

**Molekulare Analyse der mRNA-Expression von Plasma-Prokallikrein:
Expressionsprofil in humanen Geweben und Mechanismen der
Transkriptionsregulation**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Peter Neth

aus Marktoberdorf

2001

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 (3) der Promotionsordnung vom 27. November 1991 von Herrn Prof. Dr. Edwin Fink betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 31. Juli 2001

Peter Neth

Dissertation eingereicht am 08. August 2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolf Gutensohn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Schartau

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. Edwin Fink

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2002

Für Nicole und Sophia

Prolog

Menschen einer einzigen Prägung, in einheitlichen Gruppen. Ein einziges bokanowskysiertes Ei liefert die Belegschaft für eine kleine Fabrik.

„Sechsendneunzig völlig identische Geschwister bedienen sechsendneunzig völlig identische Maschinen!“ Seine Stimme bebte fast vor Begeisterung. „Da weiß man doch wirklich woran man ist! Zum ersten Mal in der Weltgeschichte!“ Er zitierte den Leitspruch des Erdballs: „Gemeinschaftlichkeit, Einheitlichkeit, Beständigkeit.“ Goldene Worte. „Wenn sich das Bokanowskyverfahren unbegrenzt fortführen ließe, wäre das ganze Problem gelöst.“

Gelöst durch gleiche Gammas, identische Deltas, einheitliche Epsilons. Millionenlinge. Massenproduktion, endlich auch in der Biologie.

aus „Schöne neue Welt“ von *Aldous Huxley*, 1932

INHALTSVERZEICHNIS

A	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
B	EINLEITUNG	3
B.1	Plasma Kallikrein (Fletcher-Faktor)	3
B.1.1	Gen- und Molekülstruktur	3
B.1.2	Vorkommen.....	3
B.1.3	Syntheseort	3
B.1.4	Aktivierung.....	4
B.2	Physiologische Funktionen	4
B.2.1	Kontaktaktivierung.....	5
B.2.2	Fibrinolyse-System.....	5
B.2.3	Das Kallikrein-Kinin System	7
B.3	Pathophysiologische Bedeutung des Plasma Kallikreins.....	10
B.4	Aufgabenstellung	10
C	MATERIAL UND METHODEN.....	12
C.1	Materialien	12
C.1.1	Geräte	12
C.1.2	Substanzen und Materialien	13
C.1.3	<i>Escherichia coli</i> Stämme.....	16
C.1.4	Zelllinien	16
C.1.4.1	HepG2	16
C.1.4.2	HEK 293.....	16
C.1.5	Plasmid-Vektoren.....	17
C.1.5.1	pUC18 (2690 bp).....	17
C.1.5.2	pCRII-TOPO (3950 bp)	17
C.1.5.3	pSEAP2-Basic (4677 bp)	18
C.1.5.4	pSEAP2-Control (5115 bp).....	20
C.1.6	Software zur Genomanalyse.....	20
C.2	Methoden	21
C.2.1	Anzucht und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	21
C.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	22
C.2.3	Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA	22
C.2.4	Agarosegel-Elektrophorese	23
C.2.5	DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	23
C.2.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	26
C.2.7	DNA-Sequenzanalyse	26
C.2.8	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	26
C.2.9	Ligierung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase	26
C.2.10	Transformation von <i>E. coli</i>	26
C.2.11	PCR-Amplifikation von DNA.....	27

C.2.12	RNA ligase-mediated rapid amplification of 5'-cDNA ends (RLM-RACE)	27
C.2.12.1	Verwendete Oligonukleotide.....	27
C.2.12.2	Prinzip und Durchführung.....	28
C.2.12.3	PCR-Ansatz	30
C.2.13	Genome Walker Verfahren	31
C.2.13.1	Verwendete Oligonukleotide.....	31
C.2.13.2	Beschreibung und Durchführung	31
C.2.14	Herstellung von Reportergenplasmiden.....	32
C.2.15	Transfektion von HepG2- und HEK 293-Zellen.....	33
C.2.15.1	Durchführung der Transfektion mit Reportergenplasmiden	33
C.2.16	Detektion und Quantifizierung des Reporterproteins SEAP.....	34
C.2.16.1	SEAP-Bestimmung	34
C.2.17	Erzeugung von PPK-Promotorverkürzungsvarianten	35
C.2.18	Amplifikation des Intron 1 Bereichs	36
C.2.18.1	Oligonukleotide	36
C.2.18.2	Durchführung	36
C.2.19	Quantitative PCR mittels der TaqMan-Technologie.....	37
C.2.19.1	Prinzip	37
C.2.19.2	cDNA aus humanen Geweben	38
C.2.19.3	Herstellung eines cDNA-Standards aus Leber-mRNA	39
C.2.19.4	PCR-Effizienz und TaqMan-Standardkurve	39
C.2.19.5	Relative Quantifizierung und Relative Standardkurve.....	41
C.2.19.6	TaqMan Primer und Sonden	42
C.2.19.7	TaqMan PCR-Bedingungen	43
C.2.20	Bestimmung der Stabilität von PPK- und GAPDH-mRNA.....	44
C.2.20.1	Zellkulturexperimente	45
C.2.20.2	RNA-Isolierung aus HepG2-Zellen	45
C.2.20.3	Reverse Transkription	46
C.2.20.4	Bestimmung von mRNA-Halbwertszeiten mittels quantitativer RT-PCR ..	46
C.2.21	Zellstimulation von HepG2-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Lipopolysacchariden (LPS).....	46
C.2.21.1	Durchführung der Zellstimulationsversuche	47
D	ERGEBNISSE	48
D.1	Quantitative RT-PCR (TaqMan-Analyse)	48
D.1.1	Validierung der Methode	48
D.1.2	Effizienzen der TaqMan-PCRs	50
D.1.3	Relative Quantifizierung der Transkripte von PPK, HK, LK, FXI und FXII in humanen Geweben	50
D.2	Zellstimulation von HepG2-Zellen mit PMA und LPS	54
D.2.1	Ergebnisse der LPS-Stimulation	54
D.2.2	Ergebnisse der PMA-Stimulation.....	56
D.3	Stabilität der RNAs von PPK und GAPDH	58
D.4	Bestimmung des PPK-Transkriptionsstarts mittels der RLM-RACE Methode.....	59
D.4.1	PPK-Transkriptionsstartkartierung in mRNAs aus Leber, Pankreas, Niere und Testis	59
D.4.2	Analyse der Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation.....	61

D.5	Klonierung und Charakterisierung der PPK-Promotorregion.....	63
D.5.1	Klonierung der Promotorregion mittels der Genome Walker Methode.....	63
D.5.2	Aktivitätsanalyse der PPK-Promotorregion	65
D.6	Konstruktion von Promotorverkürzungsvarianten.....	66
D.6.1	Analyse des P-1729 bp Promotorregion nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren	66
D.6.2	Herstellung der PPK-Promotorverkürzungsvarianten.....	71
D.6.3	Promotoraktivitätsanalyse der PPK-PVV	72
D.7	Charakterisierung des Intron 1 Bereichs.....	75
D.7.1	Analyse der potentiellen TF-Bindungsstellen im Intron 1 des PPK-Gens.....	75
D.7.2	Reportergen-Analyse des PPK-Intron 1 Bereichs.....	79
E	DISKUSSION.....	82
E.1	Expression der mRNAs von PPK, FXII, FXI, HK und LK in humanen Geweben ...	82
E.2	Stimulation von HepG2-Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS)	84
E.3	Zellstimulation von HepG2-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	85
E.4	Bestimmung der mRNA-Stabilitäten von PPK und GAPDH.....	86
E.5	Analyse des PPK-Transkriptionsstarts mittels der RLM-RACE Methode.....	87
E.6	Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation.....	89
E.7	Klonierung und Charakterisierung der P-1729 Promotorregion.....	90
E.8	Promotor-Analyse des Intron-1-Bereiches in HEK 293 Zellen.....	93
E.9	Analyse des P-1729 Promotorbereiches in HEK 293 Zellen.....	95
E.10	Ausblick	96
F	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
	DANKSAGUNG.....	109
	LEBENS LAUF	111
	PUBLIKATIONS LISTE	112

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**A**

abs	absolut
Amp	Ampicillin
AP	Adapter Primer
ARE	AU-rich element
AS	Aminosäure(n)

B

BK	Bradykinin
bp	Basenpaar(e)

C

Cap	7-Methylguanosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CPasen	Carboxypeptidasen
CS	Core-Sequenz
CSPD	Chemolumineszenz-Substrat
C _T	Threshold Cycle
C-	carboxy-

D

dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol
dsDNA	doppelsträngige DNA
dUTP	2'-Desoxyuracil-5'-Triphosphat

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EP	Early Promoter
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F

FXI	Blutgerinnungsfaktor XI
FXI	Blutgerinnungsfaktor XII (Hageman-Faktor)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer

G

GK	Gewebe-Kallikrein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSP	Genspezifischer Primer

H

<i>H. s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
htgs	high throughput genomic sequences
HK	Hochmolekulares Kininogen

I

Inr	Initiator-Element
-----	-------------------

K

Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen(paare)
KD	Kallidin
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Kg	Kininogen

L

LK	Niedermolekulares Kininogen
LSP	Linkerspezifischer Primer
LPAS	Late polyadenylation signal
LPS	Lipopolysaccharide

M

MCS	Multiple Cloning Site
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MS	Matrix-Sequenz

N

N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
NPasen	Aminopeptidasen
nt	Nukleotide(e)
N-	amino-

O

OD_{550nm}	Optische Dichte bei 550 nm Wellenlänge
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
ORI	Origin of replication

P

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RLM-RACE	RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends
PK	Plasma Kallikrein (Fletcher-Faktor)
poly(A) ⁺	polyadenyliert
PPK	Plasma Prokallikrein
PPK-PVV	PPK-Promotorverkürzungsvariante(n)
PPR	Putative Promotorregion
PVV	Promotorverkürzungsvariante(n)
Py	Cytosin oder Thymin

R

RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rlu	relative light units
RNase	Ribonuklease
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR

S

SEAP	Sekretorische Alkalische Phosphatase
SP	Signalpeptidase
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV40	Simian Virus 40

T

TAF(s)	TBP-associated factor(s)
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
TB	Transkriptionsblocker
TBP	TATA binding protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TI	Transkriptionsinhibitor
TOPO	Topoisomerase
TRE	TPA-responsive element
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TS(s)	Transkriptionsstart(s)
TSP	Transkriptionsstartpunkt

U

U	Unit(s)
ÜN	Über Nacht
UNG	Uracil-N-glycosylase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region

V

v/v	Volumen/Volumen
-----	-----------------

W

w/v	Gewicht/Volumen
-----	-----------------

Z

z.A.	zur Analyse
ZKÜ	Zellkulturüberstand

A ZUSAMMENFASSUNG

Plasma-Kallikrein (PK) ist eine Serinprotease, die als inaktives Zymogen Plasma-Prokallikrein (PPK) in der Leber gebildet und in den Blutstrom sezerniert wird. Dort erfolgt die Konvertierung zum aktiven Enzym im Kontaktphasen-System der Blutgerinnung. Neben der Funktion im Kontakt-System spielt diese Protease sowohl in der Fibrinolyse als auch im Kallikrein-Kinin-System eine zentrale Rolle. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass PPK-mRNA auch außerhalb der Leber exprimiert wird. Daraus ist zu schließen, dass dort ebenfalls PPK-Protein gebildet wird und dass diesem extrahepatischen, gewebeständigen PPK bzw. PK spezielle lokale Funktionen zukommen. Dieser Befund bildet die Grundlage dieser Dissertation.

Mit dem langfristigen Ziel die physiologische und pathophysiologische Rolle des extrahepatisch gebildeten PPK aufzuklären, sollte in dieser Arbeit zunächst mittels einer quantitativen PCR-Technik (TaqMan) untersucht werden, in welchem Umfang PPK-mRNA und die mRNAs der übrigen Komponenten des Kontaktphasen-Systems in humanen Zellen bzw. Geweben exprimiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, ob bzw. inwieweit das PPK-Gen gewebespezifisch reguliert werden kann. Hierzu sollten die regulatorisch bedeutsamen Regionen des PPK-Gens charakterisiert werden.

Mittels der TaqMan-Technologie konnte die PPK-mRNA-Expression in allen untersuchten humanen Geweben quantifiziert werden. In neun Geweben liegt die mRNA-Expression im Vergleich zur Leber zwischen 1 % und 68 % und in sechs Geweben zwischen 0,1 % und 1 %. Diese Ergebnisse sprechen für eine ubiquitäre, aber teils sehr unterschiedliche Expression der PPK-mRNA in humanen Geweben.

Die mRNAs von hochmolekularem Kininogen (HK), niedermolekularem Kininogen (LK), Faktor XI (FXI) und Faktor XII (FXII) werden dagegen nur in wenigen Geweben exprimiert. Die Transkripte von HK, LK und FXI findet man außerhalb der Leber nur noch in Nierengewebe in signifikanter Menge, während FXII-mRNA nahezu ausschließlich in der Leber synthetisiert wird. Ein gemeinsames Merkmal aller Transkripte ist, dass sie in Lebergewebe am stärksten exprimiert werden.

Zellstimulationsversuche mit HepG2-Zellen ergaben, dass die PPK-mRNA-Synthese mittels Lipopolysacchariden (LPS) kurzfristig induziert werden kann, was für eine wesentliche Funktion von PPK bzw. PK bei Entzündungsreaktionen spricht. Im Gegensatz hierzu bewirkt Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) eine Herabregulation der PPK-Transkription.

Untersuchungen zur Stabilität der mRNAs von PPK und dem Haushaltsgen GAPDH mit den Transkriptionseinhibitoren Actinomycin D, α -Amanitin und DRB zeigten, dass die mRNA-Abbauraten in HepG2-Zellen vom jeweils eingesetzten Transkriptionseinhibitor abhängen. Bei allen Transkriptionseinhibitoren wurde das PPK-Transkript im Vergleich zu GAPDH deutlich schneller (Faktor 3-5) abgebaut. Dies weist darauf hin, dass die PPK-mRNA-Spiegel in den Zellen durch ständige Neusynthese aufrechterhalten werden, um eine kontinuierliche Produktion von PPK zu gewährleisten.

Mittels der RLM-RACE Methode wurden in Leber-, Pankreas-, Nieren- und Testisgewebe die PPK-Transkriptionsstartpunkte (TS) identifiziert. Während in der Leber und im Pankreas nur TSs in Exon 1 des PPK-Gens benutzt werden, findet man in Nieren- und Testisgewebe TSs sowohl in der upstream-Region als auch in Intron 1. Weiterhin wurden in Nierengewebe drei am 5'-Ende verkürzte PPK-Transkripte detektiert, die aufgrund dieser Deletion keine Signalpeptid-Sequenz enthalten und dadurch eine intrazelluläre Lokalisation der entsprechenden PPK-Isoform bedingen. Die Consensussequenz-Analyse für die Transkriptionsinitiation zeigt, dass jedem experimentell ermittelten Transkriptionsstart eine TATA-Box oder/und ein Initiator-Element assoziiert ist. Außerdem konnte durch die RLM-RACE-Analysen die Existenz eines weiteren untranslatierten Exons im 5'-Bereich des PPK-Gens ausgeschlossen werden.

Unter Anwendung der Genome Walker Technik wurde die Promotorregion (P-1729) stromaufwärts von Exon 1 kloniert und mittels Reportergen-Studien analysiert. In HepG2-Zellen zeigt dieses Gensegment eindeutig transkriptionsaktivierende Kapazität.

Durch die Generierung von neun Verkürzungsvarianten konnten der Core-Promotor (-158 bis +22), Enhancerbereiche (-1675 bis -1494) und Silencerregionen (-1304 bis -674) charakterisiert werden. Die Transkriptionsfaktoren-Analyse ergab, dass bei der Regulation durch die P-1729 Region neben ubiquitär exprimierten auch streng gewebespezifische Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle spielen.

Reportergen-Untersuchungen des Intron-1-Bereichs in HEK 293-Zellen zeigten, dass auch diese Region des PPK-Gens transkriptionsaktivierende Kapazität besitzt. Ebenso zeigt aber auch der P-1729 Bereich in HEK 293-Zellen Promotoraktivität. Somit können innerhalb eines Zelltyps beide Promotorbereiche funktionell aktiv sein, wodurch eine alternative Regulation der PPK-Transkription ermöglicht wird.

B EINLEITUNG

B.1 Plasma Kallikrein (Fletcher-Faktor)

B.1.1 Gen- und Molekülstruktur

Humanes Plasma-Prokallikrein (PPK) wird durch ein singuläres Gen mit einer Länge von etwa 30 kb auf Chromosom 4 codiert (Beaubien et al., 1991; Yu et al., 2000). Das Gen besteht aus 15 Exons und 14 Introns und weist eine ähnliche Genstruktur wie Faktor XI auf (Asakai et al., 1987). Die mRNA von humanem Plasma-Prokallikrein codiert eine singuläre Polypeptidkette mit 619 Aminosäuren. Den amino-terminalen Bereich des Proteins bilden vier Apple-Domänen (jeweils aus 90 bzw. 91 AS), deren Struktur durch mehrere Disulfidbrücken stabilisiert wird (Chung et al., 1986; McMullen et al., 1991). Die gleiche molekulare Grundstruktur weist auch Faktor XI auf (AS-Sequenzhomologie zu PPK 58 %), was auf die Duplikation eines gemeinsamen Vorläufergens hinweist (Beaubien et al., 1991; McMullen et al., 1991).

B.1.2 Vorkommen

Plasma-Kallikrein (PK) ist eine Serinprotease, die als inaktives Plasma-Prokallikrein synthetisiert wird. Im Blutplasma findet man zwei Formen unterschiedlichen Glykosylierungsgrades mit Molekülmassen von 85 und 88 kDa (Hojima et al., 1985; Veloso & Colman, 1991) in einer Gesamtkonzentration von etwa 50 mg/l (= 0,6 µM); davon liegen 75 % an hochmolekulares Kininogen gebunden, die restlichen 25 % in freier Form vor (Mandle et al., 1976). Die Dissoziationskonstante des PPK/HK-Komplexes beträgt 12-15 nM; aufgrund dieser großen Stabilität bleibt der Komplex auch nach der Aktivierung von PPK zu PK erhalten (Bock et al., 1985; Mandle et al., 1976).

B.1.3 Syntheseort

PPK wird in der Leber gebildet und in den Blutstrom sezerniert (Mandle & Kaplan, 1977). Die immunzytochemische Lokalisation von PPK in humanen Hepatozyten gelang mittels Laserscanning-Mikroskopie (Henderson et al., 1992). Ein weiterer Beweis für die Synthese in der Leber ergab sich aus den Arbeiten von Ciechanowicz et al. (1993), durch die mittels RT-PCR die Expression von PPK-mRNA in humaner Leber nachwiesen wurde. Die Untersuchungen von Ciechanowicz et al. (1993) sowie von Hermann et al. (1996, 1999a,b) erbrachten darüber hinaus den überraschenden Befund, dass PPK-mRNA auch in anderen Geweben und

in nicht-hepatischen Zelllinien gebildet wird und demnach auch extrahepatisch synthetisiert werden kann. Dieser Befund bildet die Grundlage dieser Dissertation.

B.1.4 Aktivierung

Die Konvertierung des Plasma-Prokallikreins zu Plasma-Kallikrein erfolgt im Verlauf der Aktivierung des Kontaktphasensystems der Blutgerinnung (siehe B.2.1) durch Spaltung der Peptidbindung Arg³⁷¹-Ile³⁷² des einkettigen PPK. Die aktive Protease besteht aus einer schweren (371 AS) und einer leichten Kette (248 AS), wobei die leichte Kette das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade His⁴¹⁵, Asp⁴⁶⁴ und Ser⁵⁵⁹ enthält. Die beiden Polypeptidketten bleiben durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (McMullen et al., 1991).

B.2 Physiologische Funktionen

Die aktive Protease kann eine Reihe von Folgereaktionen einleiten. PK aktiviert Granulozyten auf eine im Einzelnen noch nicht geklärte Weise; es bewirkt deren Aggregation, eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs und die Freisetzung lysosomaler Elastase (Wachtfogel et al., 1983; Schapira et al., 1982, 1983; van der Graaf et al., 1982). Auch das Komplement-System kann von PK aktiviert werden (Gebrehiwet 1981, 1983; DiScipio, 1982). PK hat sich zudem als effektiver Aktivator des Pro-Urokinase-Plasminogenaktivators erwiesen und stellt somit eine Querverbindung zum Fibrinolyse-System her (Ichinose et al., 1986; Hauert et al., 1989). Kürzlich zeigten Forschungsarbeiten, dass Plasma-Kallikrein auch an der Adipozyten-Differenzierung durch die Aktivierung der Plasminogen-Kaskade maßgeblich beteiligt ist (Selvarajan et al., 2001).

Neben der Kontaktaktivierung in der Blutgerinnung und Fibrinolyse spielt PK eine zentrale Rolle im Kallikrein-Kinin-System (KKS).

B.2.1 Kontaktaktivierung

Das Kontaktaktivierungs-System verbindet die drei physiologischen Systeme intrinsische Blutgerinnungskaskade, Fibrinolyse sowie das Kallikrein-Kinin-System miteinander (Abbildung B 1).

Es besteht aus den Serinprotease-Zymogenen Plasma-Prokallikrein (Fletcher-Faktor), Faktor XII (Hageman-Faktor), Faktor XI (Plasma-Thromboplastin-Vorläufer) sowie dem nicht-enzymatischen Cofaktor hochmolekulares Kininogen (Fitzgerald-Faktor).

Die Kontaktaktivierung wird ausgelöst, wenn das Blut mit negativ geladenen Oberflächen in Berührung kommt, entweder *in vitro* (z.B. Kaolin, Dextransulfat) oder *in vivo* bei Verletzungen des Endothels. Der im Blut zirkulierende PPK-HK-Komplex wird dabei über positiv geladene Bereiche der Domäne 5 des HK an die negativ geladene Oberfläche gebunden (Mandle et al., 1976). Es erfolgt somit eine lokale Anreicherung des PPK, das anschließend durch Faktor XIIa aktiviert wird (Mandle & Kaplan, 1977). Faktor XII wird vermutlich durch einen autokatalytischen Prozess ebenfalls an der negativ geladenen Oberfläche in geringem Umfang aktiviert. In der Folge wird weiterer FXII sowohl durch Plasma-Kallikrein als auch durch FXIIa aktiviert. Durch diesen positiven Rückkopplungsprozess kommt es somit lokal begrenzt zu einer vermehrten Bildung der aktiven Proteasen Faktor XIIa und PK. FXIIa aktiviert Faktor XI und löst damit die endogene Kaskade der plasmatischen Gerinnung aus, die schließlich zur Spaltung von Fibrinogen durch α -Thrombin führt, wodurch ein Blutgerinnsel (Thrombus) gebildet wird.

Neuere Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass der HK/PPK-Komplex auf der Zelloberfläche von Endothelzellen auch ohne die Präsenz von Faktor XIIa aktiviert werden kann (Colman & Schmaier, 1997), wobei PPK vermutlich durch eine membranassoziierte, Zn^{2+} -abhängige Thiol-Proteinase gespalten wird. Somit stellt dieser Mechanismus eine neue Möglichkeit zur Aktivierung von PPK an der Endothelzelloberfläche dar, der neben der Kininliberierung hauptsächlich zur Induktion des Fibrinolyse-Systems beiträgt (Motta et al., 1998).

B.2.2 Fibrinolyse-System

Im hämostatischen System stehen die Gerinnungsvorgänge im Gleichgewicht mit der Fibrinolyse. In der Fibrinolyse wird das inaktive Zymogen Plasminogen durch Plasminogenaktivatoren, die in allen Geweben und Körperflüssigkeiten vorkommen, zu Plasmin umgewandelt, das dann Fibringerinnsel abbaut.

Man unterscheidet ähnlich wie bei der Gerinnung zwei Aktivierungsmöglichkeiten (Takada et al., 1994). Zum einen existiert ein sofort wirksames exogenes System, bei dem gewebestän-

dige Proteasen Aktivator-Funktionen ausüben. Hierzu zählen der Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), der hauptsächlich in der Niere (Sobel et al., 1952), später aber auch in anderen Geweben und im Plasma identifiziert werden konnte (Dano et al., 1980; Wijngaards et al., 1982; Tissot et al., 1982) und der Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator (tPA), der vor allem in Endothelzellen gebildet wird (Loskutoff & Edgington, 1977).

Zum anderen gibt es ein physiologisch langsamer ablaufendes intrinsisches plasmatisches System, das durch Proaktivatoren gestartet und katalysiert wird. Zu diesen zählen die bei Gewebeschäden aus Leukozyten freigesetzten Lysokinasen und das Kontaktsystem (siehe B.2.1). Das im Kontaktsystem aktivierte Plasma-Kallikrein wandelt dabei einen 110 kDa Pro-Aktivator in einen aktiven Plasminogenaktivator um, während Bradykinin (siehe B.2.3) die Freisetzung von tPA aus intrazellulären Speichern im Endothel stimuliert (Lill et al., 1999).

Am Ende dieser Vorphase steht die Generierung eines Plasminogen-Aktivators, der intaktes Plasminogen über die spezifische Spaltung der Peptidbindung Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² in Plasmin überführt. Die aktivierte Protease löst Blutgerinnsel auf, indem sie Fibrin zu löslichen Fibrinspaltprodukten abbaut (Abbildung B 1).

Neben der Hauptfunktion, nämlich der Auflösung von Blutgerinnseln, ist Plasmin in eine Vielzahl weiterer physiologischer Prozesse involviert, wie z.B. Embryonalentwicklung, Gewebeneumodellierung, Tumordinvasion, Entzündungsgeschehen, sowie Zelldifferenzierung (Mülleritz, 1984; Selvarajan et al., 2001).

B.2.3 Kallikrein-Kinin-System

Kininliberierung

Das Kallikrein-Kinin-System (Abbildung B 1) ist im Organismus für die kontrollierte Freisetzung der Kinine Bradykinin (BK) und Kallidin (KD) sowie deren Konvertierung und Inaktivierung verantwortlich. Kinine werden im Organismus aus den Plasmaproteinen hochmolekulares (HK) oder niedermolekulares Kininogen (LK) durch limitierte Proteolyse freigesetzt und zwar durch die beiden Serin-Proteasen Plasma-Kallikrein (PK) und Gewebe-Kallikrein (GK). Gewebe-Kallikrein setzt Kallidin frei, während Plasma-Kallikrein Bradykinin generiert (Abbildung B 1); beiden Kallikreinen ist somit prinzipiell die Kinin-liberierende Wirkung gemeinsam, ansonsten stellen sie aber biochemisch und funktionell grundverschiedene Enzyme dar.

Kinine und Kininrezeptoren

Kallidin kann durch Aminopeptidase(n) in Bradykinin überführt werden (Abbildung B 1). Beide Kinine sind Agonisten der B₂-Kininrezeptoren, sie können aber auch *in vivo* und *in vitro* durch Carboxypeptidasen zu desArg⁹-BK bzw. des Arg¹⁰-KD konvertiert werden, die spezifisch mit B₁-Kininrezeptoren interagieren (Hall & Morton, 1997; Marceau, 1997). B₂-Rezeptoren werden in vielen (möglicherweise allen) Zellen konstitutiv exprimiert und vermitteln die meisten der beschriebenen Kininwirkungen. Die Synthese der B₁-Rezeptoren wird dagegen als Antwort auf Entzündungsreaktionen induziert.

B₁- und B₂-Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen einen extrazellulären Teil (extrazelluläre Schleifen), der für die spezifische Signalauslösung (Kininbindung) verantwortlich ist, während der Transmembranteil (sieben transmembrane α -Helices) für die Weiterleitung des Stimulus zuständig ist. Intrazellulär löst die Aktivierung des Rezeptors einen G-Protein-gekoppelten Prozess aus, durch den ein spezifisches Second-Messenger Signal generiert wird, das anschließend zelluläre Effekte induziert.

Kinin-bedingte Effekte

Abhängig davon, in welchen Geweben und an welchen Zellen sie zur Wirkung kommen, lösen Kinine über die Interaktionen mit ihren Rezeptoren die unterschiedlichsten Effekte aus wie Schmerzempfindung, Dilatation von Venolen, Blutdruckabfall, Konstriktion von Kapillargefäßen in Herz und Lunge, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, des Uterus sowie des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts, Stei

gerung der Zellproliferation und Erhöhung der Spermienmobilität. Sie sind weiterhin auch an der Steuerung des zellulären Glukose- und Chloridtransportes beteiligt und besitzen kardioprotektive Wirkung (Bhoola et al., 1992; Linz et al., 1997).

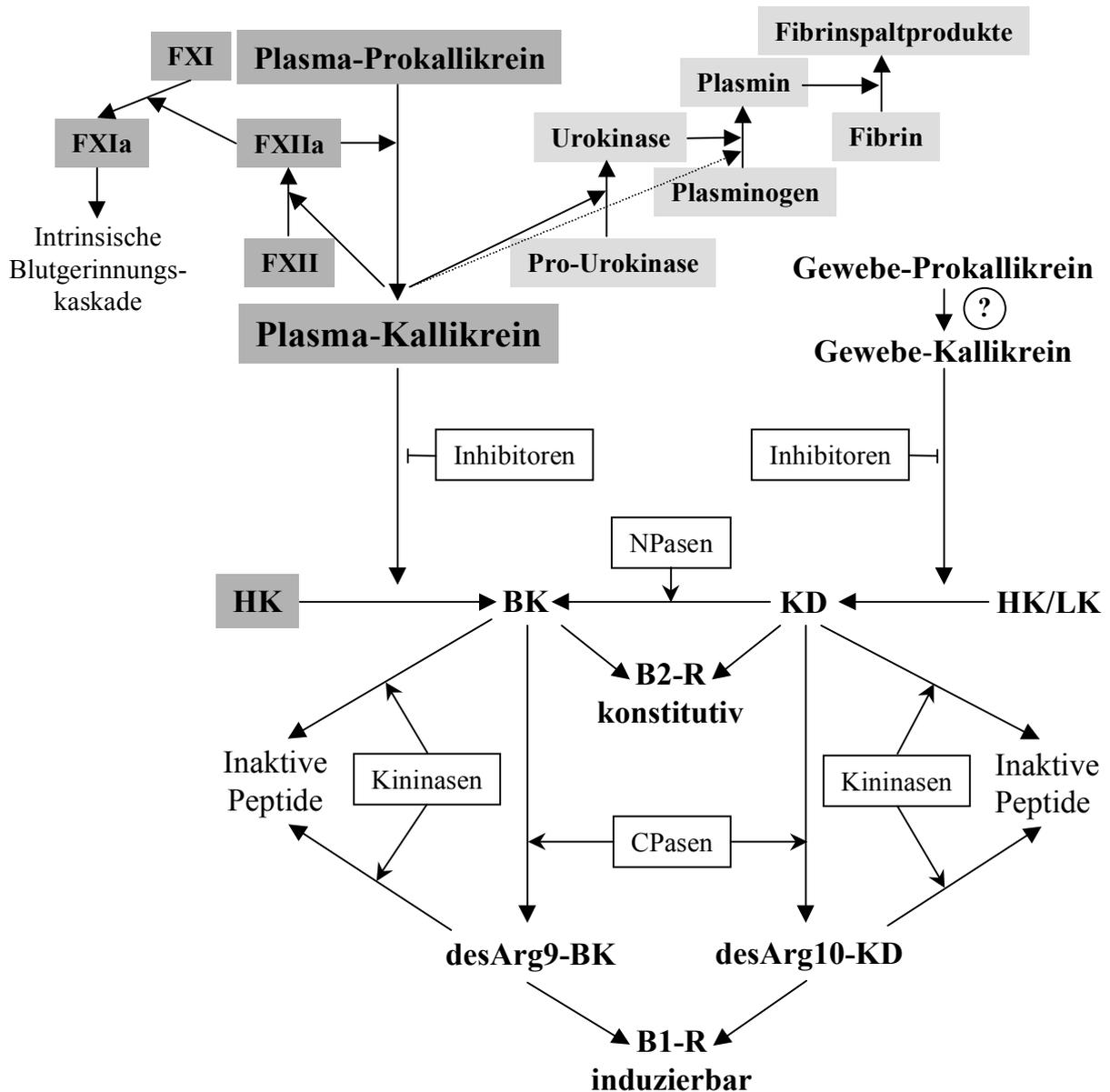


Abb. B 1 Stellung von Plasma-Kallikrein im Kontakt-System (grau), im Fibrinolyse-System (hellgrau) und im Kallikrein-Kinin-System. FXII(a), FXI(a): Zymogenform bzw. aktivierte Form der Blutgerinnungsfaktoren XII, XI; HK und LK, hochmolekulares und niedermolekulares Kininogen; BK, Bradykinin; KD, Kallidin (Lys-Bradykinin); B₁-R und B₂-R, B₁- und B₂-Kinin-Rezeptoren; CPasen, Carboxypeptidasen; NPasen, Aminopeptidasen.

Inaktivierung der Kinine

Die zeitliche und räumliche Begrenzung der Wirksamkeit der Kinine und ihrer Derivate des Arg⁹-BK und des Arg¹⁰-KD erfolgt durch proteolytische Inaktivierung durch ubiquitär vorhandene Kininasen (Abbildung B 2).

Die Carboxypeptidasen M und N spalten das carboxyterminale Arginin der Kinine ab. Der B₂-Rezeptor erkennt diese C-terminal verkürzten Kinine nicht mehr, während der B₁-Rezeptor nur durch diese desArg-Kinine stimuliert wird.

Die neutrale Endopeptidase (NEP) und das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) spalten im Bradykinin-Molekül die carboxyterminale Pro⁷-Phe⁸-Bindung, wodurch das Dipetid Phe⁸-Arg⁹ freigesetzt wird. NEP erkennt zusätzlich die Spaltstelle zwischen Gly⁴ und Phe⁵.

Weitere Kinin-abbauende Enzyme sind die Aminopeptidase P (Spaltung der Arg¹-Pro²-Bindung) sowie die zwei Endopeptidasen Kininase A (Spaltung der Phe⁵-Ser⁶-Bindung) und Kininase B (Spaltung zwischen Pro⁷ und Phe⁸).

Kinine und desArg⁹- bzw. desArg¹⁰-Kinine können daher nicht über längere Wegstrecken zu Zielzellen transportiert werden, sondern üben ihren Einfluss unmittelbar auf Zellen am oder nahe dem Ort ihrer Entstehung aus. Somit hängen die *in vivo*-Effekte einer Kininliberierung ganz entscheidend davon ab, wo im Organismus die Freisetzung erfolgt und somit letztlich davon, wo Plasma-Kallikrein und/oder Gewebe-Kallikrein verfügbar sind (Erdös & Skidgel, 1997).

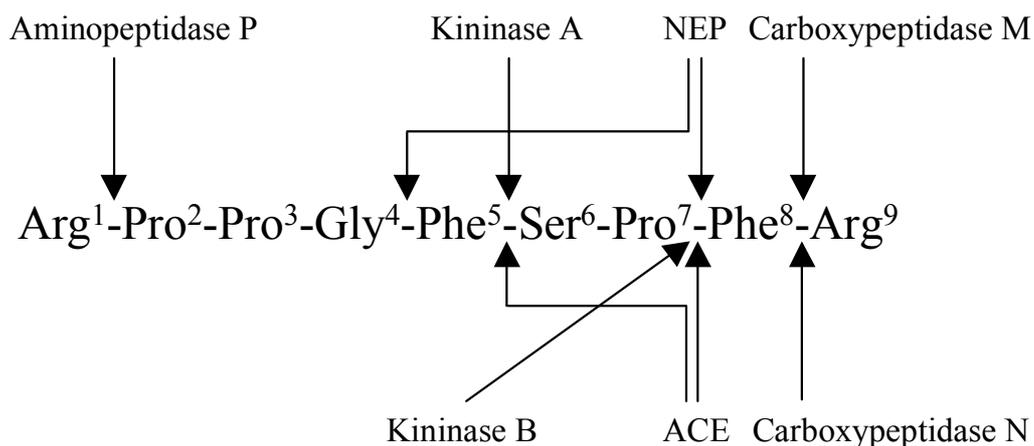


Abb. B 2 Abbau von Bradykinin durch Kininasen.

B.3 Pathophysiologische Bedeutung des Plasma Kallikreins

Eine Reihe krankhafter Zustände sind mit Symptomen verbunden, die auf eine erhöhte Aktivität von Plasma-Kallikrein und die dadurch bedingte überschießende Liberierung von Bradykinin zurückzuführen sind (Colman & Wong, 1979). So setzt Plasma-Kallikrein, das als Antwort auf Entzündungen oder Gewebeverletzungen aktiviert wird, Bradykinin frei, welches eine Dilatation der Arteriolen und damit Blutdruckabfall sowie Plasmaextravasation verursacht. Beim hereditären angioneurotischen Ödem besteht ein Mangel an funktionsfähigem C1-Inhibitor, dem wichtigsten Hemmstoff für Plasma-Kallikrein (Reddigari et al., 1997). Die akut auftretende Symptomatik mit Ödembildung vor allem im Gesichtsbereich erfolgt auf Grund nicht ausreichend kontrollierter Aktivierung der Komplement- und Kallikrein-Kinin-Systeme (Reddigari et al., 1997).

Bei der Hämodialyse (Tielemans et al., 1990; Verresen et al., 1990; Parnes & Shapiro, 1991) und LDL-Apherese (Olbricht et al., 1992; Keller et al., 1993) treten gelegentlich anaphylaktoide Reaktionen auf, offenbar wegen der Freisetzung von Bradykinin durch Plasma-Kallikrein, das seinerseits an den negativ geladenen Oberflächen der Hämodialyse-Membranen bzw. der LDL-adsorbierenden Materialien gebildet wird (siehe auch B.2.1).

B.4 Aufgabenstellung

Alle bisherigen Untersuchungen über die biologischen Funktionen von PPK bzw. PK und deren physiologische Bedeutung gehen davon aus, dass dieses Enzym in der Leber synthetisiert und anschließend in das Blut sezerniert wird. Dort erfüllt es seine diversen Aufgaben (siehe B.2) als im Blutstrom zirkulierendes bzw. im Komplex mit HK an der Endothelzelloberfläche assoziiertes Molekül.

Bis jetzt konnte Plasma Kallikrein keine Funktion außerhalb des Blutkreislaufes zugeschrieben werden.

Demgegenüber beweisen aber die Arbeiten von Ciechanowicz et al. (1993) und Hermann et al. (1996), dass PPK-mRNA auch in Geweben außerhalb der Leber transkribiert wird. Daraus ist zu schließen, dass PPK-Protein dort ebenfalls gebildet wird und dass diesem extrahepatischen, gewebeständigen PPK spezielle lokale Funktionen zukommen. Weiterhin lässt diese extrahepatische PPK-Synthese vermuten, dass das PPK-Gen gewebespezifisch und potentiell auch entwicklungspezifisch reguliert wird.

Mit dem langfristigen Ziel, letztlich die physiologische und pathophysiologische Rolle des extrahepatisch gebildeten PPK aufzuklären, sollte in dieser Arbeit mittels quantitativer PCR-Technik untersucht werden, in welchen Zellen bzw. Geweben PPK-mRNA und die mRNAs der übrigen Komponenten des Kontaktphasen-Systems (FXII, FXI, HK und LK) exprimiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die regulatorisch bedeutsamen Regionen des PPK-Gens untersucht werden.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. In welchen humanen Geweben wird PPK-mRNA gebildet und wie hoch ist die PPK-mRNA-Expression in diesen Geweben im Vergleich zur Leber?
2. In welchen Geweben werden die zur Aktivierung von PPK erforderlichen Komponenten des Kontaktphasen-Systems gebildet?
3. Wird die Bildung von PPK-mRNA durch Entzündungsmediatoren beeinflusst?
4. Wie ist die Stabilität der PPK-mRNA im Vergleich zur mRNA des Haushaltgens GAPDH?
5. Wo liegen im PPK-Gen die Transkriptionsstartpunkte? Gibt es gewebespezifische Unterschiede?
6. Welche Bereiche der Promotorregion des PPK-Gens sind an der Regulation der PPK-mRNA-Expression beteiligt? Existieren alternative bzw. gewebespezifische Promotoren?

C MATERIAL UND METHODEN

C.1 Materialien

C.1.1 Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	PE Biosystems, Weiterstadt
Automatisches Sequenziergerät, Typ A 377	PE Biosystems, Weiterstadt
Brutschrank, Typ BE 30	Memmert, Schwabach
Elektroporationsapparat, Typ Gene Pulser	Bio-Rad, München
ELISA-Reader, Typ MRX	Dynex, Denkendorf
ELISA-Platten Inkubator	Dynatech, England
Erntezentrifuge, Typ Sorvall RC3B	DuPont, Dreieich
Flachbett-Gelektrophorese-Apparatur, Typ H4 H5 und H6	BRL, Neu-Isenburg
Gel-Dokumentations-System	Pharmacia, Freiburg
Heizblock, Typ 2100	Liebisch, Bielefeld
Inkubationsschüttler, Typ ITE und TU	Infors, Bottmingen (CH)
Kühlzentrifuge, Typ Zentrifuge Hermle H 401 Mit Festwinkelrotoren A4.7, A6.9 und A8.24	Kontron, Eching
Kühlzentrifuge, Typ Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Kryostat, Typ F10-VC/3	Julabo, Seelbach
Magnetrührer, Typ KMO	IKA, Staufen
Mikrowellengerät, Typ R-6200	Sharp, Osaka, Japan
Multifunction Microplate Reader Typ SPECTRAFluor Plus	Tecan, Heidelberg
Neubauer-Zell-Zählkammer	Plazotta, München
PCR-Thermoblock, Typ Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermoblock, Typ N801-0150	Perkin Elmer, Langen
pH-Elektroden	Ingold, Steinbach-Taunus
pH-Meter, Typ 114D	WTW, Weilheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences, USA
Polaroid-Einrichtung, Typ Polaroid MP4 `Land Camera`	Polaroid, Bachofer Reutlingen

Präzisionswaage, Typ A 120 S	Sartorius, Göttingen
RNA/DNA Calculator, Typ GeneQuant	Pharmacia, Freiburg
Spannungsquelle, Phero-stab. 500	Bachofer, Reutlingen
Spannungsquelle, Typ 5000/100	Bio-Rad, München
Spektralphotometer, Uvikon 930	Kontron, Eching
Sterilbank, Typ UVF6.18S	BDK, Sonnenbühl
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischautoklav, Typ RA 80	Zirbus, Osterode
Tischzentrifuge, Typ 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Umkehrmikroskop Olympus IX 50	Micro-Optik, München
Untertischzentrifuge, Typ Megafuge 1.0	Heraeus/Sepatech, München
UV-Leuchtschirm 302 nm, Typ Chroma 43	Bachofer, Reutlingen
Varipetten, Gilson, Pipetman	Abimed, Langenfeld
Vertikal-Elektrophoresesystem, Typ SE 650 und Mighty Small, Typ SE 245	Hoefer, Heidelberg
Wasserbad, Typ Exatherm U3	Julabo, Seelbach
Zellkulturbrutschrank B 5060 EC-CO ₂	Heraeus, Osterode

C.1.2 Substanzen und Materialien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe „z.A.“ von den Firmen Baker, Deventer (NL); Fluka (CH); Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen (alle D) bezogen.

Wässrige Lösungen wurden mit Reinstwasser aus der Seral-Reinstwasseranlage der Fa. Althäuser, Ransbach-Baumbach hergestellt. Für molekularbiologische Reaktionsansätze wurde „Aqua ad injectabilia“ der Firma Braun, Melsungen benutzt.

Chemikalien

α -Amanitin	Sigma, Deisenhofen
ABTS	Roche, Mannheim
Acrylamid, 40%	Appligene, Heidelberg
Actinomycin D	Sigma, Deisenhofen
Agarose NuSieve (niedriger Schmelzpunkt)	FMC, Biozym, Hameln
Agarose Seakem GTG	FMC, Biozym, Hameln
Agarose Typ II	Sigma, Deisenhofen

Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz	Biomol, Hamburg
Antikörper gegen Plasma-Kallikrein	Laborbestand AG Prof. Dr. Fink
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Core Reagent Kit	PE Biosystems, Weiterstadt
CSPD	Clontech, Heidelberg
Cycle Sequencing Kit, Dye Desoxyterminator	PE Biosystems, Weiterstadt
5,6-Dichlorbenzimidazolribosid (DRB)	Sigma, Deisenhofen
DNA-Längenstandards, Nr. V, VII und VIII	Roche, Mannheim
DNA-Längenstandards 100 bp step ladder und PhiX174 DNA/Hinf Marker	Promega, Mannheim
dNTP-Mix	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Glycerin „ultrapure“	BRL, Neu-Isenburg
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Mineralöl, leicht	Sigma, Deisenhofen
Mobius 1000 Plasmid Kit	Novagen, USA
Peroxidase-konjugiertes-Kaninchen-anti-Ziege-IgG	Dianova, Hamburg
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma, Deisenhofen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Silbernitrat (Proteicolor)	Roth, Karlsruhe
TRI-Reagenz	Sigma, Deisenhofen
Universal Master Mix	PE Biosystems, Weiterstadt

Enzyme

Advantage Genomic Polymerase	Clontech, Heidelberg
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	PE Biosystems, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase	Clontech, Heidelberg
Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase	Invitrogen, Groningen, NL

Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Invitrogen, Groningen, NL
Goldstar DNA-Polymerase	Eurogentec, Belgien
Murine Reverse Transcriptase	Amersham Pharmacia, Freiburg
PanScript DNA-Polymerase	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PfuTurbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, NL
Restriktionsendonukleasen Typ II	Roche, Mannheim, bzw. New England Biolabs, Schwalbach
RNase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4-RNA-Ligase	Invitrogen, Groningen, NL
ThermoZyme DNA-Polymerase	Invitrogen, Groningen, NL
Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP)	Invitrogen, Groningen, NL

Zellkultur

DMEM-Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DPBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Fötales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
FuGENE 6 Transfektions-Reagenz	Roche, Mannheim
L-Glutamin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
RPMI-Medium	PAA, Linz, Österreich
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Weitere Materialien

12-bzw. 24-Kavitäten Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Filme, Polaroid Typ 667	Polaroid, Frankfurt
MicroAmp Optical PCR-Platten, 96 Kavitäten	PE Biosystems, Weiterstadt
Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten	Nunc, Wiesbaden
Polystyrol-Petrischalen, d = 94 mm	Greiner, Solingen
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Tiefgefriereröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen, 75 cm ² bzw. 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht

C.1.3 *Escherichia coli* Stämme

E. coli TOP10 (Invitrogen)

Genotyp: F⁻, mcrA, Δ(mrr-, hsdRMS-, mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG

E. coli TG1 (Amersham Pharmacia)

Genotyp: Δ(lac-pro), supE, thi⁻, hsdD5/F#, trD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZΔM15

E. coli HB101 (Laborbestand AG Fink)

Genotyp: thi⁻, hsdS20, (r_B⁻, m_B⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, rpsL20

C.1.4 Zelllinien

C.1.4.1 HepG2

Zelltyp: Humane Leberkarzinomzelllinie

Bezogen von: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abt. Menschliche und Tierische Zellkulturen

DSMZ Nr.: ACC 180

Herkunft: Tumorgewebe eines 15-jährigen Jungen aus Argentinien mit hepatozellulärem Karzinom

Zytogenetik: humaner hyperdiploider Karyotyp: 52(47-54)<2n>XY, +2, +14, +17, +20, +2mar, t(1;21) (p22.2;p11-12), i(17q)/der(17)t(17;17)(p11;q11)

C.1.4.2 HEK 293

Zelltyp: Humane embryonale Nierenzelllinie

Bezogen von: European Collection of Cell Cultures

ECACC No.: 85120602

Herkunft: Emryonale Niere

Zytogenetik: 2n = 46

C.1.5 Plasmid-Vektoren

C.1.5.1 pUC18 (2690 bp)

Bei pUC18 handelt es sich um einen Klonierungsvektor mit einer ausgedehnten multiplen Klonierungsstelle, die zur Insertion von Fremd-DNA dient. Der Replikationsursprung des Plasmids ermöglicht eine hohe Kopienzahl in *E. coli*, die relativ geringe Molmasse eine einfache Isolierung und Handhabung. Als Selektionsmarker trägt das Plasmid das β -Lactamase-Gen, welches die Ampicillin-Resistenz kodiert. Der Vektor wurde von der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg bezogen.

C.1.5.2 pCRII-TOPO (3950 bp)

Dieser Vektor von der Fa. Invitrogen, Groningen erlaubt die sogenannte TOPO-TA-Klonierung, bei der direkt durch *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte in den Vektor ligiert werden können. *Taq*-Polymerase besitzt eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität, wodurch einzelne Desoxyadenosin-Moleküle an die 3'-Enden der PCR-Amplifikate angefügt werden. Der lineare Vektor dagegen besitzt überhängende Desoxythymidin-Moleküle, wodurch das Insert effizient mit dem Vektor ligieren kann.

Zusätzlich ist an die 3'-Phosphatreste des linearisierten Vektors das Enzym Topoisomerase I gebunden. Die biologische Funktion dieses Enzyms besteht in der Aufwindung von dsDNA, damit bestimmte DNA-Bereiche für entsprechende Faktoren (z.B. RNA-Polymerase II, Transkriptionsfaktoren usw.) zugänglich werden. Dabei bindet Topoisomerase I an die Erkennungssequenz 5'-(C/T)CCTT-3' von dsDNA und spaltet einen Strang am 3'-Ende der Consensussequenz (Shuman, 1991).

Die Energie der gespaltenen Phosphodiester-Bindung wird durch die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und der Aminosäure Tyrosin (Tyr-274) der Topoisomerase I gespeichert. Diese Phospho-Tyrosin-Bindung wird nachfolgend von der 5'-OH Gruppe des PCR-Produktes in einem nukleophilen Angriff gespalten, wobei das Enzym Topoisomerase I freigesetzt wird. Diese Funktion wird bei der TOPO-TA-Klonierung eingesetzt (Shuman, 1994), wodurch sich sowohl die Zeitdauer der Ligationsreaktion stark verkürzt (5 min), als auch die Ligationseffizienz enorm steigert.

Der Vektor trägt als Selektionsmarker sowohl das Gen für β -Lactamase, welches die Ampicillin-Resistenz bedingt, als auch das Gen für die Kanamycin-Resistenz. Er besitzt außerdem den pUC-Replikationsursprung, wodurch eine hohe Kopienzahl in *E. coli* gewährleistet wird (siehe Abb. 1).

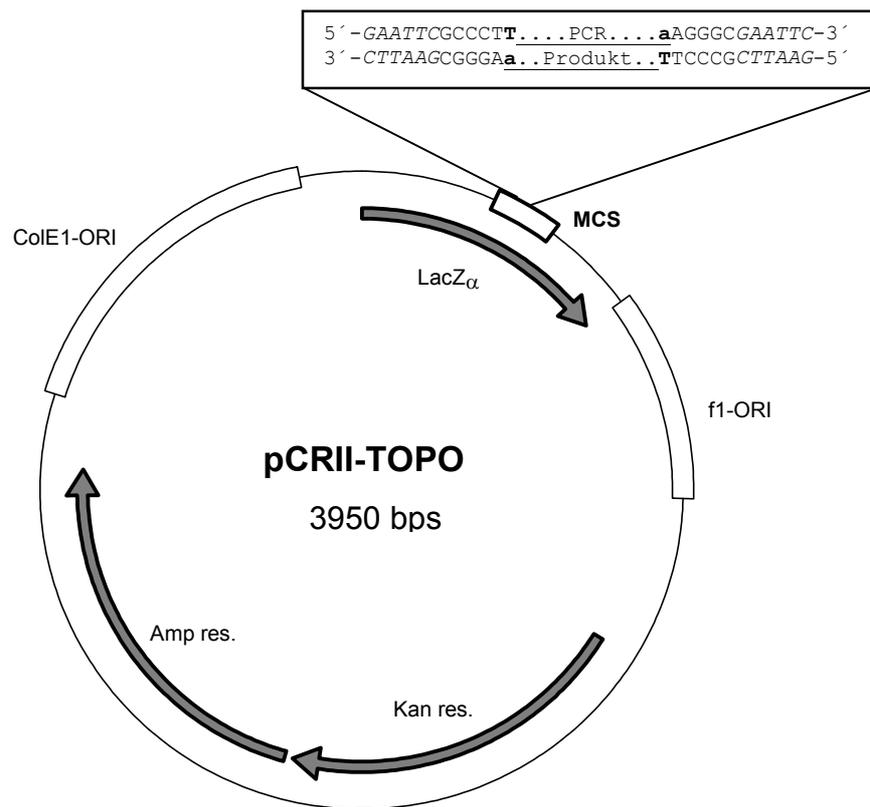


Abb. C 1 Plasmidkarte des TA-Klonierungsvektors pCRII-TOPO mit multipler Klonierungsstelle (MCS). *LacZ*, *LacZ* α -Genfragment; Kan res., Kanamycin-Resistenzgen; Amp res., Ampicillin-Resistenzgen; f1-ORI, f1-Phagen Replikationsursprung; ColE1-ORI, *E. coli* Plasmid Replikationsursprung; fett gekennzeichnete Basen stellen die überhängenden Enden dar; *kursiv* hervorgehobene Basen kennzeichnen die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *EcoRI*.

C.1.5.3 pSEAP2-Basic (4677 bp)

Der pSEAP2-Basic Vektor (Clontech, Heidelberg) erlaubt die Expression des Reporterproteins sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP). Dieser Vektor besitzt weder eukaryontische Promotor-Elemente noch Enhancer-Sequenzen. In die multiple Klonierungsstelle (MCS) können putative Promotor-Fragmente stromaufwärts des SEAP-Gens inseriert werden. Potentielle Enhancer-Elemente können entweder in die MCS oder auch in stromabwärts liegende Restriktionsstellen kloniert werden. Auf die kodierende Sequenz des SEAP-Gens folgt das späte Polyadenylierungssignal von SV40, wodurch eine korrekte und effiziente Prozessierung des SEAP-Transkripts in eukaryontischen Zellen gewährleistet wird. Der Vektor enthält außerdem einen f1-Ursprung für ssDNA-Produktion sowie einen pUC-Replikationsursprung für eine effiziente Amplifikation in *E. coli*. Außerdem trägt er das Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker.

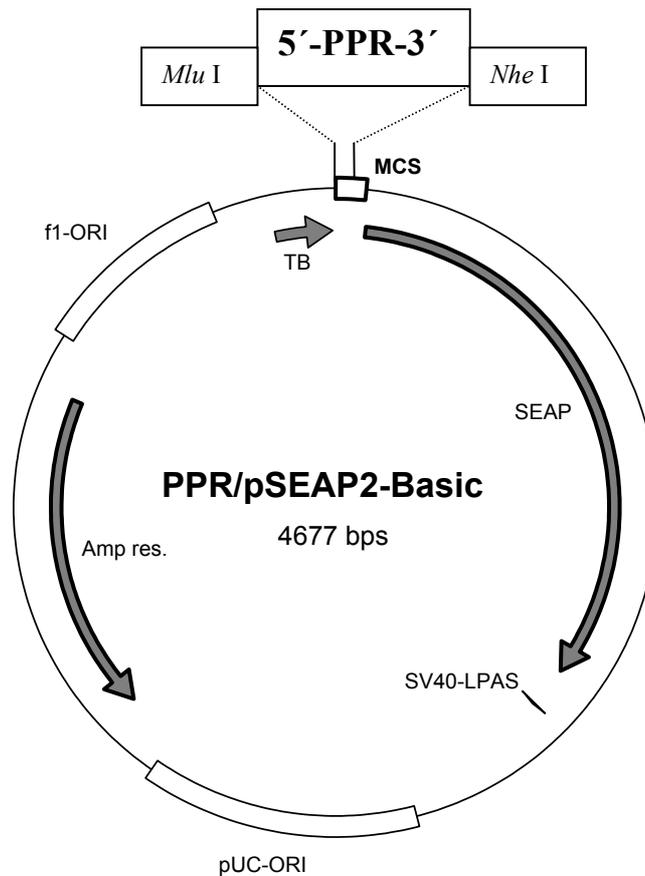


Abb. C 2 Plasmidkarte des Reportergenplasmids PPR/pSEAP2-Basic mit *Mlu*I und *Nhe*I Restriktionsschnittstellen. PPR, putative Promotorregion; MCS, multiple Klonierungsstelle; SEAP, Gen der sekretorischen alkalischen Phosphatase; SV40-LPAS, spätes mRNA-Polyadenylierungssignal von SV40; Amp res., Ampicillin-Resistenzgen; TB, Transkriptionsblocker; pUC-ORI, Plasmidreplikationsursprung in *E. coli*; f1-ORI, ssDNA-Replikationsursprung.

C.1.5.4 pSEAP2-Control (5115 bp)

Der pSEAP2-Control Vektor besteht aus dem Plasmid pSEAP2-Basic mit einem SV40 Promotor stromaufwärts des SEAP-Gens und einem SV40 Enhancer stromabwärts des SV40 Polyadenylierungssignals. Durch diese Promotor- und Enhancerelemente ist eine starke Expression der sekretorischen alkalischen Phosphatase gewährleistet. Dieser Vektor dient deshalb sowohl für eine effektive Transfektion als auch für das Detektionssystem als Positivkontrolle, da dieses Vektorkonstrukt SEAP in den meisten eukaryontischen Zelltypen exprimiert.

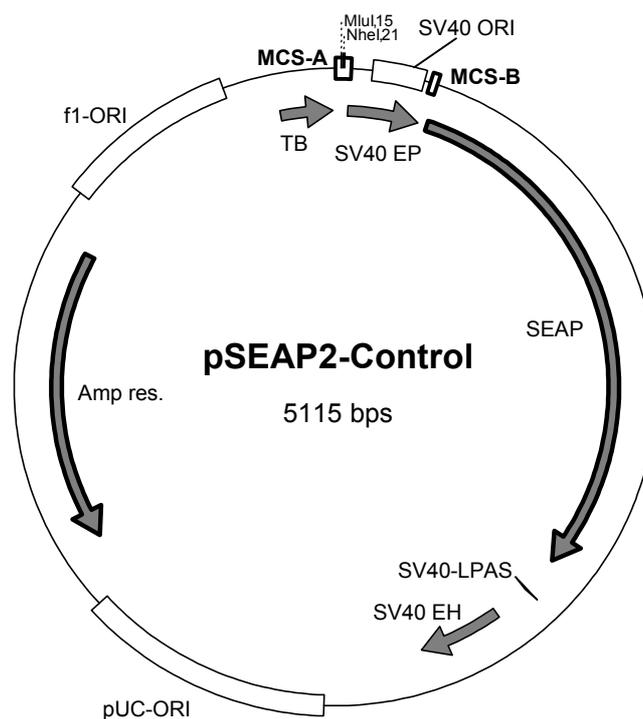


Abb. C 3 Plasmidkarte des Reportergenplasmids pSEAP2-Control mit den multiplen Klonierungsstellen A und B (MCS A und B). SV40 EP, SV40 Promotor; SV40 EH, SV40 Enhancer; SV40-ORI, SV40 Replikationsursprung; die restlichen Abkürzungen sind der Vektorkarte von pSEAP2-Basic zu entnehmen.

C.1.6 Software zur Genomanalyse

Diverse Programme von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

MatInspector V2.2 (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>)

WebGene (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene>)

C.2 Methoden

C.2.1 Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Alle mikrobiologischen Methoden wurden, falls im Text nicht anders vermerkt, analog den Anleitungen von Fritsch et al. (1989) durchgeführt.

Nährmedien wurden für die Dauer von 20 Minuten bei 121 °C unter einem Druck von $1,2 \times 10^5$ Pa autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden durch Filtration (0,2 µm Porengröße) sterilisiert und den auf < 50 °C abgekühlten Lösungen bzw. Nährmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Für feste Nährmedien (Platten) wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

Nährmedien

2 × YT-Medium:	16 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	10 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl

LB-Medium:	10 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	5 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

SOC-Medium:	20 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	10 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	1,2 g/l	MgSO ₄
	0,95 g/l	MgCl ₂
	20 g/l	D(+)-Glukose

Antibiotikum

Die Ampicillin-Stammlösung (200 mg/ml in 70 % Ethanol) wurde aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Die Zugabe zu den Nährmedien erfolgte bei einer Temperatur < 50 °C, wobei die Endkonzentration des Ampicillins 200 µg/ml betrug.

Stammhaltung

Bakterienstämme in Form von Verdünnungsausstrichen wurden nach dem Bebrüten maximal 6 Wochen bei 4 °C (gegebenenfalls unter Antibiotika-Selektionsdruck) gelagert. Für eine Langzeitkonservierung wurden ausgehend von Einzelkolonien Glycerinstammkulturen angelegt. Hierfür wurden 850 µl einer ÜN-Kultur ($OD_{550nm} = 6-10$) mit 150 µl Glycerin versetzt (Glycerin-Konzentration: 0,15 v/v), aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Anzucht

Zur Bakterienanzucht für Plasmidisolierungen wurden 6 ml (Minipröp) bzw. 100 ml (Midi-pröp) 2 × YT-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und ÜN bei 37 °C mit 220 Upm geschüttelt. Die Bakterienernte erfolgte mittels Zentrifugation in 15 ml bzw. 50 ml Falcon-Röhrchen.

C.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte im analytischen Maßstab unter Verwendung des Plasmid Mini Kits der Fa. Qiagen. Für präparative Plasmid-Isolierungen wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen) oder der Mobius 1000 Kit (Novagen, USA) verwendet.

Die Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse der Zellen freigesetzt (Birnboim et al., 1979), wobei Zellwandbestandteile sowie genomische DNA durch einen Zentrifugationsschritt sedimentiert wurden. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde nun selektiv an ein Trägermaterial (Anionenaustauscher) gebunden und durch Waschen von Verunreinigungen (RNA, Proteine, Metabolite und andere niedermolekulare Verunreinigungen) befreit. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte unter Hochsalzbedingungen mit anschließender Präzipitation durch Isopropanol. Das in der gefällten DNA enthaltene Salz wurde durch Waschen mit 70 %igem Ethanol entfernt.

C.2.3 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Eine Extraktion und Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen (z.B. Restriktionsansatz) erfolgte durch Phenolextraktion. Dabei wurde die DNA-haltige Lösung mit einem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) im Verhältnis 1:1 (v/v) ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation (14000 Upm; 5 min) wurde die wässrige, DNA-haltige Phase abgenommen und durch Ethanolfällung konzentriert.

Hierbei wurden die DNA-haltigen Lösungen mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt und gut gemischt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (abs.) wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation (14000 Upm; 30 min; 4 °C) sedimentiert. Anschließend wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut wie oben beschrieben sedimentiert.

Die Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen erfolgte photometrisch, wobei $A_{260\text{nm}} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger, bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA entspricht. Bei einem Quotienten von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8 - 2,0$ kann von einer proteinfreien DNA-Lösung ausgegangen werden.

C.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke wurde die DNA in Agarosegelen (0,5-3,0 %, abhängig von der Fragmentgröße) in einer Horizontalgelapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde die Agarose in 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt) suspendiert und durch Kochen in der Mikrowelle gelöst.

Zur Visualisierung der Nukleinsäuren im UV-Licht wurde der Agarose-Lösung 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die benutzten Gelvolumina betragen je nach Probenvolumen und Probenzahl 50 ml, 100 ml bzw. 150 ml. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6 × Farbmaler (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 0,25 % (w/v) Orange G) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Feldstärke von 5-7 V/cm über eine Dauer von 1-3 Stunden. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographisch dokumentiert.

C.2.5 DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von niedermolekularen PCR-Produkten wurden die Nukleinsäuren in einer vertikalen Polyacrylamid-Elektrophorese in 14,5 % Polyacrylamid-Gelen (1,5 mm × 150 mm × 140 mm) aufgetrennt.

Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 %: Fertiglösung 37,5 : 1

5 × TBE-Puffer: 54 g/l Tris, 27,5 g/l Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0

10 % APS: 100 g/l Ammoniumperoxodisulfat

TEMED-Lösung (gebrauchsfertig)

Sammelgel (3 %; 0,5 % TBE)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 %:	0,4 ml
5 × TBE-Puffer:	0,5 ml
H ₂ O:	4,0 ml
10 % APS:	0,04 ml
TEMED:	0,004 ml
Gesamtvolumen:	4,944 ml

Trenngel (14,5 %; 0,5 % TBE)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 %:	10,8 ml
5 × TBE-Puffer:	3,0 ml
H ₂ O:	16,0 ml
10 % APS:	0,20 ml
TEMED:	0,02 ml
Gesamtvolumen:	30,02 ml

Probenvorbereitung und Elektrophorese

6 × DNA-Probenpuffer: 2,5 g/l Bromphenolblau, 2,5 g/l Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin

0,5 × TBE-Laufpuffer: 5,4 g/l Tris, 2,75 g/l Borsäure, 1 mM EDTA

DNA-Größenstandards: 100 bp DNA-Ladder (Promega), Konzentration 0,13 µg/µl

ΦX174 DNA/*Hinf*I-Marker (Promega), Konzentration 1,0 µg/µl

Die Nukleinsäureproben wurden jeweils mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer gemischt und danach auf das Gel aufgetragen. Für die Größenbestimmung der DNA wurden 650 ng DNA-Größenstandard pro Spur verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur zuerst bei 300 V bis die Proben ins Sammelgel eingewandert waren, danach wurde die Spannung auf 400 V erhöht und die Proben 1,5 h im elektrischen Feld aufgetrennt.

Silberfärbung der DNA

Um maximale Detektionssensitivität zu erreichen, wurden Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen mittels Silberfärbung nachgewiesen.

Schritt	Reagenzien	Zeit (min)
1. Fixieren	100 ml Essigsäure 300 ml Ethanol, vergällt ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest}	3-5
2. Versilbern	0,1 g Silbernitrat ad 100 ml mit H ₂ O _{dest}	30
3. Waschen	mehrmals mit H ₂ O _{dest}	kurz
4. Entwicklung	3,5 g NaOH-Plätzchen ad 300 ml mit H ₂ O _{dest} 1,0 ml 37 % Formaldehyd-Lösung 30 mg Natriumborhydrid, wird erst unmittelbar vor der Verwendung zugegeben	10-30
5. Stoppen	50 ml Essigsäure ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest}	10

Tab. C 1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

C.2.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde die zu isolierende DNA-Bande unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAEX II Gel-Extraktions-Kits (Fa. Qiagen) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

C.2.7 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzbestimmung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die Cycle-Sequencing-Reaktion wurde mit Hilfe des PE Biosystems-Sequenzier-Kits in Gegenwart von 500 ng Template-DNA und 20 pmol Sequenzieroligonukleotid in einem PCR-Thermoblock (94 °C, 15 sec; 50 °C, 30 sec; 60 °C, 2 min; 30 Zyklen) durchgeführt.

Die Sequenzanalyse wurde an einem ABI Sequenziergerät 373A durch die Firma MediGenomix, Martinsried ausgeführt.

C.2.8 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde DNA entsprechend den jeweiligen Herstellerprotokollen spezifisch geschnitten. Für analytische Zwecke (2 µg DNA) betrug die Inkubationszeit 1-2 Stunden, für präparative Spaltungsansätze (5-20 µg DNA) 4-16 Stunden. Die Vollständigkeit der DNA-Spaltung wurde durch eine Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

C.2.9 Ligierung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Im Allgemeinen wurden in einem Ligationsansatz (10 µl) 100 ng (20-50 fmol) linearisierte Plasmid-DNA mit einem 20-50fachen molaren Überschuss an Fragment-DNA, zusammen mit 2 U T4-DNA-Ligase und 1/10 Volumen des vom Hersteller mitgelieferten 10fach Puffers 16 Stunden bei 16 °C inkubiert.

C.2.10 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation (Dower et al., 1988). Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 500 ml 2 × YT-Medium mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer $OD_{550nm} = 0,8$ bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und in sterilen Zentrifugenbechern sedimentiert (5000 × g, 10 min). Das Zellsediment wurde zweimal mit sterilem, eiskaltem Wasser gewaschen, danach im gleichem Volumen 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und

in 50 µl-Portionen aliquotiert. Die so hergestellten elektrokompenten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Durchführung der Transformation wurden 2 µl des Ligierungsansatzes (siehe C.2.9) bzw. 0,5 ng salzfreie Plasmid-DNA mit 50 µl Suspension der elektrokompenten Zellen vermischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Spaltbreite 2 mm, Fa. Eurogentec) überführt. Die Elektroporation erfolgte gemäß den Angaben der Fa. Bio-Rad mit dem Gene Pulser (Spannung: 2,5 kV, Kondensatorkapazität: 25 µF, Parallelwiderstand: 200 Ω). Nach dem Strompuls wurden die Transformationsansätze sofort in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und bei 37 °C und 150 Upm für 60 min inkubiert. Anschließend wurden 50-900 µl dieser Zellsuspension auf Selektivmedium-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

C.2.11 PCR-Amplifikation von DNA

Die Durchführung der PCR-Reaktionen (Saiki et al., 1988) erfolgte mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen (siehe C.1.2) gemäß den Herstellerangaben. Ein typischer PCR-Ansatz (50 µl) enthielt < 1,0 ng DNA-Matrize, je 200 nM der beiden Oligonukleotid-Primer, 1,25 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 2,5 mM MgCl₂, 1 U DNA-Polymerase und 5 µl 10 × PCR-Reaktionspuffer. Das gewählte Temperaturprofil wurde jeweils optimiert und ist bei den einzelnen Anwendungen detailliert beschrieben. Die hergestellten PCR-Amplifikationsprodukte wurden vor einer weiteren Verwendung (z.B. Ligation) über eine präparative Agarosegel-Elektrophorese (siehe C.2.6) gereinigt.

C.2.12 RNA ligase-mediated rapid amplification of 5'-cDNA ends (RLM-RACE)

C.2.12.1 Verwendete Oligonukleotide

RNA-Adapteroligo: 5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAA
GGAGUAGAAA-3'

5'-Adapterprimer: 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

5'-Nested-Adapterprimer: 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

PPK-r-139 (Exon 2): 5'-TAGCAAACAAGGAAATGAAATA-3'

PPK-r-124-e-*NheI* (Exon 2): 5'-GCTAGCTGAAATAAGTTGCTTGCTTGAATAAAA-3'

C.2.12.2 Prinzip und Durchführung

Die RLM-RACE-Technik basiert auf einem weiterentwickelten RACE-Protokoll, wobei die eingesetzte RNA vor der cDNA-Synthese so vorbehandelt wird (Abbildung C 4), dass bei der RACE-Reaktion nur RNA-Moleküle mit einer Cap-Struktur erfasst werden. Grundsätzlich enthält ein RNA-Pool nach der Isolation aus Geweben zum einen Transkripte mit vollständigem 5'-Ende und intakter Cap-Struktur, zum anderen eine Population verkürzter Transkripte, die durch RNA-Abbaureaktionen entstanden sind.

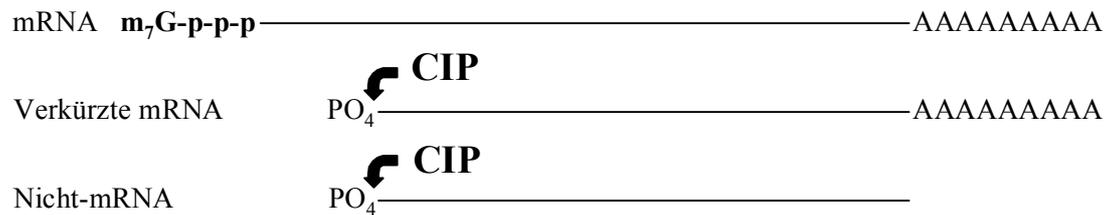
Für die Bestimmung des Transkriptionstarts sind nur solche RNA-Transkripte von Interesse, die eine intakte 5'-Cap-Struktur (7-Methylguanosintriphosphat) besitzen. Damit selektiv nur diese erfasst werden, wird die RNA zunächst mit Phosphatase (calf intestinal phosphatase = CIP) behandelt, um die 5'-Phosphatreste der verkürzten Transkripte abzuspalten; demzufolge kann das RNA-Adapteroligonukleotid nicht mehr an die verkürzten RNA-Moleküle ligiert werden. Im nächsten Schritt wird nun die dephosphorylierte RNA mit Pyrophosphatase (tobacco acid pyrophosphatase = TAP) inkubiert, wodurch die 5'-Cap-Struktur abgespalten wird. Somit weisen nur jene Transkripte, die ursprünglich eine Cap-Struktur trugen, eine freie 5'-Phosphatgruppe auf, an die in einer nachfolgenden T4-RNA-Ligationsreaktion ein RNA-Adapteroligonukleotid angefügt wird. Durch dieses RNA-Oligonukleotid wird eine Bindungsstelle für den Vorwärts-Primer der PCR in das Molekül eingeführt.

Nach reverser Transkription liegt nun eine cDNA-Population vor, die ausschließlich von mRNA-Molekülen mit Cap-Struktur abstammt, und zusätzlich an ihrem 5'-Ende eine Bindungsstelle für einen Adapterprimer trägt; somit ist es möglich, eine PCR-Reaktion mit nur einem genspezifischen Primer (Rückwärts-Primer) durchzuführen, da alle cDNA-Moleküle die Bindungsstelle für den Adapterprimer (Vorwärts-Primer) besitzen.

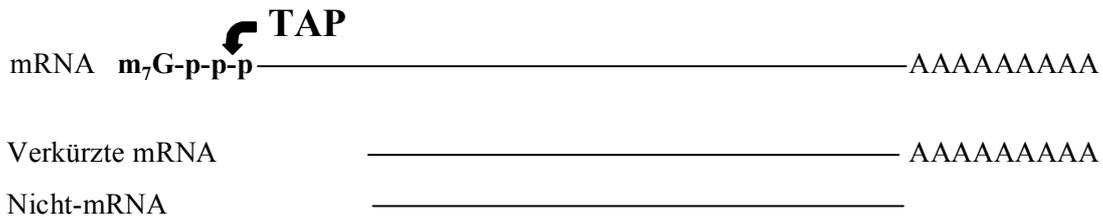
Die RLM-RACE-Reaktion wurde mit jeweils 250 ng mRNA verschiedener Gewebe der Fa. Clontech (Leber, Pankreas, Niere und Testis) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

In die nachfolgenden PCR-Reaktionen wurden jeweils 1 µl des Reaktionsgemisches oder 1 µl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Um die Spezifität der DNA-Amplifikation zu erhöhen, wurden grundsätzlich zwei PCR-Reaktionen (erste PCR und nested PCR) zur Transkriptionsstartdetektion durchgeführt.

I Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen mit CIP



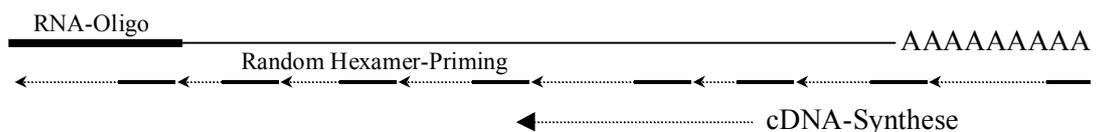
II Abspaltung der 5'-Cap-Struktur mit TAP



III Ligation des RNA-Oligonukleotids (nur bei Transkripten, die eine Cap-Struktur besitzen)



IV Reverse Transkription



V Amplifikation des Transkriptionsstarts mittels nested PCR

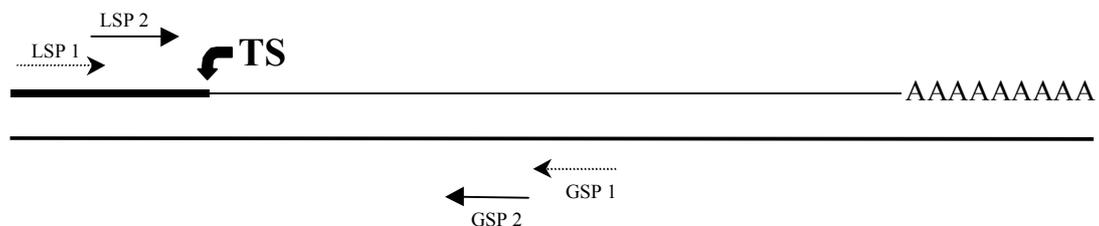


Abb. C 4 RLM-RACE-Prinzip. $m_7G-p-p-p$, 7-Methylguanosintriphosphat (5'-Cap-Struktur); CIP, calf intestinal phosphatase; TAP, tobacco acid pyrophosphatase; TS, Transkriptionsstart; LSP, linkerspezifischer Primer; GSP, genspezifischer Primer.

C.2.12.3 PCR-Ansatz

5 × ThermoZyme Puffer:	10 µl
dNTP's (jeweils 10 mM):	1 µl
5'-Adapter-Primer (10 µM):	1 µl
PPK-r-139 (10 µM):	1 µl
H ₂ O:	35 µl
ThermoZyme-DNA-Polymerase:	1 µl
cDNA-Template:	1 µl
Gesamtvolumen:	50 µl

Die Amplifikation erfolgte in 45 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil:

Anfangsdenaturierung:	95 °C; 2 min
Denaturierung:	95 °C; 15 sec
Annealing:	56 °C; 30 sec
Elongation:	72 °C; 90 sec
Auffüllreaktion:	72 °C; 10 min

Die zweite (nested) PCR erfolgte mit dem 5'-Nested-Adapteroligonukleotid und dem genspezifischen PPK-r-124-e-*NheI*-Primer, wobei als Template 1 µl einer 1:10 Verdünnung aus der ersten PCR eingesetzt wurde. Das Amplifikationsprogramm entsprach dem aus der ersten PCR, jedoch mit einer Annealing-Temperatur von 64 °C und einer Zyklenzahl von 35.

Danach erfolgte die Analyse der Proben durch eine Agarosegel-Elektrophorese. Nach Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCRII-TOPO wurde der Transkriptionsstart mittels DNA-Sequenzierung analysiert.

C.2.13 Genome Walker Verfahren

C.2.13.1 Verwendete Oligonukleotide

Adapter Primer 1 (AP1): 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Adapter Primer 2 (AP2): 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'

PPK-r-82 (Exon 1): 5'-AATTGCTTCTTGGAGGTGAGT-3'

PPK-r-44-e-*NheI* (Exon 1): 5'-GCTAGCTGAACGGTCTTCAAGCTGTTCT-3'

C.2.13.2 Beschreibung und Durchführung

Die Genome Walker Technik (Clontech, Heidelberg) ermöglicht, ausgehend von einer bekannten DNA-Sequenz, ein rasches „Wandern“ stromauf- bzw. stromabwärts auf dem Chromosom (Chromosome Walking), um in noch unbekannte Sequenzbereiche (z.B. Promotorelemente) vorzustoßen (Siebert et al., 1995). Bei diesem Verfahren werden vier genomische DNA-Bibliotheken (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *SspI*) eingesetzt, die durch Restriktionsverdau von hochreiner genomischer DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (6-Basenerkennungssequenz, nicht überhängende Enden) erhalten wurden. Nach dem Verdau werden spezifische Oligonukleotide (Genome Walker Adapter) an die 5'- bzw. 3'-Enden der DNA-Fragmente ligiert. Somit kann ein spezielles genomisches DNA-Fragment, dessen Sequenz zum größten Teil unbekannt ist, mit einem genspezifischen und einem dem Genome Walker Adapter komplementären Oligonukleotid in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden.

Um eine höhere Spezifität zu erreichen, wurden in der Regel zwei PCR-Amplifikationsrunden (erste PCR und nested PCR) zur Vervielfältigung des putativen Promotorabschnittes des PPK-Gens durchgeführt.

PCR-Ansatz

H ₂ O:	37,8 µl
10 × <i>Tth</i> -Reaktionspuffer:	5,0 µl
dNTPs (jedes 10 mM):	1,0 µl
MgAc (25 mM):	2,2 µl
Adapter Primer (10 µM):	1,0 µl
PPK-Primer (10 µM):	1,0 µl
PCR-Polymerase Mix (50 ×):	1,0 µl
DNA-Bibliothek (5 ng):	1,0 µl
Gesamtvolumen:	50 µl

Bei der ersten PCR wurden der äußere Adapter Primer (AP1) und das PPK-spezifische Oligonukleotid PPK-r-82 verwendet. Die Ampkifikation erfolgte in 45 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil: Anfangsdenaturierung 1 min bei 94 °C, Denaturierung 15 sec bei 94 °C, Annealing 30 sec bei 52 °C, Elongation 3 min bei 68 °C gefolgt von einer dreiminütigen Auffüllreaktion bei 68 °C. Die zweite PCR erfolgte mit dem Nested Adapter Primer (AP2) und dem PPK-r-44-e-*NheI*-Oligonukleotid unter Verwendung von 1 µl Template aus der ersten PCR. Das Thermoprofil entsprach dem der ersten PCR, mit der Ausnahme, dass in der zweiten PCR die Annealing-Temperatur 62 °C betrug und nur mit 30 Zyklen amplifiziert wurde. Nach der zweiten PCR wurden die Proben mit Hilfe einer Agrosegelelektrophorese analysiert und anschließend zur Sequenzierung in den pCRII-TOPO-Vektor inkloniert. Die Sequenzierungsreaktion wurde mittels vektorspezifischer Oligonukleotide durchgeführt.

C.2.14 Herstellung von Reportergenplasmiden

Nachdem durch die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente aus der Genome Walker Reaktion sichergestellt war, dass es sich hierbei um 5'-PPK-Genfragmente handelte, wurde das längste DNA-Segment in den pSEAP2-Basic Vektor inkloniert. Hierzu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *NheI* geschnitten und danach präparativ mittels einer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (siehe C.2.6).

In analoger Weise wurden die 5'-PPK-Fragmente mit den o.g. Restriktionsendonukleasen aus dem pCRII-TOPO-Vektor ausgeschnitten und über ein Agarosegel gereinigt. Danach wurden die putativen PPK-Promotorfragmente in den pSEAP2-Basic Vektor ligiert (siehe C.2.9).

Anschließend wurden kompetente *E. coli* Zellen (TG 1) mittels Elektroporation mit den Reportergenplasmiden transformiert und auf ampicillinhaltigen Nähragarplatten selektioniert. Nachdem durch Restriktionsanalyse der Plasmide sichergestellt worden war, dass alle Konstrukte die korrekte Größe besaßen, wurde von diesen Klonen eine Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxi-Präp., Mobius 1000 Kit; siehe C.2.2) durchgeführt. Nach der photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung wurden die Plasmide bis zur Transfektion von eukaryontischen Zellen bei -20 °C aufbewahrt.

C.2.15 Transfektion von HepG2- und HEK 293-Zellen

Alle Transfektionen wurden mit dem FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. FuGENE 6 ist ein lipidbasierendes Multikomponenten-Transfektionsreagenz, das zuerst die Fremd-DNA komplexiert und diese anschließend während der Transfektion durch die Zellmembran in das Cytoplasma transportiert.

C.2.15.1 Durchführung der Transfektion mit Reportergenplasmiden

Die Transfektion der HepG2- bzw. HEK-293 Zellen wurde in Mikrottestplatten mit 12 Kavitäten durchgeführt, wobei zunächst die Zellen aus einer konfluent bewachsenen 75 cm² Kulturflasche geerntet und in einem Verhältnis von 1:4 mit Medium verdünnt wurden. Danach wurden die Zellen in die 12 Kavitäten einer Mikrottestplatte in einem Gesamtvolumen von jeweils 2 ml RPMI- bzw. DMEM-Medium mit FKS ausgesät. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37 °C unter 5% CO₂-Begasung hatten die Zellen 50-70 % Konfluenz erreicht und konnten nun mit den pSEAP2-Vektorkonstrukten transfiziert werden.

Die maximale Transfektionseffizienz wurde in Vorversuchen mit verschiedenen Verhältnissen von Transfektionsreagenz zu DNA-Menge ermittelt.

FuGENE 6/DNA	FKS-freies Medium	FuGENE 6	DNA
3:2	100 µl	3 µl	2 µg
3:1	100 µl	3 µl	1 µg
3:0,5	100 µl	6 µl	1 µg

Tab. C 2 Transfektionsansätze

Die Transfektionsansätze wurden entsprechend Tabelle C 2 in Eppendorf-Reaktionsgefäßen hergestellt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz tropfenweise den einzelnen Kavitäten, die vorher mit 900 µl RPMI- bzw. DMEM-Medium + FKS befüllt worden waren, zugegeben (Endvolumen 1 ml pro Kavität).

Die erste Messung des Reporterproteins SEAP wurde 24 h nach Beginn der Transfektion durchgeführt und nach 48 h wiederholt.

C.2.16 Detektion und Quantifizierung des Reporterproteins SEAP

Das SEAP-Reporter System mit den Vektoren pSEAP2-Basic und pSEAP2-Control stellt ein ausgereiftes und sehr sensitives System für die Analyse von eukaryontischen Promotoren und Enhancern dar. Das Reportermolekül SEAP ist eine verkürzte Form der sekretorischen alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta (Berger et al., 1988). Das Chemolumineszenz-Substrat CSPD ermöglicht die Detektion von SEAP mit einer unteren Nachweisgrenze von 100 fg; somit ist das System 10fach sensitiver als der *Photinus pyralis* Luciferase-Assay. Die Nachweisreaktion für SEAP verläuft über einen weiten Bereich der Enzymaktivität ($1-10^4$) linear, wodurch vergleichende Analysen verschiedener Promotorstärken ermöglicht werden.

Das SEAP-Reportergen codiert eine verkürzte Form des Plazentaenzyms, dem die Membranankerdomäne fehlt; dadurch wird eine effiziente Sekretion aus den transfizierten Zellen ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass SEAP-Aktivitätsunterschiede, die im Kulturmedium transfizierter Zellen gemessen wurden, direkt proportional zu den Unterschieden der intrazellulären SEAP-mRNA bzw. des SEAP-Proteins sind (Berger et al., 1988; Cullen & Malim, 1992). Das SEAP-Protein ist extrem hitzestabil und resistent gegenüber dem Phosphatase-Inhibitor L-Homoarginin (Cullen & Malim, 1992). Dadurch kann endogene alkalische Phosphatase durch eine Inkubation bei 65 °C und durch Komplexbildung mit L-Homoarginin inaktiviert werden.

C.2.16.1 SEAP-Bestimmung

Die Bestimmung der SEAP-Aktivität wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten durchgeführt. In jede Kavität wurden 15 µl Zellkulturüberstände von HepG2- bzw. HEK 293-Zellen eingesetzt. Anschließend wurden in jede Kavität 45 µl Assay-Puffer zugegeben und 30 min bei 65 °C inkubiert (Inaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase). Nach Abkühlung auf RT wurden in alle Kavitäten zuerst 45 µl Substratpuffer und danach 45 µl CSPD-Substrat pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation mit dem CSPD-Substrat wurde ein Röntgenfilm auf die Mikrotiterplatte gelegt, und 15 bzw. 45 min exponiert. Alternativ wurde die SEAP-Aktivität mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert.

Zusätzlich zu den pSEAP-PPK-Promotor-Konstrukten wurden Negativkontrollen (Zellen transfiziert mit pSEAP2-Basic ohne Insert) und Positivkontrollen (Zellen transfiziert mit pSEAP2-Control) durchgeführt. Weitere Kontrollen stellten Medium von nicht-transfizierten Zellen sowie Medium mit exogen zugefügter sekretorischer alkalischer Phosphatase dar. Alle Transfektions- bzw. Detektionsansätze wurden sechsfach durchgeführt.

C.2.17 Erzeugung von PPK-Promotorverkürzungsvarianten

Um essentielle Promotorelemente zu bestimmen, wurden, ausgehend von einem 1729 bp Fragment, insgesamt neun verschiedene PPK-Promotorverkürzungsvarianten (PVV) hergestellt. Zur Generierung der PVV wurde derselbe Rückwärtsprimer (PPK-r-44-e-*NheI*) benutzt, die Vorwärts-Primer waren so ausgewählt, dass am 5'-Ende sukzessive verkürzte Produkte erhalten wurden. Alle Vorwärts-Primer besitzen an ihrem 5'-Ende eine *MluI*-Schnittstelle (Tab. C 3). Als Template wurde das P-1729/pSEAP2-Basic-Konstrukt eingesetzt und die PCR wurde in gleicher Weise wie in C.2.12.3 beschrieben durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert und anschließend mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Nach Sequenzüberprüfung erfolgte die Umklonierung in das Reporter-genplasmid pSEAP2-Basic wie bereits unter C.2.14 beschrieben wurde.

Variante	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
PVV-1	5'-ACGCGTCTAGTCTGCTGCTGAAGCTGTT-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-2	5'-ACGCGTTCTTAAGGCAATTATTTTAGC-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-3	5'-ACGCGTAGTGTGGCCTTGCCTGAAGTA-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-5	5'-ACGCGTGCTAACGTGGAGGCTAGATAGA-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-6	5'-ACGCGTGTGGTGAAGTTAGGTTCTATCT-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-7	5'-ACGCGTGGGATGAGCGCTAGAACTCCT-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-8	5'-ACGCGTGACATCACTCCCTGAAATAGTT-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-9	5'-ACGCGTGATGTTTCATGGAATATGTTGAC-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>
PVV-10	5'-ACGCGTAATATTGCCTGCAGTGCCACAT-3'	PPK-r-44-e- <i>NheI</i>

Tab. C 3 Oligonukleotide zur Generierung der PPK-Promotorverkürzungsvarianten (PVV). Alle Vorwärts-Primer besitzen an ihrem 5'-Ende einen *MluI*-Linker; für die Erzeugung aller Varianten wurde als Rückwärts-Primer das Oligonukleotid PPK-r-44-e-*NheI* (siehe C.2.13.1) eingesetzt.

C.2.18 Amplifikation des Intron-1-Bereichs

C.2.18.1 Oligonukleotide

P-I1-of-878:	5'-GTTGGCAGAAACCCAAAG-3'
P-I1-if-Mlu-929:	5'-ACGCGTGTGCCACATTAGAACAGC-3'
P-I1-or-1776:	5'-CCCGAAGCTGTATGTTCA-3'
P-I1-ir-Nhe-1682:	5'-GCTAGCCACTTACCACAGGAAACT-3'

C.2.18.2 Durchführung

Mit dem Ziel, den Intron-1-Bereich des PPK-Gens auf seine Promotoraktivität zu untersuchen, wurde dieser Sequenzbereich zunächst mittels nested PCR aus humaner genomischer DNA von zwei verschiedenen Individuen amplifiziert.

1. PCR-Ansatz

H ₂ O:	35,5 µl
5 × Thermozyne Puffer:	10,0 µl
dNTPs (jedes 10 mM):	0,5 µl
P-I1-of-878 (10 µM):	1,0 µl
P-I1-or-1776 (10 µM):	1,0 µl
ThermoZyme (1 U/µl):	1,0 µl
genomische DNA (100 ng):	1,0 µl
Gesamtvolumen:	50,0 µl

2. PCR-Ansatz

H ₂ O:	35,5 µl
5 × Thermozyne Puffer:	10,0 µl
dNTPs (jedes 10 mM):	0,5 µl
P-I1-if-Mlu 929 (10 µM):	1,0 µl
P-I1-ir-Nhe-1682 (10 µM):	1,0 µl
ThermoZyme (1 U/µl):	1,0 µl
1/10-Verdünnung aus 1. PCR:	1,0 µl
Gesamtvolumen:	50,0 µl

Das Thermoprofil für die erste PCR war 2 min Anfangsdenaturierung, 35 Zyklen mit 15 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Annealing bei 50 °C und 90 sec Elongation bei 72 °C. Abschließend erfolgte eine zehnminütige Auffüllreaktion bei 72 °C. In die zweite (nested) PCR wurde als Template 1 µl einer 1/10-Verdünnung aus der ersten PCR eingesetzt. Das Thermocycler Programm entsprach dem der ersten PCR, allerdings mit einer Annealing-Temperatur von 54 °C und nur 30 Zyklen.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert und mit vektor-spezifischen Primern sequenziert. Nach Überprüfung der Sequenz wurden die PCR-Fragmente in den pSEAP2-Basic Vektor umklontiert (siehe C.2.14).

C.2.19 Quantitative PCR mittels der TaqMan-Technologie

C.2.19.1 Prinzip

Beim TaqMan-Verfahren wird die bei den einzelnen PCR-Zyklen entstandene Produktmenge mittels eines Fluoreszenz-Detektionssystem bestimmt, wodurch die Menge des ursprünglich eingesetzten Templates quantifiziert werden kann.

Der PCR-Ansatz enthält zusätzlich zu den Primern eine Oligonukleotid-Sonde, die sich spezifisch an eine Zielsequenz zwischen den Primern anlagert. Die Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (FAM oder VIC) und am 3'-Ende den Quencherfarbstoff TAMRA. Solange die Oligonukleotidsonde intakt ist, wird die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencher übertragen (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET), wodurch eine Fluoreszenzemission unterdrückt wird.

Während der Elongationsphase eines jeden PCR-Zyklus spaltet die *Taq*-Polymerase aufgrund ihrer 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität (Holland et al., 1991) die Sondenmoleküle. Dadurch wird die Quenchung des Reporterfarbstoffes aufgehoben, so dass seine Fluoreszenz detektiert werden kann (Abb. C 5). Während jeder PCR-Runde werden weitere Sondenmoleküle gespalten. Die gemessene Zunahme der Fluoreszenz ist während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion direkt proportional zur Menge des entstandenen Amplifikats, welche wiederum proportional zur eingesetzten Template-Menge ist.

Zur Quantifizierung der Template-Konzentration in einer Probe wird die Zykluszahl bestimmt, bei der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet (C_T -Wert, threshold cycle). Dieser Schwellenwert ist definiert als das Zehnfache der Standardabweichung der Fluoreszenzsignale in den Zyklen 3-15. Der C_T -Wert ist umso niedriger, je höher die Template-Konzentration in der Probe ist. Werden die C_T -Werte der Verdünnungsreihe eines Template-Standards linear gegen den Logarithmus der Template-Konzentrationen aufgetragen, so erhält man eine Eichgerade (siehe auch C.2.19.5), anhand der die Template-Konzentration in einer unbekannt Probe ermittelt werden kann (Heid et al., 1996).

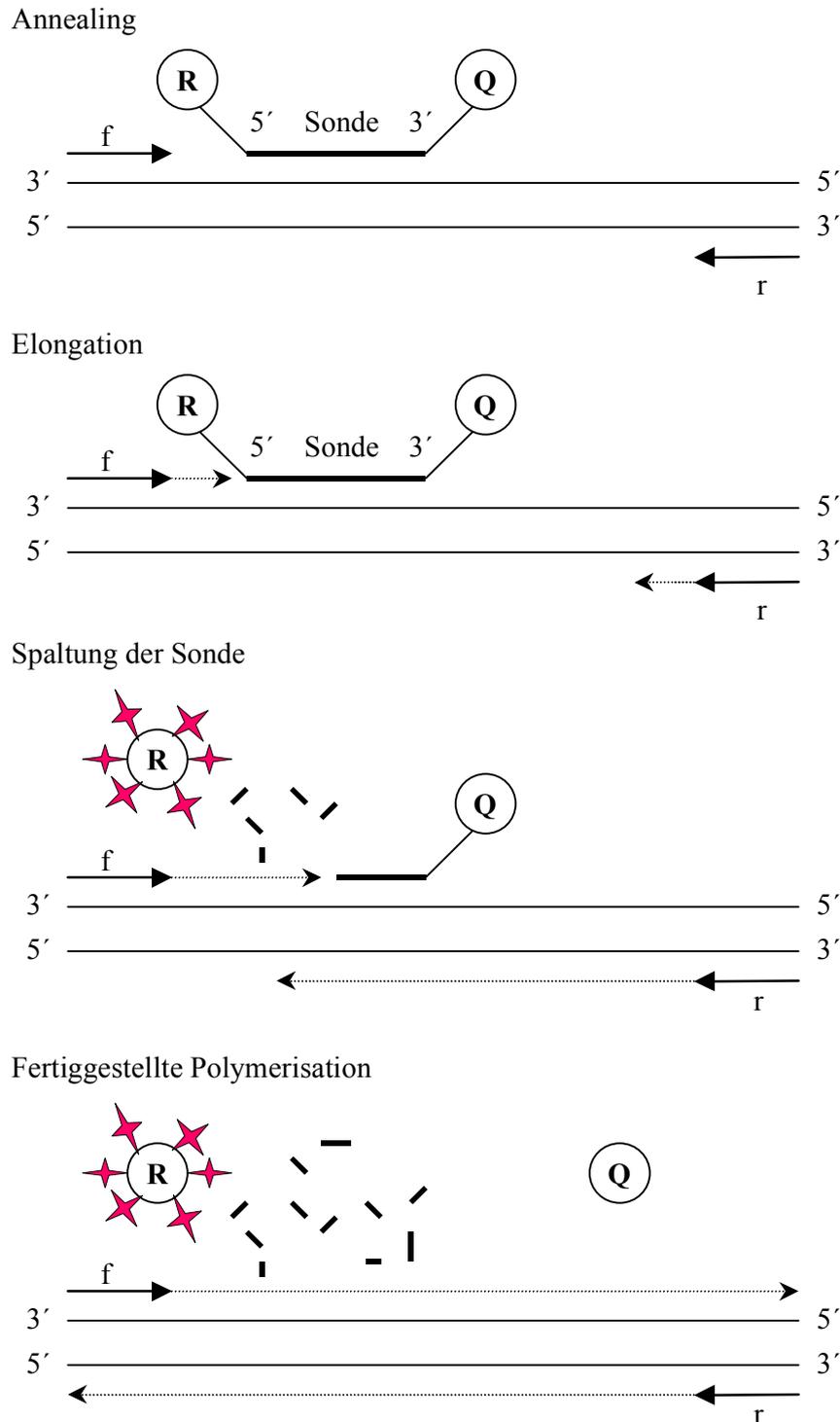


Abb. C 5 TaqMan Prinzip. f, Vorwärts-Primer; r, Rückwärts-Primer; R, Reporterfarbstoff; Q, Quencherfarbstoff.

C.2.19.2 cDNA aus humanen Geweben

Um die relative Expression der mRNAs von Plasmapräkallikrein, Faktor XI, Faktor XII, hochmolekularem und niedermolekularem Kininogen sowie von GAPDH in verschiedenen humanen Geweben zu untersuchen, wurden die Multiple Tissue cDNA Panels I und II der Fa.

Clontech, Heidelberg verwendet. Das Panel I enthält die cDNAs von Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Plazenta und Skelettmuskel, das Panel II die von Colon, Ovar, peripheren Leukozyten, Prostata, Dünndarm, Milz, Testis und Thymus.

Die cDNA-Präparationen sind aus poly(A)⁺-mRNAs hergestellt, die aus menschlichen Gewebepools (von bis zu 25 Individuen) stammen. Jede einzelne cDNA-Präparation wurde vom Hersteller auf eine etwaige Kontamination durch genomische DNA mittels eines PCR-Verfahrens untersucht. Die cDNA-Präparationen sind innerhalb des Panels auf die mRNA-Expressionslevel von vier verschiedenen Haushaltsgenen normalisiert. Zusätzlich sind die Panels untereinander kalibriert, um einen Vergleich zwischen den einzelnen Panels zu ermöglichen. Jede cDNA-Lösung hatte eine Konzentration von ~ 0,2 ng/μl.

C.2.19.3 Herstellung eines cDNA-Standards aus Leber-mRNA

Die Kalibrierungs-cDNA für die Standardkurven wurde aus 30 μg Leber Gesamt-RNA (Invitrogen, Groningen, NL) hergestellt, wobei der First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet wurde (siehe C.2.20.3). Die cDNA-Stammlösung wurde so eingestellt, dass 1 μl der Lösung genau 300 ng ursprünglich eingesetzter RNA entsprach. Die Abwesenheit von genomischer DNA in der Standard-cDNA Präparation wurde mittels PCR-Reaktion mit nachfolgender Analyse des Reaktionsgemisches durch eine PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft. Aliquotierte Proben der cDNA-Stammlösung wurden bei -80 °C aufbewahrt. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde für jeden Quantifizierungsversuch neu erstellt.

C.2.19.4 PCR-Effizienz und TaqMan-Standardkurve

Die PCR-Reaktion ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der im Falle einer 100 %igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt.

Sie kann daher mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$(1) Y = X_0(1 + E)^n$$

Y: Menge des Amplifikats

X₀: Kopienzahl zu Beginn der PCR

E: Effizienz der Reaktion

n: Anzahl der PCR-Zyklen

Zur Erstellung einer Standardkurve für die Ermittlung der PCR-Effizienz wird Gleichung (1) logarithmiert:

$$(2) \quad \log Y = \log X_0 + n \log(1 + E)$$

Beim TaqMan-Verfahren gilt:

$$(3) \quad X_T = X_0(1 + E)^{C_T}$$

X_T : Kopienzahl am Threshold (konstant)

X_0 : Kopienzahl am Anfang (variabel)

C_T : Threshold Zyklus (abhängig von X_0)

Logarithmierung der Gleichung (3) und Auflösung nach C_T ergibt:

$$(4) \quad \log X_T = \log X_0 + C_T \log(1 + E) \quad C_T = \frac{\log X_T}{\log(1 + E)} - \frac{1}{\log(1 + E)} \log X_0$$

Da $\frac{\log X_T}{\log(1 + E)}$ konstant ist, gilt:

$$(5) \quad C_T = K - \frac{1}{\log(1 + E)} \log X_0$$

Wird C_T gegen $\log X_0$ aufgetragen, so erhält man eine Gerade, mit der Steigung $-\frac{1}{\log(1 + E)}$

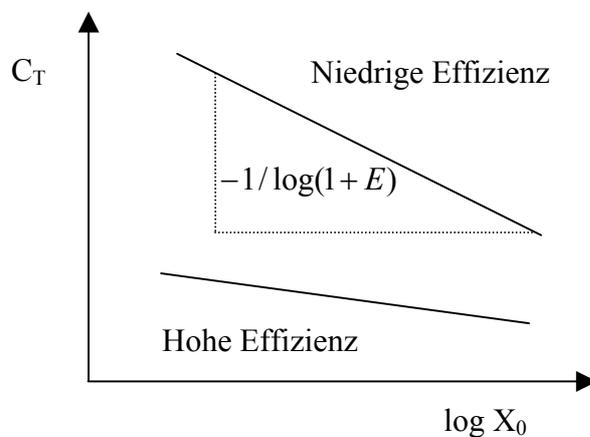


Abb. C 6 TaqMan-Standardkurven bei unterschiedlicher PCR-Effizienz.

Die Steigung der Geraden beschreibt die Effizienz der PCR-Reaktion.

$$(6) \quad s = -1/\log(1 + E) \quad E = 10^{-1/s} - 1$$

Die Effizienz der PCR hängt von mehreren Parametern ab, wie z.B. Reinheit der Probe, Basenzusammensetzung des Amplikons und Länge des Amplifikats. Sie ist umso höher, je kürzer das zu bildende Amplifikat ist; dies wurde beim Design der TaqMan-Amplikons berücksichtigt.

C.2.19.5 Relative Quantifizierung und Relative Standardkurve

Die Bestimmung der cDNA-Konzentration der einzelnen Gentranskripte erfolgte in Bezug auf die cDNA-Konzentration des jeweiligen Transkriptes in einer Standard-cDNA aus Leber; dies wird als relative Quantifizierung bezeichnet. Mengenangaben wurden auf die bei der cDNA-Synthese eingesetzte RNA-Menge bezogen (siehe C.2.19.3).

Für die Erstellung einer Standardkurve wurden, ausgehend von einer cDNA-Menge, die 300 ng RNA entsprach, fünf 1:5 Verdünnungen (60,0 ng, 12,0 ng, 2,4 ng, 0,48 ng und 0,096 ng RNA) hergestellt. Die für die sechs Standardlösungen ermittelten C_T -Werte wurden gegen den Logarithmus der Standardkonzentrationen aufgetragen. Anschließend wurde die Standardkurve durch lineare Regression berechnet.

Aus den gemessenen C_T -Werten der unbekanntenen Proben wurden anhand der Geradengleichung die dazugehörigen RNA-Mengen berechnet. Um die so erhaltenen Werte auf das Haushaltsgen (GAPDH) zu normieren, wurde jeweils der Quotient aus ng RNA (untersuchtes Gen) und ng RNA (GAPDH) gebildet. Diese dimensionslosen Zahlen geben an, wieviele cDNA-Kopien der analysierten Transkripte pro GAPDH-cDNA-Molekül in der Probe vorhanden sind. Die auf den endogenen Standard GAPDH normierten Werte ermöglichen es, die mRNA-Expression eines Gens in unterschiedlichen Geweben sowie die mRNA-Expression unterschiedlicher Gene im selben Gewebe zu vergleichen. Voraussetzung dafür ist, dass GAPDH-mRNA in allen Geweben annähernd im selben Umfang gebildet wird, und die reverse Transkription aller mRNAs mit gleicher Effizienz verläuft.

Für den Vergleich der untersuchten Gentranskripte (PPK, FXI, FXII, LK und HK) in den verschiedenen Geweben wurde jeweils die Expression in Leber als 100 % definiert.

C.2.19.6 TaqMan Primer und Sonden

Für die Konstruktion der Primer und Sonden wurde die Software Primer Express (PE Biosystems, Weiterstadt) oder Primer Designer (Scientific and Educational Software, Durham, NC, USA) verwendet. Für GAPDH wurden dieselben Sequenzen von Primer und Sonde wie im Kontrollreagenzien-Kit der Fa. PE Biosystems (P/N 402869) verwendet.

Grundsätzlich wurden die Primer- und Sondensequenzen so gewählt, dass sie entweder auf Exon/Exon-Übergängen und/oder in verschiedenen Exons lagen. Diese Vorkehrungen sollten eine Detektion von genomischer DNA ausschließen, die als Verunreinigung in den cDNA-Präparationen vorhanden sein könnte.

Der 3'-Quencherfarbstoff war bei allen verwendeten Sonden TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin), der 5'-Reporterfarbstoff war bei GAPDH VIC und bei allen anderen Sonden FAM (6-Carboxyfluorescein).

Die Primer und Sonden wurden von den Firmen MWG-Biotech, Ebersberg oder PE Biosystems, Weiterstadt synthetisiert. Die Sonden waren an ihrem 3'-Ende durch eine Phosphat- bzw. Amidgruppe blockiert, um eine Elongation durch die *Taq*-Polymerase zu verhindern.

Primer- und Sondensequenzen für die Transkriptquantifizierung von Plasma-Prokallikrein, Faktor XI, Faktor XII, Hoch- und Niedermolekulares Kininogen und GAPDH sind in Tabelle C 4 angegeben.

Plasma-Prokallikrein

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position im Gen
PPK-f-1190	GGAGCTCTGGTTACTCTTTGAGATTG	Exon 10
PPK-r-1348	ACAGGTGCCTCTGAGCTGTCA	Exon 11
PPK-sf-1229	ACA <u>A</u> CTCTG <u>T</u> CTGCACAACAAAAACAAGCACAC	Exon 10-11

Faktor XI

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position im Gen
FXI-f-869	TCTGGTTTCAGTCTACAA	Exon 8
FXI-r-970	AACAATATCCAGTTCTTCT	Exon 9
FXI-sf-898	CAGCATCCCAG <u>T</u> GTTCTG	Exon 8-9

Faktor XII

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position im Gen
FXII-f-166	CAGCTGTACCACAAATGTA	Exon 3
FXII-r-294	GCAGTGGT <u>CTTT</u> CACTTT	Exon 5-4
FXII-sr-274	TGGGCTCCAAACAGTATCCC	Exon 4

HK und LK

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position im Gen
Kg-f-185	CACTGGGAAT <u>GAT</u> CTCAC	Exon 9-10
Kg-sf-228	ACCTTTCCGATCATCACGAATA	Exon 10a
HKg-r-353	CTACGAGTATGCCCTTGT	Exon 10b
LKg-r-297	GTACTCGCAGGACCTTAG	Exon 11

GAPDH

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position im Gen
GAPDH-f-66	GAAGGTGAAGTCGGAGTCA	Exon 2
GAPDH-r-291	GAAGATGGTGATGGGATTTC	Exon 4
GAPDH-sr-262	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC	Exon 4

Tab. C 4 Primer- und Sondensequenzen für die TaqMan-Amplikons. Unterstrichene Basen bezeichnen Exon/Exon-Übergänge; f, Vorwärts-Primer; r, Rückwärts-Primer; sf und sr, Sonden.

C.2.19.7 TaqMan PCR-Bedingungen

Die PCR-Stammlösungen bestanden aus 12,5 µl TaqMan Universal MasterMix (Nr. 4304447, PE Biosystems), Wasser und den entsprechenden Lösungen von Primern und Sonde, so dass sich ein Gesamtvolumen von 24 µl ergab. Der Universal MasterMix besteht aus 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, AmpErase Uracil-N-glycosylase (= UNG), 2,5 mM dNTPs mit dUTP, passive Referenz 1 sowie aus optimierten Pufferbestandteilen.

1 µl des Leber cDNA-Standards, bzw. die zu quantifizierende cDNA-Probe (~ 0,2 ng) bzw. Wasser (Negativkontrolle) und 24 µl PCR-Stammlösung wurden in die Kavitäten einer MicroAmp Optical 96-well Platte (Nr. 403012, PE Biosystems) pipettiert.

Die optimierten Endkonzentrationen für Primer und Sonden sind in Tabelle C 5 zusammengestellt.

Gentranskript	Primerkonzentration (nM)	Sondenkonzentration (nM)
Plasma-Prokallikrein	200	150
Faktor XI	900	200
Faktor XII	200	150
HK	900	250
LK	900	250
GAPDH	200	150

Tab. C 5 Primer- und Sondenkonzentrationen in den TaqMan-PCRs. Für Vorwärts- und Rückwärts Primer wurden jeweils äquimolare Mengen eingesetzt.

In der TaqMan-PCR wurde folgendes Temperaturprofil für alle untersuchten Transkripte angewendet.

PCR-Schritt	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Spaltung mit UNG	120	50	-
Anfangsdenaturierung	600	95	-
Denaturierung	15	95	45
Annealing u. Elongation	60	60	

Tab. C 6 Temperaturprofil für die TaqMan-PCR. Amperase Uracil-N-Glycosylase (UNG) dient zum Abbau potentieller verschleppter uracilhaltiger DNA-Kontaminationen; Annealing und Elongation finden bei derselben Temperatur statt.

C.2.20 Bestimmung der Stabilität von PPK- und GAPDH-mRNA

Die Stabilität der mRNAs von PPK und GAPDH in Gegenwart der mechanistisch unterschiedlich wirkenden Transkriptioninhibitoren α -Amanitin, Actinomycin D sowie 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) wurde in HepG2-Zellen untersucht. α -Amanitin bindet an die große Untereinheit der RNA-Polymerase II (Kedinger et al., 1970; Lindell et al., 1970), wodurch die weitere Inkorporation von Ribonukleotiden in die entstehende RNA blockiert wird. Actinomycin D interkaliert in dsDNA und unterbindet dadurch die Progression der RNA-Polymerase II (Perry et al., 1970; Sobell, 1985). DRB inhibiert CDK7 und CDK9/PITALRE (Yankulov et al., 1995), wodurch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II stark reduziert wird (Dubois et al., 1994).

C.2.20.1 Zellkulturexperimente

HepG2-Zellen aus einer 75 cm² Zellkulturflasche wurden in einer 1:4 Verdünnung auf die 12 Kavitäten einer Mikrottestplatte verteilt und bis zur Konfluenz in RPMI-Medium mit FKS kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen und 2 ml RPMI-Medium mit FKS und den entsprechenden Verdünnungen der Transkriptionsinhibitoren zugegeben (siehe Tabelle C 6). Nach Inkubationszeiten von 2 h, 5 h, 8 h und 24 h wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5 ml TRI-Reagenz lysiert und die Gesamt-RNA isoliert (siehe C.2.20.2).

TK-Inhibitor	Inhibitor-Konzentration (µg/ml)			
α-Amanitin	0	5,0	10,0	20,0
Actinomycin D	0	2,5	5,0	10,0
DRB	0	12,5	25,0	50,0

Tab. C 7 Eingesetzte Konzentrationen der verschiedenen Transkriptionsinhibitoren.

C.2.20.2 RNA-Isolierung aus HepG2-Zellen

Die Extraktion der RNA erfolgte in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987).

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Kavität einer Mikrottestplatte geerntet, in 0,5 ml TRI-Reagenz (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und kräftig durchmischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurde der Ansatz 15 sec geschüttelt (Vortex-Mischer) und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Phasentrennung mittels Zentrifugation (12000 g; 15 min; 4 °C). Die obere Phase, die die RNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen - um zu vermeiden, dass DNA aus der Interphase mitisoliert wird - und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isoopropanol gefällt, und das Reaktionsgemisch nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (12000 g; 15 min; 4 °C). Das erhaltene Sediment wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet, und in 20 µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei OD_{260nm} bestimmt, wobei zur RNA-Qualitätskontrolle zusätzlich das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} ermittelt wurde. Diese RNA-Präparationen wurden entweder sofort in die cDNA-Synthese eingesetzt, oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

C.2.20.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des cDNA-Synthese Kits von Amersham Pharmacia, Freiburg gemäß den Herstellerangaben. Da ein Vergleich unterschiedlicher Primingmethoden (Genspezifisches Priming, Oligo-dT-Priming und Random-Hexamer Priming) bei Hexamer-Priming die höchste Effizienz ergeben hatte, wurde ausschließlich dieses Verfahren eingesetzt.

C.2.20.4 Bestimmung von mRNA-Halbwertszeiten mittels quantitativer RT-PCR

Zur Quantifizierung der PPK- und GAPDH-mRNA wurden die relativen Kopienzahlen in den verschiedenen cDNA-Präparationen mittels des TaqMan-Verfahrens (siehe C.2.19) bestimmt. Es wurde jeweils 1 µl cDNA-Lösung eingesetzt. Zur Ermittlung der Halbwertszeit wurde die relative Kopienzahl gegen die Inkubationszeit mit dem entsprechenden Transkriptioninhibitor aufgetragen und die Halbwertszeit aus der Kurve entnommen.

C.2.21 Zellstimulation von HepG2-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Lipopolysacchariden (LPS)

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob die Expression von PPK-mRNA durch PMA oder LPS stimuliert werden kann.

Durch Tumorpromotoren wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) kann Proteinkinase C aktiviert werden. Proteinkinase C bindet insbesondere den Tumorpromotor Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) mit hoher Affinität und wird durch diese Bindung aktiviert. Die Aktivierung ist andauernd, weil dieser Phorbol-12-myristat-13-acetat, im Gegensatz zum natürlichen Liganden Diacylglycerin, deutlich langsamer abgebaut wird. Diese spezifische Aktivierbarkeit der Proteinkinase C durch Phorbol-12-myristat-13-acetat ermöglicht es, die Beteiligung des Enzyms an Signalübertragungswegen nachzuweisen. Deshalb kann durch die externe Zugabe von PMA in zellulären Modellsystemen überprüft werden, welche biologischen Antworten eines Signalübertragungsweges unter Beteiligung und Kontrolle von Proteinkinase C ablaufen.

Lipopolysaccharide (LPS) stellen den Hauptteil der Zellwand gram-negativer Bakterien dar. Sie werden häufig als Induktoren einer Entzündung eingesetzt, um die Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren wie z.B. Interleukine in *in vivo* Versuchen (z.B. Zellkultur) zu induzieren, die wiederum an Genregulationsprozessen beteiligt sind. Dadurch wird durch LPS-Stimulation die Synthese von sog. Akutphasen-Proteinen (C-reaktives Protein, Serumamyloide, Fibrinogen sowie verschiedene Protease-Inhibitoren) induziert.

C.2.21.1 Durchführung der Zellstimulationsversuche

HepG2-Zellen aus einer konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche wurden in einer Verdünnung von 1:4 in die 24 Kavitäten einer Mikrottestplatte verteilt, und bis zur Konfluenz in RPMI-Medium mit FKS kultiviert. Danach wurde das Medium gewechselt, und die Zellen mit RPMI-Medium ohne FKS für 24 h weiterkultiviert. Anschließend wurde das Medium wiederum abgenommen und mit unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle C 8) von PMA bzw. LPS in RPMI-Medium ohne FKS über die Zeiträume 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h und 48 h stimuliert.

Stimulans	Stimulations-Konzentrationen				
PMA	10 nM	50 nM	100 nM	150 nM	200 nM
LPS	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml

Tab. C 8 PMA- und LPS-Konzentrationen in HepG2-Stimulationsversuchen.

Die HepG2-Zellen wurden nach den jeweiligen Stimulierungszeiträumen mit 0,5 ml TRI-Reagenz lysiert. Die anschließende Gesamt-RNA-Präparation sowie die cDNA-Synthese erfolgte nach dem selben Prinzip, wie es in C.2.20.2 und C.2.20.3 beschrieben ist.

D ERGEBNISSE

D.1 Quantitative RT-PCR (TaqMan-Analyse)

D.1.1 Validierung der Methode

Um die Detektion von genomischer DNA, die unter Umständen in den untersuchten cDNA-Präparationen als Kontamination vorhanden war, in den TaqMan-Assays auszuschließen, wurden folgende Vorkehrungen getroffen.

Die Primer und Sonden der TaqMan-Amplikons von PPK, FXI, FXII, HK und LK wurden so konstruiert, dass entweder die Sonde oder einer der beiden Primer auf einem Exon/Exon-Übergang lag (siehe C.2.19.6). Dadurch wurde ausgeschlossen, dass dieses Oligonukleotid an genomische DNA binden konnte. Zusätzlich wurden die Primer in unterschiedlichen Exons des jeweiligen Gens plziert, so dass die Intron enthaltende genomische DNA weniger effizient amplifiziert würde. Um sicherzustellen, dass alle Amplikons die erwartete Größe hatten, wurde der TaqMan-Reaktionsansatz nach dem Ende der quantitativen PCR-Reaktion mittels PAGE (Silberfärbung) analysiert (Abbildung D 1).

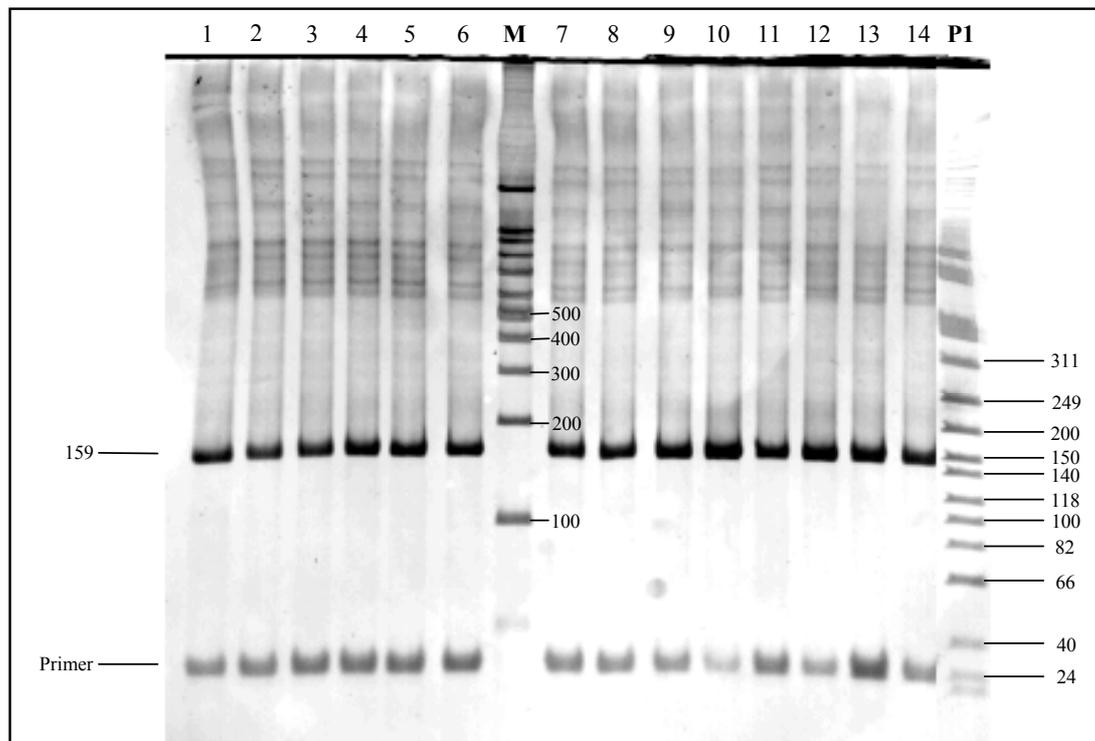


Abb. D 1 PAGE-Analyse des PPK-TaqMan-Amplikons nach 45 PCR-Zyklen. 1-6, Leber cDNA-Standard (1:5 Verdünnungen, entsprechend 300 – 0,96 ng RNA); M, 100 bp Marker; 7, Gehirn-cDNA; 8, Herz-cDNA; 9, Nieren-cDNA; 10, Leber-cDNA; 11, Lungen-cDNA; 12, Pankreas-cDNA; 13, Plazenta-cDNA; 14, Skelettmuskel-cDNA; P1, P1-Marker; das PPK-Amplikon zeigt die erwartete Länge von 159 bp; ein Amplikon von 313 bp (159 bp aus Exon 9 + Intron 10) ist nicht sichtbar; dies belegt die Abwesenheit von genomischer DNA.

In analoger Weise wurden die TaqMan-Amplifikationsprodukte von FXI, FXII, LK, HK und GAPDH auf ihre korrekte Größe überprüft.

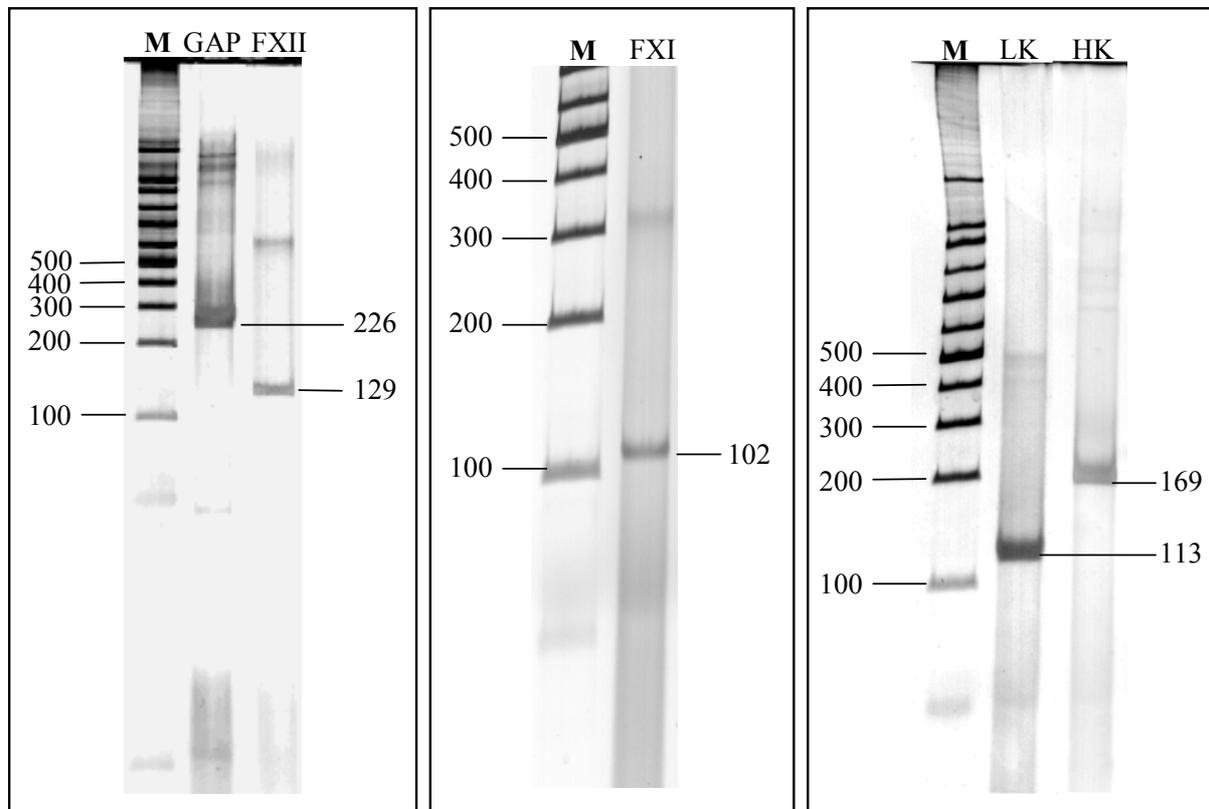


Abb. D 2 PAGE-Analyse der TaqMan-Amplikons GAPDH, FXII, FXI, LK und HK nach 45 PCR-Zyklen. An der linken Seite ist jeweils der 100 bp Marker (M) aufgetragen; alle Amplikons zeigen die korrekte Größe (GAPDH: 226 bp; FXII: 129 bp; FXI: 102 bp; LK: 113 bp; HK: 169 bp); es sind keine Amplikons aus genomischer DNA vorhanden.

D.1.2 Effizienzen der TaqMan-PCRs

Anhand der Steigungen der Standardkurven wurde die Amplifikationseffizienz der TaqMan-PCRs bestimmt (siehe C.2.19.4). Die PCR-Effizienz war bei PPK und GAPDH am höchsten (0,986 bzw. 0,917), aber auch die anderen Amplikons wurden mit einer Effizienz von über 0,5 gebildet, was eine Voraussetzung für die Durchführung von sensitiven TaqMan-Assays ist (Tabelle D 1).

Gentranskript	Geradensteigung	PCR-Effizienz
PPK	-3,3560	0,986
FXI	-4,1786	0,735
FXII	-3,6960	0,865
HK	-4,1127	0,751
LK	-4,4714	0,674
GAPDH	-3,5395	0,917

Tab. D 1 PCR-Effizienzen der TaqMan-Amplikons. Die Steigungen der Eichgeraden wurden mittels linearer Regression ermittelt und die PCR-Effizienzen anhand der Gleichung $E = 10^{-1/s} - 1$ berechnet (siehe C.2.19.4).

D.1.3 Relative Quantifizierung der Transkripte von PPK, HK, LK, FXI und FXII in humanen Geweben

Für die vergleichende Charakterisierung der Gentranskripte von PPK, FXI, FXII, HK und LK wurde die relative Quantifizierungsmethode angewandt (siehe C.2.19.5).

Bei jedem Quantifizierungsexperiment wurden Standardkurven (jeweils fünf serielle 1:5-Verdünnungen von Leber-cDNA) für das Haushaltsgen GAPDH und für die anderen untersuchten Gentranskripte erstellt.

Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die Standardkurven von PPK und GAPDH in einem TaqMan-Experiment.

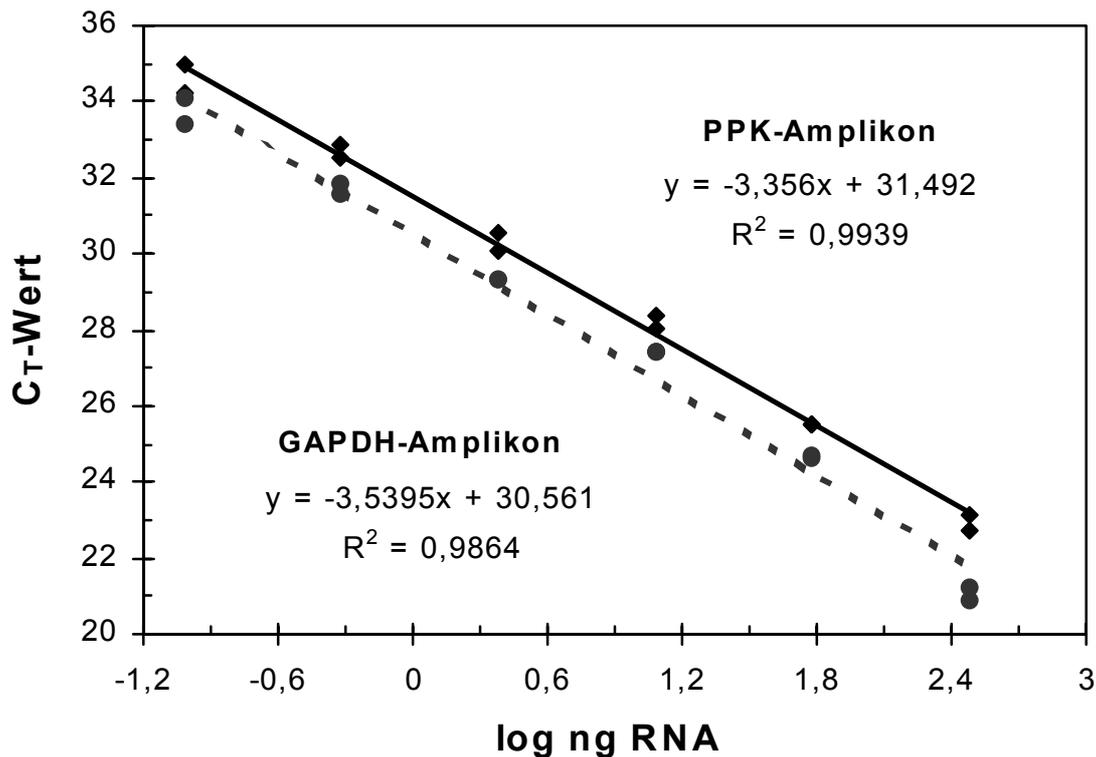


Abb. D 3 TaqMan-Standardkurven für die cDNAs von PPK und GAPDH. Ordinate, C_T-Wert; Abszisse, log ng RNA. Die Standard-cDNA wurde aus Leber-RNA hergestellt. Auf der x-Achse ist angegeben, wieviel ng Leber-RNA der eingesetzten cDNA-Menge entspricht. Die Eichgeraden wurden mittels linearer Regression ermittelt. PPK, Rauten mit durchgezogener Linie; GAPDH, gefüllte Kreise mit gestrichelter Linie.

Die Transkriptionsrate der fünf Gene wurde relativ zu der des Haushaltsgens GAPDH in 16 humanen Geweben ermittelt. Hierzu wurde mittels TaqMan-PCR der cDNA-Gehalt des jeweiligen Zieltranskriptes sowie der von GAPDH in den cDNA-Präparationen der Gewebe bestimmt. Als Standard für die Erstellung von Eichgeraden diente eine cDNA-Präparation, die aus einer definierten Menge von Gesamt-RNA aus Leber gewonnen worden war.

Um die erhaltenen Werte auf das Haushaltsgen GAPDH zu normieren, wurde jeweils der Quotient aus den Ergebnissen für das Ziel-Gen und GAPDH berechnet (siehe C.2.19.5). Diese Werte geben somit an, wieviele Kopien des Ziel-Transkriptes pro GAPDH-cDNA-Molekül in der Probe enthalten sind.

Unter der Annahme, dass das Haushaltsgen GAPDH in allen untersuchten Geweben etwa gleich stark transkribiert wird, und die Effizienz der reversen Transkription für alle mRNAs gleich war, konnten nun Vergleiche der mRNA-Expression der untersuchten Gene in verschiedenen Geweben angestellt werden.

Tabelle D 2 gibt eine Übersicht über die relative mRNA-Expression von PPK, HK, LK, FXI und FXII.

Gewebe	PPK		HK		LK		FXI		FXII	
	relative Kopienzahl	%-Anteil von Leber								
Gehirn	$2,17 \times 10^{-3}$	1,03	n. d.	—	$3,88 \times 10^{-4}$	0,12	n. d.	—	$5,50 \times 10^{-5}$	0,01
Herz	$2,50 \times 10^{-3}$	1,18	$1,49 \times 10^{-5}$	0,01	$4,53 \times 10^{-5}$	0,01	n. d.	—	$2,60 \times 10^{-5}$	0,003
Niere	$5,19 \times 10^{-2}$	24,57	$5,08 \times 10^{-2}$	43,79	$5,39 \times 10^{-2}$	17,11	$1,85 \times 10^{-3}$	24,82	n. d.	—
Leber	$2,11 \times 10^{-1}$	100,00	$1,16 \times 10^{-1}$	100,00	$3,15 \times 10^{-1}$	100,00	$7,44 \times 10^{-3}$	100,00	$8,70 \times 10^{-1}$	100
Lunge	$6,57 \times 10^{-4}$	0,31	n. d.	—	$2,40 \times 10^{-5}$	0,01	n. d.	—	$5,80 \times 10^{-5}$	0,01
Pankreas	$1,44 \times 10^{-1}$	68,04	$1,69 \times 10^{-4}$	0,15	$8,36 \times 10^{-5}$	0,03	n. d.	—	n. d.	—
Plazenta	$5,33 \times 10^{-4}$	0,25	$1,27 \times 10^{-4}$	0,11	$1,16 \times 10^{-4}$	0,04	n. d.	—	$8,52 \times 10^{-4}$	0,10
Sk. Muskel	$2,75 \times 10^{-4}$	0,13	n. d.	—						
Milz	$7,58 \times 10^{-3}$	3,59	n. d.	—	$3,36 \times 10^{-5}$	0,01	n. d.	—	$7,80 \times 10^{-5}$	0,01
Thymus	$2,84 \times 10^{-3}$	1,34	n. d.	—	$5,81 \times 10^{-5}$	0,02	n. d.	—	n. d.	—
Prostata	$4,79 \times 10^{-3}$	2,27	n. d.	—						
Testis	$2,00 \times 10^{-2}$	9,47	n. d.	—	$8,81 \times 10^{-5}$	0,03	n. d.	—	n. d.	—
Ovar	$1,25 \times 10^{-3}$	0,59	n. d.	—						
Dünndarm	$3,74 \times 10^{-3}$	1,77	n. d.	—	$1,65 \times 10^{-5}$	0,01	n. d.	—	n. d.	—
Colon	$1,06 \times 10^{-3}$	0,50	$6,80 \times 10^{-6}$	0,006	$2,02 \times 10^{-5}$	0,01	n. d.	—	n. d.	—
Leukozyten	$1,51 \times 10^{-3}$	0,71	n. d.	—						

Tab. D 2 Relative Expression der mRNAs von PPK, HK, LK, FXI und FXII in humanen Geweben. Relative Kopienzahl, Kopienzahl relativ zu der des Haushaltgens GAPDH; %-Anteil von Leber, für jedes Gen wurde die relative Kopienzahl in der Leber als 100 % definiert; n. d., kein positives Amplifikationssignal bis Zyklus 45.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse von Tabelle D 2 für das PPK-Transkript graphisch dargestellt.

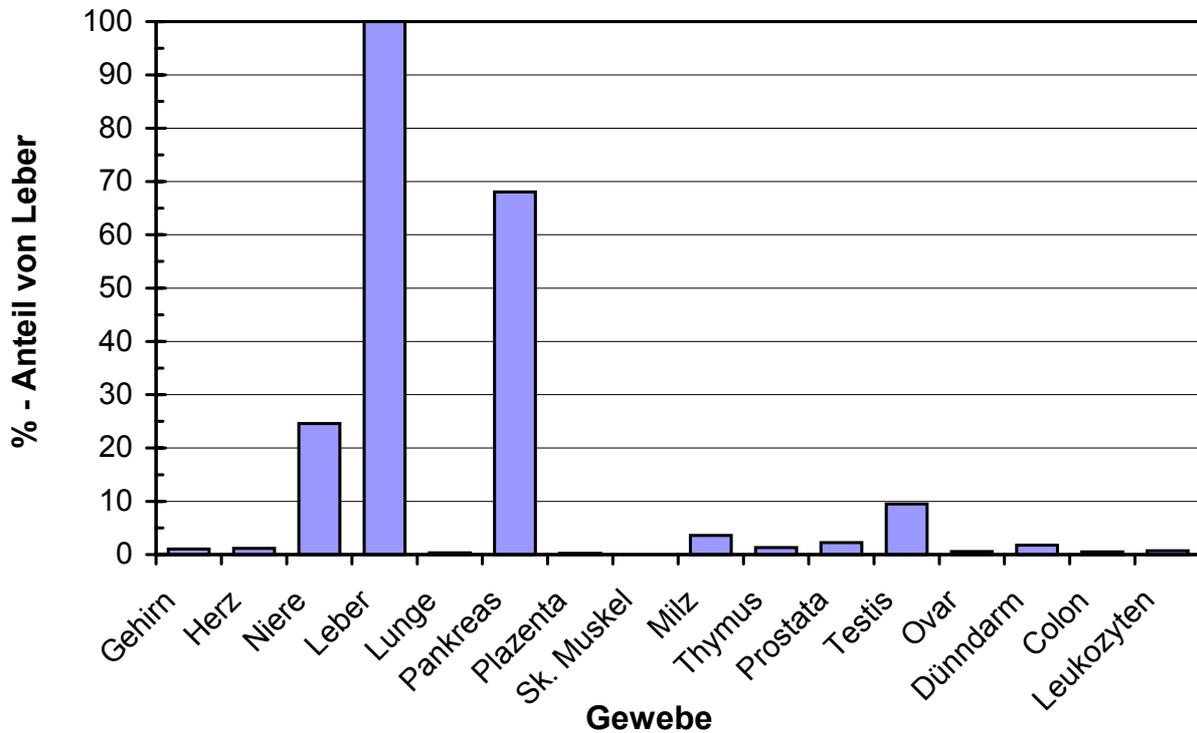


Abb. D 4 Relative Expression von PPK-mRNA in humanen Geweben. Es wurden cDNAs aus 16 menschlichen Geweben untersucht. Die PPK-mRNA Expression in Leber wurde als 100 % definiert.

Die höchste Expression von PPK-mRNA wurde in Lebergewebe gefunden. Außer in der Leber wird das PPK-Gen auch in anderen Geweben signifikant transkribiert (Abbildung D 4; Tabelle D 2). Allen voran in Pankreas (68 %), gefolgt von Nierengewebe (25 %) und Testis (9,5 %). Auch in den übrigen 12 humanen Gewebe-cDNAs ist das PPK-Transkript detektierbar, wenn auch in deutlich geringerer Menge. Am niedrigsten ist die Transkription des PPK-Gens mit 0,13 % im Skelettmuskel.

Im Gegensatz dazu ließen sich die anderen vier mRNAs nicht in allen Geweben nachweisen (Tabelle D 2). HK und LK zeigen ein nahezu gleiches Transkriptionsprofil, sie werden außer in der Leber nur in der Niere signifikant transkribiert. Die Expression von Faktor XII-mRNA ist in der Leber am höchsten, am zweithöchsten, wenn auch tausendfach niedriger, in Plazentagewebe.

Einzig in Lebergewebe werden alle fünf Transkripte in signifikanter Menge gebildet, wobei die Expression von FXII-mRNA am höchsten ist (Relative Kopienzahl: 0,87).

Die relative Kopienzahl von LK-mRNA in der Leber war mit 0,32 ungefähr dreimal so hoch wie die von HK (0,12), während die von PPK (0,21) zwischen den Werten von HK und LK lag. In der Niere findet man PPK-, HK- und LK-Transkripte in etwa gleicher Größenordnung (Relative Kopienzahlen: 0,059, 0,0508 und 0,0539).

Das Faktor XI-Gen weist in der Leber im Vergleich zu den übrigen Gentranskripten mit einer relativen Kopienzahl von 0,0074 die niedrigste Transkriptionsrate (118fach niedriger als die von Faktor XII) auf. Außer in der Leber wird Faktor XI nur noch in Nierengewebe signifikant transkribiert, jedoch in deutlich geringerer Menge (25 %).

D.2 Zellstimulation von HepG2-Zellen mit LPS und PMA

Um der Frage nachzugehen, inwieweit die PPK-mRNA-Expression durch Entzündungsmediatoren und Tumorpromotoren beeinflusst wird, wurden Zellstimulationsexperimente mit Lipopolysacchariden (LPS) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) durchgeführt. Hierzu wurden HepG2-Zellen bis zur Konfluenz in FKS-haltigem RPMI-Medium kultiviert. Die Stimulation mit PMA bzw. LPS erfolgte anschließend in FKS-freiem Medium (siehe C.2.21).

D.2.1 Ergebnisse der LPS-Stimulation

HepG2-Zellen wurden für 1 bis 24 h mit LPS (10-500 ng/ml) inkubiert, anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den stimulierten Zellen isoliert und die cDNA-Synthese mittels Random-Hexamer-Priming durchgeführt. Die Quantifizierung der cDNAs erfolgte mittels der TaqMan-Technik (Abbildung D 5).

Bei den beiden niedrigsten LPS-Konzentrationen (10 ng/ml und 50 ng/ml) weicht das mRNA-Expressionsniveau von GAPDH nur in relativ geringem Maße von den Kontrollen (unstimuliert) ab. PPK zeigt bis auf den 1-Stundenwert den gleichen Transkriptprozentanteil wie GAPDH. Der Messwert nach einer Stunde zeigt bei PPK allerdings eine deutliche Induktion der mRNA, die aber nach zwei Stunden wieder das Niveau des Kontrollwertes erreicht hat.

Bei den höheren LPS-Konzentrationen (100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml) sind die Transkriptionsprofile von PPK und GAPDH weitgehend gleich. Auffällig ist allerdings, dass die Transkriptniveaus von PPK und GAPDH nach zwei Stunden deutlich ansteigen. So werden beide Transkripte um den Faktor 3-6 hochreguliert. Nach drei Stunden pendeln sich die Transkriptanteile von PPK und GAPDH schließlich wieder um den Kontrollwert (unstimuliert) ein.

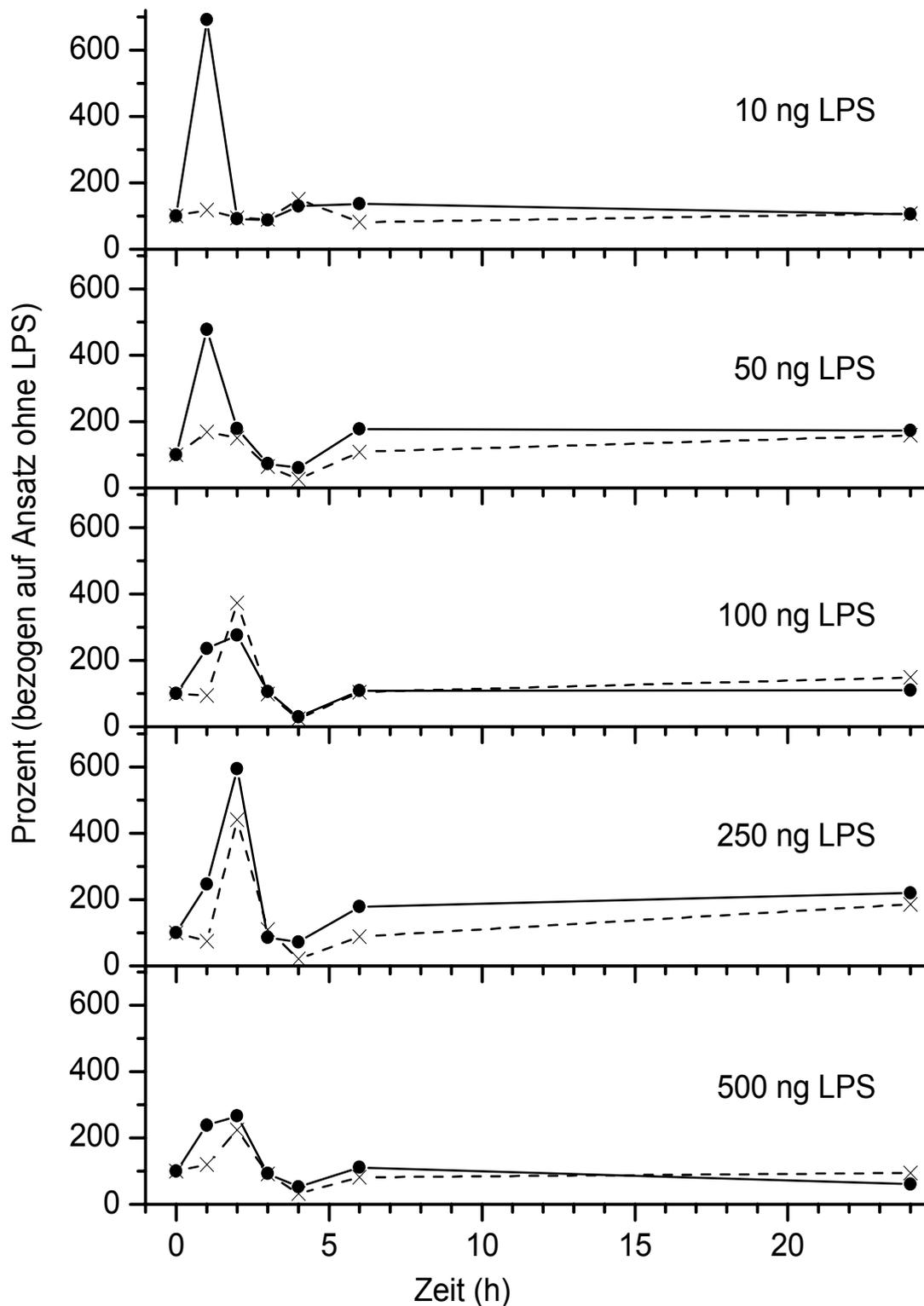


Abb. D 5 Expression von PPK- und GAPDH-mRNA in HepG2-Zellen nach LPS-Stimulation. Die einzelnen Messpunkte geben die RNA-Konzentration in Prozent des zugehörigen Kontrollwertes (ohne LPS) wieder. PPK, gefüllte Kreise mit durchgezogener Linie; GAPDH, Kreuze mit gestrichelter Linie.

D.2.2 Ergebnisse der PMA-Stimulation

Um den maximalen Stimulierungseffekt in Abhängigkeit von PMA-Dosis und Inkubationszeit zu erfassen, wurden HepG2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Phorbolesters (10 bis 200 nM) stimuliert. Nach Inkubationszeiten von 1 bis 24 h wurde die Gesamt-RNA der Zellen in den jeweiligen Kavitäten isoliert und mittels Random-Hexamer-Primern cDNA synthetisiert. Anschließend erfolgte mittels des TaqMan-Verfahrens die Quantifizierung der PPK- und GAPDH-Transkripte (Abbildung D 6).

PMA bewirkte in allen eingesetzten Konzentrationen eine Herunterregulation der PPK-Transkripte, wobei der stärkste Effekt, mit Ausnahme der Konzentration 10 nM, nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zu beobachten ist. Für die maximale Herunterregulation der PPK-mRNA Expression (auf ca. 5 % des Ausgangswertes) genügt bereits eine PMA-Konzentration von 50 nM, höhere Konzentrationen zeigen keine wesentliche Verstärkung des Effekts.

Demgegenüber zeigt das Haushaltsgen GAPDH bei sämtlichen PMA-Konzentrationen keine signifikante Änderung des Transkriptionsniveaus (Abbildung D 6).

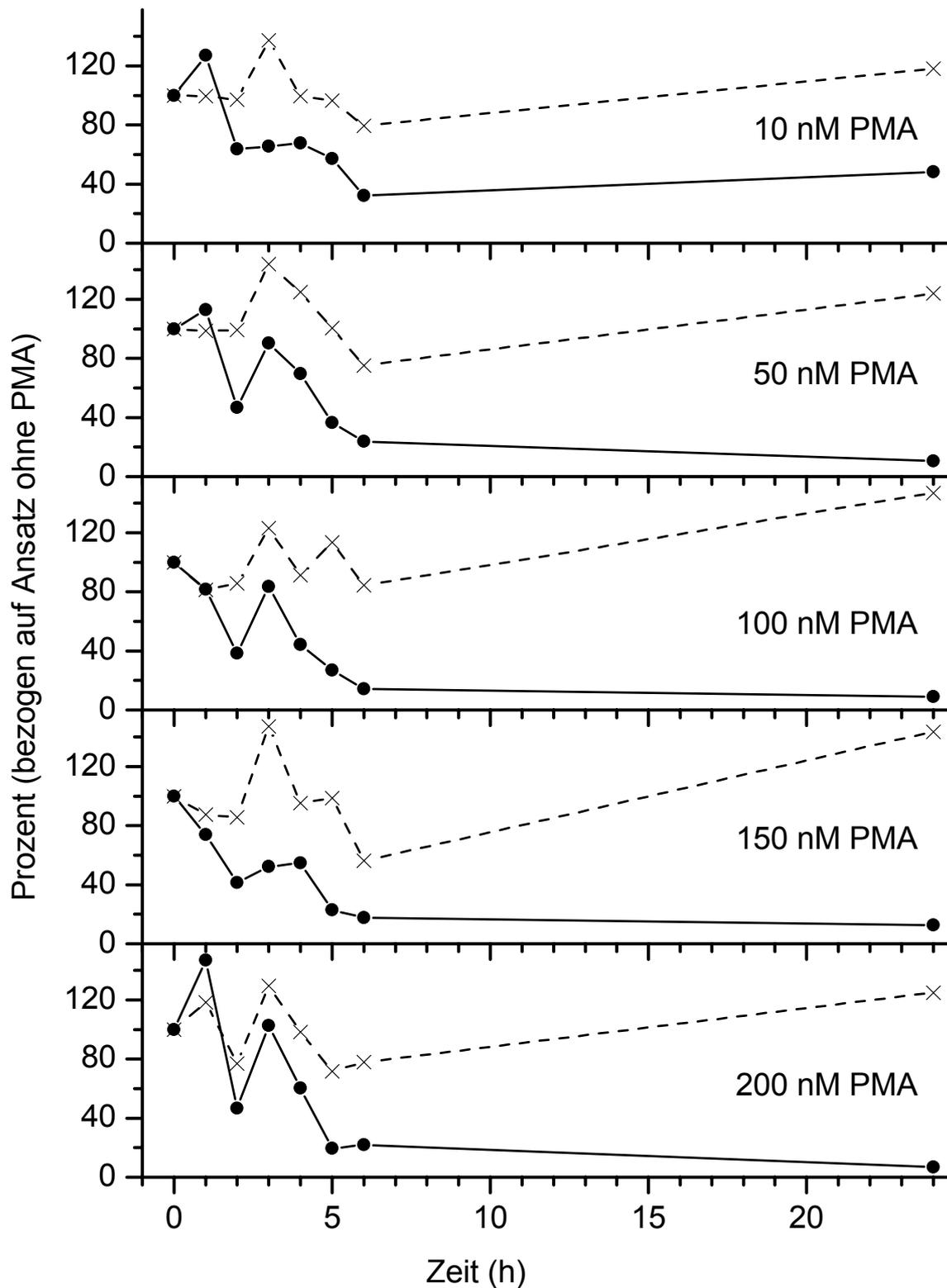


Abb. D 6 Expression von PPK- und GAPDH-mRNA in HepG2-Zellen nach PMA-Stimulation. Die einzelnen Messpunkte geben die RNA-Konzentration in Prozent des zugehörigen Kontrollwertes (ohne PMA) wieder. PPK, gefüllte Kreise mit durchgezogener Linie; GAPDH, Kreuze mit gestrichelter Linie.

D.3 Stabilität der RNAs von PPK und GAPDH

Zur Überprüfung der PPK- bzw. GAPDH-RNA-Stabilität, wurden HepG2-Zellen mit verschiedenen Transkriptionseinhibitoren inkubiert (siehe C.2.20.1), nach definierten Inkubationszeiten jeweils die Gesamt-RNA isoliert und von einer definierten RNA-Menge cDNA synthetisiert. Die relativen Kopienzahlen der PPK- und GAPDH-cDNAs wurden in den einzelnen cDNA-Präparationen mittels des TaqMan-Verfahrens (siehe C.2.19) bestimmt (Abb. D 7).

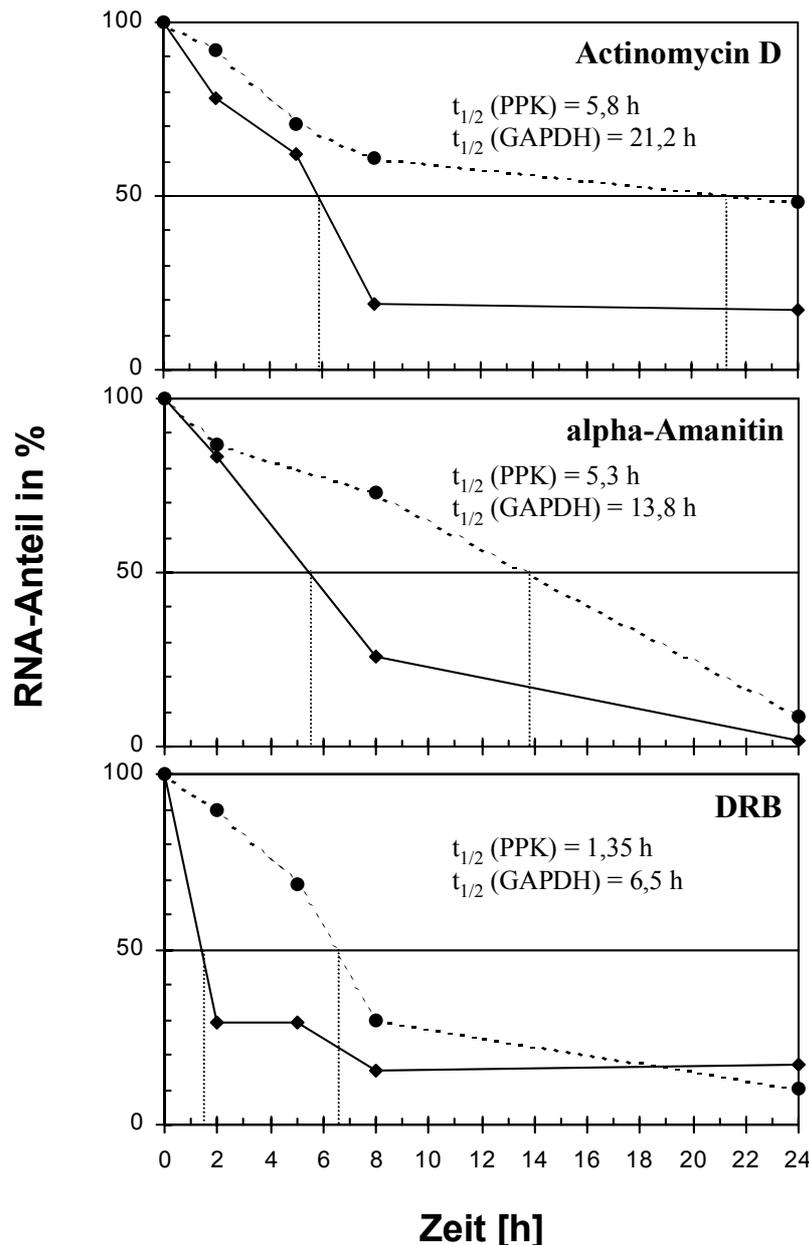


Abb. D 7 PPK- und GAPDH-RNA-Stabilitäten ermittelt mit den Transkriptionseinhibitoren (TI) Actinomycin D, α -Amanitin und DRB. Die Inkubationszeiten mit den TI betragen 2 h, 5 h, 8 h und 24 h; TI-Konzentrationen: Actinomycin D, 10 $\mu\text{g/ml}$; α -Amanitin, 10 $\mu\text{g/ml}$; DRB, 25 $\mu\text{g/ml}$; Kontrollwerte ohne den jeweiligen TI wurden bei jeder Inkubationszeit als 100 % definiert; die Zeit, nach der noch 50 % der ursprünglichen RNA-Menge vorhanden ist, repräsentiert die RNA-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und ist in jedem Diagramm angegeben; PPK, Rauten mit durchgezogener Linie; GAPDH, gefüllte Kreise mit gestrichelter Linie.

Die Ergebnisse zeigen, dass die RNA-Stabilitäten vom jeweilig eingesetzten Transkriptionsinhibitor abhängig sind.

Inhibiert man die Transkription in HepG2-Zellen mit Actinomycin D, ist das PPK-Transkript nach 5,8 h zur Hälfte abgebaut, während die GAPDH-RNA eine 3,6-mal so lange Halbwertszeit (21,2 h) aufweist. Setzt man dagegen α -Amanitin, das Gift des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), ein, so verkürzen sich die RNA-Halbwertszeiten sowohl beim PPK-Transkript (5,3 h) als auch beim GAPDH-Transkript (13,8 h). Unter Verwendung des Adenosin-Analogon 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) ist eine weitere Abnahme der RNA-Halbwertszeiten zu verzeichnen. So ergibt sich für PPK-Transkripte nur noch eine Halbwertszeit von 1,4 h, während die GAPDH-Transkripte erst nach 6,5 h zur Hälfte abgebaut sind.

Die Analyse der Halbwertszeiten zeigt, dass PPK-RNA im Vergleich zu GAPDH-RNA eine deutlich niedrigere Halbwertszeit besitzt; sie ist auf etwa 1/3 bis 1/5 reduziert.

D.4 Bestimmung des PPK-Transkriptionsstarts mittels der RLM-RACE Methode

D.4.1 PPK-Transkriptionsstartkartierung in mRNAs aus Leber, Pankreas, Niere und Testis

Der Vergleich der PPK-mRNA-Expression in unterschiedlichen Geweben hatte ergeben, dass das PPK-Gen außer in der Leber auch in Pankreas, Niere und Testis in erheblichem Ausmaß transkribiert wird (siehe D.1.3). Daher wurden zur Kartierung der PPK-Transkriptionsstarts die mRNAs dieser Gewebe eingesetzt. Durch den Vergleich dieser vier Gewebe sollte überprüft werden, ob bei der Synthese der PPK-mRNA gewebespezifische Transkriptionsstarts und möglicherweise alternative Promotorregionen benutzt werden.

Hierzu wurde zunächst mittels der RLM-RACE Methode (siehe C.2.12) cDNA aus den gewebespezifischen mRNAs hergestellt. In einer nachfolgenden Zweischritt-PCR wurde das 5'-Ende der PPK-Transkripte mit intakter Cap-Struktur amplifiziert und nach Klonierung der Amplikons die Transkriptionsstarts mittels DNA-Sequenzierung identifiziert.

Wie die Abbildungen D 8 und D 12 zeigen, ergaben sich für die einzelnen Gewebe deutliche Unterschiede in den Positionen der Transkriptionsstartpunkte.

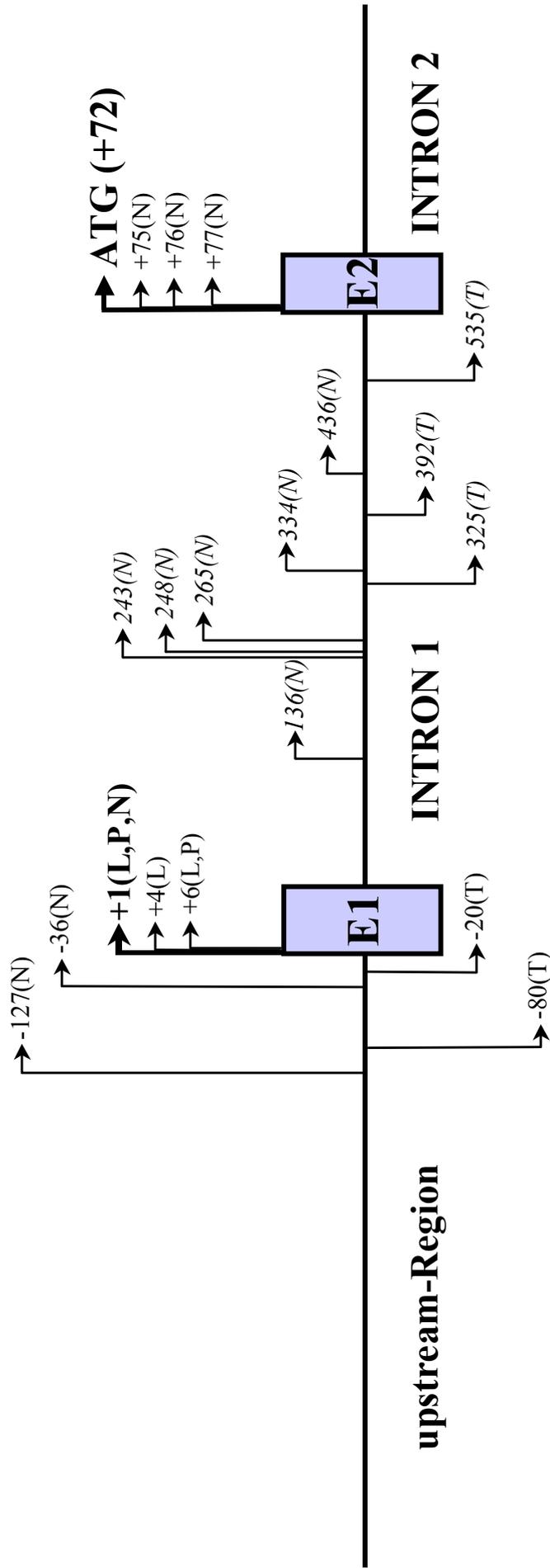


Abb. D 8 Lage der Transkriptionsstarts im PPK-Gen. Mittels RLM-RACE wurden die Transkriptionsstartpunkte in Leber (L), Pankreas (P), Niere (N) und Testis (T) identifiziert. +1, Transkriptionsstart (TS) des längsten Lebertranskriptes; *kursive* Zahlen, TSs in Intron 1; negative Zahlen, TSs stromaufwärts von Exon 1; ATG (+72), Startcodon; E1 und E2, Exon 1 und 2.

Das längste Transkript, das in mRNA aus Leber gefunden wurde, beginnt in Position +1 (Yu et al., 2000) von Exon 1 (Abbildungen D 8 und D 12). Zusätzlich wurden noch zwei weitere TSs in den Positionen +4 und +6 identifiziert. In Pankreasgewebe findet man wie in der Leber die TSs +1 und +6, während der TSP +4 nicht nachweisbar war.

Bei mRNA aus Niere zeigte sich, dass in diesem Organ eine Vielzahl von TSs rekrutiert werden. Neben dem TSP +1 findet man zusätzlich zwei PPK-Transkripte, die um 36 bzw. 127 Basen verlängert sind. Im Gegensatz zu Leber- und Pankreasgewebe werden in der Niere auch sechs TSs in Intron 1 (Positionen 136, 243, 248, 265, 334 und 436) zur Transkriptionsinitiation benutzt. Des Weiteren wurden in Nieren-mRNA auch drei Transkriptionsstartpunkte im translatierten Bereich detektiert. Sie beginnen bei den Positionen +75, +76 und +77. Diesen Transkripten fehlt das Startcodon bei +72, sodass nur ein N-terminal verkürztes PPK-Translationsprodukt generiert werden kann.

In Testis ergibt sich ebenfalls ein von Leber und Pankreas stark abweichendes TS-Verteilungsmuster. Es wurden zwei Transkriptionsstarts stromaufwärts von Exon 1 detektiert (-80 und -20), aber auch in Intron 1 existieren drei Transkriptionsstartstellen (325, 392 und 535). Im Gegensatz zu Leber-, Pankreas-, und Nierengewebe wird in Testis die +1 Position nicht genutzt.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass sowohl in Nieren- als auch in Testis-Gewebe die PPK-Transkription deutlich unterschiedlich von der in Leber und Pankreas reguliert wird.

D.4.2 Analyse der Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation

Die Analyse der Sequenzbereiche vor den jeweiligen Transkriptionsstartpunkten hinsichtlich TATA-Box- und Initiatorelement-Consensussequenzen (Smale, 1997) wurde mit den Programmen *WebGene* und *MatInspector V2.2* durchgeführt. Dabei wurde für jeden experimentell ermittelten Transkriptionsstartpunkt eine TATA-Box oder/und ein Inr-Element gefunden (Tabelle D 3 und Abbildung D 12).

In der Leber werden drei und in Pankreas zwei TSs benutzt, wobei zur Transkriptionsinitiation entweder ein gemeinsames Inr-Element (CCACATT, -7 bis -1) oder/und eine davor liegende TATA-Box (-41 bis -32) zur Verfügung steht. Anders ist die Situation in Nieren- bzw. Testis-Gewebe. In Nieren mRNA wurde das längste PPK-Transkript gefunden (-127), das am 5'-Ende von einem Inr-Element flankiert wird. Ebenso wurden in Niere und Testis weitere Transkripte detektiert, die stromaufwärts von Exon 1 beginnen (-80, -36 und -20). Allen drei TS's ist eine TATA-Box assoziiert. Bei allen Transkripten, die in Intron 1 beginnen, findet man stromaufwärts des TSP eine TATA-Box bzw. ein Inr-Element.

Transkriptionsstart	Consensus-Typ	Consensus-Sequenz	Position
-127 (N):	Inr-Element (h)	TCACTCC	-148 bis -142
-80 (T)	TATA-Box (h)	AGGATGTTCA	-104 bis -95
-36 (N)	TATA-Box (h)	AATATGTTGA	-91 bis -82
-20 (T)	TATA-Box (h)	AATATTGAAG	-41 bis -32
+1 (L, P, N)	TATA-Box (h)	AATATTGAAG	-41 bis -32
	Inr-Element (h)	CCACATT	-7 bis -1
+4 (L)	TATA-Box (h)	AATATTGAAG	-41 bis -32
	Inr-Element (h)	CCACATT	-7 bis -1
+6 (L, P)	TATA-Box (h)	AATATTGAAG	-41 bis -32
	Inr-Element (h)	CCACATT	-7 bis -1
136 (N)	<i>TATA-Box (h)</i>	<i>AGTATGTAGA</i>	<i>105 bis 114</i>
243 (N)	<i>TATA-Box (n)</i>	<i>TTTAAATGGG</i>	<i>200 bis 209</i>
248 (N)	<i>TATA-Box (n)</i>	<i>TTTAAATGGG</i>	<i>200 bis 209</i>
265 (N)	<i>TATA-Box (n)</i>	<i>TTTAAATGGG</i>	<i>200 bis 209</i>
325 (T)	<i>Inr-Element (h)</i>	<i>TTACTCT</i>	<i>316 bis 322</i>
334 (N)	<i>Inr-Element (h)</i>	<i>CCAATTC</i>	<i>330 bis 336</i>
392 (T)	<i>TATA-Box (n)</i>	<i>AATGAACAAT</i>	<i>369 bis 378</i>
436 (N)	<i>TATA-Box (h)</i>	<i>ATTATAAATT</i>	<i>424 bis 433</i>
535 (T)	<i>Inr-Element (h)</i>	<i>CTAAATC</i>	<i>533 bis 539</i>
	<i>TATA-Box (h)</i>	<i>TCTATACCAG</i>	<i>479 bis 488</i>
+75 (N)	<i>Inr-Element (n)</i>	<i>TTAGAAT</i>	<i>605 bis +73</i>
+76 (N)	<i>Inr-Element (n)</i>	<i>TTAGAAT</i>	<i>605 bis +73</i>
+77 (N)	<i>Inr-Element (n)</i>	<i>TTAGAAT</i>	<i>605 bis +73</i>

Tab. D 3 Transkriptionsstartpunkte mit möglichen Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation. (h) bzw. (n), hohe bzw. niedrige Homologie zur Consensus-Sequenz; +1, Beginn von Exon 1; negative Zahlen, stromaufwärts von Exon 1; *kursiv*, Positionen im Intron 1.

D.5 Klonierung und Charakterisierung der PPK-Promotorregion

D.5.1 Klonierung der Promotorregion mittels der Genome Walker Methode

Aus den Ergebnissen der RLM-RACE-Analysen konnten die PPK-Transkriptionsstartpunkte in Lebergewebe bei den Positionen +1, +4 bzw. +6 festgelegt werden (siehe D.4). Nachdem dadurch gesichert war, dass keine weiteren untranslatierten Exons im 5'-Bereich des PPK-Gens existieren, wurde die putative Promotorregion stromaufwärts von Exon 1 kloniert.

Hierzu wurde die Genome Walker Strategie (Clontech) angewandt (siehe C.2.13). Bei dieser Technik werden vier genomische Banken eingesetzt, die durch Restriktionsfragmentierung von humaner genomischer DNA und nachfolgender Ligation der Fragmente an Adapteroligonukleotide generiert wurden. Unter Verwendung von Adapter-komplementären Vorwärtsprimern und genspezifischen Rückwärtsprimern wurden Segmente des upstream-Bereichs des PPK-Gens mittels nested-PCR amplifiziert. Hierbei wurden PCR-Produkte mit unterschiedlichen Kettenlängen erhalten, wobei das längste mit c.a. 1,7 kb in der *DraI*-Bank detektiert wurde (Abbildung D 9).

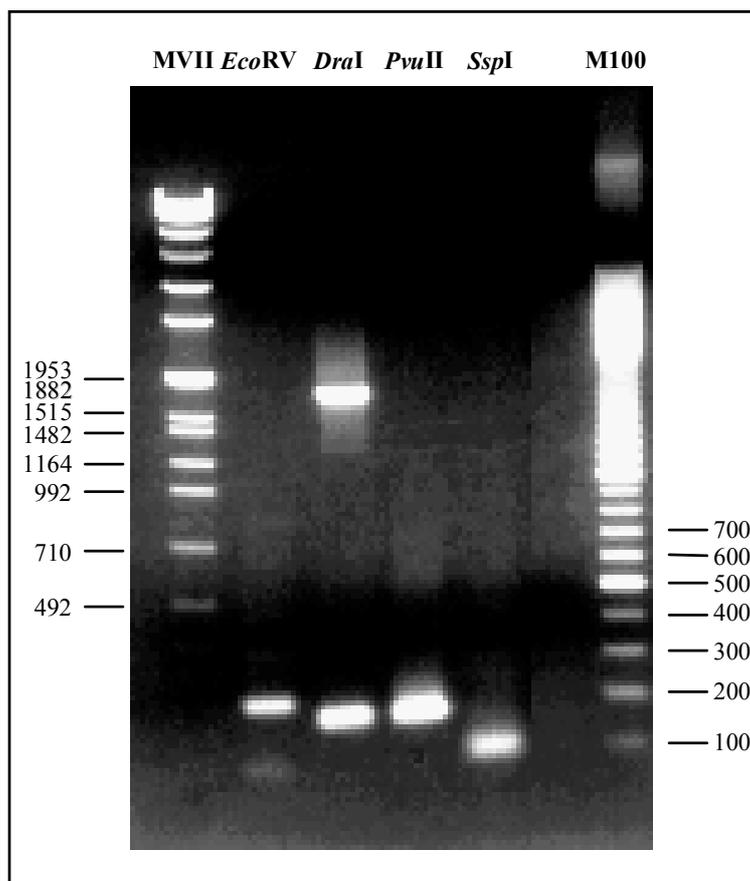


Abb. D 9 Genome Walker PCR-Amplifikate zur Klonierung der putativen PPK-Promotorregion. M VII und M 100, DNA-Größenstandards; *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* und *SspI*, in die Genome Walker PCR eingesetzte genomische DNA-Bibliotheken.

Alle erhaltenen Amplifikate wurden in den Vektor pCRII-TOPO kloniert und anschließend mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass im längsten Fragment (P-1739) aus der *DraI* DNA-Bibliothek alle kürzeren PCR-Produkte aus den übrigen DNA-Bibliotheken (*EcoRV*, *PvuII* und *SspI*) enthalten waren.

Eine BLAST-Suche in der GenBank (Suchparameter: *non redundant*) nach ähnlichen Sequenzen ergab, dass der 5'-Bereich der zum damaligen Zeitpunkt deponierten Sequenzen von humaner PPK-mRNA (M13143 und NM_000892.1) keine Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Sequenzbereich des P-1739 Fragmentes (22 Nukleotide unmittelbar stromauf des für die Klonierung verwendeten Rückwärts-Primers) aufwies.

Im Gegensatz dazu ergab sich eine hohe Sequenzhomologie zu den PPK-mRNAs von *M. musculus* und *R. norvegicus* (NM_008455 und NM_012725; Abbildung D 10), ein deutlicher Hinweis darauf, dass das in der Datenbank publizierte 22 Basensegment am 5'-Ende der PPK-mRNA nicht korrekt war. Ein weitere Beweis dafür, dass das P-1739 Fragment tatsächlich die Region stromauf von Exon 1 des PPK-Gens darstellt, ergab sich bei der BLAST-Suche in der *htgs*-Datenbank (*high throughput genomic sequences*) von GenBank. Hierbei wurden zwei Einträge gefunden (AC012525 und AC04186), die die vollständige Sequenz des P-1739 Fragmentes und zudem den kompletten codierenden Bereich des PPK-Gens enthalten.

Insgesamt ist dadurch gesichert, dass das P-1739 Segment den Sequenzbereich stromaufwärts von Exon 1 enthält und somit für die Promotoraktivitäts-Analysen geeignet ist.

	-95	TATA	TATA
<i>P-1739</i>		<u>atggaat</u> atgttgacaggacaaaaagttgaaactgttgccagaaacccaaagtcaatattga	
<i>M. musculus</i>		gtggactatattgacaggttaaaacagttgaaactgatgccagaaaccagtgtaaacactgg	
<i>R. norvegicus</i>		atggactgtattgacaggtcaaaacagaagacactgatgccagaaagccagtgtaaacactgg	
	-33	Inr +1	
<i>P-1739</i>		<u>agccaagca</u> aatattgcttgcaagtgccacattAGAACAGCTTGAAGACCG--T--TCA	
<i>M. musculus</i>		agccaagca-aagaccgccctcggtgccatattcagagggcttgaagacca--tcttca	
<i>R. norvegicus</i>		agccaagcagagaccaacct-cagtgccatattcggagagcttgaagactagct--tca	
<i>H. s. M13143</i>		<u>gtagtagcaaatattcaaatg</u> AGAACAGCTTGAAGACCG--T--TCA	

Abb. D 10 Sequenz-Alignment von P-1739 mit den 5'-Bereichen der PPK-mRNAs von *M. musculus*, *R. norvegicus*, und *H. sapiens*. Fett, in allen drei Spezies identisch; *kursiv*, von *H. sapiens* entweder zu *M. musculus* oder zu *R. norvegicus* identisch; fett unterstrichenen, Consensus-Sequenzen von TATA-Box oder Inr-Element; +1, experimentell bestimmter PPK-Transkriptionsstart in humanem Lebergewebe; große Buchstaben, PPK-r-44-e-*NheI*-Primersequenz; *kursiv unterstrichen*, 22 Basen der M13143 Sequenz, die nicht mit der genomischen Sequenz übereinstimmen.

D.5.2 Aktivitätsanalyse der PPK-Promotorregion

Nachdem sichergestellt war, dass das P-1739 Fragment den putativen Promotorbereich des PPK-Gens enthielt, wurde dieses P-1739/pCRII-TOPO-Konstrukt mit den Restriktionsendonukleasen *MluI* und *NheI* verdaut (siehe C.2.6), das so erhaltene Fragment mit einer Länge von 1729 bp (P-1729) isoliert und in das Reportergenplasmid pSEAP2-Basic kloniert.

Anschließend wurden HepG2-Zellen (50-70 %ige Konfluenz) in einer Mikrottestplatte mit den Reportergenplasmiden transfiziert (siehe C.2.15), wobei drei unterschiedliche Verhältnisse von FuGENE 6 (Transfektionsreagenz) zu Plasmid-DNA verwendet wurden.

Die Messung des Reporterproteins sekretorische alkalische Phosphatase im Zellkulturüberstand erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Die Lumineszenz-Analyse wurde in den ersten Versuchsreihen mittels eines Röntgenfilms durchgeführt (Abbildung D 11).

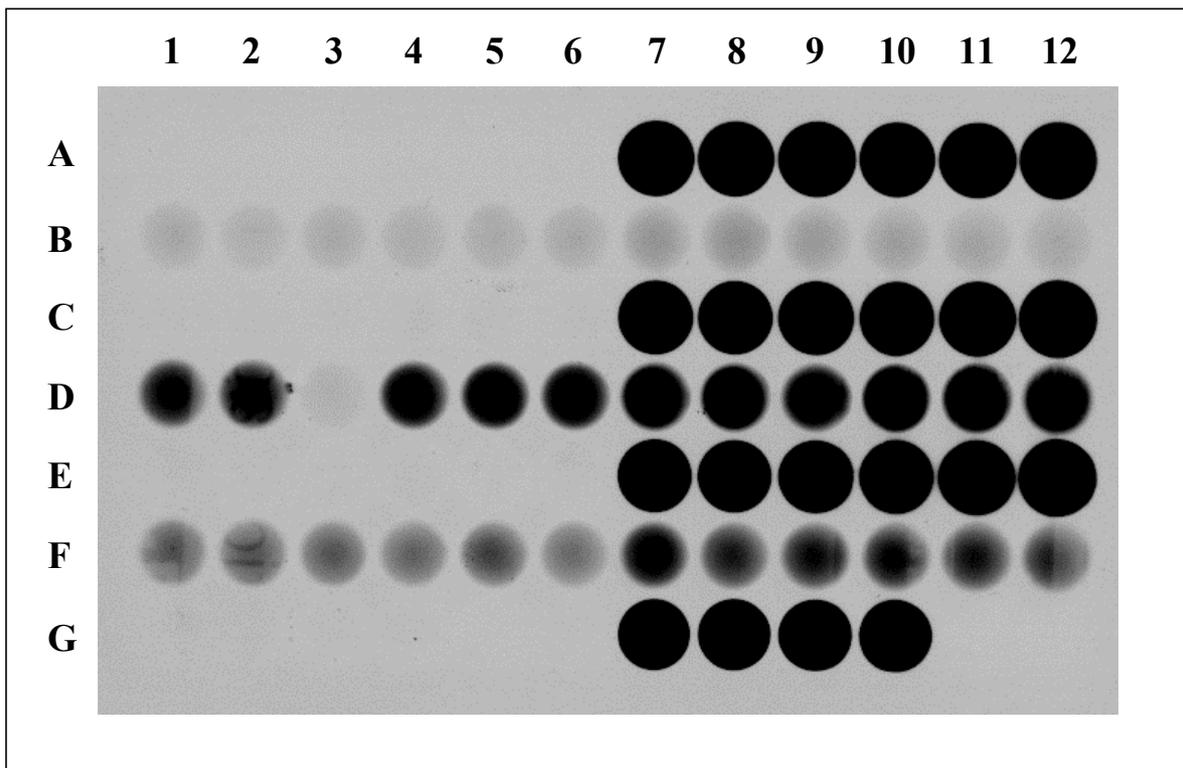


Abb. D 11 Promotoraktivitäts-Analyse des P-1729 bp Fragmentes in HepG2-Zellen. A 1-6, C 1-6, E 1-6: HepG2-Zellen transfiziert mit pSEAP2-Basic; A 7-12, C 7-12, E 7-12: HepG2-Zellen transfiziert mit pSEAP2-Control; B 1-12, D 1-12, F 1-12: HepG2-Zellen transfiziert mit P-1729/pSEAP2-Basic; A und B, 3:2 Verhältnis von FuGENE 6 (μl) zu DNA-Menge (μg); C und D, 3:1 Verhältnis von FuGENE 6 (μl) zu DNA-Menge (μg); E und F, 6:1 Verhältnis von FuGENE 6 (μl) zu DNA-Menge (μg); G 1-6, ZKÜ nichttransfizierter HepG2-Zellen; G 7-10, Zugabe von exogener alkalischer Phosphatase (100 ng SEAP pro Kavität); G 11 und 12, Assay-Puffer ohne ZKÜ (Negativkontrolle); D 3, Pipettierfehler.

Dieses Experiment zeigt eindeutig, dass das untersuchte P-1729 bp Fragment Promotoraktivität besitzt, da in allen Zellkulturüberständen (ZKÜ) von P-1729/pSEAP2-Basic transfizierten HepG2-Zellen SEAP-Aktivität detektiert werden konnte (B 1-12, D 1-12 und F 1-12). Somit ist gesichert, dass in dem 1729 bp DNA-Abschnitt Promotor-Elemente enthalten sind, die eine PPK-Transkription ermöglichen.

Negativ- und Positivkontrollen erbrachten die erwarteten Ergebnisse: Der Vektor pSEAP-Basic ohne Insert besitzt keine Promotoraktivität (A 1-6, C 1-6 und E 1-6). Die ZKÜ von HepG2-Zellen, die mit dem Plasmid pSEAP2-Control transfiziert worden waren, zeigen die höchste SEAP-Aktivität. Dies steht im Einklang damit, dass das Kontrollplasmid hochaktive SV40 Promotor- und Enhancer-Elemente besitzt. Anhand des Ergebnisses mit pSEAP2-Control ließe sich im Zweifelsfall erkennen, ob die Transfektion erfolgreich war.

Die Kavitäten G 7-10, in die exogene sekretorische alkalische Phosphatase (100 ng pro Kavität) pipettiert wurde, dienten zur Kontrolle auf korrekte Reaktionsbedingungen (Assay-Kontrolle). Bei nichttransfizierten HepG2 Zellen (G 1-6) sowie bei den Negativkontrollen G 11 und G 12 (nur Assay-Puffer) findet man keine alkalische Phosphatase-Aktivität.

Hinsichtlich des Verhältnisses von Transfektionsreagenz zu DNA-Menge zeigen die für das P-1729/pSEAP2-Basic Konstrukt erhaltenen Ergebnisse, dass bei einem Verhältnis von 3:1 die höchste Transfektionsrate in HepG2-Zellen erzielt wird. Deshalb wurde bei nachfolgenden Transfektionsexperimenten dieses Verhältnis beibehalten.

D.6 Konstruktion von Promotorverkürzungsvarianten

D.6.1 Analyse des P-1729 bp Promotorregion nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Nachdem sichergestellt war, dass das P-1729 bp Fragment eindeutig Promotoraktivität besitzt, wurden die transkriptionsaktivierenden Elemente mittels Promotor-Deletionsanalysen näher untersucht. Hierzu wurde zunächst die P-1729 bp Promotorregion nach Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen mittels der Programme *MatInspector V2.2* und *WebGene* untersucht (Tabelle D 4), um danach gezielt Promotorverkürzungsvarianten entwerfen zu können.

TF	Lok.	CS	MS	Consensus-Sequenz	W	1	2	3	5	6	7	8	9	10
OCT1	-1627 (-)	1.0	0.973	attaatATGCattag										
S8	-1620 (-)	1.0	0.951	ttaagaaaATTAatat										
GATA2	-1570 (-)	1.0	0.951	aatGATAaaa										
BRN2	-1541 (-)	1.0	0.953	gtcatttgAAATtacc										
TCF11	-1538 (-)	1.0	0.968	GTCAtttgaaatt										
RORA1	-1530 (-)	1.0	0.969	agatacaGGTCat										
LMO2COM	-1525 (-)	1.0	0.964	caGATAcag										
AP1	-1452 (-)	1.0	0.951	aaTGACtgaat										
TCF11	-1447 (+)	1.0	0.996	GTCAttttgttct										
SRY	-1359 (-)	1.0	0.985	gaaaACAAtaca										
SOX5	-1358 (-)	1.0	0.995	aaaaCAATac										
XFD3	-1344 (-)	1.0	0.956	acagtaAACAAAat										
FREAC2	-1344 (-)	1.0	0.959	agacagTAAcAAAat										
SRY	-1325 (-)	1.0	0.976	caaaaACAAtata										
SOX5	-1324 (-)	1.0	0.992	aaaaCAATat										
S8	-1296 (+)	1.0	0.982	ttaaggcaATTAtttt										
TCF11	-1271 (+)	1.0	0.987	GTCAtgcaagtaaa										
MZF1	-1195 (-)	1.0	0.962	atcGGGGa										
SOX5	-1087 (-)	1.0	0.980	ccaaCAATct										
DELTAEF1	-1033 (-)	1.0	0.983	tcccACCTtag										
CDPCR3HD	-957 (+)	1.0	0.958	catgGATCct										
MZF1	-888 (+)	1.0	0.968	catGGGGa										
DELTAEF1	-882 (+)	1.0	0.961	gatcACCTggc										
MYOD	-881 (+)	1.0	0.977	atCACCTggc										
LMO2COM	-875 (-)	1.0	0.953	actCAGGtgcca										
DELTAEF1	-875 (+)	1.0	0.968	tggcACCTgag										
MZF1	-862 (+)	1.0	0.968	catGGGGa										
IK2	-825 (+)	1.0	0.950	tcctGGGAacaa										
MZF1	-728 (+)	1.0	0.954	gcaGGGGa										
LMO2COM	-654 (+)	1.0	0.960	taGATAgag										
DELTAEF1	-373 (-)	1.0	0.973	tctcACCTtca										
TCF11	-371 (-)	1.0	0.970	GTCAtctcacctt										
MYOD	-294 (-)	1.0	0.957	acCACCTggt										
DELTAEF1	-294 (-)	1.0	0.956	taccACCTggt										
DELTAEF1	-278 (+)	1.0	0.992	tctcACCTgat										
AP4	-121 (-)	1.0	0.968	ttCAGCtggt										
AP4	-121 (+)	1.0	0.960	aaCAGCtgaa										
NF1	-62 (+)	1.0	0.982	tgtTGGCagaaacccaaa										
NF1	-43 (-)	1.0	0.925	gctTGGCttcaatattga										

Tab. D 4 Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im P-1729 bp Promotorfragment. TF, Transkriptionsfaktoren; Lok., Lokalisation im PPK-Gen (vgl. Abb. D 12); (+), Sequenzhomologie zum codogenen Strang; (-), Sequenzhomologie zum nicht-codogenen Strang; CS, Homologie zur Core-Sequenz; MS, Homologie zur Matrix-Sequenz; Consensus-Sequenz: große Buchstaben, Core-Region; kleine Buchstaben, Matrixsequenz; es sind nur Consensus-Sequenzen mit einer Matrix-Ähnlichkeit von $\geq 95\%$ angegeben; W, P-1729 bp Promotorregion; 1-10, Verkürzungsvarianten; Balkendiagramme, Transkriptionsfaktorbindungsstellen im jeweiligen Promotorkonstrukt.

Die folgende Abbildung D 12 zeigt die sequenzierte P-1729 Promotorregion mit allen experimentell bestimmten TSSs, den TF-Bindungsstellen sowie mit den Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation.

Genome Walker Adapter -1675
acgcgtggtc gacggccgg gctggtaaat aagtttctgc aactttctct ttctctactt cttctggaac tcttctaagt catattaatt
tgcgaccacg ctgcccggcc cgaccattta ttcaagacg ttgaaagaga aagagatgaa gaagaccttg agaagattac gtataattaa
MluI OCT-1

-1611 ttcttaacag tgtcctataa gtcttgtcag cttctgcaa tttttatcat tcttttatt actctgactg ggtaaattca aatgacctgt
aagaattgtc acaggatatt cagaacagtc gaaagacgtt aaaaatagta aggaaaaataa tgagactgac ccattaaagt ttactggaca
S-8 GATA-2 S-8 Brn-2 RORA1
TCF-11 LMO2COM

PVV-1 (-1488)
▼
-1521 atctgagcat gctgattctt tctcctgctt gatctagctt gctgctgaag ctggttgtga atttttcaa ttcagtcatt ttgttcttta
tagactcgta cgactaagaa agaggacgaa ctagatcaga cgacgacttc gacaaacact taaaaaagt aagtcagtaa aacaagaaat
AP-1 TCF-11

-1431 gctccagaat ttctgtttca ttctttttta tggttcctat ctatcttttt gttgaacttc taattttgct catgtattgt tttcctgatt
cgaggctta aagacaaagt aagaaaaat accaaggata gatagaaaa caacttgaag attaaaaacga gtacataaca aaaggactaa
SRY/SOX-5 NFAT

PVV-2 (-1298)
▼
-1341 ttgtttactg tctatctata ttgtttttga gcttattgag ctttcttaag gcaattattt tttagctcttt gtcatgacgt aaagatctcc
aacaaatgac agatagatat aacaaaacat cgaataactc gaaagaattc cgtttaataaa aatcgagaaa cagtaactca tttctagagg
XFD-3 SRY/SOX-5 S-8 TCF-11
FREAC-2

-1251 atttcttttag ggtcacctcc tgetgcttta tttccttctt ttgttggttt cttgtttccc cgattatttg tgatcAgtgt ggccttgcac
taaagaaatc ccagtgagg acgacgaaat aaaggaaagga aaccaccaaa gaacaaagg gctaaataaac actagtcaca cggaaactg
MZF-1 PVV-3 (-1176)
▼

-1161 tgaagtaggc acctatttca gtctttacat actagcttca gcagagaaag ccattcacta gtcagattga ccagagattg ttggtgggct
acttcatccg tggataaaagt cagaaatgta tgatcgaagt cgtctcttcc ggtaagtgat cagtctaaat ggtctctaac aaccaccgga
SOX-5

-1071 gtctgttggg gtctatgcac aggatttctg ctggagttct aagtgaggaa gggctggatt ctgggttcat tcaactgtgtt tgtctgtatt
cagacaacc cagatacgtg tcctaaagac gacctcaaga ttccaccctt cccgaacctaa gacctcaagta agtgacacca acagacataa
DEF-1

-981 ctgtgcacaa ggactggctt gaagcatgga tccttggggg ctgacttggc actgaaatga gccttaagtc tgcgtctgca gggggccagcc
gacacgtgtt cctgaccgaa ctctgtacct aggaaccccc gactgaaccg tgactttact cggaaattcag acgcagacgt ccccggtcgg

CDP

MYOD

MZF-1 DEF-1 MZF-1 IK-2

-891 taacatgggg atcaccctggc acctgagttc atggggg tag gcctgttctt gagtttattc aggtgtcctt gggaacaagg tccactgggg
attgtacccc tagtggaccg tggactcaag taccctatc cggacaagga ctcaataaag tccgacagga cccttgttcc aggtgacccc

LMO2COM

-801 tgagcccagc atctgggtcc acatggccc gcatggagcc aagatctctg gaggctgacc tgggtgctgga tctgcagggg atggcctgga
actcgggtcg tagaccagg tgtaccgggt cgtaccctgg tctctagagac ctccgactgg accacgacct agacgtcccc taccggacct

MZF-1

PVV-5 (-668)

LMO2COM

-711 ttctaggccc atgggtgcca acttggagcc tggggttgct gggGctaacg tggaggctag atagagtctt gggggccagg cttagaccgg
aagatccggg taccacggt tgaacctcgg accccaacga ccccgattgc acctccgac tctctcagaa cccccggtcc gatctcggcc

-621 agcaggcctg aagtctaggt cttgtgtggc catcttggag cctgaaagccc caggggctga cctggctctgg ggtgagcatg ggtctgaggg
tcgtccggac ttcagatcca gaacacaccg gtagaacctc ggacttcggg gtccccgact ggaccagacc ccaactcgtac ccagactccg

PVV-6 (-452)

-531 cacagaggct ggtctggcct gtggcaggcc tgaatcctgg tgctgggggt tacttggagtg ggcttgggtgc ttgggatctG tggtagaagt
gtgtctccga ccagaccgga caccgtccgg acttaggacc acgaccccaa atgacctcac ccgaaccacg aaccctagac accacttcaa

-441 aggttctatc ttaactgtcc ctctccatg caaagaggca tctctctcca tactgtgctg cccaggcttg aagtgagat gacaccggta
tccaagatag aattgacagg gaggagtac gttctcccgt agagagaggt atgacacgac ggggtccgaac ttccactcta ctgtggccat

DEF-1
TCF-11

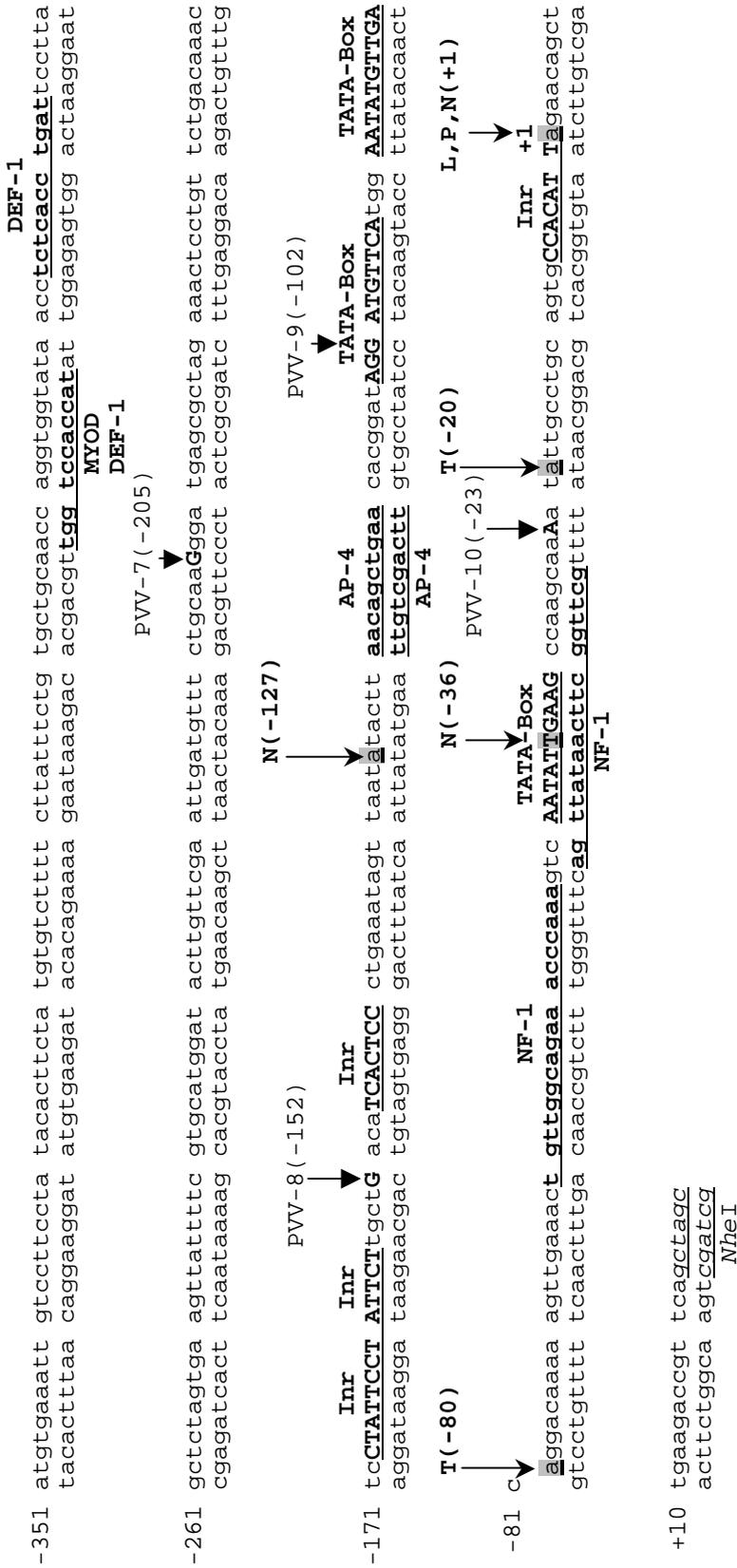


Abb. D 12 Sequenz der P-1729 Promotorregion. +1, Beginn von Exon 1; PVV-1 bis PVV-10, 5'-Ende der jeweiligen Promotorverkürzungsvarianten; fett unterstrichen, Consensussequenzen für Transkriptionsfaktoren bzw. TATA-Box und Inr-Element; grau hervorgehoben, experimentell bestimmte TSs in Leber (L), Pankreas (P), Niere (N) und Testis (T).

D.6.2 Herstellung der PPK-Promotorverkürzungsvarianten

Die Auswahl der PPK-PVV-Konstrukte erfolgte in der Weise, dass durch 5'-terminale Verkürzungen funktionelle Cluster von TF-Bindungsstellen im P-1729 bp Promotorfragment deletiert wurden. In der Region kurz vor dem Transkriptionsstart (~ 250 bp) wurden vier Varianten so ausgewählt, dass sie sich in ihrer Länge um nicht mehr als 80 bp unterschieden. Mit diesen Konstrukten sollte der Core-Promotor (minimale Promotor-Region, die eine basale Promotoraktivität zeigt) des PPK-Gens identifiziert werden. Insgesamt wurden neun Varianten hergestellt (Tabelle D 5).

PPK-PVV	5'-Ende	Länge (bp)
PPK-PVV-1	-1488	1522
PPK-PVV-2	-1298	1332
PPK-PVV-3	-1176	1210
PPK-PVV-5	-668	702
PPK-PVV-6	-452	486
PPK-PVV-7	-205	239
PPK-PVV-8	-152	186
PPK-PVV-9	-102	136
PPK-PVV-10	-23	57

Tab. D 5 PPK-Promotorverkürzungsvarianten (PPK-PVV). 5'-Ende, Lage des 5'-Endes der jeweiligen Variante im PPK-Gen; alle PPK-PVV-Konstrukte enthalten am 5'-Ende zusätzlich die *MluI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende jeweils die *NheI*-Schnittstelle; diese Linker wurden bei der Längenangabe der Konstrukte miteinbezogen.

Die verkürzten Varianten des P-1729 Promotorfragmentes wurden mittels PCR unter Verwendung von P-1729/pSEAP2-Basic als Template hergestellt (siehe C.2.17). Die Vorwärts-Primer wurden so gewählt, dass das 1729 bp lange PPK-Promotorsegment am 5'-Ende sukzessive verkürzt wurde. Der Rückwärts-Primer (PPK-r-44-e-*NheI*) war für alle Varianten identisch.

Nachdem die elektrophoretische Analyse für alle PCR-Produkte die erwartete Größe ergab (Abbildung D 13), wurden die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *Mlu*I und *Nhe*I geschnitten, die DNA-Segmente in das Reportergenplasmid pSEAP2-Basic kloniert und die DNA-Sequenz überprüft.

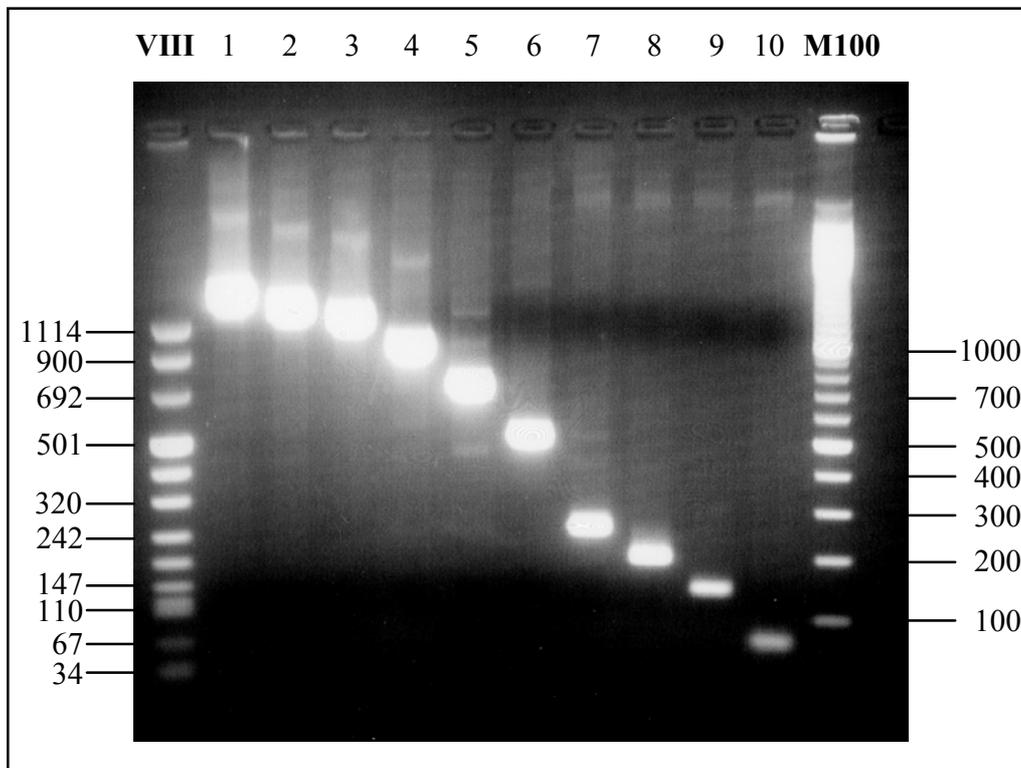


Abb. D 13 Agarosegel-Analyse der PPK-Promotorverkürzungsvarianten (PPK-PVV). M VIII und M 100, Größenstandards; Spuren 1-10, verkürzte PPK-Promotorfragmente; 1, PVV-1 (1522 bp); 2, PVV-2 (1332 bp); 3, PVV-3 (1210 bp); 4, PVV-4 (959 bp; wurde wegen Sequenzfehler nicht weiter verwendet); 5, PVV-5 (702 bp); 6, PVV-6 (486 bp); 7, PVV-7 (239 bp); 8, PVV-8 (186 bp); 9, PVV-9 (136 bp); 10, PVV-10 (57 bp).

D.6.3 Promotoraktivitätsanalyse der PPK-PVV

Mit jedem PPK-PVV/pSEAP2-Basic Konstrukt wurden HepG2-Zellen in jeweils vier Kavitäten einer Mikrottestplatte transient transfiziert. Die SEAP-Aktivitäten in den Zellkulturüberständen wurden nach 24 und 48 Stunden bestimmt und auf die absoluten Zellzahlen kalibriert. Abbildung D 14 zeigt die detaillierte Promotoraktivitäts-Analyse der verschiedenen PPK-PVV/pSEAP2-Basic Konstrukte.

Wie Abbildung D 14 zeigt, besitzen die verschiedenen PPK-Promotorkonstrukte in HepG2-Zellen sehr unterschiedliche transkriptionsaktivierende Kapazität. Betrachtet man zunächst PVV-10 (kürzestes Promotorfragment), lässt sich keine Promotoraktivität detektieren, was darauf hinweist, dass die PPK-Region von -29 bis +22 nicht genügend Sequenzinformation beinhaltet (es besitzt nur das Inr-Element), um die Transkription des PPK-Gens initiieren zu können.

Verlängert man dieses Konstrukt um 79 bp (PVV-9) in 5'-Richtung, so lässt sich eine signifikante Promotoraktivität (sie liegt deutlich über der des pSEAP2-Basic ohne Insert) feststellen. Dies deutet darauf hin, dass in HepG2-Zellen zur PPK-Transkriptionsinitiation zum einen die TATA-Box (Rowlands et al., 1994) von Position -41 bis -32 und zum anderen zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF-1 (-62 bis -45 auf dem codogenen Strang bzw. -26 bis -43 auf dem nicht-codogenen Strang) benutzt werden. Auffällig ist außerdem, dass sich die Bindungsstellen für das TATA binding protein (TBP) und für ein NF-1-Element komplementär überlappen, d.h. die Erkennungsregion für die TATA-Box (-41 bis -32) liegt auf dem codogenen Strang, während die Consensus-Sequenz für die NF-1 Bindungsstelle (-26 bis -43) auf dem nicht-codogenen Strang liegt.

Beim PVV-8 Konstrukt (-158 bis +22) steigt die Transkriptionsaktivität im Vergleich zu PVV-9 um mehr als das 4-fache an. In diesem Sequenzabschnitt ist eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-4 lokalisiert, die eine sehr hohe Homologie zur Consensus-Sequenz (NNCAGCTGNN) aufweist. Diese Palindromsequenz wird von AP-4 sowohl auf dem (+) als auch auf dem (-) Strang erkannt.

Obwohl das Promotorkonstrukt PVV-7 gegenüber PVV-8 um 53 bp am 5'-Ende verlängert ist, zeigt der SEAP-Assay keine höhere transkriptionsaktivierende Kapazität. Die Transkriptionsfaktoren-Analyse zeigt, dass in diesen 53 bp nur zwei potentielle AP-1 Bindungsstellen vorhanden sind, allerdings mit relativ geringer Homologie zur Consensus-Sequenz.

Die PPK-Promotorregion von -458 bis +22 (PVV-6) zeigt im SEAP-Assay noch eine weitere Zunahme der Promotoraktivität (rund die 1,5-fache Aktivität im Vergleich zu PVV-7). In diesen 247 zusätzlichen Basenpaaren sind zahlreiche potentielle TF-Bindungsstellen lokalisiert (drei Bindungsstellen für deltaEF-1, eine Bindungsstelle für TCF-11 sowie eine Bindungsstelle für MYOD).

Beim Konstrukt PVV-5 (-674 bis +22) steigt die Transkriptionsaktivität in Relation zu PVV-6 noch einmal um 25 % an. Hier ist eine Consensus-Sequenz für LMO2COM (NMGATANS) lokalisiert, die promotoraktivierend wirken könnte.

Im Vergleich zu PVV-5 ist die transkriptionsaktivierende Kapazität der Konstrukte PVV-3, PVV-2 und PVV-1 deutlich erniedrigt (85 %, 79 % bzw. 68 % der Promotoraktivität von PVV-5). Untersucht man diesen DNA-Bereich (-1494 bis -674) nach repressiven Elementen, so fallen hier mehrere potentielle Silencer-Elemente mit hoher Homologie zur jeweiligen Consensus-Sequenz auf (vier Bindungsstellen für MZF-1, drei Consensus-Elemente für DEF-1 und ein CDP/cut Element).

Die mit Abstand höchste Promotoraktivität weist das längste Konstrukt (P-1729) auf. Sie ist 1,5-mal, 2,2-mal bzw. 10-mal höher als die von PVV-5, PVV-1 bzw. PVV-9. Innerhalb von einem Sequenzabschnitt von 110 bp sind in diesem Fragment sieben Bindungsstellen für ausschließlich aktivierende Transkriptionsfaktoren (Oct-1, S-8, GATA-2, Brn-2, TCF-11, RORA-1 und LMO2COM) lokalisiert, die zudem alle eine hohe Homologie zur entsprechenden Consensus-Sequenz zeigen (Tabelle D 4). Dies spricht dafür, dass es sich bei diesem Sequenzabschnitt höchstwahrscheinlich um einen Enhancerbereich des PPK-Gens handelt.

D.7 Charakterisierung des Intron-1-Bereichs

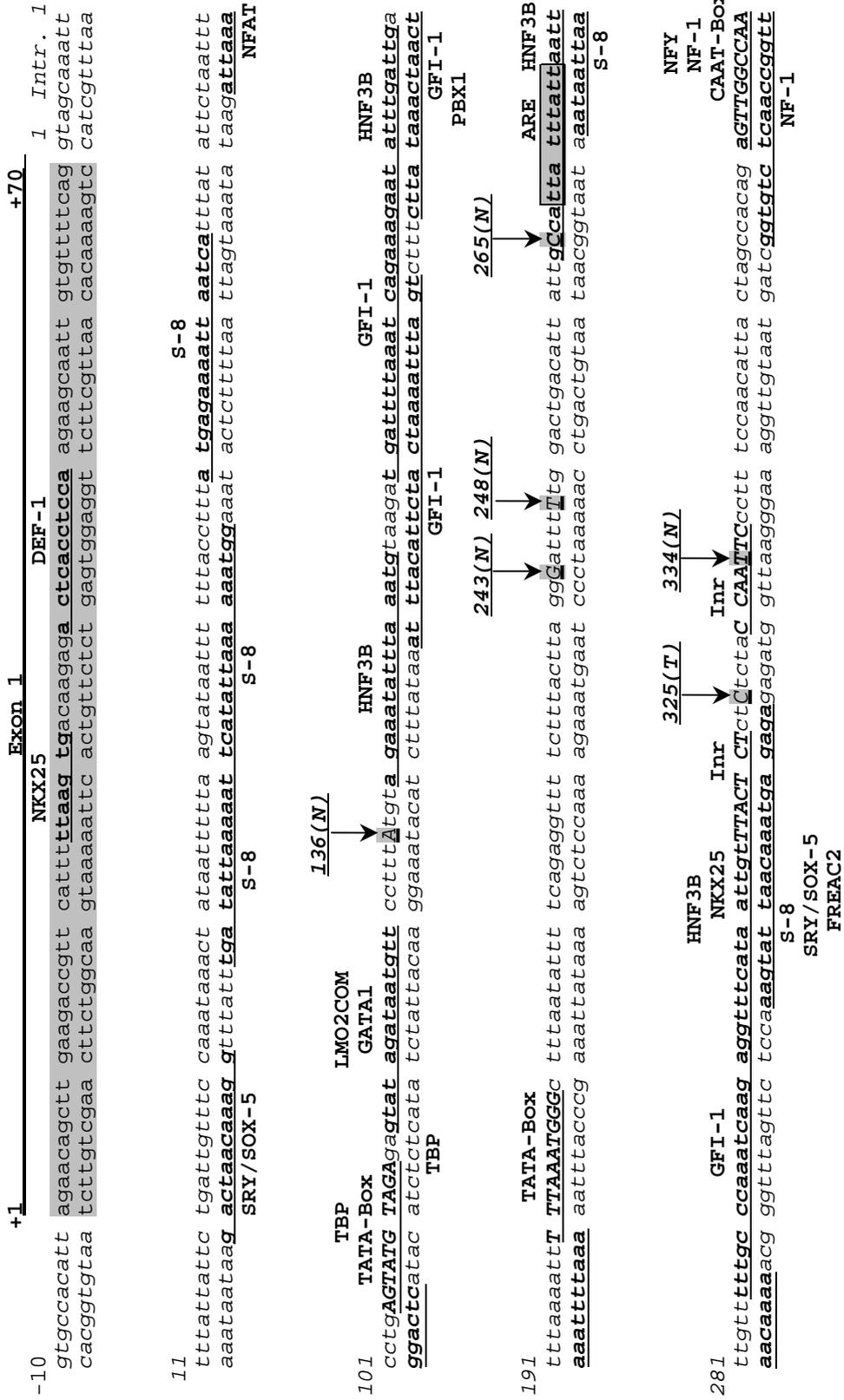
D.7.1 Analyse der potentiellen TF-Bindungsstellen im Intron 1 des PPK-Gens

Die Ergebnisse der Transkriptionsstart-Kartierung in Leber, Pankreas, Niere und Testis (siehe D.4.1) zeigten auffallende Unterschiede in Anzahl und Position der Transkriptionsstartpunkte. So existieren in der Niere insgesamt 12 und in Testis fünf verschiedene Transkriptionsstartpunkte (siehe Tabelle D 3). In diesen beiden Geweben sind TSs sowohl stromaufwärts von Exon 1 als auch im Intron 1 zu finden. Dieses Verteilungsmuster der TSs spricht für eine alternative bzw. gewebespezifische Promotornutzung im PPK-Gen, wodurch eine sehr komplexe Genregulation möglich wird (Tolner et al., 1998; Nomoto et al., 1999).

Um zu klären, ob in Intron 1 potentielle Bindungsstellen für TF vorhanden sind, wurde dieser Sequenzabschnitt mittels der *MatInspector V2.2*-Software (Transfac) analysiert (Tabelle D 6 und Abbildung D 15).

TF	Lok.	CS	MS	Consensus-Sequenz
NKX25	+26 (+)	1.000	0.985	ttAAGTg
DELTAEF1	+40 (+)	1.000	0.960	actcACCTcca
SRY	20 (-)	1.000	0.947	ggaaACAAtcag
SOX5	21 (-)	1.000	0.980	gaaaCAATca
S8	38 (-)	1.000	0.939	acttaaaaATTAtagt
S8	51 (-)	1.000	0.941	ggtaaaaaATTAtact
S8	70 (+)	1.000	0.954	atgagaaaATTAatca
NFAT	95 (-)	1.000	0.951	ctcagGAAAtta
GATA1	117 (+)	1.000	0.960	gtataGATAatggtt
GATA1	119 (+)	1.000	0.961	ataGATAatg
LMO2COM	120 (+)	1.000	0.965	taGATAatg
HNF3B	140 (+)	1.000	0.902	agaaaTATTttaaag
GFI1	149 (-)	1.000	0.902	tgatttaaAATCatcttacattta
GFI1	160 (+)	1.000	0.918	tgattttaAATCagaaagaatatt
HNF3B	175 (+)	1.000	0.925	aagaaTATTtgattg
GFI1	177 (-)	1.000	0.917	aaattttaAATCaatcaaatattc
PBX1	180 (-)	1.000	0.987	taaatCAATcaata
HNF3B	264 (+)	1.000	0.905	gccatTATTtattaa
S8	272 (-)	1.000	0.948	aaaacaaaATTAataa
GFI1	286 (+)	1.000	0.907	tttgcccaAATCaagaggtttcat
S8	305 (-)	1.000	0.972	agtaaacAATAtgaa
NKX25	307 (+)	1.000	0.980	caTAATtg
HNF3B	308 (+)	1.000	0.917	ataatTGTTtactct
SRY	308 (-)	1.000	0.960	gtaaACAattat
SOX5	309 (-)	1.000	0.987	taaaCAATta
FREAC2	309 (-)	1.000	0.956	agagagTAAAcatta
NF1	355 (-)	1.000	0.916	catTGGCcaactctgtgg
NF1	361 (+)	1.000	0.937	agtTGGCcaatgaacaat
CAAT	362 (+)	1.000	0.957	gttggCCAAtga
NFY	362 (+)	1.000	0.942	gttggCCAAtgaacaa
NFY	364 (+)	1.000	0.943	tggaCCAAtgaa
SRY	370 (+)	1.000	0.950	atgaACAAtaaa
SOX5	371 (+)	1.000	0.993	tgaaCAATaa
HFH3	374 (-)	1.000	0.913	ttgTGTTtattgt
HFH8	374 (-)	1.000	0.931	ttgTGTTtattgt
IK2	413 (+)	1.000	0.959	tcttGGGAagca
TATA	425 (+)	1.000	0.906	ttaTAAAttttccaa
NFAT	430 (-)	1.000	0.975	agttgGAAAatt
S8	485 (-)	1.000	0.972	agcacacaATTActgg
GFI1	528 (+)	1.000	0.930	aaaatctaAATCaccttaaattaa
DELTAEF1	536 (+)	1.000	0.988	aatcACCTtaa
NKX25	545 (-)	1.000	0.957	ctTAATtt
HNF3B	589 (+)	1.000	0.962	tgtatTGTTttcttt
SRY	589 (-)	1.000	0.985	gaaaACAAtaca
SOX5	590 (-)	1.000	0.995	aaaaCAATac
GFI1	600 (-)	1.000	0.916	ttgaataaAATCattctaaaaaag
NFAT	+119 (-)	1.000	0.970	cacagGAAActg

Tab. D 6 Putative TF-Bindungsstellen in der PPK-Intron-1-Region. TF, Bezeichnung der Transkriptionsfaktoren; Lok., Lokalisation der Consensussequenz im PPK-Gen; +1, Beginn von Exon 1; *kursiv*, Positionen in Intron 1; (+), Sequenzhomologie zum codogenen Strang; (-), Sequenzhomologie zum nicht-codogenen Strang; CS, Homologie zur Core-Sequenz des TF; MS, Homologie zur Matrix-Sequenz des TF; große Buchstaben, Core-Region; kleine Buchstaben, Matrixregion; Fettdruck, Bindungsstellen mit einer Matrix-Ähnlichkeit von $\geq 95\%$.



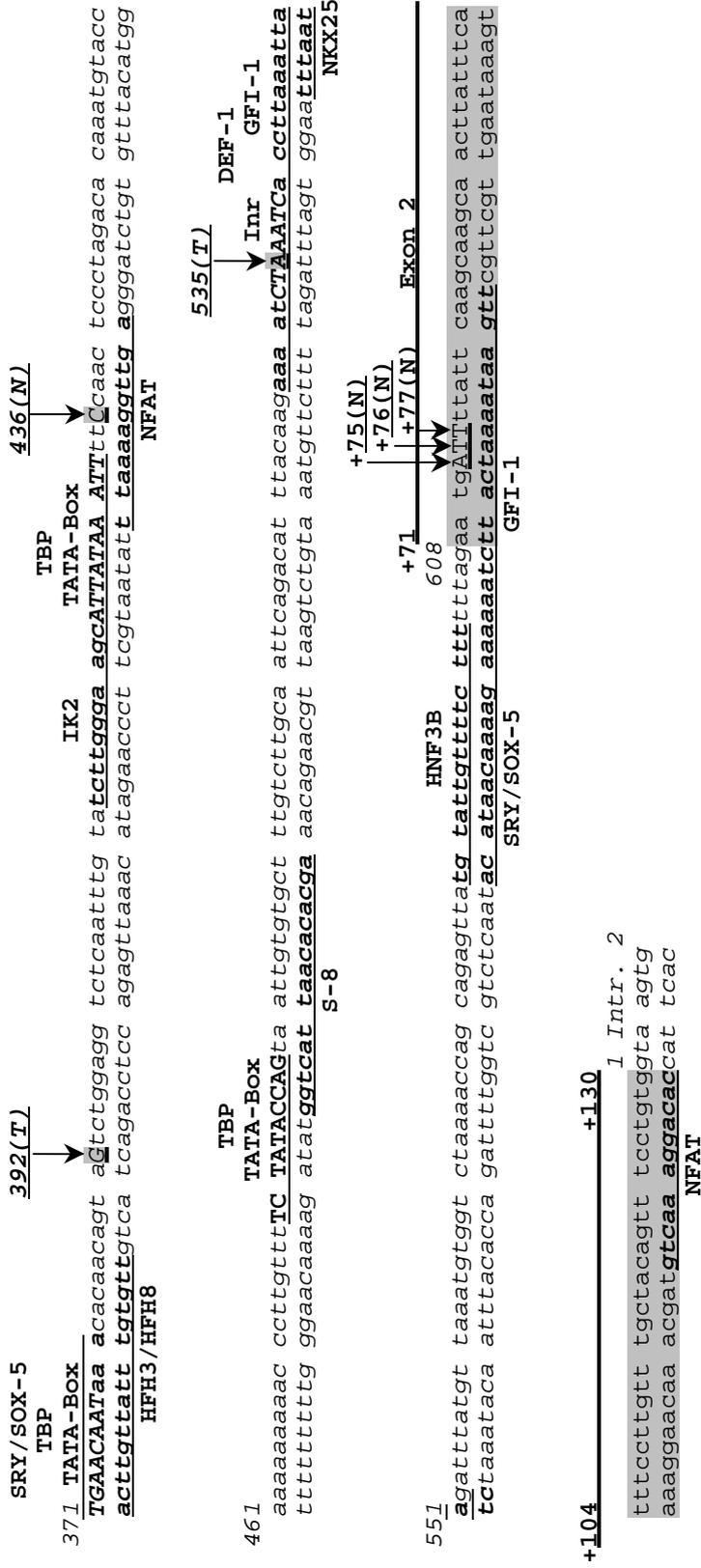


Abb. D 15 Sequenz der Intron-1-Region des PPK-Gens. +1, Beginn von Exon 1; grau, Exons; kursiv, Introns; fett unterstrichen, Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren, TATA-Box und Inr-Element; Pfeile, experimentell bestimmte Transkriptionsstartpunkte (TS) in Niere (N) und Testis (T); ARE (= AU-rich element), mRNA-Abbausignal.

Wie die Analyse ergab, ist in Intron 1 bei Position 424 eine TATA-Box lokalisiert, die 12 Basen vor einem experimentell bestimmten Nierentranskriptionsstart (Position 436) liegt. 74 Basenpaare stromaufwärts von diesem TS liegt eine Consensus-Sequenz für eine CCAAT-Box (NNNRRCCAATSA), an die der stark aktivierende Transkriptionsfaktor NF-Y binden kann (Mantovani et al., 1998). Des Weiteren sind zwischen der TATA- u. CCAAT-Box zwei Bindungsstellen für aktivierende Transkriptionsfaktoren (SRY/SOX-5 und IK-2) lokalisiert. Außerdem findet man in diesem Sequenzbereich eine Bindungsstelle für den streng nieren-spezifischen Transkriptionsfaktor HFH-3 (Clevidence et al., 1993) mit der Consensus-Sequenz KNNTGTTTRTTTA. Dieser wird sowohl in der embryonalen als auch in der adulten Niere ausschließlich im distalen Tubulus der Henle'schen Schleife exprimiert (Overdier et al., 1997).

Diese Befunde sowie das Verteilungsmuster der Transkriptionsstarts ließen erwarten, dass Intron 1 eine oder mehrere alternative Promotorregionen enthält.

D.7.2 Reporter-gen-Analyse des PPK-Intron-1-Bereichs

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurde der Sequenzbereich -10 stromaufwärts von Exon 1, Exon 1 (+1 bis +70), Intron 1 (1 bis 608), Exon 2 (+71 bis +130) und ein Teilbereich von Intron 2 (1 bis 7) mittels nested PCR aus humaner genomischer DNA amplifiziert (siehe C.2.18). Nach Überprüfung der Sequenz wurde dieses Segment in das Reporter-genplasmid pSEAP2-Basic kloniert. Anschließend wurden HEK 293-Zellen, die ein Modellsystem für humane Nierenzellen darstellen, mit dem Konstrukt transient transfiziert und die Aktivität des Reporterproteins SEAP in den ZKÜ quantifiziert (Abbildung D 16).

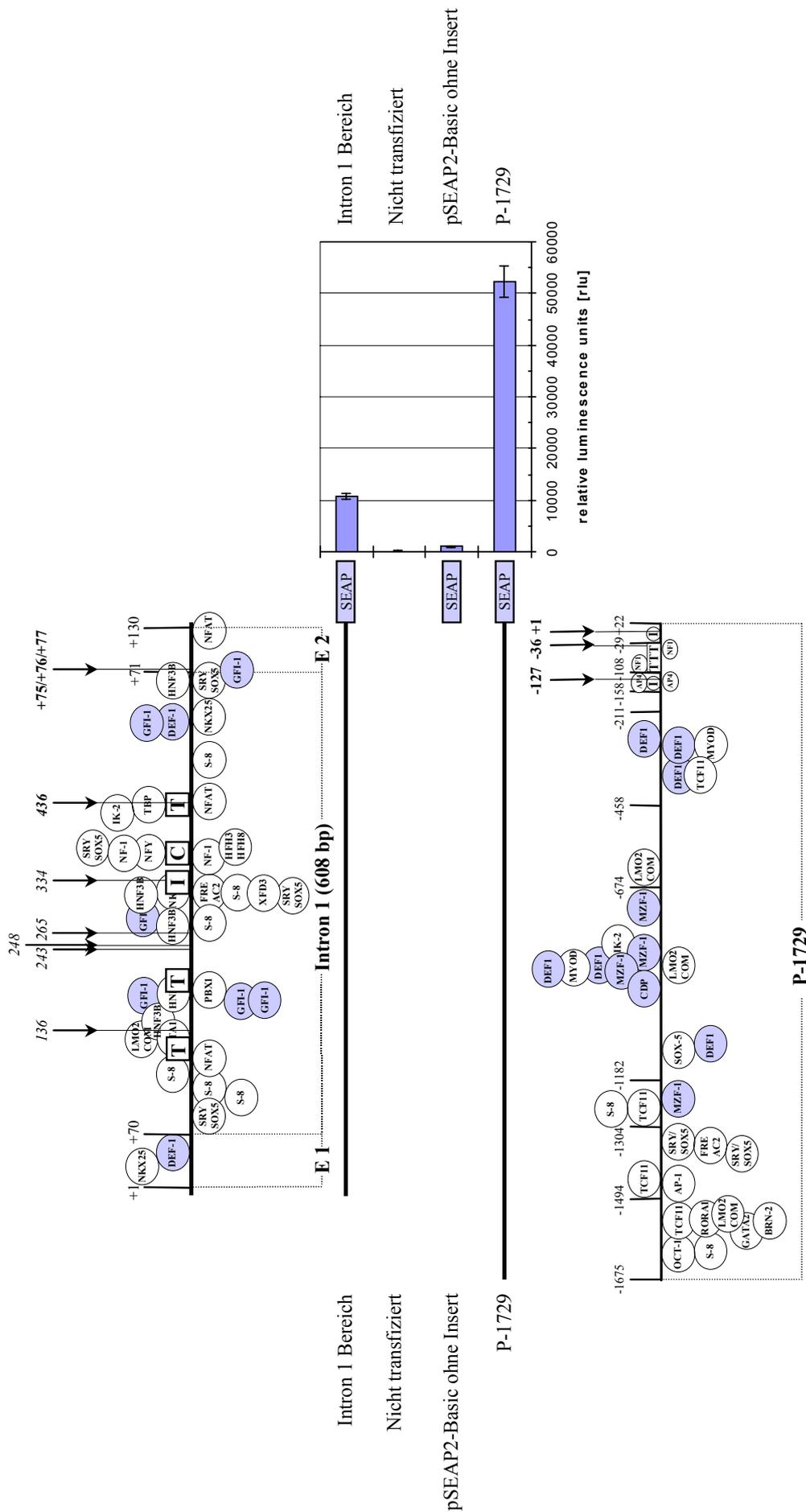


Abb. D 16 Promotoraktivitäten des Intron-1-Bereichs und der P-1729 Region in HEK 293-Zellen. *Linke Seite:* Schematische Darstellung des Intron-1- und des P-1729-Promotorbereiches mit TF-Bindungsstellen; weiß, aktivierende TF; grau, silenzierende TF; Pfeile, Transkriptionsstartstellen in Nierengewebe; T, TATA-Box; C, CCAAT-Box; I, Inr-Element. *Rechte Seite:* Das Balkendiagramm zeigt die SEAP-Aktivität (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4) der Promotorkonstrukte sowie zweier Negativkontrollen (pSEAP2-Basic ohne Insert und nicht transfizierte HEK 293-Zellen) in relativen Lumineszenz-Einheiten [rlu].

Aus diesen Transfektionsexperimenten geht hervor, dass der Intron-1-Bereich des PPK-Gens in HEK 293-Zellen signifikante Promotoraktivität besitzt. Die SEAP-Aktivität in Zellkulturüberständen von HEK 293-Zellen, die mit dem Intron-1-Konstrukt transfiziert waren, ist im Vergleich zur pSEAP2-Basic Kontrolle deutlich erhöht.

Ebenso zeigt aber auch das P-1729/pSEAP2-Basic Konstrukt in HEK 293-Zellen transkriptionsaktivierende Kapazität, wobei das P-1729 Fragment eine fünfmal stärkere Promotoraktivität gegenüber Intron 1 besitzt. Somit kann sowohl die P-1729 Promotorregion als auch der Intron-1-Promotorbereich in HEK 293-Zellen transkriptionsaktivierend wirken. Es können demnach innerhalb eines Zelltyps beide Promotorbereiche funktionell aktiv sein und somit eine komplexe Regulation der PPK-Transkriptionsinitiation ermöglichen.

Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Transkriptionsstartkartierung, die zeigten, dass in Nierengewebe sowohl TSs stromaufwärts von Exon 1 (-127, -36, sowie +1) als auch in Intron 1 (136, 243, 248, 265, 334 und 436) benutzt werden (siehe D.4.1).

Insgesamt weisen die Transkriptionsstartkartierung, die Analyse der Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation, das Verteilungsmuster der TF-Bindungsstellen sowie die Ergebnisse aus den Reporterstudien in HEK 293-Zellen darauf hin, dass das PPK-Gen durch spezifische Rekrutierung alternativer Promotorregionen reguliert werden kann.

E. DISKUSSION

E.1 Expression der mRNAs von PPK, FXII, FXI, HK und LK in humanen Geweben

Studien mittels qualitativer semi-nested RT-PCR hatten gezeigt, dass PPK-mRNA in einer Vielzahl von humanen Zelllinien und extrahepatischen Geweben transkribiert wird (Ciechanowicz et al., 1993; Hermann et al., 1996; Hermann et al., 1999a,b).

Diese Ergebnisse führten zu der Frage, ob der lokalen Synthese des PPK in extrahepatischen Geweben eine physiologische Bedeutung zukommt. Einerseits könnte das extrahepatisch produzierte PPK, in gleicher Weise wie das in der Leber gebildete, in das Blut sezerniert werden, um dort die diversen bekannten Funktionen zu erfüllen (siehe B.2). Andererseits könnte es, im Sinne einer autokrinen oder parakrinen Wirkungsweise, in oder an den PPK-produzierenden Zellen oder deren unmittelbarer Umgebung spezielle lokale Funktionen ausüben, die von dem im Blut zirkulierenden PPK bzw. PK nicht wahrgenommen werden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden quantitative RT-PCR Studien durchgeführt und die Transkriptionsraten des PPK-Gens in humanen Geweben bestimmt. Parallel dazu wurden die mRNAs von HK und FXII, den beiden anderen Komponenten des Kontaktaktivierungssystems, von FXI (ein Substrat von FXII) sowie von LK, einer Komponente des Gewebekallikrein-Kinin-Systems, quantifiziert.

Durch die Quantifizierung der PPK-mRNA sollte weiterhin geklärt werden, ob die mRNA-Expression in nicht-hepatischen Geweben, die bisher nur qualitativ mittels einer äußerst sensitiven RT-PCR-Methodik nachgewiesen worden war, überhaupt physiologisch relevant war, oder ob es sich dabei um illegitime Transkription (Chelly et al., 1989) handelte.

Bisher sind in der Literatur keine Kriterien definiert, die eine Aussage darüber erlauben, ob eine in Geweben oder in Zellen mittels qualitativer RT-PCR nachgewiesene niedrige Expression einer mRNA legitim, also physiologisch bedeutungsvoll, oder illegitim und damit physiologisch irrelevant ist. Als vorläufiges Entscheidungskriterium wird in dieser Arbeit eine mRNA-Expression von $< 10^{-5}$ im Vergleich zum Gewebe mit der höchsten Expression als illegitim betrachtet.

Die mRNA-Expressionsniveaus von PPK, HK, LK, FXI und FXII in den verschiedenen humanen Geweben weisen eine ausgesprägte Heterogenität auf (siehe Tabelle D 2).

Nimmt man einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression der fünf Gentranskripte in der Leber und der Proteinsynthese sowie der Sekretion in das Blut an, so

wäre eine direkte Korrelation zwischen den relativen Kopienzahlen (Tabelle D 2) und den Plasmakonzentrationen (LK: 2,7 μM > HK: 0,9 μM > PPK: 0,5 μM > FXII: > 0,4 μM >> FXI: 0,06 μM ; Müller-Berghaus et al., 1999) zu erwarten. Dies trifft in gewissem Umfang zu: FXI, der die niedrigste Plasmakonzentration besitzt, wird in der Leber weitaus am schwächsten exprimiert, und das Verhältnis von HK zu LK beträgt sowohl für die Plasmakonzentration wie für die relativen Kopienzahlen 1 zu 3. Allen fünf Transkripten gemeinsam ist jedoch, dass ihre mRNA-Expressionsrate in der Leber am höchsten ist. FXII-mRNA wird fast ausschließlich in der Leber synthetisiert, was in Übereinstimmung mit der Annahme steht, dass FXII nur von diesem Organ gebildet wird (Gordon et al., 1990; Kaplan et al., 1998). Die mRNAs von FXI, LK, und HK werden außer in der Leber nur noch in Nierengewebe in beträchtlichem Umfang gebildet (25 %, 17 % und 44 % im Vergleich zur Leber), während die Transkription in den übrigen Geweben sehr niedrig bzw. illegitim oder nicht detektierbar waren.

Im Gegensatz dazu wird PPK-mRNA in allen untersuchten Geweben signifikant exprimiert: In neun von 16 Geweben liegt die PPK-mRNA-Expression im Vergleich zur Leber zwischen 1 % und 68 % und in sechs Geweben zwischen 0,1 % und 1% (Tabelle D 2).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren PCR-Studien aus unserem Labor, in denen das PPK-Transkript in allen untersuchten Geweben bzw. Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Hermann et al., 1999a,b).

Diese ubiquitäre und teils sehr hohe Expression der PPK-mRNA in humanen Geweben außerhalb der Leber stützt die Arbeitshypothese, dass PPK bzw. PK spezielle Funktionen in verschiedenen Geweben ausüben können. Unklar ist, ob PK dabei lokal als Komponente des Kontaktaktivierungs- oder des Plasmakallikrein-Kinin-Systems fungiert. Ein Indiz dafür wäre es, wenn eine Korrelation zwischen den mRNA-Expressionsmustern von PPK und dessen Substraten HK und FXII bestünde. Die vorliegenden Resultate der quantitativen RT-PCR lassen jedoch eine entsprechende Korrelation nicht erkennen (siehe Tabelle D 2). Andererseits kann man eine extrahepatische, lokale Funktion des PPK als Komponente der beiden o.g. Systeme nicht ausschließen, da die Substrate von PK (HK und FXII) gegebenenfalls durch die Blutzirkulation bereitgestellt werden können.

Kürzlich haben neue Forschungsergebnisse darauf hingewiesen, dass Plasma-Kallikrein auch außerhalb des Blutstromes spezielle Funktionen zukommen. So können PK und andere Serin-Proteasen den Bradykinin B2-Rezeptor *in vitro* direkt aktivieren und zwar unabhängig von der Freisetzung von Kininen (Hecquet et al., 2000), wobei die proteolytische Aktivität dieser

Enzyme obligatorisch für die Rezeptoraktivierung ist. Der Aktivierungsmechanismus scheint allerdings im Vergleich zu den bis jetzt bekannten Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs; Dery et al., 1998) unterschiedlich zu sein.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Plasma-Kallikrein an Zelldifferenzierungsprozessen maßgeblich beteiligt ist. Demnach kann PK in Adipozyten Plasminogen direkt aktivieren, wodurch eine Plasmin-abhängige Differenzierungskaskade induziert wird, die durch den Abbau von Fibronectin-reichem Bindegewebe gekennzeichnet ist (Selvarajan et al., 2001).

Diese Arbeiten stehen mit unseren Ergebnissen der extrahepatischen Synthese von PPK in Einklang und lassen den Schluss zu, dass PPK/PK in Abhängigkeit des Gewebetyps unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben kann.

E.2 Stimulation von HepG2-Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS)

Um zu überprüfen, inwiefern die Transkription des PPK-Gens durch Entzündungsmediatoren induziert werden kann, wurden HepG2-Zellen mittels LPS-Zugabe stimuliert. Lipopolysaccharide stellen den Hauptteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien dar und werden deshalb in Entzündungsmodellen eingesetzt (Guha et al., 2001). Die TaqMan-Quantifizierungsergebnisse zeigen, dass die Transkription des PPK-Gens in HepG2-Zellen schon bei niedrigen LPS-Konzentrationen (10 und 50 ng/ml) induziert wird. Nach zwei Stunden zeigt sich hier eine 5-7fache Induktion im Vergleich zum Haushaltsgen GAPDH, während bei höheren LPS-Konzentrationen (100, 250, und 500 ng/ml) beide Transkripte hochreguliert werden (siehe Abbildung D 5). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die PPK-Transkription in HepG2-Zellen schon durch niedrige LPS-Konzentrationen induziert wird. Somit könnte man die *in vitro*-Induktion von PPK-mRNA durch LPS als Modell für eine pathogenbedingte Transkript-Generierung sehen, weil dadurch eine Erhöhung der Plasma-Kallikrein-Konzentration ermöglicht wird, die wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von Bradykinin führen kann. Dies weist darauf hin, dass PPK bzw. PK eine wesentliche Rolle bei Entzündungsprozessen zukommt.

Mehrere Forschungsarbeiten haben nämlich gezeigt, dass das Kontakt-System während einer Sepsis durch Bakterientoxine aktiviert werden kann (Ben Nasr et al., 1996; Clements et al., 1997; Herwald et al., 1998). Demnach werden Faktoren des Kontakt-Systems (siehe B.2.1) an den Curli-Organellen von *E. coli*-Bakterien assembliert, wodurch das Kontakt-System initiiert wird. Dadurch wird u.a. Bradykinin freigesetzt, was neben einer Blutdrucksenkung zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität führt. Diese Aktivierung des Kontakt- und Kallikrein-

Kinin-Systems könnte eine Strategie des pathogenen Organismus sein, um seine Invasion und Verbreitung im Gewebe des Wirtes voranzutreiben (Tapper & Herwald, 2000).

E.3 Stimulation von HepG2-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

Durch Zellstimulationsexperimente sollte untersucht werden, welchen Einfluss PMA auf die Expression von PPK-mRNA in HepG2-Zellen ausübt und inwiefern sich die PPK-Transkription durch PMA induzieren lässt. Dadurch sollten weiterführende Erkenntnisse über potentielle Regulationsmechanismen des PPK-Gens erhalten werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass PMA die PPK-mRNA-Expression bzw. -Stabilität nachhaltig beeinflusst, denn bereits ab einer PMA-Konzentration von 50 nM war eine Absenkung der PPK-Transkripte auf 5 % des Ausgangsniveaus zu verzeichnen. Dagegen blieb die Transkriptionsrate von GAPDH während der PMA-Stimulation praktisch unverändert (Abbildung D 6). Im Allgemeinen verursacht PMA bei vielen Genen eine deutliche Induktion der Transkription (Ross, 1995), was auch für das PPK-Gen erwartet wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich aber während der PMA-Stimulation in HepG2-Zellen, dass die PPK-Transkription signifikant herabreguliert wird. Welcher molekulare Mechanismus der Herabregulation der PPK-Transkription zugrunde liegt, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden.

Grundsätzlich können Phorbolster in der Zelle auf verschiedenen Ebenen wirken. Zunächst durch die Aktivierung von Proteinkinase C, wodurch mittels dieses Signaltransduktionsweges zelluläre Antworten ausgelöst werden können (Schenk et al., 1999). Ein weiteres Kennzeichen von Phorbolestern ist, dass sie mit definierten Promotorelementen (z.B. TPA-responsive elements = TRE-Elemente) interagieren und somit direkt an der Transkriptionsregulation bestimmter Gene mitwirken können (Nie et al., 1998). Die Untersuchungen der Promotorregionen des PPK-Gens (Tabelle D 4, D 6; Abbildung D 12, D 15) erbrachten aber keinen Hinweis auf eine PMA-spezifische Consensussequenz. Somit dürfte eine direkte Interaktion von PMA mit einem entsprechenden PPK-Promotorbereich wohl nicht für die Herabregulation der PPK-Transkription verantwortlich sein.

Andererseits sprechen Forschungsergebnisse auch dafür, dass die Lokalisation bzw. das Trafficking von Transkriptionsfaktoren durch PMA tiefgreifend beeinflusst wird (Kumar et al., 1997). Phorbolster können aber auch die Stabilität von mRNAs beeinflussen, was sich sowohl in einer Verlängerung als auch Verkürzung der mRNA-Halbwertszeit zeigen kann (Ross et al., 1995). Anhand dieser Überlegungen kommen wohl eher die letztgenannten PMA-induzierten Reaktionswege, die nicht mit einer direkten Promotorinteraktion in Verbindung stehen, zur Herabregulation der PPK-Transkription in Frage.

E.4 Bestimmung der mRNA-Stabilitäten von PPK und GAPDH

Die Regulation der mRNA-Abbauraten stellt neben zahlreichen anderen Faktoren wie strukturelle Aktivierung des Gens, Initiation der Transkription, Prozessierung des Transkriptes, Transport des Transkriptes in das Cytoplasma sowie Translation der mRNA einen sehr wichtigen Regulationsmechanismus dar, durch den die Genexpressionsrate kontrolliert wird (Lowenhaupt et al., 1978; Sachs, 1993). Um nun zu analysieren, wie lange die einmal generierten PPK- bzw. GAPDH-Transkripte für die Translation zur Verfügung stehen, wurde die Stabilität der beiden mRNAs mittels der TaqMan-Technologie bestimmt.

Aus den Untersuchungen mit den verschiedenen Transkriptionseinhibitoren in HepG2-Zellen geht hervor, dass die bestimmten RNA-Stabilitäten signifikant vom jeweils eingesetzten Transkriptionseinhibitor abhängen (siehe Abbildung D 7). Sowohl für das PPK- als auch für das GAPDH-Transkript wurden die längsten RNA-Halbwertszeiten unter Verwendung von Actinomycin D gemessen, während mit α -Amanitin bzw. DRB die Halbwertszeiten für beide Transkripte deutlich abnahmen. Auch aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass mRNA-Halbwertszeiten in Abhängigkeit des verwendeten Transkriptionseinhibitors stark variieren können. So zeigen Experimente zur Bestimmung der Transkript-Stabilität der schweren und leichten Immunglobulinketten, dass die Halbwertszeiten dieser mRNAs von 2,4 h (mit Actinomycin D) bis 6 h (mit DRB) differieren (Harrold et al., 1991).

Grundsätzlich zeigt das PPK-Transkript bei allen drei Transkriptionseinhibitoren aber eine deutlich geringere Stabilität (siehe Abbildung D 7) als die GAPDH-mRNA (Faktor 1/3 bis 1/5). Dies weist darauf hin, dass die PPK-mRNA-Spiegel in Zellen durch ständige Neusynthese aufrechterhalten werden, um eine kontinuierliche Produktion von PPK zu gewährleisten. Untersucht man die verschiedenen PPK-Transkripte nach Destabilisierungselementen, findet man in Intron 1 bei Position 268-276 eine Nonamer-Sequenz (5'-UUAUUUAUU-3'), die in vielen mRNA-Transkripten für eine schnelle Degradation verantwortlich ist (Aharon et al., 1993; Lagnado et al., 1994; Zubiaga et al., 1995). So zeigen zahlreiche labile mRNAs, die z.B. Cytokine und andere Mediatoren codieren, oftmals AU-reiche Sequenzen (AU-rich elements = ARE) in ihrem 3'-UTR-Bereich (Zubiaga et al., 1995; Bakheet et al., 2001).

Interessanterweise beinhalten nur vier nierenspezifische PPK-Transkripte (Transkriptionsstartpunkte: 136, 243, 248 und 265) dieses Abbausignal, da alle anderen Intron-1-Bereich-Transkripte ihren Start stromabwärts von diesem ARE-Motiv aufweisen (siehe Abbildung D 15). Sämtlichen Transkripten, die ihren Transkriptionsstart vor Exon 1 aufweisen, fehlt dieses Instabilitäts-Signal nach dem Splicing-Prozess ebenfalls. Kürzlich wurde beschrieben, dass die Abspaltung der Cap-Struktur (7-Methylguanosintriphosphat) durch ARE-Elemente regu-

liert werden kann. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass AU-reiche Sequenzen das sog. 'Decapping' von mRNA-Molekülen stimulieren können und dadurch zum schnelleren Abbau (kürzere Halbwertszeit) dieser Transkripte beitragen (Gao et al., 2001; Tucker & Parker, 2000).

Somit ist durch das ARE-Element im Intron 1 die Möglichkeit gegeben, dass die am 5'-Ende heterogenen PPK-Transkripte ihre jeweils spezifische Stabilität aufweisen, wodurch eine zusätzliche transkriptspezifische Kontrolle der PPK-Genexpression möglich wird.

E.5 Analyse des PPK-Transkriptionsstarts mittels der RLM-RACE Methode

Da die Ergebnisse der PPK-Transkriptquantifizierung zeigten, dass das PPK-Gen außer in der Leber auch in Pankreas, Niere und Testis in erheblichem Maße transkribiert wird, wurde untersucht, ob in diesen Geweben alternative Transkriptionstartpunkte existieren. Hierzu wurde die RLM-RACE Methode angewandt (siehe C.2.12), die zur Zeit die sensitivste und spezifischste Methode zur Detektion von multiplen Cap-mRNAs eines Gens darstellt (Maruyama et al., 1994; Volloch et al., 1994; Schaefer et al., 1995).

Während in Leber- und Pankreasgewebe nur TSs in Exon 1 des PPK-Gens benutzt werden (Abbildung D 8), findet man in Niere und Testis TSs sowohl in der upstream-Region als auch im Intron-1-Bereich. Diese ausgesprochene Heterogenität der PPK-Transkripte ist ein Indiz dafür, dass das PPK-Gen gewebespezifisch durch alternative Promotoren reguliert werden kann (Maniatis et al., 1987; Tolner et al., 1998).

Die genomische Organisation des PPK-Gens spricht nicht gegen eine derartige Nutzung von alternativen Promotor-Bereichen stromabwärts von Exon 1, da dieses nicht translatiert wird (Yu et al., 2000). Somit kann auch der Intron-1-Bereich transkriptionsaktivierend wirken, wodurch Transkripte mit einem TS in Intron 1 generiert werden, die aber trotzdem noch ein vollständiges PPK-Protein codieren (Lin et al., 2000; Ruiz-Vazquez et al., 1996; Umenishi et al., 1998).

Eine Besonderheit in Nierengewebe stellen die Transkriptionsstartpunkte bei den Positionen +75, +76 und +77 in Exon 2 dar, da sie stromabwärts des Translationsstarts (+72) lokalisiert sind (Abbildung D 8). Werden diese TSs unter physiologischen Bedingungen benutzt, so muß dies eine Verkürzung des PPK-Proteins um mindestens 38 Aminosäuren nach sich ziehen (Abbildung E 1). Neben den ersten 19 AS des N-Terminus würden dann ebenso die 19 AS des Signalpeptides, die für die Sezernierung des Proteins aus der Zelle verantwortlich sind, fehlen. Somit wäre eine intrazelluläre (cytoplasmatische) Lokalisation dieser PPK-Isoform zu erwarten. Durch das Fehlen der N-terminalen 19 AS des reifen Proteins wäre die Struktur der N-terminalen Apple-Domäne von PPK empfindlich gestört, da die erste Disulfid-Brücke im

PPK-Protein nicht mehr ausgebildet werden könnte (Chung et al., 1986), somit wäre wohl auch die Komplexbildung mit HK, die durch A₁ und A₄ vermittelt wird, deutlich vermindert (Abbildung E 1).

Ein ähnlicher Regulationsmechanismus auf genomischer Ebene, der ein alternatives Protein-Targeting bedingt, wurde bei einer speziellen Isoform der Carboxypeptidase A in Hirngewebe beschrieben (Normant et al., 1995). Diese Arbeiten zeigen, dass durch alternatives Splicing im CPA2-Gen Transkripte generiert werden, bei denen die ersten vier Exons deletiert sind. Dem korrespondierenden Protein fehlt deshalb das Signalpeptid, wodurch eine cytoplasmatische Form dieser Metalloprotease codiert wird.

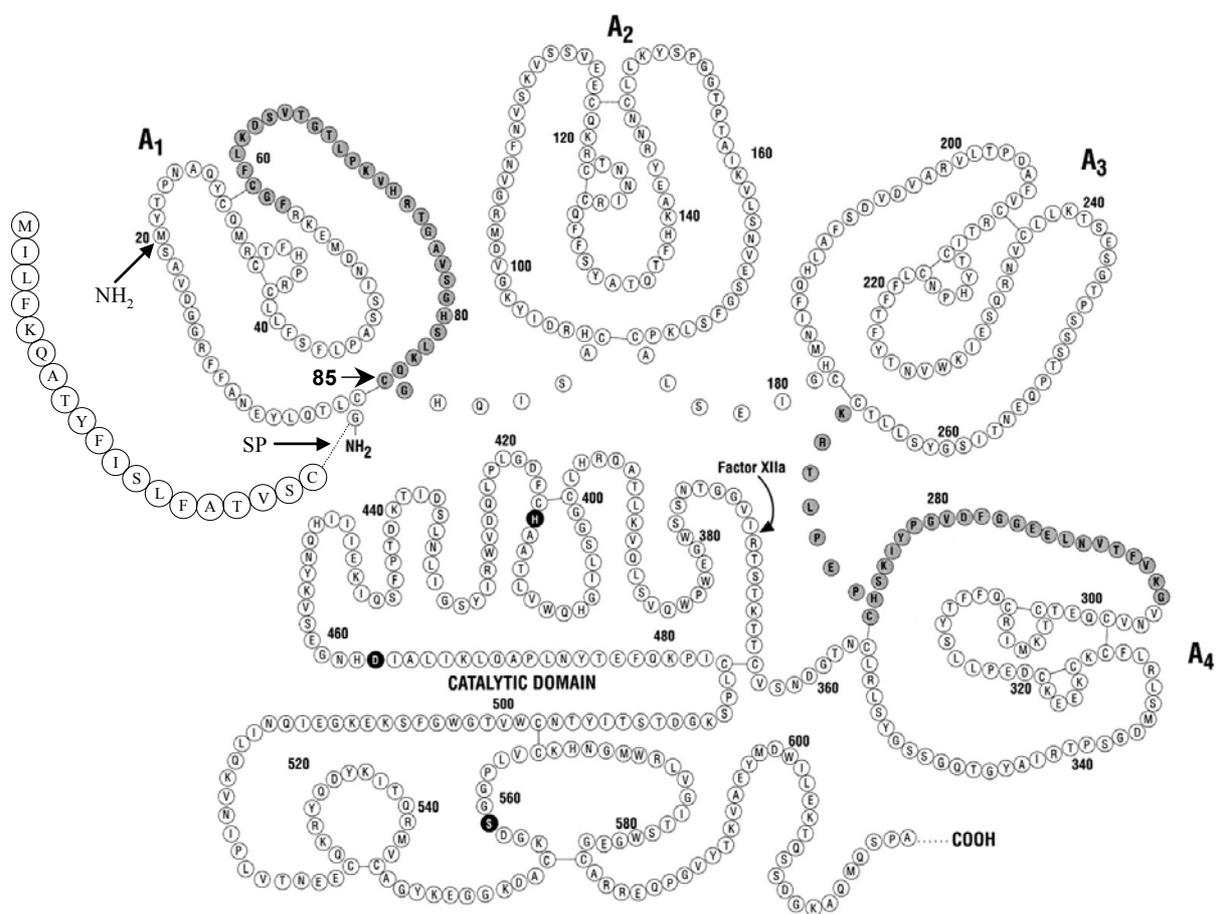


Abb. E 1 Struktur von Plasma-Prokallikrein (modifiziert nach Chung et al., 1986 bzw. McMullen et al., 1991). A₁-A₄ kennzeichnen die Apple-Domänen der schweren Kette von PPK. FXIIa (gebogener Pfeil) spaltet PPK nach Arginin 371. Histidin 415, Aspartat 464 und Serin 559 repräsentieren die katalytische Triade (schwarz hinterlegt). Grau schattierte AS heben die Regionen hervor, die an der Komplexbildung mit HK beteiligt sind. Größere Kreise markieren die Aminosäuren des Signalpeptids. Methionin 20 stellt einen möglichen alternativen Translationsstart in Nierengewebe dar.

E.6 Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsinitiation

Nachdem die Kartierung der TSs in den verschiedenen Geweben gezeigt hatte, dass unterschiedliche Regionen im PPK-Gen zur Transkriptionsinitiation genutzt werden, wurde mittels der Software-Programme *MatInspector V2.2* und *WebGene* nach Initiations-Consensussequenzen gesucht. Dabei stellte sich heraus, dass für jeden experimentell bestimmten TS eine potentielle TATA-Box bzw. ein Initiator-Element existiert (Tabelle D 3). Des Weiteren zeigte die Analyse, dass die ausgesprochene Vielfalt der TSs und damit einhergehend die 5'-Heterogenität der entsprechenden Transkripte durch die Existenz von multiplen Transkriptionsstart-Consensussequenzen (TATA-Box und/oder Inr-Element) im PPK-Gen bedingt ist.

Grundsätzlich kann die Transkription in eukaryontischen Genen durch verschiedene Consensussequenzen initiiert werden. Zum einen durch die TATA-Box, die normalerweise 25-30 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle lokalisiert ist. Sie bewirkt eine korrekte Transkriptionsinitiation aufgrund der spezifischen Interaktion mit dem TATA-binding protein (TBP) (Parker et al., 1984; Sawadogo et al., 1985; Buratowski et al., 1988; Dynlacht et al., 1991), das eine Reihe von A/T-reichen Sequenzabschnitten erkennt (Kim et al., 1993; Zenzie-Gregory et al., 1993).

Insgesamt konnten im PPK-Gen acht TATA-Elemente identifiziert werden, wobei fünf innerhalb von Intron 1 lokalisiert sind (Tabelle D 3). Zum anderen existieren im PPK-Gen neben den TATA-Sequenzen auch sechs Inr-Elemente (Tabelle D 3). Dieser Consensussequenz-Bereich überlappt sowohl in TATA(+)- als auch in TATA(-)-Promotoren oftmals mit der Transkriptionsstartstelle (Chen et al., 1985; Smale et al., 1989) und ist in der Funktion als TATA-Box-Analogon bzw. als TATA-Box assoziiertes Consensus-Element für die Auslösung einer akuraten Transkriptionsinitiation durch die RNA-Polymerase II verantwortlich (Smale et al., 1989).

Unmittelbar stromaufwärts von Exon 1 sind sowohl ein Inr-Element (-7 bis -1) als auch eine TATA-Box (-41 bis -32) vor dem TSP +1 lokalisiert, der in Leber-, Pankreas- und Nierengewebe benutzt wird. Neuere Forschungsarbeiten weisen darauf hin, dass die kombinierte Anordnung von TATA-Box und Inr-Element synergistisch auf die Transkriptionsinitiation wirken kann. So haben Experimente mit synthetischen Promotoren gezeigt (Smale, 1997), dass die Insertion eines Inr-Elementes 25 bp stromabwärts von einer TATA-Box zu einer siebenfachen Steigerung der Transkriptionsrate führt (siehe auch E.7).

Diese gekoppelte Anordnung der beiden Initiations-Elemente könnte demnach mit ein Grund dafür sein, dass das PPK-Gen in Leber, Niere und Pankreas die höchsten Transkriptionsraten aufweist (siehe Abbildung D 4) (Pugh et al., 2000).

E.7 Klonierung und Charakterisierung der P-1729 Promotorregion

Um *cis*-aktive Elemente im regulatorischen Bereich des PPK-Gens näher eingrenzen bzw. charakterisieren zu können, wurde mittels der Genome Walker Technik ein Teil des putativen PPK-Promotors amplifiziert und anschließend in das Reporter-gen-Plasmid pSEAP2-Basic kloniert. Dieser genomische Bereich (P-1729) zeigt in HepG2-Zellen im Reporter-gen-Assay eindeutig transkriptionsaktivierende Kapazität (siehe Abbildung D 11 und D 14). Um die für die Promotoraktivität des P-1729 Fragmentes essentiellen Sequenz-Elemente näher einzugrenzen, wurden verschiedene PPK-Promotor-Verkürzungsvarianten (PPK-PVV) hergestellt und ihre Aktivität im SEAP-System untersucht (siehe Abbildung D 14).

Aus diesen Analysen geht hervor, dass die Promotorregion von -108 bis +22 (PVV-9) transkriptionsaktivierende Kapazität in HepG2-Zellen besitzt, während die Region von -29 bis +22 (PVV-10) keine Promotoraktivität zeigt. Somit ist das Inr-Element (-7 bis -1) alleine, d.h. ohne das Zusammenwirken mit upstream-Faktoren, nicht in der Lage die Transkription in Gang zu setzen. Im PVV-9 Konstrukt ist sowohl eine TATA-Box (-41 bis -32) als auch ein Initiator-Element (-7 bis -1) lokalisiert, sodass diese beiden Elemente im PPK-Promotor ihre Funktionen auch konzertiert ausüben könnten. Es gibt nämlich Hinweise darauf, dass in einem Core-Promotor beide Consensus-Sequenzen zum Start der Transkription rekrutiert werden können, wodurch eine zusätzliche Transkriptionsregulation ermöglicht wird (siehe auch E.6). Experimente mit synthetischen Promotoren zeigten, dass die Transkriptionsrate deutlich gesteigert werden kann, wenn 25 bp stromabwärts von einer TATA-Box zusätzlich ein Initiator-Element inseriert wird (Emami et al., 1995).

Im Sequenzbereich von PVV-9 sind neben der TATA-Box und dem Inr-Element zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF-1 enthalten (Osada et al., 1996). Das NF-1-Protein bindet als Dimer an eine doppelköpfig palindromsymmetrische Consensus-Sequenz (TTGGC(N)₅GCCAA), wobei die beiden Erkennungssequenzen durch einen 5 bp Linker voneinander getrennt sind. Sowohl Sequenzen, die die Consensus-Sequenz flankieren, als auch Basenvariationen innerhalb der Linker-Region können einen Einfluss auf die NF-1 Bindungsaffinität ausüben (Gronostajski, 1986, 1987, 2000; Gounari et al., 1990).

Das um 50 bp längere PVV-8 Konstrukt zeigt im Vergleich zu PVV-9 im Reporter-gen-Assay eine deutliche Steigerung (mehr als das vierfache) der Transkriptionsaktivierung. Verantwortlich dafür könnte eine Consensus-Sequenz für den Transkriptionsfaktor AP-4 in diesem Sequenzabschnitt sein (siehe Tabelle D 4 und Abbildung D 14). Der TF AP-4 wird wie NF-1 ubiquitär exprimiert und gehört zur Gruppe der bHLH-Zip Proteine (Hu et al., 1990; Aranburu et al., 2001). Er bindet hochspezifisch an das 5'-CAGCTG-3'-Motiv und kann mit

AP-1 synergistisch interagieren, wodurch eine Transkriptionsaktivierung des SV40 Promotors *in vitro* beobachtet werden kann (Mermod et al., 1988).

Das PVV-7 Konstrukt zeigt im Vergleich zu PVV-8 keine weitere Steigerung der Promotoraktivität. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass in diesem Sequenzabschnitt keine zusätzlichen TF-Consensuselemente vorhanden sind.

In HepG2-Zellen, die mit dem PVV-6 Konstrukt transfiziert waren, ist dagegen eine deutliche Zunahme der Promotoraktivität zu verzeichnen. In diesem Sequenzsegment findet man drei Bindungsstellen für das 'delta-crystallin enhancer-binding protein' (DEF-1), das in Augenlinsen-, Hirn-, Herz-, Lungen-, und Lebergewebe exprimiert wird (Kamachi et al., 1993). Dieser TF greift in die linsenspezifische Genregulation von Delta1-Crystallin ein, wobei er auf den Delta1-Crystallin Enhancer wirken kann (Funahashi et al., 1991; Sekido et al., 1994). Des Weiteren findet man hier die Consensus-Sequenz für den TF MyoD, der in Muskelzellen exprimiert wird und muskelspezifische Gene aktivieren kann (Davis et al., 1990). TCF-11 induziert dagegen die erythrozyten-spezifische Genexpression von Globin (Caterina et al., 1994).

Bei dem um 217 Basen längeren PVV-5 lässt sich gegenüber PVV-6 eine Zunahme der Transkriptionsaktivität von 25 % verzeichnen. In diesem Abschnitt ist zusätzlich eine Bindungsstelle für den aktivierenden TF LMO2COM (Consensus-Sequenz: NMGATANS) lokalisiert (siehe Abbildung D 14).

Die Konstrukte PVV-3 und PVV-2 zeigen im Vergleich zu PVV-5 eine Abnahme der Transkriptionsaktivierung im Reporter-Gen-Assay. In dieser Promotorregion (-1304 bis -674) sind mehrere potentielle Silencer-Elemente lokalisiert, die repressiv auf die Genexpression wirken können. Zunächst sind hier vier Bindungsstellen für den TF MZF-1, der in der Literatur als Silencer für hämatopoese-spezifische Genexpression beschrieben worden ist, lokalisiert. So führt eine Überexpression von MZF-1 in embryonalen Stammzellen zur Inhibition der Hämatopoese (Perotti et al., 1995). Weiterhin findet man hier neben drei repressiven DEF-1 Elementen eine Consensus-Sequenz für das 'CCAAT displacement protein' (CDP/cut). Dieser TF kann ebenso wie MZF-1 und DEF-1 als Silencer wirken. In verschiedenen Arbeiten wurde beschrieben, dass CDP/cut-ähnliche Proteine als negative Regulatoren der Genexpression wirken können. So zeigen transiente Transfektionsexperimente mit humanem CDP/cut-Expressionskonstrukten, dass dadurch die Transkriptionsaktivität des beta MHC-Komplex Enhancers, des Ncam-Promotors bzw. des C-Myc-Promotors deutlich herabgesetzt wird (Andres et al., 1992; Valarche et al., 1993; Dufort et al., 1994).

Das PVV-1 Konstrukt zeigt noch eine weitere Abnahme der Transkriptionsaktivierung, obwohl im Sequenzbereich von -1494 bis -1304 keine Consensus-Sequenzen für repressive TF

lokalisiert sind (siehe Abbildung D 14). Vielmehr findet man in diesem Abschnitt zahlreiche DNA-Elemente, an die aktivierende TF wie TCF-11, AP-1, FREAC-2, SRY und SOX-5 binden können. Während TCF-11 und AP-1 in vielen Zelltypen transkriptionsaktivierend wirken können, wird FREAC-2 nur in Lunge, Placenta und Prostata in signifikanter Menge exprimiert (Hellqvist et al., 1996). Ebenso zeigen SRY und SOX-5, deren Consensus-Erkennungssequenzen einander sehr ähnlich sind (SRY: NWWAACA AWANN; SOX-5: NNAACAATNN) ein streng gewebespezifisches Expressionsmuster. Das Genprodukt von SRY (sex determining region of the Y chromosome), das auch als TDF (testis-determining factor) bezeichnet wird, ist in Säugetieren für die männliche Geschlechtsdeterminierung verantwortlich, da es in der embryonalen Genitalleiste die Testisentwicklung induziert (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Humane SOX-5-Transkripte findet man dagegen in verschiedenen Geweben wie adulter Testis, Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz sowie in fetalem Hirngewebe (Wunderle et al., 1996). Diese Vielzahl von gewebespezifischen TF könnte demnach der Grund dafür sein, weshalb das PVV-1 Konstrukt im Vergleich zu PVV-2 in HepG2-Zellen, die ja einen leberspezifischen Zelltypus repräsentieren, keine erhöhte Promotoraktivität aufweist.

Das längste Konstrukt (P-1729) zeigt in der Reporteragen-Analyse die größte Promotoraktivität. In diesem DNA-Bereich sind innerhalb von 110 bp Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Oct-1, S-8, GATA-2, Brn-2, TCF-11, RORA-1 und LMO2COM lokalisiert.

Bei Oct-1 (Consensus-Sequenz: NNGAATATKCANNNN) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der ubiquitär exprimiert wird (Sturm et al., 1988). Deshalb kann er in allen Zelltypen als starker Aktivator des RNA-Polymerase II-Systems wirken (Lebowitz et al., 1988). GATA-2 (Consensus-Sequenz: NNNGATRNNN) und TCF-11 (Consensus-Sequenz: GTCATNNWNNNNN) repräsentieren ebenfalls ubiquitäre, die Transkription aktivierende Faktoren (Merika et al., 1993; Johnsen et al., 1998). Einen weit verbreiteten (nachgewiesen in Gehirn, Herz, Leber, Testis und Haut; Carlberg et al., 1994) Transkriptionsfaktor stellt auch RORA-1 (Consensus-Sequenz: NWA WNNAGGTCAN) dar, der zur Familie der 'thyroid hormone receptor-like factors' gehört (Lau et al., 1999).

Bei S-8 handelt es sich dagegen um einen gewebespezifischen TF, der während der Embryonalentwicklung hauptsächlich in mesenchyalem Gewebe exprimiert wird (Opstelten et al., 1991). Brn-2 (Consensus-Sequenz: NNCATNSRWAATNMRN) gehört ebenso zu den gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, da er normalerweise nur im Nervensystem exprimiert wird (Schreiber et al., 1993).

Insgesamt zeigen diese Promotoranalysen, dass der Core-Promotor, der universell als basales Element transkriptionsaktivierend wirken kann (Emami et al., 1995), im Sequenzbereich von -158 bis +22 liegt. Im DNA-Segment von -674 bis -211 sind Bindungsstellen für aktivierende und reprimierende TF lokalisiert (siehe Abbildung D 14) während im Bereich von -1304 bis -674 hauptsächlich Consensus-Elemente für repressiv wirkende Transkriptionsfaktoren, die zusammen als Silencer wirken können, lokalisiert sind. Der 5'-terminale Bereich des PPK-Promotorfragmentes (-1675 bis -1494) weist innerhalb von 110 bp eine Vielzahl von DNA-Consensussequenzen auf, die ausschließlich aktivierende TF binden können. Aufgrund der Dichte der TF-Bindungsstellen und anhand der experimentellen Daten über die transkriptionsaktivierende Fähigkeit dieses Sequenzabschnittes, handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um einen Enhancer-Abschnitt im 5'-regulatorischen Bereich des PPK-Gens.

E.8 Promotor-Analyse des Intron-1-Bereiches in HEK 293-Zellen

Im Bereich des Intron 1 wurden mittels der RLM-RACE Methode neun nierenspezifische Transkriptionsstartpunkte (*136, 243, 248, 265, 334, 436, +75, +76 und +77*) detektiert (siehe Abbildung D 7). Transfektionsexperimente mit dem Intron-1-Bereich/pSEAP2-Basic-Konstrukt in HEK 293-Zellen bestätigten, dass dieser Sequenzbereich des PPK-Gens transkriptionsaktivierende Kapazität besitzt und somit offenbar als alternativer Promotorbereich fungieren kann (siehe Abbildung D 16).

Analysiert man nun das Verteilungsmuster der TSs und die Lokalisation der Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren im Intron-1-Bereich des PPK-Gens, so ergibt sich folgendes Bild: Der TS an der Position *136* liegt 26 bp stromabwärts von einer TATA-Box (*105 bis 114*) und zeigt somit den „Idealabstand“ zwischen TS und TATA-Element. Die Transkriptionsstarts *243, 248* und *265* liegen dicht beieinander und könnten somit variabel von der gleichen Initiationsregion genutzt werden. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass sich in unmittelbarer Nähe dieser TSs kein Inr-Element befindet, das mit diesen Transkriptionsstartstellen überlappen würde (siehe Abbildung D 15). Somit wird die Transkriptionsinitiation in dieser Region wahrscheinlich von der TATA-Box (*200 bis 209*) reguliert, die 38, 43, bzw. 60 bp stromaufwärts der genannten TSs liegt.

Einen interessanten TS stellt Position *334* dar, da dieser in der Consensus-Sequenz eines Inr-Elements lokalisiert ist (siehe Abbildung D 15). Unmittelbar stromaufwärts dieses Initiators schließt sich ein (CT)₅-Repeat an. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass sich durch solche Pyrimidin-Elemente die Konformation der DNA in eine partielle non-B-Struktur ändern kann,

wodurch eine verbesserte Zugänglichkeit für DNA-bindende Proteine erreicht wird (Xu and Goodridge, 1996; 1998).

Der ebenfalls nierenspezifische Transkriptionsstart bei Position 436 liegt unmittelbar stromabwärts von einer TATA-Box (424 bis 433), zusätzlich befindet sich 74 bp stromaufwärts von diesem TS die Consensus-Sequenz für eine CCAAT-Box, wodurch eine strukturelle Einheit von TS, TATA-Box und CCAAT-Box geformt wird (Mantovani et al., 1998). Außerdem befindet sich zwischen der CCAAT- und TATA-Box eine Bindungsstelle für den aktivierenden, streng nierenspezifischen Transkriptionsfaktor HFH-3 (Clevidence et al., 1993), welcher sowohl in der embryonalen als auch in der adulten Niere ausschließlich im Epithel des gewundenen distalen Tubulus der Henle'schen Schleife exprimiert wird (Overdier et al., 1997). Potentielle Consensus-Sequenzen für HFH-3 wurden bisher nur in den Promotoren von solchen Genen detektiert, die fast ausschließlich im distalen Tubulus des Nephrons exprimiert werden. Beispiele hierfür sind unter anderem das Gen, welches den Na^+/H^+ -Austauscher codiert, Gene für zwei Untereinheiten der renalen Na^+/K^+ -ATPase sowie das Gen für den Mineralcorticoid-Rezeptor. Dieser codiert einen aldosteronabhängigen Transkriptionsfaktor, der wiederum die Expression von Genen induziert, deren Genprodukte in der Funktion des distalen Tubulus involviert sind (Overdier et al., 1997). Die Existenz der oben beschriebenen funktionellen Einheit macht es wahrscheinlich, dass die Nutzung des Transkriptionsstarts bei Position 436 mit einer Transkriptionsinitiation von PPK im distalen Tubulus der Henle'schen Schleife einhergeht.

Den PPK-Transkripten, die bei den Positionen +75, +76 und +77 beginnen, kann zwar kein Inr-Element und keine funktionelle TATA-Box zugeordnet werden (siehe Abbildung D 15), andererseits zeigen die RLM-RACE Ergebnisse eindeutig (es wurden drei unterschiedliche PCR-Klone detektiert, die von drei verschiedenen PPK-Transkripten mit intakter Cap-Struktur abstammen), dass dieser PPK-Sequenzabschnitt stromabwärts des ATG-Startcodons in Exon 2 als Transkriptionsstartbereich genutzt wird. Als Erkennungsregion für den TFIID-Komplex (Chen et al., 1994) existiert hier möglicherweise ein TS-überlappendes Inr-Element (siehe Abbildung D 15), das nur in einer Position von der Consensus-Sequenz (PyPyANA/TPyPy) abweicht und stromaufwärts von einer Pyrimidin-reichen Sequenzabfolge flankiert wird, welche die Zugänglichkeit für DNA-bindende Faktoren erhöhen kann (Xu and Goodridge, 1998).

Die Analyse der Verteilungsmuster von aktivierenden TF im Intron-1-Bereich zeigt, dass hier fünf Consensus-Elemente (KGNANTRTTTRYTTW) für den TF HNF3B lokalisiert sind (siehe Tabelle D 6, Abbildung D 15 und D 16). Dieser Transkriptionsfaktor wird fast aus

schließlich in der Leber exprimiert und ist deshalb an der Expressionsregulation von vielen leberspezifischen Genen maßgeblich beteiligt (Samadani & Costa, 1996). Im Gegensatz dazu konnten im Intron-1-Bereich keine leberspezifischen TSs detektiert werden (siehe Abbildung D 8), sodass diesen TF-Bindungsstellen in der Leber möglicherweise eine Funktion als Downstream-Enhancer der Transkriptionsinitiation an den Positionen +1, +4 und +6 zukommt (Yanai et al., 1999).

Neben Consensus-Sequenzen für aktivierende TF sind im Intron-1-Bereich auch sechs Bindungselemente für GFI-1 enthalten (siehe Abbildung D 15 und D 16). Das GFI-Proto-Onkogen codiert ein Zink-Finger Protein mit einer Repressor-Domäne (SNAG) und fungiert als positions- und orientierungsunabhängiger Transkriptionsrepressor (Grimes et al., 1996a,b). Promotor-Datenbankanalysen haben ergeben, dass hauptsächlich Promotoren von Genen, die an Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind, entsprechende GFI-Consensussequenzen aufweisen (Zweidler-McKay et al., 1996).

E.9 Analyse des P-1729 Promotorbereiches in HEK 293 Zellen

Im P-1729 Promotorsegment existieren drei verschiedene nierenspezifische TSs (+1, -36 und -127) (siehe Tabelle D 3 und Abbildung D 12). Deshalb wurden embryonale Nierenzellen (HEK 293) auch mit dem P-1729/pSEAP2-Basic-Konstrukt transient transfiziert und deren Zellkulturüberstände anschließend mittels des SEAP-Assays analysiert. Dabei zeigte sich, dass dieses Konstrukt auch in Nierenzellen transkriptionsaktivierend wirken kann (siehe Abbildung D 16).

Die Consensus-Element Analyse im Bereich der TSs bei Position -36 und -127 zeigt, dass entsprechende Elemente für die Initiation der Transkription existieren. So ist stromaufwärts des TS (-36) eine TATA-Box (-80 bis -71) lokalisiert. Ebenso findet man für den TS bei Position -127 ein Inr-Element (-148 bis -142).

Betrachtet man die P-1729 Promotorregion und den Intron-1-Bereich im Ganzen, so findet man eine Kombination von regulatorisch wirksamen Promotorbereichen, durch die die PPK-Transkription in der Niere in mannigfaltiger Art und Weise reguliert werden kann. Diese Komplexität der Transkriptionsregulation wird erklärlich, wenn man bedenkt, dass die Niere aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellverbänden bzw. strukturellen Einheiten besteht, die völlig unterschiedliche physiologische Aufgaben erfüllen müssen.

E.10 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden grundlegende Untersuchungen zur molekularen Regulation der mRNA-Expression des Plasma-Prokallikrein-Gens durchgeführt. Der zentrale Befund, dass die Genregulation von PPK durch mehrere regulative Einheiten (P-1729 Region und Intron-1-Bereich) in Abhängigkeit des jeweiligen Gewebetyps gesteuert werden kann, macht es sehr wahrscheinlich, dass dieser Protease in den verschiedenen Geweben unterschiedliche Aufgaben zukommen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in Nierengewebe drei mRNA-Transkripte detektiert wurden, die ein N-terminal verkürztes Protein und damit eine intrazelluläre Isoform des PPK-Proteins codieren.

Zur Zeit werden in unserer Arbeitsgruppe weitere Reporterstudien zur detaillierten Analyse des Intron-1-Bereichs durchgeführt. Primäres Ziel hierbei ist es, die Frage zu beantworten, ob die strukturelle Einheit von TS 436, TATA-Box (424-433) und CCAAT-Box (362-373), in Nierenzelllinien transkriptionsaktivierend wirken kann. In diesem Sequenzbereich ist nämlich die Consensus-Sequenz des zellspezifischen Transkriptionsfaktors HFH3 integriert, der ausschließlich im gewundenen Teil des distalen Tubulus der Henle'schen Schleife exprimiert wird. Denn immunhistochemische Untersuchungen von einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass das PPK/PK-Protein in der Niere tatsächlich ausschließlich im distalen Tubulus der Henle'schen Schleife exprimiert wird (Prof. Dr. K. Bhoola, Durban, persönliche Mitteilung).

In diesem Zusammenhang müsste unter Einsatz rekombinanter Proteinexpression auch der Frage nachgegangen werden, welchen funktionellen Unterschied die verkürzte nierenspezifische Isoform des PPK-Proteins im Vergleich zum Wildtyp zeigt.

Die RLM-RACE-Ergebnisse zeigen eindeutig, dass auch in Testis ähnlich wie in der Niere multiple TSs sowohl in der upstream-Region als auch im Intron-1-Bereich rekrutiert werden. Somit wäre es von großem Interesse Reporterstudien in einer oder mehreren Testis-spezifischen Zelllinien durchzuführen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen könnten dann ähnlich wie in Nierengewebe Untersuchungen zur zellspezifischen Regulation der PPK-Expression durchgeführt werden.

F LITERATURVERZEICHNIS

- Aharon, T., and Schneider, R.J. (1993). Selective destabilization of shortlived mRNAs with the granulocyte-macrophage colony-stimulation factor AU-rich noncoding region is mediated by cotranslational mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1971-1980.
- Andres, V., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1992). Clox, a mammalian homeobox gene related to Drosophila Cut, encodes DNA-binding regulatory proteins differentially expressed during development. *Development* **116**, 324-334.
- Aranburu, A., Carlsson, R., Persson, C., and Leanderson, T. (2001). Transcription factor AP-4 is a ligand for immunoglobulin- κ promoter E-box elements. *Biochem. J.* **354**, 431-438.
- Asakai, R., Davie, E.W., Chung, D.W. (1987). Organization of the gene for human factor XI. *Biochemistry* **26**, 7221-7228.
- Bakheet, T., Frevel, M., Williams, B.R.G., Greer, W., and Khabar, K.S.A. (2001). ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpected diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.* **29**, 246-254.
- Beaubien, G., Rosinski-Chupin, I., Mattei, M.G., Mbikay, M., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1991). Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* **30**, 1628-1635.
- Ben Nasr, A.B., Olsen, A., Sjöbring, U., Müller-Esterl, W., and Björck, L. (1996). Assembly of human contact phase factors and release of bradykinin at the surface of curlin-expressing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**, 927-935.
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., and Cullen, B.R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukarotic cells. *Gene* **66**, 1-10.
- Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., and Worthy, K. (1992). Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**, 1-80.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **377**, 385-386.
- Bock, P.E., Shore, J.D., Tans, G., and Griffin, J.H. (1985). Protein-protein interactions in contact activation of blood coagulation. Binding of high molecular weight kininogen and the 5-(iodoacetoamido)fluorescein-labeled kininogen light chain to prekallikrein, kallikrein, and the separated kallikrein heavy and light chains. *J. Biol. Chem.* **260**, 12434-12443.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**, 549-561.
- Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A., Guarente, L. (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* **334**, 37-42.

- Carretero, O.A., and Scicli, A.G. (1995). The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function, in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* (Largah; J.H., and Brenner, B.M., eds) pp. 983-999, Raven Press, New York.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J.K., DeLamarter, J.F., Becker-Andre, M. (1994). RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and dimers. *Mol. Endocrinol.* **8**, 757-770.
- Caterina, J.J., Donze, D., Sun, C.W., Ciavatta, D.J., Townes, T.M. (1994). Cloning and functional characterisation of LCR-F1: a bZIP transcription factor that activates erythroid-specific, human globin expression. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2383-2391.
- Chelly, J., Concordet, J.P., Kaplan, J.C., Kahn, A. (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2617-2621.
- Chen, J.L., Attardi, L.D., Verrijzer, C.P., Yokomori, K., Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* **79**, 93-105.
- Chen, W., Struhl, K. (1985). Yeast mRNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from the TATA element. *EMBO J.* **4**, 3273-3280.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). A new method to isolate total RNA. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chung, D.W., Fujikawa, K., McMullen, B.A., Davie, E.W. (1986). Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contain four tandem repeats. *Biochemistry* **25**, 2410-2417.
- Ciechanowicz, A., Bader, M., Wagner, J., Ganten, D. (1993). Extra-hepatic transcription of plasma prekallikrein gene in human and rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1370-1376.
- Clements, J.A. (1997). The molecular biology of the kallikreins and their role in inflammation, in *The Handbook of Immunopharmacology. The Kinin System* (Farmer, S.G., ed.) pp. 71-97, Academic Press, London.
- Clevidence, D.E., Overdier, D.G., Tao, W., Qian, X., Pani, L., Lai, E., and Costa R.H. (1993). Identification of nine tissue-specific transcription factors of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead DNA-binding-domain family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3948-3952.
- Colman, R.W., and Wong, P.Y. (1979). Kallikrein-Kinin system in pathologic conditions, in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Erdős, E.G., ed.) pp. 569-607, Springer, Heidelberg, New York.
- Colman, R.W., and Schmaier, A.H. (1997). Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* **90**, 3819-3843.

- Cullen, B.R., & Malim, M.H. (1992). Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Meth. Enzymol.* **216**, 362-368.
- Cosman, D. (1987). Control of messenger RNA stability. *Immunol. Today* **8**, 16-17.
- Dano, K., Moller, V., Ossowski, L., and Nielsen, L.S. (1980). Purification and characterization of plasminogen activator from mouse cells transformed by an oncogenic virus. *Biochim. Biophys. Acta* **613**, 542-555.
- Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassar, A.B., Weintraub H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* **60**, 733-746.
- Dery, O., Corvera, C.U., Steinhoff, M., Bunnett, NW. (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signalling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* **274**, C1429-1452.
- DiScipio, R.G. (1982). The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. *Immunology* **45**, 587-595.
- Dower, W.J., Miller, J.K, and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dubois, M.F., Nguyen, V.T., Bellier, S., Bensaude, O. (1994). Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole and isochinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 13331-13336.
- Dufort, D., and Nepveu, A. (1994). The human Cut homeodomain protein represses expression from the c-myc promoter. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4251-4257.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T., Tijan, R. (1991). Isolation of coactivators associated with TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**, 563-576.
- Emami, K.H., Navarre, W.W., and Smale, S.T. (1995). Core promoter specificities of the SP1 and VP16 transcriptional activation domains. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5906-5916.
- Erdős, E.G., and Skidgel, R.A. (1997). Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease, in *The Handbook of Immunopharmacology. The Kinin System* (Farmer, S.G., ed.) pp. 111-141, Academic Press, London.
- Fritsch, E.F., Sambrook, J., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Funahashi, J.I., Kamachi, Y., Goto, K., Kondoh, H. (1991). Identification of nuclear factor deltaEF1 and its binding site essential for lens-specific activity of the delta1-crystallin enhancer. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3543-3547.
- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W., Wilusz, J. (2001). A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* **20**, 1134-1143.

- Ghebrehiwet, B., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1981). Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J. Exp. Med.* **153**, 665-676.
- Ghebrehiwet, B., Randazzo, B.P., Dunn, J.T., Silverberg, M. and Kaplan, A.P. (1983). Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J. Clin. Invest.* **71**, 1450-1456.
- Gordon, E.M., Gallagher, C.A., Johnson, T.R., Blossey B.K., Ilan, J. (1990). Hepatocytes express blood coagulation factor XII (Hagemann factor). *J. Lab. Clin. Med.* **115**; 463-469.
- Gounari, F., De Francesco, R., Schmitt, J., van der Vliet, P., Cortese, R., and Stunnenberg, H. (1990). Aminoterminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* **9**, 559-566.
- Grimes, H.L., Gilks, C.B., Chan, T.O., Porter, S., and Tschlis, P.N. (1996a). The GFI-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14569-14573.
- Grimes, H.L., Chan, T.O., Zweidler-McKay, P.A., Tong, B., and Tschlis, P.N. (1996b). The GFI-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G₁ arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6263-6272.
- Gronostajski, R.M. (1986). Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **14**, 9117-9132.
- Gronostajski, R. (1987). Site specific binding of nuclear factor I: effect of the spacer region. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5545-5559.
- Gronostajski, R.M. (2000). Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* **249**, 31-45.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**, 85-94.
- Hall, J.M., and Morton, K.M. (1997). The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors, in *The Handbook of Immunopharmacology. The Kinin System* (Farmer, S.G., ed.) pp. 9-43, Academic Press, London.
- Harrold, S., Genovese, C., Kobrin, B., Morrison, S.L., and Milcarek, C. (1991). A comparison of apparent mRNA half-life using kinetic labeling techniques vs. decay following administration of transcriptional inhibitors. *Anal. Biochem.* **198**, 19-29.

- Hauert, J., Nicoloso, G., Schleuning, W.D., Bachmann, F., and Schapira, M. (1989). Plasminogen activators in dextran sulfate-activated euglobulin fractions: a molecular analysis of factor XII- and prekallikrein-dependent fibrinolysis. *Blood* **73**, 994-999.
- Hecquet, C., Tan, F.L., Marcic, B.M., Erdös, E.G. (2000). Human bradykinin B-2 receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol. Pharmacol.* **58**, 828-836.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986-994.
- Hellqvist, M., Mahlapuu, M., Samuelsson, L., Enerbaeck, S., and Carlsson, P. (1996). Differential activation of lung-specific genes by two forkhead proteins, FREAC-1 and FREAC-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 4482-4490.
- Henderson, L.M., Figueroa, C.D., Müller-Esterl, W., Stain, A., and Bhoola, K.D. (1992). Immunovisualisation of plasma prekallikrein and H-kininogen on human neutrophils and in human hepatocytes. *Agents Actions Suppl.* **38**, 590-594.
- Hermann, A., Buchinger, P., Somlev, B., Rehbock, J. (1996). High and low molecular weight kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein in villous capillaries of human term placenta. *Placenta* **17**, 223-230.
- Hermann, A., Arnhold, M., Kresse, H., Neth, P., Fink, E. (1999). Expression of components of the kallikrein-kinin system in human cell lines. *Immunopharmacology* **45**, 135-139.
- Hermann, A., Arnhold, M., Kresse, H., Neth, P., Fink, E. (1999). Expression of plasma prekallikrein mRNA in human nonhepatic tissues and cell lineages suggests special functions of the enzyme. *Biol. Chem.* **380**, 1097-1102.
- Herwald, H., Mörglin, M., and Olsen, A. (1998). Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces: a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat. Med.* **4**, 298-302.
- Hojima, Y., Pierce, J.V., and Pisano, J.J. (1985). Purification and characterization of multiple forms of human plasma prekallikrein. *J. Biol. Chem.* **260**, 400-406.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7276-7280.
- Hu, Y.F., Luscher, B., Admon, A., Mermod, N., and Tjian, R. (1990). Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev.* **4**, 1741-1752.
- Ichinose, A., Fujikawa, K., and Suyama, T. (1986). The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J. Biol. Chem.* **261**, 3486-3489.
- Johnsen, O., Murphy, P., Prydz, H., Kolsto, A.-B. (1998). Interaction of CNC-bZip factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucleic Acids Res.* **26**, 512-520.

- Kamachi, Y., Kondoh, H. (1993). Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the delta1-crystallin enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5206-5215.
- Kaplan, A.P., Joseph, K., Shibayama, Y., Nakazawa, Y., Ghebrehiwet, B., Reddigari, S., Silverberg, M. (1998). Bradykinin formation - Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **16**, 403-429.
- Kedinger, C., Gniazdowski, M., Mandel, J.L., Gissinger, F., Chambon, P. (1970). Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 165-171.
- Keller, C., Grützmaker, P., Bahr, F., Schwarzbeck, A., Kroon, A.A., and Kiral, A. (1993). LDL-apheresis with dextran sulphate and anaphylactoid reactions to ACE inhibitors. *Lancet* **341**, 60-61.
- Kim, J.L., Nikolov, D.B., Burley S.K. (1993). Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of the TATA element. *Nature* **365**, 520-527.
- Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **248**, 450-452.
- Kumar, A.S., Venkatesh, V.C., Planer, B.C., Feinstein, S.I., and Ballard, P.L. (1997). Phorbol ester down-regulation of lung surfactant protein B gene expression by cytoplasmic trapping of thyroid transcription factor-1 and hepatocyte nuclear factor 3. *J. Biol. Chem.* **272**, 20764-20773.
- Lagnado, C.A., Brown, C.Y., and Goodall, G.J. (1994). AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of a mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7984-7995.
- Lau, P., Bailey, P., Dowhan, D.H., and Muscat, G.E.O. (1999). Exogenous expression of dominant negative ROR α 1 vector in muscle cells impairs differentiation: ROR α 1 directly interacts with p300 and MyoD. *Nucleic Acids Res.* **27**, 411-420.
- Lebowitz, J.H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D., Sharp, P.A. (1988). Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev.* **2**, 1227-1237.
- Lill, H. (1999). Blutgerinnung und Fibrinolyse, in *Biochemical Pathways* (Michal, G., ed.), pp. 251-257, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lin C.S., Lau, A., Tu, R., and Lue, T.F. (2000). Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **268**, 596-602.
- Lindell, T.J., Weinberg, F., Morris, P.W., Roeder, R.G., Rutter, W.J. (1970). Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-Amanitin. *Science* **170**, 447-449.

- Linz, W., Wiemer, G., Wirth, K., and Schölkens, B.A. (1997). The role of kinins in the cardiac effects of ACE inhibitors and myocardial ischemia, in *The Handbook of Immunopharmacology. The Kinin System* (Farmer, S.G., ed.) pp. 315-323, Academic Press, London.
- Loskutoff, D.J., and Edgington, T.E. (1977). Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3903-3907.
- Lowenhaupt, K., and Lingrel, J.B. (1978). A change in the stability of globin mRNA during the induction of murine erythroleukemia cells. *Cell* **14**, 337-344.
- Mandle, R.J., Colman, R.W., and Kaplan, A.P. (1976). Identification of prekallikrein and high molecular weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4279-4283.
- Mandle, R.J., and Kaplan, A.P. (1977). Hageman factor substrates. II. Human plasma prekallikrein. Mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor dependent fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* **252**, 6097-6104.
- Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237-1245.
- Mantovani, R. (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1135-1143.
- Marceau, F. (1997). Kinin B1 receptor induction and inflammation, in *The Handbook of Immunopharmacology. The Kinin System* (Farmer, S.G., ed.) pp. 143-156, Academic Press, London.
- Maruyama, K., and Sugano, S. (1994). Oligo-Capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**, 171-174.
- McMullen, B.A., Fujikawa, K., Davie, E.W. (1991). Localisation of disulfide bonds in human plasma kallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule. *Biochemistry* **30**, 2050-2056.
- Merika, M., Orkin, S.H. (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3999-4010.
- Merika, M., and Thanos, D. (2001). Enhanceosomes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **11**, 205-208.
- Mermod, N., Williams, T.J., Tjian, R. (1988). Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* **332**, 557-561.
- Motta, G., Rojkaer, R., Hasan, A.A.K., Cines, D.B., and Schmaier, A.H. (1998). High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: A novel mechanism for contact activation. *Blood* **91**, 516-528.
- Müller-Berghaus, G., Pötzsch, B. (1999). *Hämostasiologie*. Heidelberg: Springer-Verlag, 122-148.

- Müllertz, S. (1984). Fibrinolysis: an overview. *Sem. Thromb. Hemost.* **10**, 1-5.
- Nie, J., Ota, K., Morisawa, K., Auer, B., Schweiger, M., and Taniguchi, T. (1998). Analysis of the TPA regulatory element in the genomic poly(ADP-ribose) synthetase gene in human leukemia U937 cells. *Biochemistry* **37**, 14181-14188.
- Nomoto, S., Tatematsu, Y., Takahashi, T., Osada, H. (1999). Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression. *Gene* **236**, 259-271.
- Normant, E., Gros, C., and Schwartz, J.-C. (1995). Carboxypeptidase A isoforms produced by distinct genes or alternative splicing in brain and other extrapancreatic tissues. *J. Biol. Chem.* **270**, 20543-20549.
- Olbricht, C.J., Schaumann, d., and Fischer, D. (1992). Anaphylactoid reactions, LDL apheresis with dextran sulphate, and ACE inhibitors. *Lancet* **340**, 908.
- Opstelelen, D.J., Vogels, R., Robert, B., Kalkhoven, E., Zwartkruis, F., de Laaf, L., Destree, O.H., Deschamps, J., Lawson, K.A., Meijlink, F. (1991). The mouse homeobox gene, S8, is expressed during embryogenesis predominantly in mesenchyme. *Mech. Dev.* **34**, 29-41.
- Osada, S., Daimon, S., Nishihara, T., and Imagawa, M. (1996). Identification of DNA binding-site preferences for nuclear factor I-A. *FEBS Lett.* **390**, 44-46.
- Overdier, D.G., Ye, H., Peterson, R.S., Clevidence, D.E., and Costa, R.H. (1997). The winged helix transcriptional activator HFH-3 is expressed in the distal tubules of embryonic and adult mouse kidney. *J. Biol. Chem.* **272**, 13725-13730.
- Parker, C.S., and Topol, J. (1984). A Drosophila RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell* **36**, 357-369.
- Parnes, E.L., and Shapiro, W.B. (1991). Anaphylactoid reactions in hemodialysis patients treated with the AN69 dialyzer. *Kidney Int.* **40**, 1148-1152.
- Perry, R.P., Kelley, D.E. (1970). Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J. Cell. Physiol.* **76**, 127-139.
- Perrotti, D., Melotti, P., Skorski, T., Casella, I., Peschle, C., and Calabretta, B. (1995). Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: Correlation with negative regulation of CD34 and c-myb promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6075-6087.
- Pugh, B.F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* **255**, 1-14.
- Reddigari, S.R., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1997). Bradykinin formation in allergic diseases and hereditary angioedema, in *The Handbook of Immunopharmacology. The Kinin System* (Farmer, S.G., ed.) pp. 265-285, Academic Press, London.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* **59**, 423-450.

- Rowlands, T., Baumann, P., Jackson S.P. (1994). The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* **264**, 1326-1329.
- Ruiz-Vazquez, P., Moulard, M., and Silva, F.J. (1996). Structure of the phenylalanine hydroxylase gene in *Drosophila melanogaster* and evidence of alternative promoter usage. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **225**, 238-242.
- Sachs, A.B. (1993). Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* **74**, 413-421.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Samadani, U., Costa, R.H. (1996). The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6273-6284.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulsen, A.R. (1977). DNA sequencing with chain- termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sawadogo, M., and Roeder, R.G. (1985). Interaction of gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**, 165-175.
- Schaefer, B.C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**, 255-273.
- Schapira, M., Despland, E., Scott, C.F., Boxer, L.A., and Colman, R.W. (1982). Purified human plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils. *J. Clin. Invest.* **69**, 1199-1202.
- Schapira, M., Scott, C.F., Boxer, L.A. and Colman, R.W. (1983). Activation of human polymorphonuclear leukocytes by purified human plasma kallikrein. *Adv. Exp. Med. Biol.* **156**, 747-753.
- Schenk, P.W., and Snaar-Jagalska, B.E. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochem. Biophys. Acta* **1449**, 1-24.
- Schreiber, E., Tobler A., Malipiero U., Schaffner, W., Fontana, A. (1993). cDNA cloning of human N-Oct 3, a nervous-system specific POU domain transcription factor binding to the octamer DNA motif. *Nucleic Acids Res.* **21**, 253-258.
- Sekido, R., Murai, K., Funahashi, J.I., Kamachi, Y., Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, J.I., Kondoh, H. (1994). The delta-crystallin enhancer-binding protein deltaEF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5692-5700.
- Selvarajan, S., Lund, L.R., Takeuchi, T., Craik, C.S., and Werb, Z. (2001). A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 267-275.

- Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10104-10108.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **269**, 32678-32684.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. & Lukyanov, S.A. (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1087-1088.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244.
- Smale, S.T., Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**, 103-113.
- Smale, S.T. (1994) in *Transcription: mechanisms and regulation* (Conaway and Conaway, eds.), pp. 63-81, Raven Press, New York.
- Smale, S.T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1351**, 73-88.
- Sobel, G.W., Moler, S.R., Jones, N.W., Dewdy, A.B.C., and Guest, M.M. (1952). Urokinase: an activator of plasma profibrinolysis extracted from urine. *Am. J. Physiol.* **171**, 768-769.
- Sobell, H.M. (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5328-5331.
- Sturm, R.A., Das, G., Herr, W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* **2**, 1582-1599.
- Takada, A., Takada, Y., and Urano, T. (1994). The physiological aspects of fibrinolysis. *Thromb. Res.* **76**, 1-31.
- Tapper, H., and Herwald, H. (2000). Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood* **96**, 2329-2337.
- Tielemans, C., Madhoun, P., Lenaers, M., Schandene, L., Goldman, M, and Vanherweghem, J.-L. (1990). Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney Int.* **38**, 982-984.
- Tissot, J.D., Schneider, P., Hauert, J., Ruegg, M., Kruithof, E.K., and Bachmann, F. (1982). Isolation from human plasma of a plasminogen activator identical to urinary high molecular weight urokinase. *J. Clin. Invest.* **70**, 1320-1323.
- Tolner, B., Roy, K., Sirotnak, F.M. (1998). Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene* **211**, 331-341.

- Tucker, M., and Parker, R. (2000). Mechanisms and control of mRNA decapping in *saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Biochem.* **69**, 571-595.
- Umenishi, F., and Verkman, A.S. (1998). Isolation and functional analysis of alternative promoters in the human aquaporin-4 water channel gene. *Genomics* **50**, 373-377.
- Valarche, I., Tissier-Seta, J.-P., Hirsch, M.R., Martinez, S., Goridis, C., and Brunet, J.F. (1993). The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* **119**, 881-896.
- van der Graaf, F., Tans, G., Bouma, B.N., and Griffin, J.H. (1982). Isolation and functional properties of the heavy and light chains of human plasma kallikrein. *J. Biol. Chem.* **257**, 14300-14305.
- Veloso, D., and Colman, R.W. (1991). Western Blot analysis of prekallikrein and its activation products in human plasma. *Thromb. Haemost.* **6**, 382-388.
- Verresen, L., Waer, M., Vanrenterghem, Y. and Michielsen, P. (1990). Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-flux membrane dialysis. *Lancet* **336**, 1360-1362.
- Volloch, V., Schweitzer, B., and Rits, S. (1994). Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta-globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2507-2511.
- Wachtfogel, Y.T., Kucich, U., James, H.L., Scott, C.F., Schapira, M., Zimmerman, M., Cohen, A.B., and Colman, R.W. (1983). Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. *J. Clin. Invest.* **72**, 1672-1677.
- Wijngaards, G., Kluft, C., and Groeneveld, E. (1982). Demonstration of urokinase-related fibrinolytic activity in human plasma. *Br. J. Haematol.* **51**, 165-169.
- Wunderle, V.M., Critcher, R., Ashworth A., and Goodfellow P.N. (1996). Cloning and characterization of SOX5, a new member of the human SOX gene family. *Genomics* **36**, 354-358.
- Xu, G., and Goodridge, A.G. (1996). Characterization of a polypyrimidine/polypurine tract in the promoter of the gene for chicken malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **271**, 16008-16019.
- Xu, G., and Goodridge, A.G. (1998). A CT repeat in the promoter of the chicken malic enzyme gene is essential for function at an alternative transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 83-91.
- Yanai, K., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Shigematsu, Y., Shimamoto, Y., Saito, T., Chowdhury, S., Takiguchi, M., Arakawa, M., Nibu., Y., Sugiyama, F., Yagami, K., and Fukamizu, A. (1999). Regulated expression of human angiotensin gene by hepatocyte nuclear factor 4 and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 34605-34612.

- Yankulov, K., Yamashita, K., Roy, R., Egly, J.M., and Bentley, D.L. (1995). The transcriptional elongation inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription factor IIIH-associated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 23922-23925.
- Yu, H., Anderson, P.J., Freedman, B.I., Rich, S.S., and Bowden, D.W. (2000). Genomic structure of the human plasma prekallikrein gene, identification of allelic variants, and analysis in end-stage renal disease. *Genomics* **69**, 225-334.
- Zenzie-Gregory, B., Khachi, A., Garraway, I.P., Smale, S.T. (1993). Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3841- 3849.
- Zubiaga, A.M., Belasco, J.G., and Greenberg, M.E. (1995). The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2219-2230.
- Zweidler-McKay, P.A., Grimes, H.L., Flubacher, M.M., and Tschlis, P.N. (1996). GFI-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4024-4034.

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Edwin Fink bedanken, der mir die Gelegenheit offerierte in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation mit der durch die DFG geförderten Thematik „*Bedeutung der extrahepatischen Synthese von Plasma-Prokallikrein*“ (Fi 204/6-1) anzufertigen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei sein ständig offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme im Labor und insbesondere seine stetig kreative Diskussionsbereitschaft. Diese freundschaftliche Atmosphäre trug ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Wolf Gutensohn gilt ebenso ein herzliches Dankeschön, da ich in seiner Arbeitsgruppe erstmals einen tieferen Einblick in die Techniken der Molekularbiologie und Biochemie erhalten habe, und nicht zuletzt deshalb, weil er freundlicherweise die Betreuung dieser Arbeit vor der biologischen Fakultät der LMU-München übernommen hat.

Weiterhin danke ich sehr herzlich den Leitern der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik Frau Prof. Dr. Marianne Jochum und Herrn Prof. Dr. Hans Fritz, dass sie es mir ermöglicht haben, meine Promotionsarbeit im Bereich der klinischen Biochemie anzufertigen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus von der Helm, weil ich durch ihn die Gelegenheit erhalten hatte, in dem interessanten Feld der viralen Diagnostik bei der Xenotransplantation arbeiten zu können. Ebenso hervorheben möchte ich das freundschaftliche Verhältnis, seine stetig ideenreiche Diskussionsbereitschaft und insbesondere seine Toleranz, weil ich einen Großteil dieser schriftlichen Arbeit während des Beginns meiner Post-Doc Zeit anfertigen konnte.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich Frau Marianne Arnhold sagen, die durch ihre außerordentlich engagierte experimentelle Unterstützung sehr zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne ihre „goldenen Hände“ und ihrer Gewissenhaftigkeit insbesondere bei den unzähligen quantitativen PCR-Studien wären viele Teile dieser Arbeit nur unter dem Einsatz von zahlreichen Nachtschichten möglich gewesen. Ebenso möchte ich mich bei ihr für die stetige Hilfsbereitschaft und die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau Gudrun Godec, die durch ihre heitere und aufmunternde Art stets für eine gute Stimmung im Labor sorgte.

Weiterhin danke ich recht herzlich Frau Helga Maierhofer und Herrn Dr. Hans Nitschko für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Unterstützung während der Etablierung des TaqMan-Verfahrens im Max von Pettenkofer-Institut.

Allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Alexandra Bauer, Dr. Jürgen Blusch, Dr. Alexander Faußner, Amaury Fernandez-Montalvan, Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger, Dr. Beatriz Garcia-Diaz, Dr. Shirley Gil-Parrado, Dr. Stefan Groß, Heide Hinz, Claudia Huber, Dr. Siegrid Köhler, Dr. Hans Kresse, Thomas Laßleben, Dr. Alexandre Lopes, Dr. Gabi Matschiner, Barbara Meisel, Dr. Matthias Moser, Dr. Dietmar Pfeiler, Dr. Christian Ries, Dr. Elisabeth Schremmer-Danninger, Steffen Schüssler, Sabine Streicher, Dr. Tatjana Tannenberg, Frank Zettel und Rita Zauner danke ich ganz herzlich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Diskussionen und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Bei meinen Eltern möchte ich mich besonders bedanken, weil sie mir das Studium der Biologie und Chemie ermöglicht haben.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Frau Nicole, die während dieser ganzen Zeit hinter mir gestanden ist. Vor allem ihre lebensfrohe Art hat mich die teilweise langen Durststrecken bis zur Fertigstellung dieser Arbeit vergessen lassen.

LEBENS LAUF

Personalien

Name: Neth, Peter Wilhelm
Wohnort: Meichelbeckstraße 4a, 87616 Marktoberdorf
Geburtsdatum: 05. November 1967
Geburtsort: Marktoberdorf
Familienstand: verheiratet; ein Kind

Schulbildung

1974 – 1978 Besuch der St. Martin-Grundschule Marktoberdorf
1978 – 1987 Besuch des math. nat. Gymnasiums Marktoberdorf
Juni 1987 Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst

01.01.1988 – 31.03.1989

Studium

1989 – 1995 Gymnasiallehramts-Studium der Biologie und der Chemie (beide Fächer vertieft studiert) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juni 1995 Erstes Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie

Promotion

1996 – 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der LMU-München (Vorstand: Prof. Dr. Hans Fritz). Erarbeitung der experimentellen Daten zur vorliegenden Dissertation

Post-Doc Zeit

Seit März 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max von Pettenkofer-Institut der LMU-München in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Klaus von der Helm

PUBLIKATIONSLISTE

- Neth, P., Arnhold, M., Nitschko, H., Fink, E. (2001). The mRNAs of prekallikrein, factors XI and XII, and kininogen, components of the contact phase cascade are differentially expressed in multiple non-hepatic human tissues. *Thromb. Haemost.* **85**, 1043-1047.
- Hermann, A., Arnhold, M., Kresse, H., Neth, P., and Fink, E. (1999). Expression of components of the kallikrein-kinin systems in human cell lines. *Immunopharmacology* **45**, 135-139.
- Hermann, A., Arnhold, M., Kresse, H., Neth, P., and Fink, E. (1999). Expression of plasma prekallikrein mRNA in human nonhepatic tissues and cell lineages suggests special local functions of the enzyme. *Biol. Chem.* **380**, 1097-1102.
- Randak, C., Neth, P., Auerswald, E.A., Eckerskorn, C., Assfalg-Machleidt, I., and Machleidt, W. (1997). A recombinant polypeptide model of the second nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functions as an active ATPase, GTPase and adenylate kinase. *FEBS Lett.* **410**, 180-186.
- Randak, C., Neth, P., Auerswald, E.A., Assfalg-Machleidt, I., Roscher, A.A., Hadorn, H.-B., and Machleidt, W. (1996). A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS Lett.* **398**, 97-100.

Epilog

Utopien erweisen sich als weit realisierbarer, als man früher glaubte. Und wir stehen heute vor einer auf ganz andere Weise beängstigenden Frage: Wie können wir ihre endgültige Verwirklichung verhindern? ... Utopien sind machbar. Das Leben hat sich auf die Utopien hinentwickelt. Und vielleicht beginnt ein neues Zeitalter, ein Zeitalter, in dem Intellektuelle und Gebildete Mittel und Wege erwägen, die Utopien zu vermeiden und zu einer nichtutopischen, einer weniger „vollkommenen“ und einer freieren Gesellschaftsform zurückzukehren.

Nikolai Berdjajew