

**Untersuchungen zur Regulation
der Genexpression des neuen humanen
Multidomänen-Serinproteinase-Inhibitors
LEKTI**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation

von

Dipl.- Biologin Katrin Drögemüller
geboren am 30.09.1969 in Veerßen

2004

Referent:	Prof. Dr. W. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. H.J. Mägert
Tag der Promotion	16.02.2004

Meiner Familie

Zusammenfassung: Proteinase-Inhibitoren spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation physiologischer Prozesse, da sie Proteinase-medierte Signale kontrollieren. Ein Ungleichgewicht zwischen einem Proteinase-Inhibitor und seiner Zielproteinase führt zu einer dysregulierten proteolytischen Aktivität, die pathophysiologische Effekte zur Folge haben kann. Aus diesem Grund besitzen Proteinase-Inhibitoren endogenen Ursprungs als mögliche Therapeutika ein großes Potential zur Behandlung Proteinase-induzierter Zellschädigungen. Für die gezielte Entwicklung medikamentöser oder genterapeutischer Strategien sind umfassende Kenntnisse über den Inhibitor wie regulatorische Mechanismen der Inhibitor-Genexpression notwendig. Daher war das Ziel dieser Dissertation die Aufklärung regulatorischer Mechanismen der Genexpression des Proteinase-Inhibitors LEKTI (lympho-epithelial Kazal-type related inhibitor), der eine wichtige Rolle in der Hauterneuerung spielt und dessen Dysregulation zur Entstehung des Netherton Syndroms führt. Zu diesem Zweck wurden anhand eines LEKTI-Genpromotorkonstrukts *in silico* Promotor-Analysen durchgeführt und deren Ergebnis gezielt nach putativen regulatorischen Sequenz-Elementen durchgemustert, die im Kontext inflammatorischer Zustände/Akute Phase eine zentrale Rolle spielen. Anschließend wurde die Funktionalität der ausgewählten Bindungs-Elemente für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT-3, Lyf-1 und NFAT innerhalb des LEKTI-Genpromotors in Luziferase-Reportergen-Assays, quantitativen Real-Time PCR-Analysen und Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien untersucht. Die korrespondierenden Ergebnisse der verschiedenen Experimente charakterisieren das LEKTI-Gen als ein NF- κ B- und IL-6/STAT-3-reguliertes Gen, dessen Expression in lymphatischen Geweben durch die Regulatoren NFAT und Lyf-1 koordiniert wird. Daneben konnte ein aktivierender Einfluss des Proteinase-aktivierten Rezeptors-2 (PAR-2), der u.a. von den LEKTI-Zielproteinasen Trypsin, SCCE (Stratum Corneum chymotryptic Enzyme) und SCTE (Stratum Corneum tryptic Enzyme) aktiviert wird, auf die Expression des LEKTI-Gens bestimmt werden. Die Ergebnisse bestätigen die protektive Funktion des Inhibitors LEKTI in lympho-epithelialen bzw. mukösen Geweben.

Schlagworte: Proteinase-Inhibitoren – LEKTI – Netherton Syndrom – Genexpression – NF- κ B – STAT-3 – NFAT – PAR-2

Summary: Proteinase inhibitors play a crucial role in the regulation of physiological processes because they control proteinase-mediated signals. An imbalance between a proteinase inhibitor and its target-proteinase leads to dysregulated proteolytic activities which can cause pathophysiological effects. Consequently, endogenous proteinase inhibitors are potential therapeutics for the treatment of proteinase induced cell damages. For strategies of medicamentous or gene-therapeutic treatment, a comprehensive knowledge of the inhibitor itself as well as of regulatory mechanisms of gene expression is necessary. Therefore, the goal of the presented work was the uncovering of yet unknown gene regulation mechanisms of the inhibitor LEKTI which plays an important role in skin regeneration processes. Furthermore, dysregulation of LEKTI causes the Netherton syndrome, a severe skin disease. For this purpose, *in silico* promoter analyses based on a LEKTI genepromoter construct were performed and selectively screened for putative regulatory sequence elements which play a central role in inflammatory conditions/acute phase (AP). Subsequently, the functionality of the selected binding sites for the transcription factors NF- κ B, STAT-3, Lyf-1 and NFAT within the LEKTI gene promoter was examined by means of luciferase reportergene assays, quantitative real-time PCR analyses and transcription factor binding studies. The corresponding results show that LEKTI is a NF- κ B- and IL-6/STAT-3-regulated gene, which expression in lymphatic tissues is specifically coordinated by NFAT and Lyf-1. Additionally, an activating influence of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2) which itself is activated by the LEKTI target proteinases trypsin, SCCE (stratum corneum chymotryptic enzyme) and SCTE (stratum corneum tryptic enzyme) of the expression of the LEKTI gene was determined. The results confirm the protective function of the inhibitor LEKTI in lympho epithelial and/or mucous tissues.

Key words: proteinase inhibitors – LEKTI – Netherton Syndrome – gene expression – NF- κ B – STAT-3 – NFAT – PAR-2

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Acc.-No.	Nummer einer Nukleotidsequenz, die in GenBank hinterlegt wurde
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
et al.	et altera
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish-peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IL-6	Interleukin-6
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Vollmedium
min	Minute/n
M	Molar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MUT	Mutante
nt	Nukleotide
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentium hydrogenii
PKA	Proteinkinase A (cAMP-dependent protein kinase)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (definierte Einheiten)
üN	über Nacht
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

Zur Abkürzung von Aminosäuren und Nukleotiden wurde die Einbuchstaben-Nomenklatur verwendet.

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. EINLEITUNG	4
1.1 Proteinasen.....	5
1.1.1 Serinproteinasen.....	5
1.2 Serinprotease-Inhibitoren.....	7
1.2.1 Kazal-Typ-Inhibitoren	8
1.2.2 Der humane Multidomänen-Serinprotease-Inhibitor LEKTI.....	9
1.3 Pathophysiologie der Serinproteinasen und ihrer Inhibitoren.....	10
1.4 Regulation der Genexpression	12
1.4.1 RNA-Polymerase II-Genpromotoren.....	12
1.5 Transkriptionsfaktoren	16
1.5.1 NF- κ B	18
1.5.2 STAT-3	20
1.5.3 NFAT	22
1.6 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)	24
1.7 Ziel der Arbeit.....	27
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen.....	28
2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen.....	29
2.1.2 Geräte und Apparaturen.....	29
2.1.3 Oligonukleotide.....	30
2.1.4 Kits.....	30
2.1.5 DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen	30
2.1.6 Plasmidvektoren und Organismen	31
2.1.7 Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung	31
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden.....	31
2.2.1 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	32
2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.4 Ligation	33
2.2.5 Herstellung transformationskompetenter Zellen.....	35
2.2.6 Transformation von Plasmidvektoren in transformationskompetente Zellen.....	36
2.2.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	37
2.2.8 Maxi-Präparation von endotoxinfreier Plasmid-DNA	38
2.2.9 Arbeiten mit RNA.....	39
2.2.9.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen.....	39
2.3 Sequenzierung.....	40
2.3.1 Aufreinigung der Sequenzierproben mittels DNA-Präzipitation	41
2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
2.4.1 Standard-PCR	43
2.4.2 RT-PCR	43
2.4.3 Quantifizierung von Transkripten mittels Real-Time PCR (<i>TaqMan</i>)	44
2.4.3.1 Quantifizierung der endogenen Expression der Zielmoleküle.....	47
2.4.3.2 Quantifizierung von LEKTI in humanen Geweben	48
2.5 Allgemeine Zellkulturtechniken	49
2.5.1 Zelllinien und Kultivierung.....	49
2.5.2 Kultivierung humaner Zellen	50
2.5.3 Zellzahlbestimmung.....	51
2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	51
2.6 Stimulation von Zellen.....	52
2.6.1 Stimulation zu Untersuchungen der Induzierbarkeit der Transkriptionsrate des LEKTI-Gens	52
2.6.2 Stimulation zu Untersuchungen der Reporterogenaktivität der LEKTI-Genpromotor- teilfragmente	53

2.6.3	Stimulation zur Isolierung von aktiven Kernproteinen.....	53
2.7	Transfektion.....	54
2.7.1	Transiente Transfektion von adhären Zellen.....	54
2.8	Reporteranalyse.....	55
2.8.1	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	56
2.8.1.1	Messung der Luziferase-Aktivität.....	57
2.8.1.2	Messung der β -Galactosidaseaktivität.....	57
2.8.2	Bestimmung der Reporteraktivität.....	58
2.9	Herstellung von Kernextrakten.....	59
2.10	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	60
2.11	Analyse von DNA-Protein-Interaktionen.....	61
2.11.1	ELISA.....	61
2.11.2	Transcription Factor Profiling by Enzyme-Linked Immunoassay.....	61
2.11.3	Durchführung eines TF-EIA.....	63
2.12	Ca ²⁺ -Messungen mit FLIPR.....	63
2.13	Computergestützte Sequenzanalyse, Datenbankrecherche und genutzte Software.....	64
2.13.1	MatInspector.....	64
2.13.2	NCBI.....	64
3.	ERGEBNISSE.....	65
3.1	<i>in silico</i> Genpromotor-Analyse.....	65
3.2	Bestimmung der endogenen LEKTI-Genexpression humaner Zelllinien.....	67
3.3	Bestimmung der transkriptionellen Aktivität der LEKTI-Genpromotor Deletionsfragmente mittels Reporteranalyse.....	69
3.3.1	Bestimmung der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Reporter-Konstrukte.....	70
3.3.2	Bestimmung der Reporter-Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Deletions- fragmente in Abhängigkeit definierter Stimuli.....	72
3.3.3	Bestimmung der Aktivität des putativen NF- κ B-Motivs innerhalb des Genpromotor-Deletionsfragments LEKTI II.....	78
3.4	Untersuchung der Induzierbarkeit der Transkription des LEKTI-Gens mittels quantitativer Real-Time-PCR („TaqMan“).....	79
3.5	„Multiple Transcription Factor Profiling by Enzyme-Linked immunoassay (TF-EIA)“.....	82
3.5.1	„Primer-Design“ zur Herstellung der dsDNA.....	83
3.5.2	Bestimmung der Funktionalität des putativen NF- κ B-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	86
3.5.3	Bestimmung der Spezifität der verwendeten primären Antikörper.....	88
3.5.4	Bestimmung der Funktionalität der zwei putativen IL-6REs innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	88
3.5.4.1	Bestimmung der Funktionalität des distalen putativen IL-6RE I innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	89
3.5.4.2	Bestimmung der Funktionalität des proximalen putativen IL-6RE II innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	90
3.5.5	Bestimmung der Funktionalität der putativen Bindungsmotive der lymphozytären Transkriptionsfaktoren NFAT und LyF-1 innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	90
3.5.5.1	Bestimmung der Funktionalität des putativen LyF-1-Bindungsmotivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	91
3.5.5.2	Bestimmung der Funktionalität der putativen NFAT-Bindungsmotive I und II innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	92
3.5.5.3	Untersuchung des Bindungsverhaltens des Transkriptionsfaktors NFAT an das funktionale NF- κ B-Bindungsmotiv innerhalb des LEKTI-Genpromotors.....	93

3.6	Untersuchung potentieller genregulatorischer Interaktionen zwischen dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI und dem Proteinase-aktivierten Rezeptor-2 (PAR-2).....	95
3.6.1	Bestimmung der endogenen PAR-2-Genexpression in humanen Zelllinien	95
3.6.2	Überprüfung der Funktionalität der PAR-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche	97
3.6.3	Untersuchung genregulatorischer Interaktionen zwischen dem aktivierten PAR-2-Rezeptor und dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI mittels quantitativer Real-Time-PCR („TaqMan“).....	98
4.	DISKUSSION	101
4.1	<i>in silico</i> Genpromotoranalysen	101
4.2	Ist das LEKTI-Gen ein NF- κ B-reguliertes Gen?	102
4.3	Ist das LEKTI-Gen ein IL-6-responsives Gen?	107
4.4	Ist der aktivierte PAR-2-Rezeptor an der Regulation der LEKTI-Genexpression beteiligt?	110
4.4.1	Welchen Einfluss hat der aktivierte PAR-2-Rezeptor auf die Regulation der LEKTI-Genexpression in Hepatozyten?	116
4.5	Die Transkription des LEKTI-Gens ist ein Zusammenspiel interagierender Faktoren	117
4.6	Perspektiven.....	121
5.	ZUSAMMENFASSUNG	123
6.	LITERATUR.....	125
7.	ANHANG	142

1. EINLEITUNG

Proteolytische Prozesse sind von großer Bedeutung für essentielle Lebensfunktionen und werden von Proteinasen katalysiert. Sie bewirken nicht nur den Proteinabbau in den Zellen und Körperflüssigkeiten, sondern sind auch für die Regulation biochemischer Stoffwechselfvorgänge, Zyklen und Kaskaden unentbehrlich. Daneben stellen proteolytische Prozesse eine Art der posttranslationalen Modifikation dar. Als Beispiel sei die proteolytische Abspaltung sekretorischer Signalpeptide genannt. Viele Proteine wie beispielsweise die Verdauungsenzyme Chymotrypsin und Trypsin werden als inaktive Vorstufen (Propeptide, Zymogene) synthetisiert, die dann unter geeigneten Bedingungen durch eine gezielte Proteolyse aktiviert werden. Diese Proteolyse muß strengen Kontrollmechanismen unterliegen, da es sonst zu unkontrollierten proteolytischen Aktivitäten kommen kann. Aus diesen unkontrollierten Aktivitäten können pathophysiologische Effekte in Form von Zell- und Gewebsdegradationen entstehen, aus denen sich Krankheiten wie Krebs, Asthma oder entzündliche Dermatosen entwickeln können (SEIFE, 1997; STEINHOFF *et al.*, 1999). Die notwendige Kontrolle bzw. Regulation der proteolytischen Aktivitäten wird unter anderem durch die Präsenz der Proteinase-Inhibitoren, den negativen Regulatoren der Proteinasen, gewährleistet. Daneben findet in jeder Zelle ein ständiger Abbau und eine Synthese von Proteinen statt, um die Mengen und derart die Aktivitäten der Proteine rasch dem physiologischen Bedarf anzupassen. Dabei unterliegen sowohl die konstitutiven als auch die induzierbaren Proteine strengen Regulationsmechanismen, die auf folgenden Ebenen stattfinden:

- (i) transkriptionale Ebene
- (ii) posttranskriptionale bzw. translationale Ebene
- (iii) posttranslationale Ebene

Die Regulation auf transkriptionaler Ebene erfolgt durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die nukleäre DNA („Gen-Promotor“), auf posttranskriptionaler Ebene bzw. translationaler Ebene durch die Modulation der mRNA-Stabilität und alternatives Spleißen sowie auf posttranslationaler Ebene durch Protein-Modifikationen (BEATO *et al.*, 1997; LEMON *et al.*, 2000; ORPHANIDES *et al.*, 1996).

1.1 Proteinasen

Proteinasen (Peptidasen) hydrolysieren Peptidbindungen innerhalb von Proteinen und Peptiden (Proteolyse) und zählen daher gemäß der internationalen Enzymnomenklatur zu den Hydrolasen. Die genaue Anzahl der Proteinase ist bis jetzt unbekannt. SOUTHAN und Mitarbeiter (2001) mutmaßen, dass etwa 1,8 % der menschlichen Gene für Proteinase kodieren. Das bedeutet, dass bei einer angenommenen Anzahl von ca. 30 000 kodierenden Genen (LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001) hochgerechnet etwa 550 Proteinase existieren. Für die wachsende Menge an beschriebenen Proteinase ist daher eine eindeutige Klassifizierung notwendig. Dazu werden die Proteinase nach drei Gesichtspunkten eingeteilt.

Aufgrund ihrer Lokalisation im Organismus kann zwischen extrazellulären Proteinase, die im Blut bzw. Körperflüssigkeiten zirkulieren und intrazellulären, die primär in den Lysosomen lokalisiert sind, differenziert werden. Ferner kann, in Abhängigkeit des Ortes ihres enzymatischen Substrat-Angriffs, eine Einteilung in Exo- bzw. Endopeptidasen vorgenommen werden. Exopeptidasen spalten meistens einzelne Aminosäurereste vom Amino- bzw. Carboxy-Terminus einer Proteinkette ab. Im Gegensatz dazu spalten Endopeptidasen wie beispielsweise Serinproteinase selektiv Bindungen zwischen bestimmten (definierten) Aminosäuren im Inneren von Proteinen.

Das primäre Unterscheidungskriterium ist jedoch die reaktive Gruppe Aminosäure innerhalb des aktiven Zentrums der Proteinase, das in der internationalen Enzymnomenklatur als Ausgangspunkt für die Einteilung der Proteinase in vier Klassen genutzt wird (LASKOWSKI *et al.*, 1980).

- (i) Serinproteinase
- (ii) Cysteinproteinase
- (iii) Carboxyproteinase
- (iv) Metalloproteinase

Da die Zielproteinase(n) des im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Inhibitors LEKTI Serinproteinase sind, wird diese Klasse im folgenden näher erläutert (1.1.1).

1.1.1 Serinproteinase

Das Kennzeichen aller Serinproteinase (Tab. 1.1) ist ein hochreaktiver Serinrest im aktiven Zentrum, der für die spezifische Spaltung der Peptidbindung im Substrat ausschlaggebend ist. Neben dieser Gemeinsamkeit besitzen die Serinproteinase ein breites Spektrum an

Funktionen. Dazu zählen u.a. die Prozessierung von Hormonen oder die Blutgerinnung und Fibrinolyse (ROBERTS *et al.*, 1995; STEUBE *et al.*, 1988).

Im Blut sind neben den Proteinasen des Gerinnungs- und fibrinolytischen Systems weitere proteolytische Enzyme zu finden. In inflammatorischen Zuständen werden ebenfalls körpereigene Proteinase wie Elastase durch Zellen des Immunsystems freigesetzt. Elastase hydrolysiert alle wesentlichen Komponenten des Bindegewebes (z.B. Elastin), weiterhin Hämoglobin, Fibrin und Casein. Die Leukozyten-Elastase wird als ein inaktives Zymogen (Proelastase) synthetisiert, in den Lysosomen gespeichert und bei Bedarf in das Blutplasma oder in das Gewebe sekretiert. Die primäre physiologische Funktion des Enzyms liegt in der Immunabwehr, wo ihr bei der Eliminierung von phagozytierten Abbauprodukten sowie bei der Infektabwehr eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird. Daneben besitzt die Elastase eine entscheidende Aufgabe beim kontrollierten Abbau von funktionsgeschädigtem Bindegewebe (JANOFF, 1985).

Tabelle 1.1
Auswahl von Serinproteinasen aus der Exspasy-Datenbank (www.exspasy.ch/enzyme).

Klasse 3:	Hydrolasen
3.4	Peptidasen
3.4.21	Serinproteinasen (Endopeptidasen)
3.4.21.1	α -Chymotrypsin
3.4.21.4	Trypsin
3.4.21.5	Thrombin
3.4.21.7	Plasmin
3.4.21.10	Acrosin
3.4.21.19	Endoproteinase Glu-C
3.4.21.34	Plasma-Kallikrein
3.4.21.35	Gewebe-Kallikrein
3.4.21.36	Elastase (Pankreas)
3.4.21.37	Elastase (Leukozyten)
3.4.21.59	Tryptase
3.4.21.68	Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA)
3.4.21.x*	Stratum corneum chymotryptic Enzyme (SCCE) Kallikrein-like 2 (KLKL2)
3.4.21.x*	Stratum corneum tryptic Enzyme (SCTE) Kallikrein-like 5 (KLKL5)

* Noch nicht in die Datenbank aufgenommen.

Die Vielzahl der Serinproteinasen mit ihrem breiten Funktionspektrum bedingen die Existenz einer ebenso breiten Vielfalt von spezifischen Serinproteinase-Inhibitoren zur Kontrolle der proteolytischen Aktivität (1.2).

1.2 Serinproteinase-Inhibitoren

Serinproteinase-Inhibitoren sind an vielen biochemischen Prozessen wie der Blutgerinnungskaskade oder der Immunantwort regulatorisch beteiligt (ROBERTS *et al.*, 1995). Da sie spezifisch die proteolytische Aktivität ihrer Zielproteinase(n) regulieren, ist ihr Genexpressionsmuster oft an das ihrer Zielproteinase gekoppelt. So wird beispielsweise das Gen für den humanen Akrosin-Inhibitor HUSI-II, dessen Zielproteinase Akrosin eine spermatidenspezifische Expression aufweist, nur im Hoden und in der Epididymis exprimiert (MÖRITZ *et al.*, 1991; NAYERNIA *et al.*, 1994). Auch der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI ist an dieser Stelle zu nennen. Der lympho-epithelial exprimierte Inhibitor LEKTI hemmt die Serinproteinasen SCTE und SCCE (EGELRUD *et al.*, submitted; EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003), die in der Haut auf einem hohen Niveau exprimiert werden (BRATTSAND *et al.*, 1999; HANSSON *et al.*, 1994). Alle bisher bekannten, humanen Serinproteinase-Inhibitoren sind Proteine und reagieren nach einem Standardmechanismus. Die Inhibitoren besitzen spezifische Kontaktregionen, die mit den aktiven Zentren der Zielproteinasen interagieren und derart als Substratanaloga eine hohe Substratspezifität aufweisen. Durch die sterische Hinderung unterbinden sie den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum ihrer Zielproteinase (ROBERTS *et al.*, 1995). Die Bildung des stabilen Komplexes zwischen dem Inhibitor und seiner Zielproteinase erfolgt schnell. Bei einer irreversiblen Hemmung wird der Enzymkomplex in der Leber aus dem Blutkreislauf entfernt. Im Falle einer temporären Hemmung erlangt das Enzym nach einiger Zeit seine Aktivität wieder (LASKOWSKI *et al.*, 1980; Bode *et al.*, 1992).

Die Anzahl der bis dato beschriebenen Serinproteinase-Inhibitoren ist groß. Auf Grundlage von Sequenzhomologien und Lage der intramolekularen Disulfidbrücken teilen BODE und Mitarbeiter (1992) die Inhibitoren in 16 Familien ein. In der Tabelle 1.2 sind einige ausgewählte Beispiele in Anlehnung an ROBERTS und Mitarbeiter (1995) aufgeführt.

Tabelle 1.2
Auswahl humaner Serinproteinase-Inhibitoren und deren Zielproteinase(n) in Anlehnung an ROBERTS und Mitarbeiter (1995). Alternative Bezeichnungen der Inhibitoren sind ebenfalls angegeben.

Inhibitor-Familie	Zielproteinase(n)
Serpine	
α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) α_1 -Antiproteinase, α_1 -Proteinaseinhibitor	Trypsin, Elastase
α_1 -Antichymotrypsin (ACT)	Chymotrypsin, Elastase, Cathepsin G, Chymase
Antithrombin (AT) Antithrombin III (AT III)	Blutgerinnungsproteinasen (z.B. Thrombin, Faktor Xa)
Plasminogen activator inhibitor-1/ -2 (PAI-1/-2)	t-PA (tissue type plasminogen activator), u-PA (urokinase type plasminogen activator)
Kunitz-Typ	
Basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI); Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (TKI); Aprotinin; Pancreatic Kunitz Inhibitor	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein
Leukoproteinase-Typ	
SKALP / Elafin (Skin-derived antileukoprotease) Elastase spezifischer Inhibitor	Elastase, Proteinase-3, Trypsin
Antileukoprotease (ALP); MPI; Sekretorischer Leukozyten Protease-Inhibitor (SLPI); Human seminal inhibitor:(HUSI-I)	Elastase, Cathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin
Kazal-Typ	
Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) Tumor-associated trypsin inhibitor (TATI)	Trypsin
Human seminal inhibitor (HUSI-II)	Acrosin
LEKTI (lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor)	Trypsin, SCCE (Stratum corneum chymotryptic Enzyme) SCTE (Stratum corneum tryptic Enzyme)

Nachfolgend wird die Familie der Kazal-Typ-Inhibitoren erläutert, der LEKTI angehört (1.2.1).

1.2.1 Kazal-Typ-Inhibitoren

Die Familie der Kazal-Typ-Inhibitoren wurde nach KAZAL, dem Entdecker des bovinen sekretorischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (PSTI) benannt (KAZAL *et al.*, 1948). Ihr Kennzeichen ist eine konservierte 6-Cystein-Struktur. Kazal-Typ-Inhibitoren besitzen unterschiedliche Anzahlen dieser charakteristischen Kazal-Inhibitor-Hemmdomäne. Der Inhibitor PSTI enthält beispielsweise eine, der Inhibitor LEKTI zwei und der Ovoinhibitor des Huhnes sieben dieser Hemmdomänen (ROBERTS *et al.*, 1995; MÄGERT *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 1987).

1.2.2 Der humane Multidomänen-Serinproteinase-Inhibitor LEKTI

Im Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung konnten zwei unbekannte Peptide aus Hämofiltrat isoliert werden, die aufgrund ihrer molaren Masse als „HF 6478“ (6478 Da) und „HF 7665“ (7665 Da) bezeichnet wurden. Zur genaueren Charakterisierung dieser Peptide erfolgten umfangreiche molekularbiologische Arbeiten, in denen eine humane cDNA aus Vaginalepithel generiert wurde (MÄGERT *et al.*, 1999, KREUTZMANN, 2000). Diese cDNA (7.1) kodiert für ein Protein, das aus 1064 Aminosäuren besteht und sich in 15 Domänen einteilen läßt, wobei die Peptide „HF 6478“ und „HF 7665“ die Domänen 1 bzw. 6 darstellen. Dreizehn dieser Domänen zeigen ein 4-Cystein-Muster (Domäne 1 und 3 bis 14), zwei weitere Domänen enthalten sechs Cysteinreste (Domäne 2 und 15) und entsprechen je einer Kazal-Inhibitor-Hemmdomäne. Das entsprechende Protein stellt daher einen Multidomänen-Serinproteinase-Inhibitor dar (Abb. 1.1).

Signal peptid:	<u>MKIATVSVLLPLALCLIQDAAS</u>	22
Domäne 1:	<u>KNEDQEMCHEFQAFMKNGLFC</u> <u>PQDKKPFQSLDGMFINKCATCKMILEKEAKSQKR</u>	79
Domäne 2:	ARHLARAPKATAPTELNCDDFKKGGERDGFICPDYYEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSCEGCKSSN	155
Domäne 3:	PEQDVCSAFRPFVRDGRGLGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKAEENAKREGETRIRRN	219
Domäne 4:	AEKDFCKEYKQVRNGLRFLCTRESDPVVRGPDGRMHGNKCALCAEIKRRFSEENSKTDQNLGKAEKTKVKR	291
Domäne 5:	EIVKLCQYONQAKNGILFCTRENDPIRGPDKMHGNLCSMCQAYFQAEENEKKAARARNKR	355
Domäne 6:	<u>ESGKATSYAELCNEYRKLVRNGKLACTRENDPIQGGDKVHGNTCSMCQEVFFQAEENEKKAARARNKR</u>	425
Domäne 7:	QSKSTASFEELCSEYRKSRLKNGRFLCTRENDPIQGGDKMHGNLCSMCQAEFFQAEERARAKAKR	489
Domäne 8:	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPRVGPDKMHGNKCAMCASVFKLEEBEKKNDKEKGVKVEAEVKR	560
Domäne 9:	EAVQELCSEYRHYVRNGLRPLCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCQAEFFQAEKERAEPRAKVKR	625
Domäne 10:	EAEKETCDEFRRLLQNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEDQRN	689
Domäne 11:	AAGHGSSGGGGNTQDECAEYQEQMKNGLRSLCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEYSRSRN	763
Domäne 12:	GTGSESGKDTCEFRSQMKNGLICTRESDPVVRGPDGKTHGNKCTMCKEKLEREAEEKKKEDEDRSN	831
Domäne 13:	TGERSNTGERSNDKELCREFRSMQNGKLICTRENNPVRGPGYKMHINKCAMQOSIFDREANERKKKDEKSSSKPSN	910
Domäne 14:	NAKDCSEFRNYIRNNELICTPRENDPVHGADGKPYTNKCYMCRAVELTEALERAKLQEKPSHVRASQ	977
Domäne 15:	EEDSPDSFSSLDSEMCKDYRVLPRIGYLCPKDLKPVCGDDGQTYNNPMLCHENLIRQNTNHIRSTGKCESSTPGTTAASMPPSDE	1064

Abbildung 1.1:
Aminosäuresequenz des LEKTI-Proteins (abgeleitet aus cDNA, nach MÄGERT *et al.*, 1999, KREUTZMANN, 2000). Das Signalpeptid ist unterstrichen. Die 15 Domänen sind nach ihrem Cystein-Muster (rot markiert) untereinander dargestellt. Die grau hinterlegten Bereiche zeigen Sequenzhomologien innerhalb der einzelnen Domänen. Die Peptide „HF 6478“ (1. Domäne) und „HF 7665“ (6. Domäne) sind in blau dargestellt. Zusätzlich sind gemäß der Nomenklatur die P₁ und P'₁-Aminosäuren angegeben. Die Nomenklatur der reaktiven Aminosäuren entspricht jener für Substrate: P₁ für die aminoternale und P'₁ für die carboxyterminale Aminosäure in der zu spaltenden Bindung.

Das Gen des Inhibitors konnte mittels Radiation-Hybrid-Mapping auf dem Chromosom 5q31-32 lokalisiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor LEKTI in mukösen Epithelien wie dem Vaginalepithel oder der Mundschleimhaut, in der humanen Zelllinie HaCaT (Keratinocyten) und im Thymus auf einem hohen Niveau exprimiert wird (MÄGERT *et al.*, 1999; KREUTZMANN, 2000). Daher wurde das Protein Lympho-epithelialer Kazal-Typ-verwandter Inhibitor (LEKTI) genannt. Mittels Inhibitions-Studien gelang die Identifikation der Zielproteinasen Trypsin, SCTE und SCCE (KREUTZMANN, 2000; EGELRUD *et al.*, submitted; EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003). Daneben zeigten CHAVANAS und

Mitarbeiter (2000), dass Mutationen im LEKTI- bzw. SPINK-5-Gen ursächlich für die Entstehung des Netherton-Syndroms verantwortlich sind.

1.3 Pathophysiologie der Serinproteinasen und ihrer Inhibitoren

Proteinasen spielen bereits im Verlauf der Embryogenese eine wichtige Rolle in der Regulation vaskulärer Prozesse. Später sind sie dann sowohl bei zahlreichen physiologischen (z.B. Blutgerinnung und Vasoregulation) als auch pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungen oder Wundheilung beteiligt (DERY *et al.*, 1998; MACFARLANE *et al.*, 2001). Daneben tragen Proteinasen zur Entstehung von Krankheiten wie Erkältungen, Krebs oder Asthma bei, da beispielsweise Infektionen oder andere entzündliche Prozesse zu einer erhöhten Proteinase-Ausschüttung führen können. Bleiben die daraus resultierenden, gesteigerten proteolytischen Aktivitäten unkontrolliert, können pathophysiologische Effekte in Form von Zell- und Gewebsdegradationen entstehen. Aus diesem Grunde besitzen Proteinase-Inhibitoren ein Potential für die therapeutische Behandlung von Proteinase-induzierten Zellschädigungen, die in Zusammenhang mit Entzündungen oder Infektionen auftreten können (ROBERTS *et al.*, 1995; SEIFE, 1997).

Das Lungenemphysem ist ein Beispiel für einen pathologischen Effekt, der sich aus einem Ungleichgewicht zwischen der Proteinase Elastase und ihrem spezifischen Inhibitor α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 -Antitrypsin; α_1 -Antiprotease) entwickelt. Der im Blut und in verschiedenen anderen, extrazellulären Flüssigkeiten und Geweben vorkommende α_1 -Proteinaseinhibitor schützt die Lungen vor der Wirkung von Proteinasen, die von Leukozyten und phagozytierenden Zellen zum Abbau von geschädigten Lungenzellen und infiltrierten Bakterien freigesetzt werden. Im Falle einer verminderten α_1 -Proteinaseinhibitor-Aktivität bzw. bei α_1 -Proteinaseinhibitor-mangel kann die Funktion dieser Proteinasen nicht ausreichend gehemmt werden. Dadurch werden intakte körpereigene Substanzen wie Elastin angegriffen. Dieses führt zu einem verstärkten proteolytischen Abbau der elastischen Fasern und anderer Bindegewebsproteine im Lungengewebe, was langfristig die Ausbildung eines Lungenemphysems zur Folge hat. Ein Patient mit Lungenemphysem muß kräftiger atmen, um das gleiche Luftvolumen auszutauschen, da die Alveolen weniger elastisch sind als beim Gesunden (STEUBE *et al.*, 1988; STRYER, 1999). Eine eingeschränkte α_1 -Proteinaseinhibitor-Aktivität kann genetisch bedingt sein. Mindestens 20 der mehr als 75 bekannten Allelvarianten des Inhibitor-Gens führen zu Mangelzuständen (PERLMUTTER, 1991). Die am weitesten verbreitete Mutation (>90 %) ist die Z-Mutation, bei der die Aminosäure Gly³⁴²

gegen Lys³⁴² ausgetauscht ist. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer fehlerhaften posttranslationalen Modifikation und damit zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins. Bei Trägern dieser Mutation beträgt die Serumkonzentration des α_1 -Proteinaseinhibitors nur 15 % des Normalwertes. Hinzukommt, dass diese 15 % eine verminderte inhibitorische Aktivität aufweisen. Allein in den USA sollen 100.000 Personen an α_1 -Proteinaseinhibitor-Defizienz leiden (COAKLEY *et al.*, 2001). Ein Therapieverfahren zur Behandlung dieser Defizienz ist die Verabreichung von rekombinant hergestelltem α_1 -Proteinaseinhibitor als Aerosol direkt in die Lunge (VEMURI *et al.*, 1993).

Ein anderes Beispiel für einen pathologischen Effekt, bei dem ein Ungleichgewicht zwischen einer Proteinase und ihrem spezifischen Inhibitor eine bedeutende Rolle spielt, ist das Netherton Syndrom. CHAVANAS und Mitarbeiter (2000) zeigten, dass Mutationen im LEKTI- bzw. SPINK-5-Gen ursächlich für die Entstehung des Netherton Syndroms sind. Das Netherton Syndrom ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die sich äußerlich durch eine gestörte Hauterneuerung und Haarstruktur („Bambus-Haar“) bemerkbar macht. Daneben zählen auch atopische (allergische) Dermatitis, hohe Serumspiegel an IgE und Hypereosinophilie zu dieser Erkrankung, die in ihrer Gesamtheit zu einer hohen postnatalen Mortalität führt. Da die Arbeitsgruppe um CHAVANAS in einem Patientenkollektiv verschiedene Mutationen innerhalb des LEKTI-Gen nachwies, konnte LEKTI als der erste Serinproteinase-Inhibitor benannt werden, dem eine Funktion in der Hauterneuerung zuzuschreiben ist. WALLEY und Mitarbeiter (2001) lokalisierten weitere Mutationen innerhalb des LEKTI-Gens, wobei das Patientenkollektiv dieser Gruppe sowohl aus Netherton-Syndrom Patienten als auch aus Patienten mit atopischer Dermatitis, Asthma und hohen IgE-Spiegeln bestand. SPRECHER und Mitarbeiter (2001) mutmaßten, dass die pathophysiologische Rolle des Inhibitors LEKTI bei Krankheitsbildern wie dem Netherton Syndrom oder Dermatitis in der unzureichenden Regulation der für die Hautbildung und Erneuerung notwendigen Proteinase liegen könnte. Die oberste Hautschicht des Menschen (*Stratum corneum*) bildet eine wichtige Barriere gegen die Außenwelt. Sie besteht aus differenzierten und abgestorbenen Keratinozyten (Korneozyten), die alle 2 bis 4 Wochen durch proteolytische Prozesse aus dem *Stratum corneum* entfernt werden (Hauterneuerung). An diesem als Desquamation (Abschliffen) bezeichneten Prozeß sind die Proteinase Stratum corneum chymotryptic Enzyme (SCCE) und Stratum corneum tryptic Enzyme (SCTE) beteiligt. Eine Dysregulation dieser Proteinase durch ihre Inhibitoren kann zu einer ständigen Hautabschliffen führen, wie es im Krankheitsbild des Netherton-Syndroms und der Dermatitis anzutreffen ist. Die Gruppe um SPRECHER (2001) vermutete einen Zusammenhang

zwischen Mutationen innerhalb des LEKTI-Gens und der unzureichenden Regulation der für die Hautbildung notwendigen Serinproteinasen SCTE und SCCE in der oberen Hautschicht. Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass LEKTI sowohl SCTE als auch SCCE hemmt (EGELRUD *et al.*, submitted; EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003), ist es sehr wahrscheinlich, dass die Mutationen innerhalb des LEKTI-Gens zur Einschränkung der inhibitorischen Aktivität führen und derart die proteolytische Aktivität von SCCE und SCTE nicht ausreichend reguliert wird. Aus diesem Ungleichgewicht entsteht das Netherton Syndrom.

1.3 Regulation der Genexpression

Die koordinierte Entwicklung und Aufrechterhaltung der Homöostase eines Organismus setzt eine zeitlich genau definierte Expression von Genen voraus. Diese Regulation der Genexpression erfolgt auf verschiedenen Ebenen. An dieser Stelle sind Rekombinationsereignisse, Chromatinstruktur, Transkription, Regulation der RNA-Stabilität, alternatives Spleißen, Translation und posttranslationale Modifikationen zu nennen. Entscheidend für die Regulation auf transkriptionaler Ebene sind neben der Chromatinstruktur die Genpromotoren (1.4.1) mit ihren regulatorischen Elementen und die Transkriptionsfaktoren (1.5), die daran spezifisch binden (BEATO *et al.*, 1997; LEMON *et al.*, 2000; ORPHANIDES *et al.*, 1996).

1.4.1 RNA-Polymerase II-Genpromotoren

Genpromotoren sind nicht-transkribierte regulatorische DNA-Sequenz-Einheiten von variabler Größe, die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren beinhalten. Sie sind einem „Struktur-Gen“ vorgeschaltet und steuern dessen Expression. Ein „Struktur-Gen“ ist ein transkribierter DNA-Sequenz-Abschnitt, der aus definierten Exons und nicht-kodierenden Introns aufgebaut ist. Dieser gesamte DNA-Abschnitt des „Struktur-Gens“ wird im Verlauf der Transkription in heterogene (hn) RNA umgeschrieben. Die zunächst transkribierten, nicht-kodierenden Intronabschnitte werden durch das Spleißen herausgeschnitten und die Exonabschnitte als mRNA zusammengefügt. Die mRNA wird anschließend in der Proteinbiosynthese in ein Protein-Produkt translatiert (MANIATIS *et al.*, 1987; MITCHELL *et al.*, 1989; ORPHANIDES *et al.*, 1996).

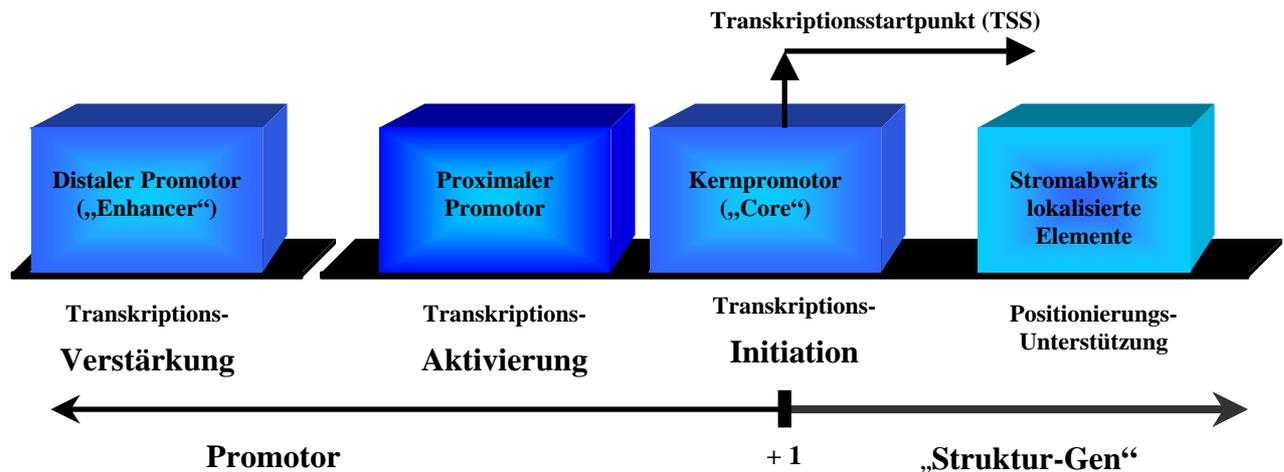


Abbildung 1.2:

Darstellung eines Genpromotor-Modells aus vier verschiedenen Abschnitten, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Der Enhancer dient der Transkriptionsverstärkung und der proximale Promotor der Transkriptionsaktivierung. Der Kernpromotor enthält den Transkriptionsstartpunkt (TSS) und ist der Ort der Transkriptions-Initiation. Stromabwärts lokalisierte, regulatorische Sequenz-Elemente haben eine unterstützende Funktion. Die gesamte regulatorische Einheit eines Genpromotors ist einem „Struktur-Gen“ vorgeschaltet (in Anlehnung an WERNER, 1999; www.gsf.de).

Die regulatorische Einheit eines Genpromotors besteht aus vier verschiedenen Abschnitten (Abb. 1.2), von denen jeder in sich (selbst) organisiert ist. Als Kernpromotor wird der unmittelbare Bereich um den Transkriptionsstartpunkt (TSS) bezeichnet (DYAN *et al.*, 1985; SMALE, 2001). Er beinhaltet alle regulatorischen Sequenz-Elemente, die für eine akkurate Initiation der Transkription (Abb. 1.3) benötigt werden (MANIATIS *et al.*, 1987). Häufig vorkommende Kernpromotor-Elemente sind beispielsweise die TATA-Box und das Initiatorelement (Inr). Die TATA-Box liegt ca. 25-30 Bp. stromaufwärts vor dem Transkriptionsstartpunkt, während der Initiator die Positionen von -3 bis +5 umfaßt. Diese beiden Elemente sind die einzigen beschriebenen, deren Abstand zum Transkriptionsstartpunkt relativ festgelegt ist (BREATHNACH *et al.*, 1981; KOLLMAR *et al.*, 1993; SMALE *et al.*, 1989).

Der proximale Promotor umfaßt den unmittelbaren Bereich vor dem Kernpromotor. In dieser Region sind Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert, die die Effizienz der Initiation erhöhen, indem sie direkt mit dem RNA-Polymerase II-Initiationskomplex interagieren (Abb. 1.3). Oftmals werden diese regulatorischen Elemente auch als UPEs (Upstream Promotor Elements) bezeichnet (MANIATIS *et al.*, 1987; MITCHELL *et al.*, 1989). Zu diesen Elementen zählt beispielsweise die CAAT-Box, die u.a von Faktoren der CTF-Familie (CAAT-binding transcription factor family) erkannt wird (ALTMANN *et al.*, 1994, NUSSINOV, 1992). Ein weiteres proximales regulatorisches Element ist die GC-Box, die

häufig in mehreren Kopien mit unterschiedlicher Orientierung vorkommt und von den GC-Box-bindenden Faktoren wie beispielsweise dem Zinkfinger-Protein SP-1 (Signal Protein-1) gebunden wird (HOLLER *et al.*, 1988; ARCOT *et al.*, 1992).

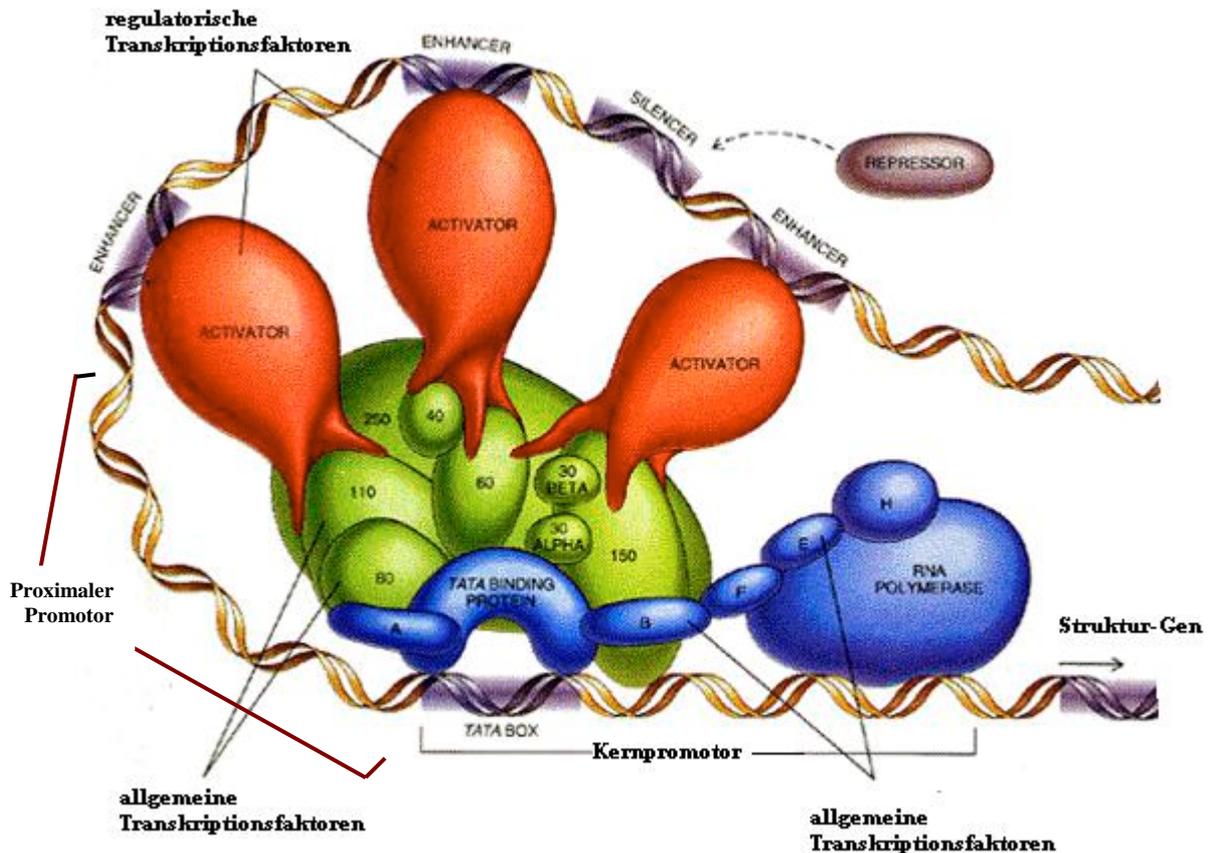


Abbildung 1.3:

Modell der Transkriptionsmaschinerie. In diesem Ausschnitt sind das „Herz“ der Maschinerie, der an den Kernpromotor gebundene Initiationskomplex aus allgemeinen Transkriptionsfaktoren (1.5) und der RNA-Polymerase II gezeigt, die mit regulatorischen Transkriptionsfaktoren (1.5) in Wechselwirkung steht. Diese regulatorischen Transkriptionsfaktoren sind an ihre spezifischen DNA-Elemente innerhalb des proximalen bzw. des distalen Genpromotors gebunden. Dieses Modell ist der Internetadresse „www.berkeley.edu/news/features/1999/12/images/09_3dsm.gif“ entnommen und modifiziert wiedergegeben.

Der distale Genpromotor (Enhancer) ist ein DNA-Sequenz-Abschnitt, der typischerweise aus einer Reihe von kurzen, oft repetitiv auftretenden regulatorischen Sequenz-Elementen zusammengesetzt ist (DYNAN, 1989). Die Wirkung eines Enhancers ist unabhängig von seiner Lage relativ zum Promotor. Enhancer-Regionen können weit vor („upstream“) dem proximalen Promoter liegen. Daneben können sie sowohl hinter („downstream“) als auch innerhalb eines „Struktur-Gens“ vorkommen. Letztere sind häufig in Introns lokalisiert (MÜLLER *et al.*, 1988). Enhancer [von engl. enhance: verstärken] enthalten regulatorische Bindungs-Elemente für Transkriptionsfaktoren, die einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription des zugehörigen „Struktur-Gens“ ausüben und werden daher oft als Aktivatoren

(1.5) bezeichnet. Gebundene Aktivatoren können eine Erhöhung der „physiologischen bzw. basalen“ Transkription bewirken (Verstärker-Effekt). Die Wirkung eines Enhancers erfolgt in analoger Weise zu der des proximalen Promotors. Die innerhalb eines Enhancers gebundenen regulatorischen Aktivatoren interagieren ebenfalls mit dem Initiationskomplex bzw. den damit assoziierten allgemeinen Transkriptionsfaktoren (Abb. 1.3). Entscheidend ist dabei die räumliche Annäherung, die das „Looping-Modell“ veranschaulicht (PTASHNE, 1986). In diesem Modell erfolgt die räumliche Annäherung durch Veränderungen der Chromatinstruktur in Form einer schlaufenförmigen Verdrängung der dazwischen liegenden DNA-Sequenz-Abschnitte. Derart werden die regulatorischen Sequenz-Elemente, die in linearer Sequenz weit voneinander entfernt liegen, in unmittelbare Nachbarschaft gebracht und die gebundenen Transkriptionsfaktoren können interagieren (GUARENTE, 1988; MANIATIS *et al.*, 1987). So ist beispielsweise im Genpromotor des Serinproteinase-Inhibitors ACT (α_1 -Antichymotrypsin) eine NF- κ B-sensitive Enhancer-Region bei -13 Kilobasenpaare „upstream“ vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert. Dieser Zytokin-induzierbare Enhancer vermittelt eine bis zu 100-fach erhöhte Transkription des ACT-Gens (KORDULA *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist das sieben Exone umfassende Gen des Serinproteinase-Inhibitors α_1 -AT (α_1 -Antitrypsin; α_1 -Proteinaseinhibitor). Dieses Gen besitzt einen „downstream“-Enhancer am 3'-Ende des fünften Exons. Dieser Enhancer kann die Transkription des α_1 -AT-Gens in Hepatozyten verdreifachen (KALSHEKER *et al.*, 2002).

Neben den regulatorischen Sequenz-Elementen, die im allgemeinen einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription haben, gibt es auch reprimierende Elemente innerhalb der Genpromotoren (Abb. 1.3). Diese „Silencer“ werden von spezifischen Transkriptionsfaktoren (Repressoren) erkannt und gebunden. Die Repressoren können die Transkription ihre Zielgene entweder direkt durch Bindung an ihr spezifisches DNA-Sequenz-Element oder indirekt durch Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren reprimieren. So können sie die Aktivierungs-Domänen anderer Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren) maskieren oder kompetitiv den Zugang von Aktivatoren bzw. anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie zur Genpromotor-DNA blockieren. Daneben können sie bereits gebundene Aktivatoren von ihren Bindungsstellen verdrängen oder die Struktur des Chromatins direkt beeinflussen (OGBOURNE *et al.*, 1998; TYLER *et al.*, 1999).

So enthält beispielsweise der distale Genpromotor des Serinproteinase-Inhibitors Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 2 (PAI-2) ein regulatorisches Sequenz-Element für den Repressor PAUSE-1. Durch die Bindung des Repressors an das DNA-Sequenz-Element wird

die Transkription des PAI-2-Gens reprimiert (OGBOURNE *et al.*, 2001). Innerhalb des Genpromotors des Serinproteinase-Inhibitors 2.3 (Spi 2.3) der Ratte sind drei repressorische Sequenz-Elemente lokalisiert, die die Transkription des Inhibitorgens stark reduzieren (PAUL *et al.*, 1998). NOURBKHS und Mitarbeiter beschrieben 1999 erstmals den Repressor NRF (NF- κ B-repressing factor), der die NF- κ B-medierte Transkriptions-Induktion von Genen unterbindet, indem er in Form von „negativen“ Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem gebundenen Faktor NF- κ B interagiert.

Die gewebsspezifische Expression eines Gens kann sowohl durch den proximalen Promotor als auch durch Enhancer vermittelt werden. So kann einerseits der proximale Promotor durch gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert sein, und ein Enhancer fördert (verstärkt) die Initiation der Transkription. Andererseits kann der proximale Promotor nur der basalen, unspezifischen Regulation unterstehen und wird erst „angeschaltet“ (aktiviert), wenn ein ihm zugeordneter Enhancer gewebsspezifisch aktiviert wird. Ferner ist zu bemerken, dass die Funktionalität eines Promotors (Abb. 1.2; 1.3) erst durch das dreidimensionale Netzwerk bzw. die koordinierte „orchestrated response“ des Chromatins, der regulatorischen DNA-Abschnitte (Genpromotor) sowie der Gesamtheit aller beteiligten Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II determiniert wird (EMERSON, 2002; HOCHHEIMER *et al.*, 2003, LEMON *et al.*, 2000).

Im folgenden Kapitel werden die Transkriptionsfaktoren näher erläutert, da sie neben den Genpromotoren eine gleichwertige Rolle bei der Regulation der Genexpression auf der transkriptionalen Ebene einnehmen (1.5).

1.5 Transkriptionsfaktoren

Die RNA-Polymerase II kann die Transkription eines humanen Gens alleine nicht initiieren. Sie ist von weiteren regulatorischen Proteinen, den Transkriptionsfaktoren abhängig. Transkriptionsfaktoren sind spezifisch DNA-bindende Proteine. Über die selektive Bindung ihres regulatorischen DNA-Sequenz-Elements innerhalb eines Genpromotors steuern sie dessen Transkription unter Einbindung der RNA-Polymerase II (MANIATIS *et al.*, 1987; MITCHELL *et al.*, 1989). Die räumlich und zeitlich differenziert auftretende Aktivität bzw. Präsenz von Transkriptionsfaktoren ist die Grundlage der differentiellen Genexpression. Sie determiniert die morphologische/ontogenetische, die gewebsspezifische und die akute bzw. dem physiologischen Zustand angepasste Expression ausgewählter Gene (BRIVANLOU *et al.*, 2002; EMERSON, 2002; KESSEL *et al.*, 1990). Die Transkriptionsfaktoren bestehen meistens

aus zwei verschiedenen funktionellen Domänen, die als DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne bezeichnet werden. Die DNA-Bindedomäne bindet an das spezifische DNA-Sequenz-Element innerhalb von Genpromotoren, und die Aktivierungsdomäne vermittelt die regulatorische Funktion. Sie kann mit anderen Transkriptionsfaktoren, der RNA-Polymerase II bzw. dem Transkriptions-Initiationskomplex oder dem Chromatin in Wechselwirkung treten (BRIVANLOU *et al.*, 2002; TJIAN *et al.*, 1994).

Die große Anzahl der Transkriptionsfaktoren kann nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Anhand der DNA-Bindungsdomänen, die oft hochkonservierten Strukturmotiven entsprechen, erfolgt die „klassische“ Einteilung der Transkriptionsfaktoren in vier Familien (LATCHMAN, 1990; MITCHELL *et al.*, 1989).

- (i) Zinkfinger-Familie
- (ii) Leucin-Zipper-Familie
- (iii) Helix-Turn-Helix-Familie
- (iv) Helix-Loop-Helix-Familie

Daneben können die Transkriptionsfaktoren in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (KRAJEWSKA *et al.*, 1992):

- (i) allgemeine Transkriptionsfaktoren GTF („general transcription factors“)
- (ii) spezifische regulatorische Transkriptionsfaktoren

Die allgemeinen Transkriptionsfaktoren (Tab. 1.3) sind unabdingbar für die exakte Initiation der Transkription. Sie bilden in einer definierten Reihenfolge den Prä-Initiationskomplex, zu dem die RNA-Polymerase II hinzutritt (BURATOWSKI, 1994; KRAJEWSKA *et al.*, 1992; ORPHANIDES *et al.*, 1996).

Tabelle 1.3
Verzeichnis der humanen allgemeinen Transkriptionsfaktoren GTF („general transcription factors“)
der RNA-Polymerase II in Anlehnung an ORPHANIDES und Mitarbeiter (1996).

Faktor	Funktion
TFII-A	Erhöhung der Bindungsaffinität von TFII-D an die TATA-Box
TFII-B	Erhöhung der Bindungsaffinität von TFII-D an die TATA-Box
TFII-D	Die Untereinheit TBP (TATA-binding-protein) bindet die TATA-Box
TFII-E	Bindung an RNA-Pol. II, Untereinheit enthält eine DNA-abhängige ATPase zur DNA-Entwindung („promotor melting“)
TFII-F	Bindung an RNA-Pol. II, eskortiert RNA-Pol. II zum TATA-Box-gebundenen TFII-D/TFII-A/TFII-B-Komplex
TFII-H	Bindung an RNA-Pol. II, Untereinheiten besitzen u.a. Helikase-Aktivität sowie Exzisionsreparatur-Aktivität (3´-5´ und 5´-3´) und Kinase-Aktivität

Gemäß dieser funktionellen Einteilung zählen alle Transkriptionsfaktoren, die nicht in der Tabelle 1.3 aufgeführt sind, zu den regulatorischen Transkriptionsfaktoren. BRIVANLOU &

DARNELL (2002) wählten die in der Abbildung 1.4 dargestellte Einteilung der „positiv-regulierenden Transkriptionsfaktoren“ (Aktivatoren).

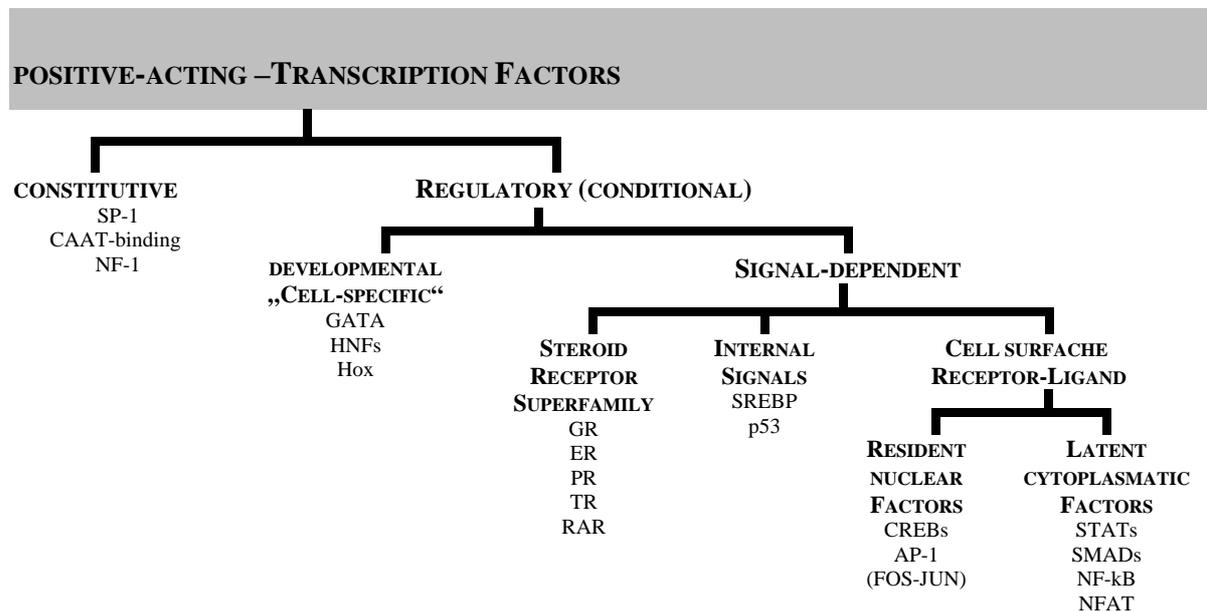


Abbildung 1.4

Funktionale Klassifizierung ausgewählter positiv-regulierender Transkriptions-Aktivatoren in Anlehnung an BRIVANLOU & DARNELL (2002). SP-1: Signal Protein-1; CAAT-binding: CAAT-Box-bindende Faktoren; NF-1: Nuclear Factor-1; HNFs: Hepatic Nuclear Factors; Hox: Homeobox-Proteins; GR: Glucocorticoid Receptor; ER: Oestrogen Receptor; PR: Progesterone Receptor; TR: Thyroid Receptor; RAR: Retinoic Acid Receptor; SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein; p53: Tumor-Suppressor-Gen p53; CREB: cAMP-responsive Element Binding Protein; AP-1: Activating Protein-1; STATs: Signal Transducers and Activators of Transkription; SMADs: Sma- and Mad-related Proteins; NF-κB: Nuclear Factor *kappa* B; NFAT: Nuclear Factor of Activated T-Cells.

Nachfolgend werden die Transkriptionsfaktoren NF-κB (1.5.1), STAT-3 (1.5.2) und NFAT (1.5.3), die gemäß der Abbildung 1.4 sämtlich zu den „signal-dependent latent cytoplasmatic factors“ zählen, näher erläutert, da diese Aktivatoren die Regulation des LEKTI-Gens maßgeblich beeinflussen (3.5).

1.5.1 NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB wurde erstmals von SEN & BALTIMORE (1986) als ein Protein identifiziert, das in reifen B-Lymphozyten an ein 10 Basenpaare umfassendes DNA-Sequenz-Element des intronischen Enhancers der leichten Kette des Immunoglobulins κ bindet. Nachfolgend konnten sie zeigen, dass dieses Protein ubiquitär verbreitet ist und sich in Zellen als Reaktion auf verschiedene exogene Stimuli die Menge an gebundenem NF-κB-Protein erhöht, obwohl keine *de novo* Synthese an NF-κB-Proteinen nachweisbar ist. Die Anzahl der Gene, deren Promotor ein NF-κB-Element beinhaltet, nimmt stetig zu. Der

inflammatorische Effekte vermittelnde „rapid response factor“ NF- κ B (SEN *et al.*, 1986) reguliert die Genexpression von Chemokinen, Interleukinen, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsproteinen und Akute-Phase-Proteinen sowohl in „gesunden“ als auch in inflammatorischen Zuständen (BALDWIN, 1996; CHEN *et al.*, 1999). Auch die Gene der Serinproteinase-Inhibitoren α_1 -Antichymotrypsin (ACT), SKALP/Elafin und Proteinase inhibitor 9 (PI-9) sind NF- κ B-responsiv (KORDULA *et al.*, 2000, BINGLE *et al.*, 2000; KANNAN-THULASIRAMAN *et al.*, 2002). NF- κ B liegt in der Mehrzahl der Zellen als Homo- oder Heterodimer aus Proteinen vor, die der rel/NF- κ B-Familie angehören und strukturell verwandte Transkriptionsfaktoren darstellen (c-rel; rel-B; p65; p100/p52; p105/p50). Die vorherrschende Form in allen Zelltypen ist das NF- κ B-Heterodimer p50/p65 (JOBIN *et al.*, 2000). Im inaktiven Zustand liegt der Faktor NF- κ B an inhibitorische I κ B-Proteine gebunden im Zytosol vor (Abb. 1.5). Infolge verschiedener exogener Stimuli wie LPS, Phorbol-Ester, Viren (z.B. HIV), Bakterien (z.B. *Helicobacter pylori*), Peroxiden, UV-Licht oder Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α) wird NF- κ B aktiviert (BALDWIN, 1996; GHOSH *et al.*, 1998).

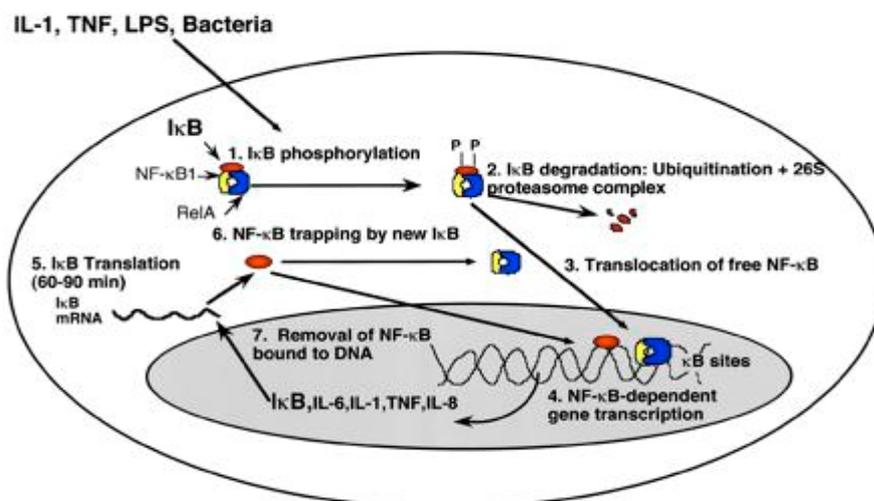


Abbildung 1.5:

Aktivierungs-Mechanismus des durch inhibitorische I κ B-Proteine sequestrierten Faktors NF- κ B im Zytosol infolge exogener Stimuli wie LPS oder TNF- α in Anlehnung an JOBIN und Mitarbeiter (2000). Der inhibitorische Proteinkomplex I κ B wird durch I κ B-Kinasen phosphoryliert und proteolytisch vom p50/p65-Komplex durch das 26S-Proteasom abgebaut. Der freie, aktivierte Faktor transloziert in den Zellkern und bindet sein regulatorisches DNA-Sequenz-Element („ κ B sites“) innerhalb von Promotoren. Diese Bindung bewirkt eine schnelle Induktion der Transkription des jeweiligen Gens. Unter den Zielgenen befinden sich ebenfalls die Gene der inhibitorischen I κ B-Proteine. Diese werden unmittelbar durch die Proteinbiosynthese generiert, um die zytoplasmatischen Pools an inaktiven NF- κ B-Komplexen wieder herzustellen sowie die an „ κ B-Sites“ gebundenen aktiven NF- κ B-Proteine zu inaktivieren und aus dem Zellkern zu schleusen.

Zur Aktivierung von NF-κB (Abb. 1.5) wird der inhibitorische Proteinkomplex IκB durch IκB-Kinasen phosphoryliert und proteolytisch vom p50/p65-Komplex durch das 26S-Proteasom abgebaut. Der freie, aktivierte Faktor transloziert in den Zellkern, bindet sein regulatorisches DNA-Sequenz-Element („κB sites“) innerhalb von Promotoren und induziert schnell die Transkription des jeweiligen Gens. Unter den Zielgenen befinden sich ebenfalls die Gene der inhibitorischen IκB-Proteine. Diese werden unmittelbar durch die Proteinbiosynthese generiert, um die zytoplasmatischen Pools an inaktiven NF-κB-Komplexen wieder herzustellen sowie die an „κB-Sites“ gebundenen aktiven NF-κB-Proteine zu inaktivieren und aus dem Zellkern zu schleusen (JOBIN *et al.*, 2000).

1.5.2 STAT-3

Der Transkriptionsfaktor STAT-3 wurde erstmals von WEGENKA und Mitarbeitern (1993) als ein Protein beschrieben, das an Promotoren von Genen bindet, die für Akute-Phase-Antwort-Proteine kodieren. Daher wurde dieses regulatorische Protein als APRF („Acute Phase Response Factor“) bezeichnet. Ein Jahr später zeigte diese Arbeitsgruppe, dass das APRF-Protein zur Familie der STAT-Proteine („Signal Transducers and Activators of Transcription“) zählt (WEGENKA *et al.*, 1994). Die STAT-Familie umfasst sechs bzw. acht verschiedene zytoplasmatische Proteine (Tab. 1.4), deren Funktion als ein „second messenger“ die intrazelluläre Weiterleitung eines Zytokin-Rezeptor-vermittelten Signals ist (DARNELL, 1997; HEINRICH *et al.*, 1998).

Tabelle 1.4:
Verzeichnis der Mitglieder der STAT-Familie („Signal Transducers and Activators of Transcription“), ihrer Aktivatoren, Verbreitung und einer Auswahl von Zielgenen (DARNELL, 1997; EHRET *et al.*, 2001; HEIM, 1999; HEINRICH *et al.*, 1998), GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor; Tpo: Thrombopoetin; EGF: Epidermal Growth Factor; G-CSF: Granulocyte Colony-stimulating Factor; IFN: Interferon; IL: Interleukin.

	Zytokin/Aktivator	Verbreitung	Ausgewählte Zielgene	Referenz
STAT-1α STAT-1β	IFN-γ	ubiquitär	ICAM-1	CALDENHOVEN <i>et al.</i> , 1994
STAT-2	IFN-α, IFN-β (with STAT-1) ¹	ubiquitär	IFN-α	LI <i>et al.</i> , 1996

¹ STAT-2 bindet immer als Heterodimer mit STAT-1

STAT-3	IL-6, Prolactin, EGF, G-CSF	ubiquitär	α_2 -Makroglobulin Serinproteinase-Inhibitor 3 α_1 -Antitrypsin (AAT) Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) Sekretorischer Leukozyten Protease-Inhibitor (SLPI)	ZHANG <i>et al.</i> , 2001 KORDULA <i>et al.</i> , 1996b MORGAN <i>et al.</i> , 2002 YASUDA <i>et al.</i> , 1993 ABE <i>et al.</i> , 1991
STAT-4	IL-12	Thymus Hoden	IFN- γ	EHRET <i>et al.</i> , 2001
STAT-5A STAT-5B	IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-15, GM-CSF, Tpo	ubiquitär	Rat Serine Protease Inhibitor 2.1 (Spi 2.1)	BERGARD <i>et al.</i> , 1995
STAT-6	IL-3, IL-4, IL-13	ubiquitär	Interleukin-4 Interleukin-4-Rezeptor	HEIM, 1999 KOTANIDES <i>et al.</i> , 1996

Der ubiquitäre „Transkriptions-Aktivator“ STAT-3 ist an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt. Dazu zählen beispielsweise die Embryogenese, die Proliferation und Differenzierung der Epidermis und die Akute-Phase-Antwort (DARNELL, 1997; LEVY *et al.*, 2002). STAT-Proteine sind sequestrierte zytoplasmatische Monomere, die auf ein spezifisches Signal aktiviert werden. So wird beispielsweise STAT-3 unter anderem durch das Zytokin Interleukin-6 aktiviert (Abb. 1.6)

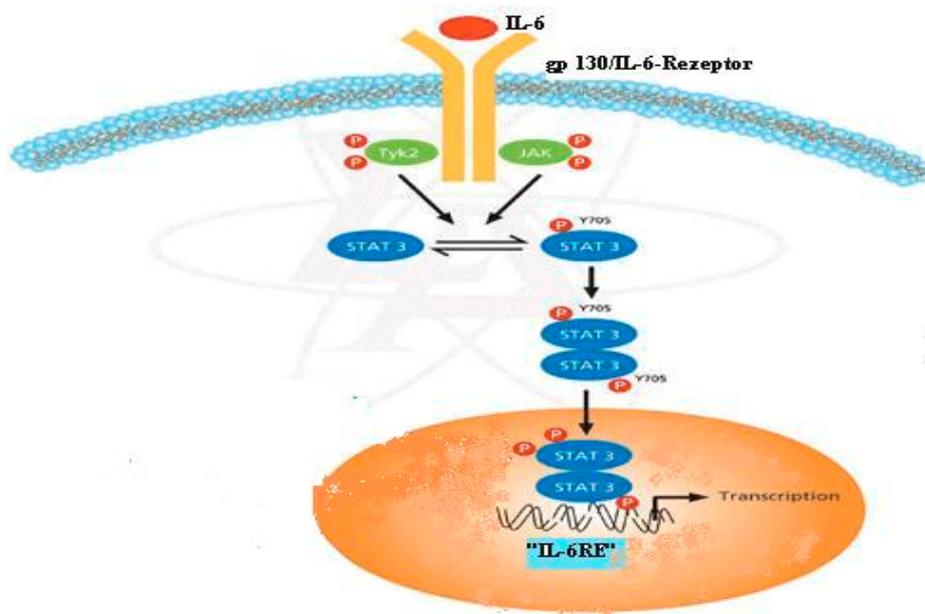


Abbildung 1.6:

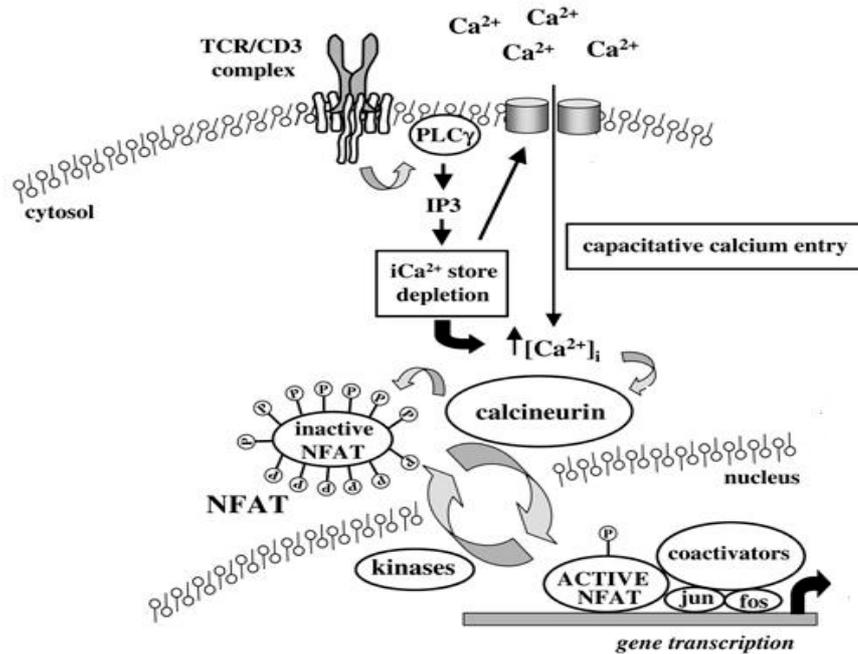
Modell der Aktivierung der sequestrierten zytoplasmatischen STAT-3-Monomere durch das Zytokin IL-6 bzw. dessen Rezeptor gp130. Die Bindung des Zytokins IL-6 an seinen Rezeptor gp130 führt zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (JAK), die daraufhin einen spezifischen Tyrosinrest (T705) der STAT-3-Monomere phosphorylieren. Die „aktivierten“ STAT-Monomere dimerisieren und translozieren in den Zellkern. Dort binden sie an ihr spezifisches regulatorisches DNA-Sequenz-Element („IL-6RE“) innerhalb von Promotoren und modulieren die Transkription des dazugehörigen Gens (DARNELL *et al.*, 1997; HEINRICH *et al.*, 1998). Die Original-Abbildung ist der Internetadresse „www.sigmaaldrich.com/STAT3_Signaling_Pathway.html“ entnommen und modifiziert wiedergegeben.

Die Bindung des Zytokins IL-6 an seinen Rezeptor gp130 führt zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (JAK), die daraufhin einen spezifischen Tyrosinrest (T705) der STAT-3-Monomere phosphorylieren. Die „aktivierten“ STAT-Monomere dimerisieren und translozieren in den Zellkern. Dort binden sie an ihr spezifisches regulatorisches DNA-Sequenz-Element („IL-6RE“) innerhalb von Promotoren und modulieren die Transkription des dazugehörigen Gens (DARNELL *et al.*, 1997; HEINRICH *et al.*, 1998).

1.5.3 NFAT

Die NFAT-Proteine konnten durch ihre Bindung an das regulatorische DNA-Motiv ARRE-2 (Antigen Receptor Response Element) innerhalb des IL-2-Genpromotors sowie an eine homologe Region innerhalb des HIV LTR (Human Immunodeficiency Virus Long-Terminal Repeat) als Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (SHAW *et al.*, 1988; NABEL *et al.*, 1987). Mittlerweile sind fünf Mitglieder dieser Transkriptionsfaktor-Familie (NFAT 1-5) bekannt, die durch alternatives Spleißen weitere Isoformen hervorbringen können. Da ihre DNA-Bindungsdomäne eine Homologie zu der Bindungsdomäne der Rel-Familie (1.5.1) aufweist, können NFAT- und NF- κ B-Proteine an ähnliche DNA-Sequenz-Elemente binden (SICA *et al.*, 1997). Die NFAT-Gene werden hauptsächlich in lymphatischen Geweben wie Thymus, Milz, T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Transkription von Genen im Verlauf der Immunantwort. Dazu zählen beispielsweise γ -Interferon und die Interleukine IL-2, IL-3, -IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (MASUDA *et al.*, 1995; RAO *et al.*, 1997).

Der generelle Aktivierungs-Mechanismus der NFAT-Protein-Familie (NFAT) in T-Lymphozyten ist in der Abbildung 1.7 dargestellt.



Arthritis Research

Abbildung 1.7:

Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT in T-Lymphozyten in Anlehnung an COPE (2002). Die NFAT-Aktivierung wird ausschließlich über den TCR-Rezeptor (T-Zell-Antigen-Rezeptor) vermittelt. In der Membran wird durch die membranständige Phospholipase C_γ (PLC_γ) aus Membran-Lipiden Inositol-Triphosphat (IP₃) gebildet. IP₃ ist ein „second messenger“, der die Freisetzung von Kalzium-Ionen (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern (Endoplasmatisches Retikulum, ER) bewirkt. Die Kalzium-Ionen aktivieren die Serinphosphatase Calcineurin, die den inaktiven zytosolischen Faktor NFAT dephosphoryliert. Der aktivierte Faktor NFAT transloziert in den Zellkern, bindet dort an sein regulatorisches DNA-Sequenz-Element innerhalb von Genpromotoren und induziert die Transkription ihrer Gene. Diese Induktion wird häufig kooperativ mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (FOS/JUN) vermittelt. AP-1: Activator Protein-1.

Die Aktivierung der Proteine der NFAT-Familie (NFAT) in T-Lymphozyten wird ausschließlich über den T-Zell-Antigen-Rezeptor (TCR) vermittelt. Dessen Aktivierung führt zur Bildung des „second messengers“ IP₃ (Inositol-Triphosphat) durch die membranständige Phospholipase C (PLC_γ). IP₃ bewirkt die Freisetzung von Kalzium-Ionen (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern (Endoplasmatisches Retikulum, ER). Die Kalzium-Ionen aktivieren die Serinphosphatase Calcineurin, die den inaktiven zytosolischen Faktor NFAT dephosphoryliert. Der aktivierte Faktor NFAT transloziert in den Kern, bindet dort selektiv an sein regulatorisches DNA-Element innerhalb von Promotoren und induziert die Transkription des Gens. Diese Induktion wird häufig kooperativ mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP-1 (FOS/JUN) vermittelt (COPE, 2002; MASUDA *et al.*, 1995, RAO *et al.*, 1997).

1.6 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) wurden erstmals als „Thrombin-Rezeptoren“ von VU und Mitarbeitern beschrieben (1991). Der Identifikation des murinen PAR-2-Rezeptors (NYSTEDT *et al.*, 1995) folgte die Klonierung des humanen Homologs, des „Trypsin-Rezeptors“, durch BÖHM und Mitarbeiter (1996b). Mittlerweile sind die Rezeptoren PAR-3 (1997) und PAR-4 (1998) bestimmt worden (Tab. 1.5) und es ist zu vermuten, dass die Identifikation weiterer folgen wird (HOLLENBERG, 1999).

Tabelle 1.5:

Verzeichnis der PAR-Rezeptoren (PAR-1-4), ihrer gebundenen Liganden, aktivierenden Proteinase und Gewebsverteilung (HOLLENBERG *et al.*, 2002; MACFARLANE *et al.*, 2001).

	gebundener Ligand	aktivierende Proteinase	Gewebsverteilung
PAR-1	SFLLRN	Thrombin Trypsin, Plasmin, Faktor Xa, Granzym A, Cathepsin G	Gehirn, Lunge, Luftröhre, Knochen, Herz, Blut (Thrombozyten), Magen, Kolon, Niere, Hoden, glatte Muskulatur, Skelettmuskulatur, Epidermis, Immunsystem (T-Zellen, Mastzellen)
PAR-2	SLIGKV	Tabelle 1.6	Gastrointestinaltrakt, glatte Muskulatur, Knochen, Harnleiter, Gallenblase, Pankreas, Leber, Niere, Lunge, Luftröhre, Haut, Prostata, Ovar, Gehirn, lymphatische Gewebe/Immunsystem (Mastzellen, T-Zellen)
PAR-3	TFRGAP	Thrombin Faktor Xa, Trypsin, Elastase Chymotrypsin	Knochenmark, Herz, Gehirn, Plazenta, Leber, Pankreas, Thymus, Dünndarm, Magen, Lymphknoten, Luftröhre
PAR-4	GYPGKF	Thrombin Trypsin, Cathepsin G	Lunge, Pankreas, Schilddrüse, Hoden, Dünndarm, Plazenta, Skelettmuskulatur, Lymphknoten, Prostata, Uterus, Kolon

Tabelle 1.6:

Übersicht bis dato beschriebener Agonisten des PAR-2-Rezeptors in Anlehnung an HOLLENBERG und Mitarbeiter (2002) sowie MACFARLANE und Mitarbeiter (2001).

PAR-2-Agonist	REFERENZ
SLIGKV (synthetisches Hexapeptid)	BÖHM <i>et al.</i> , 1996b
Trypsin ¹	BÖHM <i>et al.</i> , 1996b
Trypsin-2	ALM <i>et al.</i> , 2000
Tryptase ²	MOLINO <i>et al.</i> , 1997
Stratum corneum tryptic Enzyme (hKLK5) ¹	STEINHOFF <i>et al.</i> , 1999
Stratum corneum chymotryptic Enzyme (hKLK7) ³	STEINHOFF <i>et al.</i> , 1999
Neurosin (hKLK6)	YAMASHIRO <i>et al.</i> , 1997
HAT (human airway trypsin-like protease)	MIKI <i>et al.</i> , 2003
MT-SP1 (membrane-type serine-protease 1, Matriptase)	TAKEUCHI <i>et al.</i> , 2000
TMPRSS3 (membrane-bound serine protease)	WALLRAPP <i>et al.</i> , 2000

¹ LEKTI-Ziel-Proteinase (MÄGERT *et al.*, 1999; EGELRUD *et al.*, submitted)

² vermutete LEKTI-Zielproteinase (MÄGERT *et al.*, 1999)

³ EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003

Acrosin	SMITH <i>et al.</i> , 2000
P22 (trypsin-like serine proteinase)	SAWADA <i>et al.</i> , 2000
neutrophile Proteinase 3 (PR3)	UEHARA <i>et al.</i> , 2002
Faktor Xa	CAMERER <i>et al.</i> , 2000
Faktor VIIa (TF/FVIIa-Komplex)	CAMERER <i>et al.</i> , 2000
SFRB60 (proteolytisches Fragment des „neuronal growth associated protein B-50/GAP-43“, Entstehung u.a. durch Trypsinspaltung)	HOLLENBERG <i>et al.</i> , 2000
Gingipain-R (Serinproteinase des Bakteriums <i>Porphyromonas gingivalis</i>)	LOURBAKOS <i>et al.</i> , 1998
Der p1 (Allergen der <i>Dermatophagiodes pteronyssinus</i>)	ASOKANANTHAN <i>et al.</i> , 2002
Der p3 (Allergen der <i>Dermatophagiodes pteronyssinus</i>)	SUN <i>et al.</i> , 2001
Der p9 (Allergen der <i>Dermatophagiodes pteronyssinus</i>)	SUN <i>et al.</i> , 2001

PARs sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mit sieben Transmembran- α -Helices. Die Aktivatoren der Rezeptoren sind Serinproteinasen, die nach ihrer Bindung an den Rezeptor durch proteolytische Spaltung am extrazellulären N-Terminus einen neuen gebundenen Liganden im Rezeptor selbst freisetzen, der nun denselben Rezeptor irreversibel aktiviert (DERY *et al.*, 1998a; MACFARLANE *et al.*, 2001). In Abbildung 1.8 ist dieser irreversible Aktivierungs-Mechanismus dem reversiblen durch einen löslichen Liganden gegenübergestellt.

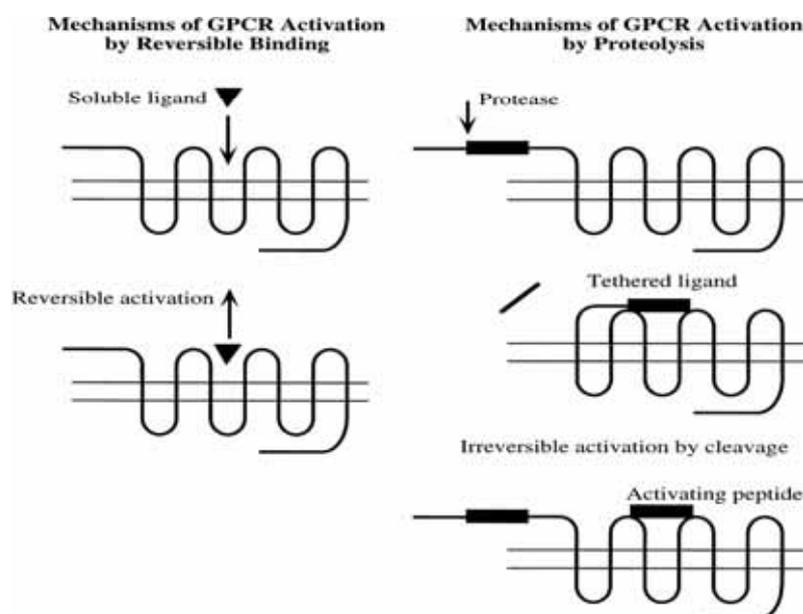


Abbildung 1.8:

Vergleich zwischen der reversiblen und irreversiblen Aktivierung eines GPCR-Rezeptors. Bei der reversiblen Aktivierung ist der Agonist ein löslicher, bei der irreversiblen ein „endogener“ Ligand. Dieser „endogene“ Ligand muß zuvor durch Proteolyse zugänglich gemacht werden (DERY *et al.*, 1998).

Die PAR-Rezeptor-vermittelten Signale werden schnell abgeschwächt, um eine unkontrollierte Stimulation zu verhindern bzw. um die PAR-Responsivität der Zellen zu bewahren (Abb. 1.9).

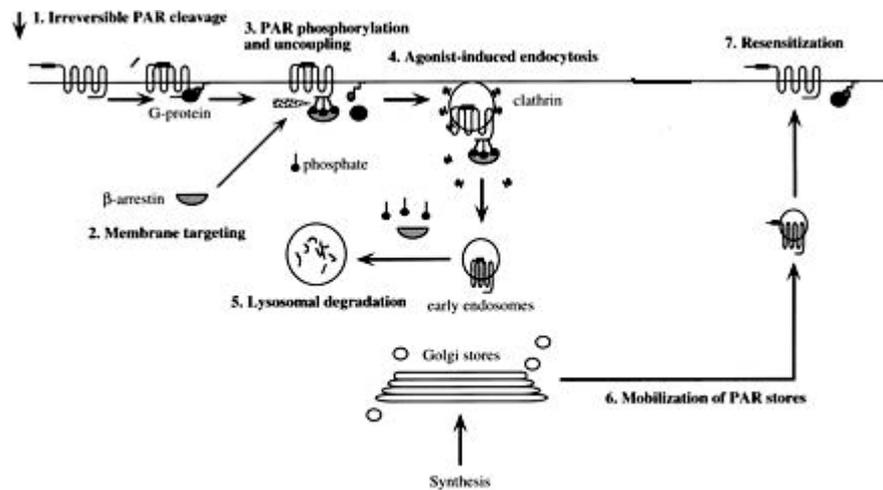


Abbildung 1.9:

Modell des „PAR-Trafficking“ in Anlehnung an BÖHM und Mitarbeiter (1996a). Die irreversibel aktivierten Rezeptoren werden phosphoryliert, mittels Klathrin-Hüllen internalisiert und lysosomal degradiert (1.-5.). Zur Resensibilisierung werden intrazelluläre PAR-2-Speicher des Golgi-Apparates in Vesikeln mobilisiert und die Rezeptoren in die Zellmembran eingebracht (6.).

Die irreversibel aktivierten PAR-Rezeptoren werden phosphoryliert, mittels Klathrin-Hüllen internalisiert und lysosomal degradiert (Abb.1.9). Zur schnellen Resensibilisierung werden intrazelluläre PAR-2-Speicher des Golgi-Apparates innerhalb weniger Minuten in Vesikeln mobilisiert und die Rezeptoren in die Zellmembran eingebracht (BÖHM *et al.*, 1996a; DERY *et al.*, 1999b). Die PAR-Rezeptor-Aktivierung vermittelt u.a. die Freisetzung der „second messenger“ Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat (IP₃). IP₃ erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch die Freisetzung von Kalzium-Ionen aus intrazellulären Kalziumspeichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Der „second messenger“ DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die beispielsweise die Phosphorylierung von Membrankanälen und weiteren Proteinen wie den Ras/MAP-Kinasen bewirkt (GUTKIND, 1998a, b; HOLLENBERG *et al.*, 2002).

PAR-Rezeptoren sind in verschiedene (patho-) physiologische Prozesse wie Wachstum und Entwicklung oder Entzündungen involviert. Der „Thrombin-Rezeptor“ PAR-1 ist unter anderem an der Thrombozyten-Aktivierung, der Vasodilatation und Vasokonstriktion, der vaskulären Permeabilität und der Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen beteiligt (DERY *et al.*, 1999a; GRAND *et al.*, 1996). Dem PAR-2-Rezeptor wird eine wesentliche Bedeutung bei Entzündungen der Haut zugeschrieben (HOU *et al.*, 1998). Keratinozyten, die

sowohl wichtige Zielzellen als auch Generatoren für Entzündungsmediatoren sind, exprimieren den PAR-2-Rezeptor auf einem hohen Niveau. Daneben gibt es Hinweise, dass der PAR-2-Rezeptor die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten negativ beeinflusst und auch akute Entzündungen der Haut, wie die UV-induzierte Dermatitis, mediiert (DERY *et al.*, 1998; MACFARLANE *et al.*, 2001; SHPACOVITCH *et al.*, 2002). Ferner wird dem PAR-2-Rezeptor bei Entzündungen und Infektionen in den Atemwegen eine Beteiligung zugeschrieben (COCKS *et al.*, 2000). Für die beiden weiteren „Thrombin-Rezeptoren“ PAR-3 und PAR-4 sind die biologischen Funktionen weitgehend unbekannt. Vermutlich unterstützen sie die PAR-1-vermittelten „Thrombin-Signale“ in einer kooperativen Art (KAHN *et al.*, 1999; SHAPIRO *et al.*, 2000).

1.7 Ziel der Arbeit

Da Mutationen innerhalb des Gens für den Proteinase-Inhibitor LEKTI maßgeblich an der Entstehung des Netherton Syndroms beteiligt sind (CHANAVAS *et al.*, 2000), war das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit die Aufklärung regulatorischer Mechanismen der LEKTI-Genexpression, um die vermutete anti-inflammatorische/protective Funktion des Serinproteinase-Inhibitors zu überprüfen (MÄGERT *et al.*, 1999). Anhand der klonierten und sequenzierten LEKTI-Genpromotor-Sequenz (DRÖGEMÜLLER, 1999) sollten *in silico* Genpromotor-Analysen durchgeführt und deren Ergebnis selektiv nach putativen regulatorischen DNA-Sequenz-Elementen durchgemustert werden, die im Kontext von inflammatorischen Zuständen (Akute Phase) eine zentrale Rolle spielen. Die Funktionalität der ausgewählten putativen DNA-Sequenz-Elemente sollte folgend in umfassenden molekularbiologischen Untersuchungen ermittelt werden. Diesbezüglich waren Reporter-Gen-Assays, quantitative Analysen mittels Real-Time-PCR, *in vitro* Stimulations-Experimente in humanen Zelllinien sowie Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien vorgesehen.

Ein weiterer Schwerpunkt stellte die Untersuchung eines Einflusses des aktivierten PAR-2-Rezeptors auf die davon abhängige Expression des LEKTI-Gens dar. Der „inflammatorische“ PAR-Rezeptor ist in entzündliche Dermatosen verwickelt (STEINHOFF *et al.*, 1999) und wird von den LEKTI-Zielproteinasen Trypsin, SCTE und SCCE aktiviert (EGELRUD *et al.*, submitted; EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003). Daher ist eine genregulatorische Interaktion in Form eines negativen Feed-Back-Mechanismus zu vermuten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen

2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Alle Feinchemikalien, Lösungsmittel und Materialien wurden in Analysenqualität verwendet und stammen, sofern nicht anders angegeben, ausschließlich von den Firmen Active Motif, BioWhittaker, Costar/Corning, Falcon, Greiner, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Roth und Sigma-Aldrich. Agarplatten, Nährmedien, Puffer und Lösungen wurden stets mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore) angesetzt. Die Sterilisation thermostabiler Lösungen, Gebrauchswaren und Polypropylen-Einwegartikeln erfolgte in feuchter Hitze für 20 min bei 2 bar und 120°C in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3021001, Schütt Labortechnik). Hitzeempfindliche Lösungen wurden über Cellulose-Acetat-Phthalat (CAP)-Membranfilter sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Ø 0,22 µm), Glas-, Keramik- und Metallwaren für 4 h bei 180°C trockener Hitze entkeimt.

2.1.2 Geräte und Apparaturen

Die gesamten experimentellen Arbeiten wurden, sofern im Text nicht anders erwähnt, mit autoklavierten Polypropylen-Einwegartikeln (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) bzw. Glasmaterialien (z.B. Messzylinder) durchgeführt. Zusätzlich zu den konventionellen Laborgeräten wie beispielsweise Thermomixer oder Heizplatten wurden folgende Geräte verwendet:

Bildbearbeitung:	- Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem mit Software Kodak 1D V. 3.5.0 (Kodak)
DNA-Gelelektrophorese:	- Mini-Sub TM Cell (Bio-Rad) - Wide Mini-Sub TM Cell (Bio-Rad)
DNA-Sequenzierer:	- Kapillarelektrophorese-Sequenzier 'PRISM TM 310 Genetic Analyzer' (ABI)
Echtzeit-PCR-Verfahren:	- PRISM 7700 Sequence Detection System (ABI)
Inkubationsschrank:	- B 6120 (Heraeus, Hanau)
Kulturschüttler:	- Innova TM 4340 (New Brunswick, C.A., USA)
Küvettenerschleuder:	- KS 8 CE (Innovative-Technische-Systeme Th. Betzel, Hattersheim)
Luminometer	- Lumat LB 9501 (Berthold, Hannover) - LumiStar [®] mit LUMIstar [®] Software (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg)
Mikroskop	- Invertoskop ID03 (Zeiss, Göttingen)
Mikrotiterplatten-Reader:	- Microplate Autoreader EL 311 (Bio-Tek Instruments)
pH-Meter:	- CG 804 (Schott)
Spektralphotometer:	- DU [®] 640 (Beckman) inklusive: wassertemperierbaren 6-fach Küvettenhalter und Software-Paket MultiTempII-Thermostat (Pharmacia)
Sterilbank	- Sterilbank 8511 (Köttermann, Ütze/Hänigsen)
Sterilisation:	- Bioclav 3.021001 (Schütt Labortechnik, Göttingen)
Thermocycler:	- GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)

Waagen:	- Laborwaage 'LC 2200 S' (Sartorius, Göttingen) - Analytikwaage 'AC 120 S' (Sartorius, Göttingen) - Feinwaage 'supermicro' (Sartorius, Göttingen)
Zellkulturschrank:	- IG 150 CO ₂ -Inkubator (Jouan, Virginia, USA)
Zentrifugen:	- Kühlzentrifuge 'Mikro Rapid/K' (Hettich, Henningen) - Kühlzentrifuge 'Biofuge 28 RS' (Heraeus, Hanau) - Kühlzentrifuge 'Rotixa/RP' (Hettich, Henningen) - Vakuum-Zentrifuge 'Univapo 150H' (Vacuumbrad GmbH&Co)

2.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche für PCR-Reaktionen und DNA-Sequenzierungen benötigten Oligonukleotide (Tabelle 2.1) wurden von den Firmen Perkin-Elmer und MWG-Biotech bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit sterilem, schwermetallfreiem Wasser (ACS-grade, Sigma) auf eine Stammkonzentration von 100 pmol eingestellt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.1: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung / Richtung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
β-Tub-1 ¹⁾	TTCCCTGGCCAGCTSAANGCNGACCTNCGCAAG
β-Tub-2 ¹⁾	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAAGGC
UNIP5	CCTTGAATTCTAGAGCTCT(T) ₁₇
KDLA-1AS	CCCAACTCGAGAAGACGATGCAAGTCGCCTAC
KDLA-2S	GGTTTGAGCTCCTGGTTTTATGTGGGTGTCACC
KDLA-3S	GGTTTGAGCTCGTATATCTGGTATTTCTGAGG
KDLA-4S	GGTTTGAGCTCGGTCTGCTTGCAAGTGCTGG
KDLA-5S	GGTTTGAGCTCCAATTTGGCTCTGGTTTCAGTC
KDLEK-1SB ²⁾	GTTTCTTCAGGTGCTTTCTTAAGCTATTAGAGGGGCAAATAA
KDLEK-1SBM ²⁾³⁾	GTTTCTTCAGGTGCTT <u>CACTA</u> AGCTATTAGAGGGGCAAATAA
KDLEK-1AS	TTATTTTGCCCTAATAGCTTAAGAAAGCACCTGAAGAAAC
KDLEK-1ASM ³⁾	TTATTTTGCCCTAATAGCTT <u>AGTGA</u> AGCACCTGAAGAAAC
KDLEK-2SB ²⁾	TTTTCTTCTTTTCTTTTTGGGAGACTAAATAATGGGATGAT
KDLEK-2SBM ²⁾³⁾	TTTTCTTCTTTTCTTTTT <u>ACTA</u> GACTAAATAATGGGATGAT
KDLEK-2AS	ATCATCCCATTATTTAGTTCTCCCAAAAAGAAAAGAAGAAA
KDLEK-2ASM ³⁾	ATCATCCCATTATTTAGTTCT <u>TGAAAA</u> AAGAAAAGAAGAAA
KDLEK-3SB ²⁾	GAAGCAGCGTACAGAGAGGAAAGAATGTTATATGTGTGGT
KDLEK-3SBM ²⁾³⁾	GAAGCAGCGTACAGAG <u>ACTT</u> AAGAATGTTATATGTGTGGT
KDLEK-3AS	ACCACACATATAACATTCTTTCTCTCTGTACGCTGCTTC
KDLEK-3ASM ³⁾	ACCACACATATAACATTCTT <u>GAGT</u> CTCTGTACGCTGCTTC
KDLEK-4SB ²⁾	CCCTGGATTTCTCTGGATGTGGAAATCTTTAAATCTATAC
KDLEK-4SBM ²⁾³⁾	CCCTGGATTTCTCTGGATGT <u>ACTA</u> ATCTTTAAATCTATAC
KDLEK-4AS	GTATAGATTTAAAGATTTCCACATCCAGAGAAATCCAGGG
KDLEK-4ASM ³⁾	GTATAGATTTAAAGATTT <u>GTAC</u> ATCCAGAGAAATCCAGGG
KDLEK-6SB ²⁾	CATCAATTGCGTTCTGGGGAGGTACCATGAAAGAACATT
KDLEK-6SBM ²⁾³⁾	CATCAATTGCGTTCTGGG <u>TTCGGT</u> ACCATGAAAGAACATT

KDLEK-6AS	AATGTTCTTTTCATGGTACCTCCCCAGAACGCAATTGATG
KDLEK-6ASM ³⁾	AATGTTCTTTTCATGGTACCC <u>AT</u> CCCAGAACGCAATTGATG
BASIC for	ACATAGAATACCATGACATTGA
BASIC rev	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC
VAG 21AS	AGTTTTCCATTTTGCAAAGTCTCGC
VGA 19S	AATGATCCTATTGAGGGTCTAGATGG
PAR2-2S	ATCCTAGCAGCCTCTCTCTCCTGCAGTGG
PAR2-4AS	GCTGTGATTTACATGGCCAATCTGGCCTT
PAR2TM-1S	GTATGTCGTGAAGCAGACCATCTT
PAR2TM-3AS	GTAATTGAACATGTCTCCCACCAA
PAR2-Sonde ⁴⁾	FAM-TCCTGCCCTGAACATCACGACCTGT
LEKTM-2S	TGGAATAATGTTTCATCAATAAATGTGC
LEKTM-3AS	CTTGGGAGCTCTTGCTAAATGC
LEKTI-5.TMP ⁴⁾	FAM-CACGTGCAAAAATGATACTGGAAAAAGAAGCAAA-Q
m/hGAPDH-F	CCTGCACCACCAACTGCTTA
hGAPDH-R	CATGAGTCCTTCCACGATACCA
gapdh-TaqMpro ⁴⁾	FAM-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAAC-Q

¹⁾ Redundanzen: S = (G + C) und N = (A + T + G + C).

²⁾ 3'-biotinyliert (2.11)

³⁾ mutiert (2.11)

⁴⁾ FAM (6-Carboxy-fluorescein) bezeichnet den Reporterfarbstoff, TAMRA den Quencher (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin).

2.1.4 Kits

Die nachfolgend aufgeführten kommerziell erhältlichen Kits (Reagenzien-Sätze) wurden, sofern im Text nicht explizit erwähnt, für die jeweiligen Anwendungen eingesetzt. Kits enthalten alle benötigten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Enzyme etc. in vorportionierter Form und ermöglichen somit eine effizientere und homogenere Versuchsdurchführung.

Tabelle 2.3: Verwendete kommerziell erhältliche Kits

Anwendung	Kit
RNA-Isolierung	NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel)
Plasmid-Isolierung	NucleoSpin Plus (Macherey-Nagel)
DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel)
Aufreinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel)
DNA-Sequenzierung	PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI)
Transfektion	Effectene-Transfektion-Reagent Kit (Qiagen)
β-Galactosidase-Assay	β-Galactosidase Enzyme Assay System (Promega)
Plasmid-Isolierung	Endofree [®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten	pGEM [®] -T Vector System I (Promega)
Kernextraktion	Nuclear Extract Kit (Active Motif)
Real-time PCR (<i>TaqMan</i>)-Experimente	<i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix (ABI)

2.1.5 DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Für gentechnische Arbeiten wurden die in Tabelle 2.4 verzeichneten DNA-modifizierenden Enzyme und Restriktionsendonukleasen sowie die entsprechenden Puffer der angegebenen Firmen bezogen. Die spezifische DNA-Hydrolyse erfolgte mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen der Firma Invitrogen. Alle Reaktionen wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
Reverse Transkriptase	SuperScript II RT (Invitrogen)
DNA-Polymerasen	<i>Taq</i> Platinum DNA-Polymerase (Invitrogen) Ampli <i>Taq</i> -Gold (Applied Biosystems) TAKARA Ex <i>Taq</i> <i>Taq</i> (Qiagen)
DNA-Nukleasen	DNase I Amp Grade (Invitrogen)
Restriktionsendonukleasen	<i>Sac I</i> / <i>Sac II</i> ; <i>Xho I</i> (Invitrogen)
RNase-Inhibitor	RNasin (Promega)
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase (Promega)

2.1.6 Plasmidvektoren und Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Bakterienstämme und Plasmidvektoren für die molekular- und zellbiologischen Versuche verwendet.

Tabelle 2.5 : Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren

Bakterienstamm	Genotyp	Anbieter
<i>Escherichia coli</i> XL2Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q lacZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>] ^a	Stratagene [®]
Plasmidvektoren	relevante Eigenschaften	Anbieter/Referenz
pGEM-T-Vektor (3000 Bp.)	Linearisierter Expressionsvektor für PCR-Produkte mit 3'-Thymidin-Überhängen	Promega [®]
pGL2-basic-Vektor (5598 Bp.)	Luziferase-Reportergen-Vektor	Promega [®] GOULD <i>et al.</i> , 1988
pGL2-control-Vektor (6047 Bp.)	Luziferase-Reportergen-Vektor mit SV-40-Genpromotor	Promega [®] GOULD <i>et al.</i> , 1988

pSV- β -Galactosidase-control-Vektor (6820 Bp.)	Expressionsvektor für β -Galactosidase mit <i>lacZ</i> gene und vorgeschaltetem SV-40-Genpromotor	Promega® ALAM <i>et al.</i> , 1990 LIM <i>et al.</i> , 1989
Hergestellte Plasmidvektoren	relevante Eigenschaften	Insert
LEKTI I (5740 Bp.)	Luziferase-Reportergen-Vektor pGL2-basic mit LEKTI-Genpromotorkonstrukt I	Größe: 142 Bp.
LEKTI II (5964 Bp.)	Luziferase-Reportergen-Vektor pGL2-basic mit LEKTI-Genpromotorkonstrukt II	Größe: 366 Bp.
LEKTI III (6293 Bp.)	Luziferase-Reportergen-Vektor pGL2-basic mit LEKTI-Genpromotorkonstrukt III	Größe: 695 Bp.
LEKTI IV (6792 Bp.)	Luziferase-Reportergen-Vektor pGL2-basic mit LEKTI-Genpromotorkonstrukt IV	Größe: 1194 Bp.

2.1.7 Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung

Jegliche Arbeiten mit genetischem Material wurden gemäß der gesetzlichen Vorschriften nur in zugelassenen Räumen der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Der Umgang mit radioaktiven Substanzen erfolgte entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen. Radioaktiver Abfall sowie Lösungsmittelreste und giftige Feststoffe wurden getrennt in den entsprechenden Behältern gesammelt und der vorgeschriebenen Beseitigung zugeführt. Infektiöses Material wurde nach Desinfektion oder Autoklavieren entsorgt. Zum Schutz gegen Kontaminationen von Haut und Kleidung wurden Einweghandschuhe und Laborkittel getragen.

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden in Anlehnung an die Beschreibungen von AUSUBEL *et al.*, 1992 und SAMBROOK *et al.*, 1989 durchgeführt.

2.2.1 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die analytische oder präparative Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch horizontale Elektrophorese in nativen Agarosegelen. In Abhängigkeit der erwarteten DNA-Fragmentgröße wurden 0,8-2%ige Gele in 1x TAE-Puffer hergestellt und die Elektrophorese bei 10 Volt pro cm Gellänge in 1x TAE-Laufpuffer durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 0,2 Volumen 10x DNA-Blaumarker versetzt. Dieses diente zum einen zur Verstärkung der Probensedimentation in

den Geltaschen und zum anderen der Kennzeichnung der Lauffront während der Elektrophorese. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde der Agaroselösung vor dem Erstarren 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Die relative Größe der DNA-Fragmente wurde anhand eines im Gel aufgetrennten Molekularlängen-Standards (0,5 µg/ml) bestimmt. Mit Hilfe des Kodak EDAS 290-Dokumentationssystems konnten die Gele photographiert und archiviert werden.

<u>Ethidiumbromid-Stammlösung:</u>	1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH ₂ O
<u>50 × TAE-Puffer (Stammlösung):</u>	2 M Tris 100 mM EDTA 1 M Essigsäure
<u>10 × DNA-Blaumarker:</u>	40 % Glycerin 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
<u>Molekular-Größenstandards:</u>	100 Bp.-Leiter (Invitrogen) 1 Kbp.-Leiter (Invitrogen)

2.2.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung gelelektrophoretisch getrennter DNA (VOGELSTEIN *et al.*, 1979) wurde anhand des NucleoSpin[®] Extract-Kits durchgeführt. Dabei wurden die jeweiligen elektrophoretisch aufgetrennten Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und eingewogen. Nach Zugabe von 300 µl Puffer NT1 pro 100 mg isolierter DNA wurde die Agarose bei 50°C und 400 rpm für 10 min geschmolzen, die Suspension auf eine NucleoSpin[®] Extract-Säule geladen und anschließend für 1 min bei 6000 × g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl des Puffers NT3 bei 12.000 × g, bevor die Säule durch eine dreiminütige Zentrifugation vollständig getrocknet wurde. Die DNA konnte nach einer einminütigen Inkubation der Säule bei Raumtemperatur mit 50 µl ddH₂O bei 12.000 × g eluiert werden.

Komponenten des NucleoSpin[®] Extract-Kits (Macherey-Nagel):

Puffer NT1	Puffer enthält u.a. chaotrope Salze zur Bindung der Nukleinsäuren an eine Silika-Oberfläche und Komponenten zur Auflösung der Agarose*
Puffer NT3	EtOH-haltiger Waschpuffer zur Entfernung von Verunreinigungen wie Salze, Nukleotide oder Proteine*
NucleoSpin [®] Extract-Säulen	Die DNA-Bindung an die Silikamembran der Säule erhöht die Reinheit und Ausbeute der Präparation. *Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur exakten Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen wurde deren Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Messung der entsprechend mit Aqua bidest verdünnten Proben erfolgte spektralphotometrisch in einer Quartzküvette mit 1 cm Schichtdicke. Anhand der ermittelten optischen Dichte (OD_{260}) der Proben konnte deren Konzentration c durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \varepsilon \times V$$

Für einzelsträngige DNA bzw. RNA beträgt der Extinktionskoeffizient ε 0,04 und für doppelsträngige DNA 0,05. Der Verdünnungsfaktor V beschreibt die eingesetzte Verdünnung der Nukleinsäure in der wässrigen Lösung.

Der Grad der Reinheit einer Nukleinsäurepräparation kann ebenfalls photometrisch bestimmt werden, da Nukleinsäuren bei 280 nm halb-maximal absorbieren. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) einer reinen Nukleinsäurelösung beträgt 2,0. Verunreinigungen durch Proteine, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt, verringern diesen Quotient entsprechend.

2.2.4 Ligation

Die Durchführung einer Sequenzierung oder Amplifikation von (PCR-) DNA-Fragmenten setzt voraus, dass diese zuvor in einen geeigneten Klonierungsvektor eingebracht wurden. Diesbezüglich fand das pGEM[®]-T Vector System Verwendung (MARCHUK *et al.*, 1991). Für die Ligation in den Vektor wurde in Anwesenheit von 3 Units T4 DNA-Ligase ein 5- bis 8-facher molarer Überschuss des DNA-Fragments zu 20 ng Vektor mit 10 x Ligationspuffer in einem 10 μ l Ansatz vereint. Der Ansatz wurde für 12-16 h bei 12-14°C inkubiert. Anschließend konnte die erhaltene Plasmid-DNA in kompetente Zellen wie *Escherichia coli* XL2 blue transformiert werden (2.2.6).

Der Klonierungsvektor pGEM-5Zf(+) besitzt unter anderem ein Resistenzgen für β -Lactamantibiotika wie beispielsweise Ampicillin und eine *lacZ*-Region, die für das N-terminale Fragment des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. In die *lacZ*-Region ist ein Polylinker eingefügt, in welchen der Plasmid-Vektor linearisiert ist. Im Falle einer erfolgreichen Ligation verhindert die Insertierung der DNA in die Polylinker-Region des Vektors die Expression des N-terminalen β -Galaktosidase Fragments, da das Leseraster des N-terminalen Fragments durch das Einfügen der DNA-Fremdsequenz zerstört worden ist

(Frame shift). Wird die anschließende Transformation mit Bakterienstämmen durchgeführt, die im *lacZ*-Gen die „*lacZM15*“-Partialdeletion besitzen und aus diesem Grunde nur das inaktive C-terminale Fragment der Galaktosidase exprimieren, kann nur in den Kolonien eine enzymatisch aktive β -Galaktosidase vorliegen, in denen das N-terminale Fragment (des Vektors) und das C-terminale Fragment (der Bakterienzelle) komplementiert sind. Diese Kolonien sind nach einer Induktion des *lac*-Promotors durch das Laktose-Analogon IPTG in der Lage, das farblose Galaktosid X-Gal zu hydrolysieren. Im Verlauf der Hydrolyse entsteht das blau gefärbte 5-Brom-3-Chlor-Indigo, welches die Kolonie blau erscheinen läßt. Im Gegensatz dazu kann in den Kolonien, in denen eine Insertierung in die Polylinkerregion stattgefunden hat, diese Reaktion nicht ablaufen, da keine funktionale β -Galaktosidase gebildet werden kann. Diese Kolonien erscheinen auf den Transformationsplatten als weiß (Blau-Weiß-Screening). Diese Tatsache wird zur Identifizierung positiv rekombinanter Kolonien genutzt. Die Überprüfung der exakten Insertgrößen der weißen Kolonien erfolgte mittels Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung (2.3).

2.2.5 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen aus *E.coli*-Stämmen wurde in Anlehnung an die Methode von NISHIMURA und Mitarbeitern (1990) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde pro Ansatz 1 ml einer Übernachtskultur des Stammes *E.coli* XL2-Blue mit 100 ml Medium A beimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD_{578nm} von 0,55 inkubiert. Nachdem die Kulturen für 10 min auf Eis gehalten wurden, erfolgte die Sedimentation der Zellen durch eine 15-minütige Zentrifugation bei $1500 \times g$ und 4°C. Das Sediment wurde in 500 ml eiskaltem Medium A resuspendiert, tröpfchenweise mit 2,5 ml Medium B vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l-Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB (Luria-Bertani) - Flüssigmedium:

1,0 %	Caseinhydrolysat (Sigma C-0626)
0,5 %	Hefeextrakt (Sigma Y-4000)
0,5 %	NaCl

Lösen der Feststoffe in Wasser, Einstellen des pH 7,4 mit 1 N NaOH und Autoklavieren.

Medium A :

LB - Flüssigmedium mit Zusatz von : 10 mM MgSO₄
0,2 % Glukose

MgSO₄-Lösung und eine Glukose-Stammlösung werden über einen Spritzenfilter zum LB-Medium gegeben.

Medium B:

LB - Flüssigmedium mit Zusatz von: 36 % Glycerin

12 % Polyethylenglykol (PEG 8000)

12 mM MgCl₂

Das PEG 8000 wird in Glycerin gelöst und zum magnesiumhaltigen LB-Medium gegeben.

2.2.6 Transformation von Plasmidvektoren in transformationskompetente Zellen

Die benötigte Menge Aliquots transformationskompetenter Zellen (2.2.5) wurde langsam auf Eis aufgetaut, mit je 100 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl eines Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die rekombinante Plasmid-DNA durch einen Hitzeschock von 45 s bei 42°C in die Zellen eingebracht und der Ansatz unmittelbar auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl vorgewärmten SOC-Medium und einer anschließenden 60-minütigen Inkubation bei 37°C und 300 rpm wurden je 150 µl des Transformations-Ansatzes auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen. Zur phänotypischen Selektion von Rekombinanten waren die ampicillinhaltigen Platten vor dem Ausstreichen mit je 40 µl X-Gal- und IPTG-Lösung behandelt worden. Aus diesem Grunde konnten in der folgenden Inkubation über Nacht bei 37°C nur die *E. coli*-Zellen wachsen, die erfolgreich mit dem Ampicillinresistenz-vermittelnden Vektor transfiziert waren. Anhand des Blau-Weiß-Screenings (2.2.4) wurden die Kolonien mit korrektem Insert ausgewählt.

Die Aufbewahrung und Vereinzlung der Bakterien erfolgte durch Ausstreichen der Klone auf Selektions-Agarplatten, deren Lagerung bei 4°C für etwa 8 Wochen möglich war. Zur längerfristigen Konservierung bei -80°C wurden glycerinhaltige Dauerkulturen hergestellt, indem je 1 ml einer über Nacht inkubierten LB-Kultur mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt wurde.

SOC-Medium:

2 %	Caseinhydrolysat
1 %	Hefeextrakt
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
10 mM	NaCl
20 mM	Glukose

Das Medium wurde vor Zugabe der Glukose autoklaviert und mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

IPTG-Lösung (sterilfiltriert):

100 mM Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid in ddH₂O

X-Gal-Lösung:

2 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid in N,N-Dimethylformamid

Selektions-Agarplatten:

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 1,5 % Agar (Sigma A-5054)
100 µg/ml Ampicillin

Der Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin erfolgte nach Abkühlung des autoklavierten Ansatzes auf 50 °C, pH 7,4 wurde mit 1 N NaOH eingestellt.

2.2.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Analyse ampicillinresistenter Kolonien (2.2.6) erfolgte durch alkalische Lyse in Anlehnung an die Methode von BIRNBOIM und Mitarbeitern (1979). Im Rahmen dieser Arbeit fand dafür das NucleoSpin[®]Plus-Kit Verwendung.

Einzelne ampicillinresistente Bakterienkolonien wurden von den Platten in je 3 ml LB-Selektivmedium überimpft und bei 37°C und 220 rpm über Nacht angezogen. Zur Präparation wurden 2 ml der Kulturen für 30 s bei 12000 × g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment mit 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer A2 im Verlauf einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Anschließend wurden die bakteriellen Proteine sowie die chromosomale Bakterien-DNA durch Zugabe von 300 µl Puffer A3 gefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 × g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin[®]Plus-Säule überführt und durch eine einminütige Zentrifugation bei 12000 × g die Plasmid-DNA an die Silikamembran der Säule gebunden. Es folgten zwei einminütige Waschschrte bei 12000 × g mit je 600 µl Puffer A4, an die sich eine Zentrifugation bei 12000 × g für 3 min zur Entfernung störender EtOH-Rückstände des

Puffer A4 anschloss. Für die Elution der Plasmid-DNA wurde die Säule mit mit 50 µl ddH₂O für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend für 1 min bei 12000 × g zentrifugiert. Zur Kontrolle, ob die Plasmid-Vektoren das korrekte Insert besitzen, wurde je 1 µl der gelösten Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (2.1.5) in Gegenwart von RNase A (0,03 mg/ml) verdaut. Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1) analysiert.

Komponenten des NucleoSpin®Plus-Kits (Macherey-Nagel):

Puffer A1	Resuspension buffer	Puffer enthält u.a. RNase A*
Puffer A2	Lysis buffer	Alkalischer Puffer, enthält u.a. SDS*
Puffer A3	Neutralisation buffer	*
Puffer A4	Wash buffer	EtOH-haltiger Waschpuffer zur Entfernung von Verunreinigungen wie Salze, Nukleotide oder Proteine*
NucleoSpin®Plus-Säulen	Die Plasmid-DNA-Bindung an die Silikamembran der Säule erhöht die Reinheit und Ausbeute der Präparation. *Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben.	

2.2.8 Maxi-Präparation von endotoxinfreier Plasmid-DNA

Die im folgenden beschriebene Präparation von Plasmid-DNA unter Verwendung des Endofree® Plasmid Maxi Kits ermöglicht die Isolierung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA aus einer 100 ml Bakterienkultur. Eine über Nacht in LB-Medium inokulierte Bakterienkultur wurde bei 12000 × g und 4°C für 15 min sedimentiert und in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Bakterienlyse wurden der Suspension vorsichtig 10 ml Puffer P2 hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die Fällung der chromosomalen Bakterien-DNA sowie bakterieller Proteine erfolgte durch die Applikation von 10 ml gekühltem Puffer P3 durch Filterspritzen (Filter-Cartridges®) bei Raumtemperatur für 10 min. Anschließend wurden 2,5 ml Puffer ER zugegeben und im Verlauf einer 30-minütigen Zentrifugation bei 6000 × g und 4°C wurden alle in der Suspension vorhandenen Endotoxine zersetzt. Der erhaltene Überstand wurde auf eine Tip500-Säule® gegeben, die zuvor mit 15 ml Puffer QBT equilibriert worden war. Nach Durchlauf des Überstandes wurde die Säule zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die gebundene Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer QF aus der Säule eluiert und durch Zugabe von 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Letzlich wurde die Plasmid-DNA während einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13000 × g sedimentiert, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Komponenten des Endofree® Plasmid Maxi Kits (Qiagen):

Puffer P1	Resuspension buffer	50 mM Tris/HCl; pH8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A
Puffer P2	Lysis buffer	200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)
Puffer P3	Neutralisation buffer	3M Potassium Acetate, pH 5,5
Puffer ER	Endotoxin removal buffer	Enthält Isopropanol und Polyethylen Glykol Octylphenyl Ether*
Puffer QBT	Equilibration buffer	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH7,0; 15% Isopropanol (v/v); 0,15% Triton®X-100 (v/v)
Puffer QC	Wash buffer	1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH7,0; 15% Isopropanol (v/v)
Puffer QF	Elution buffer	1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH8,5; 15% Isopropanol (v/v);
Puffer TE	Storage buffer	10 mM Tris/HCl, pH8,0; 1mM EDTA
Cartridge®	Spritzenförmige Filterapparatur	
Tip500-Säule®	Anionenaustausch-Chromatographiesäule	

*Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.9 Arbeiten mit RNA

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden mit sterilen gestopften Pipettenspitzen sowie RNase-freien Lösungen durchgeführt. Diese Vorsichtsmaßnahmen dienten dem Schutz der RNA vor dem enzymatischen Abbau durch die ubiquitär verbreiteten RNasen. Die Lagerung der in ddH₂O gelösten RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.9.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde anhand des NucleoSpin® RNA II-Kits durchgeführt, dessen Versuchsablauf einen DNase-Verdau beinhaltet, welcher bei Anwendung anderer Protokolle stets im Anschluss an die RNA-Isolation erfolgte. Das genutzte Verfahren hat den Vorteil, dass die erhaltene RNA-Lösung keine Komponenten des Verdauungsansatzes enthält.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA ausschließlich aus eukaryotischen Zellen isoliert (2.5.1), die in 6- oder 12-Well-Platten bzw. 75 cm² Kulturflaschen angezogen wurden. Aufgrund der limitierten Bindungskapazität der silikahaltigen NucleoSpin® RNA-Säulen konnten pro Ansatz maximal 5×10⁶ Zellen eingesetzt werden. Diese wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 400 µl Puffer RA1 (6- oder 12-Well-Platten) oder 800 µl Puffer RA1 (75 cm² Kulturflaschen) überschichtet und unmittelbar auf Eis gehalten. Anschließend wurde das Zellysate anhand eines Einweg-Zellscrapers in den Kulturgefäßen homogenisiert, auf eine NucleoSpin® Filter-Säule geladen und zur Abtrennung der Zelltrümmer für 1 min bei 12000 × g zentrifugiert. Da die maximale Beladungskapazität der NucleoSpin®-Säulen 750 µl beträgt, wurde bei größeren Volumina der Schritt wiederholt. Das erhaltene Filtrat wurde mit

300 µl bzw. 600 µl 96%igem Ethanol versetzt, auf eine NucleoSpin[®] Filter-Säule überführt und zweimal für 1 min bei 12000 × g bis zur Trocknung zentrifugiert. Anschließend wurde die an der Säule immobilisierte RNA zur Hydrolyse der ebenfalls gebundenen genomischen DNA mit 95 µl DNase I-Lösung für 15 min inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase I wurde die Säule mit 500 µl Puffer RA2 bei 800 × g für 30 s gewaschen. Im Verlauf der folgenden Waschschrte mit 600 µl bzw. 250 µl RA3 Puffer wurden Salze sowie weitere Verunreinigungen bei 12000 × g für 30 s bzw. 2 min zentrifugierend entfernt. Die derart getrocknete Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl RNase-freiem ddH₂O bei 12000 × g für 2 min eluiert. Den Eluaten wurden 5 µl zur Konzentrationsbestimmung entnommen, alle Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unmittelbar bei –80°C eingebracht. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA-Präparation erfolgte mittels photometrischer Analyse (2.2.3).

Komponenten des NucleoSpin[®] RNA II-Kits (Macherey-Nagel):

Puffer RA1	Lysispuffer, enthält 4 M Guanidiniumisothiocyanat und β-Mercaptoethanol zur Denaturierung aller Proteine und RNasen sowie chaotrope Salze zur Bindung der Nukleinsäuren an eine Silika-Oberfläche*
Puffer RA2	Waschpuffer zur Inaktivierung und Entfernung der DNase I sowie weiterer Verunreinigungen*
Puffer RA3	EtOH-haltiger Waschpuffer zur Entfernung von Verunreinigungen wie Salze, Nukleotide oder Proteine*
RNase-free DNase I	Desoxyribonuclease (DNA abbauendes Enzym)
DNase-reaction Puffer	Reaktionspuffer der DNase I
RNase-free Water	RNase-freies Wasser zur Elution der RNA von der Säule
NucleoSpin [®] Filter-Säulen	Filtersäulen zur Abtrennung der Zelltrümmer
NucleoSpin [®] RNA-Säulen	Die RNA-Bindung an die Silikamembran der Säule erhöht die Reinheit und Ausbeute der Präparation.

*Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben.

2.3 Sequenzierung

Zur Bestimmung von Nukleinsäuresequenzen doppelsträngiger DNA-Fragmente wurde eine modifizierte Form des enzymatischen Kettenabbruchverfahrens von SANGER und Mitarbeitern (1977) genutzt.

Diese als *Taq-Cycle-Sequencing* bezeichnete Methode (MANONI *et al.*, 1992) wurde unter Verwendung des PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits (ABI) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und sowohl zur Sequenzierung aufgereinigter PCR-generierter DNA-Fragmente (2.2.1) als auch präparierter Plasmid-DNA (2.2.7) eingesetzt. In diesem

Verfahren wird das Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion (2.4) mit einem kontrollierten basenspezifischen Abbruch der enzymatischen Replikation durch den Einbau von Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten (ddNTP) verwendet, wobei die zu sequenzierende DNA mit nur einem Oligonukleotid linear amplifiziert wird. Da der *Taq*-Polymerase sowohl Desoxy-Nukleotide (dNTP) als auch ddNTPs zur Elongation angeboten werden, kommt es bei Einbau eines ddNTPs zum basenspezifischen Kettenabbruch, so dass eine statistische Verteilung unterschiedlich langer DNA-Amplifikate entsteht. Zur Markierung dieser Amplifikate sind die vier eingesetzten ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Dye Terminatoren) gekoppelt, die aufgrund ihres differierenden Emissionsverhaltens im Verlauf der Elektrophorese vom Laserscanner des Kapillarsequenzers (ABI) detektiert werden. Dabei erfolgte die Datenregistrierung und Gerätesteuerung vollautomatisch mit der Data Collection Software (ABI) auf einem Macintosh-Computer. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Sequence Analysis V3.4.1-Software (ABI) ausgewertet.

Sequenzierreaktions-Ansatz (1×):

4 µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix
 1 µl Oligonukleotidprimer (10 pmol/µl)
 X µl Matrizen-DNA (DNA in ng = Basenpaaranzahl/7,5)
 ad 20 µl ddH₂O

Temperaturprogramm für 25 Zyklen:

Denaturierung	96°C	10 sek
Oligonukleotidanlagerung	45-60°C	10 sek
Elongation	60°C	4 min
Reaktionsende	4°C	∞ min

2.3.1 Aufreinigung der Sequenzierproben mittels DNA-Präzipitation

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion wurde jeder Ansatz mit 80 µl ddH₂O versetzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA bei Raumtemperatur erfolgte die Beimischung von 10 µl 3M Natriumacetatlösung, pH 4,6 und 250 µl 96%igen Ethanol, an die sich eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 × g anschloss. Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das DNA-Sediment zweimal mit 400 µl 70%igem Ethanol bei 12000 × g für 15 min zentrifugierend gewaschen und abschließend für 5 min vakuumgetrocknet. Das DNA-Präzipitat wurde zur Sequenzierung in 25 µl des Formamid-haltigen TSR (Template Supression Reagent, ABI) resuspendiert, für 2 min bei 95°C denaturiert und im

folgenden auf Eis gehalten. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz auf das Kapillargel geladen. Die elektrophoretische Trennung im Kapillarsequenzier erfolgte bei einer Injektionszeit von 30 s für 36 min bei 50°C und einer Spannung von 15 kV.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) ermöglicht die selektive exponentielle Amplifikation definierter DNA-Sequenzen *in vitro* (SAIKI *et al.*, 1985). Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Zyklen mit je drei Schritten, bei denen die neusynthetisierten DNA-Stränge jeweils als Matrizen für die weitere DNA-Synthese dienen. Dabei setzt sich jeder PCR-Zyklus aus einer temperaturgesteuerten Reaktionsfolge von Denaturierung, Annealing und Elongation zusammen. Zur Durchführung einer PCR werden eine hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase, ein Template (DNA-Sequenz) und spezifische Oligonukleotide benötigt. Diese Oligonukleotide sind jeweils einem Abschnitt des Templates komplementär und schließen als Sense- und Antisense-Oligonukleotid die zu amplifizierende Sequenz ein. Im Verlauf der Denaturierung wird das doppelsträngige DNA-Template bei hohen Temperaturen (95-99°C) zu Einzelsträngen aufgeschmolzen, an denen, aufgrund des schnellen Abkühlens auf 45-65°C, die komplementären Oligonukleotide hybridisieren (annealing). Die entstandenen doppelsträngigen Hybrid-DNA-Bereiche dienen der *Taq*-Polymerase als Startpunkt zur Synthese des komplementären Stranges bei 72°C, wobei die Dauer der Elongationszeit von der Größe des erwarteten DNA-Amplifikats abhängig ist (~ 1000 Bp./min).

Im Rahmen dieser Arbeit fanden, in Abhängigkeit des Versuchs, verschiedene Templates bzw. Oligonukleotide (2.1.3) für PCR-Reaktionen Verwendung. Dabei wurde die entsprechende Annealingtemperatur für jedes Oligonukleotidpaar zur Optimierung der Stringenz experimentell ermittelt sowie das Standardprotokoll (2.4.1) gegebenenfalls gemäß der Versuchsanforderungen modifiziert.

2.4.1 Standard-PCR

Die Standard-PCRs dienen der Akkumulation von DNA-Sequenzen zur Durchführung von Klonierungen und Sequenzierungen sowie der Untersuchung humaner Zelllinien (cDNA) auf endogene Genexpression (LEKTI, PARs).

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR (50 µl):

10 %	10 × PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl)
2 mM	MgCl ₂
200 nM	Oligonukleotidprimer (Sense und Antisense)
200 mM	dNTP-Mix (je 200 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
20 – 500 ng	DNA-Matrize (cDNA, Plasmid oder genomische DNA)
1 U	DNA-Polymerase
ad 100 %	ddH ₂ O

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden im 'GeneAmp PCR System 2400' (Perkin Elmer) gemäß des folgenden Programms durchgeführt, wobei die Zugabe der DNA-Polymerase nach Ablauf der Erst-Denaturierung erfolgte.

Temperaturprogramm für 40 Zyklen (1.- 3. Schritt):

Erst-Denaturierung der DNA	99°C	3 min
1. Denaturierung	96°C	1 - 10 s
2. Oligonukleotidanlagerung	50 - 65°C	10 - 45 s
3. Elongation	72°C	30 s - 4 min
End-Elongation	72°C	7 min
Reaktionsende	4°C	∞ min

2.4.2 RT-PCR

Die reverse Transkription ist eine abgewandelte Form der PCR (2.4), in deren Verlauf mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse-Transkriptase aus einer RNA komplementäre DNA (cDNA) generiert wird.

Zur Herstellung der cDNA wurden pro Ansatz 3 µg einer zuvor lyophilisierten Gesamt-RNA in 12 µl ddH₂O und 500 ng *random hexamer primer* ((dT)-Oligonukleotid UNIP 5) auf Eis resuspendiert und für 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurde der unmittelbar auf Eis abgekühlte Ansatz kurz zentrifugiert und mit 7 µl eiskaltem Reaktions-Premix vermischt. Für die reverse Transkription wurde der Reaktionsansatz für 1 min bei 42°C äquilibriert und mit 200 U SuperScript II (Invitrogen) versetzt. Nach Ablauf einer 50-minütigen Inkubation bei 42°C, an die sich eine kurze Zentrifugation anschloss, erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 70°C über 15 min. Zur Konzentrationsbestimmung der generierten cDNA wurde die eingesetzte RNA-Äquivalentmenge zugrundegelegt. Die Effizienz der cDNA-Synthese wurde anhand einer Standard-PCR mit β-Tubulin-Oligonukleotiden (2.1.3) durchgeführt, in deren Verlauf ein Amplifikat von 461 Bp. entsteht, welches in der anschließenden Elektrophorese (2.2.1) nachgewiesen wird.

Reaktions-Premix (1×) für eine RT-PCR:

- 4 µl 5 × Erststrangsynthesepuffer (Invitrogen)
- 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT)
- 1 µl dNTP-Mix (je 200 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)

2.4.3 Quantifizierung von Transkripten mittels Real-Time PCR (*TaqMan*)

Die Transkriptionshöhen von LEKTI in humanen Zelllinien wurden mittels *real-time reverse transcription-PCR* (SCHILD, 1996) in einem PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) quantifiziert. Das Prinzip dieser Analyse, die im Folgenden als *TaqMan* bezeichnet wird, ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Die Echtzeit-PCR-Technologie wird zur Analyse der Transkriptionshöhe der untersuchten Moleküle in humanem Gewebe sowie zur Untersuchung ihrer Induzierbarkeit in Zelllinien genutzt. Diese Technik zeichnet sich neben der PCR-eigenen Sensitivität auch durch ein hohes Maß an Selektivität und Reproduzierbarkeit aus, wobei Letztere für die verlässliche Untersuchung der Stimulation der mRNA-Expression in Zelllinien von entscheidender Bedeutung ist. Die hohe Reproduzierbarkeit des Assays ergibt sich zum einen aus dem Wegfall weiterer Arbeitsschritte zum Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes (z.B. Gelelektrophorese, Blot-Methoden), zum anderen aus der Quantifizierung der PCR im logarithmischen Bereich der Amplifikation. Die *TaqMan*-Technologie basiert auf einem 5'-Nuklease-Assay (HOLLAND *et al.*, 1991), bei dem man unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase relativ einfach sequenzspezifische Amplifikation nachweisen kann. Durch die Einführung einer mit fluoreszierenden Farbstoffen markierten Oligonukleotidsonde (LEE *et al.*, 1993) wurde dieser Assay automatisierbar.

Diese fluorogene Sonde wird zusätzlich zum spezifischen Primerpaar einer Standard-PCR eingesetzt und hybridisiert genau wie diese spezifisch an die zu amplifizierende DNA-Zielsequenz. Die Sonde besteht aus einem 24-30 bp langen Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (6-Carboxy-fluorescein) verknüpft ist, während das 3'-Ende mit einem so genannten Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) versehen ist. Zudem ist das 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert, damit die sequenzspezifische Sonde nicht auch durch die Polymerase verlängert werden und somit als dritter Primer fungieren könnte. Solange die Sonde intakt ist, findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Die normalerweise nach Anregung (Wellenlänge $\lambda=488$ nm) als Licht emittierte Energie des Reporterfarbstoffs wird auf den Quencher übertragen, so dass nach außen nur sehr geringe Lichtsignale messbar werden. Die Absorption der Energie durch den

Quencher ist nur möglich, solange sich Reporter-Markierung und Quencher in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden, wie es bei intakten Sondenmolekülen gegeben ist. Wird die Oligonukleotidsonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der Elongationsphase einer PCR-Reaktion hydrolysiert, so entfernen sich die beiden Farbstoffe voneinander und die emittierte

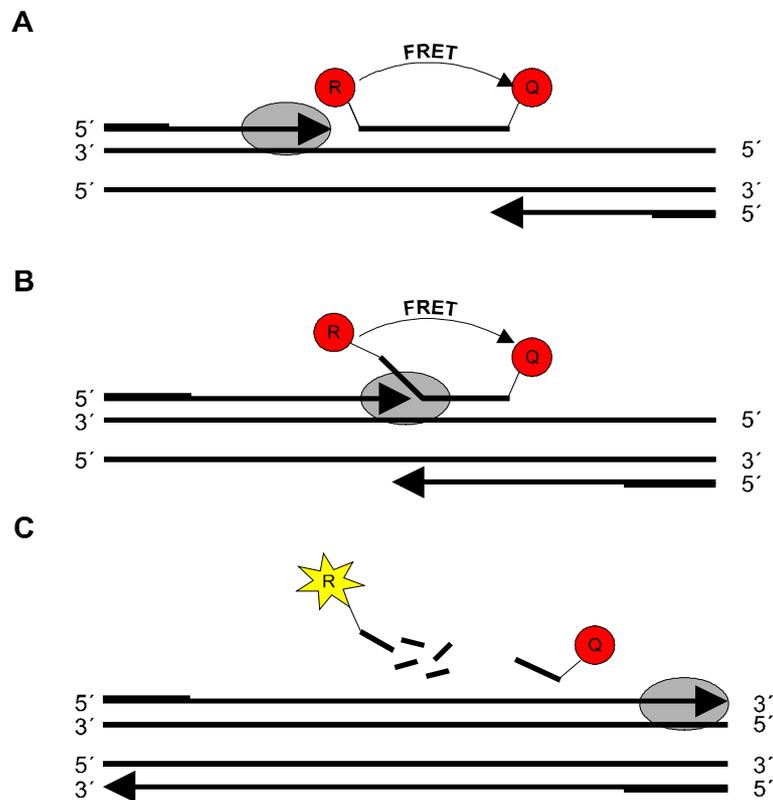


Abbildung 2.1

Prinzip der TaqMan-PCR: (A) Zu Beginn der PCR hybridisiert die mit Reporterfarbstoff (R) und Quencher (Q) markierte Oligonukleotidsonde an die Zielsequenz. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt, der ein Fluoreszenzsignal unterdrückt. (B) Während der Elongationsphase trifft die Taq-Polymerase auf die gebundene Sonde. Eine Y-förmige Übergangsstruktur während der Verdrängungsreaktion aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase und führt zur Sondenhydrolyse. (C) Aufgrund der nun zunehmenden Entfernung zwischen Reporterfarbstoff und Quencher wird der FRET unterbrochen, und ein Fluoreszenzsignal wird messbar. Die Taq-Polymerase ist durch eine graue Ellipse symbolisiert, gebundene Oligonukleotidprimer durch fettgedruckte Balken.

Energie des Reporterfarbstoffs wird als Fluoreszenzsignal ($\lambda=518$ nm) messbar. Voraussetzung für eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase ist eine stabile Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz. Zu diesem Zweck sollte die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde mindestens 8-10 °C über T_m der Oligonukleotidprimer liegen. Ist dies der Fall, so trifft die Taq-Polymerase während der Extensionsphase auf die Sonde und beginnt, diese zu verdrängen. Die dabei entstehende Y-förmige Sekundärstruktur, in der die ersten Basen der Sonde bereits verdrängt wurden, induziert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, und die Sonde wird

hydrolysiert. Eine nur schwach an die Matrize gebundene Sonde, wie z.B. bei einer Fehlpaarung in einer abweichenden Sequenz eines Allels, würde von der Polymerase so schnell verdrängt werden, dass keine Hydrolyse stattfinden könnte.

Zur Berechnung der Ausgangsmenge cDNA in einer unbekannt Probe wird die Anzahl der PCR-Zyklen herangezogen, die nötig ist, um einen festgelegten Schwellenwert eines Fluoreszenzsignals zu überschreiten. Die benötigte Zyklenzahl wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. In der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, in der die Fluoreszenzintensitäten entsprechend ihrer Wellenlängen detektiert werden, verdoppelt sich die Anzahl ungequenchter Reporter-moleküle mit jedem Zyklus. Da die Amplifikation in der exponentiellen Phase im Gegensatz zur Endpunktbestimmung keinem limitierenden Faktor unterliegt, ist die *TaqMan*-Methode gut reproduzierbar. Durch die Abhängigkeit eines detektierbaren Fluoreszenzsignals von der Hybridisierung dreier verschiedener Oligonukleotide (2 Primer und die Sonde) ist die Echtzeit-PCR ein hochspezifischer Assay. Trotzdem wurde eine mögliche Amplifikation genomischer Sequenzen durch die Verwendung exonübergreifender Primer zusätzlich unterbunden. Die im *TaqMan*-Assay verwendeten Primerpaare wurden zuvor in einer Standard-PCR darauf getestet, dass sie nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifizieren. Außerdem ermöglichte die Verwendung von Wasser anstelle von cDNA die Kontrolle auf mögliche Kontaminationen der genutzten Reagenzien.

Die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten während einer Echtzeit-PCR wurde mit Hilfe des PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) gemessen. Alle benötigten Sonden (Tabelle 2.1) waren mit 6-Carboxy-fluorescein (FAM) als Reporterfarbstoff und mit 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin als Quencher markiert, welche beide vom Argon-Laser des PRISM 7700 ($\lambda=488$ nm) angeregt werden. Die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Bereich von 500-660 nm automatisch aufgenommen und durch eine CCD-Kamera (*charge-coupled device*) in vom Computer bearbeitbare Datenpunkte umgewandelt.

Oligonukleotidprimer und -sonden wurden mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems) abgeleitet und von den Firmen MWG (Primer) und TIB MOLBIOL (Sonden) bezogen. Als endogene Amplifikationskontrolle zum Abgleichen der eingesetzten cDNA-Mengen dienten Oligonukleotide und Sonden für die so genannten Haushaltsgene ribosomale 18S-RNA und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH).

Für alle *TaqMan*-PCR-Läufe wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1.	Uracil- <i>N</i> -Glykosylase-Reaktion	50 °C	2 min	1 Zyklus
2.	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1 Zyklus
3.	Denaturierung Oligonukleotidanlagerung und Amplifikation der Zielsequenz	95 °C 60 °C	15 s 1 min	 45 Zyklen
4.	Reaktionsende	25 °C	∞	

Die für eine quantitative Auswertung notwendigen Absorptionsspektren der beteiligten Fluorogene wurden während der Amplifikation der Zielsequenz (Schritt 3) aufgenommen.

Für jeden PCR-Reaktionsansatz (25 µl Endvolumen) wurden folgende Reagenzien benötigt:

12,5 µl	2 × <i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix (ABI)
250 nM	Oligonukleotidprimer (250 nM je Primer)
250 nM	Sonde (5'-FAM / 3'-TAMRA markiertes Oligonukleotid)
2,0 µl	cDNA-Matrize (Template)

2.4.3.1 Quantifizierung der endogenen Expression der Zielmoleküle

Die Quantifizierung der Transkription von LEKTI erfolgte über das Prinzip der Standardkurvenmethode. Bei der Quantifizierung von LEKTI wurde die Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe einer Stammlösung cDNA aus BHY-Zellen konstruiert. Aufgrund der Datenaufnahme des *TaqMan*-Systems in der exponentiellen Phase der PCR sowie aufgrund der kurzen Amplifikationsprodukte ist die gemessene Effizienz der PCR von der Startkopienzahl nahezu unabhängig. Der Logarithmus der Startkopienzahl ist daher über mindestens 5 Größenordnungen proportional zum C_T -Wert. Die aus diesen zwei Parametern konstruierte Standardkurve weist im Experiment meist einen Korrelationskoeffizienten $R > 0,97$ auf, was das Standardkurvenverfahren zu einer sehr genauen Auswertungsmethode macht.

2.4.3.2 Quantifizierung von LEKTI in humanen Zelllinien

Zur Erstellung der Standardkurve wurde cDNA aus BHY-Zellen in 10 Verdünnungsstufen im Bereich von 50 ng - 25 pg RNA-Äquivalentmenge eingesetzt. Für die Erstellung der Standardkurven sowohl für die Bestimmung der Transkriptionsrate von LEKTI wie auch für die endogene Kontrolle GAPDH wurde für alle Experimente die gleiche, zuvor aliquotierte cDNA-Stammlösung aus BHY-Zellen genutzt. Die Doppelbestimmungen für die Standards wurden im gleichen Experiment wie die zu untersuchenden Proben analysiert. Es kamen nur solche Versuche zur Auswertung, in denen die Standardreihen für Zielsequenz und

Haushaltsgen einen Korrelationskoeffizienten $R > 0,97$ aufwiesen und zugleich alle Probenwerte umspannten.

Die Berechnung der endogenen Expression von LEKTI erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die Signale der einzelnen Proben normalisiert, indem die ermittelten Startkopienzahlen von LEKTI durch die Startkopienzahl des Haushaltsgens GAPDH dividiert wurden. Dieser Schritt erlaubte das Vernachlässigen abweichender Mengen eingesetzter cDNA, die z.B. durch unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkription entstanden sein könnten. Im zweiten Schritt wurden dann alle so normalisierten Startkopienzahlen kalibriert, indem man sie durch die normalisierte Startkopienzahl des Gewebes mit der niedrigsten Transkriptionsrate (Kalibrator) dividierte. Das Ergebnis dieser Berechnung war also ein relatives Expressionsniveau der Zielsequenz LEKTI in verschiedenen humanen Zelllinien, wobei der Kalibrator gleich 1 gesetzt wurde.

Zur Berechnung der endogenen Expression in den Proben wurde anschließend die experimentell festgestellte Startkopienzahl des Zielgens durch die der endogenen Kontrolle dividiert.

2.5 Allgemeine Zellkulturtechniken

2.5.1 Zelllinien und Kultivierung

Sämtliche Arbeiten mit eukaryotischen Zellen erfolgten an einem sterilen Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 und wurden gemäß der von LINDL (2000) publizierten allgemeinen Empfehlungen für den Umgang mit eukaryotischen Zellen durchgeführt.

Alle verwendeten Zelllinien (Tabelle 2.6) wurden ausschließlich mit den in Tabelle 2.7 aufgeführten Medien und Materialien kultiviert und unter Standardbedingungen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinien.

Zellstamm	Gewebe / Morphologie	Herkunft / Referenz
HUH-7	Humane Hepatoma-Zelllinie Adhärenz Zellen, die als einschichtiger Zellrasen (<i>monolayer</i>) wachsen	Etabliert aus der Resektion der Leber eines 57-jährigen Patienten (NAKABAYASHI <i>et al.</i> , 1982)
HaCaT	Humane Keratinozyten-Zelllinie adhärent, als Monolayer wachsend	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten (BOUKAMP <i>et al.</i> , 1988)
SAEC 6043	Humane Lungenprimärzellen adhärent, als Monolayer wachsend	Fa. Cellsystems, Nummer CC-2547
NCI H720	Atypisches Karzinoid der Lunge nicht-adhärenz Suspensions-Zelllinie	ATCC-Nummer: CRL-5838
Jurkat	Humane T-Zellen nicht-adhärenz Suspensions-Zelllinie	DSMZ-Nummer: ACC 282
A-549	Humanes Lungenkarzinom adhärent, als Monolayer wachsend	DSMZ-Nummer: ACC 107
BHY	Humanes Mundschleimhautkarzinom adhärent, als Monolayer wachsend	DSMZ-Nummer: ACC 404
HT 29	Humanes Kolonkarzinom adhärent, als Monolayer wachsend	DSMZ-Nummer: ACC 229
SKHEP-1	Humanes Leberkarzinom adhärent, als Monolayer wachsend	DSMZ-Nummer: ACC 141
T84	Humanes Kolonkarzinom (epithelialer Herkunft) adhärent, als Monolayer wachsend	ATCC-Nummer: CCL 248

Tabelle 2.7: Verwendete Agenzien zur Kultivierung von Zellen.

Medien, sonstiges Zellkulturmaterial	Anbieter, Bestellnummer
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, 41965-029
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, 41965-039
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	BioWhittaker, 14-701F
Minimum Essential Medium Alpha Medium	Invitrogen, 41061-029
SAGM Bullet Kit	Cell Systems CC-3118
PBS Dulbecco´s	Invitrogen, 14190-094
RPMI 1640	Invitrogen, 31870-025
SAGM Bullet Kit	Cell Systems CC-3118
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Invitrogen, 35400-027
10.000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100x)	Invitrogen, 15140-130
200 mM (100x) L-Glutamin	Invitrogen, 25030-024

2.5.2 Kultivierung humaner Zellen

Zur Stammerhaltung und Zellvermehrung wurden die Zellen regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz umgesetzt („passagiert“). Die adhärennten Kulturen wurden einmal mit warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C vom Kulturflaschenboden gelöst. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 4 Volumina FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt, die Zellen für 7 min bei Raumtemperatur und 120 x g zentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Anhand der Neubauer-Zählkammer (2.5.3) wurde die Zellzahl/ml bestimmt, um anschließend die Zellen in gewünschter Dichte auszuplattieren. Suspensionskulturen wurden direkt sedimentiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen, die Zellzahl/ml bestimmt und wie benötigt ausgesät. Zellen, die zur Erhebung experimenteller Daten genutzt wurden, waren mindestens 2 Wochen in Kultur bzw. drei Passagen alt.

2.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl (Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit) und der Zellvitabilität (Trypanblauausschlussmethode) erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (LINDL *et al.*, 2000). Trypanblau lagert sich an Proteinstrukturen des Zytoplasmas an, kann jedoch nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen und färbt aus diesem Grunde selektiv tote Zellen bläulich an.

Trypanblau: 0,1% Trypanblau (w/v) in PBS

2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Überzählige Zellen wurden zur Stammerhaltung und eigenen Stockherstellung wieder in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Die Zellen wurden sedimentiert und je nach Zelllinie $0,1-1 \times 10^7$ Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in kältebeständige Einfriergefäße (Cryovial, Roth) überführt und für 48 h bei -80°C gelagert. Anschließend konnten die Cryovials in flüssigem Stickstoff eingebracht werden. Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch zügiges Auftauen der Cryovials in einem Wasserbad (37°C) und unmittelbarer Überführung in vorbereitete Zellkulturflaschen mit 20 ml des jeweiligen Kulturmediums. Am nächsten Tag wurde der DMSO-haltige Mediumüberstand gewechselt, um optimales Wachstum zu erreichen.

Einfriermedium: Der Zelllinie entsprechendes Medium
 20 % FCS
 2 mM L-Glutamin
 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
 10 % DMSO*

*Der 10%ige Zusatz von DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen. Aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften entzieht es den Zellen während des Einfrierens Wasser. Da es jedoch bei Raumtemperatur toxisch wirkt, wurde es umgehend durch Mediumwechsel aus den Kulturen entfernt.

2.6 Stimulation von Zellen

Sämtliche im Rahmen der Arbeit durchgeführten *in vitro* Stimulationen mit pro-inflammatorisch wirksamen Mediatoren dienten der Untersuchung der Responsivität des LEKTI-Genpromotors in humanen Zellsystemen. Die Mediatoren wurden in Wasser (ACS-grade, Sigma) oder DMSO (Sigma) gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Aufgrund der Tatsache, dass die Mediatoren sowohl in unterschiedlichen Aktivitätseinheiten als auch Reinheitsgraden kommerziell erhältlich sind, sind zur exakten Identifizierung die jeweilige Bestellnummer sowie der Produzent angegeben. Für die Herstellung der Stimulationslösungen wurden die Mediatoren entsprechend der gewünschten Konzentration in dem jeweiligen auf Raumtemperatur äquilibrierten Medium gelöst. Da der Verdünnungsfaktor der DMSO-haltigen Mediator-Stammlösungen im Medium mindestens 1:1000 betrug, war ein potentieller Einfluss des (Stammlösungs-) Lösungsmittels in den durchgeführten Experimenten zu vernachlässigen.

Tabelle 2.8: Verwendete Mediatoren.

Mediator	Kat. Nr.	Hersteller
Forskolin	F-105	RBI
Interleukin-6 (IL-6)	016200-R	TEBU
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	P-8139	Sigma
Ionomycin	CA201-0001	Biomol
NF-κB-Inhibitor	Kat. Nr.	Hersteller
MG-132	4747-90-5MG	CalBiochem
BAY 11-7082	EI-270	Biomol
Peptid	Aminosäuresequenz	Hersteller
PAR-2	SLIGKV	MWG

2.6.1 Stimulation zu Untersuchungen der Induzierbarkeit der Transkription des LEKTI-Gens

Für die Untersuchungen einer Induzierbarkeit der Transkription des LEKTI-Gens *in vitro* (2.4.4) wurden diverse humane Zelllinien mit pro-inflammatorischen Mediatoren inkubiert. In Abhängigkeit des Versuches wurden diese sowohl dosis- als auch zeitabhängig variiert. Die Zellkulturen wurden auf einer 6- oder 12-Well-Kulturschale ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Zur Stimulation wurde das Kulturmedium entfernt und durch vorbereitetes Stimulationsmedium (2.6) ersetzt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur Vorbereitung auf die anschließende RNA-Extraktion (2.2.9) durch Zugabe von 500 µl Lysispuffer aufgelöst. Jeder Stimulationsansatz wurde in zwei Wells gleichzeitig und mindestens einmal in einem unabhängigen Experiment wiederholt. Als Kontrolle dienten Kavitäten, die mit zusatzfreiem Kulturmedium inkubiert wurden.

2.6.2 Stimulation zu Untersuchungen der Reporterogenaktivität der LEKTI-Genpromotorteilfragmente

Zur Bestimmung der Reporterogenaktivität wurden transient transfizierte Zellen (2.6.2) in weiße 96-Well-Mikrotiterplatten (Costar, Kat. Nr.3610) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90% im Kulturmedium gehalten. Für die Stimulation wurde das Kulturmedium von den Wells entfernt, je 25 µl MEMalpha Medium mit den entsprechend gelösten Mediatoren auf die Zellen gegeben und für 6 h bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Reporterogen-Aktivität (2.8.2).

Zur Durchführung der Versuche mit NF-κB-Inhibitoren wurden diese in einem Volumen von 25 µl auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C/5%CO₂ vorinkubiert. Die anschließende Stimulation erfolgte durch Zugabe von 5 µl Medium, in dem die Mediatoren in 6-facher Konzentration gelöst vorlagen. Jeder Ansatz wurde in vier Wells parallel durchgeführt und mindestens dreimal in unabhängigen Experimenten wiederholt.

2.6.3 Stimulation zur Isolierung von aktiven Kernproteinen

Die Extraktion von Kernproteinen (2.9) wurde mit etwa 90% konfluenten Zellen durchgeführt, die in 75 cm² oder 175 cm² Zellkultur-Flaschen angezogen worden waren. Zur Synchronisation der Zellen wurden 12-16 h zuvor die Suspensionskulturen mit

$1,5 \times 10^7$ Zellen/ml in 10 ml serumfreiem Medium ausgesät sowie bei adhärenen Zellen das FCS-haltige Kulturmedium gegen 10 ml serumfreies Medium ersetzt. Die Stimulation der Kulturen erfolgte durch direkte Applikation von 100 μ l Stimulations-Lösung in die Zellkulturflaschen, an die sich eine 30-minütige Inkubationzeit bei 37°C/5%CO₂ anschloss. Für die Herstellung der Stimulationslösung waren die jeweiligen Mediatoren zuvor in 100-facher Konzentration in 100 μ l serumfreiem Medium gelöst worden.

<u>Serumfreies Medium:</u>	Der Zelllinie entsprechendes Medium
	0% FCS
	2 mM L-Glutamin
	100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin

2.7 Transfektion

Das Einführen von DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Diese kann entweder transient oder stabil erfolgen. Bei der transienten Transfektion kommt es zu einer vorübergehenden, bei der stabilen zu einer permanenten Expression des fremden Gens.

2.7.1 Transiente Transfektion von adhärenen Zellen

Alle transienten Transfektionen adhärenen eukaryotischer Zellen wurden anhand des Effectene[®]-Transfektions-Reagent Kits durchgeführt. Zuerst wird die zu transfizierende Plasmid-DNA in einem geeigneten Puffersystem mit einem Enhancer-Reagenz kondensiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Applikation von nicht-liposomalen Lipiden (Effectene-Reagenz), die die kondensierte DNA mizellenartig umhüllen. Der Transfektionsvorgang erfolgt durch Fusion der Mizellen mit der Zellmembran, wobei die zu transfizierende DNA in das Zellinnere eingeschleust wird.

Da die einzelnen Zellsysteme sehr unterschiedlich auf eine Transfektion reagieren können, wurde, ausgehend von den Hersteller-Richtwerten, für jede Zelllinie eine Optimierung der Parameter durchgeführt.

Komponenten des Effectene[®]-Transfektions-Reagent Kits (Qiagen):

EC buffer	Puffersystem	Keine Herstellerangaben bzgl. der Komponenten
Enhancer	Kondensations-Reagenz	Keine Herstellerangaben bzgl. der Komponenten
Effectene [®]	Nicht-liposomale Lipide	Keine Herstellerangaben bzgl. der Komponenten
Manual	Handbuch mit Referenzen und Versuchsprotokollen	

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die Kulturen in einer 6-Well-Platte mit einer Dichte von 8×10^5 (HuH-7) oder 5×10^5 (SK-Hep-1) Zellen pro Well ($9,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und für 16-20 h in Kultur gehalten. Für die Transfektion wurden (pro Well) 5 μg Plasmid-DNA, 150 μl Buffer EC und 20 μl Enhancer gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 15 μl Effectene wurde die Lösung für 10 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und zur Ausbildung der Micellen 8-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit Kulturmedium gewaschen und mit 1 ml Kulturmedium überschichtet. Der DNA-Micellen-Komplex wurde mit 1 ml Kulturmedium vermischt und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Da Effectene nicht toxisch ist, konnte die Inkubation für 24 h bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ erfolgen. Für Kotransfektionen mit Vektoren ähnlicher Größe wurden je 2,5 μg Plasmid-Vektor-DNA pro Transfektionsansatz eingesetzt. Alle Transfektionen wurden in zweifachem Ansatz durchgeführt, um Schwankungen der Transfektionseffizienz zu nivellieren. Als Referenz dienten Transfektionen mit Nicht-Reporter-Vektoren (pGL2-Basic).

2.8 Reporteranalyse

Reporteranalysen dienen dem Aktivitätsnachweis von Genpromotoren in transfizierten Zellsystemen und werden unter Verwendung von Reporter-Konstrukten durchgeführt. Im Zuge der Klonierung des Luziferase-Gens von *Photinus pyralis* (DE WET *et al.*, 1987) wurde ein alternatives Reportersystem zu der bis dato gebräuchlichen CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase)-Methode entwickelt, welches sich sowohl durch die schnellere Versuchsdurchführung als auch die nicht-radioaktive Technik auszeichnet (NORDEEN, 1988; WILLIAMS *et al.*, 1989). Ein Reporter-Konstrukt besteht aus einem Teil der 5'-nichtkodierenden Region (Promotor) des zu untersuchenden Gens und dem Reporter (Plasmid-Vektor), der für ein fluoreszierendes Protein wie green fluorescent protein (GFP) oder ein Enzym wie Luziferase oder β -Galaktosidase kodiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit enzymkodierenden Reportervektoren (Luziferase, β -Galaktosidase) transient transfizierte Zellsysteme genutzt. Werden diese Zellsysteme mit Mediatoren inkubiert, die den Promotor des Reportergens aktivieren, findet vermehrt eine Translation des Reporters statt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit werden die Zellen lysiert und die Enzymaktivität gemessen. In Anwesenheit von ATP, Luziferin, Mg^{2+} und O_2 erzeugt das Enzym Luziferase Licht und Oxyluziferin (Chemilumineszenz), welches in einem Luminometer quantifiziert wird (Abb. 2.2).



Abbildung 2.2:

Prinzip der ‐Luciferase-Reaktion‐: In Anwesenheit von ATP, Luziferin, Mg²⁺ und O₂ erzeugt das Enzym Luciferase Licht und Oxyluciferin (Chemilumineszenz).

Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die Spaltung eines farblosen Substrats (ONPG) zu einem gelben Produkt (o-Nitrophenol). Diese Reaktion lässt sich aufgrund des Farbumschlages spektralphotometrisch nachweisen (Abb. 2.3).

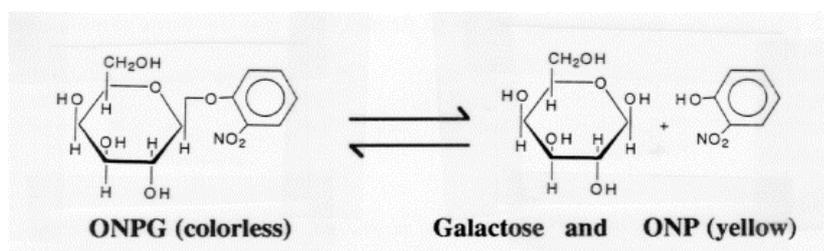


Abbildung 2.3:

Prinzip der ‐ β -Galaktosidase-Assays‐: Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die Spaltung eines farblosen Substrats (ONPG) zu einem gelben Produkt (o-Nitrophenol).

Unter Anwendung des Luciferase-Reportergen-Assays wurden sowohl die Transfektionseffizienz (2.8.1) als auch die relativen Aktivitäten der LEKTI-Genpromotorteilfragmente in stimulierten Zellsystemen (2.8.2) bestimmt.

2.8.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Unterschiede der Transfektionseffizienzen werden durch Kotransfektion mit dem pSV- β -Galactosidase-control-Vektor (2.1.6) kontrolliert und normalisiert (ALAM *et al.*, 1990; LIM *et al.*, 1989). Diesbezüglich fand im Rahmen dieser Arbeit das Luciferase- und β -Galactosidase Enzyme Assay System der Firma Promega Verwendung. Die Lyse der transient transfizierten Zellen wurde mit Reporter Lysis Buffer nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 400 μ l 1 \times Reporter Lysis Buffer für 15 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgef  b überführt und im Folgenden auf Eis gehalten. Die erhaltenen Lysate wurden für 15 s gemischt und zur Sedimentierung der Zelltrümmer für 2 min bei 4°C und 12000 \times g zentrifugiert. Anschließend wurde der proteinhaltige Überstand dekantiert und bei -

70°C gelagert. Zur Durchführung der Messungen wurden die Lysate auf Raumtemperatur äquilibriert, um temperaturbedingte Schwankungen der Enzymaktivität zu vermeiden.

2.8.1.2 Messung der Luziferase-Aktivität

Die Luziferase-Aktivität der Zellysate (2.8) wurde nach der von WILLIAMS und Kollegen (1989) beschriebenen Methode in einem Luminometer bestimmt. Für jede Luziferinreaktion wurden 100 µl des Luziferase Assay Reagents in Polystyrolröhrchen (Sarstedt) vorgelegt und unmittelbar vor der Messung mit 20 µl Zellysate versetzt. Die Messung erfolgte im Luminometer Typ Lumat LB 9501 (Berthold), in dem automatisch vor jeder Messung 100 µl Luziferinlösung zur Probe injiziert und die entstehenden Lichtemissionen (relative Light Units, RLU) über ein Intervall von 10 s gemessen wurden. Der Leerwert betrug etwa 100 Light Units und wurde von den Messwerten abgezogen. Es wurden jeweils drei Einzelmessungen durchgeführt, die Werte gemittelt und anschließend gemäß der β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert (2.8.1.3).

Komponenten des Luciferase Enzyme Assay Systems (Promega):

Luciferase assay substrate (lyophilized)

Luciferase assay buffer

Reporter lysis buffer

*Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben.

2.8.1.3 Messung der β -Galaktosidaseaktivität

Der β -Galaktosidase Test beruht auf einer durch das bakterielle Enzym β -Galaktosidase katalysierten Hydrolyse, in deren Verlauf farbloses ONPG (o-Nitrophenol- β -D-Galactospyranosid) zu gelbem o-Nitrophenol und Galaktose umgesetzt wird. Dabei ist die Menge des gebildeten Farbstoffes proportional zu der Enzymmenge. Die optische Dichte des Farbstoffs wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifiziert.

Zur Durchführung des β -Galaktosidase Tests wurden 96 Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden verwendet. Als Standard wurde die Galaktosidase (1 U/ml) zunächst in 50 µl 1× Reporter-Lysis-Puffer (RLB) auf 0, 1, 2, 3, 4 und 5 mU verdünnt. Für den Test wurden je 50 µl Standard, Leerwert (1× RLB) oder Probe (25 µl Zellysate und 25 µl 1× RLB) in Dreifachbestimmungen eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl 2× Assay-Puffer gestartet und bis zum Eintreten einer deutlichen Gelbfärbung bei 37°C im Brutschrank

inkubiert (15-30 min). Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 150 µl 1M NaCO₃-Lösung abgestoppt und die optische Dichte in einem Mikrotiterplatten-Reader bei 420 nm gemessen.

Komponenten des β-Galactosidase Enzyme Assay Systems (Promega):

Reporter lysis buffer (RLB)

Assay 2× buffer

β-Galactosidase

1 M Sodium Carbonate (NaCO₃)

*Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben.

2.8.2 Bestimmung der Reporterogenaktivität

Die Reportergen-Aktivität in stimulierten, transient transfizierten Zellsystemen wurde anhand von stabilisierter Luciferase-Lösung (SteadyGlo[®]) ermittelt. In diesem Fall findet die Umsetzung des Substrates Luciferin nicht in einer schnellen Reaktion mit geringer Halbwertszeit statt (vgl. 2.8.1.1), sondern wird aufgrund spezieller Pufferbedingungen derart verlangsamt, dass die Halbwertszeit der Reaktion bei Raumtemperatur etwa 2 h beträgt. Mit Zugabe der Luciferin-Substrat-Lösung erfolgt gleichzeitig die Lyse der Zellen und somit die Freisetzung der gebildeten Luziferase.

Nach Ablauf der Inkubationzeit mit den jeweiligen Mediatoren (2.6.2) wurden pro Kavität 25 µl auf Raumtemperatur äquilibrierte SteadyGlow[®]-Lösung zugegeben und die 96 Well-Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 20 min und 250 rpm geschüttelt. Die Messung des emittierten Lichts erfolgte in einem automatischen 96-Well-Lumineszenzmeßgerät (LumiStar[®], BMG), wobei jedes Well für 10 s vermessen wurde. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe einer LumiStar-Excel-Maske (BMG).

Komponenten des SteadyGlow[®]-Luciferase Assay (Promega):

SteadyGlow[®]-Luciferase Assay Substrate (lyophilized)*

SteadyGlow[®]-Luciferase Assay Buffer*

*Die genaue Pufferzusammensetzung ist vom Hersteller nicht angegeben

2.9 Herstellung von Kernextrakten

Die Isolierung aktiver Kernproteine wurde sowohl mit einem kommerziell erhältlichen Kit als auch anhand einer von BOMSZTYK und Mitarbeitern (1990) nach DIGNAM (1983) modifizierten Methode durchgeführt. Zur Vermeidung von Proteindegradationen wurden

sterile, auf 4°C vorgekühlte Puffer und Verbrauchsmaterialien verwendet sowie die gesamte Präparation bei 4°C vollzogen.

Für die Isolierung nach BOMSZTYK wurden pro Ansatz 2×10^7 Zellen (2.6.3) zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert (2.5.2) und im Verlauf einer 10-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und $250 \times g$ sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 10 ml kaltem PBS aufgenommen, für 10 min bei 4°C und $250 \times g$ zentrifugierend gewaschen, in 1,5 ml kaltem PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 s bei $12000 \times g$ wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Zellsediment mit 400 µl Puffer A versetzt und zur hypoosmotischen Schwellung für 15 Minuten auf Eis gehalten. Zur Proteinsolubilisierung (Zellmembranlyse) erfolgte die Zugabe von 25 µl einer 10% Nonidet p-40-Lösung, das Lysat wurde anschließend kurz gemischt und die Zellkerne für 30 s bei $12000 \times g$ sedimentiert. Der zytosolische Überstand wurde verworfen, das Zellkernsediment in 50 µl Puffer C resuspendiert und zur Freisetzung der Kernproteine (high-salt-extraction) für 15 Minuten bei 250 rpm auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zelltrümmer im Verlauf einer 5-minütigen Zentrifugation bei $12000 \times g$ von der Zellkernfraktion (DNA und Kernproteine) getrennt, der Überstand in vorbereitete frische 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Pufferzusammensetzung:

Puffer A

HEPES	10 mM, pH 7,9
KCl	10 mM
EDTA	100 µM, pH 8,0
EGTA	100 µM, pH 7,6
PMSF	500 µM (Vor Versuchsbeginn frisch zusetzen.)
DTT	1 mM (Vor Versuchsbeginn frisch zusetzen.)

Puffer C

HEPES	20 mM, pH 7,9
NaCl	400 mM
EDTA	1 mM, pH 8,0
EGTA	1 mM, pH 7,6
PMSF	1 mM (Vor Versuchsbeginn frisch zusetzen.)
DTT	1 mM (Vor Versuchsbeginn frisch zusetzen.)

Die Extraktion aktiver Kernproteine unter Anwendung des Nuclear Extract Kits (2.1.4) der Firma Active Motif wurde gemäß der Herstellerangaben vollzogen. Das erhaltene Kernextrakt

wurde ebenfalls aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Zellkernprotein-Fractionen erfolgte anhand des Bradford-Assays (2.10).

2.10 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Sämtliche Bestimmungen von Proteinkonzentrationen erfolgten unter Anwendung des Bradford-Assays (BRADFORD *et al.*, 1976). Diesem Assay liegt das Prinzip zugrunde, dass der Farbstoff Coomassie-Blue durch die Bindung an aromatische oder basische Aminosäuren der Proteine vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird und derart eine Verschiebung der Wellenlänge des Farbstoff-Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm bewirkt. Der Anstieg der Absorption wird photometrisch bestimmt und die unbekannte Proteinkonzentration einer Probe anhand einer mit Proteinstandard erstellten Eichkurve bestimmt. Da ein Einfluss der Puffer-Komponenten, in denen die zu untersuchenden Proben gelöst waren auf das Absorptionsverhalten des Farbstoffs nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden den Proteinstandards der jeweilige konzentrationsäquivalente Zusatz der Puffer beigelegt.

Die unbekannte Proteinprobe wurde mit dH_2O auf ein Endvolumen von 20 μl aufgefüllt, mit 200 μl Farbreagenz gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem 96-Well-Mikrotiterplatten-Reader vermessen. Als Leerwert diente ein Ansatz, der 20 μl H_2O und 200 μl Farbreagenz enthielt. Zur Erstellung des Proteinstandards wurden 0-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) eingesetzt, wobei die Messungen in Dreifachbestimmungen erfolgten. Die unbekannte Proteinmenge wurde unter Verwendung der Eichgerade des Proteinstandards graphisch ermittelt.

Farbreagenz:

Coomassie Brilliant Blue G 250	100 mg
95% Ethanol	50 ml
85 % Phosphorsäure	100 ml
Wasser	850 ml

Nach Filtration durch Faltenfilter wurde die Lösung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.11 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen

Die Kenntnis über Interaktionen zwischen Zellkernproteinen (Transkriptionsfaktoren) und DNA-Sequenzen gibt Aufschluss über genregulatorische Mechanismen des zu

untersuchenden Genpromotors bzw. des Proteins, für das er kodiert. Herkömmlich wurden derartige Wechselwirkungen in Gelshift- oder *DNase I* Footprint-Experimenten untersucht. Folgend wird eine auf einem ELISA (2.11.1) basierende sensitivere und schnellere Methode (2.11.2) beschrieben, die es ermöglicht, ohne den Einsatz von Radioaktivität die Bindung eines Kernproteins aufgrund seiner DNA-Affinität *in vitro* spezifisch nachzuweisen.

2.11.1 ELISA

Unter dem Begriff „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) werden die Immunoassays zusammengefasst, bei denen die Konzentration eines Antikörpers über die Aktivität eines Markerenzym ermittelt wird. Dabei finden immer zwei Reaktionstypen statt: eine durch Antikörper vermittelte immunologische und eine enzymatische Reaktion (ENGVALL *et al.*, 1972).

2.11.2 Transcription Factor Profiling by Enzyme-Linked Immunoassay

Zur Bestimmung der Existenz und Funktionalität der *in silico* detektierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb des LEKTI-Genpromotors wurde ein „Transcription Factor Profiling by Enzyme-Linked Immunoassay“ (TF-EIA) durchgeführt (SHEN *et al.*, 2002). Eine Übersicht der Versuchsdurchführung ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

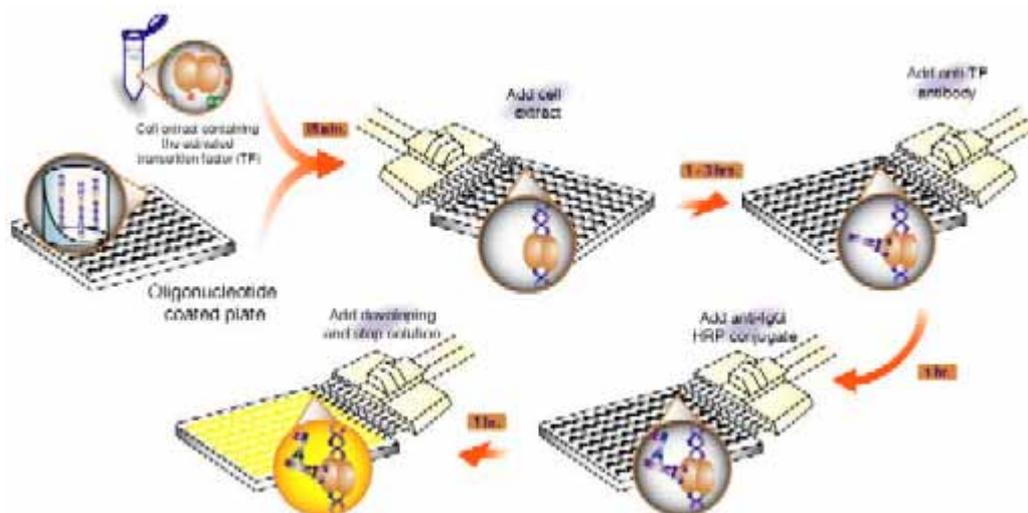


Abbildung. 2.4:

Prinzip des TF-EIA (©Active Motif):

Eine biotinylierte doppelsträngige DNA (dsDNA), welche eine putative Transkriptionsfaktor-Bindungssequenz des LEKTI-Genpromotors beinhaltet, wurde auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert. Aufgrund der Zugabe von Kernextrakt-Proteinen war zu dem Zeitpunkt die Bindung des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors an seine spezifische Erkennungssequenz innerhalb des immobilisierten LEKTI-Genpromotorfragments möglich. Zur Detektion der gebundenen Transkriptionsfaktoren wurden primäre Antikörper hinzugefügt, die spezifisch für die gebundene aktive Form des jeweiligen Transkriptionsfaktors sind. Es folgte eine Inkubation mit einem enzymkonjugierten

(Horse Raddish Peroxidase, HRP) sekundären Antikörper, der nun an die entstandenen immobilisierten Komplexe aus Transkriptionsfaktor und primärem Antikörper binden konnte. Letztlich wurde diese Enzymaktivität durch Zugabe eines Chromogensubstrates (Tetramethylbenzidin, TMB) bestimmt. TMB wird zu einem farbigen Substrat umgesetzt, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert wird, wobei die Intensität des Farbschlages proportional zu der Menge an gebundenem Sekundärantikörper ist.

Eine biotinylierte doppelsträngige DNA (dsDNA), welche eine putative Transkriptionsfaktor-Bindungssequenz des LEKTI-Genpromotors beinhaltet, wurde auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert. Aufgrund der Zugabe von Kernextrakt-Proteinen war zu dem Zeitpunkt die Bindung des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors an seine spezifische Erkennungssequenz innerhalb des immobilisierten LEKTI-Genpromotorfragments möglich. Zur Detektion der gebundenen Transkriptionsfaktoren wurden primäre Antikörper hinzugefügt, die spezifisch für die gebundene aktive Form des jeweiligen Transkriptionsfaktors sind. Es folgte eine Inkubation mit einem enzymkonjugierten (Horse Raddish Peroxidase, HRP) sekundären Antikörper, der nun an die entstandenen immobilisierten Komplexe aus Transkriptionsfaktor und primärem Antikörper binden konnte. Letztlich wurde diese Enzymaktivität durch Zugabe eines Chromogensubstrates (Tetramethylbenzidin, TMB) bestimmt. TMB wird zu einem farbigen Substrat umgesetzt, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert wird, wobei die Intensität des Farbschlages proportional zu der Menge an gebundenem Sekundärantikörper ist.

Die in Abhängigkeit des limitierten Messbereichs des genutzten Mikrotiterplatten-Readers einzusetzenden Antikörperverdünnungen wurden in Vorversuchen optimiert. Bei einer Verdünnung des primären von 1:500 und des sekundären Antikörpers von 1:1000 konnten alle untersuchten Proben quantifiziert werden. Sämtliche Ansätze wurden in vier Wells parallel durchgeführt, wobei Ansätze, die ohne Kernextrakt inkubiert wurden, als Kontrolle dienten.

2.11.3 Durchführung eines TF-EIA

Der nachfolgend beschriebene Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche Waschschrte wurden dreimal mit TBS-T anhand einer 10 ml Auslaufpipette vorgenommen, wobei die Wells nach jedem Schritt vorsichtig über Saugpapier ausgeschlagen wurden.

Zur Herstellung der dsDNA wurden die jeweiligen Oligonukleotidpaare (2.1.3) mit einer finalen Biotinkonzentration von 125 pmol in 100 µl TE-Puffer gelöst und für 10 min bei 100°C in einem Wasserbad hybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die benötigte Menge an Mikrotiterplatten-Wells gewaschen und anschließend mit je 100 µl des auf Raumtemperatur

abgekühlten Hybridisierungsansatzes beladen. Nach einer einstündigen Inkubation, an die sich ein Waschvorgang anschloss, wurden 40 µl Kernextraktproteine, die zuvor in der gewünschten Konzentration mit 1× Rotiblock verdünnt worden waren, auf die Wells gegeben. Einer erneuten Inkubation für 45 min folgte ein weiterer Waschvorgang, bevor 100 µl der primären Antikörper-Lösung auf das entsprechende Well geladen wurden. Nach Ablauf von 30 Minuten und einem vollzogenen Waschschrift wurden die Wells mit je 100 µl der sekundären Antikörperlösung versetzt und erneut für 30 Minuten inkubiert. Zur Detektion des enzymkonjugierten sekundären Antikörpers wurde den gewaschenen Wells je 100 µl TMB-Substrat-Lösung beigefügt, diese nach 15 min mit 50 µl Stopplösung überschichtet und letztlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Tabelle 2.9: Verwendete Materialien zur Durchführung eines TF-EIA

Material	Hersteller
Microplate Autoreader EL 311	Bio-Tek Instruments
Reacti-Bind™Neutravidin™Coated Plates (Nr.: 0015508)	Pierce, USA
Antikörper	Hersteller
Ikaros (H-100); sc-13039	Santa Cruz, USA
NFATc1 (H-110); sc-13033	Santa Cruz, USA
NF-κB p50 (H-119); sc-7178	Santa Cruz, USA
Stat3 (H-190); sc-7179	Santa Cruz, USA
Goat Anti Rabbit IgG; sc-2054	Santa Cruz, USA
Puffer, Lösungen	Hersteller
TMB (Nr.: 34014)	Pierce, USA
Rotiblock (Nr.: 151.1)	Roth

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCL
 1 mM EDTA
 pH-Wert auf 8,0 einstellen, ad 1l mit ddH₂O

1 x TBS-Tween:

100 ml 10 x TBS
 1 ml Tween20®
 900 ml ddH₂O

10 x TBS:

24,2 g Tris
 80,0 g NaCl
 pH-Wert mit HCL auf 7,6 einstellen, ad 1l mit ddH₂O

2.12 Ca²⁺-Messungen mit FLIPR™

Für die Messung intrazellulärer Ca²⁺-Änderungen wurde der FLIPR™ (Fluorometric Imaging Plate Reader) verwendet. Das System basiert auf der Ladung von Zellen mit einem fluoreszenten Acetoxy-Methyl-Ester (Fluo-4, Am, Molecular Probes®). Nach der Diffusion des Farbstoffes in die Zellen wird der Ester intrazellulär gespalten, so dass sich Fluoro-4 in der Zelle anreichert. Das Derivat erhöht seine Fluoreszenz-Intensität um ca. das Hundertfache nach Bindung von freiem, intrazellulären Ca²⁺.

Für die Experimente wurden BHY- und SKHEP-1-Zellen in schwarzen 96-Well-Platten (Costar, Kat.Nr. 3603) mit je 30 000 bzw. 45 000 Zellen pro Well in Kompletmedium ausplattiert und 16 h über Nacht bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Für die Beladung wurden die Zellen einmal mit 1 x HBSS (Invitrogen) inkl. 20 nM HEPES (Invitrogen) gewaschen und mit dem gleichen Puffer incl. 1 µM Fluoro-4® (gelöst in je 22 µl DMSO und 22 µl Pluronic F-127; Molecular Probes) für 40 min bei 37°C/5%CO₂ beladen. Die Wells wurden anschließend je 3 x mit 1 x HBSS/HEPES gewaschen und in einem Volumen von 100 µl 1 x HBSS/HEPES kurz bei 37°C inkubiert. Die Zugabe der in 1x HBSS/HEPES gelösten Testsubstanzen erfolgte während der Messung in einem Volumen von je 50 µl als 3-fach konzentrierte Lösungen. Die Anregung der Zellen erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm, die Emission wurde zwischen 510 und 520 nm gemessen. Die relative Fluoreszenz-Änderung wurde 30 s im Verlauf (vor Applikation des Stimulus) und 130 s nach Zugabe der Testsubstanzen gemessen. Alle weiteren Details wurden gemäß der Anweisungen des Handbuchs Version 3.4, Molecular Devices durchgeführt.

2.13 Computergestützte Sequenzanalyse, Datenbankrecherche und genutzte Software

Die Vorbereitungen aller beschriebenen Experimente wurden mit Hilfe eines Personal Computers unter Einsatz des kommerziellen Programms MatInspector (2.13.1) sowie den kostenfrei zugänglichen Programme des NCBI (2.13.2) durchgeführt. Zum Vergleich von sequenzierten DNA-Fragmenten untereinander wurde das Programm Sequencher™ Version 3.1 angewendet.

Weiterhin dienten zur Erstellung der vorliegenden Arbeit Computerprogramme zur Text- und Graphikbearbeitung (Microsoft® Office und Adobe Photoshop). Sämtliche statistischen Berechnungen der Standardabweichungen (SD) wurden mit Excel 97 nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

(y_i = Einzel-Messwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Mittelwert aller Einzel-Messwerte, n = Anzahl der Replika)

2.13.1 MatInspector

Zur *in silico* Analyse des LEKTI-Genpromotors auf potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurde das auf TRANSFAC 4.0 basierende Computerprogramm MatInspector V2.2 eingesetzt (<http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl>). Anhand dieses Programmes wird eine vorgegebene DNA-Sequenz hinsichtlich kurzer Sequenzen („core-sequence“) durchsucht, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Bindungsstellen für einen Transkriptionsfaktor darstellen. Im Anschluss daran werden diese Daten automatisch mit den gesamten bis dato bekannten Transkriptionsfaktor-Erkennungssequenzen aus der Literatur verglichen (QUANDT *et al.*, 1995). Das erhaltene Ergebnis gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der einer der detektierten regulatorischen Sequenzen eine Funktion *in vivo* zukommt.

2.13.2 NCBI

Die öffentliche Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bietet ein breites Spektrum an (Such-) Programmen zur Bewältigung der Datenfülle aller bisher publizierten DNA-Sequenzen diverser Spezies und der rasant wachsenden Menge an Literatur im biologischen und medizinischen Bereich. Diese Datenbank wurde ebenfalls für den Vergleich von Sequenzen mit den bis dato bekannten Genomen eingesetzt (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*, ALTSCHUL *et al.*, 1997) und bietet weiterhin ein vielfältiges Angebot zur Analyse von DNA-Sequenzen (GenBank) und zur Literatursuche (PubMed).

3. Ergebnisse

3.1 *in silico* Genpromotor-Analyse

Zur Charakterisierung der klonierten Promotorsequenz des LEKTI-Gens erfolgte eine *in silico* Genpromotor-Analyse unter Einsatz des Computerprogramms MatInspector (2.13.1). Das Ergebnis dieser Analyse ist den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt. Zur Übersicht sind in Abbildung 3.1 nur die putativen regulatorischen Motive verzeichnet, die mögliche Bindungsstellen für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren repräsentieren. Da der Transkriptionsstartpunkt des LEKTI-Gens bis dato unbekannt bzw. die Möglichkeit multipler Transkriptionsstartpunkte diskutiert ist (DRÖGEMÜLLER, 1999), beziehen sich alle nachfolgend angegebenen Positionsangaben des jeweiligen Sequenzmotivs (5'-terminales Nukleotid) auf den Translationsstartpunkt ATG (Abb. 3.2).

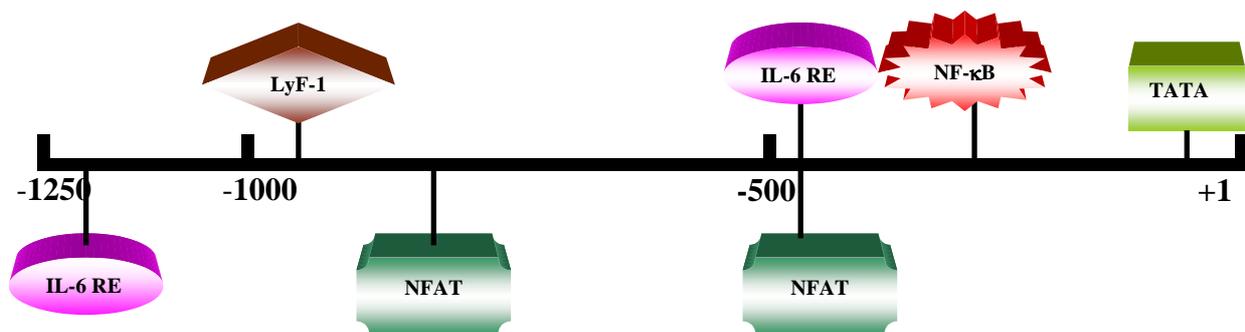


Abbildung 3.1:

Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten putativen Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren innerhalb des LEKTI-Genpromotors. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Translationsstartpunkt. IL-6RE: „Interleukin-6 response elements“; NF-κB: Nuclear Factor *kappa*-B“; NFAT: „Nuclear Factor of Activated T-Cells“; LyF-1: „Lymphoid Transcription Factor 1“.

Der untersuchte LEKTI-Genpromotor (Abb. 3.1) beinhaltet zwei putative „Interleukin-6 response elements“ (IL-6RE; AKIRA *et al.*, 1990), wobei eines im distalen (IL-6RE I) und das zweite im proximalen Abschnitt (IL-6RE II) des klonierten Promotors lokalisiert ist. Weiterhin detektierte das Programm sowohl ein putatives Bindungsmotiv für den „Nuclear Factor *kappa*-B“ (NF-κB; SEN *et al.*, 1986) im proximalen als auch ein TATA-Box-Element (BREATHNACH *et al.*, 1981; MCKNIGHT *et al.*, 1982) im Core-Promotorbereich. Ferner wurden bei der Auswertung neben zwei putativen Bindungsmotiven für den „Nuclear Factor of Activated T-Cells“ (NFAT; MCCAFFREY *et al.*, 1992) auch eines des „Lymphoid Transcription Factor 1“ (LyF-1; LO *et al.*, 1991) identifiziert.

	+1	
(+)	3'-AGTG ACACCGATAG AAGTACAAC TCTGCTACGT TCAGCGGATG TCCAGGTGAG GTACGTAACG AGTCGACCAC	-57
(-)	5'-TCAC TGTGGCTATC TTCATGTTGA AGACGATGCA AGTCGCCTAC AGGTCCACTC CATGCATTGC TCAGCTGGTG	
	TATA-Box CRE	
GTCATACTGA	CTTGAGCCCC GTTACGTCAA ATGAAATAT TTCGTGACCA CTGTGGGTGT ATTTTGGTCA ACAAGTTCCA	-137
CAGTATGACT	GAACTCGGG CAATGCAGTT TACTTTTATA AAGCACTGGT GACACCCACA TAAAACCAGT TGTTCAAGGT	
	CRE	
GTACCCTGAA	TATATGGTGT GGTGAAATCG AAGGTAGGAA ATCCTAGGAC AGTCCCACAG TCCAAACTTG TCTCTTATAG	-217
CATGGGACTT	ATATACCACA CCACTTTAGC TTCCATCCTT TAGGATCCTG TCAGGGTGTC AGGTTTGAAC AGAGAATATC	
	CACCC-Box	
ATAAAGATTC	ATCCTTACAA GAAAGTACCA TGAGGGGGT CTTGCGTTAA CTACCTCAGG TGTCTGGGAT GAGTTTCAAC	-297
TATTTCTAAG	TAGGAATGTT CTTTCATGGT ACCTCCCCCA GAACGCAATT GATGGAGTCC ACAGACCCTA CTCAAAGTTG	
	(*) NF-κB	
	GRE/PRE	
TTATAAGATA	TTAGGATATA TTATTGGCTT AAGGAGTCTT TATGGTCTAT ATGATGGAGC ATTTGTTTGT ACAAAGACTG	-377
AATATTCTAT	AATCCTATAT AATAACCGAA TTCCTCAGAA ATACCAGATA TACTACCTCG TAAACAAACA TGTTTCTGAC	
	GAS	
ACCTGAGGGA	AGTATTACC CTCTCCTCTC CTTTCCTTCT GTCTAACCAA CAGGATGGTC AGTCCATATC TAAATTTCTA	-457
TGGACTCCCT	TCATAAGTGG GAGAGGAGAG GAAAGGAAGA CAGATTGGTT GTCCTACCAG TCAGGTATAG ATTTAAAGAT	
	SP-1 IL-6RE II	
AGGTGTAGG	TCTCTTTAGG TCCCAAGGAC AAGACTTCAC AGACTCAAGT CACAGTGTCT GAGTATATAT ACAAATCTCAA	-537
TTCCACATCC	AGAGAAATCC AGGGTTCCTG TTCTGAAGTG TCTGAGTTCA GTGTACAGAG CTCATATATA TGTTAGAGTT	
	NFAT II GRE/PRE	
CTTGCTGGGA	TTTCTATATG GACCGTTTTA AGATTACAAC TTATATATCC CTCCGTCCTT GAGTCTCCTC GTTACTGAAA	-617
GAACGACCTT	AAAAGATAAC CTGGCAAAAT TCTAATGTTG AATATATAGG GAGGCAGGAA CTCAGAGGAG CAATGACTTT	
	Oct-1	
GAGTATTGCT	CTGTCAAATC AACCTCGTCC GTCTCCTCCG TAGGTCGTGA ACGTTCGTCT GGTGTGTATA TTGTAAGAAA	-697
CTCATAAGCA	GACAGTTTAG TTGGAGCAGG CAGAGGAGGC ATCCAGCACT TGCAAGCAGA CCACACATAT AACATTCTTT	
	GAS	
GGAGAGACAT	GYGACGAAGT AGGAATCTGT AATCTTTTCC GTCTTTGCAA CTTTTTTATT TTGAACATAC ATTGATTGAA	-777
CCTCTCTGTA	CRCTGCTTCA TCCTTAGACA TTAAGAAAGG CAGAAACGTT GGAAAAATAA AACTTGATG ATG TAACCTA	
	NFAT I Oct-1	
AATTTTGAAG	AGTTAGACGT CCTATAAAAT ATAAGACTTC GGAATAAAAT ATAAAATCGG TTTGTAGTAT TAGTATTTGT	-857
TTAAAACCTC	TCAATCTGCA GGATATTTTA TATTCTGAAG CCTTATTTTA TATTTTAGCC AAACATCATA ATCATAAAACA	
AACCTCTGAG	TCAAATTGAA AGGGTATCGG ATACTAATGG GTATAATGGC AAACCTTTTA AACCGAGTTA GTCAAAGAG	-937
TTGGAGACTC	AGTTTAACTT TCCCATAGCC TATGATTACC CATATTACC G TTTGAAAAAT TTGGCTCAAT CAGTTTCTC	
	LyF-1	
ATTTAGTATA	AAGAAGGGAC ATAGTAGGGT AATAAATCAG AGGGTTTTTC TTTTCTTCTT TTTTCAACAA TTGTTAATAT	-1017
TAAATCATAT	TTCTTCCCTG TATCATCCA TTATTTAGTC TCCCAAAAAG AAAAGAAGAA AAAAGTTGTT AACAATTATA	
TTACACATTT	ACATTGTAAA AAGATCTCTT TCAAAGAAGA GAAATCAACG AAGAAAGTAG GATTGTTTCAT TGTGAAAAAA	-1097
AATGTGTAAA	TGTAACATTT TTCTAGAGAA AGTTTCTTCT CTTTAGTTGC TTCTTTCATC CTAACAAGTA ACACCTTTTT	
AGATGGTCTGA	ATAAACGGG ATTATCGAAT TCTTTCGTGG ACTTCTTGT ACACTTCTAC TGACTTTGGT CTCGGTTTAA	-1177
TCTACCAGCT	TATTTTGCCC TAATAGCTTA AGAAAGCACC TGAAGAAACA TGTGAAGATG ACTGAAACCA GAGCCAAAT	
	Oct-1 CRE	
	IL-6RE I	
CAAAGTAAGG	-5'	
GTTTCATTCC	-3'	

Abbildung 3.2:

Darstellung ausgewählter *in silico* identifizierter putativer regulatorischer Motive innerhalb der untersuchten LEKTI-Genpromotorsequenz unter Einsatz des Computerprogramms MatInspector (2.13.1). Dabei fanden nur die Sequenzmotive Berücksichtigung, deren Kern-Konsensussequenzen vollständig (100 %) repräsentiert waren und eine Matrixhomologie von mindestens 90 % aufwiesen. Der Translationsstartpunkt ATG (+1) ist gekennzeichnet. Oct-1 (Octamer-Binding Proteine 1); CRE (cAMP-Responsive Element); GRE/PRE (Glucocorticoid/ Progesteron Response Element); SP-1 (Signal Protein 1) IL-6RE („Interleukin-6 response element“); NF-κB (Nuclear Factor kappa-B⁶); NFAT („Nuclear Factor of Activated T-Cells“); LyF-1 („Lymphoid Transcription Factor 1“); (*): Erläuterung in 4.5; (-): nicht-kodierender Strang; (+): kodierender Strang

3.2 Bestimmung der endogenen LEKTI-Genexpression humaner Zelllinien

Die Grundlage aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wie Stimulationen (2.6) oder Reporteranalysen (2.8) war die Bestimmung humaner Zelllinien, die das LEKTI-Gen endogen exprimieren. Unter dieser Prämisse mußte ebenfalls eine Referenz-Zelllinie identifiziert werden, die weder in stimulierten noch unstimulierten Zuständen eine endogene Expression des LEKTI-Gens aufweist. Zu diesem Zweck erfolgte die Optimierung einer Standard-PCR (2.4.1). Die dazu eingesetzten Oligonukleotide zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität sowohl bei der Amplifikation eines 180 Bp. umfassenden DNA-Fragments („LEKTI“) als auch in den Kontrollen mit genomischer DNA, in denen ein spezifisches Amplikon von ca. 2000 Bp. nachweisbar war. In die PCR-Reaktion (2.4.1) wurden cDNAs (2.4.1) humaner Zelllinien (2.5.1), die Oligonukleotide VGA-19S und VAG-21AS (2.1.3) sowie die TaKaRa Ex *Taq*TM-Polymerase (Cambrex Bio Science) unter folgenden Parametern (2.4.1) eingesetzt:

Temperaturprogramm für 40 Zyklen (1.- 3. Schritt):

Erst-Denaturierung der DNA	97°C	3 min
1. Denaturierung	96°C	30 s
2. Oligonukleotidanlagerung	65°C	45 s
3. Elongation	72°C	2,5 min
End-Elongation	72°C	7 min
Reaktionsende	4°C	∞ min

Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Ansätze in einem 2 % igen Agarosegel ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

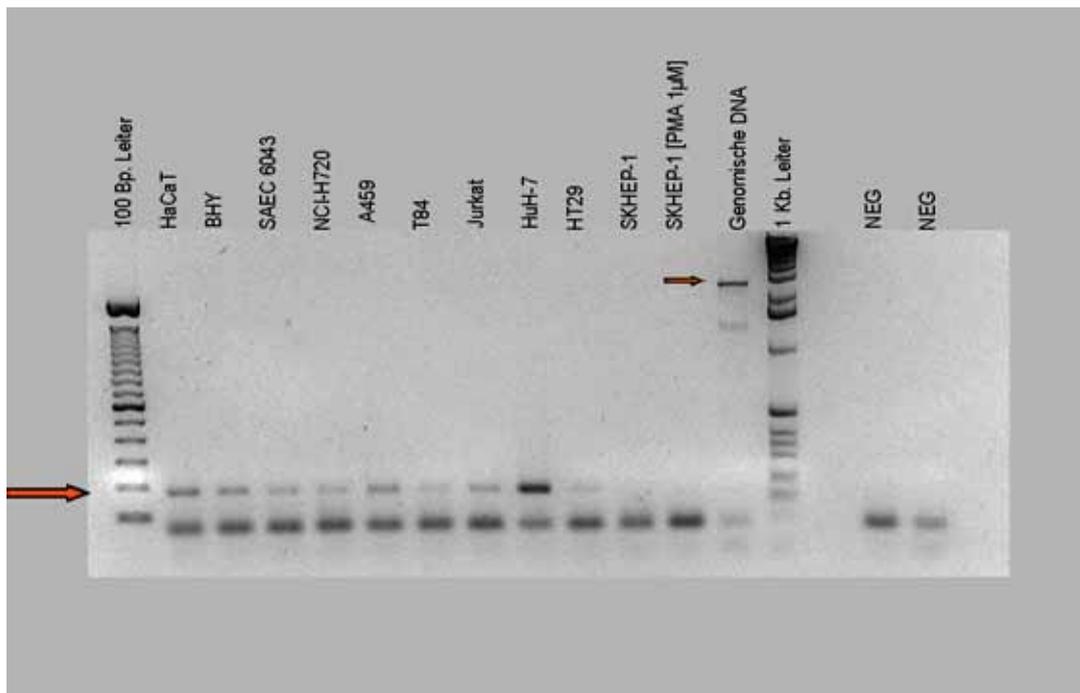


Abbildung 3.3:

Bestimmung der endogenen LEKTI-Genexpression in humanen Zelllinien mittels einer optimierten Standard-PCR. Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2 % igen Agarosegel. Eine 100 Bp.- und 1 Kbp.-Leiter (Invitrogen) wurden als Größenstandard mitgeführt. Die Pfeile zeigen die Höhe des erwarteten Amplifikats von 180 Bp. für die LEKTI-cDNA bzw. die Höhe der genomischen Kontrolle (ca. 2000 Bp.).

Die Ergebnisse (Abb. 3.3) zeigen eine LEKTI-Genexpression in verschiedenen humanen Zelllinien (Tab. 3.1), die mit dem lympho-epithelialen Expressionsmuster des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI übereinstimmt (MÄGERT *et al.*, 1999). Ferner konnte die Zelllinie SKHEP-1 (2.5.1) als Referenz-Zelllinie bestimmt werden, da diese weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand eine endogene LEKTI-Genexpression aufweist. Zur Überprüfung, ob die generierten Amplifikate tatsächlich die erwartete DNA-Sequenz repräsentieren, erfolgte die Extraktion der Amplifikate aus dem Agarosegel (2.2.2), die Klonierung in den pGEM-T Vektor (2.2.4) sowie eine anschließende Sequenzierung (2.3).

Tabelle 3.1:
Zusammenstellung der identifizierten humanen Zelllinien, die das LEKTI-Gen endogen exprimieren.

Zelllinie	Organ / Herkunft
HuH-7 (hepatoma cells)	Leber
BHY (oral squamous cell carcinoma)	Mundschleimhaut (epithelialer Herkunft)
SAEC 6043 (primary small airway epithelial cells)	Alveolaren (epithelialer Herkunft)
NCI-H720 (lung; atypical carcinoid)	Alveolaren (epithelialer Herkunft)
A459 (pulmonary epithelial type II cells)	Alveolaren (epithelialer Herkunft)
HaCat (immortalised keranocytes)	Haut (epithelialer Herkunft)
HT 29 (colon adenocarcinoma)	Dickdarmschleimhaut (epithelialer Herkunft)
T84 (lung derived colorectal carcinoma)	Dickdarmschleimhaut (epithelialer Herkunft)
Jurkat (T cell leucemia)	Thymus (lymphatischer Herkunft)

3.3 Bestimmung der transkriptionellen Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente mittels Reporteranalyse

Die Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des LEKTI-Genpromotors erfolgte anhand von Reporteranalysen (2.8). Dazu wurde der 1,25 kB. umfassende 5'-Bereich des LEKTI-Genpromotors sukzessiv verkürzt und die generierten Deletionsfragmente in den Luziferase-Reporter-Gen-Vektor pGL2-Basic (2.1.6) kloniert (DRÖGEMÜLLER, 1999). Die Größe und Struktur der Fragmente bezüglich der deletierten, putativen regulatorischen Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren sind aus Abbildung 3.4 ersichtlich.

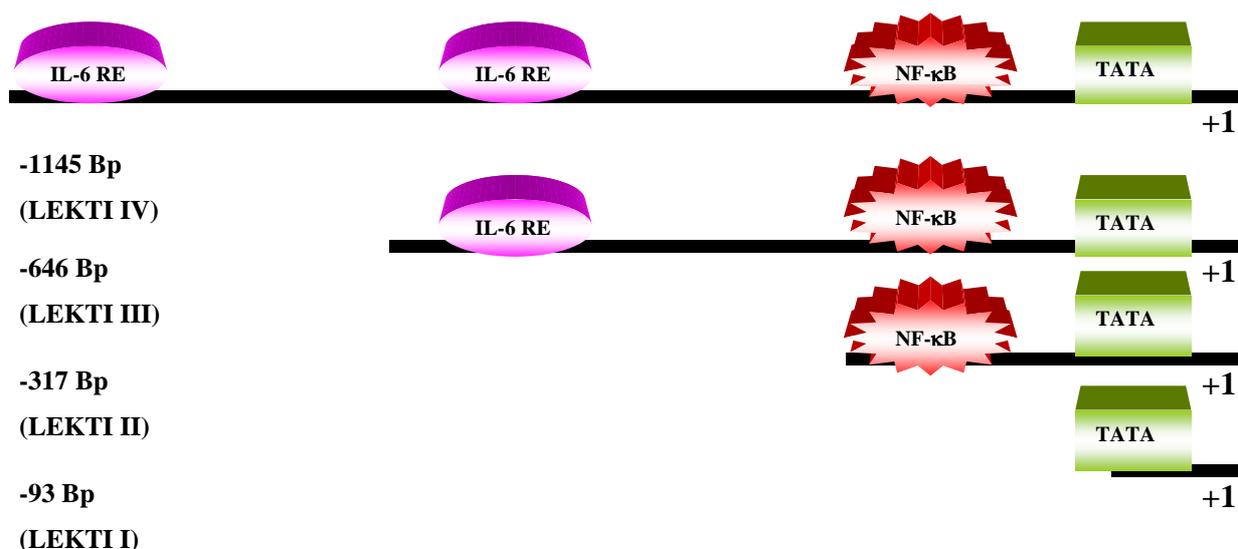


Abbildung 3.4:
 Darstellung der Größe (bezogen auf den Translationsstartpunkt) und Struktur des LEKTI-Genpromotors (LEKTI IV) bzw. der Teilfragmente (LEKTI I, II, III) in Hinblick auf die deletierten, putativen regulatorischen Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren, die (nach Klonierung in den Luziferase-Reporter-Gen-Vektor pGL2-Basic) in den anschließenden Reporteranalysen Verwendung fanden.

Der LEKTI-Genpromotor LEKTI IV (Abb. 3.4) enthält (u.a.) zwei putative IL-6REs und ein NF- κ B-Motiv. Die Generation des Teilfragments LEKTI III diente zur Deletion des distalen und die des Teilfragments LEKTI II zur Deletion des proximalen putativen IL-6REs. Demzufolge beinhaltet das Teilfragment LEKTI II das putative NF- κ B-Motiv und das Teilfragment LEKTI I keines der untersuchten, putativen regulatorischen Sequenzmotive (Abb. 3.4). Die Auswirkungen dieser Deletionen wurden anschließend experimentell analysiert (3.3.1, 3.3.2).

3.3.1 Bestimmung der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Reportergen-konstrukte

Die Bestimmung der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente (Abb. 3.4) erfolgte mittels Luziferase-Reportergen-Assays (ALAM *et al.*, 1990; LIM *et al.*, 1989). Die dazu eingesetzten Plasmid-Vektoren (2.1.6) enthalten eine Kopie des Luziferase-Gens unter der transkriptionellen Kontrolle des jeweiligen zu untersuchenden LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragments. Dazu wurde die Luziferase-Äktivität als Ausdruck der Promotoraktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) in transient transfizierten HuH-7-Zellen (2.7.1) gemessen (2.8.1.2), wobei die Transfektionsansätze mit den Plasmid-Vektoren pGL2-Basic und pGL2-Control (2.1.6) als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienten. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz (2.8.1) erfolgte eine Ko-Transfektion sämtlicher Transfektionsansätze mit dem pSV β -Galaktosidase-Control-Vektor (2.1.6).

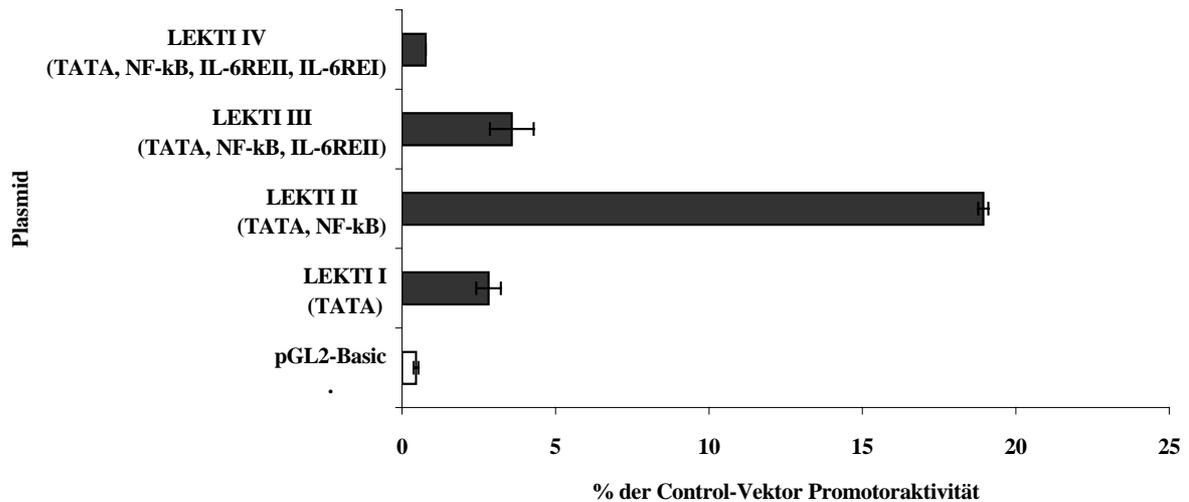


Abbildung 3.5:

Bestimmung der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente in HuH-7-Zellkulturen. Die Promotoraktivität wurde im Verhältnis zum Control-Vektor ermittelt und dessen Aktivität auf 100 % festgelegt. Gezeigt sind die durch β -Galaktosidase-Tests standardisierten Mittelwerte der Luziferase-Messungen aus zwei Experimenten (n=3) +/- SD.

Der Abbildung 3.5 ist zu entnehmen, dass das LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragment II (LEKTI II) die höchste Promotoraktivität aller untersuchten Plasmide aufweist. Der Vergleich der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente I, III und IV zeigt eine Abstufung der untersuchten Aktivität von III > I > IV, wobei diese unter Berücksichtigung der gezeigten Aktivität des Plasmids LEKTI II sämtlich als gering eingestuft werden müssen. In Hinblick auf die Auswirkungen der durchgeführten Deletionen (Abb. 3.4) ist anhand dieser Ergebnisse (Abb. 3.5) folgendes festzustellen:

- (i) Die Deletion des distalen putativen IL-6REs I bewirkt eine Erhöhung der Aktivität des LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragments III (LEKTI III > LEKTI IV).
- (ii) Die Deletion des zweiten proximalen putativen IL-6REs II führt zu einem deutlichen Anstieg der Promotoraktivität des LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragments II (LEKTI II), welches das noch vorhandene putative NF- κ B-Motiv beinhaltet.
- (iii) Interessanterweise zeigt das LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragment I (LEKTI I), das abgesehen von der putativen TATA-Box keines der untersuchten putativen regulatorischen Bindungsmotive beinhaltet, eine höhere Aktivität als das LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragment VI (LEKTI IV), welches den gesamten (im Rahmen dieser Arbeit) untersuchten LEKTI-Genpromotor darstellt (Abb. 3.4).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Deletionsfragment LEKTI II, welches

das putative NF- κ B-Motiv beinhaltet in Bezug auf die Genpromotor-Deletionsfragmente LEKTI I, III und IV eine stark erhöhte Aktivität aufweist.

3.3.2 Bestimmung der Reporter-gen-Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente in Abhängigkeit definierter Stimuli

Auf Grundlage der Aktivitäten der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente (3.3.1) erfolgte die spezifische Untersuchung der in den Fragmenten lokalisierten, putativen regulatorischen DNA-Motive (Abb. 3.4) bezüglich ihrer Responsivität auf genregulatorisch wirksame Mediatoren (2.6). Dazu wurden die humanen hepatozytären Zelllinien HuH-7 und SK-HEP-1 (2.5) transient mit den Plasmid-Vektoren pGL2-Basic, LEKT I, II, III und IV (2.1.6) transfiziert (2.7.1), wobei der promotorlose Vektor pGL2-Basic als Referenz auf der Plasmid-Ebene und die „LEKTI-negative“ Zelllinie SK-HEP-1 (3.2) für Vergleichszwecke auf der Zellsystem-Ebene diente. Im Anschluss an die Inkubation der Transfektionsansätze für 6 Stunden mit verschiedenen Mediatoren (2.6.2) erfolgte die Bestimmung der Luziferase-Aktivität (2.8.2). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt, in denen zum direkten Vergleich der Signifikanz des Einflusses des jeweiligen genutzten, genregulatorisch wirksamen Mediators eine einheitliche Darstellung² bezüglich des ermittelten Maximums der relativen Lichteinheiten (RLU) im Verlauf der Versuchsreihen (Abzisse) gewählt ist.

Zur Feststellung, ob PKC-vermittelte Signale, die einen Einfluss auf die Promotoraktivität vieler Gene wie beispielsweise die der Serinproteinase-Inhibitoren SKALP/Elafin (BINGLE *et al.*, 2000; PFUNDT *et al.*, 1996) oder α -1-Antitrypsin (MORGAN *et al.*, 2002) ausüben, ebenfalls die Aktivitäten der LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente regulieren, erfolgte eine Inkubation der Transfektionsansätze mit dem PKC-Aktivator PMA (2.6).

² In den Abbildungen 3.9 und 3.10 sind abweichende Skalierungen der Abzisse gewählt.

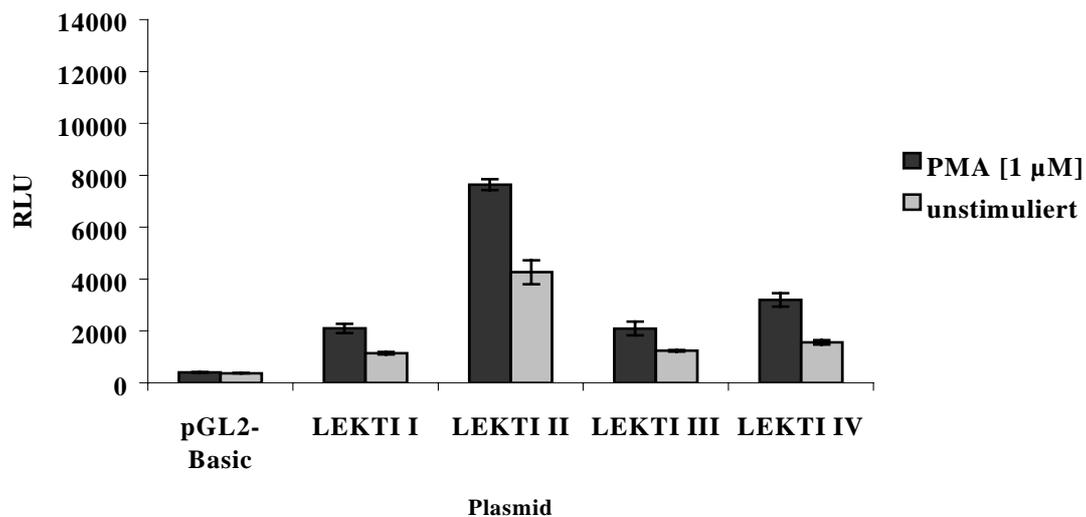


Abbildung 3.6:

Induktion der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte durch Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA [1 µM] für 6 Stunden in transient transfizierten HuH-7-Zellkulturen. Die Kontrolle repräsentiert der Leer-Vektor pGL2-Basic. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=4) +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.6) zeigen eine Verdopplung der LEKTI-Genpromotoraktivität in allen untersuchten Plasmiden. Diese PMA-Responsivität weist auf regulatorische DNA-Motive innerhalb des LEKTI-Genpromotors hin, die von (durch PKC-vermittelte Signale) aktivierten Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF-κB erkannt und gebunden werden und derart die Transkriptionsrate modulieren (GHOSH, 1999).

Da an der Transkriptionsregulation verschiedener Gene wie beispielsweise die der Serinproteinase-Inhibitoren „Plasminogen Activator Inhibitor Typ I“ (HEATON *et al.*, 1998) und Typ II (COSTA *et al.*, 2000) PKA/cAMP-vermittelte Prozesse involviert sind, wurden denkbare Einflüsse auf die Aktivität der untersuchten LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente im Verlauf einer Inkubation mit dem PKA/cAMP-Aktivator Forskolin (2.6) untersucht.

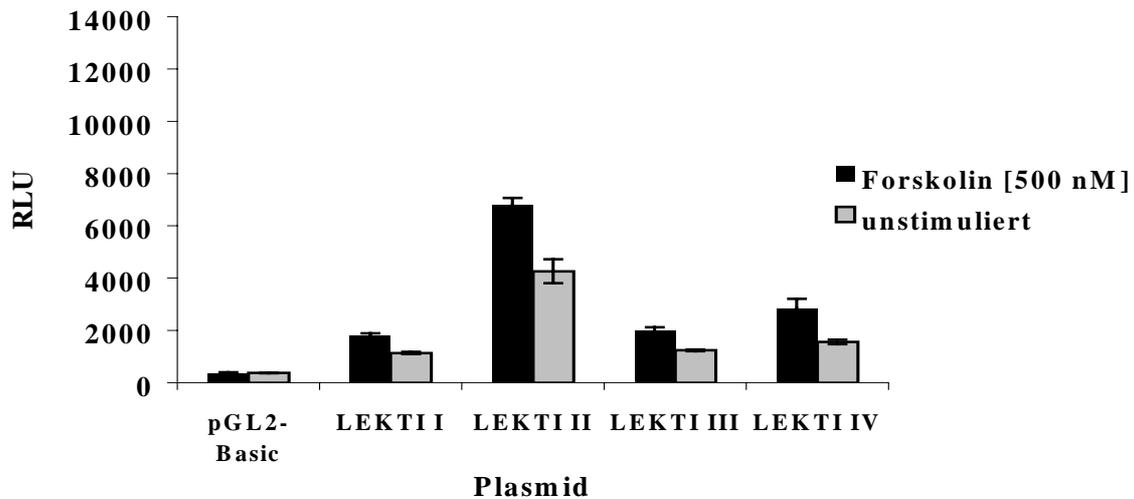


Abbildung 3.7:

Induktion der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte durch Stimulation mit dem PKA/cAMP-Aktivator Forskolin [500 nM] für 6 Stunden in transient transfizierten HuH-7-Zellen. Die Kontrolle repräsentiert der Leer-Vektor pGL2-Basic. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=4) +/- SD.

Der Abbildung 3.7 ist zu entnehmen, dass alle untersuchten LEKTI-Genpromotor-Konstrukte eine cAMP-Responsivität aufweisen, da sich die Promotoraktivität im Vergleich zu den unstimulierten Ansätzen um mindestens 30 % erhöht. Dieses Ergebnis deutet auf das Vorkommen regulatorischer Motive für Transkriptionsfaktoren innerhalb des LEKTI-Genpromotors hin, die infolge der Adenylat-Zyklase-Aktivierung aktiviert werden und die Transkription beeinflussen (HAI *et al.*, 2001; VALLEJO *et al.*, 1993). Da innerhalb des gesamten LEKTI-Genpromotors *in silico* putative cAMP-responsive DNA-Motive identifiziert wurden (3.1), kann diesen in ihrer Gesamtheit vermutlich eine Beteiligung an der Regulation der Transkription des LEKTI-Gens zugewiesen werden.

Ausgehend von der gezeigten PKC- und PKA/cAMP-vermittelten Beteiligung an der Aktivierung der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte (Abb. 3.6; 3.7) folgte in Hinblick auf eine denkbare Interaktion dieser zwei signalvermittelnden Wege (BOGUSLAWSKI *et al.*, 2000) eine Ko-Stimulation der Transfektionsansätze mit dem PKC-Aktivator PMA [1 μ M] und dem PKA/cAMP-Aktivator Forskolin [500 nM].

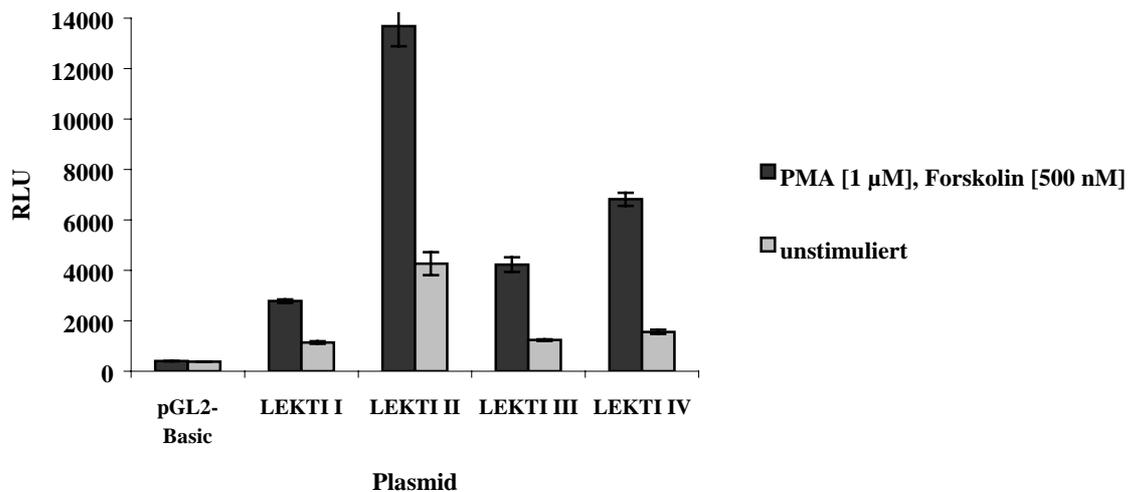


Abbildung 3.8:

Induktion der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte durch Ko-Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA[1 µM] und PKA/cAMP-Aktivator Forskolin [500 nM] für 6 Stunden in transient transfizierten HuH-7-Zellen. Die Kontrolle repräsentiert der Leer-Vektor pGL2-Basic. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=4) +/- SD.

Das Ergebnis (Abb. 3.8) zeigt eine deutliche Erhöhung der Aktivitäten sämtlicher LEKTI-Genpromotor-Konstrukte, die sich in einer Verdopplung in dem Plasmid LEKTI I sowie einer Verdreifachung in den Plasmiden LEKTI II, III und IV manifestiert. Dieser Sachverhalt weist auf eine additive cAMP- und PKC-vermittelte Beteiligung an der Regulation der LEKTI-Genpromotoraktivität hin. Die LEKTI-Promotor-Konstrukte II, III und IV beinhalten das untersuchte putative NF-κB-Motiv und putative cAMP-responsive DNA-Motive (Abb. 3.2). Daher ist es denkbar, dass innerhalb des LEKTI-Genpromotors Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert sind, die infolge einer PKA- und PKC-Aktivierung die Transkription des LEKTI-Gens additiv induzieren.

Zu Vergleichszwecken erfolgte die Ko-Stimulation der Referenz-Zelllinie SK-HEP-1 (3.2) mit dem PKC-Aktivator PMA und PKA/cAMP-Aktivator Forskolin, die die LEKTI-Genpromotor-Aktivität in allen Reporter-genkonstrukten additiv in HuH-7-Zellkulturen induzieren (Abb. 3.8).

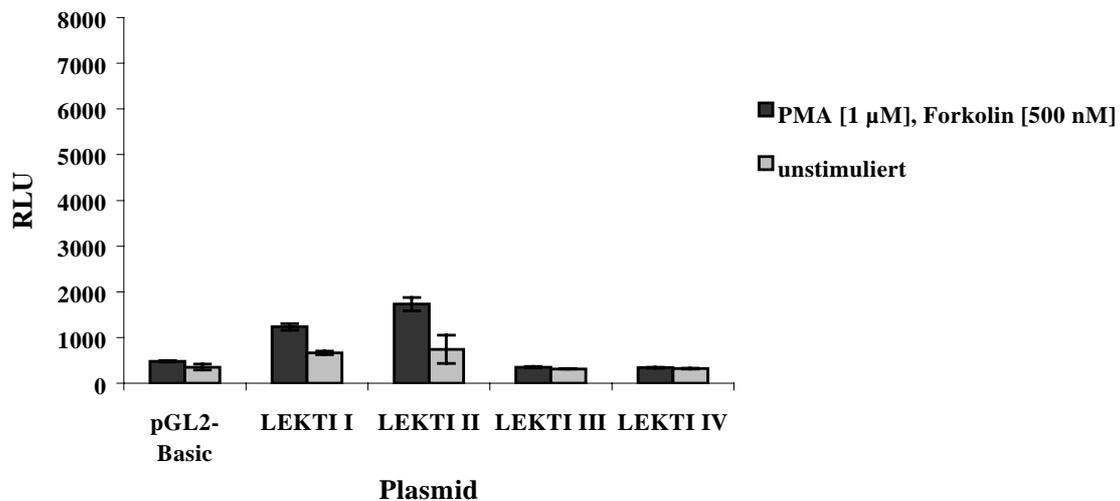


Abbildung 3.9²:

Induktion der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte durch Ko-Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA[1 µM] und PKA/cAMP-Aktivator Forskolin [500 nM] für 6 Stunden in der transient transfizierten Referenz-Zelllinie SK-HEP-1. Die Kontrolle repräsentiert der Leer-Vektor pGL2-Basic. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=4) +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.9) zeigen, dass auch in der transfizierten Referenz-Zelllinie SK-HEP-1 eine Steigerung der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte nachweisbar ist, die jedoch auf die Plasmide LEKTI I und II beschränkt ist. Ferner ist ersichtlich, dass die ermittelte Höhe der Lichteinheiten (RLU) im Vergleich zu den untersuchten transfizierten HuH-7-Zellkulturen um eine Zehnerpotenz geringer ist (Abb. 3.8). Es ist festzustellen, dass die ermittelte Induktion der Promotoraktivität des Plasmids LEKTI II in der Referenz-Zelllinie SK-HEP-1 die vermutete Responsivität des putativen NF-κB-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotor-Konstrukts LEKTI II stützt.

Typischerweise werden die Gene für Akute-Phase-Antwort-Proteine wie beispielsweise die der Serinproteinase-Inhibitoren „Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor“ (YASUDA *et al.*, 1993) sowie α-1-Antitrypsin und α-1-Antichymotrypsin (KASHEKER *et al.*, 2002) durch das Zytokin IL-6 induziert (HEINRICH *et al.*, 1998). Daher wurde eine denkbare IL-6-Responsivität des LEKTI-Genpromotors in Hinblick auf die zwei *in silico* identifizierten putativen IL-6REs (3.1) innerhalb der Promotor-Konstrukte III bzw. IV (Abb. 3.4) durchgeführt. Dazu wurden die Transfektionsansätze mit dem Zytokin Interleukin-6 (2.6) inkubiert.

² In dieser Abbildung ist eine abweichende Skalierung der Abbzisse gewählt.

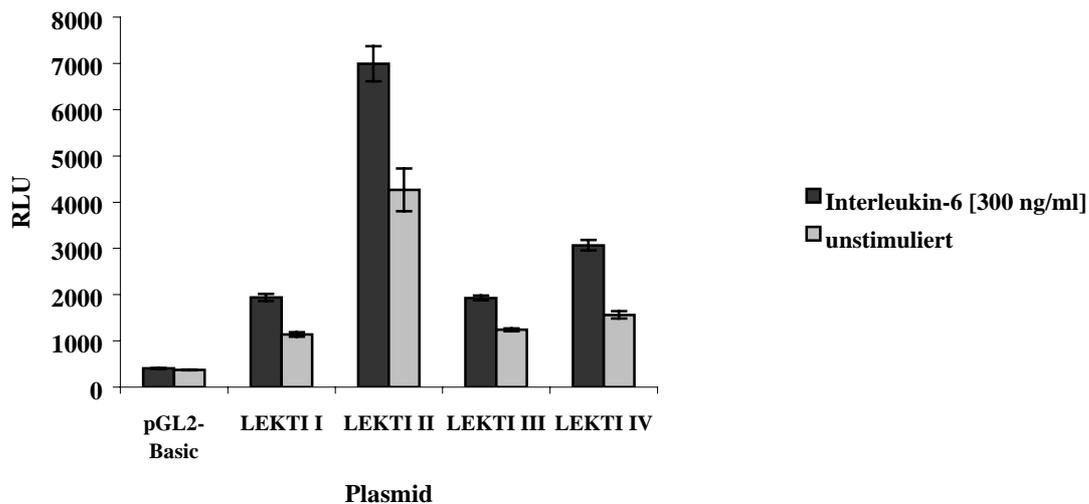


Abbildung 3.10²:

Induktion der Aktivität der LEKTI-Genpromotor-Konstrukte durch Stimulation mit dem Zytokin Interleukin-6 [300 ng/ml] für 6 Stunden in transient transfizierten HuH-7-Zellkulturen. Die Kontrolle repräsentiert der Leer-Vektor pGL2-Basic. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=4) +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.10) zeigen eine IL-6-Responsivität aller untersuchten LEKTI-Genpromotor-Konstrukte. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da die zwei *in silico* identifizierten putativen IL-6REs (3.1) innerhalb der Promotor-Konstrukte III bzw. IV lokalisiert sind und somit keinen Einfluß auf die ermittelte erhöhte Promotoraktivität der Promotorkonstrukte I und II haben können (Abb.3.4). Der Vergleich zwischen den Konstrukten LEKTI III und LEKTI IV zeigt eine Zunahme der Promotoraktivität um 30 % (LEKTI III) bzw. 50 % (LEKTI IV). Somit weist das Konstrukt LEKTI IV, welches beide untersuchten putativen IL-6REs beinhaltet, eine höhere Aktivität nach Ablauf der Inkubation mit dem Zytokin Interleukin-6 als LEKTI III auf, welches nur das proximale putative IL-6RE II beinhaltet.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle untersuchten LEKTI-Genpromotor-Konstrukte durch PKC- und PKA/cAMP-vermittelte Signale additiv induzierbar sind und eine IL-6-Responsivität aufweisen.

² In dieser Abbildung ist eine abweichende Skalierung der Abzisse gewählt.

3.3.3 Bestimmung der Aktivität des putativen NF- κ B-Motivs innerhalb des Genpromotor-Deletionsfragments LEKTI II

Der nachfolgend beschriebene Assay diente dem selektiven Aktivitäts-Nachweis des putativen NF- κ B-Motivs (3.1) innerhalb des Genpromotor-Deletionsfragments LEKTI II (3.3), welches die höchste Promotor-Aktivität (3.3.1) sowie eine signifikant erhöhte Luziferase-Aktivität im Verlauf einer Ko-Stimulation mit PMA (PKC-Aktivator) und Forskolin (PKA/cAMP-Aktivator) zeigt (3.3.2). Zu diesem Zweck wurden HuH-7-Zellkulturen mit dem Plasmid LEKTI II (2.1.6) transient transfiziert (2.7.1) und der Assay wie unter 2.6.2 beschrieben durchgeführt. Nach Ablauf der Vorinkubation mit den Inhibitoren MG-132 bzw. Bay 11-7082 (2.6) folgte die Stimulation für 4 h mit den Mediatoren PMA [1 μ M] und Forskolin [500 nM], an die sich die Bestimmung der Luziferase-Aktivität anschloss (2.8.2). Der unspezifische, reversible Proteasom-Inhibitor MG-132 inhibiert die Substratdegradation im Verlauf des UPP („Ubiquitin-Proteasome pathway“) und somit die NF- κ B-Aktivierung durch Hemmung des I κ B- α -Abbaus. Im Gegensatz dazu ist Bay 11-7082 ein spezifischer, irreversibler NF- κ B-Inhibitor, der die NF- κ B-Aktivierung durch die Stabilisierung von I κ B- α hemmt.

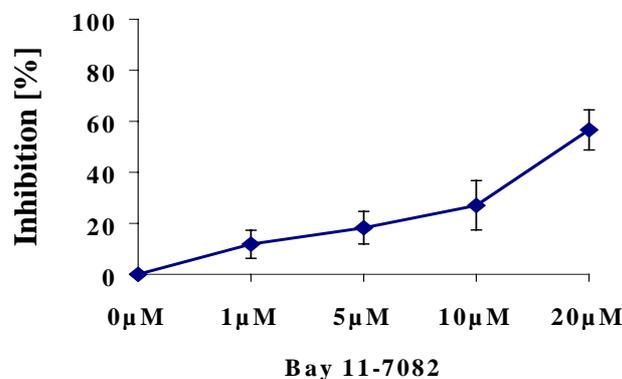


Abbildung 3.11:

Konzentrationsabhängige Inhibition der Aktivität des putativen NF- κ B-Motivs innerhalb des Genpromotor-Deletionsfragments LEKTI II durch den spezifischen, irreversiblen Inhibitor Bay 11-7082 in transient transfizierten HuH-7-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor für 30 min vorinkubiert und im Anschluss für 4 h mit dem PKC-Aktivator PMA [1 μ M] und dem PKA/cAMP-Aktivator Forskolin [500 nM] ko-stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier Experimenten (n=4) +/- SD.

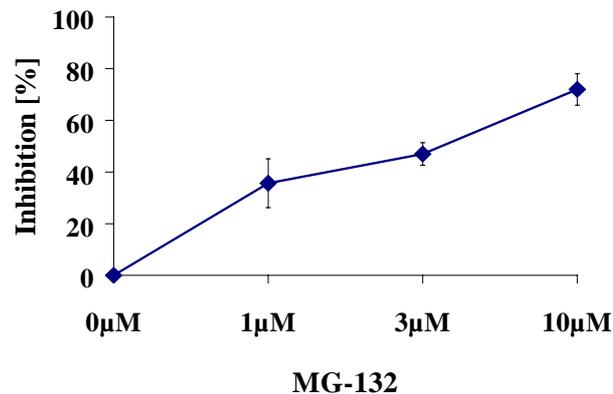


Abbildung 3.12:

Konzentrationsabhängige Inhibition der Aktivität des putativen NF- κ B-Motivs innerhalb des Genpromotor-Deletionsfragments LEKTI II durch den unspezifischen, reversiblen Proteasom-Inhibitor MG-132 in transient transfizierten HuH-7-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor für 30 min vorinkubiert und im Anschluss für 4 h mit dem PKC-Aktivator PMA [1 μ M] und dem PKA/cAMP-Aktivator Forskolin [500 nM] ko-stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier Experimenten (n=4) +/- SD.

Aus den Abbildungen 3.11 und 3.12 ist ersichtlich, dass sowohl der spezifische NF- κ B-Inhibitor Bay 11-7082 (HU *et al.*, 2001; PIERCE *et al.*, 1997) als auch der Proteasom-Inhibitor MG-132 (FIEDLER *et al.*, 1998; ROS *et al.*, 2001) eine konzentrationsabhängige Inhibition der NF- κ B-Aktivierung in HuH-7-Zellen bewirkt. Diese beiden Resultate weisen deutlich auf die Existenz eines funktionalen NF- κ B-Bindungsmotivs innerhalb des Genpromotor-Deletionsfragments LEKTI II hin, da unter Einsatz von zwei voneinander unabhängigen Inhibitor-Assays mit divergierend wirksamen Inhibitoren vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.4 Untersuchung der Induzierbarkeit der Transkription des LEKTI-Gens mittels quantitativer Real-Time-PCR („TaqMan“)

Zur Validierung der unter Einsatz von Luziferase-Reporter-Gen-Assays erzielten Ergebnisse (3.3) dienten quantitative Analysen mit dem ABI PRISM[®] 7700 Real-Time-PCR-System („TaqMan“). Die dazu benötigten cDNAs der Zelllinien HuH-7 und BHY, die das LEKTI-Gen endogen exprimieren (3.2), wurden wie unter 2.6.1 beschrieben hergestellt. Für die Quantifizierung der Induktion der Transkription des LEKTI-Gens anhand der gewonnenen experimentellen Daten fand im Rahmen dieser Arbeit die Standardkurven-Methode Anwendung, welche unter 2.4.3 detailliert beschrieben ist. Ausgehend von der gezeigten

additiven PKC- und PKA/cAMP-vermittelten Induktion der LEKTI-Genpromotor-Aktivität (3.3.2) sowie der vermuteten Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der Regulation der Expression des LEKTI-Gens (3.3.3) erfolgten TaqMan-Analysen, die unter Einsatz von cDNAs der hepatozytären Zelllinie HuH-7 durchgeführt wurden.

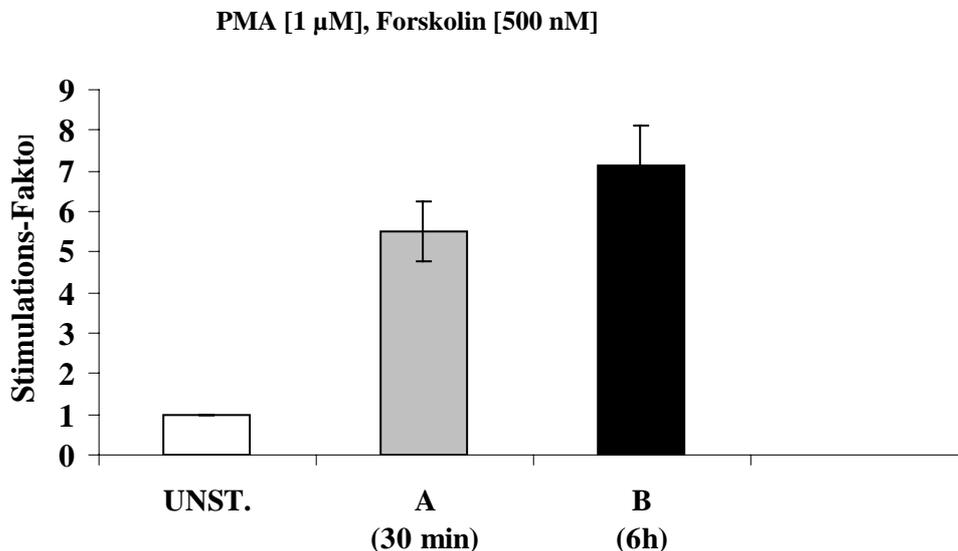


Abbildung 3.13:

Bestimmung der Induktion der Transkription des LEKTI-Gens unter Einsatz von RNAs der hepatozytären Zelllinie HuH-7, die mit dem PKC-Aktivator PMA und dem PKA/cAMP-Aktivator Forskolin für 30 min und 6 h ko-stimuliert wurden. Der unstimulierte Ansatz repräsentiert die Negativkontrolle nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen GAPDH (2.4.3). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=2) +/- SD.

In der Abbildung 3.13 ist eine zeitabhängige Induktion der LEKTI-Genexpression in der hepatozytären Zelllinie HuH-7 gezeigt. Im Verlauf einer sechsständigen Ko-Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA und PKA/cAMP-Aktivator Forskolin erhöht sich die Transkription des LEKTI-Gens bereits nach 30 min um das Vierfache (A) und versechsfacht sich nach Ablauf von 6 Stunden (B). Die Tatsache, dass bereits nach 30 Minuten eine deutliche Erhöhung der Gen-Expressionsrate festzustellen ist, unterstützt die Vermutung (3.3), dass PKC-regulierte „rapid response“ Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B (GHOSH *et al.*, 1998) die Transkription des LEKTI-Gens aktivierend beeinflussen.

Die nachfolgend dargestellten TaqMan-Analysen dienten zur Überprüfung der gezeigten Interleukin-6-Responsivität des LEKTI-Genpromotors (Abb.3.10). Zu Vergleichszwecken wurden diese Untersuchungen mit stimulierten RNAs (IL-6 [300 ng/ml]) der hepatozytären HuH-7- und der epithelialen BHY-Zelllinie durchgeführt.

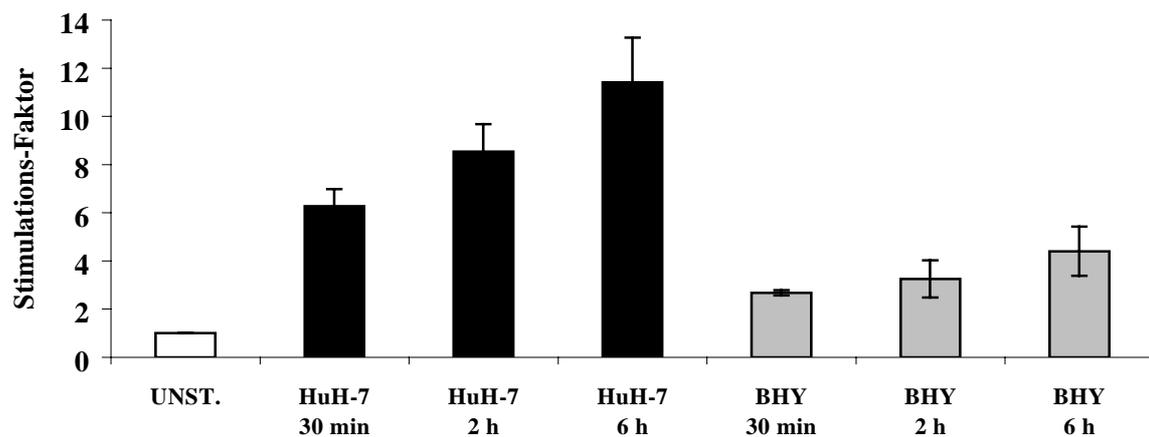


Abbildung 3.14:

Bestimmung der Induktion der Transkription des LEKTI-Gens unter Einsatz von cDNAs der Zelllinien HuH-7 (Hepatozyten) und BHY (Mundschleimhaut) nach Inkubation mit dem Zytokin IL-6 [300 ng/ml] für 30 min, 2 h bzw. 6 h. Der unstimulierte Ansatz beider Zelllinien repräsentiert die Negativkontrolle nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen GAPDH (2.4.3). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=2) +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.14) zeigen eine zeitabhängige Induktion der LEKTI-Genexpression in beiden untersuchten Zelllinien, wobei diese jedoch einen deutlichen Unterschied in der Expressionshöhe aufweisen. In der epithelialen Zelllinie BHY verdreifacht und in der hepatozytären Zelllinie HuH-7 verzehnfacht sich die Transkriptionsrate des LEKTI-Gens im Verlauf einer sechsständigen Inkubation mit dem Zytokin Interleukin-6. Weiterhin ist eine Induktion der Transkription in beiden Zelllinien bereits nach Ablauf von 30 Minuten feststellbar. Dieses Ergebnis deutet auf einen aktivierenden Einfluss von IL-6-regulierten „rapid response“ Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise STAT-3 (HEIM, 1999) auf die Transkription des LEKTI-Gens hin. Die relative Höhe der Induktion der LEKTI-Genexpression ist in den hepatozytären RNAs (HuH-7) im Vergleich zu den stimulierten epithelialen RNAs verdreifacht.

Es ist festzustellen, dass die auf Grundlage von Luziferase-Reporter-Gen-Assays ermittelte PKC- und IL-6-Responsivität des LEKTI-Genpromotors sowie der postulierte aktivierende Einfluss der Transkriptionsfaktoren STAT-3 und NF- κ B auf die Expression des LEKTI-Gens aus den erhaltenen Daten unterstützt wird.

3.5 „Multiple Transcription Factor Profiling by Enzyme-Linked Immunoassay (TF-EIA)“

Die Überprüfung der Funktionalität ausgewählter *in silico* identifizierter putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive (IL-6RE, LyF-1, NFAT und NF-κB) innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) erfolgte anhand eines Immunoassays (2.11) zur Detektion von DNA-Protein-Interaktionen (BENOTMANE *et al.*, 1997; KANNAN-THULASIRAMAN *et al.*, 2002; RENARD *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2002). Zu diesem Zweck wurden die benötigten Kernextrakte aus den humanen Zelllinien BHY, HuH-7 und Jurkat isoliert (2.9), für die eine endogene LEKTI-Genexpression belegt ist (3.2). Der Einsatz „LEKTI-positiver“ Kulturen gewährleistet die Präsenz aller an einer LEKTI-Genexpression beteiligten Transkriptionsfaktoren in dem untersuchten Kernextrakt. Zur Übersicht sind diese für 30 Minuten „Faktor-spezifisch stimulierten“ Kernextrakte (2.6.3) in der Tabelle 3.2 verzeichnet.

Tabelle 3.2:
Verzeichnis der für 30 Minuten „Faktor-spezifisch stimulierten“, untersuchten humanen Kernextrakte.

Kernextrakt	Einsatz zum Bindungsnachweis von
HuH-7 PMA [1 μM]; Forskolin [0,5 μM]	NF-κB, STAT-3
HuH-7 TNF-α [20 ng/ml]	NF-κB
HuH-7 IL-6 [150 ng/ml]	STAT-3
HuH-7 PMA [1,5 μM]; Ionomycin [0,5 μM]	NFAT (Kontrolle)
BHY PMA [1 μM]; Forskolin [0,5 μM]	NF-κB, STAT-3
BHY TNF-α [20 ng/ml]	NF-κB
BHY IL-6 [150 ng/ml]	STAT-3
Jurkat PMA [1,5 μM]; Ionomycin [0,5 μM]	NF-κB, STAT-3, NFAT, LyF-1

Im Rahmen dieser Versuche wurden vier verschiedene Wege ausgearbeitet, um Kontroll- bzw. Referenzdaten zu erhalten:

- (i) Den Ansätzen wurde kein Kernextrakt beigefügt (NEG). In diesen Ansätzen sollte keine bzw. nur eine basale Aktivität detektierbar sein.
- (ii) Innerhalb der identifizierten putativen Bindungsmotive der Transkriptionsfaktoren wurde eine 3 Basenpaare umfassende Mutation (MUT) eingefügt, welche die Erkennung und anschließende Bindung des jeweiligen Faktors an sein spezifisches Motiv unterbinden sollte (Tab. 3.3).
- (iii) Aufgrund des Einsatzes von Kernextrakten aus stimulierten und unstimulierten Zellen konnte gleichzeitig der Einfluss der jeweiligen Mediatoren auf die Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktors qualitativ ermittelt werden.
- (iv) Zur Verifizierung der Spezifität der primären Antikörper wurde der primäre

Antikörper gegen NF- κ B (p50) mit einer dsDNA inkubiert, die *in silico* kein putatives p50-Bindungsmotiv aufweist (3.5.3).

3.5.1 „Primer-Design“ zur Herstellung der dsDNA

Die Herstellung der benötigten doppelsträngigen (ds) DNA (2.11.2) erfolgte anhand komplementärer Oligonukleotidhybride, die das zu untersuchende putative Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiv beinhalten. Auf diese Weise konnten mögliche Mutationen innerhalb einer PCR-generierten dsDNA-Sequenz ausgeschlossen werden. Der Konstruktion der mutierten Oligonukleotide ging eine umfassende Literaturrecherche hinsichtlich beschriebener funktionaler Bindungsmotive der untersuchten Transkriptionsfaktoren innerhalb humaner und muriner Genpromotoren voraus (vgl. EHRET *et al.*, 2001; UDALOVA *et al.*, 2002), deren Ergebnis in der Tabelle 3.3 erfaßt ist. Für den Faktor NF- κ B, der in drei verschiedenen Dimeren (p50/p50; p50/p65 und p65/p65) vorkommt, wurde die überwiegende Präsenz des p50/p65 Heterodimers zugrundegelegt (JOBIN *et al.*, 2000) und selektiv das p50-Bindungsmotiv mutiert. Gleichzeitig konnte derart eine Bindung des p50/p50 Homodimers unterbunden werden, so dass bei der Auswertung der Ergebnisse nur eine mögliche Bindung des p65/p65 Homodimers berücksichtigt werden mußte. Da das allgemeingültige palindrome Konsensus-Motiv der STAT-3-Faktoren (TTN₍₂₋₅₎AA) in der Literatur kontrovers beschrieben ist (DARNELL *et al.*, 1997; EHRET *et al.*, 2001; HEIM 1999; SEIDEL *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1996), sind zur Verdeutlichung die zwei entscheidenden divergierenden Motive dargestellt (Tab. 3.3). Weiterhin sind die zitierten Bindungsmotive für den Transkriptionsfaktor STAT-3 gekennzeichnet (*), die als APRF („Acute Phase Response Factor“) beschrieben sind, da dieses die ursprüngliche Bezeichnung darstellt (WEGENKA *et al.*, 1993) und dessen Zuordnung in die Familie der STAT-Faktoren erst später erfolgte (WEGENKA *et al.*, 1994).

Tabelle 3.3:

Einordnung der *in silico* identifizierten putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) in eine Auswahl bis dato beschriebener, funktionaler regulatorischer Motive innerhalb humaner und muriner Genpromotoren. Zur Übersicht ist das Core (Kernkonsensus-Sequenz) in fetten Lettern hervorgehoben sowie die Bindematrix (surrounding/flanking sequence), welche das Core umschließt (soweit angegeben), ebenfalls verzeichnet, da dieser Bindematrix ein Einfluss an der Erkennung und Bindung des Transkriptionsfaktors an sein Core-Motiv zugeschrieben wird (LAMB *et al.*, 1995; PAXTON *et al.*, 1997; ZHONG *et al.*, 1994). Weiterhin sind die Motive, die in revers komplementärer Orientierung (r.o.) innerhalb beschriebener Genpromotoren Funktionalität besitzen, kursiv gekennzeichnet und das entsprechende komplementäre Motiv in Klammern angegeben. Ferner ist die (innerhalb der identifizierten putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive des LEKTI-Genpromotors) eingefügte, 3 Basenpaar umfassende Mutation (MUT) in Form unterstrichener fetter Buchstaben hervorgehoben.

(*): STAT-3 Bindungsmotive, die als APRF („Acute Phase Response Factor“) beschrieben sind.

IUPAC-Code (Auswahl):

- Y C oder T
- R A oder G
- N A,C,G oder T

Faktor	Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiv (5'-3'- Orientierung)			Gen	Referenz
		(p50)	(p65)		
NF-κB (p50/p65)	GG	GGGAG	GGTAC	LEKTI (WT)	MatInspector (3.1)
	G	GGGAC	TTTCC	CD3-γ	BADRAN <i>et al.</i> 2002
	G	GGGAT	YCC	IFN-γ	SICA <i>et al.</i> , 1997
	GG	GGGAC	TTTC	Igκ light chain	BOMSZTYK <i>et al.</i> , 1990
	G	GGGAC	TCCCC	PECAM-1-Gen	BOTELLA <i>et al.</i> , 2000
	G	GGGAC	TTTCCG	IL-2	McCAFFREY <i>et al.</i> , 1992
	TAACT	GGGAA	TTCC	IFN-β	BERKOWITZ <i>et al.</i> , 2002
	CCTTCT	GGGAC	TCCTC	uPA	BERKOWITZ <i>et al.</i> , 2002
	ATGC	GGAAA	GTCCCT	α ₂ -Makroglobulin	BODE <i>et al.</i> , 2001
	CTTGA	GGGAA	TTCTGG	α ₂ -Makroglobulin	BODE <i>et al.</i> , 2001
		GGGAA	GTCCCA	α ₁ -Antichymotrypsin (ACT)	KORDULA <i>et al.</i> , 2000
		GGGAA	AGCCCCCA	SKALP/Elafin	BINGLE <i>et al.</i> , 2000
		GGAAA	GACCC	Proteinase-Inhibitor 9	KANNAN-T. <i>et al.</i> , 2002
		GTGAA	TCCCC	Proteinase-Inhibitor 9	KANNAN-T. <i>et al.</i> , 2002
	GG	<u>GATGG</u>	GGTAC	LEKTI (MUT)	DRÖGEMÜLLER, 2002

STAT-3/APRF*	TT	NNNNN	AA	TTN ₍₅₎ AA "generalized"	DARNELL <i>et al.</i> , 1997
	TT	NNNN	AA	TTN ₍₄₎ AA	SEIDEL <i>et al.</i> , 1995
	TT	TCTT	AA	LEKTI (I) (WT)	MatInspector (3.1)
	TT	TAGA	AA	LEKTI (II) (WT)	MatInspector (3.1)
	TT	CTGGG	AA	α_2 -Makroglobulin	LEE <i>et al.</i> , 1999 ZHANG <i>et al.</i> , 2001
	TT	CTGGG	AA	SPI-3*	KORDULA <i>et al.</i> , 1996a
	TT	AGGA	AA	SPI-3*	KORDULA <i>et al.</i> , 1996a
	TT	CTCTT	AA	α_1 -Antitrypsin (AAT)	MORGAN <i>et al.</i> , 2002
	TT	AGCAA	TT	α_1 -Antitrypsin (AAT)	MORGAN <i>et al.</i> , 2002
	AT	CCAGG	AA	TIMP-1	KORZUS <i>et al.</i> , 1997
	TT	GAGC	AA	PSTI	YASUDA <i>et al.</i> , 1993
	TT	GTGGA	GA	SLPI*	ABE <i>et al.</i> , 1991
	TT	CCCG	AA	CRP*	ZHANG <i>et al.</i> , 1996
	TT	ACTGG	AA	Haptoglobin	KIM <i>et al.</i> , 1997
	TT	<u>CACT</u>	AA	LEKTI (I), (MUT)	DRÖGEMÜLLER, 2002
<u>AT</u>	<u>GAGA</u>	AAT	LEKTI (II), (MUT)	DRÖGEMÜLLER, 2002	
NFAT	GAGA	GGAAA	GAA	LEKTI (I)	MatInspector (3.1)
	ATGT	GGAAA	TCT	LEKTI (II)	MatInspector (3.1)
	<i>ACAGTT</i>	<i>TTTC</i> (GGAAA)	<i>TC</i>	Interleukin 2	MCCAFFREY <i>et al.</i> , 1992
	<i>GGC</i>	<i>TTTC</i> (GGAAA)	<i>ATT</i>	CD3- γ	BADRAN <i>et al.</i> 2002
	AAC	GGAAA	AAC	CD3- γ	BADRAN <i>et al.</i> 2002
	AAA	GGAAA	AAG	CD3- γ	BADRAN <i>et al.</i> 2002
	<i>GGA</i>	<i>GTTC</i> (GGAAC)	<i>AGA</i>	IFN- γ	SICA <i>et al.</i> , 1997
	GAGA	<u>CTCAA</u>	GAA	LEKTI (I) (MUT)	DRÖGEMÜLLER, 2002
	ATGT	<u>TACAA</u>	TCT	LEKTI (II) (MUT)	DRÖGEMÜLLER, 2002
LyF-1	TT	TGGGAG	A	LEKTI	MatInspector (3.1)
	^c / _T / _T	TGGGAG	^A / _G	TdT (Deoxynucleotidyltransferase)	LO <i>et al.</i> , 1991
	CT	TGGGAG	G	PECAM-1	ALMENDRO <i>et al.</i> , 1996
	TT	TGGCAG	G	MUNC18-1 (n-Sec1)	GOTOH <i>et al.</i> , 1998
	<i>TG</i>	<i>CCCTCC</i> (GGGAGG)	<i>C</i>	B29 (Ig β)	THOMPSON <i>et al.</i> , 1996
	TT	<u>ACTGAG</u>	A	LEKTI (MUT)	DRÖGEMÜLLER, 2002

3.5.2 Bestimmung der Funktionalität des putativen NF- κ B-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Zur Bestimmung der Menge des einzusetzenden Kernextrakts dienten konzentrationsabhängige Bindungsstudien. Zu diesem Zweck wurde der primäre Antikörper gegen NF- κ B (p50) mit den angegebenen Mengen (Abb. 3.15) eines Kernextrakts der hepatozytären Zelllinie HuH-7 (TNF- α [20 ng/ml]) und der spezifischen Wildtyp (WT) bzw. mutierten (MUT) dsDNA inkubiert, die das zu überprüfende putative NF- κ B-Motiv des LEKTI-Genpromotors (Abb. 3.2) beinhaltet.

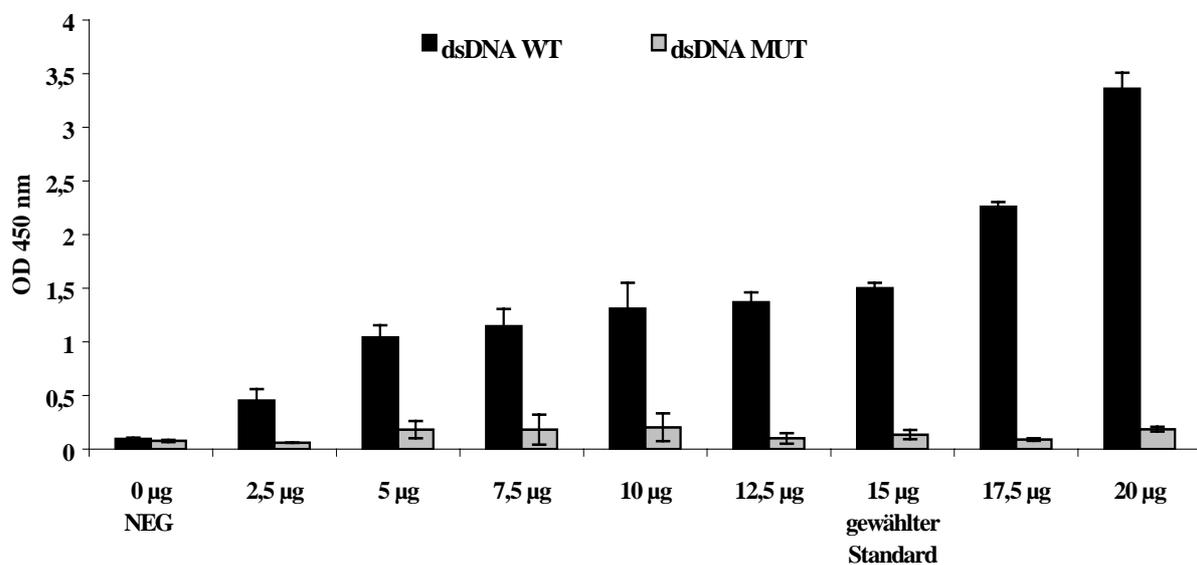


Abbildung 3.15:

Konzentrationsabhängige Bindungsstudie zur Bestimmung der Menge des einzusetzenden Kernextrakts in einem TF-EIA-Assay. Dazu wurden der primäre Antikörper gegen NF- κ B (p50), hepatozytäre Kernextrakte (HuH-7, TNF- α [20 ng/ml]) und die dsDNA, welche das untersuchte putative NF- κ B-Motiv des LEKTI-Genpromotors (dsDNA WT; dsDNA MUT) beinhaltet, eingesetzt. Der gewählte Standard von 15 μ g Kernextrakt ist gekennzeichnet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays +/- SD.

Die Resultate zeigen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Menge gebundener NF- κ B-Proteine an die LEKTI-spezifische NF- κ B-dsDNA (WT). Deshalb kann das NF- κ B-Motiv als funktional bestimmt werden, da in allen Ansätzen eine Bindung der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren an das *in silico* identifizierte Motiv innerhalb des LEKTI-Genpromotors erfolgte. Weiterhin ist ersichtlich, dass die eingefügte Mutation innerhalb des NF- κ B-Motivs effizient ist, da in diesen Ansätzen (dsDNA MUT) kein Anstieg einer Bindung von NF- κ B-Proteinen in Bezug auf die Kontrolle (NEG) nachweisbar ist. Auf Grundlage der Ergebnisse (Abb. 3.15) wurde für alle folgenden Assays die einzusetzende Menge von 15 μ g

Kernextrakt gewählt (RENARD *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2002).

Anschließend wurde das als funktional identifizierte NF- κ B-Motiv des LEKTI-Genpromotors bezüglich seiner Sensitivität in Gegenwart von verschiedenen humanen Kernextrakten (Tab. 3.2) und dem primären Antikörper gegen NF- κ B (p50) untersucht.

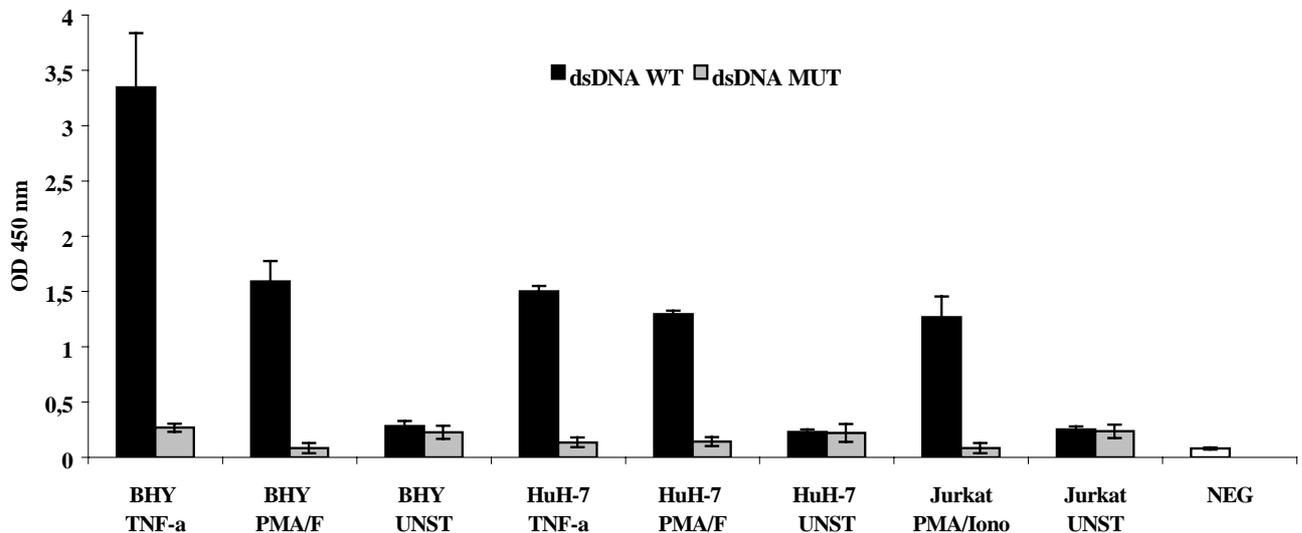


Abbildung 3.16:

Untersuchung der Sensitivität des funktionalen (dsDNA WT) und mutierten (dsDNA MUT) NF- κ B-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors mit 15 μ g Kernextrakten (Tab. 3.2) aus den humanen Zelllinien BHY (Mundschleimhaut), HuH-7 (Hepatozyten) und Jurkat (T-Zellen) sowie des primären Antikörpers gegen NF- κ B (p50). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays \pm SD.

Auch dieses Ergebnis (Abb. 3.16) bestätigt die Funktionalität des untersuchten NF- κ B-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors. In allen Ansätzen, die mit (aus stimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, konnte die Bindung von NF- κ B-Proteinen an das entsprechende Motiv des LEKTI-Genpromotors (dsDNA WT) nachgewiesen werden. Diese Bindung konnte in den Ansätzen, die mit (aus unstimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, nicht ermittelt werden. Ferner ist offensichtlich, dass die eingefügte Mutation innerhalb des NF- κ B-(p50)-Bindungs-Motivs des LEKTI-Genpromotors wirksam ist, da in diesen Ansätzen ebenfalls keine Bindung von NF- κ B-Proteinen erfolgte. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Sequestrierung der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma. Infolge spezifischer Stimuli translozieren die aktivierten Faktoren in den Zellkern und modulieren die Transkription von NF- κ B-responsiven Genpromotoren (BALDWIN, 1996; GHOSH, 1999).

3.5.3 Bestimmung der Spezifität der verwendeten primären Antikörper

Zum Nachweis der Spezifität der eingesetzten primären Antikörper wurde der primäre Antikörper gegen NF- κ B (p50) mit Kernextrakten der epithelialen Zelllinie BHY (Tab. 3.2) und einer dsDNA (IL-6RE I, WT) inkubiert, die *in silico* kein putatives NF- κ B (p50) Bindungsmotiv aufweist (Abb. 3.2).

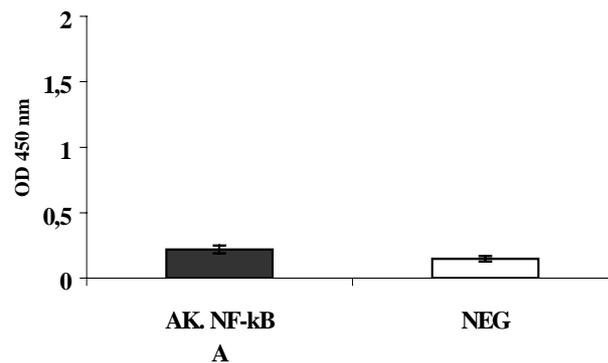


Abbildung 3.17:

Untersuchung der Spezifität des primären Antikörpers gegen NF- κ B-(p50) unter Einsatz einer dsDNA (IL-6RE I, WT) des LEKTI-Genpromotors, die *in silico* kein putatives NF- κ B (p50)-Bindungsmotiv aufweist (Abb. 3.2) sowie 15 μ g Kernextrakt aus der epithelialen Zelllinie BHY [TNF- α , 20 ng/ml]. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays \pm SD.

Das Ergebnis (Abb. 3.17) zeigt, dass der untersuchte primäre Antikörper gegen NF- κ B (p50) Spezifität besitzt, da im Vergleich zur Negativkontrolle (NEG) keine Bindung von NF- κ B-Proteinen an die eingesetzte dsDNA (IL-6RE I, WT) nachweisbar ist.

3.5.4 Bestimmung der Funktionalität der zwei putativen IL-6REs innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Die Überprüfung der Funktionalität der zwei *in silico* identifizierten putativen IL-6REs innerhalb des LEKTI-Genpromotors erfolgte unter Einsatz des primären Antikörpers gegen STAT-3 sowie Kernextrakten, die aus IL-6-stimulierten hepatozytären (HuH-7) und epithelialen Zellen (BHY) isoliert wurden (Tab. 3.2).

3.5.4.1 Bestimmung der Funktionalität des distalen putativen IL-6RE I innerhalb des LEKTI-Genpromotors

In diesem Assay wurde das im distalen Abschnitt des LEKTI-Genpromotors lokalisierte putative IL-6RE I (3.1) auf dessen Funktionalität untersucht.

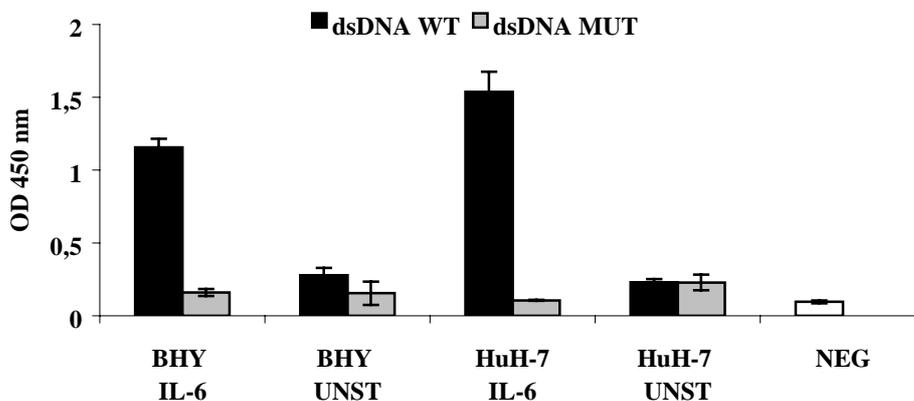


Abbildung 3.18:

Bestimmung der Funktionalität des distalen putativen IL-6REs I (dsDNA WT; dsDNA MUT) innerhalb des LEKTI-Genpromotors mit 15 µg Kernextrakt (Tab. 3.2) aus den humanen Zelllinien BHY (Mundschleimhaut) und HuH-7 (Hepatozyten) sowie des primären Antikörpers gegen STAT-3. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays +/- SD.

Aufgrund der Ergebnisse (Abb. 3.18) kann das untersuchte distale IL-6RE I (dsDNA WT) innerhalb des LEKTI-Genpromotors als funktional bestimmt werden, da in allen Ansätzen, die mit (aus stimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, eine Bindung des Transkriptionsfaktors STAT-3 an das distale IL-6RE I nachweisbar war. Weiterhin ist die Kontrolle in Form der eingefügten Mutation (dsDNA MUT) innerhalb des STAT-3 Bindungsmotivs des LEKTI-Genpromotors (IL-6RE I) wirksam, da in diesen Ansätzen keine Bindung von STAT-3-Proteinen an das mutierte distale IL-6RE I detektiert werden konnte. Hinzu kommt, dass in den Kontrollen (dsDNA WT), die mit (aus unstimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, diese Bindung ebenfalls nicht ermittelt wurde. Letzteres bestätigt die auf einen spezifischen Stimulus erfolgende Aktivierung und Translokation der zytoplasmatisch sequestrierten inaktiven Transkriptionsfaktoren STAT-3 in den Zellkern, wo sie gemäß ihrer genregulatorischen Funktion aktiv werden (HEINRICH *et al.*, 1998).

3.5.4.2 Bestimmung der Funktionalität des proximalen putativen IL-6RE II innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Zur Untersuchung der Funktionalität des *in silico* identifizierten proximalen putativen IL-6REs II innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) wurde der Assay wie unter 3.5.4.1 beschrieben durchgeführt.

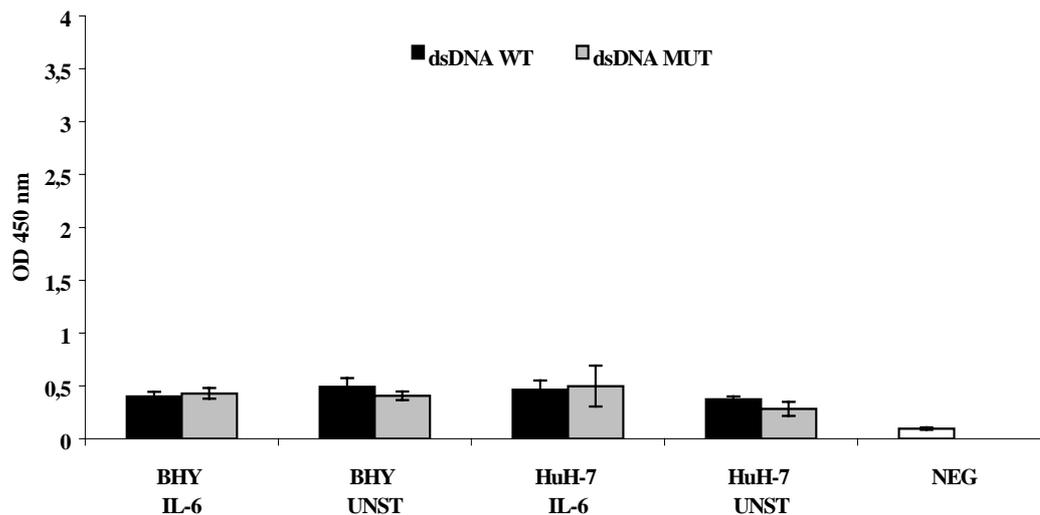


Abbildung 3.19:

Bestimmung der Funktionalität des proximalen putativen IL-6REs II (dsDNA WT; dsDNA MUT) innerhalb des LEKTI-Genpromotors mit 15 µg Kernextrakt (Tab. 3.2) aus den humanen Zelllinien BHY (Mundschleimhaut) und HuH-7 (Hepatozyten) sowie des primären Antikörpers gegen STAT-3. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays +/- SD.

Anhand der präsentierten Ergebnisse (Abb. 3.19) kann dem proximalen IL-6RE II keine Funktionalität zugewiesen werden. Es konnte weder ein Einfluss des Zytokins Interleukin-6 noch der eingefügten Mutation innerhalb des LEKTI-Genpromotor-Bindungsmotivs auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren STAT-3 an das proximale IL-6RE II des LEKTI-Genpromotors nachgewiesen werden.

3.5.5 Bestimmung der Funktionalität der putativen Bindungsmotive der lymphozytären Transkriptionsfaktoren NFAT und LyF-1 innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Für die Untersuchungen einer Funktionalität der *in silico* identifizierten putativen Bindungsmotive der lymphozytären Transkriptionsfaktoren NFAT und LyF-1 innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) wurden Kernextrakte aus der T-Zelllinie Jurkat eingesetzt

(Tab. 3.2). Ferner diente zur Verifizierung der beschriebenen Gewebsspezifität der Transkriptionsfaktoren LyF-1 (LO *et al.*, 1991) und NFAT (MASUDA *et al.*, 1995) das *in silico* identifizierte putative NFAT I-Motiv (dsDNA WT; dsDNA MUT) des LEKTI-Genpromotors (3.1), welches mit hepatozytären Kernextrakten (HuH-7) inkubiert wurde.

3.5.5.1 Bestimmung der Funktionalität des putativen LyF-1-Bindungsmotivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Die Untersuchung der Funktionalität des *in silico* identifizierten putativen Bindungsmotivs des lymphozytären Transkriptionsfaktors LyF-1 innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) erfolgte unter Einsatz des primären Antikörpers gegen LyF-1 und Kernextrakten aus der T-Zelllinie Jurkat (Tab. 3.2).

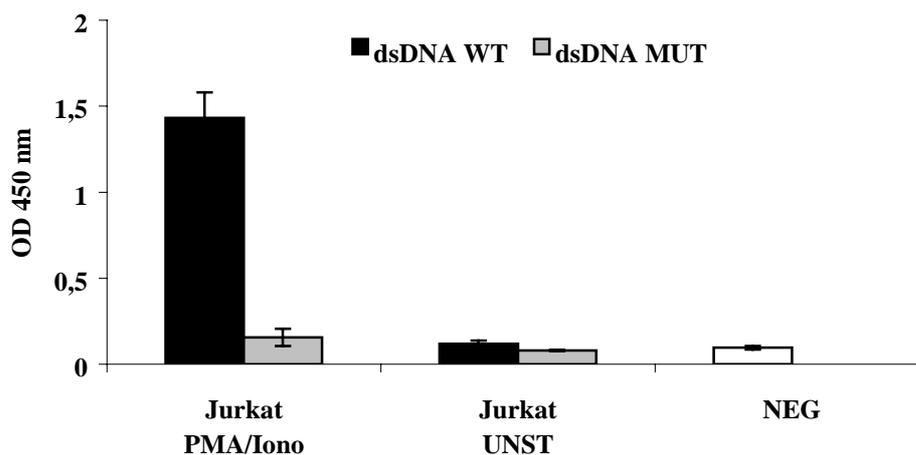


Abbildung 3.20:

Bestimmung der Funktionalität des *in silico* identifizierten putativen LyF-1 Bindungsmotivs (dsDNA WT, dsDNA MUT) innerhalb des LEKTI-Genpromotors mit 15 µg Kernextrakt (Tab. 3.2) aus der T-Zelllinie Jurkat sowie des primären Antikörpers gegen LyF-1. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays +/- SD.

Den gezeigten Ergebnissen (Abb. 3.20) ist eine Funktionalität des *in silico* identifizierten LyF-1-Bindungsmotivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors zu entnehmen. In allen Ansätzen (dsDNA WT), die mit (aus stimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, konnte eine Bindung von LyF-1- Proteinen an das entsprechende Motiv ermittelt werden. Diese Bindung konnte weder in den Kontrollansätzen (UNST), die mit (aus unstimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, noch in denen, die das mutierte Motiv (dsDNA MUT) beinhalten, bestimmt werden.

3.5.5.2 Bestimmung der Funktionalität der putativen NFAT-Bindungsmotive I und II innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Zum Nachweis der Funktionalität der zwei *in silico* identifizierten putativen NFAT-Bindungsmotive innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) wurden die entsprechenden dsDNAs mit verschiedenen Kernextrakten (Tab. 3.2) und dem primären Antikörper gegen NFAT inkubiert. Weiterhin wurde zur Verifizierung der Gewebsspezifität der lymphozytären Transkriptionsfaktoren das *in silico* identifizierte NFAT I-Motiv (dsDNA WT; dsDNA MUT) des LEKTI-Genpromotors mit hepatozytärem Kernextrakt (HuH-7) und dem primären Antikörper gegen NFAT inkubiert.

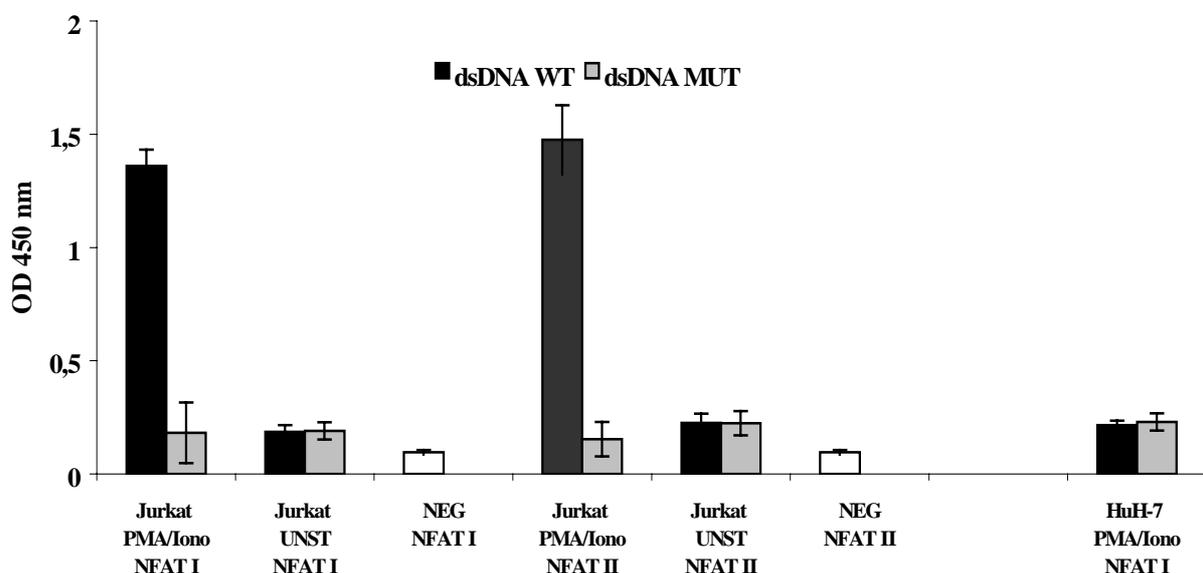


Abbildung 3.21:

Bestimmung der Funktionalität der putativen NFAT-Bindungsmotive I und II (dsDNA WT; dsDNA MUT) innerhalb des LEKTI-Genpromotors mit 15 µg Kernextrakt (Tab. 3.2) aus der humanen Zelllinie Jurkat (T-Zellen) sowie des primären Antikörpers gegen NFAT. Zur Untersuchung der Gewebsspezifität der NFAT-Transkriptionsfaktoren wurden 15 µg Kernextrakt (Tab. 3.2) der humanen Zelllinie HuH-7 (Hepatozyten) eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.21) zeigen, dass die zwei untersuchten NFAT-Bindungsmotive (dsDNA WT) Funktionalität besitzen, da in allen Ansätzen, die mit (aus stimulierten Zellen isolierten) Kernextrakten inkubiert wurden, eine Bindung der NFAT-Proteine an die *in silico* identifizierten Motive innerhalb des LEKTI-Genpromotors erfolgte. Weiterhin ist ersichtlich, dass die spezifisch eingefügte Mutation innerhalb des NFAT I- bzw. NFAT II-Motivs wirksam ist, da in diesen Ansätzen keine Bindung der NFAT-Proteine an die entsprechenden Motive (dsDNA MUT) nachweisbar ist. Die Gewebsspezifität der lymphozytären Transkriptionsfaktoren NFAT konnte ebenfalls in diesem Versuch bestätigt werden, da in den

Ansätzen, die mit hepatozytären Kernextrakten (HuH-7) inkubiert wurden, keine Bindung der Transkriptionsfaktoren NFAT an das Bindungsmotiv NFAT I (dsDNA WT, dsDNA MUT) nachweisbar ist.

3.5.5.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens des Transkriptionsfaktors NFAT an das funktionale NF- κ B-Bindungsmotiv innerhalb des LEKTI-Genpromotors

Die Transkription des LEKTI-Gens ist, wie jeder Transkriptionsvorgang eines Gens, eine „orchestrated response (orchestrierte Antwort)“ (LEMON *et al.*, 2000) von aktivierenden, reprimierenden sowie miteinander synergistisch oder antagonistisch kooperierenden Faktoren (BRIVANLOU *et al.*, 2002). In Hinblick auf beschriebene funktionale NF- κ B-Bindungsmotive innerhalb von humanen Genpromotoren, die ebenfalls von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie erkannt und gebunden werden (BADRAN *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 1995; MATSUDA *et al.*, 1994; MCCAFFREY *et al.*, 1992; SICA *et al.*, 1997), wurde untersucht, ob NFAT-Proteine ebenfalls an das funktionale NF- κ B-Motiv des LEKTI-Genpromotors binden. Die Tabelle 3.4 verdeutlicht die beschriebene Bindung der NFAT-Proteine an NF- κ B-Bindungsmotive innerhalb humaner Genpromotoren.

Tabelle 3.4:

Darstellung der relevanten Konsensus-Bindungsmotive der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B. Das Konsensus-Motiv der (p65)-NF- κ B-Untereinheit ist unterstrichen und das untersuchte revers komplementäre Bindungsmotiv (r.O.) des Transkriptionsfaktors NFAT in fetten Buchstaben hervorgehoben.

Kernextrakt	Sequenz	Referenz
NFAT-Konsensus	5'-GGAAA-3'	BADRAN <i>et al.</i> , 2002
NFAT-Konsensus (r.O.)	3'- TTTCC -5'	BADRAN <i>et al.</i> , 2002
NF- κ B (p50/p65)	5'-GGGGAT <u>TTTCC</u> -3'	SICA <i>et al.</i> , 1997
	5'-GGGACT <u>TTTCC</u> -3'	MCCAFFREY <i>et al.</i> , 1992
NF- κ B (p50-p65) LEKTI	5'-GAGGGGGTCT-3'	MatInspector (3.1)

In der Tabelle 3.4 ist gezeigt, dass innerhalb des Konsensus-Bindungsmotivs des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65) in revers komplementärer Orientierung ein NFAT-Bindungsmotiv lokalisiert ist. Zur Untersuchung, ob die Transkriptionsfaktoren NFAT an das funktionale NF- κ B-Bindungsmotiv innerhalb des LEKTI-Genpromotors binden, wurde das funktionale NF- κ B-Bindungsmotiv des LEKTI-Genpromotors (dsDNA WT, dsDNA MUT) mit dem primären Antikörper gegen NFAT unter Zugabe von Kernextrakten aus stimulierten

T-Zellen (Jurkat; PMA [1,5 µM]; Ionomycin [0,5 µM]) inkubiert.

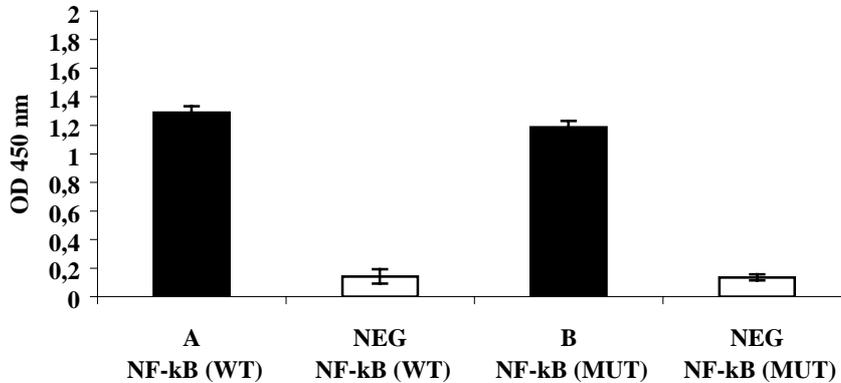


Abbildung 3.22:

Untersuchung des Bindungsverhaltens des primären Antikörpers gegen NFAT an das funktionale (A) und mutierte (B) NF-κB-Motiv (dsDNA) innerhalb des LEKTI-Genpromotors mit 15 µg Kernextrakt aus der stimulierten T-Zelllinie Jurkat (PMA [1,5 µM]; Ionomycin [0,5 µM]). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Assays +/-SD.

Das Ergebnis (Abb. 3.22) zeigt *in vitro* eine Bindung der NFAT-Proteine an das untersuchte funktionale (A) und mutierte (B) NF-κB-Bindungsmotiv (dsDNA) innerhalb des LEKTI-Genpromotors. Dieses Ergebnis deutet stark darauf hin, dass NFAT-Proteine an das funktionale NF-κB-Motiv des LEKTI-Genpromotors (3.5.2) binden.

Zur Übersicht sind alle in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse in der Abbildung 3.23 zusammengefasst:

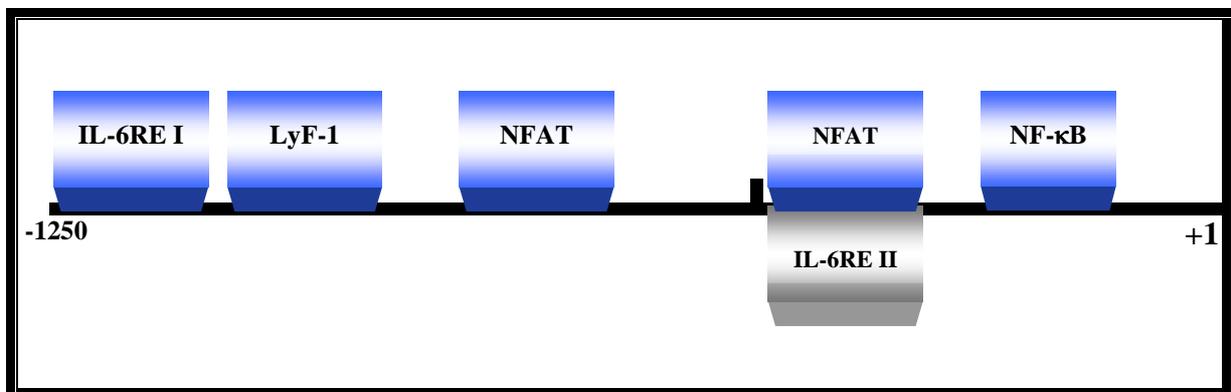


Abbildung 3.23:

Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der im Rahmen dieses Kapitels durchgeführten Bindungsstudien mittels TF-EIA. Funktionale Bindungsmotive sind blau, Falsifikate grau unterlegt. Die Größenangaben beziehen sich auf den Translationsstartpunkt (3.1).

3.6 Untersuchung potentieller genregulatorischer Interaktionen zwischen dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI und dem Proteinase-aktivierten Rezeptor-2 (PAR-2)

Die Grundlage zur Untersuchung einer denkbaren genregulatorischen Interaktion zwischen dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI und dem aktivierten PAR-2-Rezeptor bildeten humane Zelllinien, die PAR-2-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (3.6.1). Im Anschluss an die Überprüfung der PAR-2-Rezeptor-Funktionalität in einem dazu entwickelten FLIPR-Assay (3.6.2) erfolgten die Untersuchungen hinsichtlich der potentiellen Interaktionen zwischen dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI und dem aktivierten PAR-2-Rezeptor auf transkriptioneller Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR (3.6.3).

3.6.1 Bestimmung der endogenen PAR-2-Genexpression in humanen Zelllinien

Die öffentlich zugängliche PAR-2-cDNA-Sequenz (BÖHM *et al.*, 1996b; Acc. No.: U34038) diente zur Konstruktion von Oligonukleotiden, die in den anschließenden PCR-Reaktionen für die Amplifikation der PAR-2-spezifischen Fragmente eingesetzt wurden. Parallel dazu erfolgte der Einsatz von LEKTI-Oligonukleotiden zum Ausschluss genomischer Verunreinigungen (3.2). Nachdem die Anlagerungstemperatur der zwei Oligonukleotidpaare zur Optimierung der Stringenz experimentell ermittelt war, wurden die PCR-Reaktionen (2.4.1) zur Generierung der folgenden Amplifikate wie unter 3.2 beschrieben vollzogen.

- (i) PAR-2-spezifisches Amplifikat 300 Bp.
- (ii) LEKTI-spezifisches Amplifikat (3.2) 180 Bp.
- (iii) genomische Kontrolle (3.2) 2000 Bp.

Temperaturprogramm für 40 Zyklen (1.- 3. Schritt):

Erst-Denaturierung der DNA	97°C	3 min
1. Denaturierung	96°C	30 s
2. Oligonukleotidanlagerung	58°C	45 s
3. Elongation	72°C	2,5 min
End-Elongation	72°C	7 min
Reaktionsende	4°C	∞ min

Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Ansätze in einem 2 % igen Agarosegel ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

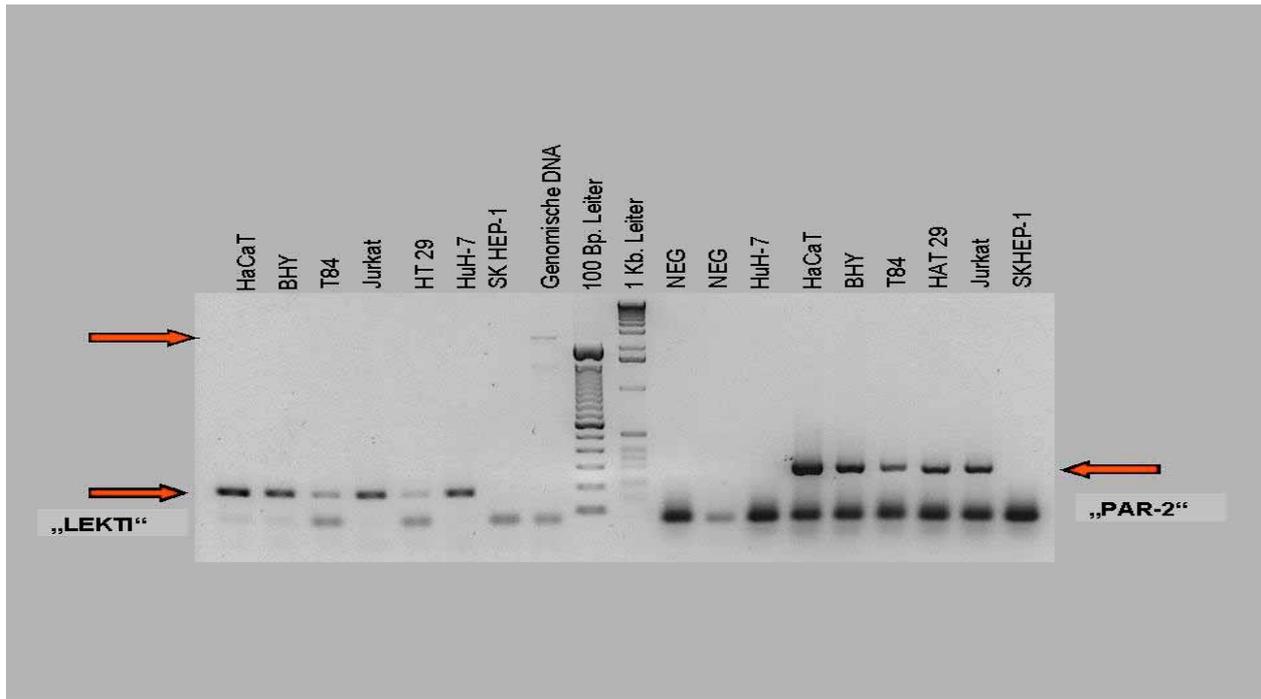


Abb. 3.24:
Bestimmung der endogenen PAR-2- und LEKTI-Genexpression in humanen Zelllinien mittels einer PCR.
 Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2 % igen Agarosegel. Eine 100 Bp- und 1 Kb.-Leiter (Invitrogen) wurden als Größenstandard mitgeführt. Die Pfeile zeigen die Höhe der erwarteten Amplifikate von 300 Bp. für die PAR-2-cDNA, von 180 Bp. für die LEKTI-cDNA und für die genomische Kontrolle von ca. 2000 Bp.

Das in Tabelle 3.6 dokumentierte Ergebnis (Abb. 3.24) zeigt, dass verschiedene humane Zelllinien bestimmt werden konnten, die das PAR-2-Gen exprimieren. Weiterhin ist ersichtlich, dass die hepatozytären Zelllinien HuH-7 und SK-HEP-1 keine PAR-2-Genexpression aufweisen. Daneben weisen die Ergebnisse auf eine korrelierende Expression des LEKTI- und PAR-2-Gens in humanen Zelllinien hin. Die Überprüfung, ob die generierten Amplifikate tatsächlich die erwartete DNA-Sequenz repräsentieren, erfolgte durch die Extraktion der Amplifikate aus dem Agarosegel (2.2.2), die Klonierung in den pGEM-T Vektor (2.2.4) sowie einer anschließenden Sequenzierung (2.3).

Tabelle 3.6:
Untersuchung humaner Zelllinien auf eine endogene Expression des LEKTI- und PAR-2-Gens.

Zelllinie	PAR-2	LEKTI
BHY (Mundschleimhaut)	+	+
HaCat (Keratinocyten)	+	+
Jurkat (T-Zellen)	+	+
HT 29 (Kolonkarzinom)	+	+
T84 (Kolonkarzinom)	+	+
HuH-7 (Hepatozyten)	-	+
SK-HEP-1 (Hepatozyten)	-	-

3.6.2 Überprüfung der Funktionalität der PAR-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche

Zur Überprüfung der Funktionalität der PAR-2-Rezeptoren auf der Oberfläche der identifizierten humanen Zelllinien (Tab. 3.6) wurde die epitheliale Zelllinie BHY als Positiv- sowie die hepatozytäre Zelllinie SK-HEP-1 als Negativ-Kontrolle in die anschließenden FLIPR-Untersuchungen eingesetzt. Diese auf Fluoreszenzänderung basierende Methode kann Veränderungen der freien physiologischen Kalzium-Konzentration in der Zelle (ca. 100 nM) durch Freisetzung aus zellulären Speichern oder durch Einstrom der im genutzten Messpuffer enthaltenen Kalzium-Ionen (ca. 1,4 mM) durch Ionenkanäle zeitaufgelöst nachweisen (2.12). In diesen konzentrationsabhängigen Untersuchungen wurden die Zellkulturen mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV, dem beschriebenen physiologischen Agonisten Trypsin (BÖHM *et al.*, 1996b) sowie einer Kontrolle (Lysozym) inkubiert.

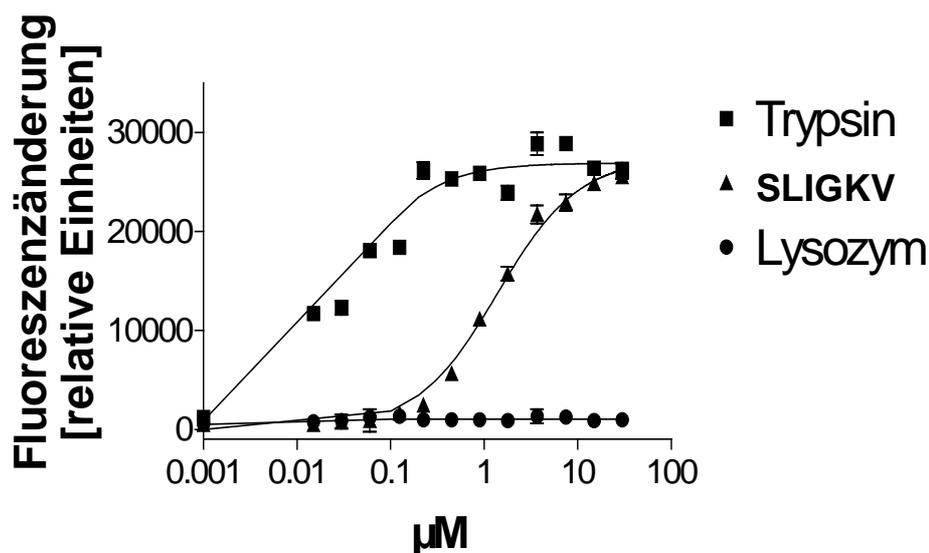


Abbildung 3.25:

Untersuchung der Funktionalität der PAR-2-Rezeptoren auf der epithelialen Zelllinie BHY mittels FLIPR-Untersuchungen. Dazu wurden der synthetische PAR-2-Agonist SLIGKV, der physiologische Agonist Trypsin und eine Kontrolle (Lysozym) in ansteigenden Konzentrationen [0-100 µM] eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten (n=3) +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.25) zeigen eine konzentrationsabhängige Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Ansätzen, die mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV bzw. dem physiologischen Agonisten Trypsin inkubiert wurden. In den Kontrollen konnte keine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration detektiert werden.

Die folgende Abbildung 3.26 zeigt die analoge Untersuchung in der hepatozytären Kontroll-Zelllinie SK-HEP-1 (Tab. 3.6).

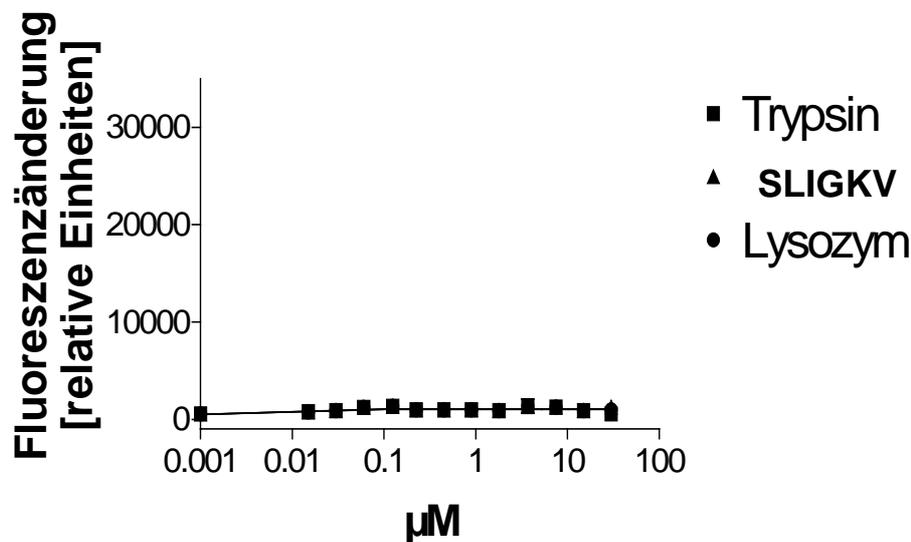


Abbildung 3.26:

Analoge Untersuchung des zur Bestimmung der Funktionalität der PAR-2-Rezeptoren auf der epithelialen Zelllinie BHY genutzten FLIPR-Untersuchungen in der hepatozytären Kontroll-Zelllinie SK-HEP-1. Dazu wurden der synthetische PAR-2-Agonist SLIGKV, der physiologische Agonist Trypsin sowie eine Kontrolle (Lysozym) in ansteigenden Konzentrationen [0-100 µM] eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten (n=3) +/- SD.

Aus der Abbildung 3.26 ist ersichtlich, dass weder eine Inkubation mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV bzw. dem physiologischen Agonisten Trypsin eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in der hepatozytären Kontroll-Zelllinie SK-HEP-1 bewirkt. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse wurde die epitheliale Zelllinie BHY für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

3.6.3 Untersuchung genregulatorischer Interaktionen zwischen dem aktivierten PAR-2-Rezeptor und dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI mittels quantitativer Real-Time-PCR („TaqMan“)

Der Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war eine denkbare genregulatorische Interaktionen zwischen dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI und dem aktivierten PAR-2-Rezeptor. Grundlage dieser putativen Interaktion in Form eines negativen Feedback-Mechanismus (4.4) ist, dass die physiologischen PAR-2-Agonisten Trypsin, SCTE und SCCE (Tab. 1.6) Zielproteinasen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI sind (MÄGERT *et al.*, 1999;

EGELRUD *et al.*, submitted; EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003). Zur Prüfung dieser Hypothese wurden humane Zelllinien, die den PAR-2-Rezeptor tragen, *in vitro* unter Einsatz des synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV aktiviert und die abhängige LEKTI-Genexpressionsrate quantitativ ermittelt („TaqMan“). Für die Quantifizierung der Transkriptionsrate des LEKTI-Gens anhand der gewonnenen experimentellen Daten fand im Rahmen dieser Arbeit die Standardkurven-Methode Anwendung, die unter 2.4.3 detailliert beschrieben ist.

Dazu wurden die Zelllinien BHY (Mundschleimhaut) und T84 (Kolonkarzinom), die eine endogene PAR-2- und LEKTI-Genexpression aufweisen (Tab. 3.6) mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV inkubiert (30 min, 2,5 h und 6 h). Ausgehend von den FLIPR-Ergebnissen (3.6.2) und Referenzen (BELHAM *et al.*, 1996; KANKE *et al.*, 2001; MIKE *et al.*, 2001) wurde eine Agonisten-Konzentration von cSLIGKV [100 μ M] gewählt, um eine maximale Aktivierung der PAR-2-Rezeptoren zu erreichen. Zu Vergleichszwecken wurde die PAR-2-negative hepatozytäre Zelllinie HuH-7 in den folgenden Versuchen mitgeführt.

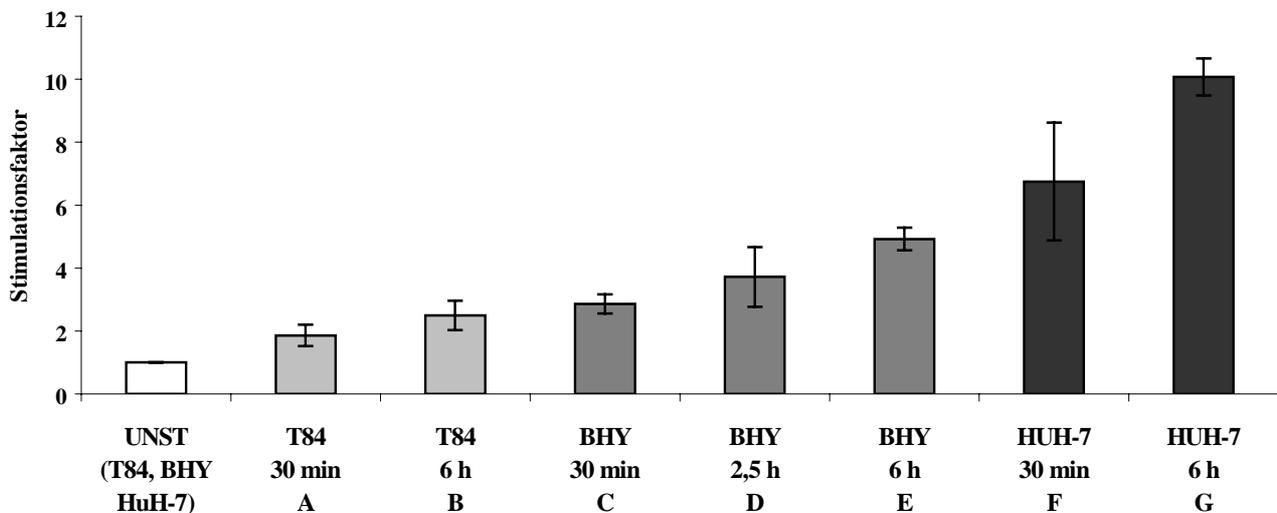


Abbildung 3.27:

Bestimmung des Einflusses des aktivierten PAR-2-Rezeptors bzw. des spezifischen synthetischen Agonisten SLIGKV auf die Induzierbarkeit der Transkription des LEKTI-Gens mittels Real-Time-PCR. Zu diesem Zweck wurden die Kolonkarzinom-Zelllinie (epithelialer Herkunft) T84, der Mundschleimhaut-Karzinom-Zelllinie BHY sowie die hepatozytäre Kontroll-Zelllinie HuH-7 mit dem synthetischen Liganden SLIGKV [100 μ M] für 30 min, 2,5 h und 6 h inkubiert. Der unstimulierte Ansatz aller untersuchten Zelllinien (T84, BHY, HuH-7) repräsentiert die Negativkontrolle nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen GAPDH (2.4.3). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten (n=2) +/- SD.

Die Ergebnisse (Abb. 3.27) zeigen eine zeitabhängige Induktion der Transkription des LEKTI-Gens nach Inkubation mit dem spezifischen synthetischen PAR-2 Agonisten SLIGKV in allen untersuchten humanen Zelllinien. Die niedrigste Induktionsrate, die einer

Verdreifachung der Expression des LEKTI-Gens nach Ablauf von 6 h entspricht, weisen die stimulierten Ansätze der Kolon-Karzinom-Zelllinie T84 auf (A; B). In der Mundschleimhaut-Karzinom-Zelllinie BHY konnte im Verlauf von 6 h eine fünffach erhöhte Transkriptionsrate des LEKTI-Gens ermittelt werden (C; D; E). Interessanterweise wurde die höchste Induktion der Transkription des LEKTI-Gens (F; G) in der hepatozytären Zelllinie HuH-7 ermittelt, die eine endogene LEKTI- aber keine PAR-2-Genexpression aufweist (3.6.1). Ferner ist zu bemerken, dass in allen Ansätzen bereits nach Ablauf einer 30-minütigen Inkubation mit dem synthetischen Agonisten SLIGKV eine deutliche Induktion der Transkription des LEKTI-Gens erfolgt (A; C; F). Dieses weist auf eine Beteiligung von „rapid response“ Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B an der PAR-2-medierten Induktion der Transkription des LEKTI-Gens hin. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Bestimmung eines aktivierenden Einflusses des synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV auf die Transkription des LEKTI-Gens *in vitro* gelang.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität des klonierten und sequenzierten 1,25 Kilobasenpaare umfassenden LEKTI-Genpromotorkonstrukts (DRÖGEMÜLLER, 1999) untersucht, um die vermutete anti-inflammatorische Funktion des lympho-epithelialen Serinproteinase-Inhibitors LEKTI zu stützen. Dabei gelang eine Präzisierung sowie weitere Eingrenzung von regulatorischen DNA-Bereichen und schließlich die Identifikation einzelner funktionaler Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive innerhalb des LEKTI-Genpromotors, die Rückschlüsse auf die Regulation der LEKTI-Genexpression erlauben. Es konnte sowohl ein aktivierender Einfluss der zu den pro-inflammatorischen „rapid response“ zählenden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT-3 als auch eine Beteiligung der lymphozytären Transkriptionsfaktoren NFAT und LyF-1 an der (gewebsspezifischen) Expression des LEKTI-Gens bestimmt werden. Daneben konnte ein Einfluss des PAR-2-Rezeptors auf die Induktion der Transkription des LEKTI-Gens bestimmt werden.

4.1 *in silico* Genpromotoranalysen

Zur Bewältigung der Datenflut seit Entschlüsselung des Genoms (VENTER *et al.*, 2001) und der Forschungen in den Bereichen Signaltransduktion bzw. genregulatorischer Mechanismen (BRIVANLOU *et al.*, 2002) avancierten *in silico* Promotor-Analysen zu einem nützlichen Handwerkszeug (Tool), um einen ersten Eindruck des zu untersuchenden Gens zu erhalten. Die Kenntnis der Promotorstruktur eines Gens ermöglicht Rückschlüsse auf dessen Regulation, Gewebsspezifität und ist daher hilfreich zur Charakterisierung neuentdeckter Gene bzw. deren Protein-Produkte (LENHARD *et al.*, 2003; WINGENDER *et al.*, 2000). So werden mittlerweile einzelne Gene aufgrund ihrer Promotorstruktur zu den NF- κ B-regulierten (LI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2001; SACCANI *et al.*, 2001; TIAN *et al.*, 2003), den Akute-Phase (AP-) bzw. IL-6-responsiven (ALONZI *et al.*, 2001; RUMINY *et al.*, 2003) oder gewebsspezifisch exprimierten Genen (FRECH *et al.*, 1998; HOCHHEIMER *et al.*, 2003) zugeordnet. Allerdings muß dabei immer berücksichtigt werden, dass *in silico* Analysen auf einer Statistik beruhen, deren Ausgangspunkt Konsens-Sequenz-Motive sind, die *in vivo* erhebliche Abweichungen aufweisen können (NIJNIK *et al.*, 2003; UDALOVA *et al.*, 2002). Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit die Tabelle 3.3 (3.5.1) erstellt. Neben diesen Abweichungen bleiben der flankierende Bereich der Konsensus-Motive (LAMB *et al.*, 1995; PAXTON *et al.*, 1997) und die Chromatinstruktur (BEATO *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2002; TYLER

et al., 1999), die ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung eines Transkriptionsfaktors an sein regulatorisches DNA-Motiv haben, unberücksichtigt. Daher muß die Funktionalität von *in silico* identifizierten putativen regulatorischen DNA-Motiven innerhalb eines Gen-Promotors experimentell verifiziert werden, wie es im Rahmen dieser Arbeit mit den ausgewählten Bindungsmotiven der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT-3 sowie LyF-1 und NFAT erfolgte.

4.2 Ist das LEKTI-Gen ein NF- κ B-reguliertes Gen?

Der Promotor eines NF- κ B-regulierten Gens beinhaltet ein funktionales NF- κ B-Bindungsmotiv. Die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert die Transkription des NF- κ B-responsiven Gens. Die Aktivierung des als „pro-inflammatorisch und genregulatorisch wirksamen Mediator“ beschriebenen Transkriptionsfaktors NF- κ B vollzieht sich aufgrund pro-inflammatorischer Stimuli innerhalb weniger Minuten (BALDWIN, 2001) und bewirkt eine schnelle Hochregulation der Zielgene. Daher stehen die Zielgene mit dem auslösenden pro-inflammatorischen Stimulus insofern in Zusammenhang, als dass sie als „Antwort“ hochreguliert werden. In diesem Kontext besitzen die induzierten Zielgene bzw. deren Gen-Produkte vermutlich vorrangig protektive Funktionen, um die NF- κ B-medierte akuten inflammatorischen Zustände (lokal) einzugrenzen, ihnen entgegenzuwirken, und längerfristig den physiologischen Ausgangszustand/Homöostase wiederherzustellen.

Der ubiquitäre „rapid response“ Faktor NF- κ B (SEN *et al.*, 1986) ist ein zentraler transkriptioneller Aktivator vieler Gene. Diese kodieren für Proteine, die an der Zelladhäsion, pro-inflammatorischen Prozessen, der Immunantwort, Apoptose sowie Wachstums- und Differenzierungsvorgängen beteiligt sind (BALDWIN, 1996; GHOSH *et al.*, 1998; JOBIN *et al.*, 2000). Die Aktivierung des im Zytoplasma sequestrierten Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt im Verlauf weniger Minuten aufgrund verschiedenster pro-inflammatorischer Stimuli wie beispielsweise TNF- α , LPS oder UV-Strahlung (zur Übersicht: GHOSH *et al.*, 1998; JOBIN *et al.*, 2000). Im Anschluss an die Translokation in den Zellkern bindet der aktivierte Faktor NF- κ B sein regulatorisches Motiv innerhalb von responsiven Genpromotoren. Derart kann die Transkription des betreffenden Gens innerhalb kurzer Zeit (ca. 15 min) induziert werden, so dass nach Ablauf der Proteinbiosynthese das kodierte Protein-Produkt in einer erhöhten Menge vorliegt und entsprechend seiner (physiologischen) Funktion wirksam werden kann (ARENZANA-SEISDEDOS *et al.*, 1995; LEGRAND-POELS *et al.*, 2000). Auf diese Weise bewirkt

der „Mediator“ NF- κ B eine rasche (physiologische) Antwort auf den auslösenden Stimulus in Form einer Hochregulation der für diesen akuten Zustand notwendigen Gen-Produkte. Dabei wird die selektive Aktivierung der jeweils „benötigten“ NF- κ B-responsiven Gene bzw. deren Protein-Produkte zum einen durch den auslösenden Stimulus vorgegeben (JOBIN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001) und zum anderen durch komplexe Regulationsmechanismen kontrolliert. An diesen Regulationsmechanismen sind sowohl die inhibitorischen NF- κ B-Kinasen I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ und Bcl-3 (GHOSH *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2002) als auch weitere interagierende Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP-1 oder SP-1 beteiligt (AINBINDER *et al.*, 2002; KANNAN-THULASIRAMAN *et al.*, 2002; TAK *et al.*, 2001).

Die Funktionen der NF- κ B-responsiven Gene sind vielfältig (zur Übersicht: LI *et al.*, 2002). Es ist jedoch insofern eine Differenzierung möglich, als dass zwischen Gen-Produkten unterschieden werden kann, die selbst pro-inflammatorische Effekte vermitteln und solchen, die direkt lokal bzw. systemisch wirksam werden. Zu der erstgenannten „NF- κ B-Mediator-Gruppe“ zählen beispielsweise die Zytokine IL-6 und IL-8 oder der Wachstumsfaktor GM-CSF (BALDWIN, 1996). Der zweiten Gruppe sind zum Beispiel das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 (AHMAD *et al.*, 1995) sowie die zu den Akute-Phase-Antwort-Proteinen zählenden Serinproteinase-Inhibitoren α_2 -Macroglobulin (BODE *et al.*, 2001) und α_1 -Antichymotrypsin (KORDULA *et al.*, 2000) zuzuordnen. Weiterhin sind an dieser Stelle der in respiratorischen Epithelien exprimierte lokale Serinproteinase-Inhibitor Elafin (BINGLE *et al.*, 2000) und der zelluläre Serinproteinase-Inhibitor PI-9 (KANNAN-THULASIRAMAN *et al.*, 2002) zu nennen. Auch der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI ist der zweiten Gruppe zugehörig, da dessen Promotor ein funktionales NF- κ B-Motiv beinhaltet. Das LEKTI-Gen wird infolge spezifischer inflammatorischer Zustände NF- κ B-mediert hochreguliert, damit das Gen-Produkt LEKTI entsprechend seiner diskutierten protektiven Funktion wirksam werden kann. Zur Prüfung dieser These dienten verschiedene Experimente, in denen die Funktionalität des *in silico* identifizierten putativen NF- κ B-Motiv innerhalb des LEKTI-Genpromotors (3.1) untersucht wurde. Zur Übersicht sind die Ergebnisse nachfolgend stichpunktartig zusammengefasst:

- (i) Für die Bestimmung der Promotoraktivität wurden LEKTI-Genpromotor-Deletionskonstrukte- bzw. Plasmide hergestellt und diese in Luziferase-Reportergen-Assays untersucht. Die Promotoraktivität des Genpromotor-Deletionskonstrukts LEKTI II, das die putative TATA-Box und das untersuchte NF- κ B-Motiv beinhaltet (Abb. 3.4), ist im Vergleich zu den Deletionskonstrukten LEKTI I, III bzw. IV um den Faktor 4 erhöht (Abb. 3.5).

- (ii) Sämtliche LEKTI-Deletionskonstrukte weisen eine PMA-Responsivität auf, die sich in einer verdoppelten Promotoraktivität manifestiert und wie folgt differenzieren lässt: LEKTI II >> III > I > IV (Abb. 3.6). Der eingesetzte PKC-Aktivator PMA ist ein beschriebener „direkter“ NF- κ B-Aktivator (LEE *et al.*, 2002).
- (iii) Weiterhin wurden Reporter-Gen-Assays mit LEKTI II-transfizierten, ko-stimulierten HuH-7-Zellkulturen (PMA, Forskolin) durchgeführt, die mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 bzw. dem spezifischen NF- κ B-Inhibitor Bay 11-7082 vorinkubiert wurden. In diesen konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität des Deletionskonstrukts LEKTI II durch den Inhibitor Bay 11-7082 um 50 % bzw. dem Inhibitor MG-132 um 70 % vermindert wird (Abb. 3.11; 3.12).
- (iv) Unter Einsatz der Real-Time-PCR konnte in quantitativen Analysen in den untersuchten cDNAs der hepatozytären Zelllinie HuH-7 nach einer sechsstündigen Inkubation mit dem PKC/„NF- κ B“-Aktivator PMA eine Verdreifachung der Transkription des LEKTI-Gens ermittelt werden. Weiterhin konnte in ko-stimulierten Ansätzen mit dem PKC/„NF- κ B“-Aktivator PMA und dem PKA-Aktivator Forskolin eine zeitabhängige Induktion der Transkription des LEKTI-Gens bestimmt werden, die sich bereits nach 30 min in einer Vervierfachung und nach Ablauf von 6 Stunden in einer sechsfach erhöhten Transkriptionsrate des LEKTI-Gens manifestiert (Abb. 3.13).
- (v) Die durchgeführten NF- κ B-Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien bestätigen die untersuchte Funktionalität des NF- κ B-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors, da nur in den Ansätzen gebundene NF- κ B-Proteine nachweisbar waren, die mit beschriebenen NF- κ B-Aktivatoren (TNF- α , PMA) stimuliert wurden. Hinzu kommt, dass eine eingefügte 3 Basenpaare umfassende Mutation (BADRAN *et al.*, 2002; BINGLE *et al.*, 2001) die Bindung der NF- κ B-Proteine bzw. der (p50)-Untereinheit verhinderte (Abb. 3.15; 3.16).
- (vi) Im Verlauf einer sechsstündigen Inkubation mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV konnte eine zeitabhängige PAR-2-mediierte Induktion der Transkription des LEKTI-Gens in der Kolonkarzinomzelllinie T84 (dreifach), der Mundschleimhaut-Karzinomzelllinie BHY (fünffach) sowie der hepatozytären Zelllinie HuH-7 (zehnfach) ermittelt werden (Abb. 3.27). Dieses Ergebnis weist ebenfalls auf die Funktionalität des untersuchten NF- κ B-Motivs innerhalb des LEKTI-Genpromotors hin, da eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die im Zuge der PAR-2-Rezeptor-Aktivierung abläuft, über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird

(KANKE *et al.*, 2001; SHPACOVITCH *et al.*, 2002; VLIAGOFTIS *et al.*, 2000).

Die experimentell ermittelten Ergebnisse erlauben die Zuordnung des LEKTI-Gens zu der Gruppe der NF- κ B-regulierten Gene. Somit ist der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI ein lokaler und möglicherweise auch systemischer Inhibitor, der schnell infolge spezifischer pro-inflammatorischer Stimuli NF- κ B-mediert hochreguliert wird, um gemäß seiner diskutierten protektiven Funktion wirksam zu werden.

Diese NF- κ B-Responsivität des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI könnte beispielsweise im Verlauf von entzündlichen Dermatosen oder auch im regenerativen Wundheilungsprozeß von Bedeutung sein. Für den Serinproteinase-Inhibitor LEKTI ist eine Beteiligung an der Entstehung des Netherton Syndroms beschrieben, die auf Mutationen zurückzuführen ist. Diese Mutationen innerhalb des LEKTI-Gens führen zu einem eingeschränkten inhibitorischen Potential des Inhibitors LEKTI (BITOUN *et al.*, 2002a, b; CHAVANAS *et al.*, 2000; KOMATSU *et al.*, 2002). Infolgedessen ist das Proteinase-Inhibitor-Gleichgewicht in der Haut gestört, was unregulierte proteolytische Aktivitäten ermöglicht, die pathologische Effekte wie Zell- und Gewebsdegradationen zur Konsequenz haben, die wiederum zu entzündlichen Dermatosen führen können.

Das Netherton-Syndrom (1.3) ist eine autosomal-rezessiv erbliche Enzymopathie, die sich in mehr oder minder schweren Störungen in der Keratinisation (Verhornungsprozeß) in Form einer Parakeratose ausprägt. Das vielgestaltige Spektrum dieser Parakeratosen umfaßt u.a. Haarfehlbildungen und entzündliche Ekzeme (JUDGE *et al.*, 1994; PIMENTEL *et al.*, 2003; RESNIK *et al.*, 2003). An der Keratinisation sind viele Komponenten beteiligt wie beispielsweise die Serinproteinase SCTE (Stratum corneum tryptic Enzyme), die eine Zielproteinase des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI ist (EGELRUD *et al.*, submitted). Das mutationsbedingt verminderte Potential des Inhibitors LEKTI ermöglicht eine unkontrollierte proteolytische SCTE-Aktivität, die den Verlauf der Keratinisation beeinträchtigt und zur Ausbildung des Netherton-Syndroms führt (BITOUN *et al.*, 2002; EKHOLM *et al.*, 2000; KOMATSU *et al.*, 2002).

Zudem ist die Keratinisierung ein zentraler Vorgang in der regenerativen Wundheilung nach (akuten) Gewebsverletzungen. In diesem inflammatorischen Zustand ist die Genexpression aller beteiligten Komponenten dieses Prozesses, zu denen auch der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI zählt, induziert (BITOUN *et al.*, 2002; MAST *et al.*, 1997). Diese Induktion wird auch über den pro-inflammatorischen „rapid response“ Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt, der an der Differenzierung der Keratinozyten beteiligt ist (HU *et al.*, 1999; KAUFMANN *et al.*,

2000; TAK *et al.*, 2001). Die NF- κ B-Aktivierung bewirkt eine selektive Hochregulation der Gene, welche für Proteine wie beispielsweise Kollagen oder Integrine kodieren, die an der Regeneration beteiligt sind, um die Homöostase in der Haut/Epidermis wiederherzustellen (HAN *et al.*, 2000; KAUFMANN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001).

NF- κ B besitzt eine wichtige Rolle in der Morphogenese der Haut/Epidermis. Transgene Mäuse mit inaktivierten Genen der inhibitorischen NF- κ B-Kinase I κ B α weisen eine anormal entwickelte Epidermis und Skelettierung auf (LI *et al.*, 1999a, b). Weiterhin sind diese Mäuse durch Störungen in der frühen Morphogenese der Haarfollikel, exokrinen Drüsen und Zähnen gekennzeichnet (SCHMIDT-ULLRICH *et al.*, 2001), leiden an einer ausgedehnten Dermatitis und versterben nach 7 bis 10 Tagen (KLEMENT *et al.*, 1996).

Für den Faktors NF- κ B ist eine protektive Wirkung im Hinblick auf die UV-Exposition der Haut diskutiert. UV-Strahlung (Sonne) aktiviert NF- κ B-Faktoren, die die Proliferation der epithelialen Zellen insofern regulieren, als dass sie keiner vorzeitigen Apoptose unterliegen (FISHER *et al.*, 1996; QIN *et al.*, 1999; SEITZ *et al.*, 2000).

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Rolle in der Morphogenese der Haut und deren Anhangsgebilde, bei der Keratinisierung und eine protektive Funktion im Hinblick auf die UV-Exposition besitzt. Da innerhalb des Genpromotors des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI ein funktionales NF- κ B-Bindungsmotiv lokalisiert ist, ist anzunehmen, dass die Regulation der Expression des LEKTI-Gens in der Haut/Epidermis/Keratinocyten auch über den Faktor NF- κ B mediiert wird. In Hinblick auf das Netherton Syndrom ist diese Hochregulation nicht relevant, da das inhibitorische Potential des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI mutationsbedingt vermindert ist. In Bezug auf den pro-inflammatorischen NF- κ B-mediierten regenerativen Prozeß der Wundheilung ist ein Einfluß auf LEKTI jedoch wahrscheinlich. Es verbleibt festzustellen, dass das LEKTI-Gen ein NF- κ B-reguliertes Gen ist.

4.3 Ist das LEKTI-Gen ein IL-6-responsives Gen?

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) ist als ein zentraler Mediator an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt. Dazu zählen beispielsweise die Induktion der Akute-Phase-Antwort oder die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten (HEINRICH *et al.*, 1998). Die Bindung des Interleukin-6 an seinen Rezeptor bewirkt die Aktivierung der Janus-Tyrosinkinasen (Jak), die ihrerseits die Transkriptionsfaktoren STAT-3 aktivieren. Diese liegen sequestriert im Zytoplasma vor und translozieren infolge ihrer Aktivierung innerhalb weniger Minuten in den Zellkern (Abb. 4.1). Dort binden sie an ihr spezifisches regulatorisches Motiv („IL-6RE“) innerhalb von Genpromotoren und induzieren die Transkription ihrer Genprodukte (HEINRICH *et al.*, 1998; HEMMANN *et al.*, 1996).

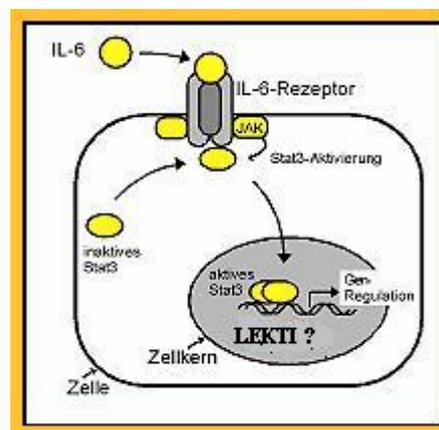


Abbildung 4.1:

Skizzierte Darstellung der IL-6-mediierten Aktivierung, Translokation und Bindung der Transkriptionsfaktoren STAT-3 an ihr regulatorisches Motiv („IL-6RE“) innerhalb von Genpromotoren. Diese Bindung bewirkt die folgenden genregulatorischen Mechanismen (HEINRICH *et al.*, 1998; HEMMANN *et al.*, 1996).

Das Zytokin IL-6 ist der Hauptmediator der Akute-Phase-Reaktion (APR) in der Leber. Daher ist den IL-6-responsiven Genen bzw. den IL-6-mediiert hochregulierten Genprodukten vorrangig eine protektive, anti-inflammatorische Funktion zuzuweisen (ANDUS *et al.*, 1988; BAUMANN *et al.*, 1994).

Innerhalb des LEKTI-Genpromotors wurden *in silico* zwei putative IL6-RE identifiziert (3.1). Eine experimentell bestätigte Funktionalität dieser putativen regulatorischen Motive würde die vermutete protektive, anti-inflammatorische Funktion des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI stützen. Zur Prüfung, ob das LEKTI-Gen ein IL-6-responsives- und STAT-3-reguliertes Gen ist, dienten verschiedene Experimente, deren Ergebnisse nachfolgend zusammengefasst sind:

- (i) Für die Bestimmung einer IL-6-mediierten Induktion der Promotoraktivität dienten Luziferase-Reporter-Gen-Assays, in denen die LEKTI-Genpromotor-Deletionsfragmente- bzw. Plasmide unter Einsatz von transient transfizierten und IL-6-

stimulierten hepatozytären HuH-7-Zellkulturen untersucht wurden. In diesen konnte gezeigt werden, dass sämtliche LEKTI-Deletions-Konstrukte eine IL-6-Responsivität aufweisen. Das Plasmid LEKTI IV, welches beide untersuchten putativen IL-6REs beinhaltet, zeigt eine um 20 % höhere Promotoraktivität als das Plasmid LEKTI III, welches nur das proximale putative IL-6RE II beinhaltet (Abb. 3.10).

- (ii) Unter Einsatz der Real-Time-PCR wurden in quantitativen Analysen IL-6-stimulierte RNAs der hepatozytären Zelllinie HuH-7 sowie der epithelialen Zelllinie BHY untersucht. In allen Ansätzen konnte eine Induktion der Transkription ermittelt werden. In den stimulierten cDNAs der epithelialen Zelllinie BHY ist die Transkriptionsrate nach Ablauf von 30 Minuten um das zweifache und nach 6 Stunden um das dreifache erhöht. Weiterhin konnte in den hepatozytären Ansätzen ebenfalls zeitabhängige Induktion der Transkription des LEKTI-Gens bestimmt werden, die sich bereits nach 30 Minuten in einer Verfünffachung und nach Ablauf von 6 Stunden in einer zehnfach erhöhten Transkriptionsrate des LEKTI-Gens darstellt (Abb 3.14).
- (iii) Die durchgeführten STAT-3-Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien bestätigen die Funktionalität des distalen IL-6REs innerhalb des LEKTI-Genpromotors, da nur in den Ansätzen gebundene STAT-3-Proteine nachweisbar waren, die mit dem Zytokin IL-6 stimuliert wurden. Hinzu kommt, dass die eingefügte, 3 Basenpaare umfassende, Mutation die Bindung der STAT-3-Proteine an das distale IL-6RE verhinderte (Abb.3.18). Dem untersuchten proximalen IL-6RE konnte unter Einsatz dieses Versuches keine Funktionalität zugewiesen werden (Abb. 3.19)

Anhand der Ergebnisse kann das LEKTI-Gen als ein IL-6-responsives- und STAT-3-reguliertes Gen charakterisiert werden, da das distale IL-6RE funktional ist. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit denen der Reporter-gen- (i) und quantitativen TaqMan-Analysen (ii).

Das Zytokin Interleukin-6 ist als ein wichtiger inflammatorischer Mediator an der Regulation verschiedener zellulärer Mechanismen wie beispielsweise der Proliferation und der Differenzierung beteiligt (HEINRICH *et al.*, 1998). Ferner ist Interleukin-6 der Hauptmediator der Akute-Phase-Reaktion (APR) und bewirkt die schnelle Induktion der Transkription der Akute-Phase (AP)-Gene in der Leber (ANDUS *et al.*, 1988; CASTELL *et al.*, 1989). An dieser IL-6-medierten Induktion ist der Transkriptionsfaktor STAT-3 maßgeblich beteiligt (ALONZI *et al.*, 2001). Die APR wird durch Gewebeschädigung hervorgerufen. In der Frühphase überwiegen lokale Entzündungszeichen wie Schwellungen und Rötungen, in der Spätphase systemische Reaktionen. Diese Spätphase ist durch die systemische Wirkung von Zytokinen (IL-6) charakterisiert, die das Temperaturregulationszentrum im Hypothalamus verändern

(Fieber). Dadurch wird der Metabolismus angeregt und die Bildung von Akute-Phase-Proteinen (APP) in der Leber induziert. Das Ziel der APR ist der Schutz vor fortschreitender Gewebeerstörung, die Zerstörung infektiöser Organismen und die Initiation von Reparaturprozessen. Die Funktionen der Akute-Phase-Proteine (APP) bestehen darin, Reparaturprozesse zu begünstigen und einer Gewebeschädigung entgegenzuwirken. In diesem Kontext haben die AP-Gene eine protektive, anti-inflammatorische Funktion (ANDUS *et al.*, 1988; BAUMANN *et al.*, 1994). Zu der (heterogenen) Gruppe der APPs zählen beispielsweise die Serinproteinase-Inhibitoren α_2 -Makroglobulin (HEINRICH *et al.*, 1998) oder α -1-Antitrypsin und α -1-Antichymotrypsin (KASHEKER *et al.*, 2002), die in der Leber IL-6-mediert über den Transkriptionsfaktor STAT-3 hochreguliert werden.

Die (regenerative) Wundheilung ist ein Bestandteil der APR und wird sowohl über lokal- als auch systemisch hochregulierte APPs vermittelt, deren IL-6-responsive Gene in den jeweiligen Geweben STAT-3-reguliert induziert werden (BAUMANN *et al.*, 1994; SUGAWARA *et al.*, 2001). Dazu zählen beispielsweise Fibrinogen, der Faktor I der Blutgerinnung, die Matrix Metalloproteinasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9, der Metalloproteinase-Inhibitor TIMP-1 und das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (HEIM, 1999). Neben der Funktion, die regenerative Wundheilung in den Keratinozyten zu induzieren, besitzt das Interleukin-6 auch eine Rolle in pathologischen Hautveränderungen wie beispielsweise Psoriasis, in denen die Keratinisation gestört ist. Diese abnormal differenzierenden und proliferierenden Keratinozyten zeigen eine stark erhöhte Expression des IL-6-Gens (GALLUCCI *et al.*, 2000; GROSSMANN *et al.*, 1989; SUGAWARA *et al.*, 2001; SAWAMURA *et al.*, 1998). Weiterhin ist in transgenen Mäusen, in deren Keratinozyten das Gen für das Zytokin Interleukin-6 überexprimiert wird, ein verdicktes Stratum Corneum nachweisbar (TURKSEN *et al.*, 1992). Daneben ist die Beteiligung des PAR-2-Rezeptors bei entzündlichen Dermatosen zu nennen (HOU *et al.*, 1998; MACFARLANE *et al.*, 2001; STEINHOFF *et al.*, 1999). PAR-2-Agonisten induzieren die Expression des IL-6-Gens in Keratinozyten (SHPACOVITCH *et al.*, 2002). Da bis jetzt keine konkrete Funktion/Rolle des Zytokins IL-6 im Verlauf der Keratinisation bzw. Entstehung entzündlicher Dermatosen beschrieben ist, kann nur darauf verwiesen werden, dass das Zytokin IL-6 in diese Prozesse involviert ist (SUGAWARA *et al.*, 2001; SAWAMURA *et al.*, 1998; TURKSEN *et al.*, 1992).

Der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI ist an der Differenzierung der Epidermis bzw. der Keratinisierung beteiligt (BITOUN *et al.*, 2002a, b; KOMATSU *et al.*, 2002) und wird vermutlich im Zuge der Wundheilung oder entzündlicher Dermatosen zur Regeneration der Homöostase der Haut hochreguliert. Diese Hochregulation wird infolge akuter bzw. chronisch

entzündlicher Zustände über pro-inflammatorische Mediatoren wie beispielsweise IL-6/STAT-3 oder NF- κ B vermittelt. Somit kann den selektiv induzierten Genen eine protektive, anti-inflammatorische Funktion zugewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb des LEKTI-Genpromotor ein funktionales IL-6-RE lokalisiert ist und das LEKTI-Gen in hepatozytären und epithelialen Zellkulturen über den IL-6-medierten Transkriptionsfaktor STAT-3 induziert wird. Es ist zu vermuten, dass das LEKTI-Gen infolge inflammatorischer Prozesse IL-6-mediert und STAT-3-reguliert in der Haut/Keratinocyten zur Regeneration hochreguliert wird. Daher kann dem Serinproteinase-Inhibitor eine anti-inflammatorische, protektive Funktion zugewiesen werden. (Es verbleibt festzustellen, dass das LEKTI-Gen ein IL-6-responsives Gen ist.)

4.4 Ist der aktivierte PAR-2-Rezeptor an der Regulation der LEKTI-Genexpression beteiligt?

Für den „Trypsin-Rezeptor“ PAR-2, der in epithelialen Geweben auf hohem Niveau exprimiert wird (BÖHM *et al.*, 1996b; STEINHOFF *et al.*, 1999) und dessen Genexpressionsmuster eine Korrelation zum LEKTI-Gen aufweist (Abb. 3.24), sind sowohl inflammatorische als auch protektive Funktionen beschrieben (1.6). Für den Serinproteinase-Inhibitor LEKTI sind die Zielproteinasen Trypsin (MÄGERT *et al.*, 1999), Stratum corneum tryptic Enzyme (SCTE) und Stratum corneum chymotryptic Enzyme (SCCE) identifiziert (EGELRUD *et al.*, submitted; EGELRUD, persönliche Mitteilung, 2003) und eine Tryptasehemmung vermutet (WALDEN *et al.*, 2002). Alle genannten Serinproteinasen sind bereits beschriebene physiologische Agonisten des PAR-2-Rezeptors. Daneben ist sowohl die Existenz weiterer Agonisten des PAR-2-Rezeptors (COCKS *et al.*, 2000; HOLLENBERG *et al.*, 2002) als auch bis dato unbekannter Zielproteinasen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI wahrscheinlich (MÄGERT *et al.*, 2002). Es ist deshalb anzunehmen, dass in Zukunft weitere LEKTI-Zielproteinasen identifiziert werden, die zugleich physiologische Agonisten des PAR-2-Rezeptors sind. Eine aktuelle Übersicht der PAR-2-Agonisten ist in der Tabelle 1.6 (1.6) wiedergegeben, aus der hervorgeht, dass sämtliche humanen Agonisten „trypsin-ähnliche Serinproteinasen“ sind (COUGHLIN *et al.*, 2003). Auf dieser Grundlage ist eine genregulatorische Interaktion in Form eines negativen Feed-Back-Mechanismus zwischen der Aktivierung des PAR-2-Rezeptors auf der Zelloberfläche und der (davon) abhängigen Transkription des LEKTI-Gens zu vermuten (Abb. 4.2).

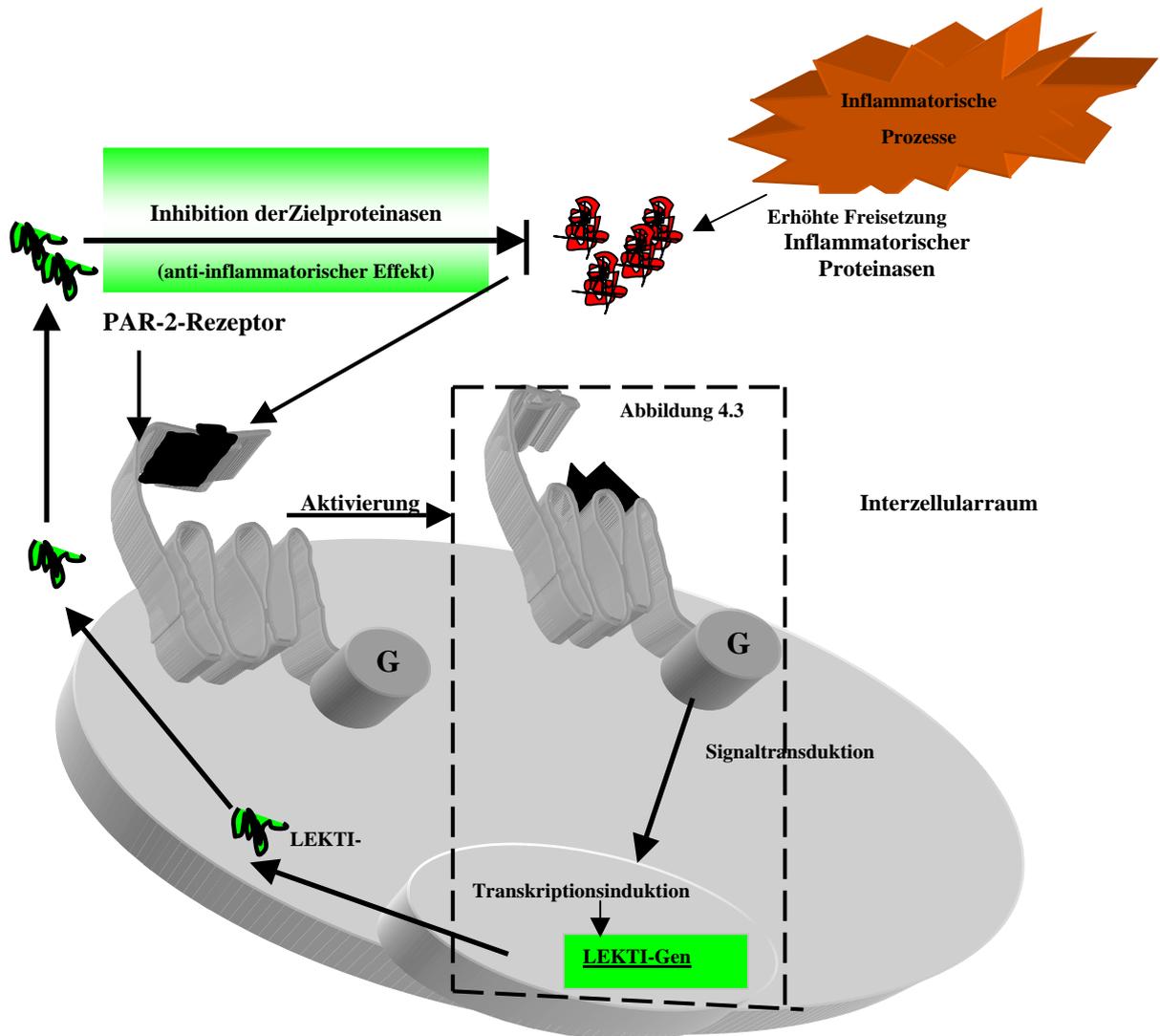


Abbildung 4.2
Schematische Darstellung des postulierten negativen Feed-Back-Mechanismus zwischen der Aktivierung des PAR-2-Rezeptors auf der Zelloberfläche und der Transkription des LEKTI-Gens.

Dem negativen Feed-Back-Mechanismus (Abb. 4.2) liegt die erhöhte Freisetzung von LEKTI-Zielproteinasen zugrunde. Diese aktivieren den PAR-2-Rezeptor, der nun intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden auslöst (Abb. 4.3), die die Transkription des LEKTI-Gens induzieren. Daraus resultiert letztlich eine erhöhte Menge des Inhibitors LEKTI. LEKTI wird in den Interzellularraum sekretiert und hemmt dort seine (den PAR-2-Rezeptor aktivierenden) Zielproteinasen. Die Inhibition der physiologischen PAR-2-Agonisten bewirkt eine Verminderung an aktivierten PAR-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und damit einhergehend längerfristig eine Erniedrigung der Transkriptionsrate des LEKTI-Gens.

Dass der aktivierte PAR-2-Rezeptor einen direkten Einfluss auf die Sekretion eines Proteins hat, konnte bereits gezeigt werden. So wird beispielsweise die Sekretion der Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9) in epithelialen Alveolarzellen (VLIAGOFTIS *et al.*, 2000), des Zelladhäsionsproteins ICAM-1 in epithelialen Zellen (STEINHOFF *et al.*, 1999; UEHARA

et al., 2002) oder Kollagen aus den Lebersternzellen (GACA *et al.*, 2002) infolge der Aktivierung des PAR-2-Rezeptors auf der Zelloberfläche mediiert. Ferner ist gezeigt, dass Agonisten des PAR-2-Rezeptors die Genexpression von Signal-Mediatoren wie der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 (SHPACOVITCH *et al.*, 2002), des Chemokins MCP-1 (UEHARA *et al.*, 2002) oder des Wachstumsfaktors GM-CSF (WAKITA *et al.*, 1997) spezifisch hochregulieren.

Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten PAR-2-Rezeptors (1.6) bewirkt den Ablauf intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden (Abb. 4.3).

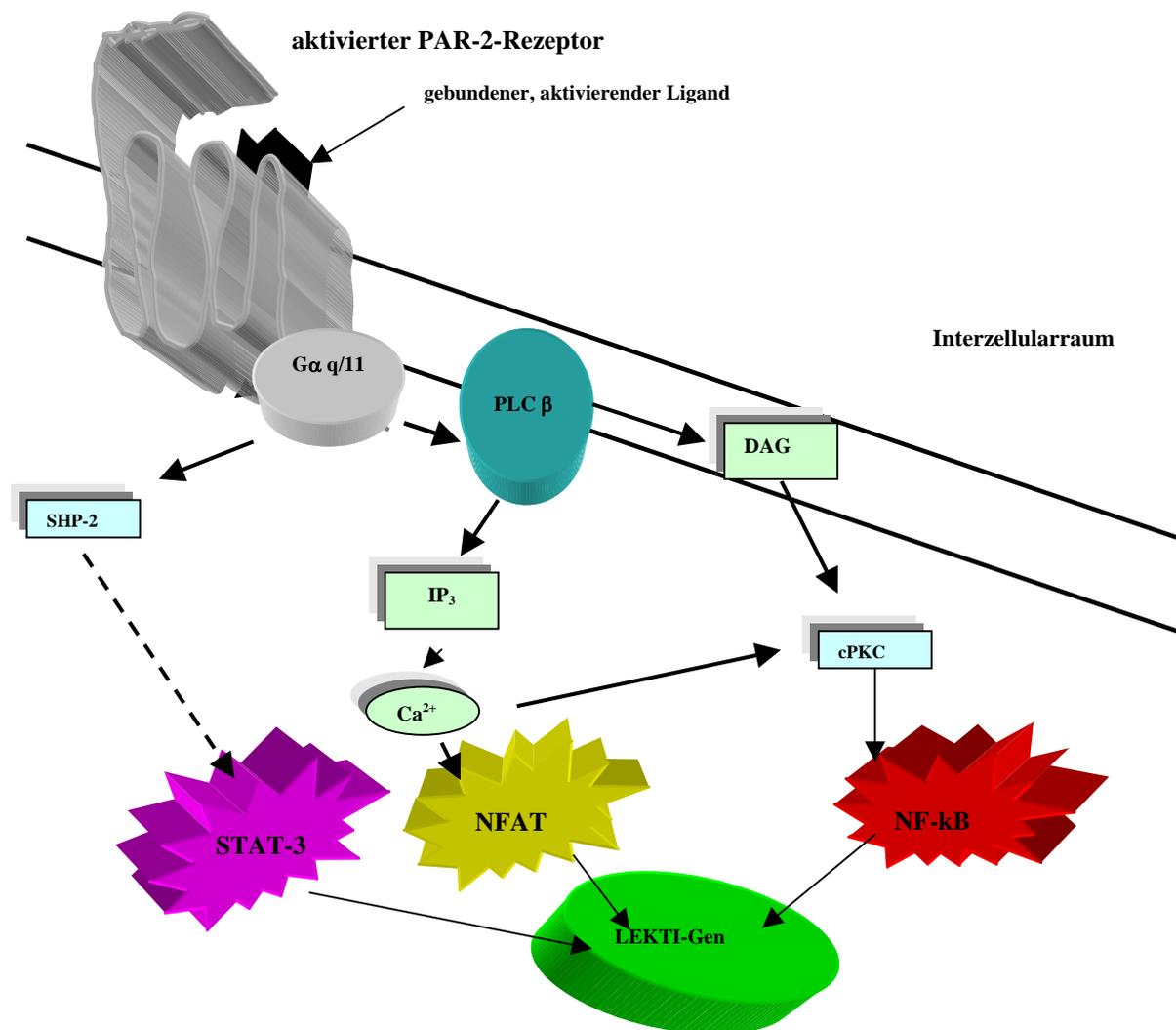


Abbildung 4.3

Skizze der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden nach Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR-2 auf der Zelloberfläche im Hinblick auf den postulierten negativen Feed-Back-Mechanismus (LUNDIN BROCKDORFF *et al.*, 2002; GUTKIND, 1998a, b; HOLLENBERG *et al.*, 2002; KANKE *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 1999; VLIAGOFTIS *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2001; YU *et al.*, 1997).

Die Aktivierung des PAR-2-Rezeptors bewirkt den Ablauf intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, an denen die Transkriptionsfaktoren NF-κB, STAT-3 und NFAT

beteiligt sind. Da diese Transkriptionsfaktoren funktionale regulatorische Bindungsmotive innerhalb des LEKTI-Genpromotors besitzen, wird folgend die PAR-2-vermittelte Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren erläutert.

Die PAR-2-mediierte Translokation des „rapid response“ Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern wird primär über Proteinkinase C (PKC) vermittelt (KANKE *et al.*, 2001; SHPACOVITCH *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2001). NF- κ B bindet an sein regulatorisches Motiv innerhalb von Genpromotoren und induziert deren Transkription. Die Hochregulation der Matrixmetalloprotease-9 (VLIAGOFTIS *et al.*, 2000) sowie des Zelladhäsionsproteins ICAM-1 (STEINHOFF *et al.*, 1999; UEHARA *et al.*, 2002) wird über NF- κ B vermittelt und ist für die Zytokine IL-6 und IL-8 diskutiert (SHPACOVITCH *et al.*, 2002). Da das LEKTI-Gen NF- κ B-reguliert ist (4.2), ist zu vermuten, dass infolge der Aktivierung des PAR-2-Rezeptors die Induktion der Transkription des LEKTI-Gens ebenfalls über die erläuterte Signaltransduktionskaskade verläuft.

Ein direkter Einfluss des aktivierten PAR-2-Rezeptors auf den Transkriptionsfaktor STAT-3 ist bislang nicht beschrieben. Jedoch gibt es eindeutige Hinweise darauf, dass der aktivierte PAR-2-Rezeptor die Tyrosinphosphatase SHP-2 induziert (YU *et al.*, 1997). Die SHP-2 interagiert wiederum mit den Januskinasen (JAKs), welche die Translokation der STAT-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern vermitteln (LUNDIN BROCKKDORFF *et al.*, 2002; HEINRICH *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1999; SERVIDEI *et al.*, 1998). Unter der Prämisse, dass der aktivierte PAR-2-Rezeptor an der Aktivierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren STAT-3 in den Zellkern beteiligt ist, ist anzunehmen, dass die STAT-3-Faktoren die Transkription des LEKTI-Gens regulieren, da der LEKTI-Genpromotor ein funktionales STAT-3-Bindungs-Motiv (IL-6RE) aufweist (4.3).

Die Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern ist vermutlich die wichtigste Signalvermittlungs-Kaskade nach der Aktivierung des PAR-2-Rezeptors. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass sämtliche Assays zur Bestimmung der Funktionalität von PAR-2-Rezeptoren *in vitro* auf der Quantifizierung intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen basieren (BELHAM *et al.*, 1996; BÖHM *et al.*, 1996b; HOWELLS *et al.*, 1997; UEHARA *et al.*, 2002). In Hinblick auf die hohe Expression des LEKTI-Gens im Thymus, die vermutete immuno-regulatorische Funktion des lympho-epithelialen Inhibitors LEKTI (MÄGERT *et al.*, 1999), die gezeigte LEKTI-Genexpression in der humanen T-Zelllinie Jurkat (Abb. 3.3) und der beschriebenen Expression des PAR-2-Rezeptor-Gens in T-Zellen (BAR-SHAVIT *et al.*, 2002; MARI *et al.*, 1996) könnte diese Kaskade von besonderer Relevanz sein. In Anbetracht der korrelierenden Expression beider Gene (PAR-2; LEKTI) und der funktionalen

Bindungsmotive für die lymphozytären Transkriptionsfaktoren LyF-1 und NFAT innerhalb des LEKTI-Genpromotors (Abb. 3.20; Abb. 3.21), ist zu vermuten, dass die Regulation der LEKTI-Genexpression in lympho-epithelialen Geweben vorwiegend durch die gewebsspezifischen Faktoren NFAT und LyF-1 vermittelt wird und infolge der PAR-2-Aktivierung die Ca^{2+} -Signaltransduktionskaskade verstärkt abläuft. Zur Verifizierung dieser Vermutung müßten jedoch weitere Untersuchungen unter Einsatz von T-Zellen bzw. lymphatischer Gewebe *in vitro* durchgeführt werden. Über eine konkrete Funktion des PAR-2-Rezeptors auf T-Zellen ist, außer einer Beteiligung an der T-Zell-Regulation im Verlauf inflammatorischer Dermatosen, wenig bekannt (BAR-SHAVIT *et al.*, 2002; STEINHOFF *et al.*, 1999). Diese Dermatosen werden auch durch inflammatorische Neuromediatoren wie Substanz P (SP) oder „calcitonin gene related peptide“ (CGRP) vermittelt, die infolge der PAR-2-Aktivierung auf den kutanen sensorischen Nervenendungen ausschließlich über die Ca^{2+} -Signaltransduktionskaskade (CORVERA *et al.*, 1999) freigesetzt werden (LUGER, 2002; STEINHOFF *et al.*, 2000; STEINHOFF *et al.*, 2003). Somit wird die Annahme, dass die „Kalzium-medierte“ Signaltransduktionskaskade die vorherrschende ist, gestützt.

Es ist zu vermuten, dass alle drei erläuterten Signaltransduktionskaskaden in Abhängigkeit des Zelltyps bzw. Gewebes sowie des beteiligten spezifischen PAR-2-Agonisten verstärkt bzw. vermindert im Verlauf des postulierten negativen Feed-Back-Mechanismus ablaufen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Zelllinien mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV inkubiert und die Expression des LEKTI-Gens quantitativ mittels Real-Time-PCR *in vitro* bestimmt. In allen Untersuchungen konnte eine Transkriptions-Induktion des LEKTI-Gens bestimmt werden, die sich bereits nach 30 Minuten deutlich und im Verlauf von 6 Stunden stetig (auf einem geringeren Niveau) erhöht (Abb. 3.27). Dieses Ergebnis stützt die vermutete Beteiligung der „rapid response“ Transkriptions-Aktivatoren NF- κ B, NFAT und STAT-3 an der Regulation der Expression des LEKTI-Gens (Abb. 4.3).

In der humanen Zelllinie T84 (Kolon) verdoppelte und in der epithelialen Zelllinie BHY (Mundschleimhaut) vervierfachte sich die Transkriptionsrate des LEKTI-Gens nach Ablauf von 6 Stunden (Abb. 3.27). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine erhöhte Menge des Inhibitors LEKTI im Anschluss an die Translation und Prozessierung in den Interzellularraum sekretiert wird. Diese gesteigerte LEKTI-Präsenz hätte lokal weitreichende physiologische Veränderungen zur Folge, da sich nun ein „positives“, da „anti-inflammatorisches Ungleichgewicht“ zwischen dem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI und dessen Zielproteinasen einstellt. Derart könnten die im Zuge von entzündlichen Prozessen vermehrt freigesetzten LEKTI-Zielproteinasen in den untersuchten (epithelialen) Geweben inaktiviert werden. Diese

lokal protektive Funktion ist ebenfalls für die Serinproteinase-Inhibitoren SKALP/Elafin in entzündeter psoriatischer Epidermis (ALKEMADE *et al.*, 1994), SLPI in der Lunge (SALLENAVE, 2000) sowie PSTI/SPINK 1 im Pankreas (WITT *et al.*, 2000) beschrieben und für LEKTI diskutiert (DRÖGEMÜLLER, 1999; MÄGERT *et al.*, 2002). Weiterhin wird dem PAR-2-Rezeptor eine Beteiligung an neurogenen Entzündungen und deren Nozizeption im peripheren sensorischen Nervensystem zugeschrieben (VERGNOLLE *et al.*, 2001). Diese neurogenen Entzündungen sind ein Teil des komplexen Krankheitsbildes chronisch entzündlicher Hauterkrankungen wie Psoriasis, atopischer Dermatitis oder des Netherton Syndroms (STEINHOFF *et al.*, 1999; STEINHOFF *et al.*, 2003). Für den Serinproteinase-Inhibitor ist eine Beteiligung an der Entstehung und Manifestierung des Netherton Syndroms bewiesen (BITOUN *et al.*, 2002a, b; CHAVANAS *et al.*, 2000). Durch die Existenz des „neuronalen Verbindungsglieds“ PAR-2 und der Präsenz der Serinproteinase Trypsin im Nervensystem (KOSHIKAWA *et al.*, 1998) wird die postulierte protektive Funktion des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI weiter gestützt.

Angesichts der postulierten protektiven Funktion des Inhibitors LEKTI kann der aktivierte PAR-2-Rezeptor wiederum als ein lokal aktivierendes „Glied“ einer übergreifenden (systemischen) inflammatorischen Signal-Kette angesehen werden. In dieser Kette fungiert der PAR-2-Rezeptor selbst als ein „Sensor“ für einen lokalen Überschuss an pro-inflammatorischen LEKTI-Zielproteinasen und besitzt eine protektive Funktion, obwohl er bezüglich der übergreifenden Signal-Kette ein Mediator inflammatorischer Effekte ist. Diese ambivalente Mediator-Funktion des PAR-2-Rezeptors ist diskutiert (COCKS *et al.*, 2000; VERGNOLLE *et al.*, 2001) und die gewählte Bezeichnung des PAR-2-Rezeptors als ein „Sensor“ anerkannt. BÖHM und Mitarbeiter (1996b) charakterisieren den PAR-2-Rezeptor als „Trypsin-Sensor“ im Intestinaltrakt, CAMERER und Mitarbeiter (2000) als generellen „Koagulations-Proteinase-Sensor“, COUGHLIN und Mitarbeiter (2003) als „Sensor für Gewebsverletzungen“ und COCKS und Mitarbeiter (2000) bezeichnen den PAR-2-Rezeptor gar als einen „Wachposten für Entzündungen (Sentries for Inflammation)“. Abschließend kann der von MIIKE und Mitarbeitern (2001) beschriebene Sachverhalt, dass der PAR-2-Rezeptor sensitiv auf Veränderungen in seinem „microenvironment“ reagiert und daraufhin seine jeweilige Effektor-Funktion ausübt, zitiert werden.

4.4.1 Welchen Einfluss hat der aktivierte PAR-2-Rezeptor auf die Regulation der LEKTI-Genexpression in Hepatozyten?

In der untersuchten hepatozytären Zelllinie HuH-7, die mit dem synthetischen Agonisten SLIGKV inkubiert wurde, versechsfacht sich die Transkriptionsrate des LEKTI-Gens nach Ablauf von 30 Minuten und ist nach 6 Stunden um das Zehnfache erhöht (Abb. 3.27). Im Vergleich zu den bereits diskutierten Ergebnissen mit den epithelialen Zelllinien T84 und BHY weisen diese Daten auf eine Erhöhung der beschriebenen anti-inflammatorischen Effekte des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI in Hepatozyten hin. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da die höchste Induktion der Transkription des LEKTI-Gens (im Verlauf einer Inkubation mit dem synthetischen PAR-2-Agonisten SLIGKV) in einer humanen hepatozytären Zelllinie detektiert wurde, die keine intrinsische PAR-2-Genexpression zeigt (Abb. 3.24). Demgegenüber steht jedoch die belegte hohe Expression des PAR-2-Rezeptor-Gens in der Leber (BÖHM *et al.*, 1996b; GACA *et al.*, 2002). Es ist denkbar, dass der genutzte PCR-Assay nicht die nötige Sensitivität zur Quantifizierung der beschriebenen PAR-2-Genexpression aufwies. Diesbezüglich ist die Präsenz von Subpopulationen des PAR-2-Rezeptors (SCHECHTER *et al.*, 1998) oder das Vorkommen polymorpher PAR-2-Rezeptoren (COMPTON *et al.*, 2000) zu erwägen. Daneben sind bis dato unbekannte Rezeptoren der PAR-Rezeptor-Familie in Betracht zu ziehen (BELHAM *et al.*, 1996; DERY *et al.*, 1999a; KAHN *et al.*, 1998; VERGNOLLE *et al.*, 2001), deren wahrscheinliche Existenz HOLLENBERG (1999) mit der Frage „Protease-activated receptors: PAR-4 and counting: how long is the course?“ beantwortete.

In der Leber laufen im Vergleich zu anderen Geweben divergierende genregulatorische Mechanismen bzw. spezifische physiologische Vorgänge ab. Hierzu gehören die Metabolisierung und Exkretion toxischer Substanzen, die Synthese funktionell wichtiger Proteine wie Albumin, verschiedener Gerinnungsfaktoren sowie den systemischen Akute-Phase-Proteinen (BAUMANN *et al.*, 1994). Daher ist es denkbar, dass die ermittelte hohe Induktion der Transkription des LEKTI-Gens infolge der PAR-2-Aktivierung auf weitere, leberspezifische Effekte zurückzuführen ist, die wiederum in den untersuchten epithelialen Zelllinien T84 bzw. BHY nicht ablaufen. In diesem Kontext ist auf die bereits diskutierte Interleukin-6-Responsivität in Hinblick auf eine denkbare Zugehörigkeit des LEKTI-Gens zu den Akute Phase-Genen zu verweisen (4.3). Unter dieser Prämisse sind an der Regulation der LEKTI-Genexpression im Zuge der PAR-2-Rezeptor-Aktivierung vermutlich weitere leberspezifische genregulatorische Mechanismen an der Transkription des LEKTI-Gens beteiligt. Ein Einblick in die „orchestrated response (orchestrierte Antwort)“ des

Transkriptionsvorgangs (LEMON *et al.*, 2000) wird im Rahmen dieser Diskussion in dem folgenden Kapitel (4.5) vermittelt.

Es ist festzustellen, dass ein negativer Feed-Back-Mechanismus (Abb. 4.2) wahrscheinlich ist. Die lokal protektive Funktion des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI kann in Abhängigkeit von der weit verbreiteten Expression des PAR-2-Rezeptors und der ubiquitären Präsenz tryptischer Aktivitäten auf eine systemische Funktion in lympho-epithelialen und durch das „Verbindungsglied PAR-2“ auch auf kutane neuronale Gewebe ausgeweitet werden. Daneben kann dem PAR-2-Rezeptor in den Regulations-Mechanismen der Expression des LEKTI-Gens die Funktion eines lokalen Mediators und „Sensors“ zugewiesen werden. Der PAR-2-Rezeptor ist Komponente einer (infolge von inflammatorischen Einflüssen hochregulierten lokalen Präsenz von Zielproteinasen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI) ablaufenden „systemischen“ inflammatorischen Signal-Kette. In deren Verlauf induziert der aktivierte PAR-2-Rezeptor auf der Zelloberfläche das LEKTI-Gen wiederum gewebs- bzw. zell-spezifisch über dessen funktionale regulatorische Bindungsmotive der Transkriptionsfaktoren NF- κ B-, STAT-3- und NFAT. Daher kann das LEKTI-Gen als PAR-2-reguliert bezeichnet werden.

4.5 Die Transkription des LEKTI-Gens ist ein Zusammenspiel interagierender Faktoren

Der Transkriptionsvorgang jedes Gens ist eine „orchestrated response“ (LEMON *et al.*, 2000) von aktivierenden, reprimierenden, miteinander synergistisch oder antagonistisch kooperierenden Transkriptionsfaktoren, die zudem eine ubiquitäre oder gewebspezifisch limitierte Präsenz aufweisen. Dieses muß bei Untersuchungen regulatorischer Mechanismen eines Genpromotors immer berücksichtigt werden. Demzufolge sollten die Ergebnisse selektiver *in vitro* Untersuchungen wie beispielsweise Reporter-gen-Analysen stets in Relation zu dem beschriebenen „*in vivo* Gesamtkontext“ der Transkription gesetzt werden (BRIVANLOU *et al.*, 2002; LEMON *et al.*, 2000). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze zur Identifikation regulatorischer Mechanismen der LEKTI-Genexpression *in vitro* gewählt:

- (i) Die „Induzierbarkeit“ des LEKTI-Genpromotors wurde mittels quantitativer TaqMan-Analysen unter Einsatz humaner cDNAs aus Zellen, die zuvor mit genregulatorisch wirksamen Mediatoren stimuliert worden waren, untersucht (3.4).

- (ii) Zur Aktivitätsbestimmung der LEKTI-Genpromotor-Deletionskonstrukte dienten Reporter-Gen-Assays, die sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten transient transfizierten, hepatozytären Zellkulturen durchgeführt wurden (3.3).
- (iii) Die Funktionalität jedes *in silico* identifizierten putativen regulatorischen Bindungsmotivs wurde mittels Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien unter Einsatz verschiedener Kernextrakte aus humanen Zelllinien untersucht (3.5).

In allen Untersuchungen gelang der Nachweis einer PKC- und IL-6-Responsivität des LEKTI-Genpromotors. Weiterhin konnte die vermutete Beteiligung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT-3 an der Transkription des LEKTI-Gens bestätigt werden, da das *in silico* detektierte NF- κ B-Bindungsmotiv (Abb. 3.15) bzw. das distale IL-6RE (Abb. 3.18) innerhalb des LEKTI-Genpromotors als funktional bestimmt werden konnte. Die daraus gefolgerte, bereits diskutierte Zuordnung des LEKTI-Gens zu den NF- κ B-regulierten- (4.2) bzw. IL-6-responsiven Genen (4.3) erlaubt weitere Postulate in Hinblick auf die Regulation der Expression des LEKTI-Gens.

Die „orchestrated response“ der Transkription ist ein exakt aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Komponenten. Neben den beteiligten regulatorischen Proteinen wie den Transkriptionsfaktoren oder der RNA-Polymerase II ist auch die Chromatinstruktur von Bedeutung. Diese kann die regulatorischen Proteine sterisch an ihrer Bindung hindern. Ferner können Bindungsmotive, die in der linearen DNA-Sequenz mehrere Kilobasenpaare voneinander entfernt liegen, räumlich dicht zueinander geführt werden, so dass eine Interaktion der regulatorischen Proteine ermöglicht wird. Die Effekte dieser Interaktionen sind verschieden. Sie können reprimierend, inhibierend oder auch aktivierend sein, tragen aber in jedem Fall wesentlich zur Regulation der Transkription bei. Daher ist ihre Kenntnis unabdingbar zum Verständnis genregulatorischer Mechanismen (BEATO *et al.*, 1997; KADONAGA, 1998; LEMON *et al.*, 2000; SACCANI *et al.* 2001). Im Folgenden werden ausgewählte Modelle für Interaktionen des Transkriptionsfaktors NF- κ B erläutert, die im Verlauf der Transkription des LEKTI-Gens ebenfalls denkbar sind.

Die Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und SP-1 (Signal Protein-1) liefert beispielsweise ein Modell für die transkriptionale Induktion von NF- κ B-regulierten Genen (AINBINDER *et al.*, 2002). In „normalen physiologischen Zuständen“ werden die Promotoren der NF- κ B-regulierten Gene durch den Transkriptionsapparat (1.4.1) und konstitutive Transkriptionsfaktoren wie SP-1 auf einem basalen Niveau exprimiert. Infolge „inflammatorischer Zustände“ transloziert der aktivierte Faktor NF- κ B in den Zellkern (1.5.1), bindet an sein regulatorisches Motiv in Ziel-Genpromotoren und tritt mit mehreren

Komponenten des Transkriptionsapparates in Wechselwirkung. Diese Interaktion bewirkt multiple Transkriptionszyklen und derart die Induktion der Genexpression (Abb. 4.4).

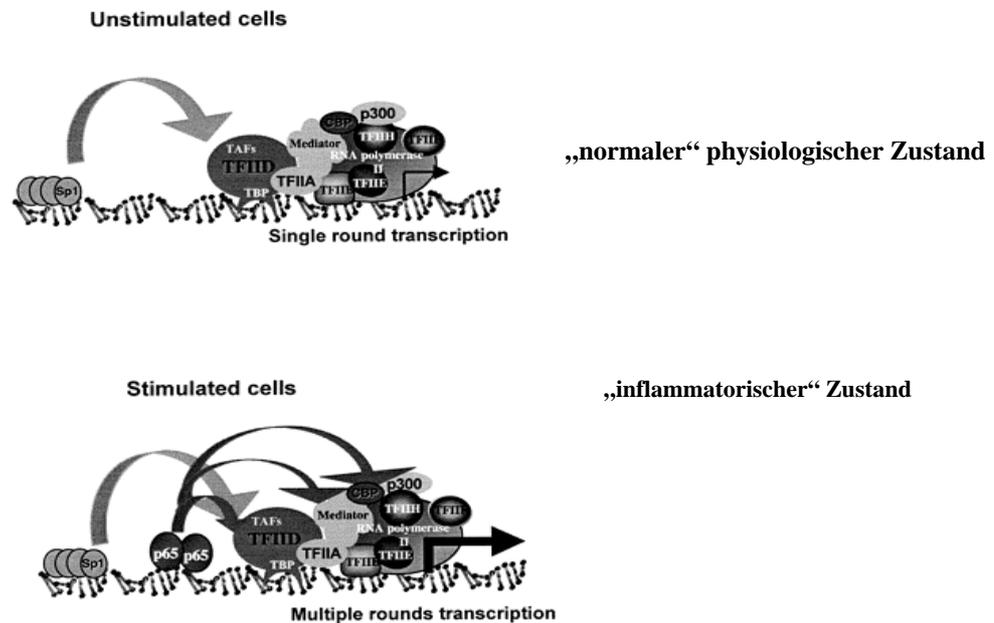


Abbildung 4.4:

Modell der transkriptionellen Induktion von NF-κB-regulierten Genen. In „normalen physiologischen Zuständen“ werden die Gene durch den Transkriptionsapparat und konstitutiven Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise SP-1 auf einem basalen Niveau transkribiert. In inflammatorischen (stimulierten) Zuständen bindet der aktivierte Faktor NF-κB an sein regulatorisches Motiv in Ziel-Genpromotoren und interagiert mit dem Transkriptionsapparat. Diese Interaktion bewirkt multiple Transkriptionszyklen (AINBINDER *et al.*, 2002).

Dieses Interaktions-Modell (Abb. 4.4) ist durchaus auf die ermittelte NF-κB-medierte Induktion des LEKTI-Gens projizierbar, da innerhalb des LEKTI-Genpromotors *in silico* ein putatives SP-1-Bindungsmotiv identifiziert wurde (Abb. 3.2). Diese Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Das folgend erläuterte Modell beschreibt einen vermutlich grundlegenden regulatorischen Mechanismus (BODE *et al.*, 2001). Es basiert darauf, dass die regulatorischen Bindungsmotive zweier Faktoren überlappen bzw. eines Bestandteil des anderen ist.

Der Faktor SP-1 bindet selektiv an NF-κB-Bindungsmotive (p50/p50) und bewirkt eine konstitutive Genexpression. Gelangen aktivierte NF-κB-p50-Dimere in den Zellkern, verdrängen sie die SP-1-Proteine und induzieren die Expression ihrer Zielgene. Derart kann die Expression von NF-κB-regulierten Genen auch in Abwesenheit von NF-κB-Proteinen im Zellkern auf einem basalen Niveau gewährleistet werden (HIRANO *et al.*, 1998).

In vielen Genpromotoren von Akute-Phase-Proteinen, wie beispielsweise denen der Serinproteinase-Inhibitoren α_2 -Makroglobulin oder α_1 -Antichymotrypsin, überlappen die regulatorischen Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren STAT-3 und NF- κ B (BODE *et al.*, 2001). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die Faktoren um die Bindung des Motivs konkurrieren können (ZHANG *et al.*, 1997a, b) oder auch bereits gebundene „schwächere“ Faktoren durch „stärker“ aktivierende substituiert werden (BODE *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 1995).

Ein weiteres Beispiel für die Überlappung von regulatorischen Motiven ist die Bindung der lymphozytären Transkriptionsfaktoren NFAT an NF- κ B-(p65)-Bindungsmotive (BADRAN *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 1995; MATSUDA *et al.*, 1994; MCCAFFREY *et al.*, 1992). In diesem Modell konkurrieren beide Faktoren um die Bindung des Motivs. Im Promotor des Interferon- γ -Gens binden beide Faktoren kooperativ an das DNA-Motiv und „induzieren die maximale Transkription“ (SICA *et al.*, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese, auf den LEKTI-Genpromotor projizierbare Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und NFAT untersucht (3.5.5.3). Anhand von Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien konnte die Bindung von NFAT-Proteinen an den untersuchten LEKTI-Genpromotor-Abschnitt (dsDNA), der das funktionale NF- κ B-Bindungsmotiv beinhaltet, bestätigt werden (Abb. 3.22). Da diese Bindung in allen untersuchten Ansätzen (WT; MUT; stimuliert; unstimuliert) nachweisbar war, ist die eingefügte 3 Basenpaare umfassende Mutation innerhalb des NF- κ B-p50-Bindungsmotivs unwirksam. Eine denkbare Erklärung ist, dass die Mutation innerhalb des p50-Motivs, das in reverser Orientierung untersuchte NFAT-Bindungsmotiv jedoch im NF- κ B-p65 Motiv lokalisiert ist (Tab. 3.4). Daneben konnte, nach erneuter Sequenzanalyse der eingesetzten NF- κ B-dsDNA, *in silico* ein putatives NFAT-Bindungsmotiv (5'-GGAAA-3') stromabwärts in unmittelbarer Nähe (5 Bp.) des untersuchten funktionalen NF- κ B-Bindungsmotivs des LEKTI-Genpromotors identifiziert werden (Abb. 3.2 *). Zur Analyse dieser Interaktion müßten weitere Experimente durchgeführt werden, um die genaue Bindungsstelle der NFAT-Proteine innerhalb des untersuchten dsDNA-Abschnitts zu ermitteln.

Durch die Aufklärung der Interaktion bzw. Bindung des Transkriptionsfaktors NFAT an das funktionale NF- κ B-Motiv innerhalb der LEKTI-Genpromotorsequenz konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Teil der „Komplexität“ genregulatorischer Mechanismen beschrieben werden.

4.6 Perspektiven

Im Verlauf der letzten Jahre ist das Interesse an Proteinase-Inhibitoren stark gestiegen, da sie ein hohes therapeutisches Potential besitzen. Eine häufige Ursache pathologischer Zell- und Gewebsdegradationen ist ein Ungleichgewicht zwischen einer Proteinase und ihrem spezifischen Inhibitor (1.3). Dieses Mißverhältnis kann zu polymorphen Krankheitsbildern wie Asthma, Krebs, entzündliche Dermatosen oder Störungen in der Wundheilung führen. Daher sind Proteinase-Inhibitoren für eine (gen-) therapeutische Behandlung von Proteinase-induzierten Zellschädigungen bzw. Gewebsdegradationen geeignet (LEUNG *et al.*, 2000; ROBERTS *et al.*, 1995; SEIFE, 1997; STEINHOFF *et al.*, 1999).

Als Gentherapie wird das Einschleusen funktionsfähiger Gene mittels Vektoren in die vom Gendefekt betroffenen Zellen bezeichnet. Daneben kann der Gentransfer ebenfalls zur körpereigenen Synthese verschiedenster therapeutisch oder präventiv wirksamer Genprodukte eingesetzt werden. Insofern kann der Gentransfer auch als eine „natürliche“, endogene Form der Medikament-Produktion angesehen werden, die gezielt am physiologischen Ort der Erkrankung ansetzt (VERMA *et al.*, 1997).

Mutationen innerhalb von Proteinase-Inhibitor-Genen, die das inhibitorische Potential des Gen-Produkts vermindern oder gänzlich unterbinden, können zu unkontrollierten Aktivitäten der Zielproteinase(n) und derart zu degenerativen Effekten bzw. pathophysiologischen Dysfunktionen führen. So wird beispielsweise eine Form der chronischen Pankreatitis durch Mutationen innerhalb des Gens für den Serinproteinase-Inhibitor SPINK-1/PSTI hervorgerufen (KEIM *et al.*, 2003; WITT *et al.*, 2000). Auch das Krankheitsbild des Lungenemphysems resultiert aus einem mutationsbedingten Mangel an funktionalem α_1 -Proteinaseinhibitor (CARRELL *et al.*, 2002), und das Netherton Syndrom entsteht u.a. aufgrund von Mutationen innerhalb des Gens für den Serinproteinase-Inhibitor LEKTI (BITOUN *et al.*, 2002a, b; CHAVANAS *et al.*, 2000). Die Kenntnis dieser Mutationen bzw. des Ursprungs der Dysfunktionen auf molekularer Ebene ermöglicht eine gezielte Entwicklung gentherapeutischer Verfahren. Diese werden bei der chronischen Pankreatitis und dem Lungenemphysem bereits intensiv erforscht und wären ebenfalls für den Serinproteinase-Inhibitor LEKTI in Hinblick auf das Netherton Syndrom vorstellbar. Eine aktuelle Übersicht über bisher durchgeführte klinische Studien kann unter der Internet-Adresse <http://www.wiley.co.uk/genetherapy> eingesehen werden. Die Abbildung 4.5 soll einen Eindruck über den momentanen Forschungsstand der Gentherapie *per se* vermitteln, der große Zukunftsperspektiven eingeräumt werden (BAGNIS, 2002; RUSSELL *et al.*, 1999; STECENKO *et al.*, 2003; VERMA *et al.*, 1997).

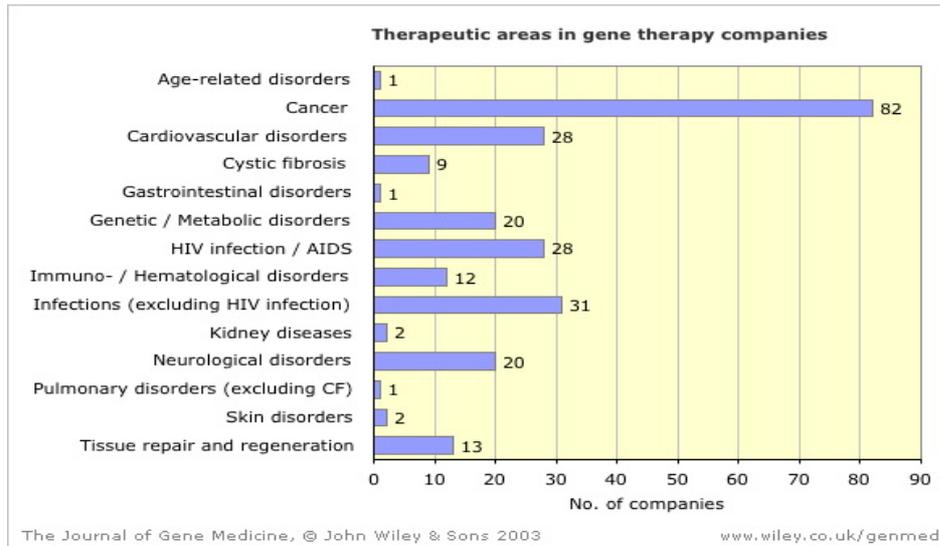


Abbildung 4.5:

Aktuelle Darstellung der gen-therapeutischen Forschungsbereiche kommerzieller Unternehmen (entnommen aus: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy>).

Mit Hilfe von synthetischem Serinproteinase-Inhibitor LEKTI im Krankheitsbild des Netherton-Syndroms und den damit verbundenen entzündlichen Dermatosen wäre auch eine topische Therapie der betroffenen Hautregionen denkbar. Diese könnte in Form von Salben oder Cremes, die den „intakten“ Serinproteinase-Inhibitor LEKTI enthalten, darauf abzielen, die entzündliche Reaktion der Haut positiv zu beeinflussen und derart zu einer Linderung der Entzündungen, Rötungen und Juckreiz führen. Somit wäre der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI durchaus als ein wirksames (Gen-) Therapeutikum zur Behandlung von entzündlichen Dermatosen geeignet.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung regulatorischer Mechanismen der Genexpression des humanen Multidomänen Serinproteinase-Inhibitors LEKTI. Dazu wurden auf Grundlage der bekannten LEKTI-Genpromotor-Sequenz (DRÖGEMÜLLER, 1999) Untersuchungen zur Bindung *in silico* identifizierter putativer Transkriptionsfaktoren durchgeführt.

Hierzu wurden humane Zelllinien unterschiedlicher Herkunft bezüglich ihrer endogenen LEKTI-Genexpression untersucht und in die anschließenden Experimente eingesetzt. Zur Identifikation responsiver Elemente auf dem verwendeten LEKTI-Genpromotor-Fragment wurden Deletionsmutanten hergestellt und diese in Reporter-Gen-Experimenten analysiert. Dabei führte die Deletion flankierender Bereiche um das putative NF- κ B-Bindungsmotiv (Genpromotorkonstrukt LEKTI II) zur höchsten endogenen Aktivität in transient transfizierten hepatozytären Zellen (HuH-7). In weiteren Experimenten, in denen die Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA und cAMP-Aktivator Forskolin oder dem Zytokin IL-6 vorstimuliert wurden, konnte eine Induktion des Reportergens in allen LEKTI-Genpromotorkonstrukten bestimmt werden. Untersuchungen mit NF- κ B-Inhibitoren zeigten, dass diese die ermittelte PKC-Responsivität des Konstrukts LEKTI II um 50 % reduzieren. Zur Evaluierung der ermittelten PKC- und IL-6-Responsivität der untersuchten LEKTI-Genpromotorsequenz wurde die endogene Expression von LEKTI in humanen Zelllinien unter Einfluss verschiedener Stimuli mit Hilfe von quantitativen RT-PCR-Analysen untersucht. Hierbei gelang der Nachweis einer zeitabhängigen Induktion des LEKTI-Gens in hepatozytären Zellen (HuH-7) durch die Ko-Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA und dem cAMP-Aktivator Forskolin. Weiterhin konnte eine zeitabhängige Induktion des LEKTI-Gens in IL-6-stimulierten epithelialen (BHY) sowie hepatozytären (HuH-7) Zellen ermittelt werden, wobei sich die endogene Expression in diesen Zellen um das 3-fache bzw. um das 10-fache erhöhte. Mit Hilfe von Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien (TF-EIA) konnten die *in silico* identifizierten putativen NF- κ B-, LyF-1- und NFAT-Bindungsmotive sowie des IL-6RE I bestätigt werden.

Im Kontext der in den letzten Jahren intensivierten Forschungen an den pathophysiologisch bedeutsamen Proteinase-Aktivierten-Rezeptoren (PARs) wurden Untersuchungen zu Interaktionen zwischen dem aktivierten PAR-2-Rezeptor und der Expression des LEKTI-Gens durchgeführt. Da der PAR-2-Rezeptor durch die LEKTI-Zielproteinasen Trypsin, SCTE und SCCE aktiviert wird, ist eine Interaktion in Form eines negativen Feedback-Mechanismus vorstellbar. PAR-2-exprimierende humane Zellen wurden mit Hilfe des synthetischen PAR-2-

Agonisten SLIGKV aktiviert und die abhängige LEKTI-Genexpressionsrate mittels quantitativer RT-PCR-Analysen bestimmt. In allen untersuchten Zellen gelang der Nachweis einer zeitabhängigen Induktion des LEKTI-Gens. Die Expression des LEKTI-Gens verdreifachte bzw. verfünffachte sich in den epithelialen Zelllinien T84 bzw. BHY, und in der hepatozytären Zelllinie HuH-7 konnte eine Verzehnfachung ermittelt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann das LEKTI-Gen als NF- κ B-reguliert, IL-6-responsiv und PAR-2-mediert induzierbar bezeichnet werden. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B, das Zytokin IL-6 und der aktivierte PAR-2-Rezeptor pro-inflammatorische Effekte vermitteln, stützen die Ergebnisse die vermutete anti-inflammatorische Funktion des Serin-Proteinase-Inhibitors LEKTI.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ABE, T., KOBAYASHI, N., YOSHIMURA, K., TRAPNELL, B.C., KIM, H., HUBBARD, R.C., BREWER, M.T., THOMPSON, R.C., CRYSTAL, R.G. (1991). Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest.* **87**: 2207-15.
- AHMAD, M., MARUI, N., ALEXANDER, R.W., MEDFORD, R.M. (1995). Cell type-specific transactivation of the VCAM-1 promoter through an NF-kappa B enhancer motif. *J Biol Chem.* **270**: 8976-83.
- AINBINDER, E., REVACH, M., WOLSTEIN, O., MOSHONOV, S., DIAMANT, N., DIKSTEIN, R. (2002). Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* **22**: 6354-62.
- AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S., NISHIO, Y., NAKAJIMA, T., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* **9**: 1897-906.
- ALAM, J., COOK, J.L. (1990). Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* **188**: 245-54.
- ALKEMADE, J.A., MOLHUIZEN, H.O., PONEC, M., KEMPENAAR, J.A., ZEEUWEN, P.L., DE JONGH, G.J., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I.M., VAN ERP, P.E., VAN DE KERKHOF, P.C., SCHALKWIJK, J. (1994). SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.* **107**: 2335-2342.
- ALM, A.K., GAGNEMO-PERSSON, R., SORSA, T., SUNDELIN, J. (2000). Extraprostatic trypsin-2 cleaves proteinase-activated receptor-2. *Biochem Biophys Res Commun.* **275**: 77-83.
- ALMENDRO, N., BELLON, T., RIUS, C., LASTRES, P., LANGA, C., CORBI, A., BERNABEU, C. (1996). Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization. *J Immunol.* **157**: 5411-21.
- ALONZI, T., MARITANO, D., GORGONI B., RIZZUTO, G., LIBERTI, V., POLI, V. (2001). Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation in the liver. *Mol Cell Biol.* **21**: 1621-32.
- ALTMANN, H., WENDLER, W., WINNACKER, E.L. (1994). Transcriptional activation by CTF proteins is mediated by a bipartite low-proline domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 3901-5.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- ANDUS, T., HEINRICH, P.C., CASTELL, J.C., GEROK, W. (1989). Interleukin-6: a key hormone of the acute phase reaction. *Dtsch Med Wochenschr.* **114**: 1710-6.
- ARCOT, S.S., DEININGER, P.L. (1992). Protein binding sites within the human thymidine kinase promoter. *Gene.* **111**: 249-54.
- ARENZANA-SEISDEDOS, F., THOMPSON, J., RODRIGUEZ, M.S., BACHELERIE, F., THOMAS, D., HAY, R.T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* **15**: 2689-96.
- ASOKANANTHAN, N., GRAHAM, P.T., STEWART, D.J., BAKKER, A.J., EIDNE, K.A., THOMPSON, P.J., STEWART, G.A. (2002). House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol.* **169**: 4572-8.

- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMANN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- BADRAN, B.M., WOLINSKY, S.M., BURNY, A., WILLARD-GALLO, K.E. (2002). Identification of three NFAT binding motifs in the 5'-upstream region of the human CD3gamma gene that differentially bind NFATc1, NFATc2, and NF-kappa B p50. *J Biol Chem*. **277**: 47136-48.
- BAEUERLE, P.A., BALTIMORE, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**: 13-20.
- BAGNIS, C. (2002). Picking Some News about the Retroviral Vector World from the 9th Symposium of the European Society of Gene Therapy. *J Biomed Biotechnol*. **2**: 4-6.
- BALDWIN, A.S. JR. (2001). The transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*. **107**: 3-6.
- BALDWIN, A.S. JR. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. **14**: 649-83.
- BAR-SHAVIT, R., MAOZ, M., YONGJUN, Y., GROYSMAN, M., DEKEL, I., KATZAV, S. (2002). Signalling pathways induced by protease-activated receptors and integrins in T cells. *Immunology*. **105**: 35-46.
- BAUMANN, H., GAULDIE, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today*. **15**: 74-80.
- BEATO, M., EISFELD, K. (1997). Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res*. **25**: 3559-63.
- BELHAM, C.M., TATE, R.J., SCOTT, P.H., PEMBERTON, A.D., MILLER, H.R., WADSWORTH, R.M., GOULD, G.W., PLEVIN, R. (1996). Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and independent activation of mitogen-activated protein kinases. *Biochem J*. **320**: 939-46.
- BENOTMANE, A.M., HOYLAERTS, M.F., COLLEN, D., BELAYEW, A. (1997). Nonisotopic quantitative analysis of protein-DNA interactions at equilibrium. *Anal Biochem*. **250**: 181-5.
- BERKOWITZ, B., HUANG, D.B., CHEN-PARK, F.E., SIGLER, P.B., GHOSH, G. (2002). The x-ray crystal structure of the NF-kappa B p50.p65 heterodimer bound to the interferon beta -kappa B site. *J Biol Chem*. **277**: 24694-700.
- BINGLE, L., TETLEY, T.D., BINGLE C.D. (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **25**: 84-91.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res*. **7**: 1513-1523.
- BITOUN, E., BODEMER, C., AMIEL, J., DE PROST, Y., STOLL, C., CALVAS, P., HOVNANIAN, A. (2002a). Prenatal diagnosis of a lethal form of Netherton syndrome by SPINK5 mutation analysis. *Prenat Diagn*. **22**: 121-6.
- BITOUN, E., CHAVANAS, S., IRVINE, A.D., LONIE, L., BODEMER, C., PARADISI, M., HAMEL-TEILLAC, D., ANSAI, S., MITSUHASHI, Y., TAIEB, A., DE PROST, Y., ZAMBRUNO, G., HARPER, J.I., HOVNANIAN, A. (2002b). Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol*. **118**: 352-61.
- BODE, J.G., FISCHER, R., HAUSSINGER, D., GRAEVE, L., HEINRICH, P.C., SCHAPER, F. (2001). The inhibitory effect of IL-1 beta on IL-6-induced alpha 2-macroglobulin expression is due to activation of NF-kappa B. *J Immunol*. **167**: 1469-81.

- BODE, W., HUBER, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**: 433-451.
- BOGUSLAWSKI, G., HALE, L.V., YU., X.P., MILES, R.R., ONYIA, J.E., SANTERRE, R.F., CHANDRASEKHAR, S. (2000). Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C-dependent pathways. *J Biol Chem.* **275**: 999-1006.
- BÖHM, S.K., KHITIN, L.M., GRADY, E.F., APONTE, G., PAYAN, D.G., BUNNETT, N.W. (1996a). Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem.* **271**: 22003-16.
- BÖHM, S.K., KONG, W., BROMME, D., SMEEKENS, S.P., ANDERSON, D.C., CONNOLLY, A., KAHN, M., NELKEN, N.A., COUGHLIN, S.R., PAYAN, D.G. (1996b). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J.* **314**: 1009-16.
- BÖHM, S.K., MCCONALOGUE, K., KONG, W., BUNNETT, N.W. (1998). Proteinase-Activated Receptors: New Functions for Old Enzymes. *News Physiol Sci.* **13**: 231-240.
- BOMSZTYK, K., TOIVOLA, B., EMERY, D.W., ROONEY, J.W., DOWER, S.K., RACHIE, N.A., SIBLEY, C.H. (1990). Role of cAMP in interleukin-1-induced kappa light chain gene expression in murine B cell line. *J Biol Chem.* **265**: 9413-7.
- BOTELLA, L.M., PUIG-KROGER, A., ALMENDRO, N., SANCHEZ-ELSNER, T., MUNOZ, E., CORBI, A., BERNABEU, C. (2000). Identification of a functional NF-kappa B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. *J Immunol.* **164**: 1372-8.
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R.T., BREITKREUTZ, D., HORNING, J., MARKHAM, A., FUSENING, N.E., (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* **106**: 761-71.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.
- 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**: 30033-40.
- BREATHNACH, R., CHAMBON, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* **50**: 349-83.
- BRIVANLOU, A.H., DARNELL, J.E. JR. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science.* **295**: 813-8.
- BROWN, R.T., ADES, I.Z., NORDAN, R.P. (1995). An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. *J Biol Chem.* **270**: 31129-35.
- BURATOWSKI, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell.* **77**: 1-3.
- CALDENHOVEN, E., COFFER, P., YUAN, J., VAN DE STOLPE, A., HORN, F., KRUIJER, W., VAN DER SAAG, P.T. (1994). Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element. *J Biol Chem.* **269**: 21146-54.
- CAMERER, E., HUANG, W., COUGHLIN, S.R. (2000). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 5255-60.

- CARRELL, R.W., LOMAS, D.A. (2002). Alpha₁-antitrypsin deficiency: a model for conformational diseases. *N. Engl. J. Med.* **346**: 45-53.
- CASTELL, J.V., GOMEZ-LECHON, M.J., DAVID, M., ANDUS, T., GEIGER, T., TRULLENQUE, R., FABRA, R., HEINRICH, P.C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* **242**: 237-9.
- CHAVANAS, S., BODEMER, C., ROCHAT, A., HAMEL-TEILLAC, D., ALI, M., IRVINE, A.D., BONAFE, J.L., WILKINSON, J., TAIEB, A., BARRANDON, Y., HARPER, J.I., DE PROST, Y., HOVNANIAN, A. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* **25**: 141-142.
- CHEN, F., CASTRANOVA, V., SHI, X., DEMERS, L.M. (1999). New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* **45**: 7-17.
- COAKLEY, R.J., TAGGART, C., O'NEILL, S., MCELVANEY, N.G. (2001). Alpha1-antitrypsin deficiency: biological answers to clinical questions. *Am. J. Med. Sci.* **321**: 33-41.
- COCKS, T.M., MOFFATT, J.D. (2000). Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci.* **21**: 103-8.
- COMPTON, S.J., CAIRNS, J.A., PALMER, K.J., AL-ANI, B., HOLLENBERG, M.D., WALLS, A.F. (2000). A polymorphic protease-activated receptor 2 (PAR2) displaying reduced sensitivity to trypsin and differential responses to PAR agonists. *J Biol Chem.* **275**: 39207-12.
- COPE, A.P. (2002). Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res.* **3**: 197-211.
- CORVERA, C.U., DERY, O., MCCONALOGUE, K., GAMP, P., THOMA, M., AL-ANI, B., CAUGHEY, G.H., HOLLENBERG, M.D., BUNNETT, N.W. (1999). Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J Physiol.* **517**: 741-56.
- COSTA, M., SHEN, Y., MEDCALF, R.L. (2000). Overexpression of a dominant negative CREB protein in HT-1080 cells selectively disrupts plasminogen activator inhibitor type 2 but not tissue-type plasminogen activator gene expression. *FEBS Lett.* **482**: 75-80.
- COUGHLIN, S.R., CAMERER, E. (2003). PARTICipation in inflammation. *J Clin Invest.* **111**: 25-7.
- DARNELL, J.E. JR. (1997). STATs and gene regulation. *Science.* **277**: 1630-5.
- DERY, O., BUNNETT, N.W. (1999a). PROTEINASE-ACTIVATED RECEPTORS: a growing family of heptahelical receptors for thrombin, trypsin and tryptase. *Biochem Soc Trans.* **127**: 246-54.
- DERY, O., CORVERA, C.U., STEINHOFF, M., BUNNETT, N.W. (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol.* **274**: C1429-52
- DERY, O., THOMA, M.S., WONG, H., GRADY, E.F., BUNNETT, N.W. (1999b). Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem.* **274**: 18524-35.
- DE WET, J.R., WOOD, K.V., DELUCA, M., HELINSKI, D.R., SUBRAMANI, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **7**: 725-37.
- DIGNAM, J.D., LBOVITZ, R.M., ROEDER, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475-89.
- DRÖGEMÜLLER, K. (1999). Charakterisierung des Gens für einen neuen humanen Serinproteinase-Inhibitor VAKTI. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hannover.

- DYNAN, W.S., TJIAN, R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature*. **316**: 774-8.
- EGELRUD, T., BRATTSAND, M., WALDEN, M., KREUTZMANN, P., MARX, U.C., VITZIHUM, K., MÜNCH, J., KIRCHHOFF, F., FORSSMANN, W.G., MÄGERT, H.J. (2003). The Multidomain Serine Proteinase Inhibitor LEKTI: Therapeutic Potential in Skin Diseases and HIV Infection. *Science*. (submitted).
- EHRET, G.B., REICHENBACH, P., SCHINDLER, U., HORVATH, C.M., FRITZ, S., NABHOLZ, M., BUCHNER, P. (2001). DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem*. **276**: 6675-88.
- EKHOLM, I.E., BRATTSAND, M., EGELRUD, T. (2000). Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol*. **114**: 56-63.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*. **109**: 129-35.
- FIEDLER, M.A., WERNKE-DOLLRIES, K., STARK, J.M. (1998). Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **19**: 259-68.
- FISHER, G.J., DATTA, S.C., TALWAR, H.S., WANG, Z.Q., VARANI, J., KANG, S., VOORHEES, J.J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. **379**: 335-9.
- FRECH, K., QUANDT, K., WERNER, T. (1998). Muscle actin genes: a first step towards computational classification of tissue specific promoters. *In Silico Biol*. **1**: 29-38.
- GACA, M.D., ZHOU, X., BENYON, R.C. (2002). Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol*. **36**: 362-9
- GALLUCCI, R.M., SIMEONOVA, P.P., MATHESON, J.M., KOMMINENI, C., GURIEL, J.L., SUGAWARA, T., LUSTER, M.I. (2000). Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J*. **14**: 2525-31.
- GHOSH, S. (1999). Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol Res*. **19**: 183-9.
- GHOSH, S., MAY, M.J., KOPP, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. **16**: 225-60.
- GOTOH, K., YOKOTA, H., KIKUYA, E., WATANABE, T., OISHI, M. (1998). Genomic structure of MUNC18-1 protein, which is involved in docking and fusion of synaptic vesicles in brain. *J Biol Chem*. **273**: 21642-7.
- GOULD, S.J., SUBRAMANI, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem*. **175**: 5-13.
- GRAND, R.J., TURNELL, A.S., GRABHAM, P.W. (1996). Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J*. **313**: 353-68.
- GROSSMAN, R.M., KRUEGER, J., YOURISH, D., GRANELLI-PIPERNO, A., MURPHY, D.P., MAY, L.T., KUPPER, T.S., SEHGAL, P.B., GOTTLIEB, A.B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**: 6367-71.
- GUARENTE, L. (1988). UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell*. **52**: 303-5.

- GUTKIND, J.S. (1998a). Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*. **17**: 1331-42.
- GUTKIND, J.S. (1998b). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*. **273**: 1839-42.
- HAI, T., HARTMAN, M.G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*. **273**: 1-11.
- HAN, Y.P., TUAN, T.L., WU, H., HUGHES, M., GARNER, W.L. (2000). TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*. **114**: 131-139.
- HANSSON, L., STROMQVIST, M., BACKMAN, A., WALLBRANDT, P., CARLSTEIN, A., EGELRUD, T. (1994). Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem*. **269**: 19420-6.
- HEATON, J.H., TILLMANN-BOGUSH, M., LEFF, N.S., GELEHRTER, T.D. (1998). Cyclic nucleotide regulation of type-1 plasminogen activator-inhibitor mRNA stability in rat hepatoma cells. Identification of cis-acting sequences. *J Biol Chem*. **273**: 14261-8.
- HEIM, M.H. (1999). THE JAK-STAT PATHWAY: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*. **19**: 75-120.
- HEINRICH, P.C., BEHRMANN, I., MULLER-NEWEN, G., SCHAPER, F., GRAEVE, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. **334**: 297-314.
- HEMMANN, U., GERHARTZ, C., HEESEL, B., SASSE, J., KURAPKAT, G., GROTZINGER, J., WOLLMER, A., ZHONG, Z., DARNELL, J.E. JR., GRAEVE, L., HEINRICH, P.C., HORN, F. (1996). Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem*. **271**: 12999-3007.
- HIRANO, F., TANAKA, H., HIRANO, Y., HIRAMOTO, M., HANDA, H., MAKINO, I., SCHEIDEREIT, C. (1998). Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol*. **18**: 1266-74.
- HOCHHEIMER, A., TJIAN, R. (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity ad tissue-specific gene expression. *Genes Dev*. **17**: 1309-20.
- HOFFMANN, A., LECHENKO, A., SCOTT, M.L., BALTIMORE, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. **298**: 1241-5.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R., GELFAND, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7276-7280.
- HOLLENBERG, M.D. (1999). Protease-activated receptors: PAR4 and counting: how long is the course? *Trends Pharmacol Sci*. **20**: 271-3.
- HOLLENBERG, M.D., COMPTON, S.J. (2002). International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. **54**: 203-17.
- HOLLENBERG, M.D., SAIFEDDINE, M., ZWIERS, H. (2000). Proteinase-activated receptors (PARs): activation of PAR1 and PAR2 by a proteolytic fragment of the neuronal growth associated protein B-50/GAP-43. *Can J Physiol Pharmacol*. **78**: 81-5.

- HOLLER, M., WESTIN, G., JIRICNY, J., SCHAFFNER, W. (1988). Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev.* **2**: 1127-35.
- HOU, L., KAPAS, S., CRUCHLEY, A.T., MACEY, M.G., HARRIOTT, P., CHINNI, C., STONE, S.R., HOWELLS, G.L., (1998). Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology.* **94**: 356-62.
- HOWELLS, G.L., MACEY, M.G., CHINNI, C., HOU, L., FOX, M.T., HARRIOTT, P., STONE, S.R. (1997). Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J Cell Sci.* **110**: 881-7.
- HU, X., JANSSEN, W.E., MOSCINSKI, L.C., BRYINGTON, M., DANGSUPA, A., REZAI-ZADEH, N., BABBIN, B.A., ZUCKERMAN, K.S. (2001). An IkappaBalpha inhibitor causes leukemia cell death through a p38 MAP kinase-dependent, NF-kappaB-independent mechanism. *Cancer Res.* **61**: 6290-6.
- HU, Y., BAUD, V., DELHASE, M., ZHANG, P., DEERINCK, T., ELLISMAN, M., JOHNSON, R., KARIN, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science.* **284**: 316-20.
- JAIN, J., BURGEON, E., BADALIAN, T.M., HOGAN, P.G., RAO, A. (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem.* **270**: 4138-45.
- JANOFF, A. (1985). Elastase in tissue injury. *Ann. Rev. Med.* **36**: 207-216.
- JOBIN, C., SARTOR, R.B. (2000). The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**: C451-62.
- JUDGE, M.R., MORGAN, G., HARPER, J.I. (1994). A clinical and immunological study of Netherton's syndrome. *Br J Dermatol.* **131**: 615-21.
- KADONAGA, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell.* **92**: 307-13.
- KAHN, M.L., NAKANISHI-MATSUI, M., SHAPIRO, M.J., ISHIHARA, H., COUGHLIN, S.R. (1999). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* **103**: 879-87.
- KALSHEKER, N., MORLEY, S., MORGAN, K. (2002). Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans.* **30**: 93-8.
- KANKE, T., MACFARLANE, S.R., SEATTER, M.J., DAVENPORT, E., PAUL, A., MCKENZIE, R.C., PLEVIN, R. (2001). Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem.* **276**: 31657-66.
- KANNAN-THULASIRAMAN, P., SHAPIRO, D.J. (2002). Modulators of inflammation use nuclear factor-kappa B and activator protein-1 sites to induce the caspase-1 and granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9. *J Biol Chem.* **277**: 41230-9.
- KATO, I., SCHRODE, J., KOHR, W.J., LASKOWSKI JR, M. (1987). Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry.* **26**: 193-201.
- KAUFMAN, C.K., FUCHS, E. (2000). It's got you covered. NF-kappaB in the epidermis. *J Cell Biol.* **149**: 999-1004.
- KAZAL, L.A., SPICER, D.S., BRAHINSKY, R.A. (1948). Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from the pancreas. *J. Am. Chem. Soc.* **70**: 3034-3040.

- KEIM, V., WITT, H., BAUER, N., BODEKER, H., ROSENDAHL, J., TEICH, N., MOSSNER, J. (2003). The course of genetically determined chronic pancreatitis. *JOP*. **4**: 146-54.
- KESSEL, M., GRUSS, P. (1990). Murine developmental control genes. *Science*. **249**: 374-9.
- KIM, H., BAUMANN, H. (1997). The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter. *J Biol Chem*. **272**: 14571-9.
- KIM, H., BAUMANN, H. (1999). Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol Cell Biol*. **19**: 5326-38.
- KLEMENT, J.F., RICE, N.R., CAR, B.D., ABBONDANZO, S.J., POWERS, G.D., BHATT, P.H., CHEN, C.H., ROSEN, C.A., STEWART, C.L. (1996). IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol*. **16**: 2341-9.
- KOLLMAR, R., FARNHAM, P.J. (1993). Site-specific initiation of transcription by RNA polymerase II. *Proc Soc Exp Biol Med*. **203**: 127.
- KOMATSU, N., TAKATA, M., OTSUKI, N., OHKA, R., AMANO, O., TAKEHARA, K., SAJOH, K. (2002). Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J Invest Dermatol*. **118**: 436-43.
- KOOLMAN, J., RÖHM, K.H. (1994). Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- KORDULA, T., RIPPERGER, J., MORELLA, K.M., TRAVIS, J., BAUMANN, H. (1996a). Two separate signal transducer and activator of transcription proteins regulate transcription of the serine proteinase inhibitor-3 gene in hepatic cells. *J Biol Chem*. **271**: 6752-7.
- KORDULA, T., TRAVIS, J. (1996b). The role of Stat and C/EBP transcription factors in the synergistic activation of rat serine protease inhibitor-3 gene by interleukin-6 and dexamethasone. *Biochem J*. **313**: 1019-27.
- KORDULA, T., BUGNO, M., RYDEL, R.E., TRAVIS, J. (2000). Mechanism of interleukin-1- and tumor necrosis factor alpha-dependent regulation of the alpha 1-antichymotrypsin gene in human astrocytes. *J Neurosci*. **20**: 7510-6.
- KORZUS, E., NAGASE, H., RYDELL, R., TRAVIS, J. (1997). The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem*. **272**: 1188-96.
- KOSHIKAWA, N., HASEGAWA, S., NAGASHIMA, Y., MITSUHASHI, K., TSUBOTA, Y., MIYATA, S., MIYAGI, Y., YASUMITSU, H., MIYAZAKI, K. (1998). Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, ad neurons in human and mouse. *Am J Pathol*. **153**: 937-44.
- KRAJEWSKA, W.M. (1992). Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem*. **24**: 1885-98.
- KREUTZMANN, P. (2000) Identifikation und Charakterisierung eines neuen humanen Multidomänen-Serinproteinase-Inhibitors (LEKTI). Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Hannover.
- LAMB, P., SEIDEL, H.M., HASLAM, J., MILOCCO, L., KESSLER, L.V., STEIN, R.B., ROSEN, J. (1995). STAT protein complexes activated by interferon-gamma and gp130 signaling molecules differ in their sequence preferences and transcriptional induction properties. *Nucleic Acids Res*. **23**: 3283-9.
- LANDER, E.S., LINTON, L.M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M.C., ET AL. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**: 860-921.

- LASKOWSKI JR, M., KATO, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 593-626.
- LATCHMAN, D. S. (1990). Eukaryotic transkription factors. *Biochem. J.* **270**: 281-289.
- LEE, L.G., CONNELL, C.R., BLOCH, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3761-3766.
- LEE, H.W., AHN, D.H., CRAWLEY, S.C., LI, J.D., GUM, J.R. JR., BASBAUM, C.B., FAN, N.Q., SZYMKOWSKI, D.E., HAN, S.Y., LEE, B.H., SLEISENGER, M.H., KIM, Y.S. (2002). 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via Ras, ERK, and NF-kappa B. *J Biol Chem.* **277**: 32624-31.
- LEE, D.K., CARRASCO, J., HIDALGO, J., ANDREWS, G.K. (1999). Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J.* **337**: 59-65.
- LEGRAND-POELS, S., SCHOONBROODT, S., PIETTE, J. (2000). Regulation of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines in a colon cancer cell line. *Biochem J.* **349**: 765-73.
- LEMON, B., TJIAN, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* **14**: 2551
- LENHARD, B., SANDELIN, A., MENDOZA, L., ENGSTROM, P., JAREBORG, N., WASSERMAN, W.W. (2003). Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J Biol.* **2**: 13.
- LEUNG, D., ABBENANTE, G., FAIRLIE, D.P. (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem.* **43**: 305-41.
- LI, Z.W., CHU, W., HU, Y., DELHASE, M., DEERINCK, T., ELLISMAN, M., JOHNSON, R., KARIN, M. (1999a). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med.* **189**: 1839-45.
- LI, X., LEUNG, S., QURESHI, S., DARNELL, J.E. JR., STARK, G.R. (1996). Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *J Biol Chem.* **271**: 5790-4.
- LI, Q., LU, Q., HWANG, J.Y., BUSCHER, D., LEE, K.F., IZPISUA-BELMONTE, J.C., VERMA, I.M. (1999b). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev.* **13**: 1322-8.
- LI, X., MASSA, P.E., HANIDU, A., PEET, G.W., ARO, P., SAVITT, A., MISCHKE, S., LI, J., MARCU, K.B. (2002). IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem.* **277**: 45129-40.
- LI, J., PEET, G.W., BALZARANO, D., LI, X., MASSA, P., BARTON, R.W., MARCU, K.B. (2001). Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem.* **276**: 18579-90.
- LIM, K., CHAE, C.B. (1989). A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for beta-galactosidase. *Biotechniques.* **7**: 576-9.
- Lindl, T. (2000). ZELL UND GEWEBEKULTUR. 4. ÜBERARBEITETE AUFLAGE, SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, HEIDELBERG, BERLIN.
- LO, K., LANDAU, N.R., SMALE, S.T. (1991). LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol Cell Biol.* **11**: 5229-43.

- LOURBAKOS, A., CHINNI, C., THOMPSON, P., POTEPA, J., TRAVIS, J., MACKIE, E.J., PIKE, R.N. (1998). Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Lett.* **435**: 45-8.
- LUGER, T.A. (2002). Neuromediators--a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci.* **30**: 87-93.
- LUNDIN BROCKDORFF, J., WOETMANN, A., MUSTELIN, T., KALTOFF, K., ZHANG, Q., WASIK, M.A., ROPKE, C., ODUM, N. (2002). SHP2 regulates IL-2 induced MAPK activation, but not Stat3 or Stat5 tyrosine phosphorylation, in cutaneous T cell lymphoma cells. *Cytokine.* **20**: 141-7.
- MACFARLANE, S.R., SEATTER, M.J., KANKE, T., HUNTER, G.D., PLEVIN, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* **53**: 245-82.
- MÄGERT, H.J., KREUTZMANN, P., DRÖGEMÜLLER, K., STÄNDKER, L., ADERMANN, K., WALDEN, M., JOHN, H., KORTING, H.C., FORSSMANN, W.G. (2002). The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role. *Eur J Med Res.* **7**: 49-56.
- MÄGERT, H.J., STÄNDKER, L., KREUTZMANN, P., ZUCHT, H.D., REINECKE, M., SOMMERHOFF, C.P., FRITZ, H., FORSSMANN, W.G. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* **274**: 21499-502.
- MANIATIS, T., GOODBOURN, S., FISCHER, J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science.* **236**: 1237-45.
- MANONI, M., PERGOLIZZI, R., LUZZANA, M., DE BELLIS, G. (1992). Dideoxy linear PCR on a commercial fluorescent automated DNA sequencer. *Biotechniques.* **12**: 48-50, 52-3.
- MARCHUK, D., DRUMM, M., SAULINO, A., COLLINS, F.S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1154.
- MARI, B., GUERIN, S., FAR, D.F., BREITMAYER, J.P., BELHACENE, N., PEYRON, J.F., ROSSI, B., AUBERGER, P. (1996). Thrombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J.* **10**: 309-16.
- MAST, B.A., SCHULZ, G.S. (1997). Interaktionen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen in akuten und chronischen Wunden. *HARTMANN Wundforum.* **3**: 16-24.
- MASUDA, E.S., NAITO, Y., TOKUMITSU, H., CAMPBELL, D., SAITO, F., HANNUM, C., ARAI, K., ARAI, N. (1995). NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol.* **15**: 2697-706.
- MATSUDA, I., MASUDA, E.S., TSUBOI, A., BEHNAM, S., ARAI, N., ARAI, K. (1994). Characterization of NF(P), the nuclear factor that interacts with the regulatory P sequence (5'-CGAAAATTTCC-3') of the human interleukin-4 gene: relationship to NF-kappa B and NF-AT. *Biochem Biophys Res Commun.* **199**: 439-46.
- MCCAFFREY, P.G., JAIN, J., JAMIESON, C., SEN, R., RAO, A. (1992). A T cell nuclear factor resembling NF-AT binds to an NF-kappa B site and to the conserved lymphokine promoter sequence "cytokine-1". *J Biol Chem.* **267**: 1864-71.
- MCKNIGHT, S.L., KINGSBURY, R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science.* **217**: 316-24.
- MIIKE, S., MCWILLIAM, A.S., KITA, H. (2001). Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol.* **167**: 6615-22.

- MIKI, M., NAKAMURA, Y., TAKAHASHI, A., NAKAYA, Y., EGUCHI, H., MASEGI, T., YONEDA, K., YASUOKA, S., SONE, S. (2003). Effect of human airway trypsin-like protease on intracellular free Ca²⁺ concentration in human bronchial epithelial cells. *J Med Invest.* **50**: 95-107.
- MITCHELL, P.J, TJIAN, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* **245**: 371-8.
- MÖRITZ, A., LILJA, H., FINK, E. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding the human acrosin-trypsin inhibitor (HUSI-II). *FEBS Lett.* **278**: 127-130.
- MOLINO, M., BARNATHAN, E.S., NUMEROF, R., CLARK, J., DREYER, M., CUMASHI, A., HOXIE, J.A., SCHECHTER, N., WOOLKALIS, M., BRASS, L.F. (1997). Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem.* **272**: 4043-9.
- MORGAN, K., MARSTERS, P., MORLEY, S., VAN GENT, D., HEJAZI, A., BACKX, M., THORPE, E.R., KALSHEKER, N. (2002). Oncostatin M induced alpha1-antitrypsin (AAT) gene expression in Hep G2 cells is mediated by a 3' enhancer. *Biochem J.* **365**: 555-60.
- MÜLLER, M.M., GERSTER, T., SCHAFFNER, W. (1988). Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur J Biochem.* **176**: 485-95.
- NABEL, G., BALTIMORE, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature.* **326**: 711-3.
- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. UND SATO, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**: 3858-3863.
- NAYERNIA, K., NIETER, S., KREMLING, H., OBERWINKLER, H., ENGEL, W. (1994). Functional and molecular characterization of the transcriptional regulatory region of the proacrosin gene. *J Biol Chem.* **269**: 32181-6.
- NIJNIK, A., MOTT, R., KWIATKOWSKI, D.P., UDALOVA, I.A. (2003). Comparing the fine specificity of DNA binding by NF-kappaB p50 and p52 using principal coordinates analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1497-501.
- NISHIMURA, A., MORITA, M., NISHIMURA, Y., SUGINO, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6169.
- NORDEEN, S.K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques.* **6**: 454-8.
- NOURBAKHS, M., HAUSER, H. (1999). Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB. *EMBO J.* **18**: 6415-25.
- NUSSINOV, R. (1992). The eukaryotic CCAAT and TATA boxes, DNA spacer flexibility and looping. *J Theor Biol.* **155**: 243-70.
- NYSTEDT, S., EMILSSON, K., LARSSON, A.K., STROMBECK, B., SUNDELIN, J. (1995). Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor2. *Eur J Biochem.* **232**: 84-9.
- OGBOURNE, S.M., ANTALIS, T.M. (2001). Characterisation of PAUSE-1, a powerful silencer in the human plasminogen activator inhibitor type 2 gene promoter. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3919-27.
- OGBOURNE, S. M., ANTALIS, T.M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J.* **331**: 1-14.

- ORPHANIDES, G., LAGRANGE, T., REINBERG, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**: 2657-83.
- PAUL, C., SIMAR-BLANCHET, A.E., RO, H.S., LE CAM, A. (1998). Characterization of three transcriptional repressor sites within the 3'untranslated region of the rat serine protease inhibitor 2.3 gene. *Eur J Biochem.* **254**: 538-46.
- PTASHNE, M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature.* **322**: 697-701.
- PAXTON, L.L., LI, L.J., SECOR, V., DUFF, J.L., NAIK, S.M., SHIBAGAKI, N., CAUGHAM, S.W. (1997). Flanking sequences for the human intercellular adhesion molecule-1 NF-kappaB response element are necessary for tumor necrosis factor alpha-induced gene expression. *J Biol Chem.* **272**: 15928-35.
- PERLMUTTER, D.H. (1991). The cellular basis for liver injury in α_1 -antitrypsin deficiency. *Hepatology.* **13**: 172-185.
- PFUNDT, R., VAN RUISSSEN, F., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I.M., ALKEMADE, H.A., ZEEUWEN, P.L., JAP, P.H., DIJKMAN, H., FRANSEN, J., CROES, H., VAN ERP, P.E., SCHALKWIJK, J. (1996). Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J. Clin. Invest.* **98**: 1389-1399.
- PIERCE, J.W., SCHOENLEBER, R., JESMOK, G., BEST, J., MOORE, S.A., COLLINS, T., GERRITSEN, M.E. (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem.* **272**: 21096-103.
- PIMENTEL, D.R., MICHALANY, N., MORGADO DE ABREU, M.A., PETLIK, B., MOTA DE AVELAR ALCHORNE, M. (2003). Granular parakeratosis in children: case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol.* **20**: 215-20.
- QIN, J.Z., CHATURVEDI, V., DENNING, M.F., CHOUBEY, D., DIAZ, M.O., NICKOLOFF, B.J. (1999). Role of NF-kappaB in the apoptotic-resistant phenotype of keratinocytes. *J Biol Chem.* **274**: 37957-64.
- QUANDT, K., FRECH, K., KARAS, H., WINGENDER, E., WERNER, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4878-84.
- RAO, A., LUO, C., HOGAN, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* **15**: 707-47.
- RENARD, P., ERNEST, I., HOUBION, A., ART, M., LE CALVEZ, H., RAES, M., REMACLE, J. (2001). Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res.* **29**: E21.
- RESNIK, K.S., DILEONARDO, M. (2003). Follicular granular parakeratosis. *Am J Dermatopathol.* **25** 428-9.
- ROS, J.E., SCHUETZ, J.D., GEUKEN, M., STREETZ, K., MOSHAGE, H., KUIPERS, F., MANNS, M.P., JANSEN, P.L., TRAUTWEIN, C., MÜLLER, M. (2001). Induction of Mdr1b expression by tumor necrosis factor-alpha in rat liver cells is independent of p53 but requires NF-kappaB signaling. *Hepatology.* **33**: 1425-31.
- ROBERTS, R.M., MATHIALAGAN, N., DUFFY, J.Y., SMITH, G.W. (1995). Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **5**: 385-436.
- RUMINY, P., GANGNEUX, C., CLAEYSSSENS, S., SCOTTE, M., DAVEAU, M., SALIER, J.P. (2001). Gene transcription in hepatocytes during the acute phase of a systemic inflammation: from transcription factors to target genes. *Inflamm Res.* **50**: 383-90.

- RUSSELL, C.S., CLARKE, L.A. (1999). Recombinant proteins for genetic disease. *Clin Genet.* **55**: 389-94.
- SACCANI, S., PANTANO, S., NATOLI, G. (2001). Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med.* **193**: 1351-9.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**: 1350-1354.
- SALLENAVE, M. (2000). The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. *Respir Res* **1**: 87-92.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, I., FRITSCH, E.F. (1989). Molecular Cloning - A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- SAWADA, K., NISHIBORI, M., NAKAYA, N., WANG, Z., SAEKI, K. (2000). Purification and characterization of a trypsin-like serine proteinase from rat brain slices that degrades laminin and type IV collagen and stimulates protease-activated receptor-2. *J Neurochem.* **74**: 1731-8.
- SAWAMURA, D., MENG, X., INA, S., SATO, M., TAMAI, K., HANADA, K., HASHIMOTO, I. (1998). Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes. *J Immunol.* **161**: 5633-9.
- SCHECHTER, N.M., BRASS, L.F., LAVKER, R.M., JENSEN, P.J. (1998). Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol.* **176**: 365-73.
- SCHILD, T.A. (1996). Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. Perkin Elmer ABI-Handbuch. Version 2.1: 20-27.
- SCHMIDT-ULLRICH, R., AEBISCHER, T., HULSKEN, J., BIRCHMEIER, W., KLEMM, U., SCHEIDEREIT, C. (2001). Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development.* **128**: 3843-53.
- SEIDEL, H.M., MILOCCO, L.H., LAMB, P., DARNELL, J.E. JR., STEIN, R.B., ROSEN, J. (1995). Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3041-5.
- SEIFE, C. (1997). Blunting nature's swiss army knife. *Science* **277**: 1602-1603.
- SEITZ, C.S., FREIBERG, R.A., HINATA, K., KHAVARI, P.A. (2000). NF-kappaB determines localization and features of cell death in epidermis. *J Clin Invest.* **105**: 253-60.
- SEN, R., BALTIMORE, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* **47**: 921-8
- SERVIDEI, T., AOKI, Y., LEWIS, S.E., SYMES, A., FINK, J.S., REEVES, S.A. (1998). Coordinate regulation of STAT signaling and c-fos expression by the tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem.* **273**: 6233-41.
- SHAPIRO, M.J., WEISS, E.J., FARUQI, T.R., COUGHLIN, S.R. (2000). Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem.* **275**: 25216-21.

- SHAW, J.P., UTZ, P.J., DURAND, D.B., TOOLE, J.J., EMMEL, E.A., CRABTREE, G.R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*. **241**: 202-5.
- SHEN, Z., PEEDIKAYIL, J., OLSON, G.K., SIEBERT, P.D, FANG, Y. (2002). Multiple transcription factor profiling by enzyme-linked immunoassay. *Biotechniques*. **32**: 1168, 1170-2.
- SHPACOVITCH, V.M., BRZOSKA, T., BUDDENKOTTE, J., STROH, C., SOMMERHOFF, C.P., ANSEL, J.C., SCHULZE-OSTHOFF, K., BUNNETT, N.W., LUGER, T.A., STEINHOFF, M. (2002). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappaB in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*. **118**: 380-5.
- SICA, A., DORMAN, L., VIGGIANO, V., CIPPITELLI, M., GHOSH, P., RICE, N., YOUNG, H.A. (1997). Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem*. **272**: 30412-20.
- SMALE, S.T. (2001). CORE PROMOTERS: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev*. **15**: 2503-8.
- SMALE, S.T., BALTIMORE, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell*. **57**: 103-13.
- SMITH, R., JENKINS, A., LOURBAKOS, A., THOMPSON, P., RAMAKRISHNAN, V., TOMLINSON, J., DESHPANDE, U., JOHNSON, D.A., JONES, R., MACKIE, E.J., PIKE, R.N. (2000). Evidence for the activation of PAR-2 by the sperm protease, acrosin: expression of the receptor on oocytes. *FEBS Lett*. **484**: 285-90.
- SOUTHAN C. (2000). Assessing the protease and protease inhibitor content of the human genome. *J Pept Sci*. **6**(9): 453-8.
- SPRECHER, E., CHAVANAS, S., DIGIOVANNA, J.J., AMIN, S., NIELSEN, K., PRENDIVILLE, J.S., SILVERMAN, R., ESTERLY, N.B., SPRAKER, M.K., GUELG, E., DE LUNA, M.L., WILLIAMS, M.L., BUEHLER, B., SIEGFRIED, E.C., VAN MALDERGEM, L, PFENDNER, E., BALE, S.J., UITTO, J., HOVNANIAN, A., RICHARD, G. (2001). The spectrum of pathogenic mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *J Invest Dermatol*. **117**: 179-87.
- STEINHOFF, M., CORVERA, C.U., THOMA, M.S., KONG, W., MCALPINE, B.E., CAUGHEY, G.H., ANSEL, J.C., BUNNETT, N.W. (1999). Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol*. **8**: 282-94.
- STEINHOFF, M., NEISIUS, U., IKOMA, A., FARTASCH, M., HEYER, G., SKOV, P.S., LUGER, T.A., SCHMELZ, M. (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* **23**: 6176-80.
- STEINHOFF, M., VERGNOLLE, N., YOUNG, S.H., TOGNETTO, M., AMADESI, S., ENNES, H.S., TREVISANI, M., HOLLENBERG, M.D., WALLACE, J.L., CAUGHEY, G.H., MITCHELL, S.E., WILLIAMS, L.M., GEPPETTI, P., MAYER, E.A., BUNNETT, N.W. (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med*. **6**: 151-8.
- STEUBE, K., KUNZ, D. (1988). Struktur und Funktion menschlicher Proteinase-Inhibitoren. *Biologie in unserer Zeit* 18. Jahrg. **3**: 71-76.
- STRYER, L. (1999). Biochemie. Nachdruck der völlig neubearb. Aufl. 1990. Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, New York.
- SUGAWARA, T., GALLUCCI, R.M., SIMEONOVA, P.P., LUSTER, M.I. (2001). Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine*. **15**: 328-36.

- SUN, G., STACEY, M.A., SCHMIDT, M., MORI, L., MATTOLI, S. (2001). Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol.* **167**: 1014-21.
- TAK, P.P., FIRESTEIN, G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* **107**: 7-11.
- TAKEUCHI, T., HARRIS, J.L., HUANG, W., YAN, K.W., COUGHLIN, S.R., CRAIK, C.S. (2000). Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem.* **275**: 26333-42.
- THOMPSON, A.A., WOOD, W.J. JR., GILLY, M.J., DAMORE, M.A., OMORI, S.A., WALL, R. (1996). The promoter and 5' flanking sequences controlling human B29 gene expression. *Blood.* **87**: 666-73.
- TIAN, B., BRASIER, A.R. (2003). Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res.* **58**: 95-130.
- TJIAN, R., MANIATIS, T. (1994). Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**: 5-8.
- TURKSEN, K., KUPPER, T., DEGENSTEIN, L., WILLIAMS, I., FUCHS, E. (1992). Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 5068-72.
- TYLER, J.K., KADONAGA, J.T. (1999). The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell.* **99**:443-6.
- UDALOVA, I.A., MOTT, R., FIELD, D., KWIATKOWSKI, D. (2002). Quantitative prediction of NF-kappa B DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 8167-72.
- UEHARA, A., SUGAWARA, S., MURAMOTO, K., TAKADA, H. (2002). Activation of human oral epithelial cells by neutrophil proteinase 3 through protease-activated receptor-2. *J Immunol.* **169**: 4594-603.
- VALLEJO, M., RON, D., MILLER, C.P., HABENER, J.F. (1993). C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 4679-83.
- VENTER, J.C., ADAMS, M.D., MYERS, E.W. ET AL. (2001). The sequence of the human genome. *Science.* **291**: 1304-51.
- VERGNOLLE, N., WALLACE, J.L., BUNNETT, N.W., HOLLENBERG, M.D. (2001). Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci.* **22**: 146-52.
- VERMA, I.M., SOMIA, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature.* **389**: 239-42.
- VEMURI, S., YU, C.T., ROOSDORP, N. (1993). Formulation and stability of recombinant alpha 1-antitrypsin. *Pharm. Biotechnol.* **5**: 263-286.
- VLIAGOFTIS, H., SCHWINGSHACKL, A., MILNE, C.D., DUSZYK, M., HOLLENBERG, M.D., WALLACE, J.L., BEFUS, A.D., MOQBEL, R. (2000). Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* **106**: 537-45.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- VU, T.K., HUNG, D.T, WHEATON, V.I, COUGHLIN, S.R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* **64**: 1057-68.

- WAKITA, H., FURUKAWA, F., TAKIGAWA, M. (1997). Thrombin and trypsin induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc Assoc Am Physicians*. **109**: 190-207.
- WALDEN, M., KREUTZMANN, P., DRÖGEMÜLLER, K., JOHN, H., FORSSMANN, W.G., MÄGERT, H.J. (2002). Biochemical features, molecular biology and clinical relevance of the human 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI. *Biol Chem*. **383**(7-8): 1139-41.
- WALLEY, A.J., CHAVANAS, S., MOFFATT, M.F., ESNOUF, R.M., UBHI, B., LAWRENCE, R., WONG, K., ABECASIS, G.R., JONES, E.Y., HOVNANIAN, A., COOKSON, W.O. (2001). Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet*. **29**: 175-8.
- WALLRAPP, C., HAHNEL, S., MÜLLER-PILLASCH, F., BURGHARDT, B., IWAMURA, T., RUTHENBURGER, M., LERCH M.M., ADLER, G., GRESS, T.M. (2000). A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. *Cancer Res*. **60**: 2602-6.
- WEGENKA, U.M., BUSCHMANN, J., LUTTICKEN, C., HEINRICH, P.C., HORN, F. (1993). Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*. **13**: 276-88.
- WEGENKA, U.M., LUTTICKEN, C., BUSCHMANN, J., YUAN, J., LOTTSPREICH, F., MULLER-ESTERL, W., SCHINDLER, C., ROEB, E., HEINRICH, P.C., HORN, F. (1994). The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. *Mol Cell Biol*. **14**: 3186-96.
- WINGENDER, E., CHEN, X., HEHL, R., KARAS, H., LIEBICH, I., MATYS, V., MEINHARDT, T., PRUSS, M., REUTER, I. SCHACHERER, F. (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*. **28**: 316-9.
- WITT, H., LUCK, W., HENNIES, H.C., CLASSEN, M., KAGE, A., LASS, U., LANDT, O., BECKER, M. (2000). Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet*. **25**: 213-6.
- YAMASHIRO, K., TSURUOKA, N., KODAMA, S., TSUJIMOTO, M., YAMAMURA, Y., TANAKA, T., NAKAZATO, H., YAMAGUCHI, N. (1997). Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim Biophys Acta*. **1350**: 11-4.
- YASUDA, T., OGAWA, M., MURATA, A., OHMACHI, Y., YASUDA, T., MORI, T., MATSUBARA, K. (1993). Identification of the IL-6-responsive element in an acute-phase-responsive human pancreatic secretory trypsin inhibitor-encoding gene. *Gene*. **131**: 275-80.
- YE, R.D. (2001). Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *J Leukoc Biol*. **70**: 839-48.
- YU, Z., AHMAD, S., SCHWARTZ, J.L., BANVILLE, D., SHEN, S.H. (1997). Protein-tyrosine phosphatase SHP2 is positively linked to proteinase-activated receptor 2-mediated mitogenic pathway. *J Biol Chem*. **272**: 7519-24.
- ZHANG, X., DARNELL, J.E. JR. (2001). Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem*. **276**: 33576-81.
- ZHANG, Z., JONES, S., HAGOOD, J.S., FUENTES, N.L., FULLER, G.M. (1997a). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem*. **272**(49): 30607-10.
- ZHANG, Z., FULLER, G.M. (1997b). The competitive binding of STAT3 and NF-kappaB on an overlapping DNA binding site. *Biochem Biophys Res Commun*. **237**(1): 90-4.

- ZHANG, D., SUN, M., SAMOLS, D., KUSHNER, I. (1996). STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem.* **271**: 9503-9.
- ZHAO, J., ARAKI, N., NISHIMOTO, S.K. (1995). Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* **155**: 159-165.
- ZHONG, Z., WEN, Z., DARNELL, J.E. JR. (1994). STAT3 AND STAT4: MEMBERS OF THE FAMILY OF SIGNAL TRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION. *PROC NATL ACAD SCI U S A.* **91**: 4806-10.

* 4.Domäne													#						
C	K	E	Y	E	K	Q	V	R	N	G	R	L	F	C	T	R	E	S	D
TGC	AAG	GAA	TAT	GAA	AAA	CAA	GTG	AGA	AAT	GGA	AGG	CTT	TTT	TGT	ACA	CGG	GAG	AGT	GAT
		724			733			742			751			760			769		
#													*						
P	V	R	G	P	D	G	R	M	H	G	N	K	C	A	L	C	A	E	I
CCA	GTC	CGT	GGC	CCT	GAC	GGC	AGG	ATG	CAT	GGC	AAC	AAA	TGT	GCC	CTG	TGT	GCT	GAA	ATT
		784			793			802			811			820			829		
F	K	R	R	F	S	E	E	N	S	K	T	D	Q	N	L	G	K	A	E
TTC	AAG	CGG	CGT	TTT	TCA	GAG	GAA	AAC	AGT	AAA	ACA	GAT	CAA	AAT	TTG	GGA	AAA	GCT	GAA
		844			853			862			871			880			889		
#													* 5.Domäne						
E	K	T	K	V	K	R	E	I	V	K	L	C	S	Q	Y	Q	N	Q	A
GAA	AAA	ACT	AAA	GTT	AAA	AGA	GAA	ATT	GTG	AAA	CTC	TGC	AGT	CAA	TAT	CAA	AAT	CAG	GCA
		904			913			922			931			940			949		
#													#						
K	N	G	I	L	F	C	T	R	E	N	D	P	I	R	G	P	D	G	K
AAG	AAT	GGA	ATA	CTT	TTC	TGT	ACC	AGA	GAA	AAT	GAC	CCT	ATT	CGT	GGT	CCA	GAT	GGG	AAA
		964			973			982			991			1000			1009		
#													*						
M	H	G	N	L	C	S	M	C	Q	V	Y	F	Q	A	E	N	E	E	K
ATG	CAT	GGC	AAC	TTG	TGT	TCC	ATG	TGT	CAA	GTC	TAC	TTC	CAA	GCA	GAA	AAT	GAA	GAA	AAG
		1024			1033			1042			1051			1060			1069		
#													--> HF7665						
K	K	A	E	A	R	A	R	N	K	R	E	S	G	K	A	T	S	Y	A
AAA	AAG	GCT	GAA	GCA	CGA	GCT	AGA	AAC	AAA	AGA	GAA	TCT	GGA	AAA	GCA	ACC	TCA	TAT	GCA
		1084			1093			1102			1111			1120			1129		
#													* 6.Domäne						
E	L	C	N	E	Y	R	K	L	V	R	N	G	K	L	A	C	T	R	E
GAG	CTT	TGC	AAT	GAA	TAT	CGA	AAG	CTT	GTG	AGG	AAC	GGA	AAA	CTT	GCT	TGC	ACC	AGA	GAG
		1144			1153			1162			1171			1180			1189		
#													#						
N	D	P	I	Q	G	P	D	G	K	V	H	G	N	T	C	S	M	C	E
AAC	GAT	CCT	ATC	CAG	GGC	CCA	GAT	GGG	AAA	GTG	CAC	GGC	AAC	ACC	TGC	TCC	ATG	TGT	GAG
		1204			1213			1222			1231			1240			1249		
#													HF7665 <--						
V	F	F	Q	A	E	E	E	E	K	K	K	K	E	G	E	S	R	N	K
GTC	TTC	TTC	CAA	GCA	GAA	GAA	GAA	GAA	AAG	AAA	AAG	AAG	GAA	GGC	GAA	TCA	AGA	AAC	AAA
		1264			1273			1282			1291			1300			1309		
#													* 7.Domäne						
R	Q	S	K	S	T	A	S	F	E	E	L	C	S	E	Y	R	K	S	R
AGA	CAA	TCT	AAG	AGT	ACA	GCT	TCC	TTT	GAG	GAG	TTG	TGT	AGT	GAA	TAC	CGC	AAA	TCC	AGG
		1324			1333			1342			1351			1360			1369		
#													#						
K	N	G	R	L	F	C	T	R	E	N	D	P	I	Q	G	P	D	G	K
AAA	AAC	GGA	CGG	CTT	TTT	TGC	ACC	AGA	GAG	AAT	GAC	CCC	ATC	CAG	GGC	CCA	GAT	GGG	AAA
		1384			1393			1402			1411			1420			1429		
#													*						
M	H	G	N	T	C	S	M	C	E	A	F	F	Q	Q	E	E	R	A	R
ATG	CAT	GGC	AAC	ACC	TGC	TCC	ATG	TGT	GAG	GCC	TTC	TTT	CAA	CAA	GAA	GAA	AGA	GCA	AGA
		1444			1453			1462			1471			1480			1489		
#													* 8.Domäne						
A	K	A	K	R	E	A	A	K	E	I	C	S	E	F	R	D	Q	V	R
GCA	AAG	GCT	AAA	AGA	GAA	GCT	GCA	AAG	GAA	ATC	TGC	AGT	GAA	TTT	CGG	GAC	CAA	GTG	AGG
		1504			1513			1522			1531			1540			1549		
#													#						
N	G	T	L	I	C	T	R	E	H	N	P	V	R	G	P	D	G	K	M
AAT	GGA	ACA	CTT	ATA	TGC	ACC	AGG	GAG	CAT	AAT	CCT	GTC	CGT	GGA	CCA	GAT	GGC	AAA	ATG
		1564			1573			1582			1591			1600			1609		
#													*						
H	G	N	K	C	A	M	C	A	S	V	F	K	L	E	E	E	E	K	K
CAT	GGA	AAC	AAG	TGT	GCC	ATG	TGT	GCC	AGT	GTG	TTC	AAA	CTT	GAA	GAA	GAA	GAG	AAG	AAA
		1624			1633			1642			1651			1660			1669		

N	D	K	E	E	K	G	K	V	E	A	E	K	V	K	R	E	A	V	Q
AAT	GAT	AAA	GAA	GAA	AAA	GGG	AAA	GTT	GAG	GCT	GAA	AAA	GTT	AAG	AGA	GAA	GCA	GTT	CAG
		1684			1693			1702			1711			1720				1729	
* 9.Domäne #																			
E	L	C	S	E	Y	R	H	Y	V	R	N	G	R	L	P	C	T	R	E
GAG	CTG	TGC	AGT	GAA	TAT	CGT	CAT	TAT	GTG	AGG	AAT	GGA	CGA	CTC	CCC	TGT	ACC	AGA	GAG
		1744			1753			1762			1771			1780				1789	
# *																			
N	D	P	I	E	G	L	D	G	K	I	H	G	N	T	C	S	M	C	E
AAT	GAT	CCT	ATT	GAG	GGT	CTA	GAT	GGG	AAA	ATC	CAC	GGC	AAC	ACC	TGC	TCC	ATG	TGT	GAA
		1804			1813			1822			1831			1840				1849	
A	F	F	Q	Q	E	A	K	E	K	E	R	A	E	P	R	A	K	V	K
GCC	TTC	TTC	CAG	CAA	GAA	GCA	AAA	GAA	AAA	GAA	AGA	GCT	GAA	CCC	AGA	GCA	AAA	GTC	AAA
		1864			1873			1882			1891			1900				1909	
* 10.Domäne #																			
R	E	A	E	K	E	T	C	D	E	F	R	R	L	L	Q	N	G	K	L
AGA	GAA	GCT	GAA	AAG	GAG	ACA	TGC	GAT	GAA	TTT	CGG	AGA	CTT	TTG	CAA	AAT	GGA	AAA	CTT
		1924			1933			1942			1951			1960				1969	
# *																			
F	C	T	R	E	N	D	P	V	R	G	P	D	G	K	T	H	G	N	K
TTC	TGC	ACA	AGA	GAA	AAT	GAT	CCT	GTG	CGT	GGC	CCA	GAT	GGC	AAG	ACC	CAT	GGC	AAC	AAG
		1984			1993			2002			2011			2020				2029	
# *																			
C	A	M	C	K	A	V	F	Q	K	E	N	E	E	R	K	R	K	E	E
TGT	GCC	ATG	TGT	AAG	GCA	GTC	TTC	CAG	AAA	GAA	AAT	GAG	GAA	AGA	AAG	AGG	AAA	GAA	GAG
		2044			2053			2062			2071			2080				2089	
E	D	Q	R	N	A	A	G	H	G	S	S	G	G	G	G	G	N	T	Q
GAA	GAT	CAG	AGA	AAT	GCT	GCA	GGA	CAT	GGT	TCC	AGT	GGT	GGT	GGA	GGA	GGA	AAC	ACT	CAG
		2104			2113			2122			2131			2140				2149	
* 11.Domäne #																			
D	E	C	A	E	Y	Q	E	Q	M	K	N	G	R	L	S	C	T	R	E
GAC	GAA	TGT	GCT	GAG	TAT	CAG	GAA	CAA	ATG	AAA	AAT	GGA	AGA	CTC	AGC	TGT	ACT	CGG	GAG
		2164			2173			2182			2191			2200				2209	
# *																			
S	D	P	V	R	D	A	D	G	K	S	Y	N	N	Q	C	T	M	C	K
AGT	GAT	CCT	GTA	CGT	GAT	GCT	GAT	GGC	AAA	TCG	TAC	AAC	AAT	CAG	TGT	ACC	ATG	TGT	AAA
		2224			2233			2242			2251			2260				2269	
A	K	L	E	R	E	A	E	R	K	N	E	Y	S	R	S	R	S	N	G
GCA	AAA	TTG	GAA	AGA	GAA	GCA	GAG	AGA	AAA	AAT	GAG	TAT	TCT	CGC	TCC	AGA	TCA	AAT	GGG
		2284			2293			2302			2311			2320				2329	
* 12.Domäne #																			
T	G	S	E	S	G	K	D	T	C	D	E	F	R	S	Q	M	K	N	G
ACT	GGA	TCA	GAA	TCA	GGG	AAG	GAT	ACA	TGT	GAT	GAG	TTT	AGA	AGC	CAA	ATG	AAA	AAT	GGA
		2344			2353			2362			2371			2380				2389	
# *																			
K	L	I	C	T	R	E	S	D	P	V	R	G	P	D	G	K	T	H	G
AAA	CTT	ATC	TGC	ACT	CGA	GAA	AGT	GAC	CCT	GTC	CGG	GGT	CCA	GAT	GGC	AAG	ACA	CAT	GGT
		2404			2413			2422			2431			2440				2449	
# *																			
N	K	C	T	M	C	K	E	K	L	E	R	E	A	A	E	K	K	K	K
AAT	AAG	TGT	ACT	ATG	TGT	AAG	GAA	AAA	CTG	GAA	AGG	GAA	GCA	GCT	GAA	AAA	AAA	AAG	AAA
		2464			2473			2482			2491			2500				2509	
E	D	E	D	R	S	N	T	G	E	R	S	N	T	G	E	R	S	N	D
GAG	GAT	GAA	GAC	AGG	AGC	AAT	ACA	GGA	GAA	AGG	AGC	AAT	ACA	GGA	GAA	AGG	AGC	AAT	GAC
		2524			2533			2542			2551			2560				2569	
* 13.Domäne #																			
K	E	D	L	C	R	E	F	R	S	M	Q	R	N	G	K	L	I	C	T
AAA	GAG	GAT	CTG	TGT	CGT	GAA	TTT	CGA	AGC	ATG	CAG	AGA	AAT	GGA	AAG	CTT	ATC	TGC	ACC
		2584			2593			2602			2611			2620				2629	
# *																			
R	E	N	N	P	V	R	G	P	Y	G	K	M	H	I	N	K	C	A	M
AGA	GAA	AAT	AAC	CCT	GTT	CGA	GGC	CCA	TAT	GGC	AAG	ATG	CAC	ATC	AAT	AAA	TGT	GCT	ATG
		2644			2653			2662			2671			2680				2689	

*

C Q S I F D R E A N E R K K K D E E K S
 TGT CAG AGC ATC TTT GAT CGA GAA GCT AAT GAA AGA AAA AAG AAA GAT GAA GAG AAA TCA
 2704 2713 2722 2731 2740 2749

* 14.Domäne

S S K P S N N A K D E C S E F R N Y I R
 AGT AGC AAG CCC TCA AAT AAT GCA AAG GAT GAG TGC AGT GAA TTT CGA AAC TAT ATA AGG
 2764 2773 2782 2791 2800 2809

#

N N E L I C P R E N D P V H G A D G K F
 AAC AAT GAA CTC ATC TGC CCT AGA GAG AAT GAC CCA GTG CAC GGT GCT GAT GGA AAG TTC
 2824 2833 2842 2851 2860 2869

#

*

Y T N K C Y M C R A V F L T E A L E R A
 TAT ACA AAC AAG TGC TAC ATG TGC AGA GCT GTC TTT CTA ACA GAA GCT TTG GAA AGG GCA
 2884 2893 2902 2911 2920 2929

K L Q E K P S H V R A S Q E E D S P D S
 AAG CTT CAA GAA AAG CCA TCC CAT GTT AGA GCT TCT CAA GAG GAA GAC AGC CCA GAC TCT
 2944 2953 2962 2971 2980 2989

* 15.Domäne Typische Kazal-Domäne

F S S L D S E M C K D Y R V L P R I G Y
 TTC AGT TCT CTG GAT TCT GAG ATG TGC AAA GAC TAC CGA GTA TTG CCC AGG ATA GGC TAT
 3004 3013 3022 3031 3040 3049

#

+

!

L C P K D L K P V C G D D G Q T Y N N P
 CTT TGT CCA AAG GAT TTA AAG CCT GTC TGT GGT GAC GAT GGC CAA ACC TAC AAC AAT CCT
 3064 3073 3082 3091 3100 3109

#

*

C M L C H E N L I R Q T N T H I R S T G
 TGC ATG CTC TGT CAT GAA AAC CTG ATA CGC CAA ACA AAT ACA CAC ATC CGC AGT ACA GGG
 3124 3133 3142 3151 3160 3169

+

K C E E S S T P G T T A A S M P P S D E
 AAG TGT GAG GAG AGC AGC ACC CCA GGA ACC ACC GCA GCC AGC ATG CCC CCG TCT GAC GAA
 3184 3193 3202 3211 3220 3229

TGA CAG GAA GAT TGT TGA AAG CCA TGA GGG AAA AAA TAA ACC CCA GTT CTG AAT CAC CTA
 3244 3253 3262 3271 3280 3289

CCT TCA CCA TCT GTA TAT ACA AAG AAT TCT TCG GAG CTT GTC TTA TTT GCT ATA GAA AAC
 3304 3313 3322 3331 3340 3349

AAT ACA GAG CTT TTG GGA ATG GAA TCA CTG ATT TTC AGT CTT TTC CAT TTC TTT CCT CCT
 3364 3373 3382 3391 3400 3409

AGA ATC TGT GAT CTG AGG GTA TAA AGA CAT TTC CAC CAA GTT TGA GCC CTC AAA ATG TCC
 3424 3433 3442 3451 3460 3469

Polyadenylierungssignal

TGA TTA CAA TGC TGT CTG TCC AAC TGC CTG TTC AAT AAA AGT AAA CTC AGC AGA.Poly(A) 3'
 3484 3493 3502 3511 3520 3529

Abbildung 7.1:

Die Positionen der Hämofiltratpeptide HF 6478 und HF 7665 sind markiert. Die Kazal-Typ ähnlichen Domänen (4 Cysteine) und die typischen Kazal-Domänen sind überstrichen. Die erwarteten (und für HF7665 bekannten) Cystein-Verbrückungen sind durch Markierung mit jeweils gleichen Zeichen gezeigt. Das konservierte Tyrosin (Y) innerhalb der Kazal-Typ Domänen ist durch ein Ausrufungszeichen markiert. Das Polyadenylierungssignal ist doppelt unterstrichen gekennzeichnet. Die Größe der cDNA ohne Poly(A)-Schwanz umfaßt 3528 Bp. und codiert für ein 1064 Aminosäuren langes Protein (KREUTZMANN, 2001).

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert für die stets engagierte, kompetente und freundschaftliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke dem wissenschaftlichen Leiter der IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH), Herrn Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann, ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Übernahme des Referates danken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Annette Busmann, Herrn Dr. Peter Kreutzmann, Herrn PD Dr. Erik Maronde und Herrn Dr. Dirk Motzkus für die zahlreichen Diskussionen, Ideen und Hilfestellungen, die den Verlauf meiner Arbeit oft maßgeblich beeinflusst haben.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, insbesondere bei Rainer Schreeb, Melanie Klingenberg und Veronika Sürig möchte ich mich für die wertvollen praktischen Hilfestellungen im Laboralltag und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ich danke auch allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern innerhalb und außerhalb des Niedersächsischen Instituts für Peptid-Forschung (IPF) GmbH, die mir bei der Bearbeitung des Themas Hilfe gewährten.

Für die Unterstützung während der vergangenen Zeit möchte ich Martin, Uwe, Heinz, Miri, Michael, Birte, Anna, Svenny, Virgi, Alf, Edu, Nolle, dem LM-Coach und ganz besonders Lothar für seine unendliche Geduld danken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht haben und die mir während der Erstellung dieser Arbeit in vielfältiger Weise zur Seite standen.

Publikationsliste

Publizierte Originalarbeiten:

WALDEN, M., KREUTZMANN, P., **DRÖGEMÜLLER, K.**, JOHN, H., FORSSMANN, WG. (2002). Biochemical features, molecular biology ad clinical relevance of the human 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI. *Biol Chem.* **383**: 1139-41.

MÄGERT HJ, KREUTZMANN P, **DRÖGEMÜLLER K.**, STÄNDKER L, ADERMANN K, WALDEN M, JOHN H, KORTING HC, FORSSMANN WG. (2002). The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: Biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role. *Eur J Med Res.* **7**: 49-56.

MÄGERT, H.J., KREUTZMANN, P., **DRÖGEMÜLLER, K.**, STÄNDKER, L., WALDEN, M., FORSSMANN, W.G. (2001). LEKTI: A human lympho-epithelial multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance. *European Journal of Biochemistry.* **268**: 195.

Publizierte Abstrakta:

KREUTZMANN, P., **DRÖGEMÜLLER, K.**, STÄNDKER, L., FORSSMANN, W.G. UND MÄGERT, H.J. (1999). The gene encoding the novel multidomain serine proteinase inhibitor LEKTI is expressed in lympho-epithelial tissues. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **380**: 169.

Nichtpublizierte Abstrakta:

WALDEN, M., KREUTZMANN, P., **DRÖGEMÜLLER, K.**, JOHN, H., FORSSMANN, W.G. UND MÄGERT, H.J.. Biochemical features, molecular biology, and clinical relevance of the human 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI. 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS/ICPI 2001). München 31. Oktober - 04. November 2001.

MÄGERT, H.J., KREUTZMANN, P., **DRÖGEMÜLLER, K.** UND FORSSMANN, W.G.. LEKTI, a novel lympho-epithelial 15-domain serine proteinase inhibitor (Vortrag). 1999 International Conference on Protease Inhibitors. Gainsville (Florida, USA) 3. - 6. Dezember 1999.

KREUTZMANN, P., **DRÖGEMÜLLER, K.**, SOMMERHOFF, C.P., FORSSMANN, W.G. UND MÄGERT, H.J.. LEKTI: A novel human kazal-type-related 15 domain proteinase inhibitor. 2nd Symposium Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases. Magdeburg 12. - 14. September 1999.

MÄGERT, H.J., **DRÖGEMÜLLER, K.**, KREUTZMANN, P. UND FORSSMANN, W.G.. Analysis of the gene promoter of LEKTI, a novel human multidomain serine proteinase inhibitor. 2. Joint Meeting Signal Transduction: Receptors, Mediators, and Genes. Langen 19. - 21. November 1998.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katrin Drögemüller
Geburtsdatum/-ort: 30. September 1969 in Veerßen, jetzt Uelzen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1976 - 1980 Grundschole in Gr.-Liedern/Hanstedt II
1980 - 1989 Lessing-Gymnasium Uelzen
Schulabschluss Abitur

Berufliche Ausbildung

WS 1990 - WS 1992 Vordiplomstudium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg, Fachbereich Biologie
SS 1993 - WS 1998 Diplomstudium der Biologie an der Universität Hannover, Fachbereich Biologie
Apr. 1998 - Apr. 1999 Diplomarbeit am Institut für Peptidforschung (IPF) in Hannover
Studienabschluss Diplom der Biologie
Seit Juli 1999 Durchführung der Doktorarbeit bei der IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH) in Hannover

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen und Personen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 18.12.2003

Katrin Drögemüller