

**Molekularbiologische Untersuchungen differenziell exprimierter
Gene in Tumoren der humanen Epidermis**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf**

**Vorgelegt von
Thomas Welss
aus Trier**

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. T. Ruzicka
Korreferent: Prof. Dr. W. Kunz

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2002

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe, bzw. keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde.

Düsseldorf, im Februar 2002

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1. Tumore der Haut	2
1.1.1. Hauttumore des nicht-melanozytären Typs (NMSC)	3
1.1.1.1. Basalzellkarzinome	3
1.1.1.2. Plattenepithelkarzinome	3
1.2. Karzinogenese der NMSC	4
1.3. Serinprotease-Inhibitoren (Serpine)	7
1.3.1. Struktur der Serpine und Mechanismus der Inhibition	7
1.4. Das Ovalbumin-Serpin (Ov-Serpin) Hurlin	9
1.5. Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	
2.1. Material	11
2.1.1. Antibiotika	11
2.1.2. Antikörper	11
2.1.3. Chemikalien	11
2.1.4. Enzyme	11
2.1.5. Kits	11
2.1.6. Membranen	12
2.1.7. Oligonukleotide	12
2.1.8. Medien und Medienzusätze	12
2.1.9. Molekulargewichtsstandards	13
2.1.10. Vektoren	13
2.2. Methoden	13
2.2.1. Zellkultur mit der HaCaT-Zelllinie	13
2.2.2. Zellkultur mit primären Keratinozyten (NHK)	13
2.2.3. Hautbiopsien	14
2.2.4. Nukleinsäureanalysen	14
2.2.4.1. Isolierung von RNA aus Zelllinien	14
2.2.4.2. Isolierung von RNA aus Gewebe	14
2.2.4.3. Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten BCC	15

2.2.4.4.	Isolierung von DNA aus Hefe	15
2.2.4.5.	Isolierung von Plasmid-DNA aus P1 Phagen DNA-Klonen	15
2.2.4.6.	Reverse Transkription von RNA	16
2.2.4.7.	Primerextensions-Analysen	16
2.2.4.8.	Sequenzanalysen	17
2.2.4.9.	Polymerase-Kettenreaktion	17
2.2.4.10	Semiquantitative RT-PCR	18
2.2.5.	“Differential Display” Polymerase Kettenreaktion	19
2.2.5.1.	DNase-Behandlung der RNA	19
2.2.5.2.	cDNA-Synthese	19
2.2.5.3.	DDRT-PCR	20
2.2.5.4.	Auswahl und Isolierung der Banden	21
2.2.5.5.	Reamplifizierung	22
2.2.5.6.	Verifizierung mittels reverser Northern-Dot-Blot-Analyse	23
2.2.5.7.	Klonierung	23
2.2.5.8.	Plasmidpräparation	24
2.2.5.9.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	24
2.2.6.	Radioaktive Markierung von DNA durch “random priming”	24
2.2.7.	Hybridisierung von Membranen	25
2.2.8.	Southern-Blot-Analysen	25
2.2.9.	Southern-Dot-Blot-Analysen	25
2.2.10.	Untersuchung von bekannten Genen mit Hilfe der humanen cDNA Arrays	26
2.2.10.1.	Generierung von cDNA-Bibliotheken mittels SMART-PCR	26
2.2.11.	Synthese von rekombinantem Hurpin in <i>Pichia pastoris</i>	28
2.2.11.1.	Klonierungsstrategie	28
2.2.11.2.	Transformation von Hefe	28
2.2.11.3.	Expression und Isolation von rekombinantem Hurpin	29
2.2.11.4.	Metallaffinitäts-Säulenchromatographie	29
2.2.11.5.	Ionenaustausch-Säulenchromatographie	30
2.2.12.	Isolation von Protein aus BCC und gesunder Haut	30
2.2.13.	Bestimmung der Konzentration von Gesamtprotein	30

2.2.14	Bestimmung der Konzentration von rekombinantem Protein	31
2.2.15.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	31
2.2.15.1.	SDS-PAA-Gele	31
2.2.15.2.	SDS-PAA-Gradientengele	31
2.2.15.3.	Transversale Harnstoffgradienten PAA-Gelelektrophorese (TUG-PAGE)	32
2.2.16.	Färbung der Proteingele	33
2.2.16.1.	“Coomassie blue“-Färbung	33
2.2.16.2.	Silberfärbung	33
2.2.17.	Western-Blot-Analysen	33
2.2.18.	Immunhistologie	33
2.2.19.	Zielgerichtete Mutagenese	34
2.2.20.	Protease-Inhibitionsassays	34
2.2.20.1.	Aktivitätsbestimmung der Cysteinproteasen Cathepsin B und L	34
2.2.20.2.	Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition	35
2.2.20.3.	Bestimmung der Assoziationskonstante	35
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Identifizierung von BCC-assozierten, differenziell exprimierten Genen	37
3.1.1.	Differenzielle Hybridisierung von cDNA-Arrays	37
3.1.2.	Expressionsstudien der in den cDNA-Arrays differenziell exprimierten Gene	39
3.1.3.	Expressionsprofilierung mittels “Differential Display” RT-PCR (DDRT-PCR)	41
3.1.4.	Überprüfung der differenziellen Expression mittels reverser Northern-Dot-Blot-Analysen	42
3.2.	Analysen der differenziellen Expression des BCC-assozierten Gens für das heterogene-nukleäre-RNA-bindende-Protein D0 (hnRNP D0)	45
3.2.1.	Western-Blot-Analysen zur Expressionstudie von hnRNP D0 in BCC und gesunder Haut	45

3.2.2.	Immunhistologische Untersuchungen der hnRNP D0-Expression in BCC	46
3.3.	Transkriptionelle Analysen des neuen Serinprotease-Inhibitors Hurpin	47
3.3.1.	Expression von Hurpin in Hauttumoren	47
3.3.2.	Expression von Hurpin in verschiedenen SCC-Zelllinien	48
3.3.3.	Expression von Hurpin in verschiedenen humanen Geweben	49
3.4.	Isolierung und Charakterisierung des genomischen Klons von Hurpin	50
3.4.1.	Isolierung des genomischen Klons von Hurpin	50
3.4.2.	Verifizierung der positiven P1-Klone mittels Restriktionsspaltung und Southern-Blot-Analysen	51
3.4.3.	Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts	52
3.5.	Western-Blot-Analysen zur Spezifität der polyklonalen anti-Hurpin Antikörper	53
3.6.	Biochemische Analysen von Hurpin	54
3.6.1.	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Hurpin	54
3.6.1.1.	Aufreinigung mittels Metallaffinitäts-Säulenchromatographie	54
3.6.1.2.	Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Säulenchromatographie	55
3.6.2.	Transversale Harnstoffgradienten PAA-Gelanalyse	56
3.6.3.	Isolation und Identifizierung der P1-P1'-Schnittstelle	57
3.6.4.	Expression von gezielt mutiertem Hurpin	58
3.6.5.	Auswahl von transformierten Hefeklonen mit stabil integrierten Hurpinmutationen	58
3.7.	Inhibitions von Cysteinproteasen durch Hurpin	60
3.7.1.	Bestimmung der proteolytischen Aktivität der humanen Cathepsine B und L	61
3.7.2.	Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) von humanen Cysteinproteasen durch Hurpin	61
3.7.2.1.	Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) von humanem Cathepsin B durch Hurpin	62

3.7.2.2.	Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) von humanem Cathepsin L durch Hurpin	63
3.7.3.	Bestimmung der Assoziationskonstante (k_{ass}) der Inhibition von humanem Cat L durch Hurpin	65
4.	Diskussion	68
4.1.	Identifizierung von NMSC-assoziierten Genen	69
4.1.1.	Humane cDNA Expressionsarrays	69
4.1.1.1.	Mikrosomale Glutathion-S-Transferase (GST 12)	69
4.1.1.2.	Glutaredoxin	70
4.1.1.3.	„Teratocarcinoma-derived growth factor“ Cripto	71
4.1.1.4.	Janus Tyrosin Kinase 3 (Jak3)	72
4.1.1.5.	Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	73
4.1.2.	DDRT-PCR	75
4.1.2.1.	Das heterogene-nukleäre-RNA-bindende-Protein D0 (hnRNP D0)	75
4.2.	Untersuchungen des neuen Ov-Serpins Hurpin	77
4.2.1.	Expression von Hurpin in unterschiedlichen humanen Geweben	77
4.2.2.	Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation von Hurpin	78
4.2.3.	Biochemische und funktionelle Untersuchungen von Hurpin	79
4.2.4.	Die mögliche Relevanz der Inhibition von Cat L durch Hurpin in pathologischen und physiologischen Situationen	81
4.3.	Ausblick	84
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	99
	Lebenslauf	100

Verzeichnis der Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BCC	Basalzellkarzinom
BSA	bovines Serumalbumin
Cat L, B	Cathepsin L, B
cDNA	Copy Desoxynukleinsäure
DDRT-PCR	„Differential Display“ RT-PCR
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	„Expressed sequence tag“
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
GST 12	mikrosomale Glutathion-S-Transferase
HaCaT	Humane Keratinozyten-Zelllinie
hnRNP	heterogene-nukleäre-RNA-bindendes Protein
HRP	Peroxidase aus Meerrettich isoliert
Jak3	Janus-Tyrosin-Kinase 3
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1
NMSC	Hauttumoren des nicht-melanozytären Typs
NHK	Primäre Keratinozyten
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	RNA-Protease-Inhibitoren
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSL	exponierte, reaktive Schleife bei Serpinen
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SCC	Plattenepithelkarzinom
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
SI	Stöchiometrie der Inhibition
STS	„sequence tagged sites“
TEMED	Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUG	Transversales Harnstoffgradientengel

UV-Strahlung

Ultraviolette Strahlung

1. Einleitung

Tumore der Haut sind in der kaukasischen Weltbevölkerung die häufigsten Krebserkrankungen und die Anzahl der Menschen, die jährlich an Hauttumoren erkranken, steigt stetig an (de Gruijl, 1999). Der hauptsächliche Grund für diese Zunahme der Inzidenz, die in den vergangenen Dekaden festgestellt wurde, liegt in der vermehrten Exposition der Haut mit UV-Strahlung. Dies ist zum einen durch die fortschreitende Depletion der UV-protectiven stratosphärischen Ozonschicht, zum anderen aber auch in geändertem Freizeitverhalten und Schönheitsbewusstsein begründet.

Als äußerer „Mantel“ schützt die Haut den Körper vor chemischen und physikalischen Noxen und dem Befall durch Pathogene. Neben diesen Aufgaben ist die Haut maßgeblich an der Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushaltes beteiligt und für den Tastsinn verantwortlich. Die Haut bedeckt durchschnittlich eine Fläche von 1,8 m² und ist mit ca. 16 % des Körpergewichtes das größte Organ des Menschen. Sie ist ein mehrschichtiges, epitheliales Gewebe ektodermaler Herkunft und baut sich aus der Epidermis, der Dermis und der Subcutis auf.

In Hinblick auf die Entstehung und die Lokalisation von Hauttumoren ist die Epidermis von entscheidender Bedeutung, da sie ist die äußerste Schranke der Haut gegenüber Karzinogenen bildet.

Die Epidermis ist ein gefäßloses, mehrschichtiges Plattenepithel mit einer durchschnittlichen Dicke von ca. 60 bis 100 µm. Neben den Melanozyten mit UV-protectiven Aufgaben, den Antigen-präsentierenden Langerhanszellen und den Merkelzellen bilden die Keratinozyten die Mehrzahl der epidermalen Zellen.

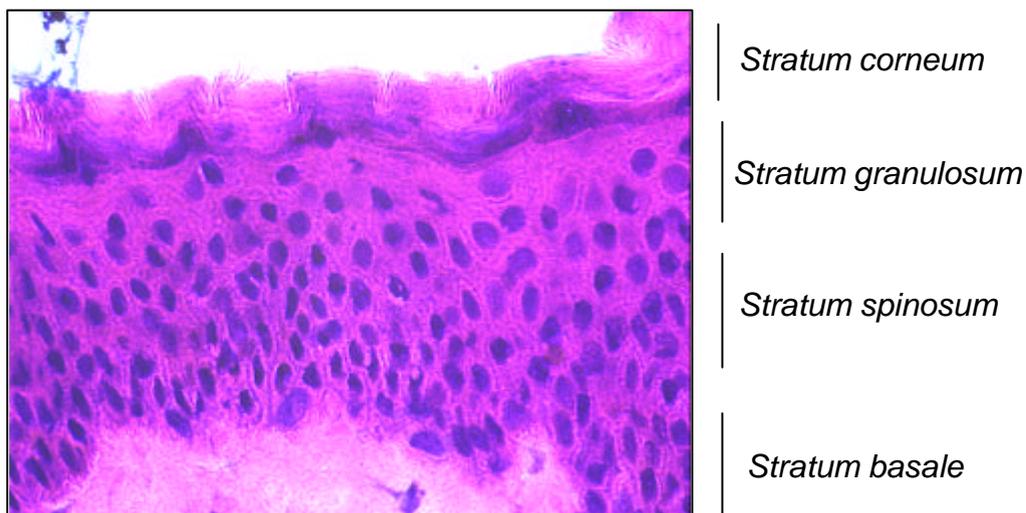


Abbildung 1. Aufbau der humanen Epidermis (Hämatoxylin-Eosin Färbung)

Getrennt durch die Basalmembran, liegt das einschichtige *Stratum basale* an der Grenze zur Dermis. Im *Stratum basale* befinden sich die Stammzellen der Keratinozyten, welche durch Mitose Tochterzellen an die suprabasalen Schichten absiedeln. Diese mitotisch inaktiven Tochterzellen durchlaufen auf dem ca. 2- bis 4-wöchigen Weg durch die Schichten der Epidermis (*Stratum*

spinosum, Stratum granulosum) eine regulierte, terminale Differenzierung, die in verhornten Schuppen in der Hornschicht (*Stratum corneum*) endet.

1.1. Tumore der Haut

Als Hauttumore bezeichnet man alle Tumore, die, unabhängig von ihrer zellulären Abstammung, in der Haut lokalisiert sind. Man unterscheidet zwischen benignen und malignen Tumoren. Benigne oder gutartige Tumore sind lokal begrenzte Geschwüre, die ihr neoplastisches Wachstum einstellen und chirurgisch leicht zu entfernen sind. Hierzu zählen zum Beispiel auch die durch Papillomaviren induzierten Warzen. Maligne, bösartige Tumore besiedeln auch umliegendes Gewebe und können durch Abgabe von Tumorzellen in das Blut- oder Lymphsystem zur Bildung von Sekundärtumoren (Metastasen) führen.

Die heterogene Gruppe der Hauttumoren wird in zwei systematische Familien unterteilt: die Melanome und die Hauttumore vom nicht-melanozytären Typ. Die letztere Gruppe wird in Anlehnung an die englische Nomenklatur („non-melanoma skin cancer“) mit NMSC abgekürzt.

Die Transformation einer normalen Zelle zur neoplastischen Zelle und zur Tumorgeschwulst verläuft nicht spontan, sondern über unterschiedliche Zwischenstufen, die mit zahlreichen morphologischen und physiologischen Veränderungen einhergehen. Das Modell der Mehrschrittkarzinogenese bietet die Möglichkeit, mittels molekularbiologischer und histologischer Methoden definierbare Unterteilungen treffen zu können. Man unterscheidet hierbei drei Phasen, die letztendlich zur Ausprägung von Tumoren führen: die Tumorinitiation, die Tumorpromotion und die Tumorprogression.

Die Tumorinitiation ist gekennzeichnet durch die Entstehung und Konservierung von Mutationen in der DNA. Besonders kritisch sind in diesem Zusammenhang Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder in Proto-Onkogenen.

Die klonale Expansion der transformierten Zelle wird durch weitere karzinogene Stimuli angeregt (Tumorpromotion). Häufig besitzen Tumorzellen gegenüber ihren benachbarten Zellen Selektionsvorteile, beispielsweise sind sie resistent gegenüber apoptotischen Prozessen.

In der letzten Phase, der Tumorprogression, durchbricht das Karzinom die begrenzende Basalmembran und zerstört durch infiltratives und destruktives Wachstum benachbartes Gewebe. In dieser Phase kann es auch zur Metastasierung und zur Entstehung von Sekundärtumoren (Metastasen) kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Analysen zur pathologisch-bedingten, differenziellen Genexpression von NMSC durchgeführt. Im Folgenden werden diese Karzinome näher charakterisiert.

1.1.1. Hauttumore des nicht-melanozytären Typs (NMSC)

Das Basalzellkarzinom (BCC) und das Plattenepithelkarzinom (SCC) sind die häufigsten Formen der NMSC. Beide Tumore entstehen aus transformierten Keratinozyten und sind in der Regel Tumoren des Alters, da sie die größte Inzidenz nach dem 70. Lebensjahr aufweisen und selten vor dem 40. Lebensjahr auftreten. Ebenso korreliert die Entstehung der BCC und SCC mit dem Hauttyp, wobei hellhäutige Menschen, die häufig zu Sonnenbränden neigen, prädisponiert sind. NMSC kommen bei Männern etwa doppelt so häufig vor als bei Frauen. Aus therapeutischer Sicht sind früh diagnostizierte NMSC unproblematisch, da sie exzidiert werden können und sehr spät zur Metastasierung neigen.

1.1.1.1. Basalzellkarzinome

Unter den NMSC tritt das BCC am häufigsten auf. Die Inzidenz ist steigend und hat sich in den letzten 20 Jahren in den USA nahezu verdoppelt (Karagas *et al.*, 1999). In Townsville, Australien, wurden 1998 bei 2.058 Männern und 1.195 Frauen pro 100.000 Einwohnern BCC diagnostiziert (Buettner & Raasch, 1998). BCC entstehen stets *de novo* aus transformierten Keratinozyten-Stammzellen. Charakteristisch ist das ausschließliche Auftreten an follikelhaltigen Körperregionen. Aufgrund der histologischen Ähnlichkeit der neoplastischen Keratinozyten des BCC mit den Zellen des *Stratum basale* nahm man an, dass das BCC aus transformierten Basalzellen entsteht. Neuere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die BCC aus transformierten Keratinozyten der Wurzelscheide oder des Haarschaftes von Vellushaarfollikeln entstehen (Borges & Naresh, 2000; Kruger *et al.*, 1999). Genotypisch bleiben die Zellen des BCC meist diploid. Das BCC ist ein lokal wachsender Tumor, der äußerst selten metastasiert (Miller, 1991), weshalb er auch als semi-maligne eingestuft wird. Dennoch können unbehandelte BCC durch invasives Wachstum zu massivsten Destruktionen der beteiligten Gewebe und im Extremfall zum Tod führen.

1.1.1.2. Plattenepithelkarzinome

SCC der Haut entsteht nicht *de novo*, sondern aus Präkanzerosen wie der aktinischen Keratose, welche stets in chronisch UV-geschädigter Haut entsteht. SCC werden seltener diagnostiziert als BCC, allerdings stieg die Inzidenz in den vergangenen 20 Jahren dramatisch an. In New Hampshire, USA, wurde in dem Zeitraum von 1979/1980 bis 1993/1994 bei Männern eine Zunahme um 234 % und bei Frauen um 350 % festgestellt (Karagas *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu BCC sind SCC genotypisch oft aneuploid und metastasieren häufiger (Marks, 1996). Statistisch gesehen starben 1988 in den USA von 100.000 Kaukasiern 0,67 Männer und 0,3 Frauen an SCC (Weinstock, 1993). Eine Sonderstellung nehmen die SCC der Schleimhäute des Naso-Pharyngealbereichs und des Genitalbereichs ein. Diese entstehen nicht aus

UV-bedingten Präkanzerosen und weisen im allgemeinen ein aggressiveres Wachstum auf.

1.2. Karzinogenese der NMSC

Das hauptsächliche Auftreten von NMSC an Sonnenlicht-exponierten Stellen der Haut und der Nachweis von typischen UV-induzierten DNA-Mutationen in diesen Tumoren zeigen, dass die Karzinogenese von NMSC mit der UV-Exposition der Haut korreliert (Grossmann & Leffell, 1997).

Die hochenergetische UVB-Strahlung des Wellenlängenbereichs 280 bis 315 nm dringt durch die epidermalen Schichten bis in das *Stratum basale* ein. Das aromatische Ringsystem der Basen der Nukleinsäuren wirkt hierbei als Chromophor für die UVB-Strahlung. Trifft ein Photon auf ein Elektron des konjugierten π -Elektronensystems, wird dieses angeregt. Neben der Abgabe der absorbierten Energie in Form von Phosphoreszenz, Fluoreszenz und Wärme können die Basen photochemisch modifizierte Produkte, typische UV-bedingte Signaturmutationen, ausbilden. Die häufigste Signaturmutation ist das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer. Seltener wird eine weitere Signaturmutation, das Pyrimidin-[6-4]-Pyrimidon-Photoprodukt, nachgewiesen (Brash *et al.*, 1991; Dumaz *et al.*, 1993). Jüngsten Untersuchungen zur Folge wird auch die UVA-Strahlung (315–400 nm) als mögliches Mutagen diskutiert. In der Epidermis kann die Energie der UVA-Strahlung über „Sensitizer“ zur Synthese von reaktiven Sauerstoffradikalen beitragen. „Sensitizer“ sind in diesem Zusammenhang Moleküle, die aufgrund ihrer chemischen Struktur von der UVA-Strahlung angeregt werden und im Folgenden die absorbierte Energie auf weitere Moleküle abgeben können. Dieser Energietransfer kann zur Generierung von Radikalen führen, welche wiederum zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA beitragen können (Petersen *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen von Cooke *et al.* zeigen, dass neben Strangbrüchen auch typische UVA-initiierte Mutationen durch Oxidation von Desoxyguanosin hervorgerufen werden können (Cooke *et al.*, 2000).

UV-induzierte Mutationen in der Haut sind durchaus alltägliche Effekte. Zum Schutz vor Transformation besitzen Hautzellen hoch spezialisierte Systeme, durch die DNA-Schäden detektiert und repariert werden, oder bei nicht reparabler Schädigung die Zelle dem programmierten Zelltod (Apoptose) zuführen. Nach exzessiver Sonnenbestrahlung zeigt sich dieser finale Vorgang phänotypisch an der sich „pellenden“ Haut, die aus apoptotischen Keratinozyten besteht. Neben der UV-Strahlung kann ionisierende Strahlung, Arsen und polyaromatische Kohlenwasserstoffe zur Initiation von BCC führen (Boonchai *et al.*, 2000).

Auf molekularer Ebene ist das Tumorsuppressorgen p53, der „Wächter des Genoms“, bei der Kontrolle und dem Schutz vor Transformation das Schlüsselprotein (Rich *et al.*, 2000; Levine *et al.*, 1991). Der 53 kDa schwere Transkriptionsfaktor akkumuliert nach Schädigung der DNA in der Zelle, was

auf eine regulierte Stabilisierung des Proteins zurückzuführen ist (El Deiry, 1998). Als initialen Schritt induziert p53 die Expression von p21. Dieses wiederum inhibiert eine Cyclin-abhängige Kinase, wodurch der Zellzyklus in der G₁-Phase unterbrochen wird. Der derart initiierte Stillstand des Zellzyklus ermöglicht es der Zelle, DNA-Schäden präreplikativ zu beheben. Durch die Induktion der Expression des "growth arrest DNA damage inducible gene 45" (GADD45) durch p53 wird die DNA-Reparatur aktiviert. Sind die Schäden in der DNA allerdings zu gravierend, induziert p53 die Expression des bax-1-Gens, wodurch die Zelle der Apoptose zugeführt wird (Levine, 1997).

Sehr häufig werden Mutationen im p53-Gen in Tumoren des Menschen detektiert. Brash *et al.* entdeckten in 50% der untersuchten BCC und in 90% der SCC Mutationen im p53 Gen, die zum Grossteil auf UV-Strahlung zurückzuführen waren (Brash *et al.*, 1996). Meist sind diese p53-Mutationen „missense“ Mutationen, die auf der einen Seite zum Verlust der Funktion als Tumorsuppressor, auf der anderen Seite zur Zunahme karzinogener Funktion führen können. Letzteres wird durch ein verändertes Repertoire der p53-regulierten Genexpression begründet (Dittmer *et al.*, 1993; Lane & Benchimol, 1990). Während Mutationen in Tumorsuppressorgenen zu dem Verlust der Funktion führen, können Mutationen in Proto-Onkogenen zu einer gesteigerten Aktivität dieser führen.

In Hauttumoren werden sehr häufig Mutationen in der *ras*-Genfamilie identifiziert, was sie im Kontext dieser Arbeit interessant macht. Zu dieser Familie gehören drei Proto-Onkogene (*Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*). Die *ras*-Gene kodieren für GTP-bindende GTPasen, welche an der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren beteiligt sind (Russell & Hoeffler, 1996). Das durch Punktmutation veränderte Genprodukt besitzt nicht mehr die GTP-hydrolysierende Aktivität und überträgt so kontinuierlich das Signal auf die Adenylat-Cyclase. Dadurch kommt es zur Dysregulation des Zellwachstums (Russell & Hoeffler, 1996). Neben Punktmutationen können auch Genduplikationen und Gen- oder Chromosomentranslokationen zu der Überexpression von Proto-Onkogenen führen.

Neben den mutagenen Effekten spielt die immunsuppressive Wirkung der UV-Strahlung in der Karzinogenese von NMSC eine weitere, wichtige Rolle. Fisher und Kripke zeigten schon 1977, dass eine UV-vermittelte Immunsuppression in der Haut zu einer Toleranz gegenüber NMSC führt (Fisher & Kripke, 1977). In diesen Versuchen wurden UV-induzierte murine Hauttumore auf kongene Mäuse transplantiert, die vorher mit UV bestrahlt wurden. Während die Transplantate von der unbestrahlten Kontrollgruppe abgestoßen wurden, zeigten die bestrahlten Mäuse Toleranz gegenüber den transplantierten Tumoren. Diese Versuche bewiesen, dass UV-Bestrahlung neben der Initiation auch zur Immuntoleranz gegenüber NMSC führt (Longstreth *et al.* 1998).

Des Weiteren kommt es nach UV-Bestrahlung zu lokalen inflammatorischen Reaktionen, wie sie akut bei solaren Erythemen auftreten, und zur Freisetzung

von Eikosanoiden. Studien mit Eikosanoid-Inhibitoren deuten darauf hin, dass Eikanoide wirksame Tumorpromotoren sind (Kraemer, 1997).

Die Entwicklung von NMSC kann auch durch erbliche Prädisposition begünstigt sein. Bei hereditären Erkrankungen wie dem *Xeroderma pigmentosum* kann es durch Defekte in DNA-Reparaturgenen (XP-Gene) zu einem Verlust der DNA-Exzisionsreparatur kommen. Die fehlerhafte Elimination von UV-initiierten Mutationen führt bei diesen Patienten schon im frühen Kindesalter zur Ausprägung von NMSC.

In allen Stadien der Mehrschrittkarzinogenese kommt es, verglichen mit nicht-pathogenen Arealen, zu veränderter Genexpression. Die molekularen Vorgänge der UV-Karzinogenese sind nach wie vor unvollständig aufgeklärt und erst wenige Gene konnten in diesem Kontext identifiziert werden. Um eine zielgerichtete Tumorprävention, eine detailliertere Diagnose und vor allem alternative, kausale Therapieformen zu entwickeln, ist es notwendig, die molekularen Grundlagen der Tumorentstehung aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichende Analysen der Expressionsmuster von gesunden und transformierten Keratinozyten durchgeführt.

1.3. Serinprotease-Inhibitoren (Serpine)

Die Aktivität von proteolytischen Enzymen (Proteasen) muss nach Beendigung der Enzymreaktionen durch hemmende Regulationsmechanismen wieder gebremst werden, um zu verhindern, dass sie den Organismus schädigen. Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) sind Proteine, die an der Regulation der Enzymaktivität von Proteasen beteiligt sind. Die Familie der Serpine besteht aus ca. 200 Mitgliedern, welche mit Ausnahme von Bakterien und Pilzen in allen Organismen vorkommen (Silverman *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass Serpine durch Genduplikation aus einem über 200 Millionen Jahre alten, ursprünglichen Gen hervorgegangen sind (Salzet *et al.*, 1999; Bird, 1998).

Bei der Regulation der Serinproteasen, der größten Gruppe der Proteasen, spielen Serpine die zentrale Rolle. Sie regulieren Prozesse der Blutkoagulation, der Fibrinolyse, der Inflammation, der Zellmigration, des Aufbaus der extrazellulären Matrix und der Aktivierung von Interleukinvorstufen. Eine Vielzahl an Fakten weist zudem darauf hin, daß eine Reihe von Serpinen auch an der Regulation der Apoptose beteiligt sind (Bird, 1998).

Bisher wurde die tumorassoziierte differenzielle Genexpression von Ov-Serpinen für den „Plasminogen activator inhibitor (PAI)-2“ (Zhou *et al.*, 2001) und die SCC-Antigene (SCCA)-1 und -2 (Kato *et al.*, 1979) beschrieben. Das neueste tumorassoziierte Ov-Serpin ist Headpin (Spring *et al.*, 1999).

1.3.1. Struktur der Serpine und Mechanismus der Inhibition

Serpine sind einkettige Proteine mit 370 bis 390 Aminosäuren und Molekulargewichten von 40 bis 60 kDa. Analysen der Kristallstruktur von Serpinen zeigen eine konservierte Tertiär-Konformation mit 3 β -Faltblatt-Strukturen und 9 α -Helices (Loebermann *et al.*, 1984). 30 bis 40 Aminosäuren entfernt vom C-Terminus befindet sich eine Schleife, der sogenannte „reactive site loop“ (RSL). Der bewegliche RSL besteht meist aus 17 Aminosäuren und enthält die Erkennungsregion für die Zielprotease, die sogenannte P1-P1'-Schnittstelle (P-Nomenklatur nach Schechter & Berger, 1967). Die P1-P1'-Schnittstelle ist ein Bereich, in dem die Aminosäurefolge je nach Serpin variiert und die Lage der Schnittstelle ist nicht streng konserviert (Riewald & Schleef 1996).

Inhibitorische Serpine weisen eine thermodynamisch ungünstige Konformation, die sogenannte „stressed form“ auf. Hierbei befindet sich der RSL teilweise oder komplett außerhalb der β -Faltblattstruktur in einer exponierten Lage. Der „Mäusefallen“-ähnliche Mechanismus der Proteaseinhibition wird initiiert, sobald sich die Zielprotease in einem nicht-kovalenten, Michaelis-ähnlichen Komplex an den RSL des Serpin anlagert. Nach Proteolyse der P1-P1'-Schnittstelle kommt es zu einer schnellen Konformationsänderung des Serpins und der RSL inseriert mitsamt der Protease in das β -Faltblatt A (Silverman *et al.*, 2001). Durch diese Konformationsänderung erreicht das Serpin eine thermodynamisch

günstigere, stabilere Form, die „relaxed form“, in welcher der Serpin-Protease-Komplex extrem stabil ist (Stratikos & Gettins, 1997). Dabei wird Serpin irreversibel zerstört, weshalb man bei dieser Reaktion auch von einem suizidalen Mechanismus spricht.

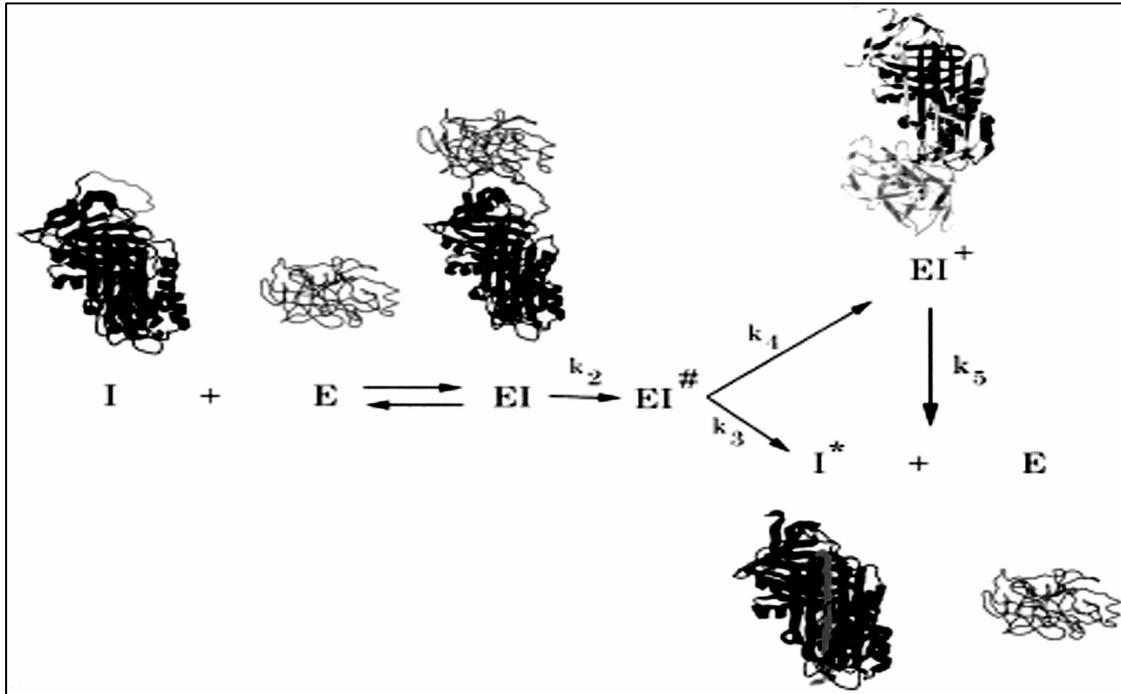


Abbildung II : Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen einem Serpin (I) und einer Protease (E). Der nicht-kovalente Michaelis-Komplex (EI) geht nach Proteolyse der P1-P1'-Peptidbindung in eine intermediäre Acyl-Bindung (EI[#]) über. Diese Bindung führt entweder zur Inhibition der Protease (EI⁺) oder zu einem inaktivierten Inhibitor (I^{*}) und der freien Protease (Entnommen aus: Gettins,., 2000).

Neben der P1-P1'-Schnittstelle ist die Inhibition ebenfalls von der proximalen Gelenkregion oder „hinge region“ (P9-P15) abhängig. Mutationen innerhalb dieser Region, welche den Einbau sterisch ungünstiger Aminosäuren zur Folge haben, führen zum Verlust der inhibitorischen Funktion (Potempa *et al*, 1994).

Serpine können nicht nur zur Inhibition von Serinproteasen beitragen. Die klassenübergreifende Inhibition von Cysteinproteasen wurde bisher für SCCA 1 (Nawata *et al.*, 1997) und das virale Serpin „Cytokine response modifier A“ (CrmA) beschrieben (Komiyama *et al.*, 1994).

Nicht alle Serpine sind inhibitorisch aktiv. Löst sich die Protease bevor sie komplexiert wurde, zum Beispiel durch eingeschränkte Beweglichkeit der Gelenkregion, so verläuft die Interaktion über den nicht-inhibitorischen Weg. Das Serpin wird in diesem Fall von der Protease als Substrat behandelt, was zu einem inaktivierten Inhibitor und der freien Protease führt (Gettins, 2000).

Des Weiteren kommen in der Natur nicht-inhibitorische Serpine vor. Beispiele sind Ovalbumin, das die Funktion eines extrazellulären Speicherproteins im Hühnerei erfüllt, Angiotensinogen, das an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist oder Maspin, welches tumorsuppressive Eigenschaften besitzt.

1.4. Das Ovalbumin-Serpin (Ov-Serpin) Hurpin

Hurpin (HaCaT-Zelllinie UVB-reprimierbares Serpin), systematische HUGO-Nomenklatur SERPINB13, wurde von unserer Arbeitsgruppe mittels DDRT-PCR als UV-regulierbares Gen detektiert und erstmalig kloniert. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde es der Genfamilie der Serinprotease-Inhibitoren des Ovalbumintyps (Ov Serpine) zugeordnet und Hurpin genannt (Abts *et al.*, 1997; Abts *et al.*, 1999). Hurpin ist identisch mit dem von Spring *et al.* publiziertem, SCC-assoziiertem Headpin (Spring *et al.*, 1999).

Zu den humanen Ov-Serpinen gehören bisher neben Hurpin der Plasminogen Aktivator Inhibitor 2 (PAI 2), Maspin, SCAA 1 und SCAA 2, PI6, PI8, PI9 und PI10. Die größten Sequenzhomologien bestehen zwischen Hurpin und SCCA 1 (58,4%) und SCCA 2 (58,1%).

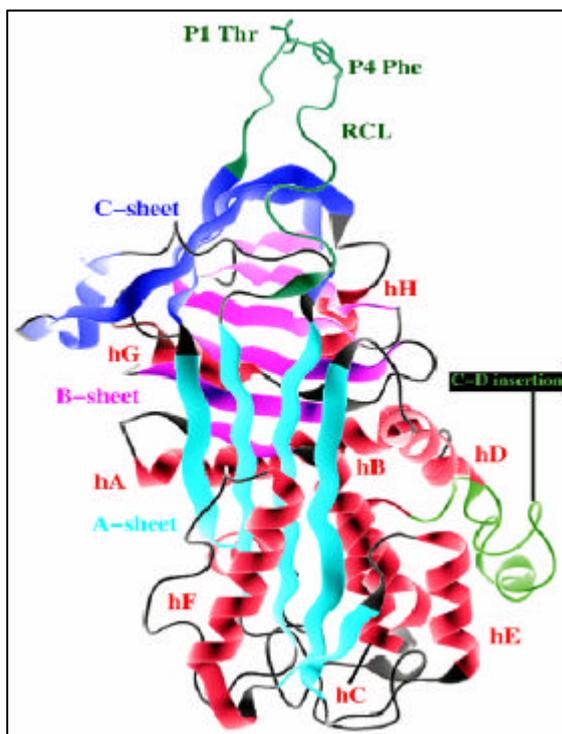


Abbildung III: Modellhafte Darstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Hurpin. Im oberen Bereich ist der RSL (hier RCL) zu erkennen. In dieser Abbildung ist das aktive Hurpin in der „stressed form“ mit dem exponierten RSL dargestellt. (Whisstock und Abts; 2000; unveröffentlichte Daten).

Ov-Serpine unterscheiden sich von der Superfamilie der Serpine (relativ zu α 1-Antithrombin) unter anderem durch: a) fehlende C- und N-terminale Erweiterungen, b) eine variable Aminosäure an Position 388 anstatt des üblichen Valin-Restes, c) das fehlende N-terminale Signalpeptid, welches für die direkte Sekretion von Serpinen benötigt wird (Remold-O'Donnell, 1993). Des Weiteren besitzen Ov-Serpine einen interhelikalen Loop zwischen Helix C und Helix D (Remold-O'Donnell 1993).

Alle bis heute bekannten Gene der Ov-Serpine sind entweder auf den Chromosomenabschnitten 18q21 oder 6p25 lokalisiert. Die Gene, die einen hohen Grad an Sequenzhomologie zu Hurpin besitzen, wie SCAA 1 und SCAA 2, PAI 2, sind auf dem Chromosomen-„Cluster“ 18q21.3 lokalisiert (Sun *et al.*, 1998).

1.5. Zielsetzung

Die Pathophysiologie von Hauttumoren des nicht-melanozytären Typs ist nicht vollständig geklärt. Die Kenntnis möglichst aller Gene mit Beteiligung an der Initiation, Promotion, Manifestation und Invasion von SCC und BCC würde dazu beitragen, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken. Hierdurch könnten sich neue molekulare Tumormarker ergeben und vor allem eine verbesserte Tumorprävention ermöglicht werden. Darüber hinaus könnten diese Kenntnisse langfristig auch zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden führen.

Anhand der Analyse von Expressionsprofilen normaler und pathologisch veränderter Haut mittels Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR) und der differenziellen Hybridisierung humaner cDNA-Arrays sollte die Beteiligung von neuen und bekannten Genen an der Karzinogenese von Hauttumoren untersucht werden.

Das neue UVB-regulierbare Ov-Serpin Hurpin wurde als SCC-assoziiert beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche Dysregulation dieses Gens auch in BCC auf transkriptioneller Ebene untersucht werden.

Des Weiteren sollte die rekombinante Expression von Hurpin in pro- und eukaryotischen Systemen etabliert werden. Die Expression von möglichst reinem Hurpin sollte im Folgenden zur Herstellung von anti-Hurpin-Antikörpern dienen.

Das aus Vorarbeiten bekannte Expressionsprofil von Hurpin in physiologischen und pathologischen Situationen deutete auf die mögliche Beteiligung von Hurpin an der epidermalen Homöostase hin. Mit Hilfe von Protease-Inhibitions-Assays sollte die mögliche Interaktion von Hurpin mit Serinproteasen und Cysteinproteasen *in vitro* untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antibiotika

Ampicillin, Sigma, Deisenhofen

Penicillin / Streptomycin 10.000 U / 10.000 µg/ml, Biochrom, Berlin

Tetrazyklin, Sigma, Deisenhofen

2.1.2. Antikörper

Maus-anti-humane-hnRNP D0-monoklonale Antikörper (hnRNP D0-mAb)
freundliche Gabe von Gideon Dreyfuss, Howard Hughes Medical Institute,
Philadelphia,

Kaninchen-anti-humaneHurpin-polyklonale Antikörper, Eurogentec, Seraing,
Belgien

2.1.3. Chemikalien

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien in p. A.- Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (München), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Die verwendeten Radiochemikalien wurden über die Firma ICN (Eschwege) bezogen.

2.1.4. Enzyme

Restriktionsendonukleasen, DNase I, DNA-Ligase, alkalische Phosphatase,
Dispase, T4-Polymerase, T4-Ligase und RNasin, Roche, Mannheim

Superscript II Reverse Transkriptase, Gibco BRL, Eggenstein

Taq-Polymerase für DDRT-PCR, Amersham-Pharmacia, Freiburg

Taq-Polymerase für RT-PCR, Qiagen, Hilden

Trypsin, ICN, Eschwege

2.1.5. Kits

Megaprime, DNA labelling system, Amersham, Braunschweig

Plasmidisolierungs-Kit, Qiagen, Hilden

Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit, SMART PCR cDNA Library
Construction Kit, Atlas Human cDNA Expression Array Clontech, Palo Alto,
USA

T7 Sequencing Kit USB, Cleveland, USA

2.1.6. Membranen

Nylonmembran Hybond-N+, Amersham, Braunschweig
Nitrozellulosemembranen, Bio-Rad, München

2.1.7. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in ddH₂O gelöst und als 10 µM Verdünnung bei -20°C gelagert.

Gen	5´	3´	Fragment-grösse
Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	forward: CCCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAG reverse: TCTTCGGAGTTTGGGTTTGCTTGT		354 bp
60 S ribosomales Protein L6 (RP L6)	forward: CGGCAAAAAACCCTTCAGTCAGCA reverse: CTTCTGGTGTCTGGGCTTCCGCA		388 bp
Teratokarzinom-stammender Wachstumsfaktor (Cripto)	forward GGTTCAGCCATTCTCCTGCCTCA reverse: GCCCTTCCATTTAGCCTTTTTACT		323 bp
cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor 4 (ATF4)	forward: AAGCAGCCCCCAGACGGTGAAC reverse: CCCTTGCCTTGC GGACCTCTTCTA		401 bp
C-myc Proto-Onkogene (c-myc)	forward: CTCCTGGCAAAAGGTCAGAGTCTGG reverse: GGGGCTGGTGCATTTTCGGTTGTTGC		222 bp
40 S ribosomales Protein S19 (RP S19)	forward: CCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGC reverse: TTTGTCCCTGAGGTGTCAGTTTGCGG		295 bp
Janus Tyrosin-Protein Kinase (Jak3)	forward: GGCCTTATGAGGGTCTCTACTTCAG reverse: CACTGTGAGCCGAGATCGCTACCAC		336 bp
Glutaredoxin	forward: GGGAGACCGCAGCCCATCGGCAT reverse: ACTAGATCACTGCATCCGCCTATACAAT		282 bp
Mikrosomale Glutathion-S-Transferase (GST 12)	forward: AATGGTTGACCTCACCCAGGTAATGGA reverse: GATCCGTGCTCCGACAAATAGTCTGAA		348 bp
Beta 2 adrenerger Rezeptor (β2AR)	forward: AGGCATCATCATGGGCACTTTCACCC reverse: TGTTATCGCTAGGCACAGTACCTTGATC		371 bp
Hurpin RT-PCR-Primer	HP1: TAAAGGGCAATGGGACAGGGAGT HP2 :GCGGATGTGACAGTAAAGCCTATG		524 bp
HP-PE-Primer	2-1: TTAAGGAGAAGAAAATCTGCCGAAGAAGA GGATGCT 2-2: ATGCATCACCATCACCATCACGATTCACT TGGCGCCGTCAGC		1200 bp
HP-GSP1	ACGGTGGTGGCTGGGCAACGAACT		—
HP 501	AGCTGCAGCCTCGCGCCTTCTCAGTTAC		—
HP 502	ACCTGGGGCGGACGCGACAGTAAAGCC		—
HP 503	ATGTACTGCTTCTGTGTTCTCCTTCGTCTCTTT TTCAGAGTGAAACACC		—

2.1.8. Medien und Medienzusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS), L-Glutamin, Biochrom, Berlin

Rinderhypophysenextrakt, Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Insulin, Hydrocortison, Gentamicinsulfat, Keratinocyte Basal Medium (KBM), Clonetics, USA

LB-Medium, Gibco-BRL, Eggenstein

2.1.9. Molekulargewichtstandards

1 kb DNA Leiter, 100 bp DNA Leiter, RNA Leiter, Gibco BRL, Eggenstein
Vorgefärbte Protein Leiter, Bio-Rad, München

2.1.10. Vektoren

pCRII, Invitrogen, Leek, Niederlande

pHIL D2, Invitrogen, Leek, Niederlande

P1 Phagen-DNA Klone, GenomeSystems, St. Louis, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur mit der HaCaT-Zelllinie

Bei der HaCaT-Zelllinie handelt es sich um immortalisierte Keratinozyten, welche sich u.a. durch genomische Translokationen von den herkömmlichen humanen Hautzellen unterscheiden (Boukamp *et al.*, 1988). HaCaT-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit Natrium-Pyruvat, 100 mg/l Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) in einem Inkubator bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

2.2.2. Zellkultur mit primären Keratinozyten (NHK)

Primäre Keratinozyten wurden aus Hautbiopsien von Mammareduktionen oder Circumcisionen präpariert. Die in 1 x PBS gelagerte Haut wurde von subkutanem Fettgewebe befreit und in Rechtecke (ca. 5 mm x 5 mm) geteilt. Die Stücke wurden bei 4°C für 12-16 h in Dispase inkubiert. Durch diese Behandlung trennt sich die Epidermis von der Dermis. Die abgelöste Epidermis wurde anschließend für 5-15 min. in einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,2 % Trypsin, 0,2 % EDTA, in 1 x PBS) bei 37°C inkubiert. Die dadurch entstehende Einzelzellsuspension wurde in Gegenwart von Keratinozyten Basalmedium, supplementiert mit 50 mg/l Gentamicinsulfat, 50 µg/l Amphotericin, 5 mg/l Rinderinsulin und 0,06 µg/l Epidermal Growth Factor ausplattiert. Alle 5-6 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

2.2.3. Hautbiopsien

Die verwendeten Biopsien (BCC, SCC, gesunde Haut) wurden in Zusammenarbeit mit der histologischen Abteilung der Hautklinik der Heinrich-Heine Universität gesammelt. Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki nach Einholen des schriftlichen Votums der Ethikkommission durchgeführt. Die Patienten wurden über die wissenschaftliche Natur der Untersuchungen eingehend aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Die Biopsien wurden von Blutresten und Fettgewebe befreit, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4. Nukleinsäuren-Analysen

2.2.4.1. Isolierung von RNA aus Zelllinien

Die mit PBS gewaschenen adhären Zellen wurden je Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) mit 1,6 ml TRIzol-Reagenz (Gibco BRL) lysiert, die Suspension mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und in 2 ml Polypropylengefäße überführt. Die lysierten Proben blieben für 5 min. bei Raumtemperatur stehen, um die komplette Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu gewährleisten. Die Suspension wurde durch Zugabe von 320 μl Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die RNA-haltige, wäßrige Oberphase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut mit TRIzol-Reagenz extrahiert, um DNA-Kontaminationen zu minimieren. Nach weiterer Zentrifugation wurde die wässrige Oberphase mit 800 μl Isopropanol versetzt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation wurde die pelletierte RNA mit 75 %-igem Ethanol (v/v in DEPC- H_2O) gewaschen. Nach Lufttrocknen wurde die RNA in entsprechenden Volumen DEPC- H_2O rückgelöst. Nach Konzentrationsbestimmungen wurden zur qualitativen Kontrolle 500 ng RNA auf einem 1 %-igem Agarosegel gelelektrophoretisch untersucht.

2.2.4.2. Isolierung von RNA aus Geweben

Alle verwendeten Gefäße, die zu RNase-Kontaminationen führen könnten, wurden vorher mit dem RNase-ZAP Reagenz behandelt. Die bei -80°C gelagerten Gewebebiopsien wurden mittels eines Mikrodismembrators (Braun, Melsungen) in Gegenwart von flüssigem Stickstoff und 200 μl TRIzol pulverisiert. Die Teflon beschichtete Kammer des Dismembrators wurde auf Eis stehend geöffnet und das Gewebepulver mit 1,5 ml TRIzol überschichtet. Durch diese Vorgehensweise wurden mögliche RNasen komplett inhibiert. Die anschließende RNA-Präparation verlief wie oben beschrieben.

2.2.4.3. Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten BCC

Zu DDRT-PCR-Analysen wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten RNA-Proben unter dem Gesichtspunkt des Alters, des Geschlechts und der Lokalisation des Tumors in drei Pools vereinigt. Ebenso wurde RNA aus gesunder Haut von 6 verschiedenen Patienten in zwei Pools vereinigt.

	Nomenklatur	Alter	Geschlecht	Exzisionsstelle
Pool A	BA-21	84a	W	Stirn
	BA-34	87a	W	Kapillitium frontal
	BA-43	74a	W	Gesicht/Wange
Pool B	BA-26	69a	W	Kapillitium parietal
	BA-28	52a	W	Kapillitium occipital
	BA-46	65a	W	Kapillitium occipital
	BA-48	76a	W	Gesäß
Pool C	BA-44	55a	M	Glabella
	BA-47	77a	M	Hinterohr
	BA-51	65a	M	Ohrmuschel

Bei diesen RNA-Proben handelt es sich um eine freundliche Gabe von Frau Dr. Julia Reifenberger (Hautklinik). Die RNA war aus Tumorgewebe durch Ultrazentrifugation des Zelllysats in einem CsCl-Gradienten isoliert worden. BCC Pool B wurde nicht für DDRT-PCR Analysen verwendet, da mindestens eine der RNA-Proben degradiert war.

2.2.4.4. Isolierung von DNA aus Hefe

Je 10 Klone der Hurpin-Varianten (HP 501, HP 502, HP 503) wurden in 5 ml YPD bei 30°C und 225 rpm für 5 Tage inkubiert. Nach Sedimentierung der Hefen durch Zentrifugation (1000 x g, 20 min.) wurde die DNA mittels des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.4.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus P1-Phagen-DNA-Klonen

Der genomische Klon von Hurpin wurde zurückgreifend auf eine kommerziell erhältliche, genomische DNA-Bibliothek (GenomeSystems, St. Louis, USA) isoliert. $1,44 \times 10^5$ DNA-Fragmente mit Größen um 75 bis 100 kb waren auf Nylonmembranen immobilisiert und wurden gegen die radioaktiv markierte volle-Länge-cDNA von Hurpin hybridisiert. Nach Identifizierung von Klonen mit möglichen genomischen Hurpinsequenzen wurden die transformierten E. coli-Klone gekauft. Die Klone wurden über Nacht in 3 ml 2x YT (25 µg/ml Kanamycin) kultiviert. Diese Vorkultur wurde zu 500 ml 2x YT (25 µg/ml Kanamycin) gegeben und bis zu einer $OD_{550} = 0,15$ weiter kultiviert. Die

Replikation der Plasmide wurde durch Zugabe von 1 % (v/v) einer 0,1 M IPTG-Lösung induziert. Nach weiteren 3 h wurden die Bakterien pelletiert. Die Plasmidisolierung wurde mit dem Qiagen Plasmid Präparations Kit unter Verwendung von Tip 100 Säulen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden auf die Integration von Hurlin nach Restriktionsdauer mit Bgl II oder Hind III mittels Southern-Blot-Analysen oder PCR untersucht und ein Klon anschließend sukzessiv sequenziert.

2.2.4.6. Reverse Transkription von RNA

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde Superscript II, eine rekombinante M-MLV-Reverse-Transkriptase ohne RNase-H-Aktivität (Gibco, BRL), verwendet. Die reverse Transkription erfolgte nach Herstellerangaben. Pro Ansatz wurde je 1 µg Gesamt-RNA in Gegenwart von 500 ng Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primern hitzedenaturiert und auf Eis abgekühlt. Den RNA / oligo dT-Hybriden wurde folgende Lösung zugegeben:

4,0 µl 5 x Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

2,0 µl 0,1 M DDT

1,0 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

1,0 µl RNasin (40 U)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl (200 U) Superscript-II-Reverse-Transkriptase gestartet und der Reaktionsansatz für 60 min. bei 42 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte durch eine 15minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 70°C. Die neu synthetisierte cDNA wurde auf 1/20 in ddH₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.4.7. Primerextensions-Analysen

Mit Hilfe von Primerextensions-Experimenten sollte der exakte Transkriptionsstartpunkt von Hurlin bestimmt werden. Bei dieser Methode bindet ein Oligonukleotid möglichst nahe am bekannten 5'-Ende der mRNA. Durch reverse Transkription wird die cDNA verlängert, bis das tatsächliche 5'-Ende des Transkripts erreicht wird. Unter Verwendung von radioaktiv markierten Desoxynukleotiden kann die Länge des mittels Primerextension generierten Fragments in einem Sequenzgel autoradiographisch ermittelt werden.

25 µg Gesamt-RNA aus HaCaT-Zellen und Uterusgewebe (Clontech, Palo Alto, USA) wurden zusammen mit 2 µl GSP1-Primer (10 µM) bei 65°C für 10 min. denaturiert. Nach folgender 10minütiger Inkubation auf Eis wurden 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl 5 x RT-Puffer (Roche, Mannheim), 1 µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP; 5 mM), 0,8 µl dCTP (0,5 mM), 3 µl [α ³²P]-dCTP (10 µCi/µl) und 1 µl RNasin [40 U/µl] hinzugegeben. Der Ansatz wurde 3 min. bei 42°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Superscript II RT-Polymerase gestartet wurde. Nach 1 h wurde das Enzym denaturiert und die Proben

eingefroren. Am folgenden Tag wurden 5 µl dieser Reaktion mit Sequenzladepuffer versetzt und nach 5minütiger Denaturierung auf einem Sequenzgel grössensepariert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden (6 M Harnstoff) 5 %-igen PAA-Gel wurden die radioaktiv markierten Fragmente durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

2.2.4.8. Sequenzanalysen

Um präzise Aussagen über die Grösse des Primerextensions-Produktes treffen zu können, wurde ein Plasmid bekannter Basenfolge mit dem T7 Sequencing Kit der Firma USB (Cleveland, USA) sequenziert. Die Analyse wurde unter Verwendung des Standard-Annealing-Protokolls des Herstellers durchgeführt. Diese Sequenzanalyse wurde parallel zu den Produkten der Primerextensions-Experimente auf dem Sequenzgel aufgetragen.

2.2.4.9. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein zyklischer Prozess, bei dem sich die Zahl der synthetisierten DNA-Moleküle mit jedem Zyklus verdoppelt. Die Amplifikation von DNA- oder cDNA-Sequenzen erfolgt durch spezifische, Strang- und Gegenstrang-komplementäre Oligonukleotide (Primer), welche die Zielsequenz paarweise flankieren. Bei der Auswahl der Primer wurden folgende Punkte beachtet:

- Kontrolle der Duplex-Bildung
- Homologie der 3´- und 5´- Enden zueinander
- Selbstkomplementarität
- Schmelzpunkte der Primer

Um die Reaktionsbedingungen in der PCR zu optimieren, wurden mit jedem Primerpaar Test-Reaktionen durchgeführt, in welchen die MgCl₂-Konzentration und die Temperatur des Primer-Bindungsschrittes (Annealing) getestet wurde. Die PCR wurden als „hot start“-Reaktionen gestartet. Hierbei fügt man die Taq-Polymerase nach dem ersten Denaturierungsschritt hinzu. Dadurch wird das Entstehen unspezifischer Amplifikate minimiert.

Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes:

Probenmix:

X µl	DNA-Matrize (Plasmid-DNA = 1 ng, DNA = 100 ng, cDNA = 50 ng)
4,7 µl	10 x Taq-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)
1 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
0,5 µl	Primer 1 (10 µM)
0,5 µl	Primer 2 (10 µM)
ad 47 µl	ddH ₂ O

Taq-Mix:

0,2 µl	10 x Taq-Puffer
0,4 µl	Taq-Polymerase
1,4 µl	ddH ₂ O

Die Inkubation erfolgte in dem programmierbaren Thermocycler PTC 2000 (MJ Research, Massachusetts).

Standard PCR Programm:

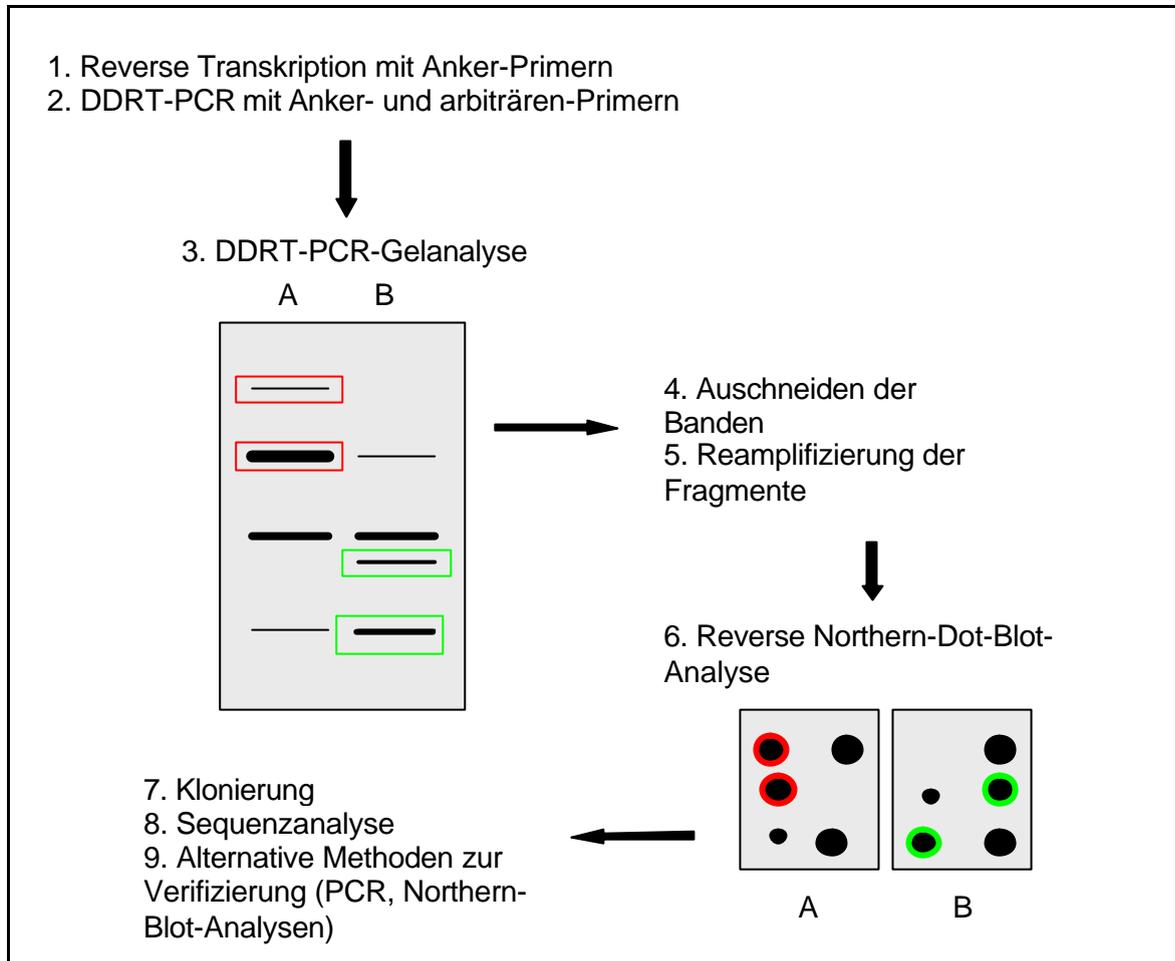
94°C	1 min.	Denaturierungsschritt
55-65°C	1 min.	Primer-spezifisches Annealing
72°C	1min.	Elongation
Wiederholung für 25-35 Zyklen		
72°C	5 min.	Terminale Elongation

2.2.4.10. Semiquantitative RT-PCR

Zur Analyse der differentiellen Expression in den untersuchten, individuellen Proben ist die semiquantitative RT-PCR die beste Methode. Aufgrund der hohen Sensitivität war es möglich, auch mit geringen Mengen an Ausgangsmaterial Transkripte nachzuweisen. Zur Quantifizierung der spezifischen Transkripte diente der Vergleich zur Expression von „house keeping“-Genen, welche in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert werden. Nach RT-PCR und elektrophoretischer Größenseparation wurden die Signalintensitäten densitometrisch bestimmt und miteinander verrechnet.

2.2.5. 'Differential Display' Polymerase Kettenreaktion (DDRT-PCR)

Schema zur Durchführung der DDRT-PCR. Vergleich der RNA Populationen A und B. Rot umrandete Signale stellen A-induzierte Gene, grün umrandete Signale A-reprimierte Gene dar.



2.2.5.1. DNase-Behandlung der RNA

Da genomische DNA in der DDRT-PCR zu unspezifischen Signalen führen kann, wurde die gepoolte RNA mit Rnase-freier DNase I (Roche, Mannheim) behandelt. Je 10 µg RNA wurden mit 0,1 M Natriumacetat; 5 mM MgSO₄ (pH 5,0); 1 mM DTT; 1 U DNase I und 1,6 U RNasin pro µg RNA für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die DNase-behandelte RNA wurde mittels TRIzol-Reagenz aus dem Reaktionsansatz extrahiert. Nach einer Qualitätskontrolle wurde die RNA für die reverse Transkription verwendet.

2.2.5.2. cDNA-Synthese

Die Komplexität der gesamten mRNA wird verringert, in dem die cDNA-Synthese mit drei Anker-Primern durchgeführt wird. Diese Anker-Primer sind modifizierte oligo-dT-Primer, welche am 3'-Ende entweder ein Adenosin (A),

Cytosin (C) oder Guanidin (G) und am 5'-Ende eine zusätzliche *Hind III*-Schnittstelle besitzen.

Bezeichnung der Anker-Primer	5'	3'
TA	AAGCTTTTTTTTTTTTTTA	
TC	AAGCTTTTTTTTTTTTTTC	
TG	AAGCTTTTTTTTTTTTTTG	

1 µg der DNase-behandelten RNA wurde in 33 µl DEPC-behandeltem ddH₂O aufgenommen und je 11 µl in drei Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach Zugabe des jeweiligen Anker-Primers (2 µM) wurden die Proben 10 min. bei 70°C denaturiert und anschließend weitere 10 min. auf Eis gelagert. 8 µl eines „Master-Mixes“ wurden auf die Aliquots verteilt. Dieser enthielt für jeden Ansatz 2 µl 0,1 M DTT; 1 µl RNasin (40 U/µl); 4 µl 5 x Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM KCl und 10 mM MgCl₂) und 1 µl dNTP-Mix (400 µM). Die Ansätze wurden für 2 min. auf 37°C vorgewärmt und mit 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase versehen. Die Proben wurden für 40 min. bei 37°C und dann 20 min. bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 5minütige Inkubation bei 70°C denaturiert.

2.2.5.3. DDRT-PCR

Neben dem ersten für die cDNA-Synthese genutzten 3'-liegenden Anker-Primers werden zur PCR arbiträre 5'-Primer genutzt. Diese 13mere besitzen Sequenzen, die bei der Generierung des Displays zu komplexen Bandenmustern führen.

Bezeichnung der arbiträren Primer	5'	3'
H-AP6	AAGCTTGCACCAT	
H-AP10	AAGCTTCCACGTA	
H-AP13	AAGCTTCGGCATA	
H-AP25	AAGCTTTCCTGGA	
H-AP29	AAGCTTAGCAGCA	

Am 3'-Ende der arbiträren Primer befindet sich die bindungsspezifische Sequenz, am 5'-Ende ist eine *Hind III*-Schnittstelle angefügt. Für jeden DDRT-PCR-Versuchsansatz wurden 2 µl der entsprechenden cDNA und 2 µl der jeweiligen Anker-Primer (2 µM) in ein 0,5 ml Polypropylengefäß pipettiert. Die

übrigen Komponenten wurden als „Master-Mix“ hinzugefügt, um Pipettierfehler zu minimieren.

Der „Master-Mix“ bestand je Ansatz aus:

2 µl	Arbiträrer 5´-Primer (2µM)
1,8 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10x)
1,6 µl	dNTP-Mix (je Nukleotid 25 µM)
8,2 µl	ddH ₂ O
0,4 µl	[α P ³²]-dCTP

Jeweils 14 µl des Master-Mixes wurden auf die cDNA-Populationen verteilt und mit 80 µl Mineralöl überschichtet. Dieses verhindert das Verdampfen des Wassers bei den hohen Reaktionstemperaturen. Nach der ersten Denaturierungs- und Annealingphase wurde hier ein „hot start“ durchgeführt (siehe 2.2.4.9.).

DDRT-PCR-Elongations Programm:

	Denaturieren	„hot-start“	Annealing	Elongation
1. Zyklus	95°C/1 min.	80°C	41°C/1 min.	72°C/1 min.
2. bis 35. Zyklus	94°C/50 sec	-	42°C + 0,1°C/Zykl. 1 min.	72°C/1 min.

Nach Beendigung der PCR wurde ein Aliquot eines jeden Ansatzes auf einem denaturierenden (6 M Harnstoff) 5 %-igen PAA-Gel bei 45 Watt größenfraktioniert. Nach Beendigung wurde das Gel mittels Whattman-Papier von der Glasplatte separiert und in einem Vakuumtrockner (Bio-Rad) bei 80°C für 2 h getrocknet. Die radioaktiv markierten Fragmente wurden durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. Die Lage des Films wurde durch fluoreszierende „Tracker-Tapes“ bestimmt.

2.2.5.4. Auswahl und Isolierung der Banden

Auf dem entwickelten Röntgenfilm wurden Bandensignale ausgewählt, welche auf eine differenzielle Expression schließen lassen. Diese Signale wurden markiert und der Film in seiner ursprünglichen Position wieder auf dem Gel fixiert. Mit einer Nadel wurde der Film durchstoßen und so die Position der Bande auf dem PAA-Gel markiert. Diese wurden mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten, in 100 µl ddH₂O überführt und für 15 min. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 µl 3 M NaOAc (pH 5,2), 2,5 µl Glykogen (20 mg/ml) und 450 µl eiskaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurden die präzipitierten Nukleinsäuren 30 min. bei 4°C und

15000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 10 µl TE^{*}-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA) aufgenommen.

2.2.5.5. Reamplifikation

Um genügend Ausgangsmaterial für den reversen Northern-Dot-Blot und die anschließende Klonierungen zu generieren, müssen die isolierten DDRT-PCR Fragmente mit der ursprünglichen Primerkombination reamplifiziert werden. Hierzu wurden folgende Komponenten pro Ansatz benötigt:

4 µl	Anker-Primer (2µM)
4 µl	Arbiträr-Primer (2µM)
3,8 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10x)
3,2 µl	dNTP-Mix (250 µM)
19 µl	ddH ₂ O
2 µl	Taq-Polymerase-Mix; siehe „hot-start“

Das PCR-Programm unterschied sich von dem der DDRT-PCR in der Durchführung eines 'touch down'-Protokolls. Hierbei nahm die Annealing-Temperatur sukzessiv in den Zyklen 2 bis 4 um 1°C ab. Die so gewählten stringenten Bedingungen in den ersten Zyklen waren dafür verantwortlich, daß nur das erwünschte, spezifische Produkt generiert wurde. In den folgenden Zyklen wurden diese Fragmente optimal reamplifiziert. Durch interne Bindung der Primer können jedoch kleinere Fragmente entstehen.

Reamplifikations-Programm der DDRT-PCR Produkten:

	Denaturieren	hot-start	Annealing	Elongation
1.Zyklus	95°C/1 min.	80°C	50°C/1 min.	72°C/2 min.
2. bis 4. Zyklus	94°C/50 sec	-	49°C –1°C pro Zyklus/ 1 min.	72°C/2 min.
5. bis 35. Zyklus	94°C/50 sec	-	45°C/ 1 min.	72°C/2 min. + 2 sec/Zykl.

Das gesamte Volumen der Ansätze wurde auf ein 1,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Größenfraktionierung wurden die spezifischen Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die cDNA mittels „QIAquick Spin Columns“ (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert. Falls die cDNA-Mengen zu gering waren, wurde ein weiterer Reamplifizierungsschritt durchgeführt.

2.2.5.6. Verifizierung mittels reverser Northern-Dot-Blot-Analyse

16 µl der isolierten, reamplifizierten und gereinigten cDNA-Fragmente wurden mit TE-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) auf 90 µl aufgefüllt und in Gegenwart von 10 µl 2 M NaOH 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Denaturierungsschritt wurde die Lösung durch 100 µl 2 M NH₄OAc neutralisiert. Je 25 µl wurden anschließend auf eine mit 1 M NH₄OAc prä-äquilibrierte Nylonmembran mittels eines Vakuum-Dot-Blotters transferiert. Nach Waschen mit 1 M NH₄OAc wurden die gedoteten Fragmente durch 2stündiges Backen kovalent an die Membranen gebunden. Die Hybridisierung erfolgte gegen 100 ng radioaktiv markierte cDNA-Bibliotheken aus BCC oder gesunder Haut. Anschließend wurden die Hybridisierungssignale autoradiographisch detektiert (siehe 2.2.7.). Das Autoradiogramm wurde digitalisiert, die Hybridisierungssignale densitometrisch ausgewertet und durch Verrechnung interner Standards normalisiert. Klone mit Signalunterschieden von größer oder gleich 2 wurden im Folgenden kloniert.

2.2.5.7. Klonierung

Die Taq-Polymerase addiert an das 5'-Ende der neu synthetisierten, doppelsträngigen Nukleinsäuren ein einzelnes Adenin. Viele Vektor-Systeme nutzen dies zur Ligation, indem sie T-Überhänge an den 3'-Enden des linearisierten Vektors besitzen. Des Weiteren befinden sich zu beiden Seiten der Insertionsstelle Restriktionsschnittstellen, Promotoren (T7- und SP6-Promotor) und Bindungsstellen für 5'- und 3'- Sequenzierungs-Primer (M13-Primer). Zusätzlich sitzt die Insertionsstelle im lacZ-Gen, so dass die Inaktivierung der β-Galaktosidase durch die Insertion des Fragmentes für eine Blau-Weiß-Selektion genutzt werden kann. Hier wurde der Topo TA Cloning-Kit von Invitrogen mit dem Vektor pCR II nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Insertion der Fragmente in die Vektoren wurden die Plasmide mit Standardmethoden in hochkompetente *Escherichia coli* Bakterien des Stammes XL-1-blue transformiert. Nach Ausplattierung der transformierten Bakterien auf Selektionsplatten, wurden von jedem Klon 5 weiße Kolonien auf einer „Master-Platte“ isoliert. Die Spitzen, mit welchen die Kolonien transferiert worden waren, wurden anschließend in 30 µl ddH₂O gespült. Diese Suspensionen wurden 10 min. bei 95°C gekocht, wodurch die Plasmide freigesetzt wurden. Je 5 µl der Überstände wurden als Matrize für PCR-Reaktionen mit M13-Primern verwendet. Nach Amplifizierung mittels PCR und gelelektrophoretischer Auftrennung konnten die Größen der Inserts bestimmt werden. Durch Vergleich mit den Größen der isolierten DDRT-PCR-Fragmente konnten somit falsch-positive Klone ausgeschlossen werden.

5 µl	Bakterienlysat
0,2 µl	5'-M13-Primer (10 µM)
0,2 µl	3'-M13-Primer (10 µM)
0,4 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1,8 µl	10 x PCR-Puffer
10,4 µl	ddH ₂ O
2 µl	Taq-Polymerase-Mix, siehe „hot start“

Reamplifikations-Programm der M13-PCR

	Denaturieren	hot-start	Annealing	Elongation
1. Zyklus	95°C/1 min.	80°C	55°C/1 min.	72°C/2 min.
2. bis 35. Zyklus	94°C/50 sec	-	55°C/1 min.	72°C/2 min.

Zu beachten war, dass durch die M13-PCR das amplifizierte Fragment um 200 bp größer war.

2.2.5.8. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mittels des QIAGEN Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Plasmide wurden aus 5 ml einer Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Reinheit und die Integrität der Plasmide mittels Gelelektrophorese gespaltener und ungespaltener Plasmide untersucht.

2.2.5.9. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der klonierten Fragmente erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität. Die rekombinanten Plasmide wurden durch Zyklus-Sequenzierung mit den M13-Forward- und M13-Reverse-Primern in einem automatischen Sequenzer (ABI) bearbeitet. Durch computergestützte Homologiesuche wurden anschließend die Sequenzen mit den in den Datenbanken (Genbank, EMBL) niedergelegten, weltweit publizierten Sequenzen auf eventuelle Identität überprüft.

2.2.6. Radioaktive Markierung von DNA durch „Random-Priming“

Für die Hybridisierung der Filter wurden die DNA-Fragmente, die als Hybridisierungssonde eingesetzt werden sollten, mit [α -³²P]-dCTP (3000 Ci /

mmol) nach der „Random-Priming“-Methode radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Hierzu wurde der „Megaprime labeling kit“ (Amersham, Buckinghamshire, England) verwendet. Freie Nukleotide wurden durch Chromatographie über eine Sephadex-S-300-Minisäule abgetrennt. Die Einbaurate von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP in die DNA wurde durch Messung eines Aliquots der Markierungsreaktion in einem Szintillationszähler bestimmt.

2.2.7. Hybridisierung von Membranen

Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte für mindestens 1 h bei 42 °C in der „Dig-Easy-Hyb“-Hybridisierungslösung (Roche, Mannheim). Für die anschließende Hybridisierung wurde diese Lösung nicht erneuert, sondern direkt mit der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde versehen und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Zum Erreichen höchster Spezifität wurde wie folgt gewaschen: 2 x 10 min. in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur; 1 x 10 min. 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur; 1 x 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 42 °C; 1 x 10 min. in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C. Die Membranen wurden in Frischhaltefolie verpackt und die radioaktiven Signale mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

2.2.8. Southern-Blot-Analyse

Jeweils 10 μg der 4 unterschiedlichen Hurpin-P1-Klone wurden mit den Restriktionsenzymen *Hind III* und *Bgl II* über Nacht gedaut. Die DNA wurde in einem 0,9 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter denaturierenden Bedingungen mittels Kapillartransfer aus dem Agarosegel auf Nylonmembranen transferiert. Nach Kreuzvernetzung der Nukleinsäuren mit der Membran durch Backen wurde diese gegen das radioaktiv markierte Hurpin-Transkript (λ -Klon 1.1) hybridisiert. Nach stringentem Waschen der Membranen (siehe 2.2.7.) wurden die Hybridisierungssignale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

2.2.9. Southern-Dot-Blot-Analysen

Zur Untersuchung der Integration des kodierenden Bereichs von Hurpin in das Genom von *Pichia pastoris* wurde Hefe-DNA isoliert und je 500 ng Hefe-DNA unter denaturierenden Bedingungen auf Nylon-Membranen immobilisiert. Die folgenden Schritte sind denen der Southern-Blot-Analyse (siehe 2.2.8.) gleich.

2.2.10. Untersuchung von bekannten Genen mit Hilfe von humanen cDNA-Arrays

Der kommerziell erhältliche cDNA-Array „humaner cDNA-Atlas I“ (Clontech, Palo Alto, USA) besteht aus zwei Nylonmembranen, auf denen jeweils 8 bis 10 ng 200 bis 500 bp grosser RT-PCR-Produkte bekannter Gene in Duplikaten immobilisiert wurden. Die Membranen sind in 6 Quadranten unterteilt, in welchen cDNAs verschiedener Gene entsprechend der funktionellen Bedeutung der Genprodukte angeordnet sind:

Quadrant A: Onkogene, Tumorsuppressorgene, Zellzyklus-Regulatoren;

Quadrant B: Streßantwort, Ionenkanäle und -transport, Modulatoren und Effektoren intrazellulärer Signale;

Quadrant C: Apoptose; DNA-Synthese, -Reparatur und –Rekombination;

Quadrant D: Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Proteine;

Quadrant E: Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Chemokine, Interleukine, Hormone und Neurotransmitter; Zelloberflächenantigene, Zelladhäsion;

Quadrant F: Zell-Zellkommunikation, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine; Interleukine, Interferone und Hormone.

2.2.10.1 Generierung von cDNA-Bibliotheken mittels SMART PCR

Jeweils 250 ng DNase-behandelte Gesamt-RNA aus Haut von 4 gesunden Spendern, bzw. je 500 ng aus BCC-Pool A und C wurden vereinigt und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. In diesem Falle wurden modifizierte Oligo-dT-Primer (CDS-Primer) verwendet. In der Regel fügt die Reverse Transkriptase am 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA Nukleotide an, in erster Linie dCTP. In dem Reaktionsansatz befinden sich zusätzlich „SMART-Primer“. Diese Primer haben am 3'-Ende Oligo-G-Sequenzen, die sich an die Oligo-C-Sequenzen am 3'-Ende der cDNA anlagern. Nach der folgenden Zweitstrang-Synthese besitzt die so modifizierte cDNA sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende definierte Sequenzen. Mit Hilfe spezifischer Primer, die an diese definierten Sequenzen binden, ist es mittels einer „Long-distance-PCR“ (LD-PCR) möglich, die gesamte cDNA zu amplifizieren.

Für die reverse Transkription wurde folgender Versuchsansatz gewählt:

1,0 µg	Gesamt-RNA (gepoolt)
1,0 µl	SMART-Oligonukleotide (10 µM)
1,0 µl	CDS/3'-PCR-Primer (10 µM)
ad 10 µl	DEPC-H ₂ O,
10 min. 72°C, 10 min. Eis	
4,0 µl	5 x Puffer (250 mM Tris-HCl pH8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)
2,0 µl	0,1 M DTT

1,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
1,0 µl	RNasin (40 U)
1,0 µl	ddH ₂ O
2 min. bei 42 °C im Wasserbad	
1,0 µl	Superscript-II-Reverse-Transkriptase
1 h bei 42 °C, 10 min. bei 70 °C	

Die verwendeten Primer wiesen folgende Sequenzen auf:

SMART-Primer: 5'-TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAAGGG-3'

CDS-/ 3'-Primer Oligo (dT)₃₀ N₋₁ N; N = A, G, C oder T; N₋₁ = A, G oder C.

In der LD-PCR wird ein Mix aus der KlenTaq 1-Polymerasen und einer weiteren Polymerase, welche fehlerhafte Neusynthesen kontrolliert, eingesetzt. Dadurch können lange Produkte mit geringer Fehlerrate amplifiziert werden.

Der Polymerase-Kettenreaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

2,0 µl	cDNA
80,0 µl	ddH ₂ O
10,0 µl	10 x KlenTaq-PCR-Puffer
2,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
2,0 µl	5'-Primer (10 µM)
2,0 µl	CDS-/ 3'-Primer
2,0 µl	50 x Advantage-KlenTaq-Polymerase-Mix

Das Gesamtvolumen betrug 100 µl. Die LD-PCR-Reaktion wurde mit unterschiedlicher Zyklenzahl nach folgendem Programm durchgeführt: 1. Zyklus: 95°C 1 min.; 2. – x. Zyklus: 95 °C 15 s, 68 °C 5 min..

Entscheidend für eine gleichmäßige Verteilung der Transkripte war die optimale Zyklenzahl der PCR. Deshalb wurden nach 7, 15, 18, 21 und 24 Zyklen Aliquots aus dem PCR-Ansatzes entnommen und auf einem 0,9 %igen Agarosegel analysiert. Die optimale Amplifikation, mit detektierten cDNAs im Bereich von 0,3 bis 3 kb, wurde nach 17 Zyklen erreicht. Im Folgenden wurden die cDNA-Bibliotheken in einer LD-PCR mit 17 Zyklen amplifiziert. Die generierten cDNA-Bibliotheken wurden über Microcon-100-Säulen (Amicon, USA) von nicht eingebauten Nukleotiden, Primern und Enzymen getrennt, und die Konzentration anschließend photometrisch bestimmt.

2.2.11. Synthese von rekombinanten Hurpin in *Pichia pastoris*

2.2.11.1. Klonierungsstrategie

Als eukaryotischen Expressionsvektor für die rekombinante Proteinsynthese in der Hefe *Pichia pastoris* wurde pHIL D2 der Firma Invitrogen verwendet. Der Vektor und der kodierende Bereich von Hurpin, der mittels PCR aus dem λ -Klon R7-1.1 amplifiziert worden war, wurden mit Eco RI gedaut und gelelektrophoretisch aufgereinigt. Die 5'-Überhänge des linearisierten Vektors wurden im Folgenden mit intestinaler Phosphatase vom Kalb (Roche, Mannheim) dephosphoryliert, um Religationen zu vermeiden. Die Ligation und Transformation verlief nach Standardmethoden. Da es sich hierbei um eine ungerichtete Klonierung handelte, wurden nach der Transformation 10 Klone auf die korrekte Orientierung des kodierenden Bereichs mittels PCR unter Verwendung des Primers HP PE 2-1 und des vektorspezifischen AOX-1-Primers untersucht. Ein Klon mit der richtigen Orientierung wurde daraufhin sequenzanalysiert.

Das ligierte Hurpin-Transkript war derart modifiziert, dass nach Expression 6 Histidine zusätzlich an den N-Terminus des Proteins fusioniert waren („His-tagged“ Fusionsprotein). Diese Modifikation vereinfacht die nachfolgende Isolation und Reinigung des rekombinanten Hurpin.

2.2.11.2. Transformation von Hefe

Das Hurpin-pHIL D2-Konstrukt wurde in die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* transformiert. Hierbei wurde nach dem Protokoll des *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) verfahren. In Kürze, die Zellwand der Hefe wurde durch Zymolase (ICN, Eschwege) gedaut und die Bildung der Spheroplasten photometrisch kontrolliert. Jeweils 10 μ g der Hurpin-pHIL D2-Plasmide wurden durch *Not I* linearisiert. Die Plasmide wurden zu den Spheroplasten gegeben und der Ansatz für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Hefe transformiert. Nach der Transformation wurden jeweils 300 μ l dieses Ansatzes vorsichtig mit 10 ml 45°C warmem RD-Medium gemischt und auf Histidin-freie RDB-Platten gegossen. Der Mangel an Histidin führt zu einer Selektion, da nicht-transformierte *Pichia pastoris* durch das Fehlen des HIS4-Gens kein Histidin synthetisieren konnten und nicht wuchsen. Nach 6tägiger Inkubation bei 30°C wurden die Hefe-Klone auf stabile Integration von Hurpin in das Hefe-Genom mittels Southern-Dot-Blot-Analysen und PCR untersucht. Die positiven Klone wurden daraufhin mittels Western-Dot-Blot-Analysen und SDS-PAGE auf die Expression von Hurpin untersucht.

2.2.11.3. Expression und Isolation von rekombinantem Hurpin

Einzelkolonien wurden in 500 ml YPD für 2 Tage bei 30°C und 225 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 3 % (v/v) Methanol wurde die Suspension weitere 3 Tage inkubiert. Methanol induziert die Expression von Hurpin in *P. pastoris* durch einen dem klonierten Gen vorgeschalteten Alkohol-Oxidase-Promoter. Nach insgesamt 5tägiger Inkubation wurde die Hefe pelletiert (1000 x g; 15 min.) und das Pellet in 20 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen an säuregewaschenen Glasperlen (Durchmesser 425- 600 µm, Sigma) versetzt und in halbminütigen Abständen gevortext. Dieses Mahlen wurde mehrmals wiederholt (20 x) und führte zum Aufbrechen der Zellwand und zur Freisetzung des Zytoplasma. Nach vollständiger Lyse wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (4000 x g, 20 min., 4°C) von den zytosolischen Proteine getrennt.

YPD:	10 g	Hefe-Extrakt
	20 g	Pepton
	20g	Glukose
	ad 1000 ml ddH ₂ O	

Lysis-Puffer:	20 mM	Tris-HCl (pH8)
	5 mM	β Mercaptoethanol
	1 mM	PMSF
	10 %	Glyzerin

2.2.11.4. Metallaffinitäts-Säulenchromatographie

Das zytosolische Proteingemisch wurde mit der Metallaffinitäts-Chromatographie-Matrix Talon (Clontech, Palo Alto, USA) versetzt und für 30 Minuten unter ständiger Bewegung bei 4°C inkubiert. Die Talon-Matrix besteht aus Sepharosekugeln, an denen durch Komplexierung Kobalt-Ionen immobilisiert sind. Das rekombinante, His-getaggte Hurpin bindet hierbei an die positiv-geladenen Co²⁺-Ionen, indem es das freie Elektronenpaar des Histidin-Imidazolrings mit den Elektronen-defizienten Orbitalen des Metallions teilt. Nach Überführung der Matrix in eine leere Säule folgten zwei Waschschrte (50 ml Waschpuffer I; 20 ml Waschpuffer II). Die Elution wurde durch Gabe von 10 ml 50 mM Imidazol (in ddH₂O) herbeigeführt und die Eluate in Fraktionen zu je 1,8 ml aliquotiert.

Waschpuffer I:	20 mM Tris (pH 7,4)
	150 mM NaCl
	5 mM β Mercaptoethanol

Waschpuffer II: 20 mM Tris (pH 7,4)
 500 mM NaCl
 5 mM β Mercaptoethanol

Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.15.1) kontrolliert.

2.2.11.5. Ionenaustausch-Säulenchromatographie

DEAE-Sepharose (HiTrap DEAE Sepharose, Amersham-Pharmacia, Freiburg) wurde in 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquiliibriert. Dabei liegt das Diethylaminoethyl in seiner protonierten, positiv-geladenen Form vor. Hurlin besitzt einen pK-Wert von 5,5 (Abts *et al.*, 1999) und ist bei pH 7,5 negativ geladen. Das einmalig gereinigte rekombinante Hurlin wurde zusammen mit der Säulenmatrix inkubiert und blieb aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung an dieser haften. Nach mehreren Waschschrinen wurde die Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten (0- 500mM) durchspült. Dabei wurde das rekombinante Hurlin charakteristisch in Gegenwart von 120- 140 mM Chlorid-Ionen durch Konkurrenz von der Säule gelöst. Die Ionenaustausch-Chromatographie wurde mittels der BioLogic LP (Bio-Rad, München) mit integrierten Messeinheiten für die UV-Absorption und die Leitfähigkeit, durchgeführt.

2.2.12. Isolation von Proteinen aus BCC und gesunder Haut

Die zellulären Bestandteile der BCC wurden mittels CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation aufgetrennt. Die proteinhaltige Phase wurde zur Verringerung der Salzkonzentration über Nacht in 1 x PBS dialysiert. Die Proteine aus gesunder Haut wurden aus TRIzol-lysierten Gewebebiopsien nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.13. Bestimmung der Konzentration von Gesamt-Protein

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des „NanoOrange Protein Quantitation Kit“ (Molecular Probes, Pitchford, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Diese Methode beruht auf Reaktionen des NanoOrange-Reagens mit Proteinen. Hierbei ändert sich die Konformation des Reagens, wodurch nach Anregung bei 485 nm Fluoreszenz bei 590 nm messbar wird. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Vergleich mit einer vorher ermittelten Eichreihe mit BSA als Standard bestimmt.

2.2.14. Bestimmung der Konzentration von rekombinantem Protein

Zur Bestimmung der Konzentration von rekombinantem Protein wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Durch Einsetzen der bekannten Parameter in das *Lambert-Beersche Gesetz* konnte die Konzentration bestimmt werden.

$$c = A_{280} / \epsilon_{\text{Hurpin}} \times d$$

c = Konzentration [M]

$\epsilon_{\text{Hurpin}} = 39880 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$

A_{280} = Absorption bei 280 nm

d = Schichtdicke [cm]

2.2.15. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Zur Herstellung aller Polyacrylamid (PAA)-Gele wurde eine gebrauchsfertige, 50 %-ige PAA-Lösung (ProSieve, FMC, Rockland, USA) benutzt. Zur Herstellung der Gele und zur elektrophoretischen Auftrennung wurde die MiniProtean Gieß- und Elektrophoresekammer (Bio-Rad) verwendet.

2.2.15.1. SDS-PAA-Gele

Zur Auftrennung von rekombinantem Hurpin und Gesamt-Protein aus Biopsien wurden SDS-PAGE-Analysen nach Laemmli (1970) durchgeführt, wobei das Sammelgel einen PAA-Gehalt von 5 % und das Trenngel von 12,5 % enthielt.

2.2.15.2. SDS-PAA-Gradientengele

Zur optimalen elektrophoretischen Auftrennung des Cathepsin L-geschnittenen Hurpins wurden kontinuierliche PAA-Gradientengele (5– 20 %) verwendet. Hierfür wurden zwei PAA-Lösungen (5 % und 20 %) in einem linearen Verhältnis unter Verwendung eines Gradientenmischers und einer Pumpe in die Gelkammer gegossen. Für eine Gebrauchslösung von je 20 ml ergaben sich folgende Mengen:

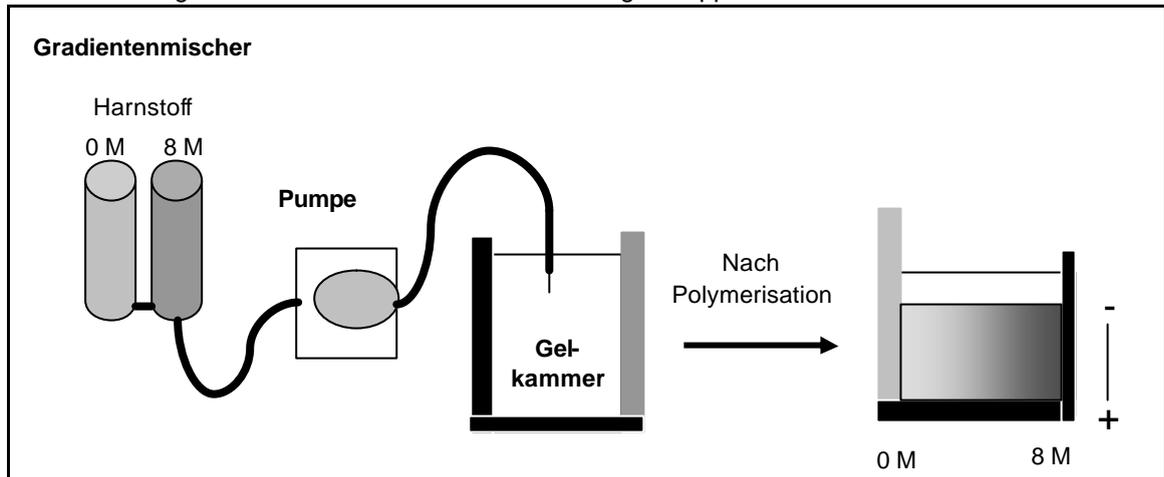
	5 %-ige PAA	20 %-ige PAA
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	5 ml	5 ml
ProSieve (50 %)	2 ml	8 ml
SDS (10 %)	200 µl	200 µl
ddH ₂ O	12,8 ml	6,8 ml

Für ein Gel wurde je Lösung 2,4 ml in die separaten Kammern des Gradientenmischers vorgelegt und die Polymerisierung durch Gabe von 5 µl APS und 3 µl TEMED gestartet. Die Flussgeschwindigkeit der Pumpe war auf 4 ml pro Minute eingestellt.

2.2.15.3. Transversale Harnstoffgradienten PAA Gelelektrophorese (TUG-PAGE)

Mit Hilfe von TUG-PAGE-Analysen ist es möglich, Aussagen über die Fähigkeit zur Konformationsänderung inhibitorisch aktiver Serpine zu erlangen. Die hier beschriebene TUG-PAGE ist eine abgeleitete Version der Methode von Mast *et al.* (1991).

Die Abbildung veranschaulicht die verwendete Gelgieß-Apparatur.



Die beiden PAA-Lösungen wurden in einem linearen Verhältnis gemischt und in die Gelkammer gepumpt. Nach der Polymerisation wurde der Platzhalter (hellgrau unterlegte) der Gelkammer vorsichtig entfernt und an dem linken Rand der Gelkammer neu plaziert.

Pro Gel wurden folgende Volumen an Inhaltsstoffen benötigt:

	0 M Harnstoff	8 M Harnstoff
ProSieve	600 μ l	600
4 x Laufpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	1000 μ l	1000 μ l
ddH ₂ O	2400 μ l	0,5 μ l
Harnstoff	-	1,92 g
10 % APS	20 μ l	20 μ l
TEMED	3 μ l	3 μ l

100 μ g des nativen Hurpin wurden mit 2 x Ladepuffer (125 mM Tris-HCl, 20 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau, pH 8,3) versetzt und gleichmäßig aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung des Proteins erfolgte mit einer Stromstärke von 7 mA je Gel über 2 h. Als Kathodenpuffer wurde 5,3 mM Tris, 6,8 mM Glyzin; pH 8,9, als Anodenpuffer wurde 100 mM Tris-HCl pH 7,8 verwendet.

2.2.16. Färbung der Proteingele

2.2.16.1. „Coomassie blue“-Färbung

Hierbei wurden die gebrauchsfertigen Lösungen von Bio-Rad (München) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.16.2. Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Mengen gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurde die sensitive Methode der Silberfärbung eingesetzt. Hierbei wurden die gebrauchsfertigen Lösungen von Bio-Rad (München) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.17. Western-Blot-Analysen

Größenseparierte Proteine wurden mittels Elektrottransfers in einer feuchten Transferkammer (Protean Trans-Blot, Bio-Rad, München) nach SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembranen (Bio-Rad, München) transferiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Trockenmilch (5 % (w/v)), Tween 20 (0,02 % (v/v)) in PBS blockiert.

Für die Detektion von hnRNP D0 wurde eine 1/5000-fache Verdünnung (3 %-ige (w/v) Trockenmilch in PBS) des Maus-anti-human-hnRNP D0 monoklonalen Antikörpers verwendet. Nach Waschen in TPBS (0,1 % Tween 20 in PBS) wurde die Membran mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertem-anti-Maus-monoklonalem Antikörper (Sigma) inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mittels Western-Blot-Chemiluminescence Reagent Plus (NEN, Boston, USA) nach Herstellerangaben. Das durch die Aktivität der Peroxidase freigesetzte Licht wurde mit Röntgenfilmen nachgewiesen.

2.2.18. Immunhistologie

Gefrierschnitte wurden mit 50 %-igem Aceton und 50 %-igem Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend an der Luft getrocknet. Unspezifische Bindung von Antikörpern wurde durch Inkubation mit 5 % (w/v) Trockenmilch, 3 Tropfen Ziegen Serum in PBS blockiert. Der hnRNP D0-mAb wurde 1/1000 in 1 % (w/v) BSA in 1 x PBS für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden durch den sekundären, FITC-markierten Antikörper detektiert. Die Gefrierschnitte wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) untersucht und fotografiert.

2.2.19. Zielgerichtete Mutagenese

Zur Untersuchung des Inhibitionsmechanismus von Hurpin wurden 3 zielgerichtet mutierte Hurpinvarianten unter Verwendung des „Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Clontech, Palo Alto, USA) generiert. Hierbei wurde die P14-Stelle des reaktiven-Loops (HP 501), die mögliche P1-P1´-Stelle (HP 502) und der CD-interhelikale-Loop (HP 503) mutiert, bzw. deletiert. Als Matrize für die zielgerichtete Mutagenese wurde das Hurpin-pHIL D2-Konstrukt (siehe 2.2.11.1.) verwendet.

Klon-name	Eingeführte Mutation	Veränderte Restriktionsspaltstelle
HP 501	³⁴³ Thr nach ³⁴³ Arg	Zusätzliche Kas I-Restriktions-Schnittstelle
HP 502	³⁵⁶ Thr nach ³⁵⁶ Ala	Zusätzliche Bst UI-Restriktions-Schnittstelle
HP 503	ΔCD interhelikale-Loop	Entfernt Sac I-Restriktions-Schnittstelle

Das benutzte Kit basiert auf der Methode von Deng und Nickoloff (1992). In dieser Methode wurden zwei verschiedene Oligonukleotide verwendet. Ein Oligonukleotid war der Mutagenese-Primer (siehe 2.1.7.), das zweite ein Selektions-Primer, durch den eine Restriktions-Schnittstelle im Plasmid entfernt wurde. Nach Annealing der Primer an den Einzelstrang des Plasmids wurde der Doppelstrang durch T4-Polymerase synthetisiert und die Enden mittels T4-Ligase geschlossen. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, wobei folgende Modifikationen vorgenommen wurden:

- Alkalische Denaturierung der Plasmide anstelle von Hitze-Denaturierung
- Molares Verhältnis Mutagenese-Primer zu Selektions-Primer ist 100:1
- [NaCl] im Annealing-Puffer ist um das 10-fache verringert.

Nach Transformation von Bakterien und anschließender Plasmidpräparation, wurden die Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe Tabelle) gespalten. Anhand der Fragmentverteilung nach Gelelektrophorese konnten falsch-positive Klone ausgeschlossen werden. Je zwei positive Klone wurden anschließend durch Sequenzanalyse bestätigt.

2.2.20. Protease-Inhibitionsassays

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Hurpin wurden Protease-Inhibitionsassays *in vitro* durchgeführt.

2.2.20.1. Aktivitätsbestimmung der Cysteinproteasen Cathepsin L und B

Die proteolytische Aktivität der käuflich erworbenen Cysteinproteasen Cathepsin L (Calbiochem) und B (ICN, Eschwege) musste bestimmt werden, da

durch Bearbeitung und Transport nicht die gesamte Menge der gelieferten Protease aktiv ist. Bei diesem Assay misst man die verbliebene Aktivität der Proteasen nach Inhibition durch den synthetischen Cysteinprotease-Inhibitor E-64 (L-trans-3-carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, ICN, Eschwege). Dieser inhibiert Cat L und Cat B in einem äquimolaren Verhältnis. Die verbliebene Aktivität der Proteasen wurde durch Proteolyse des für Cat L und Cat B spezifischen Fluoreszenzsubstrates N-CBZ-Phe-Arg-AFC (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) mit Hilfe eines Fluorimeters (Fluoroskan Ascent, Labsystems) gemessen.

Je 25 nM Cat L und Cat B wurden mit 10 mM Cystein bei 37°C für 15 Minuten präaktiviert, wobei in diesem Schritt die Proteasen aktiviert werden. Je 10 µl der präaktivierten Protease wurde in 98-Well-Mikrotiterplatten (Cliniplate-black, Labsystems) vorgelegt und je 10 µl E-64 unterschiedlicher Konzentrationen zugegeben. Der Ansatz wurde mit Parafilm abgedeckt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 80 µl Cathepsin L-Puffer (0,1 M NaOAc (pH 5,5), 1 mM EDTA und 0,1% Brij35) verdünnt. Dann wurde nach Zugabe von 100 µl des Substrats (20 µM) die Fluoreszenz (em.: 355 nm, exc.: 460 nm) alle 20 Sekunden über einen Zeitraum von 6 Minuten gemessen. Daraus kann die Aktivität der Protease wie folgt errechnet werden:

$$\frac{\text{Geschwindigkeit der Fluoreszenzentwicklung der inhibierten Protease}}{\text{Geschwindigkeit der Fluoreszenzentwicklung der nicht inhibierten Protease}}$$

Diese Werte werden gegen das Protease/Inhibitor Verhältnis aufgetragen (X-Achse). Durch lineare Regression unter Verwendung der GraphPad-Prism-Software (GraphPad Software Inc.) wurde eine Gerade errechnet, deren Schnittpunkt an der X-Achse die wirkliche Proteaseaktivität in Prozent widerspiegelt.

2.2.20.2. Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI)

Die Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) wurde nach dem selben Protokoll wie die Aktivitätsbestimmung der Proteasen durchgeführt. Abweichend davon wurden hier jeweils 10 µl der präaktivierten Protease (10 nM) mit 10 µl Hurpin, bzw. -Mutanten unterschiedlicher Konzentrationen (0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 37,5; 50 nM) inkubiert. Der Schnittpunkt an der X-Achse ist hier der SI. Alle Assays wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Werte gemittelt.

2.2.20.3. Bestimmung der Assoziationskonstante (k_{ass})

Hier wurde die kontinuierliche Inhibition von Cat L durch Hurpin über einen Zeitraum von 2 h untersucht. Der Versuchsaufbau änderte sich im Vergleich zu

den vorher beschriebenen Assays derart, dass je 10 μl Hurpin verschiedener Konzentration (10 bis 150 nM) mit 90 μl Substrat (11,1 μM) in 96-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt wurden. Kurz vor Beginn der Messung wurde jeweils 100 μl präaktiviertes Cat L (0,5 nM) zugegeben. Die Fluoreszenz wurde alle 24 sec. über 2 h gemessen. Die Aktivität der Protease wurde durch nicht-lineare Regression mit folgender Gleichung $Y = V_s * X + (V_0 - V_s) * (1 - e^{-(k * X)}) / k$ bestimmt. Die ermittelten k-Werte wurden im Folgenden gegen die molaren Hurpin-Konzentrationen aufgetragen. Die Steigung, welche durch lineare Regression berechnet worden war, war die unkorrigierte Assoziationskonstante.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von BCC-assoziierten, differenziell exprimierten Genen

Zur Identifizierung von Genen, die an der Pathogenese von BCC beteiligt sind, wurden Expressionsprofile von Tumorgewebe und normaler Haut vergleichend dargestellt. Hierfür wurden die DDRT-PCR und die differenzielle Hybridisierung von cDNA-Arrays eingesetzt.

3.1.1. Differenzielle Hybridisierung von cDNA-Arrays

Einen möglichen Ansatz zur vergleichenden Analyse differenziell exprimierter Gene bietet die differenzielle Hybridisierung von cDNA-Arrays. Die Verwendung dieser Expressionsarrays auf Nylonmembranen in Größe einer Mikrotiterplatte ("humane cDNA Atlanten") der Firma Clontech (Palo Alto, CA) ermöglicht die parallele Analyse von 588 bekannten Genen.

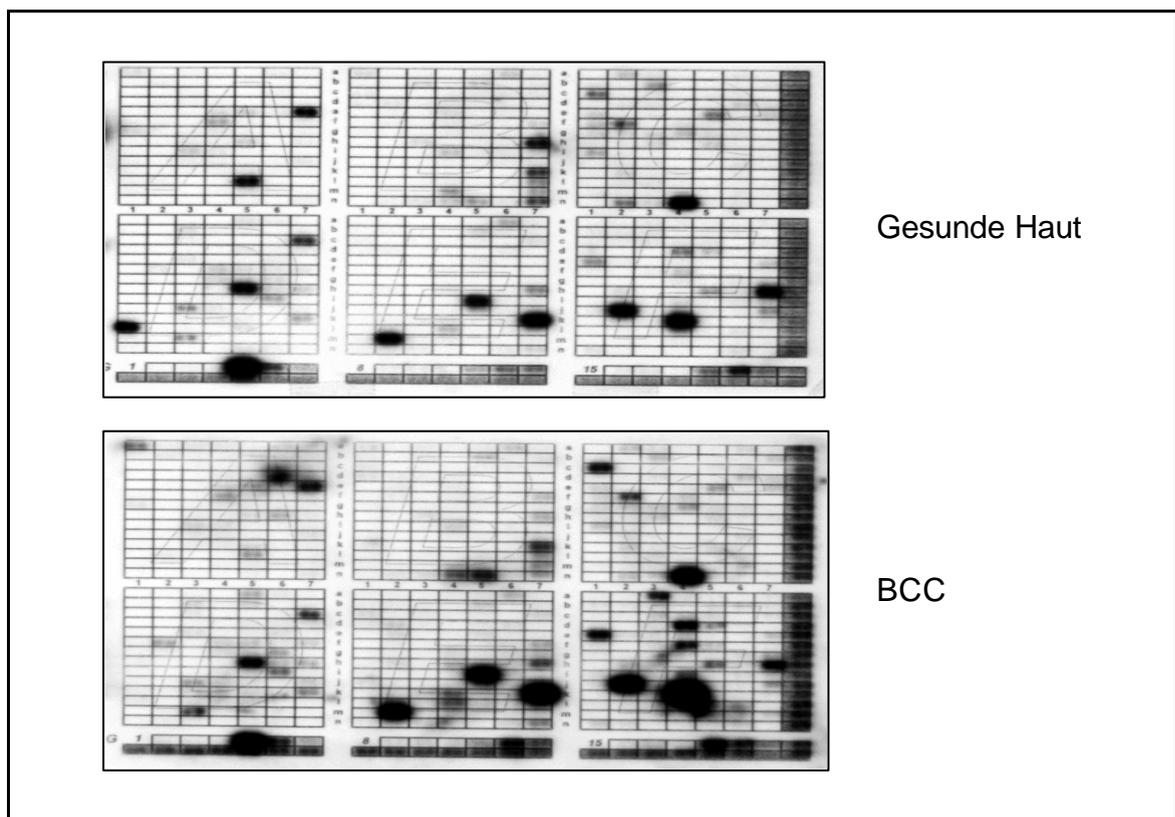


Abbildung 1: Differenzielle Hybridisierung von cDNA-Arrays. 200 bis 500 bp große cDNA PCR-Produkte bekannter Gene sind in Duplikaten auf Nylonmembranen immobilisiert worden. Die Hybridisierung erfolgte gegen 100 ng radioaktiv markierte Gesamt-cDNA aus BCC und gesunder Haut. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für 8 Stunden.

Aus der Gesamtheit der 588 auf dem cDNA-Array immobilisierten Fragmente konnte für 100 dieser Gene die Expression in gesunder Haut, bzw. in BCC nachgewiesen werden. Das Autoradiogramm wurde digitalisiert, die Hybridisierungssignale mit Hilfe der Multianalyst-Software (BioRad, München)

densitometrisch ausgewertet und anschließend gegen die Signalstärken der „house-keeping“-Gene (grau unterlegte Zeilen und Reihen) normalisiert. Fragmente, die einen Unterschied in der Expression von größer oder gleich 2 aufwiesen, wurden als differenziell exprimiert eingestuft. Derart wurden 16 differenziell exprimierte Gene ermittelt. 6 der Gene werden in BCC im Vergleich zu gesunder Haut reprimiert und 10 induziert exprimiert. Tabelle 2 listet diese Gene auf, die auf Grund der jeweiligen physiologischen Funktion in unterschiedlichen Gruppen zusammengefasst wurden.

Tabelle 1: Gene mit einem Unterschied in der Expression von grösser oder gleich 2. Die differenziell exprimierten Gene sind funktionellen Gruppen zugeordnet.

Gene	Zugangsnummer zur Gen-Bank	Orientierung in dem cDNA-Array	Verhältnis BCC zu gesunder Haut
Zelluläre Redoxsysteme			
Glutaredoxin	X76648	B7n	0,2
Mikrosomale Glutathion-S-Transferase (GST 12)	J03746	C2n	0,16
Natürliche Killer-Zellen verstärkender Faktor	L19185	B7h	0,11
Transkriptionsfaktoren und Zell-Zyklus-Kontrolle			
Janus-Tyrosin-Kinase Jak3	U09607	B4n	> 10
Adrenerger β -2 Rezeptor	M15169	E4k	7
myc Proto-Onkogen	V00568	A1a	5,5
„Teratocarcinoma-derived factor1“ Cripto	M96956	F4f	4
cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor ATF4	D90209	D2f	4
ERK 2 (MAPK2)	M84489	B5n	2
40 S ribosomales Protein S19 (RP S19)	M81757	A5l	0,11
60 S ribosomales Protein L6 (RP L6)	X69391	D1e	<< 0,1
Immunsystem			
„Monocyte chemotactic protein-1“	M24545	F3a	25
TGF- β	J05114	F1e	2
Semaphorin (CD 100)	U60800	E7n	2
Zellmatrix und Zell-Zell-Kontakt			
Thymosin- β -10	M92381	F4d	2,5
Integrin beta-4 (CD104)	X53587	E7h	2

3.1.2. Expressionsstudie der in den cDNA-Arrays differenziell exprimierten Gene

Mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR-Analysen sollte bei 10 Genen (Jak3, GST 12, Glutaredoxin, β 2 AR, c-myc, RP L6, RP S19, MCP-1, ATF4, CRIPTO) die mittels cDNA-Array-Analyse (3.1.1.) festgestellte differenzielle Expression verifiziert werden. Darüber hinaus konnte derart auch die individuelle Expression in 10 unterschiedlichen BCC, 2 SCC, in 7, bzw. 10 Proben aus gesunder Haut, HaCaT und NHK untersucht werden.

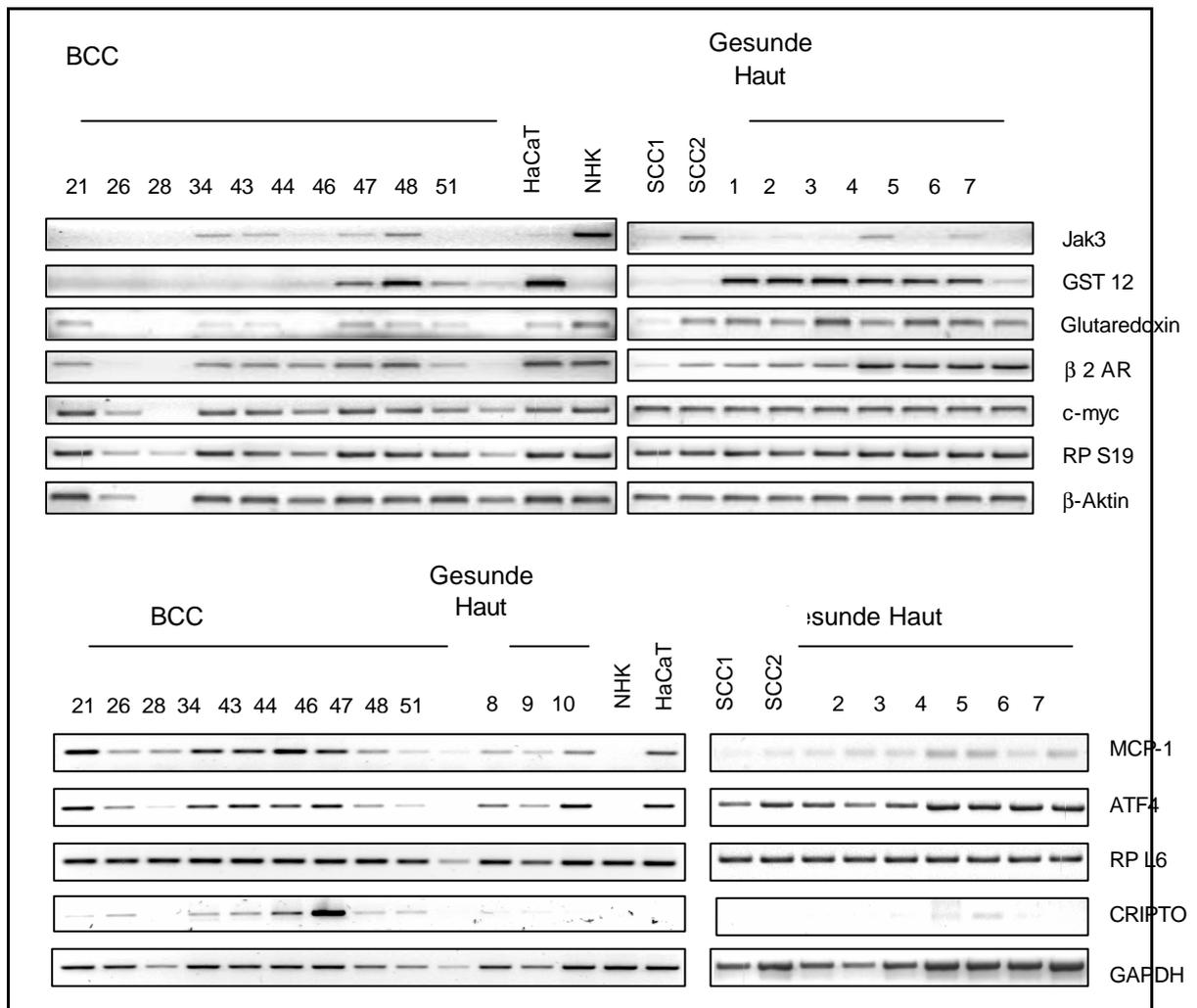


Abbildung 2: Inverse Darstellung der Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegele der semiquantitativen RT-PCR-Analysen zur Expressionsstudie differenziell exprimierter, BCC-assoziiierter Gene. Gesamt-cDNA aus 10 BCC, 2 SCC, 7, bzw. 10 Biopsien aus gesunder Haut, HaCaT und NHK wurden in RT-PCR Reaktionen mit den angegebenen Gen-spezifischen Primern eingesetzt. Die Gele wurden fotografiert und densitometrisch ausgewertet. Diese Werte wurden entsprechend der Signale von β -Aktin (oben), bzw. GAPDH (unten) normalisiert.

Transkriptionsfaktoren und Zell-Zyklus-Kontrolle

Die mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmte mRNA-Menge für die *Tyrosin-Protein-Kinase Jak3* ist, mit Ausnahme in NHK, in allen Proben gering. In den BCC 12, 26, 28, 44, 48, und 51 konnten keine, in BCC 34, 43, 47 geringe und in

BCC 47 etwas größere Transkriptmengen nachgewiesen werden. In HaCaT und SCC1 wurden ebenfalls geringe Mengen der Jak3-mRNA nachgewiesen. In den gesunde Haut Proben 1, 2, 3 wurden schwache Signale, in 5 und 7 keine und in 4 und 6 stärkere Signale detektiert. Es wurden große individuelle Schwankungen in den einzelnen Proben detektiert, dennoch ist tendenziell eine BCC-assoziierte Überexpression feststellbar.

Der „*teratocarcinoma-derived growth factor 1*“ (*Cripto*) wird nur in BCC und in der gesunden Haut Probe 5 exprimiert. Die größte Menge an *Cripto* mRNA liegt in BCC 46 vor. Die BCC-assoziierte Induktion von *Cripto*, die mittels cDNA-Array-Analyse detektiert wurde, konnte bestätigt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression in den untersuchten Biopsien einer individuellen Variabilität unterliegt.

Die durch die cDNA-Array Analyse detektierte differenzielle Expression für den adrenergen β -2 Rezeptor (β -2-AR), das Proto-Onkogen *c-myc*, die ribosomalen Proteine S19 und L6 (RP-S19 und -L6) und für den cAMP-abhängige Transkriptionsfaktor ATF4 konnte mittels semiquantitativer RT-PCR nicht bestätigt werden.

Zelluläre Redoxsysteme

Die *mikrosomale Glutathion-S-Transferase (GST 12)* wird konstitutiv in gesunder Haut und in HaCaT-Zellen exprimiert. Die Expression von GST 12 in BCC konnte nur in den Proben 46, 47, 48 und 51 nachgewiesen werden. In SCC und in NHK konnten mittels RT-PCR keine Transkripte amplifiziert werden. Die Ergebnisse der differenziellen Hybridisierung der cDNA-Arrays zeigten für GST 12 eine 5-fach geringere mRNA-Menge als in BCC. Dieses Ergebnis konnten hiermit bestätigt werden.

Glutaredoxin wird in allen Proben aus gesunder Haut exprimiert. Eine schwächere Expression kann in den BCC 21, 34, 43, 46, 47 und 48, sowie den HaCaT-Zellen, NHK und den SCC nachgewiesen werden. Keine Amplifikate wurden in den BCC 26, 28, 44 und 51 detektiert. Die mittels cDNA-Arrays demonstrierte Repression von Glutaredoxin in BCC konnte durch RT-PCR verifiziert werden

Immunsystem

Transkripte des „*monocyte chemotactic protein-1*“ (*MCP-1*) können mit Ausnahme von NHK in allen untersuchten Proben festgestellt werden. Die Expression in der gesunden Haut ist generell schwächer als in den BCC 21, 34, 43, 44 und 46. Keine relevanten Unterschied in der Expression zeigen die BCC-Proben 26, 28, 47, 48 und 51 vergleichend zur gesunden Haut. Die postulierte Induktion von MCP-1 in BCC konnte verifiziert werden. Auch hier liegen starke individuelle Schwankung der Expression vor.

3.1.3. Expressionsprofilierung mittels „Differential Display“ RT-PCR (DDRT-PCR)

Zur Identifizierung neuer und bekannter Gene, die in BCC im Vergleich zu gesunder Haut differenziell exprimiert werden, sind DDRT-PCR Reaktionen mit 15 verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt worden. Nach gelelektrophoretischer Größenauftrennung der Reaktionsansätze konnten insgesamt ca. 800 cDNA-Fragmente detektiert werden, von denen 54 als differenziell exprimiert eingestuft wurden.

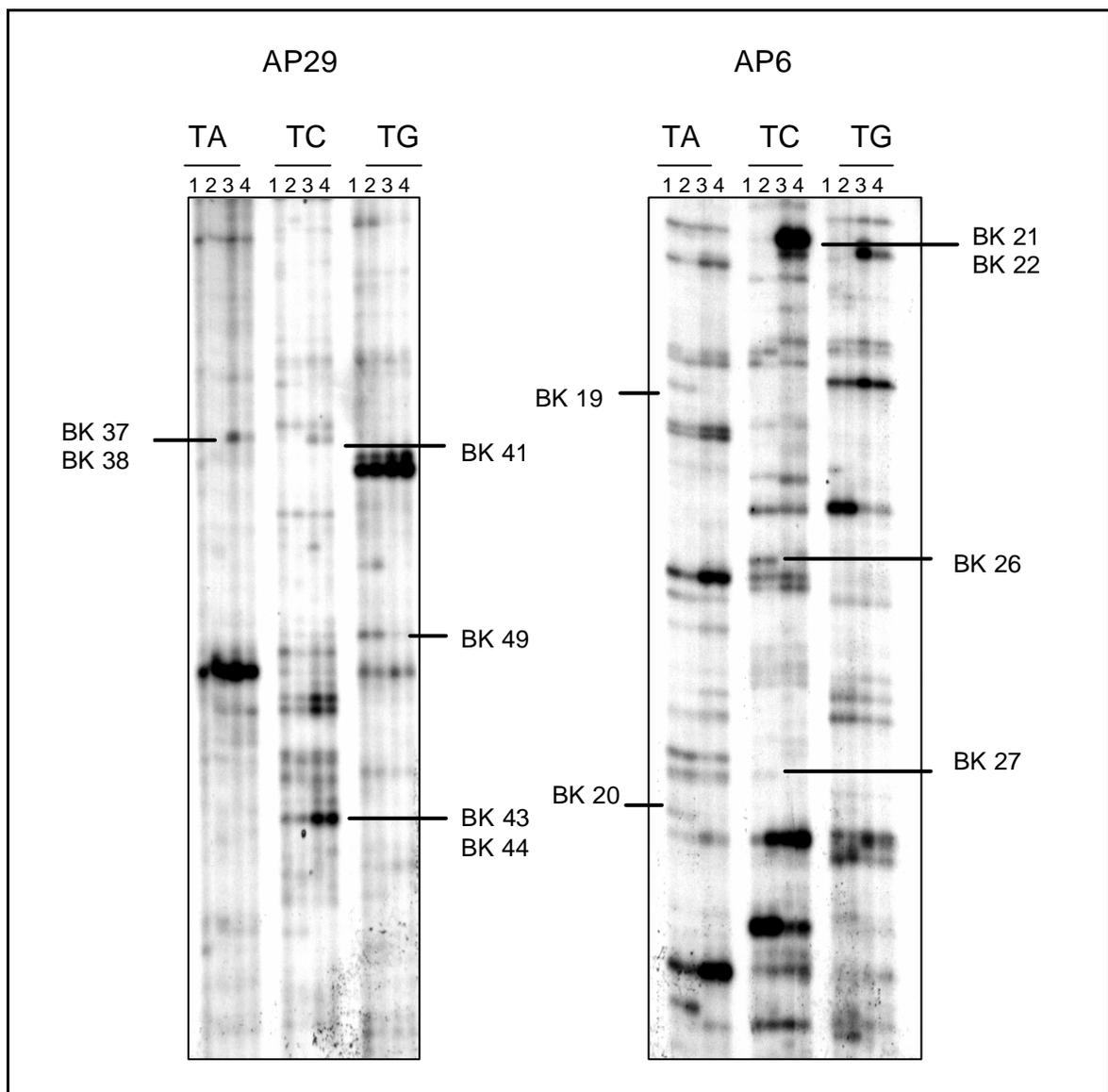


Abbildung 3: DDRT-PCR Analysen mit mRNA aus BCC und gesunder Haut unter Verwendung der arbiträren Primer AP 6 oder AP 29. Es wurden jeweils 4 µl des DDRT-PCR Ansatzes unter denaturierenden Bedingungen auf einem 5% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. 1: BCC-Pool A, 2: BCC-Pool C, 3: Gesunde-Haut-Pool A, 4: Gesunde-Haut-Pool B. Die Exposition des Röntgenfilms durch die getrockneten PAA-Gele erfolgte für 14 Stunden.

3.1.4. Überprüfung der differentiellen Expression mittels reverser Northern-Dot-Blot-Analysen

Mit einer zweiten, unabhängigen Methode, der reversen Northern-Dot-Blot-Analyse, kann die differentielle Expression der isolierten DDRT-PCR-Fragmente verifiziert werden. Die reamplifizierten und gereinigten cDNA-Fragmente wurden auf Nylonmembranen immobilisiert und gegen radioaktiv markierte Gesamt cDNA-Bibliotheken aus BCC und gesunde Haut-Proben hybridisiert.

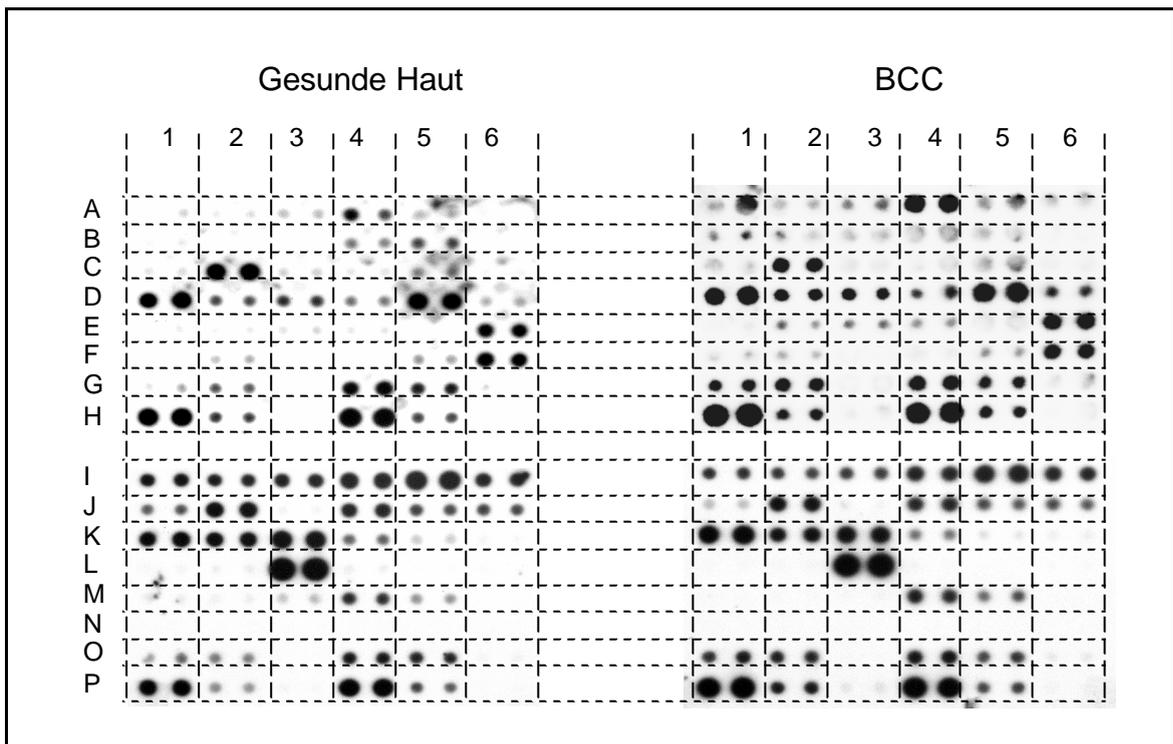


Abbildung 4: Reverse Northern-Blot-Analysen. Jeweils 4 µl der isolierten, reamplifizierten und gereinigten cDNA-Fragmente wurden jeweils als Duplikate auf Nylonmembranen immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte gegen 100 ng radioaktiv markierte Gesamt-cDNA aus BCC und aus gesunder Haut. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für 8 Stunden.

Das Autoradiogramm wurde digitalisiert, die Hybridisierungssignale densitometrisch ausgewertet und gegen die Signalstärken der „house keeping“-Gene (Reihen G, H und O, P) normalisiert. Anschließend wurden die Expressionsunterschiede zwischen BCC und gesunder Haut ermittelt.

Fragmente, die einen Unterschied in der Expression von mehr als 2 aufwiesen, wurden in pCRII-Vektoren kloniert und anschließend sequenziert. Die Suche nach homologen Gensequenzen wurde mit dem Fasta-Programm in der EMBL™-Datenbank durchgeführt.

Tabelle 2: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der reversen Northern-Dot-Blot-Analysen und der Homologie-Suche. Es sind jeweils die Gensequenzen angegeben, die den höchsten Grad an Homologie mit den cDNA Fragmenten aufwiesen (n.d. = nicht untersucht).

Klon	Primer	Größe [bp]	Dot Blot	BCC	Homologie	Zugangsnummer
				ges. Haut		
BK1	C25	500	A1	4,15	H.s. mRNA für „ras-related botulinum toxin substrate“ <i>rac</i> 99% in 476 nt	M29870
BK2	C25	350	A2	3,86	H.s. mRNA-Klon HUR 8 100% in 350 nt	X98206
BK3	C25	300	A3	2,39	H.s. mRNA-Klon aus Parathyroidtumor NbHPA 100% in 241 nt	AA844017
BK4	C25	280	A4	1,38	H.s. mRNA-Klon aus Fetus Nb2HF8, 100% in 240	AI056685
BK5	A10	400	A5	4,8	H.s. DNA-Klon CTD-2631K10 von Chromosom 5, 69% in 385 nt	AC035140
BK6	A10	350	A6	> 10	H.s. DNA-Klon RP11-69C17 von Chromosom 10, 67% in 153 nt	AL441943
BK7	A10	320	B1	3,47	H.s. mRNA-Klon DKFZp434A1810, 99% in 319 nt	AL137741
BK8	C10	500	B2	> 10	H.s. DNA-Klon RP11-409J23 von Chromosom 13, 76% in 384 nt	AL442126
BK9	C10	500	B3	> 10	H.s. DNA-Klon RP11-409J23 von Chromosom 13, 76% in 384 nt	AL442126
BK10	G10		B4	1,4	n.d.	
BK11	G10	530	B5	1	n.d.	
BK12	A13	800	B6	(5,4)	n.d.	
BK13	A13	800	C1	2,68	H.s. DNA-Klon BAC R-369C8 von Chromosom 14, 98% in 756 nt	AL359398
BK14	A13	500	C2	0,68	H.s. DNA-Klon 218J18 von Chromosom X, 98% in 454 nt	AL034370
BK15	C13	800	C3	2,51	H.s. DNA-Klon BAC R-369C8 von Chromosom 14, 97% in 698 nt	AL359398
BK16	C13	800	C4	n.d.	n.d.	
BK17	G13	800	C5	2,36	n.d.	
BK18	G13	800	C6	n.d.	n.d.	
BK19	A6	450	D1	0,75	n.d.	
BK20	A6	250	D2	1,29	n.d.	
BK21	C6	520	D3	0,72	H.s. mRNA für „ADP/ATP carrier-protein“ (ANT-2) 99% in 515nt	L78810
BK22	C6	500	D4	1,33	n.d.	
BK23	C6	450	D5	1,29	n.d.	
BK24	C6	380	D6	2,97	H.s. DNA-Klon RP11-481F7 von Chromosom 10, 99% in 372nt	AL603717
BK25	C6	380	E1	1,49	H.s. DNA-Klon 112K5 von Chromosome X, 80 in 383 nt	Z85987
BK26	C6	300	E2	3,14	H.s. DNA-Klon RP1-104D1 von chromosome 6, 100% in 111 nt	AL159164
BK27	C6	250	E3	2,29	n.d.	
BK28	G6		E4	3,04	H.s. BAC-Klon RP11-570H18 von Chromosom 7, 99% in 642 nt	AC073114
BK29	G6	600	E5	> 10	H.s. BAC-Klon RP11-150C16 100% in 221 nt	AC046129
BK30	G6	580	E6	0,8	n.d.	

Klon	Primer	Größe [bp]	Dot Blot	BCC ges. Haut	Homologie	Zugangsnummer
BK31	G6	580	F1	> 10	H.s. PAC-Klon 260J9 auf Chromosom X, 75% in 215 nt	Z82193
BK32	G6	550	F2	1,5	n.d.	
BK33	G6	500	F3	n.d.	n.d.	
BK34	G6	450	F4	n.d.	n.d.	
BK35	G6	380	F5	1,3	n.d.	
BK36	G6	380	F6	0,69	n.d.	
BK37	A29	400	I1	0,47	H.s. mRNA für "high affinity IgE" 99% in 368 nt	X06948
BK38	A29	400	I2	0,47	H.s. mRNA für „immunoglobulin receptor alpha chain“ 98% in 368nt	L14075
BK39	A29	320	I3	0,46	H.s. mRNA für Ubiquitin Hydrolase, 99,7% in 316 nt	X98296
BK40	C29	420	I4	0,54	n.d.	
BK41	C29	400	I5	0,6	H.s. mRNA für Antigen NY-CO-25, 98% in 158 nt	AF039695
BK42	C29	350	I6	1,28	n.d.	
BK43	C29	300	J1	0,2	H.s. mRNA-Klon HSI01193 100% in 283 nt	AK026208
BK44	C29	300	J2	0,59	n.d.	
BK45	C29	250	J3	n.d.	n.d.	
BK46	G29	620	J4	0,62	n.d.	
BK47	G29	600	J5	0,61	n.d.	
BK48	G29	580	J6	0,63	n.d.	
BK49	G29	350	K1	0,82	n.d.	
BK50	G29	320	K2	0,59	n.d.	
BK51	G29	300	K3	0,53	n.d.	
BK52	A6	650	K4	0,54	n.d.	
BK53	C6	320	K5	0,29	H.s. mRNA für Ubiquitin Hydrolase, 99,7% in 316 nt	X98296
BK54	C6	650	K6	0,79	n.d.	

3.2. Analysen der differentiellen Expression des BCC-assoziierten Gens für das heterogene-nukleäre-RNA-bindenden Protein D0 (hnRNP D0)

Die differentielle Expression des heterogene-nukleäre-RNA-bindenden Proteins D0 (hnRNP D0) wurde auf transkriptioneller Ebene bereits in meiner Diplomarbeit untersucht (Welss, 1997). Dabei wurde eine BCC-assoziierte Induktion und eine transiente Repression nach UVB-Bestrahlung in der HaCaT-Zelllinie mittels DDRT-PCR- und Northern-Blot-Analysen nachgewiesen. Die hier durchgeführten Untersuchungen der Expression auf Ebene der Proteine sollen weitere Erkenntnisse über die Assoziation von hnRNP D0 an pathologischen Prozessen maligner Tumoren der Epidermis liefern.

3.2.1. Western-Blot-Analysen zur Expressionsstudie von hnRNP D0 in BCC und gesunder Haut

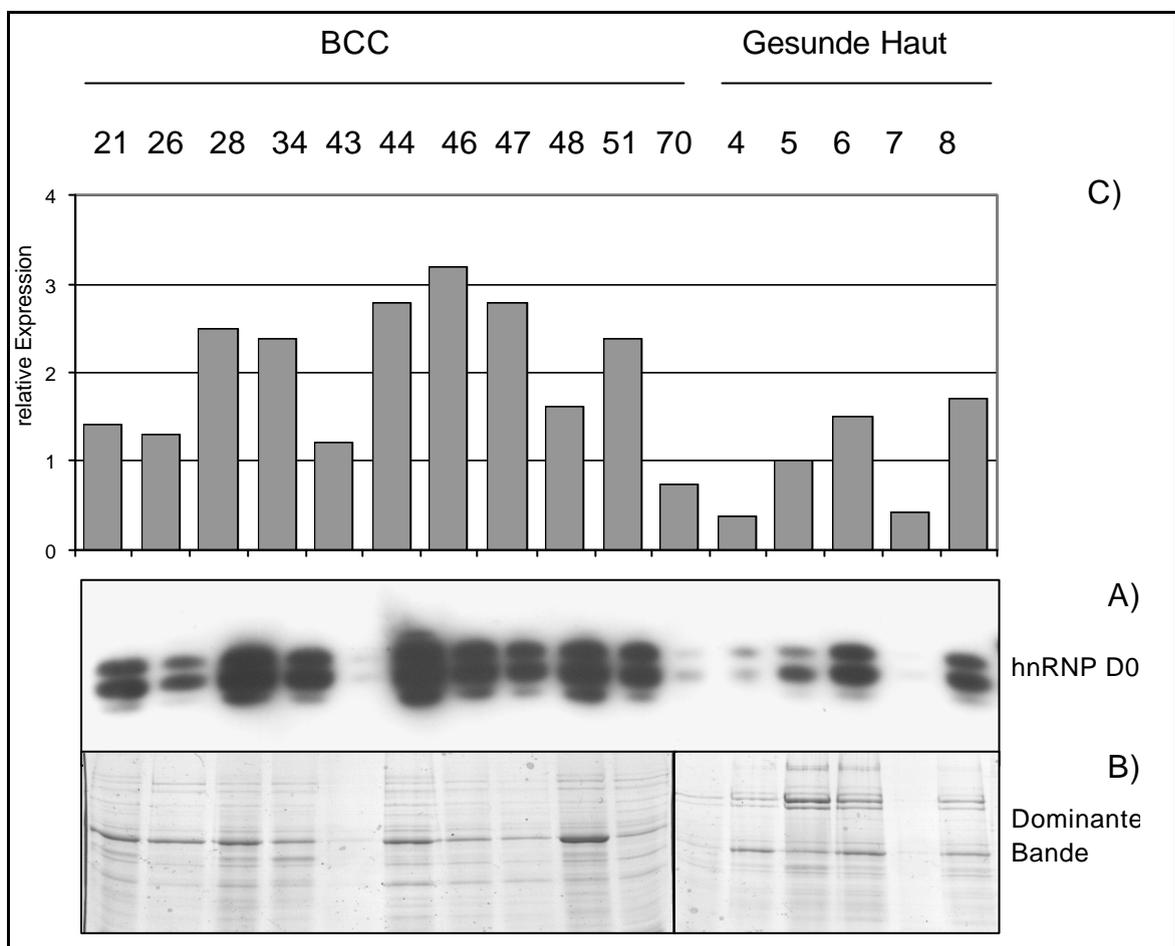


Abbildung 5: A) Western-Blot-Analyse zur Expression von hnRNP D0 in BCC und gesunder Haut. Je 10 µg Gesamt-Protein wurden mittels SDS-PAGE größensepariert und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation mit Maus-anti-human-hnRNP D0-Antikörpern wurden die gebundenen Antikörper durch einen HRP-konjugierten IgG-anti-Maus-Antikörper und nachfolgenden Umsatz des Chemilumineszenz-Substrates detektiert. B) „Coomassie blue“-Färbung der aufgetrennten Proteine. Die dominante Bande wurde zur Standardisierung der aufgetrennten Proteinmengen herangezogen. C) Grafische Darstellung der differentiellen Expression von hnRNP D0. Probe 8 der gesunden Haut wurde 100% gleichgesetzt und die standardisierten Signale der Western-Blot-Analyse darauf bezogen.

Durch diese Western-Blot-Analyse konnten 3 Isoformen von hnRNP D0, mit Molekulargewichten von 37 kDa, 40 kDa und 42 kDa detektiert werden. Der Vergleich der Signalstärken zeigt, dass hnRNP D0 in der Mehrzahl der untersuchten BCC im Gegensatz zur gesunden Haut überexprimiert wird. Besonders große Proteinmengen waren in den BCC 44, 46, 47 nachweisbar.

3.2.2. Immunhistologische Untersuchung der hnRNP D0-Expression in BCC

Um die Expression von hnRNP D0 in BCC auf Einzelzellebene untersuchen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffin-fixierten Hautschnitten in Zusammenarbeit mit der histologischen Abteilung der Hautklinik durchgeführt.

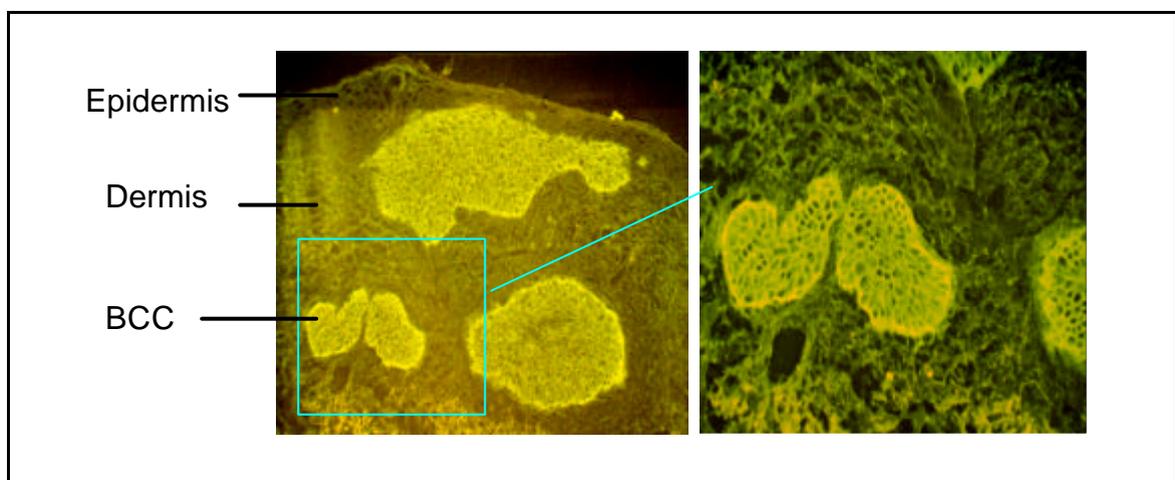


Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Analysen zur Expression von hnRNP D0 in BCC. Paraffin-fixierte Schnitte von BCC wurden mit einem Maus-anti-human-hnRNP D0-Antikörpern inkubiert und die gebundenen Antikörper durch einen FITC-konjugierten-anti-Maus-Antikörper detektiert. Die immunhistologischen Schnitte wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und fotografiert.

Durch Antikörperdetektion wurden in den invasiv wachsenden BCC-„Inseln“ grosse Mengen des hnRNP D0- Proteins detektiert. Es ist erkennbar, dass die Expression des zytoplasmatisch lokalisierten Proteins in den palisadenartig angeordneten peripheren Zellen des Tumors am höchsten war. In der gesunden Dermis und Epidermis wurden hingegen geringe Proteinmengen detektiert.

3.3. Transkriptionelle Analysen des neuen Serinprotease-Inhibitors Hurpin

Der Serinprotease-Inhibitor Hurpin wurde 1997 erstmalig von unserer Arbeitsgruppe kloniert und als UV-reprimierbares Serpin beschrieben (Abts *et al.*, 1997). Hierbei konnte durch Northern-Blot-Analysen in HaCaT-Zellen eine transiente Repression der Hurpin mRNA Menge nach UVB-Bestrahlung nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die differenzielle Expression von Hurpin in UV-induzierten Tumoren der Haut untersucht. Des Weiteren sollte die gewebespezifische Expression von Hurpin näher analysiert werden.

3.3.1. Expression von Hurpin in Tumoren der Haut

Mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR-Analysen wurde die Expression von Hurpin in 10 unterschiedlichen BCC, 2 SCC, 7 Proben aus gesunder Haut, HaCaT und NHK mit Hurpin-spezifischen Primern untersucht.

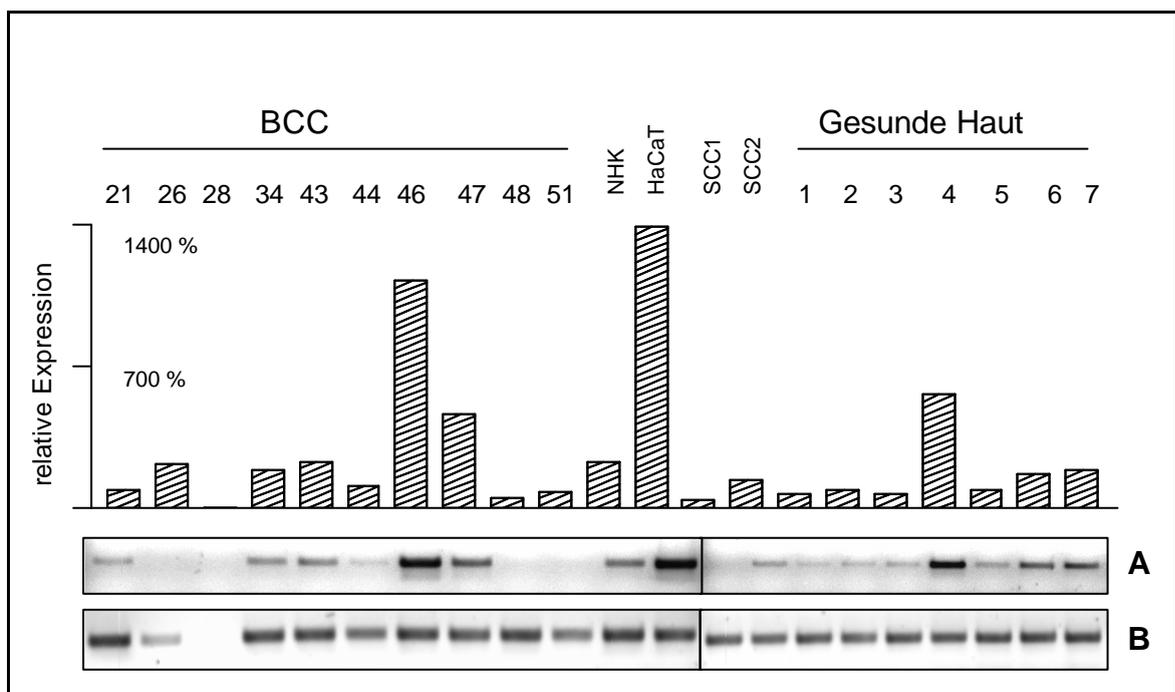


Abbildung 7: Inverse Darstellung des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels. Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Expression von Hurpin (A) in 10 BCC, 2 SCC, 7 Proben aus gesunder Haut, HaCaT und NHK. Die Gele wurden fotografiert und die Signalstärken der Banden densitometrisch ausgewertet. Diese Werte wurden entsprechend der Signale für β -Aktin (B) normalisiert. Zur grafischen Auswertung wurde die gesunde Haut Probe 7 mit 100% gleichgesetzt.

Vergleicht man die Signalstärken der einzelnen BCC mit dem Mittelwert der gesunde Haut Proben 1, 2, 3, 5, 6 und 7, so zeigt sich in 5 von 10 BCC eine Überexpression von Hurpin. In BCC 46 wird mit einer 10-fach größeren Transkriptmenge der stärkste Expressionsunterschied detektiert. Geringere Unterschiede werden in BCC 47 (5-fach), BCC 26 und 43 (2-fach) und BCC 34

(1,7-fach) nachgewiesen. In einem der untersuchten SCC wird eine leichte Induktion (1,2-fach) in dem anderen eine Repression (3-fach) nachgewiesen. Eine 12-fache Überexpression von Hurpin wird in der Zelllinie HaCaT detektiert, wohingegen in den hier untersuchten, kultivierten primären Keratinozyten eine 2-fach erhöhte Transkription vorliegt.

3.3.2. Expression von Hurpin in verschiedenen SCC-Zelllinien

In SCC der Mundhöhle wurde von Nakashima *et al.* (2000) für Headpin eine Repression nachgewiesen. In Zusammenarbeit mit Frau Tanja Günther wurde die Hurpin mRNA-Menge in acht verschiedenen SCC-Zelllinien im Vergleich zu HaCaT bestimmt (Günther, 2001).

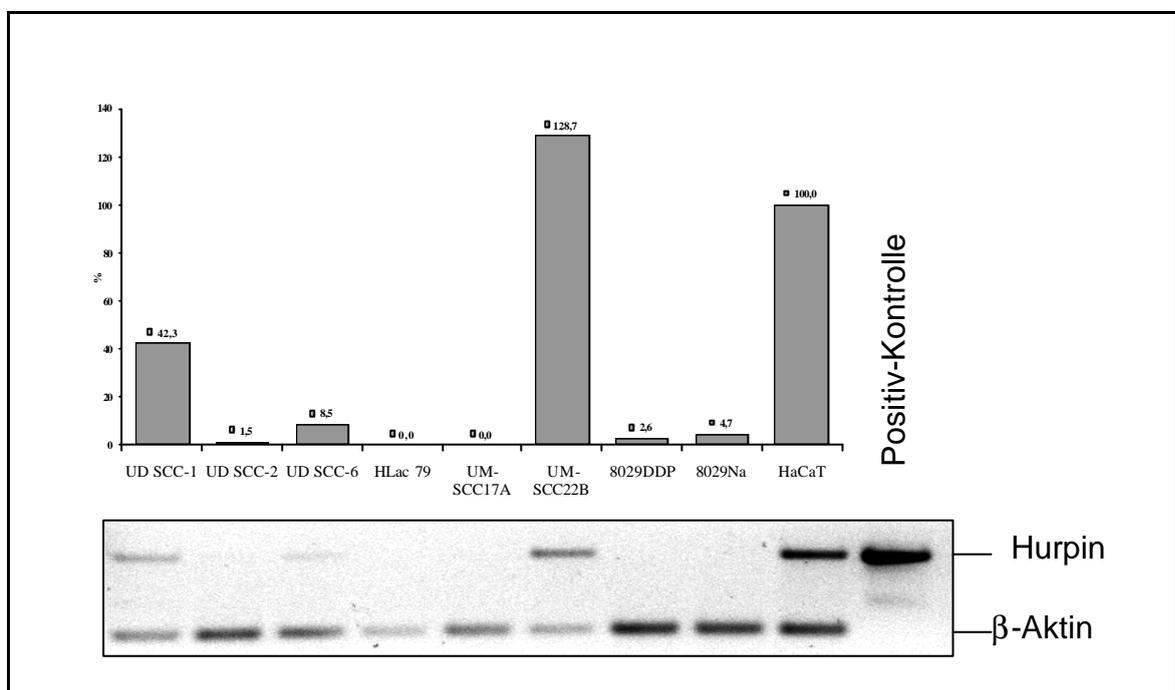


Abbildung 8: Inverse Darstellung des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Semiquantitative RT-PCR-Analyse zur Expression von Hurpin in 8 SCC-Zelllinien im Vergleich zu HaCaT. Das Gel wurden fotografiert und die Signalstärken densitometrisch ausgewertet. Diese Werte wurden entsprechend der Signale von β -Aktin normalisiert. Zur grafischen Auswertung wurde die Expression in HaCaT mit 100 % gleichgesetzt.

Abbildung 8 zeigt die Hurpin-Expression in den verschiedenen SCC-Zelllinien. In UD SCC-2, UD SCC-6, 8029DDP und 8029Na wurde im Vergleich zu HaCaT- Zellen ein Expression von weniger als 10% detektiert und in den Zelllinien HLac 79 und UM-SCC17a konnte keine messbare Expression von Hurpin nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte für die Zelllinien UD SCC-1 und UM-SCC22B ein Hurpin-Expression von etwa 40%, bzw. 130% der Expression in HaCaT gezeigt werden.

3.3.3. Expression von Hurpin in verschiedenen humanen Geweben

Mittels RT-PCR-Analysen mit RNA aus verschiedenen humanen Geweben sollten Daten über die gewebespezifische Expression von Hurpin generiert werden. Dabei sollte das von Abts *et al.* (1999) mittels „multiple tissue“ Northern-Blot-Analysen untersuchte Expressionsspektrum erweitert werden.

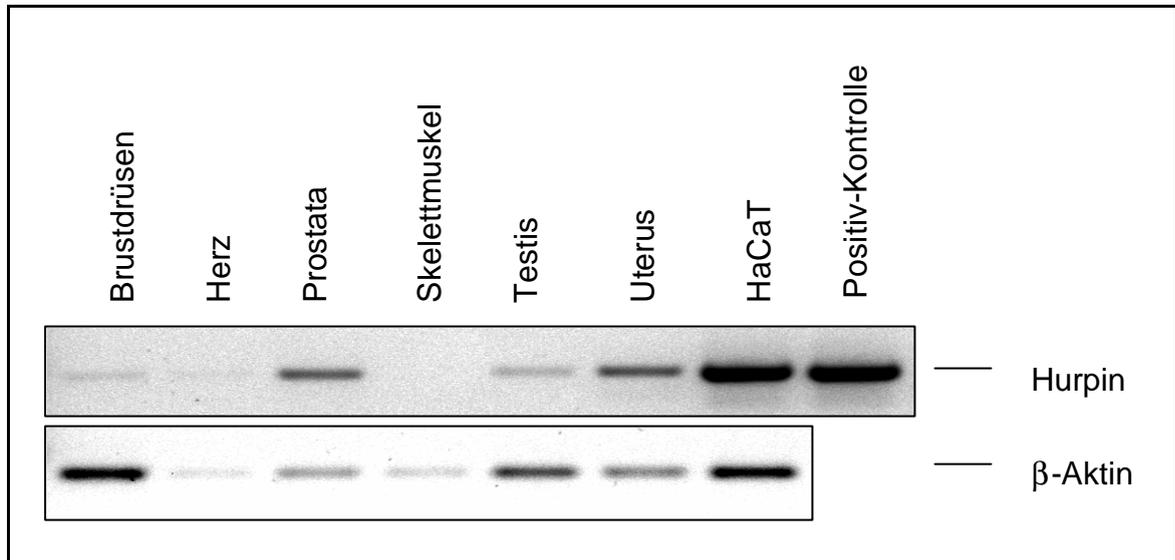


Abbildung 9: Inverse Darstellung des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. RT-PCR zur Expression von Hurpin in verschiedenen humanen Geweben. Je 1 µg Gesamt-RNA wurde in cDNA reverse transkribiert und die Hurpintranskripte mittels PCR unter Verwendung von 50 ng cDNA und des HP -1/2 Primerpaares amplifiziert.

Die stärkste Expression wurde in HaCaT festgestellt. Schwächere Signale wurden in Uterus- und Prostatagewebe detektiert. In Testis-, Brustdrüsen- und Herzgewebe wurde Hurpin schwach exprimiert. Keine Transkripte konnten in Skelettmuskel festgestellt werden.

3.4. Isolierung und Charakterisierung des Gens für Hurpin

3.4.1. Isolierung des genomischen Klon für Hurpin

Zurückgreifend auf eine kommerziell erhältliche, genomische DNA-Bibliothek konnten Klone des Hurpingens isoliert werden. Diese Bibliothek ist in $1,44 \times 10^5$ DNA-Fragmente unterteilt, welche auf Nylonmembranen immobilisiert wurden. Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten cDNA voller Länge von Hurpin wurden 8 Hybridisierungssignale detektiert.

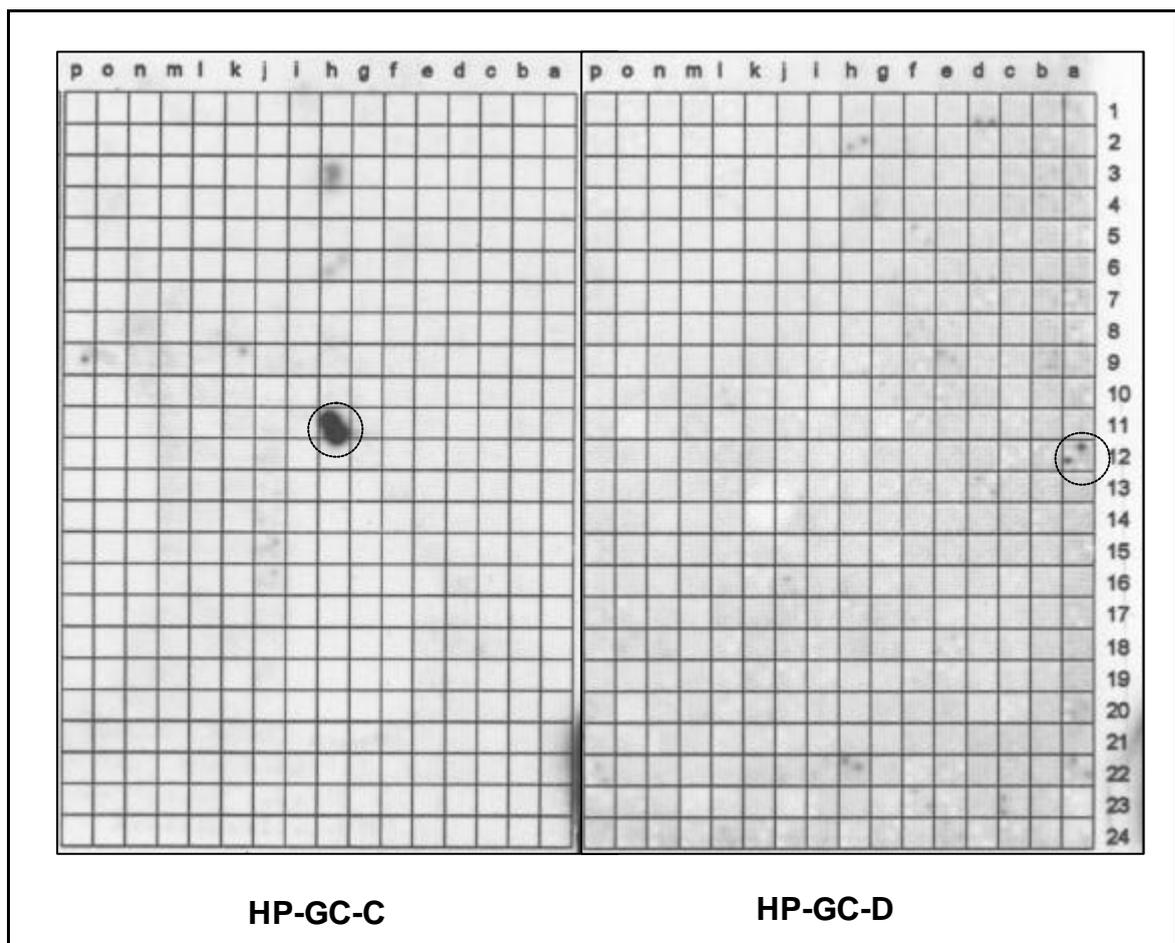


Abbildung 10: Southern-Dot-Blot-Analyse zur Detektion des genomischen Hurpin-Klons. Untersuchung der humanen, genomischen DNA-Bibliothek mit radioaktiv markierter volle-Länge-cDNA von Hurpin. Exemplarisch sind Hybridisierungen zweier Membranen gezeigt, durch die die genomischen Klone HP-GC-C und HP-GC-D identifiziert wurden.

4 der in P1 Phagen-DNA klonierten DNA-Fragmente, welche starke bis mittlere Hybridisierungssignale aufwiesen, wurden käuflich erworben. Diese Klone wurden im folgenden durch Southern-Blot-Analysen auf das Vorhandensein des Hurpingens untersucht.

3.4.2. Verifizierung der positiven P1-Klone mittels Restriktionsspaltung und Southern-Blot-Analyse

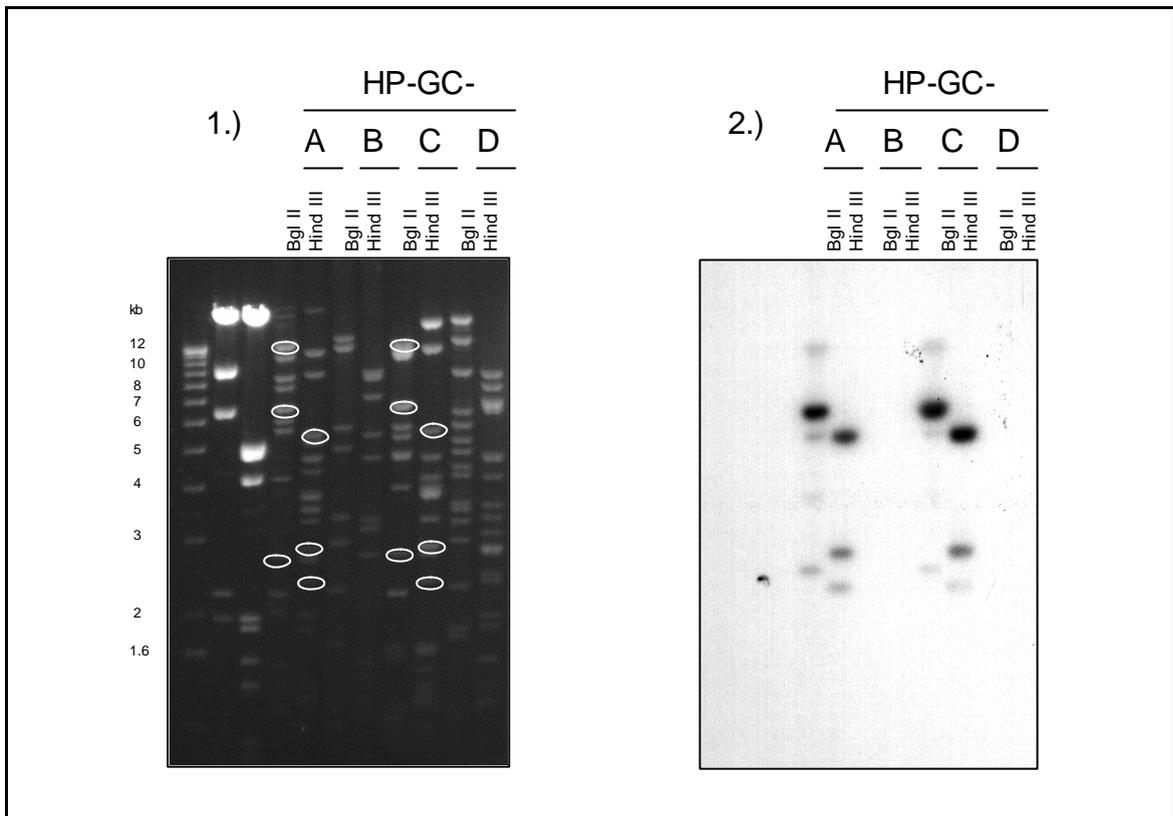


Abbildung 11: Southern-Blot-Analyse zur Bestätigung der Hurpin-P1-Klone. 1.) Ethidiumbromid-gefärbtes 1%-iges Agarosegel. Aufgetrennt sind je 10 µg der mit Bgl II oder Hind III gespaltenen genomischen Klone HP-GC-A, -B, -C, -D. Die eingefügten weissen Markierungen zeigen Übereinstimmungen im Bandenmuster. 2.) Autoradiogramm der Southern-Blot-Analyse. Die fragmentierte DNA wurde aus dem Agarosegel (1.) auf eine Nitrocellulose-Membran überführt und gegen die radioaktiv-markierte cDNA voller Länge von Hurpin hybridisiert.

Die Southern-Blot-Analyse bestätigte das Vorhandensein von Hurpin in 2 der 4 untersuchten P1-Klone. Im folgenden wurde der Klon HP-GC-C in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. H. F. Abts sequenziert. Die Sequenzanalysen ergaben für das Hurpingen eine Grösse von 12.253 Basenpaaren. Die computerunterstützte Suche nach konservierten Intron/Exon-Übergängen zeigte, dass das Gen für Hurpin aus 8 Exons und 7 Introns aufgebaut ist.

3.4.5. Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts

Um den exakten Transkriptionsstartpunkt (TSS) identifizieren zu können, wurden Primerextensions-Experimente mit dem Primer GSP1 und Gesamt-RNA aus Keratinozyten und Uterusgewebe durchgeführt. Als Größenmarker wurde Plasmid-DNA mit bekannter Basenfolge sequenziert und parallel analysiert.

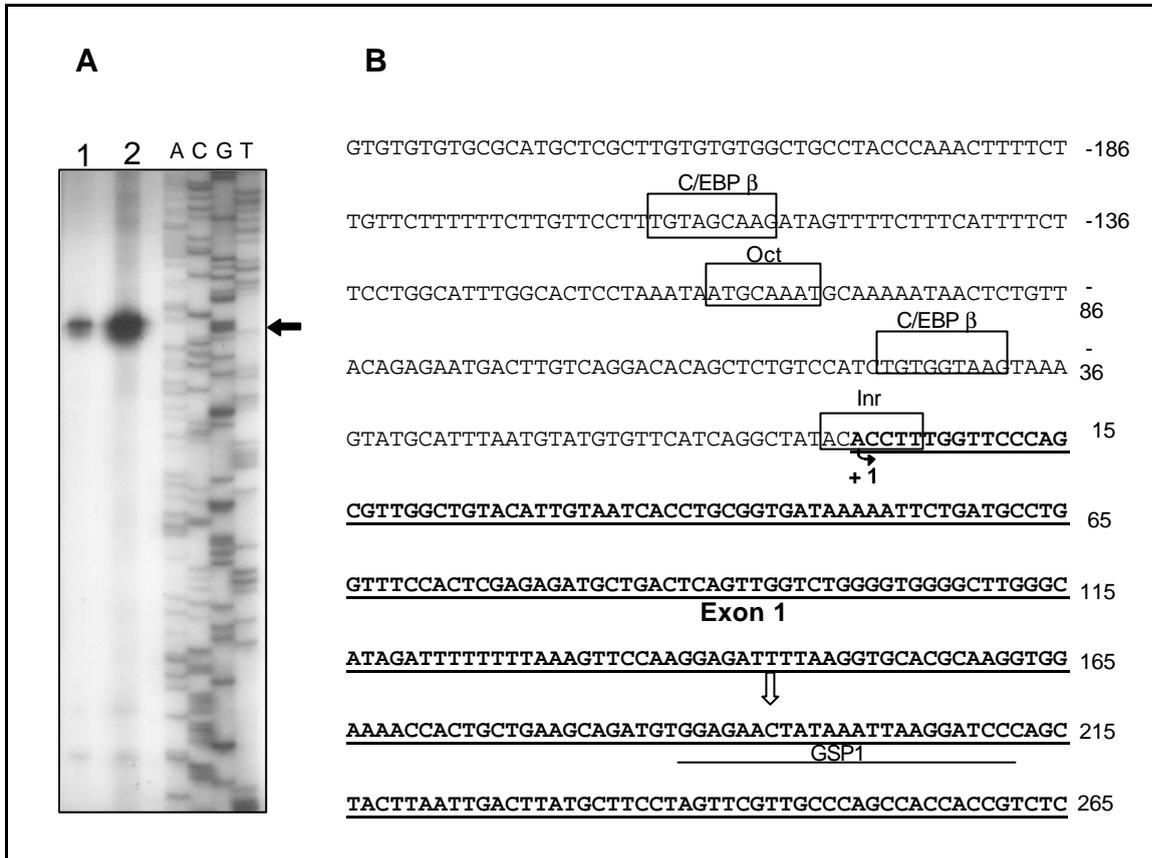


Abbildung 12: Analyse des TSS durch Primerextension. A.) Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Auftrennung der Primerextensions-Reaktionen und der Sequenzreaktion. Gesamt RNA aus HaCaT (1) und Uterus (2) wurde mit Primer GSP 1 hybridisiert. Der Primer wurde durch M-MLV Reverse Transkriptase verlängert und durch Einbau von [α - 32 P] dCTP radioaktiv markiert. B.) Darstellung des 5'-cDNA Endes und der benachbarten Promotorregion. Exon 1 ist in fetten Lettern und unterstrichen. Die Position des GSP 1-Primers ist durch einen horizontalen Pfeil angegeben. Der dominante Startpunkt der Transkription ist durch den gebogenen Pfeil und die Bezeichnung +1 markiert. Die Sequenzen des möglichen Initiationspunktes und potentieller Promotor-Elemente sind eingerahmt.

Es wurde ein hauptsächlich verwendeter TSS 262 bp entfernt des GSP 1-Primers nachgewiesen (schwarzer Blockpfeil, Abb. A). Die Transkription der Hurpin mRNA startet somit mit Adenosin. Die unterschiedliche Stärke der beiden Signale geht auf verschieden starke Markierungsreaktionen zurück und nicht auf differenzielle Expression in den untersuchten Geweben. Es wurden zwei weitere schwächere Signale detektiert, die auf alternative, näher am 3'-Ende liegende Startpunkte oder vorzeitig terminierte Transkripte hinweisen. Es konnte keine konservierte TATA-Box in typischer Nähe des hauptsächlich

verwendeten TSS identifiziert werden. Allerdings besteht eine nahezu perfekte Übereinstimmung mit der Initiatorsequenz YYAN(T/A)YY (Zhang, 1998). Mit Hilfe dieser Daten konnte die theoretische Größe der Hurpin mRNA-Transkripte auf 3319 bp, bzw. 2865 bp festgelegt werden. Dies stimmt mit den mittels Northern-Blot-Analysen (Abts *et al*, 1997) bestimmten Größen von 3,4 kb und 3 kb gut überein.

3.5. Western-Blot-Analysen zur Spezifität der polyklonalen anti-Hurpin Antikörper

Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern sollte die Expression von Hurpin auf translationeller Ebene in pathologischen und physiologischen Situationen analysiert werden.

Dazu wurden 2 Kaninchen mit rekombinatem humanem Hurpin immunisiert. In diesem Falle war das rekombinante Hurpin in einem bakteriellen Expressionssystem synthetisiert worden. Die Immunisierung und die Tierhaltung wurden bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Nach Abschluss der Immunisierung wurde uns das Serum gesendet.

Die mittels ELISA (Daten nicht gezeigt) auf anti-Hurpin Antikörper getesteten Seren wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Spezifität der Immundetektion von Hurpin getestet. Aufgrund der hohen Homologien zwischen Serpinen und der dadurch möglichen Kreuzreaktion, wurden hier Western-Blot-Analysen mit 8 Serpinen und Hurpin durchgeführt.

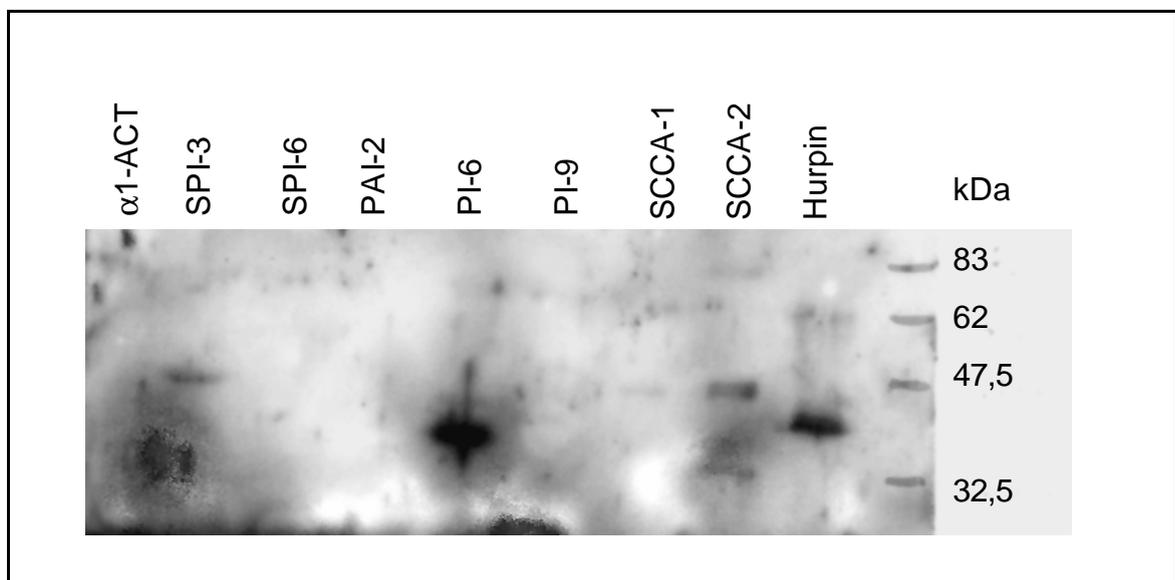


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Spezifität der polyklonalen anti-Hurpin Antikörper. Je 100 ng der angegebenen Serpine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Inkubation mit dem Kaninchen Serum wurden die gebundenen Antikörper durch einen HRP-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper und nachfolgenden Umsatz des Chemilumineszenz-Substrates durch einen Röntgenfilm detektiert.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die polyklonalen Antikörper rekombinantes Hurpin detektieren. Allerdings erkennen diese Antikörper auch Antigenstrukturen weiterer Serpine, wie das murine SPI-3, PI6 und SCCA 1 und 2. Eine weitere Verwendung der Antikörper zu spezifischen Analysen der Hurpin-Expression war somit ausgeschlossen, da PI6, SCCA 1 und 2 auch in Keratinozyten exprimiert werden und somit durch Kreuzreaktion die Ergebnisse verfälschen würden.

3.6. Biochemische Analysen von Hurpin

3.6.1. Expression und Aufreinigung von rekombinatem Hurpin

Die rekombinante Expression von Hurpin wurde auch in dem eukaryotischen System der Hefe *Pichia pastoris* durchgeführt. Nach Expression wurde Hurpin aus dem Hefe-Proteinlysate unter Verwendung zweier unterschiedlicher Matrices säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach jedem dieser Schritte wurde die Qualität des isolierten, rekombinanten Hurpinproteins mittels SDS-PAGE kontrolliert.

3.6.1.1. Aufreinigung mittels Metallaffinitäts-Chromatographie

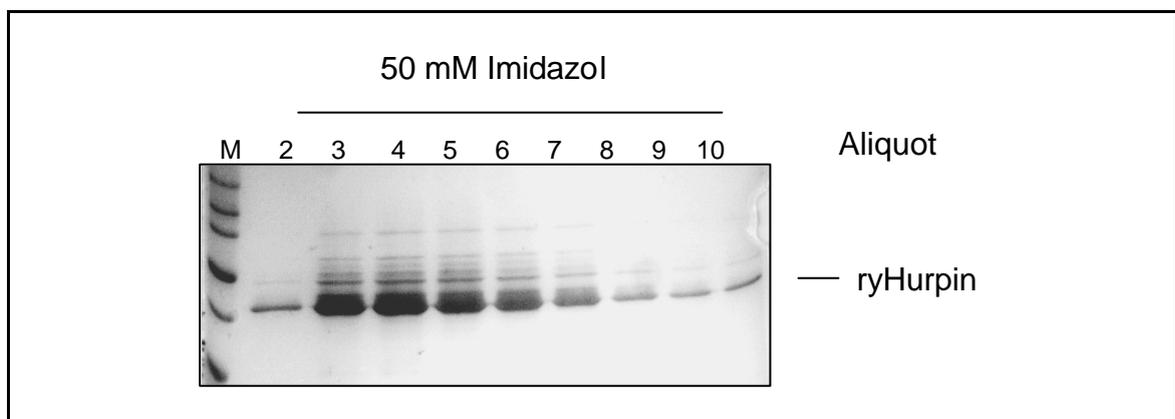


Abbildung 14: Kontrolle der Aufreinigung von Hurpin nach Metallaffinitäts-Chromatographie mittels Talon-Matrix. „Coomassie blue“ gefärbtes SDS-PAGE nach Auftrennung von je 18 μ l der Eluate in einem 12,5 %-igem PAA-Gel.

Abbildung 14 zeigt die typische Verteilung der Proteine nach Metallaffinitäts-Chromatographie. In Gegenwart von 50 mM Imidazol wird das His-„getaggte“ Hurpin-Fusionsprotein in den Aliquots 3 bis 9 eluiert.

3.6.1.2. Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie

Um möglichst reines Hurpinprotein zu isolieren, wurde mit der nachgeschalteten Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung von DEAE-Sepharose (pH 7,5) als Matrix ein weiteres Reinigungsverfahren angewendet.

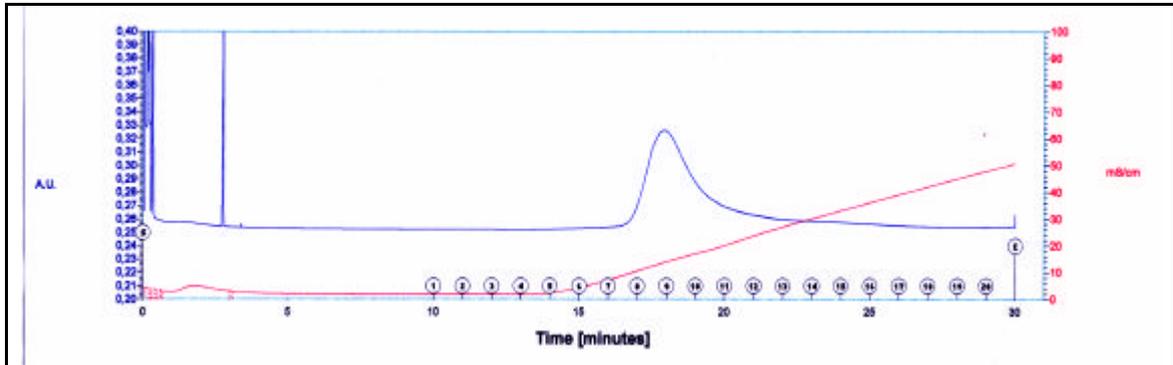


Abbildung 15: Elutionsprofil der Hurpin Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung der BioLogic (Bio-Rad) mit integrierten Messeinheiten für die UV-Absorption bei 280 nm (blaue Linie) und die Leitfähigkeit (rote Linie), welche sich durch steigende NaCl-Konzentrationen ändert. Die Stecknadel-Markierungen geben die einzelnen Aliquots wieder.

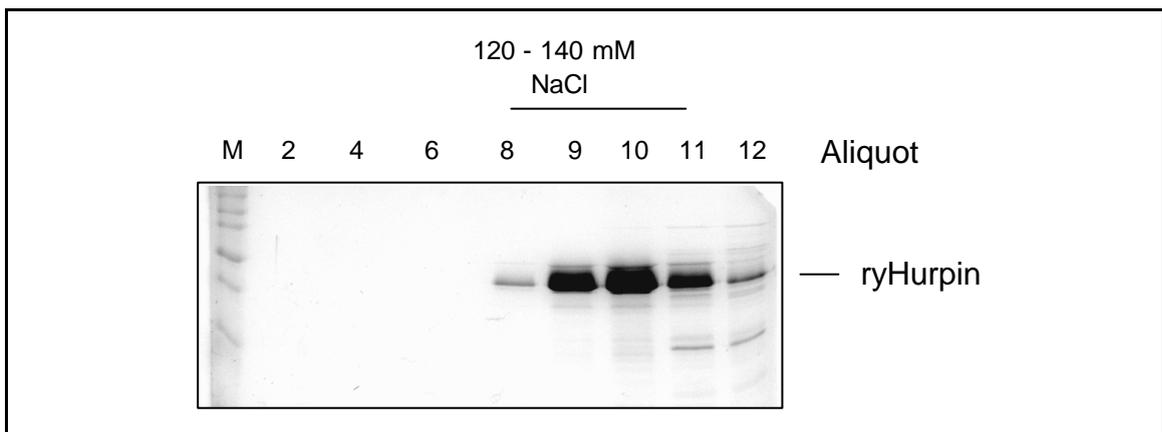


Abbildung 16: Kontrolle der Aufreinigung von Hurpin nach Ionenaustausch-Chromatographie. „Coomassie blue“ gefärbtes SDS-PAGE nach Auftrennung von je 18 µl des Eluats in einem 12,5 %-igen PAA-Gel.

Nach Elution des Proteins in Gegenwart eines steigenden NaCl-Gradienten (0 – 500 mM) werden die größten Mengen an reinem, rekombinantem Hurpin in den Fraktionen 9, 10 und 11 detektiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots in Gegenwart von 50 % Glycerin bei -20°C gelagert.

3.6.2. Transversale Harnstoffgradienten PAA Gel- Analyse (TUG-PAGE)

Aufgrund der tertiären Proteinstruktur stehen native, inhibitorische Serpine unter einer starken thermodynamischen Spannung. In Gegenwart von steigenden Harnstoffkonzentrationen kommt es zu einer Konformationsänderung mit einer charakteristischen Kinetik. Zur Überprüfung der Funktionalität des rekombinanten Hurpins wurde die für inhibitorische Serpine typische Konformationsänderung mit Hilfe von TUG-PAGE-Analysen untersucht.

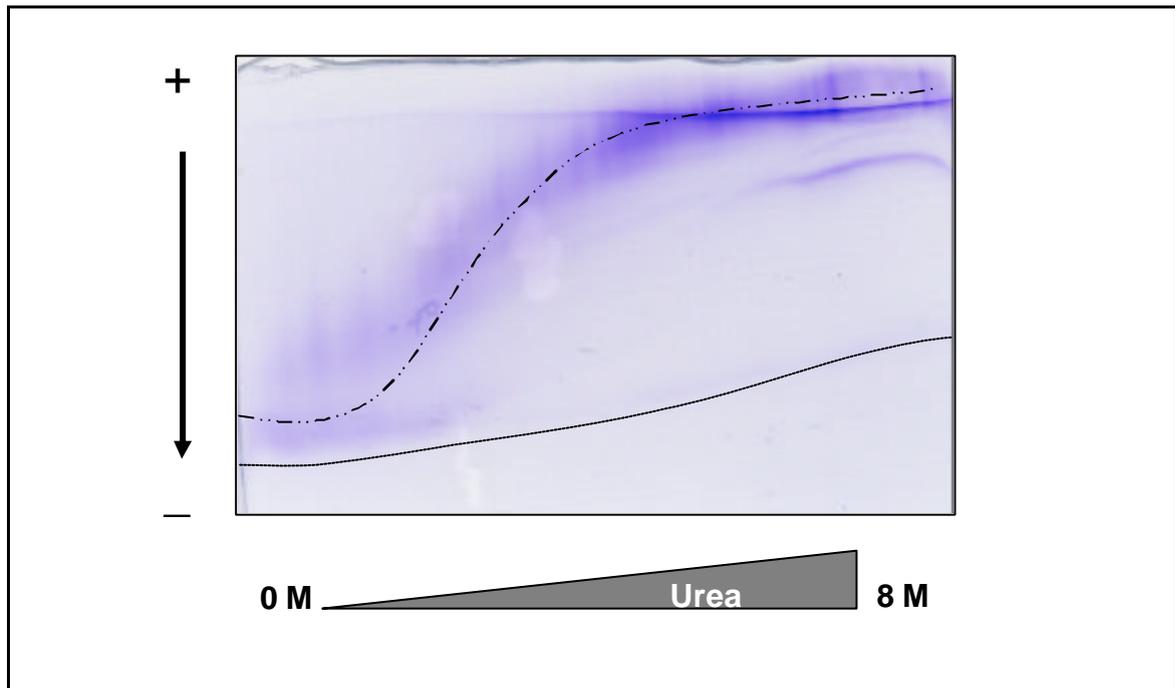


Abbildung 17: TUG-PAGE-Analyse. „Coomassie blue“ gefärbtes 12,5 %-iges PAA-Gel mit einem transversalen Harnstoffgradienten von 0 M (links) bis 8 M (rechts) Harnstoff. Aufgetragen sind 100 μg DEAE-gereinigtes rekombinantes Hurpin. Zur besseren Erkennung sind gestrichelte Kurvenlinie in die Darstellung eingearbeitet worden.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß Hurpin in Gegenwart von weniger als ca. 2 M Harnstoff in seiner nativen Form vorliegt. In dem Bereich von ca. 2 bis ca. 4 M Harnstoff erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, was zu einer zunehmenden Retardierung im Gel führt. Oberhalb einer Konzentration von ca. 4 M Harnstoff liegt Hurpin komplett in der relaxierten, thermodynamisch stabileren Konformation vor (gestrichelte, obere Linie). Die gepunktete untere Linie zeigt das Laufverhalten eines kontaminierenden Proteins oder von latentem, nicht funktionellem Hurpin.

3.6.3. Isolation und Identifizierung der P1-P1'- Schnittstelle

Für die Inhibition von Proteasen durch Serpine ist die Aminosäuresequenz an der P1-P1'- Schnittstelle von großer Bedeutung, denn dort wird der „reactive site loop“ (RSL) von der Zielprotease hydrolysiert und der inhibitorische Mechanismus initiiert. Wie von Abts *et al.* (1999) mittels Hurpin-Protease-Interaktions-Assays gezeigt, führt die Inkubation von Hurpin mit Cathepsin (Cat) L zu einem verkürzten Hurpinprotein. Durch die Isolation des kleineren, abgeschnittenen Fragments des RSL und anschließende Analyse der Aminosäuresequenz sollte die P1-P1'- Schnittstelle von Hurpin bestimmt werden.

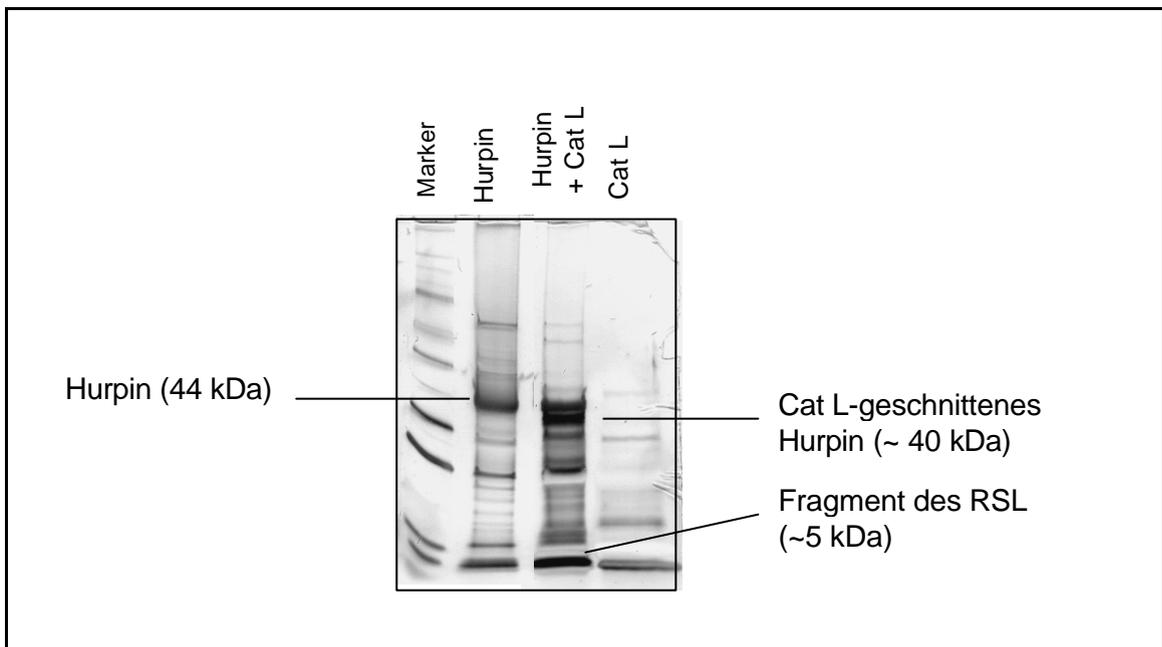


Abbildung 18: Silbergefärbtes SDS-PAA Gradienten-Gel (5- 20 %). Kontrolle der Hurpin Cat L-Interaktion. Aufgetragen sind Hurpin, Hurpin nach Inkubation mit Cat L und Cat L.

Nach Inkubation mit Cat L wurden ein um ca. 5 kDa verkürztes Hurpin und eine grössere Menge eines 5 kDa kleinen Proteins detektiert. Bei dem hier verwendeten Hurpin handelt es sich um ein mittels Metallaffinitäts-Chromatographie aufgereinigtes rekombinantes Hurpin. Das kleine Fragment wurde in Kooperation mit Prof. Phil I. Bird und Dr. Juiro Sun (Monash-University, Clayton, Australien) mittels „reversed phase chromatography“ aus dem Reaktionsansatz isoliert und die Aminosäuresequenz durch Massenspektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse der massenspektroskopischen Untersuchung zeigten, dass Cat L Hurpin zwischen den Aminosäuren Thr³⁵⁶ und Ser³⁵⁷ hydrolysiert (persönliche Mitteilung von Prof. P. I. Bird).

3.6.4. Expression von gezielt mutiertem Hurpin

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Inhibition von Proteasen durch Hurpin wurden drei Mutationen nach der Methode von Deng und Nickoloff (1992) in Hurpin eingeführt. Bei diesen ausgewählten Mutationen handelt es sich um Veränderungen, die einen entscheidenden Eingriff in den Mechanismus von Hurpin haben sollten.

Tabelle 3 listet die gezielt eingeführten Mutationen auf. Die verwendete P-Nomenklatur der Aminosäuren basiert auf der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967).

Klon	Mutation	Aminosäure-Sequenz
<i>P-Nomenklatur</i>		<i>P17 P14 P1=P1'</i>
Wildtyp-Hurpin (HPwt)	---	³⁴⁰ EEGTEAAAATGIGFTVT=SAPGH ³⁶¹
HP 501	³⁴³ Thr nach ³⁴³ Arg	³⁴⁰ EEG R EAAAATGIGFTVT=SAPGH ³⁶¹
HP 502	³⁵⁶ Thr nach ³⁵⁶ Ala	³⁴⁰ EEGTEAAAATGIGFTV A =SAPGH ³⁶¹
HP 503	ΔCD interhelikaler Loop	Deletion

Die eingeführten Mutationen waren vor Transformation der Konstrukte in *Pichia pastoris* durch Sequenzanalysen verifiziert worden.

3.6.5. Auswahl von transformierten Hefeklonen mit stabil integrierten Hurpinmutationen

Von jedem Mutationsansatz wurden 10 Hefeklone auf stabile Integration des kodierenden Bereichs von Hurpin mit Hilfe von Southern-Dot-Blot Analysen untersucht.

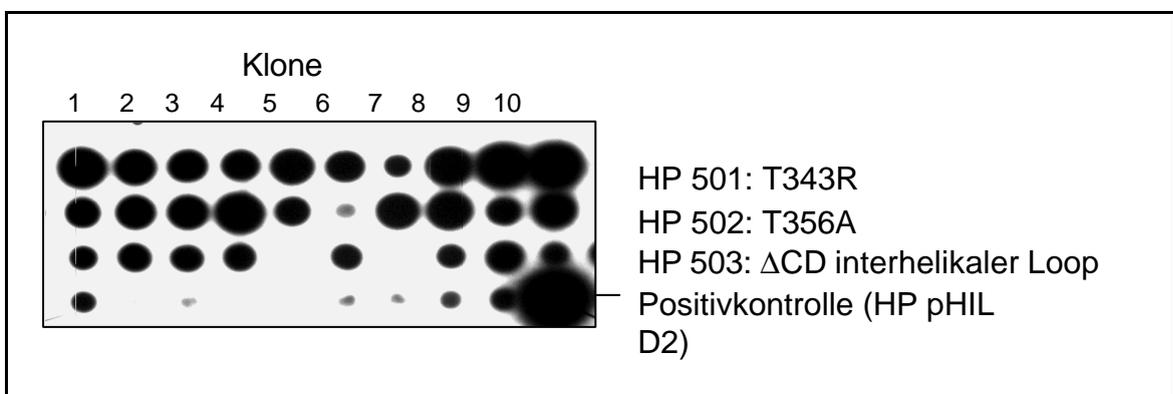


Abbildung 19: Southern-Dot-Blot-Analyse. Je 500 ng der isolierten Hefe-DNA wurden auf einer Nylonmembran immobilisiert. Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Hurpin cDNA voller Länge wurden die Signale mit einem Röntgenfilm detektiert.

Mit drei Ausnahmen zeigten alle untersuchten Hefeklone Hybridisierungssignale. Die unterschiedlich starken Signale können dabei auf die Häufigkeit der Integration von Hurpin in das Hefegenom hinweisen.

Um sicher zu stellen, daß die volle Länge des kodierenden Bereichs im Hefegenom integriert worden war, wurde im folgenden der kodierende Bereich von Hurpin mittels PCR aus der Hefe-DNA amplifiziert. Hierzu wurden Primer verwendet, welche die Insertionsstelle von Hurpin im verwendeten Expressionsvektor pHIL D2 flankieren.

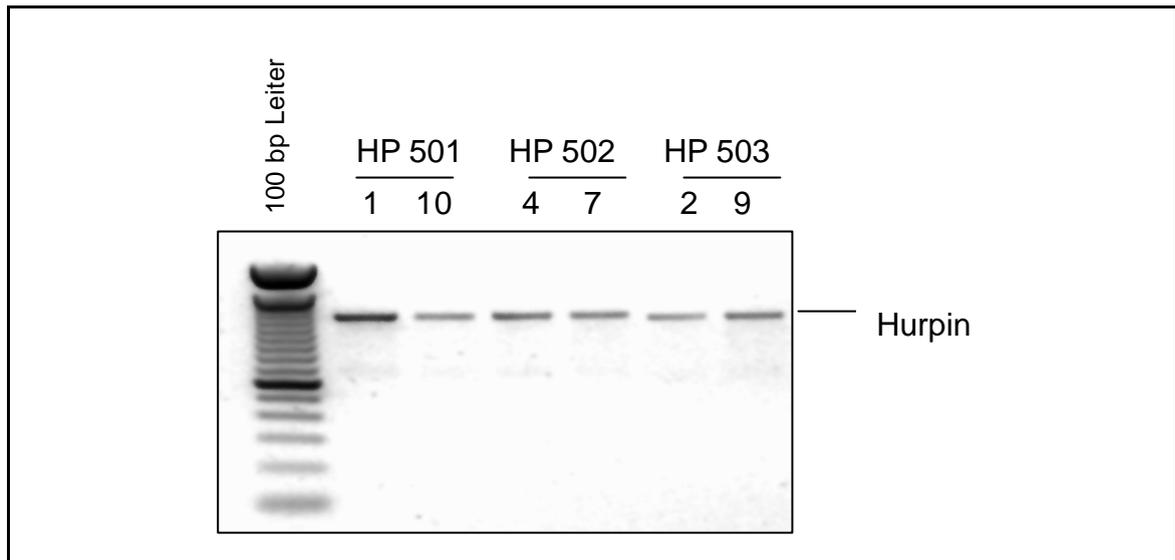


Abbildung 20: Inverse Darstellung des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels. PCR zur Analyse der Integration von Hurpin in Hefe-DNA.

Die untersuchten DNAs der Hefeklone zeigten alle die Integration der cDNA voller Länge von Hurpin (ca. 1200 bp), wobei die Amplifizierung der Deletionsmutante (HP 503) ein kleineres Produkt ergibt. Durch nachfolgende Sequenzanalysen konnten alle untersuchten Klone als gezielt mutiert verifiziert werden.

3.7. Inhibition von Cysteinproteasen durch Hurpin

Vergleichende Sequenzanalysen der für die Inhibition entscheidenden exponierten Schleife (RSL) und im speziellen der Gelenkregion von Hurpin mit anderen inhibitorischen Serpinen wiesen auf ein inhibitorisches Potenzial von Hurpin hin.

In Vorversuchen konnten Interaktionen zwischen Serinproteasen und dem RSL von *in vitro* translatiertem Hurpin gezeigt werden. (Abts *et al*, 1999). Ebenfalls wurden Interaktionen zwischen Hurpin und Cysteinproteasen detektiert.

In Kooperation mit der australischen Serpin-Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. P. I. Bird in Clayton wurde die inhibitorische Kapazität von Hurpin gegenüber Cysteinproteasen untersucht. Innerhalb dieser Kooperation konnte die Inhibition der lysosomalen Protease Cat L, welche aus Lebergewebe von Ziegen gewonnen war, durch Hurpin gezeigt werden.

Aufbauend auf diesen Hinweisen wurden in der vorliegenden Arbeit kinetische Analysen der Inhibition von humanem Cat L und Cat B durch Hurpin und die Hurpin-Mutanten durchgeführt.

3.7.1. Bestimmung der proteolytischen Aktivität der humanen Cathepsine B und L

Zur Bestimmung der tatsächlichen proteolytischen Aktivität des kommerziell erworbenen Cat B und Cat L wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen des synthetischen Cysteinprotease-Inhibitors E-64 inkubiert. In äquimolaren Konzentrationen inhibiert E-64 Cat B und Cat L vollständig. Nach beendeter Inkubation wurde die proteolytische Aktivität der nicht inhibierten Protease durch Umsatz des Fluoreszenzsubstrates N-CBZ-Phe-Arg-AFC nachgewiesen.

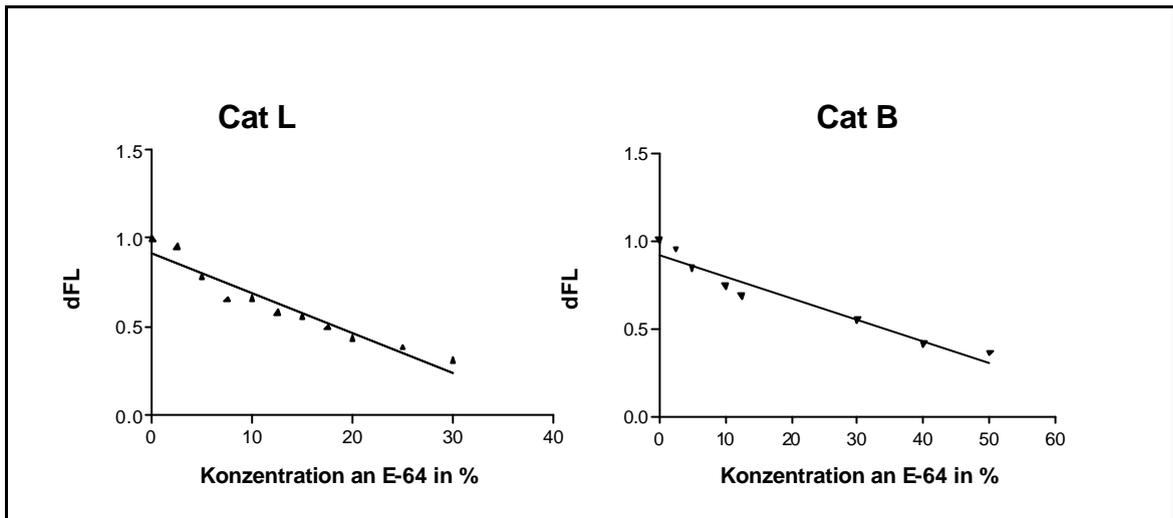


Abbildung 21: Grafische Darstellung der Aktivitätsbestimmung von Cat B und Cat L. Verschiedene Konzentrationen an E-64 wurden mit gleichbleibenden Konzentrationen von Cat L und Cat B inkubiert. Die proteolytische Aktivität der nicht inhibierten Cathepsine wurde durch Umsatz des Fluoreszenzsubstrates bei Exc. 355 nm, Em. 460 nm gemessen. Die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit der Zeit (dFI) wurde gegen die unterschiedlichen Verhältnisse der Konzentrationen E-64/Cathepsin [%] aufgetragen. Die Gerade wurde durch lineare Regression errechnet. Der Schnittpunkt der Geraden an der X-Achse gibt die tatsächliche Aktivität der Protease in Prozent an.

Die Aktivitätsbestimmung ergab für humanes Cat L eine tatsächliche proteolytische Aktivität von 40 % und für Cat B eine von 75 % im Vergleich zu den Angaben der Hersteller (100%). In den folgenden Inhibitionsassays wurden die geringeren Aktivitäten berücksichtigt.

3.7.2. Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) von humanen Cysteinproteasen durch Hurpin

Der SI-Wert gibt das molare Verhältnis wieder, bei dem ein Inhibitor die entsprechende Protease inhibiert ($[Inhibitor] / [Protease]$). Somit gibt dieser Wert Auskunft darüber, ob die Reaktion zur stabilen Komplexbildung führt oder ob der Inhibitor von der Protease als Substrat benutzt wird. Theoretisch wird die Inhibition von Proteasen durch stabile Komplexbildung mit dem Serpin in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 erreicht.

Zur Bestimmung des SI-Wertes wird nach Inkubation der Protease mit verschiedenen Konzentrationen an Hurpin die restliche Proteaseaktivität gemessen.

3.7.2.1. Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) von humanem Cat B durch Hurpin

Hier wurden die SI-Werte der Inhibition von Cathepsin B, einer Cysteinprotease des Papain-Typs, durch das Wildtyp Hurpin (HP wt) und die Hurpin-Mutante HP 502 bestimmt.

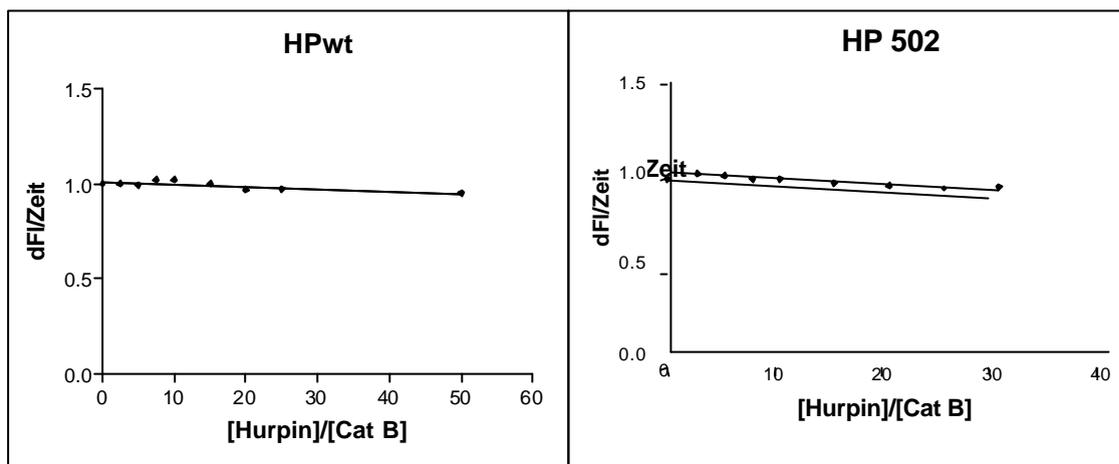


Abbildung 22: Bestimmung der SI-Werte von HP wt und der Hurpinmutante HP 502 gegenüber humanem Cat B. Prä-aktiviertes Cat B wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von HP wt und HP 502 für 45 Minuten bei 37°C in Cat L-Puffer inkubiert. Die proteolytische Aktivität des nicht inhibierten Cat B wurde durch Umsatz des Fluoreszenzsubstrates bei Exc. 355 nm, Em. 460 nm gemessen. Die Fluoreszenzunterschiede in Abhängigkeit der Zeit (dFI/Zeit) wurden gegen das molare Verhältnis von Hurpin zu Cat B aufgetragen. Das [Hurpin] / [Cat B]-Verhältnis am Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse gibt die SI-Werte wieder.

Die ermittelten SI-Werte für Wildtyp-Hurpin (SI von 796) und die P1-Mutante HP 502 (SI von 330) zeigen, dass Hurpin kein physiologisch relevanter Inhibitor von Cat B ist.

3.7.2.2. Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) von humanem Cat L durch Hurpin

Hier wurden die SI-Werte für die Inhibition von Cat L durch Wildtyp-Hurpin und die Hurpinmutanten HP 501, HP 502 und HP 503 bestimmt.

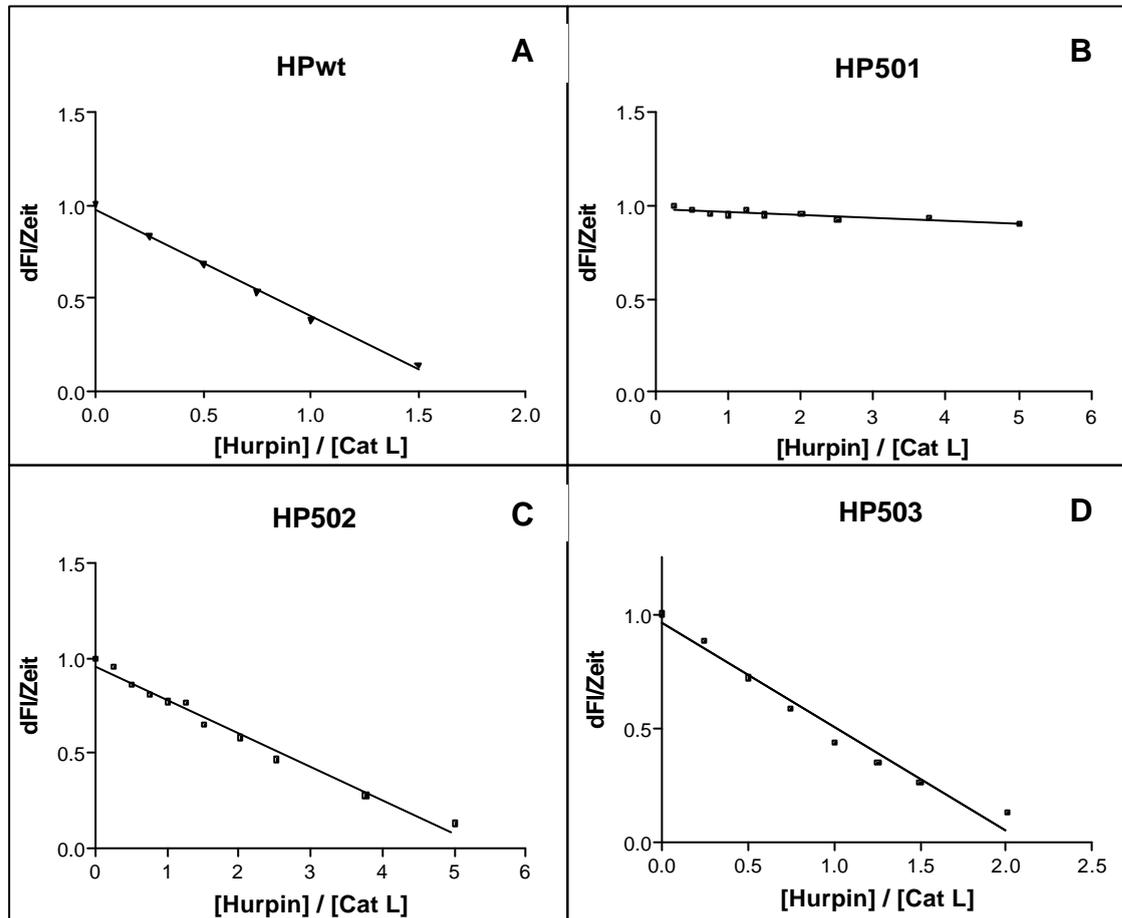


Abbildung 23: Bestimmung der SI-Werte von Hurpin und der Hurpinmutanten gegenüber humanem Cat L. Präaktiviertes Cat L wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von HP wt, HP 501, HP 502 und HP 503 für 45 Minuten bei 37°C in Cat L-Puffer inkubiert. Die proteolytische Aktivität des nicht inhibierten Cat L wurde durch Umsatz des Fluoreszenzsubstrates bei Exc. 355 nm, Em. 460 nm gemessen. Die Fluoreszenzunterschiede in Abhängigkeit der Zeit (dFI/Zeit) wurden gegen das molare Verhältnis von Hurpin zu Cat L aufgetragen. Das $[Hurpin] / [Cat L]$ -Verhältnis am Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse gibt die SI-Werte wieder.

Tabelle 4 zeigt die errechneten SI-Werte.

Hurpin-Variante	SI-Wert
HP wt	1,7
HP 501	60
HP 502	5,5
HP 503	2,1

Das Wildtyp-Hurpin und die Hurpinmutante HP 503 inhibieren humanes Cat L in einem physiologisch relevanten Bereich. Die SI-Werte von HP 501 und HP 502 gegenüber Cat L deuten auf einen Verlust bzw. auf eine starke Einschränkung der inhibitorischen Aktivität hin. Zur vollständigen Inhibition von Cat L durch HP 501 wird hierbei die 60-fache Menge des Inhibitors benötigt. Dies ist nicht mehr im Rahmen einer physiologischen Relevanz zu sehen und deutet auf den Verlust des inhibitorischen Potentials durch die in die proximale Region des RSL eingeführte Mutation hin. Auch die Mutation der P1-P1'-Stelle (HP 502) schränkt die Inhibition von Cat L ein. Allerdings kommt es im Gegensatz zu HP 501 nicht zum Verlust der Inhibitionsfähigkeit. Dies wird durch den SI-Wert von 5,5 verdeutlicht.

3.7.3. Bestimmung der Assoziationskonstante (k_{ass}) der Inhibition von humanem Cat L durch Hurpin

Der k_{ass} -Wert ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Komplexbildung und die Affinität des Inhibitors zur Zielprotease. Je höher der k_{ass} -Wert, desto schneller kommt es zur Insertion des RSL und somit zur stabilen Komplexbildung der Protease.

Zur Bestimmung des k_{ass} -Wertes wurden verschiedene Konzentrationen von Hurpin, bzw. der Hurpinmutanten zu konstanten Konzentrationen präaktivierten Cat L gegeben. Die Messung der Fluoreszenz wurde sofort nach Zugabe des Substrates begonnen und insgesamt über 2 Stunden fortgeführt.

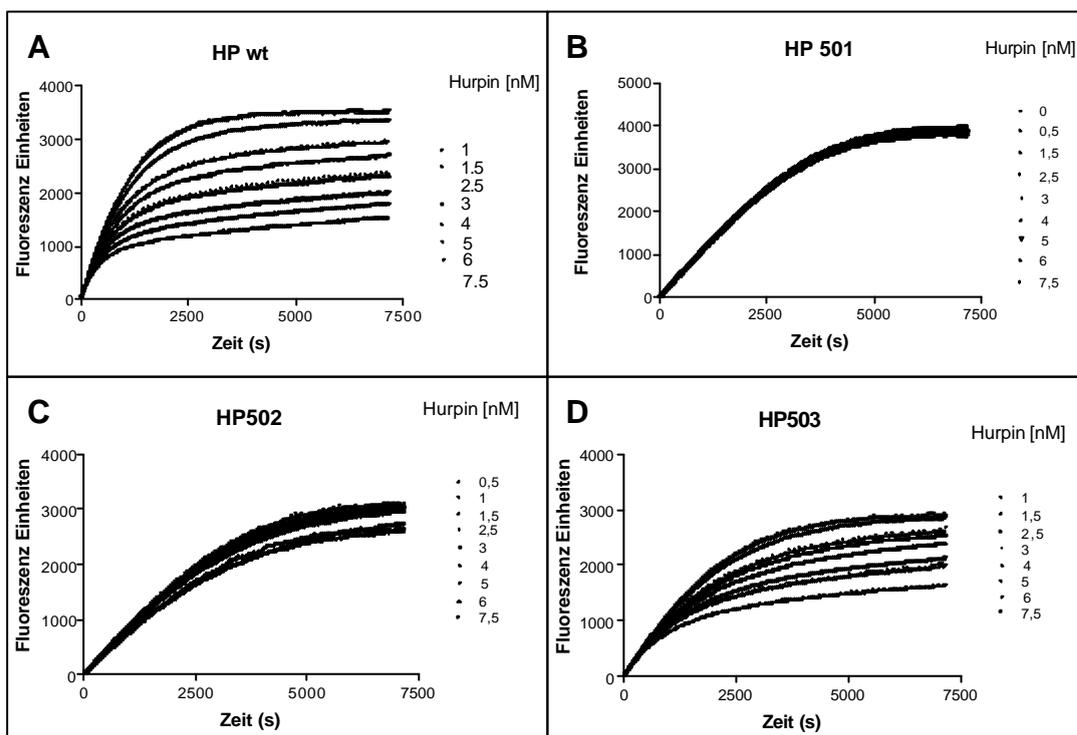


Abbildung 24: Kontinuierliche Inhibitionsassays zur Bestimmung des k_{ass} -Wertes. 5 nM Cat L wurden mit den in der Legende angegebenen Konzentrationen von Hurpin inkubiert. Die Fluoreszenz (Exc. 355 nm, Em. 460 nm) wurden alle 24 Sekunden über einen Zeitraum von zwei Stunden aufgezeichnet. Die Grafik zeigt die absolute Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zeit.

Die grafischen Darstellungen geben die absoluten Fluoreszenz-Werte in Abhängigkeit zur Versuchsdauer wieder. Dies ist ein Maß für die Aktivität der Protease, bzw. für die eingeschränkte Proteaseaktivität nach Inhibition durch das Serpin. Je weniger Fluoreszenz detektiert wird, desto weniger aktiv ist Cat L. Die Inhibition von Cat L durch geringe Konzentrationen an Wildtyp-Hurpin beginnt rasch. 15 Minuten nach Versuchsbeginn ist eine nahezu vollständige Inhibition von Cat L in Gegenwart von 7,5 nM Hurpin erreicht. Diese Konzentration entspricht mit einem Verhältnis Inhibitor zu Protease von 1,5 in etwa dem für das Wildtyp-Hurpin ermittelten $S_{1/2}$ -Wert (Tabelle 4).

Vergleichsweise langsamer verläuft die Inhibition durch HP 503. Hier wird eine nahezu vollständige Inhibition von Cat L mit 7,5 nM Hurpin nach ca. 25 Minuten erreicht.

Eine schwache Inhibition über die gemessene Zeit wurde für HP 502 nachgewiesen. Keine Inhibition von Cat L konnte unter Verwendung von HP 501 nachgewiesen werden.

Um diese Rohdaten in eine analoge Konstante umzuwandeln, wurde die Assoziationskonstante k_{ass} mittels nicht-linearer Regression errechnet.

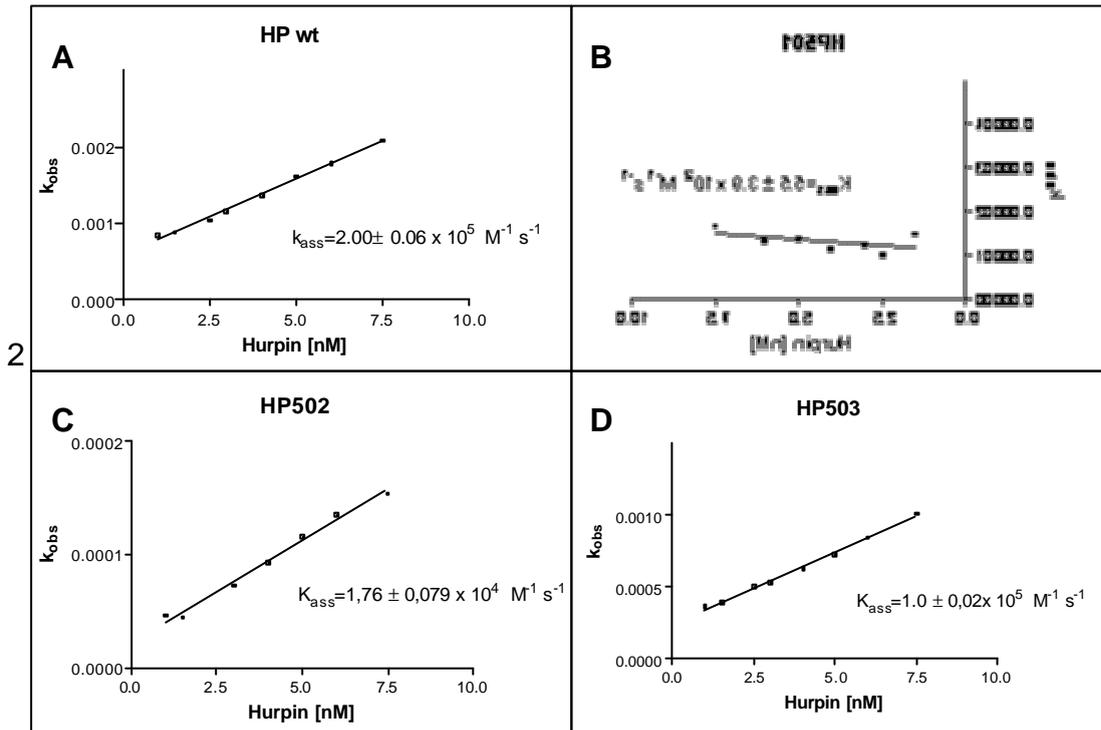


Abbildung 25: Grafische Darstellung der Assoziationskonstante der Inhibition von Cat L durch Wildtyp-Hurpin und die Mutanten HP 501, HP 502, HP 503.

Tabelle 5: Errechnete k_{ass} -Werte

Hurpin-Variante	k_{ass} [$\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]
HP wt	$2,00 \pm 0,06 \times 10^5$
HP 501	$5,5 \pm 3,9 \times 10^2$
HP 502	$1,79 \pm 0,079 \times 10^4$
HP 503	$1,00 \pm 0,02 \times 10^5$

Die hier errechneten Assoziationskonstanten (k_{ass}) sind Werte, die Aussagen über die Schnelligkeit der Insertion des RSL zulassen. Dabei gilt: je größer der k_{ass} , desto schneller verläuft die Reaktion und desto eher führt diese zur Inhibition (Sun *et al.*, 2001). Für die Inhibition von Serinproteasen durch Serpine werden Assoziationskonstanten von 10^5 bis $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ als physiologisch

signifikant beschrieben (Travis & Salvesen, 1983). Der von uns ermittelte k_{ass} -Wert von $2,00 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ für die Komplexbildung zwischen humanem Cat L und Hurpin *in vitro* weist somit auf eine Inhibition in physiologisch relevanten Konzentrationen hin.

4 Diskussion

Die geringe Sterblichkeitsrate von Patienten mit Basalzellkarzinomen (BCC) und Plattenepithelkarzinomen (SCC) verdeckt die Tatsache, dass diese Hauttumore die häufigsten bösartigen Tumoren des Menschen sind. Obwohl BCC nie und SCC spät metastasieren, sind sie durch ihr lokales, destruktiv-invasives Wachstum und das häufige Auftreten im Gesichtsbereich für die betroffenen Patienten problematisch und belastend.

Beide Tumore des nicht melanozytären Typs (NMSC) entstehen aus transformierten Keratinozyten und treten in der Regel im Alter und an sonnenlichtexponierten Stellen auf. Im Rahmen einer mehrschrittigen Karzinogenese übernimmt die UV-Strahlung eine herausragende Position: sie ist das hauptsächliche Mutagen, trägt zur Toleranz des Immunsystems gegenüber den neoplastischen Zellen bei und wird auch als Tumorpromoter diskutiert. Deshalb ist die stetig steigende Inzidenz von NMSC auf die zunehmende Exposition der Haut mit UV-Strahlung zurück zu führen. Gründe hierfür liegen vor allem in geändertem Freizeitverhalten, bzw. Schönheitsidealen. Hinzu kommt eine generelle Zunahme der UV-Strahlung durch die fortschreitende Depletion der Ozonschicht.

Bis heute sind die vielfältigen, molekularen Prozesse, die zu der Pathophysiologie von NMSC beitragen, nicht vollständig geklärt. Bisherige Untersuchungen NMSC-assoziiierter Gene beschränken sich meist auf Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reparaturgene. Es ist unbestritten, dass diese Gene, bzw. ihre Fehlregulation, von großer Bedeutung im Rahmen der Karzinogenese sind. Die Identifizierung weiterer Gene ist allerdings wichtig, um die Tumorzellen besser zu charakterisieren und die zugrundeliegenden Mechanismen der Tumorentstehung verstehen zu können.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen der Expressionsprofile von normaler Haut und von Hauttumoren mittels DDRT-PCR und cDNA-Arrays boten die Möglichkeiten, neue und bekannte Hauttumor-assoziierte Gene zu identifizieren.

4.1. Identifizierung von NMSC-assoziierten Genen

4.1.1. Humane cDNA Expressionsarrays

Die differenzielle Hybridisierung von cDNA-Arrays ist eine effiziente Methode, um die Expression einer grossen Anzahl bekannter Gene zu untersuchen. Der in dieser Arbeit verwendete cDNA-Array enthielt 588 cDNA-Fragmente bekannter Gene, von denen nach differenzieller Hybridisierung 100 Gene als in der Haut exprimiert detektiert wurden (Abbildung 1). Nach Auswertung der Daten wurden diejenigen Gene näher untersucht, deren differenzielle Expression um mindestens den Faktor 2 variierte (Tabelle 1). Dieser Faktor ist im Rahmen einer individuellen Divergenz zu verstehen, die nicht zwangsläufig mit der Pathophysiologie der BCC assoziiert ist. Von 10 der 16 BCC-assoziierten Gene wurde die individuelle Genexpression in 10 BCC, 2 SCC, 7, bzw. 10 Proben aus gesunder Haut, HaCaT und NHK mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert (Abbildung 2).

Mit Hilfe der hier durchgeführten Analysen wurden die „steady state“ mRNA-Mengen für die jeweiligen Gene untersucht. Die festgestellten unterschiedlichen mRNA-Mengen dieser Gene können sowohl durch differenzielle Genexpressionen als auch durch veränderte posttranskriptionelle Regulationen hervorgerufen worden sein.

Im folgenden werden 5 Gene, deren dysregulierte Expression zur Pathophysiologie von NMSC beitragen könnte, diskutiert. Keines dieser 5 Gene ist vorher im Zusammenhang mit Hauttumoren beschrieben worden.

4.1.1.1. Mikrosomale Glutathion-S-Transferase (GST 12)

Die Auswertung des cDNA-Arrays ergab, dass das Gen für die mikrosomale Glutathion-S-Transferase (GST 12) in BCC 6,25-fach geringer exprimiert wurde. Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte die individuelle Expression in 7 von 8 RNA-Proben aus gesunder Haut und in der HaCaT-Zelllinie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die mRNA-Mengen in 8 von 10 BCC, in beiden SCC und in NHK stark verringert (Abbildung 2, Tabelle 1).

GST 12 ist ein Mitglied der „membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism“-Supergen-Familie (MAPEG). Mitglieder dieser Familie übernehmen wichtige Aufgaben in der enzymatischen Abwehr gegenüber endogenen und exogenen Noxen (Jakobsson *et al.*, 2000).

Das Gen für GST 12 kodiert für ein im menschlichen Körper ubiquitär exprimiertes, 17 kDa schweres Protein (Morgenstern *et al.*, 1982; Lee & DeJong, 1999). In der aktivierten Form ist GST 12 ein membrangebundenes Homotrimer (Schmidt-Krey *et al.*, 2000), das die Reduktion von Fettsäure- und Phospholipid-Hydroperoxiden in einer Glutathion-abhängigen Reaktion katalysiert (Mosialou *et al.*, 1995). In Keratinozyten entstehen Hydroperoxide

beispielsweise im Rahmen des UV-induzierten oxidativen Stress (Punnonen *et al.*, 1991). Durch Reaktion mit der DNA können diese Hydroperoxide als Mutagen wirken (Esterbauer *et al.*, 1990).

Die festgestellte Repression des GST 12-Gens könnte deshalb zu einem mangelhaftem Schutz vor intrazellulären Peroxiden führen und folglich zur vermehrten Entstehung von Mutationen beitragen.

Die Hypothese, dass die dysregulierte Expression von GST 12 einen direkten Einfluss auf die Karzinogenese von Hauttumoren hat, wird durch Untersuchungen an zytosolischen Glutathion-S-Transferasen gestützt. Obwohl diese keine strukturellen Ähnlichkeiten mit GST 12 aufweisen, bestehen doch funktionelle Verwandtschaften. Lear und Mitarbeiter zeigten, dass der Verlust des Gens für die zytosolische Glutathion-S-Transferase T1 signifikant mit der schnelleren Genese von BCC korreliert (Lear *et al.*, 1997).

Untersuchungen zur Expression der mikrosomalen Glutathion-S-Transferase 1 L1 (MGST1 L1), welche in 38 % der Aminosäuren identisch mit GST 12 ist, zeigten, dass die Expression dieses Gens unter anderem durch p53 kontrolliert wird (Polyak *et al.*, 1997). Auf Grund dieser Regulation wird für MGST1 L1 die Verbindung zu apoptotischen Prozessen und, im Fall der Dysregulation, die Beteiligung an der Karzinogenese diskutiert. Eine transkriptionelle Kontrolle des GST 12-Gens durch p53 wurde bis dato noch nicht beschrieben.

Eine mögliche weitere Funktion von GST 12 könnte in der Bindung von Leukotrien C₄ (LTC₄) liegen (Metters *et al.*, 1994). Neben der proinflammatorischen Wirkung wird LTC₄ auch als Mediator der Tumorpromotion diskutiert (Furstenberger *et al.*, 1994). Das Ungleichgewicht in der LTC₄-Regulation, hervorgerufen durch die dysregulierte Expression von GST 12, könnte so zur Tumorpromotion beitragen.

4.1.1.2. Glutaredoxin

Die Auswertung der cDNA-Arrays ergab, dass das Gen für Glutaredoxin in BCC 5-fach schwächer als in gesunder Haut exprimiert wurde. Die mittels semiquantitativer RT-PCR untersuchte individuelle Expression wies in allen Proben aus gesunder Haut und in NHK größere Transkriptmengen auf als in den BCCs, in 1 von 2 SCC und in HaCaT (Abbildung 4 und Tabelle 2).

Glutaredoxin ist ein ubiquitär vorkommendes, zytosolisches Enzym, welches in Glutathion-abhängigen Reaktionen die Reduktion von Disulfidbindungen katalysiert (Bjornstedt *et al.*, 1994; Holmgren & Karlsson, 1978).

Das 11 kDa grosse Protein (Wells *et al.*, 1993) wird zur Proteinfamilie des Thiol-Disulfid Oxireduktase (TDOR) Enzymsystems gezählt (Starke *et al.*, 1997). Glutaredoxin spielt bei der Reduktion von Dehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure eine entscheidende Rolle. Die eingeschränkte Bereitstellung von Ascorbinsäure, einem zellulären Antioxidans und Radikalenfängers, könnte zur Entstehung von BCC beitragen. Diese Hypothese wird von Vural *et al.*

unterstützt, der eine verringerte Konzentration von Ascorbinsäure in BCC nachweisen konnten (Vural *et al.*, 1999).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Glutaredoxin auch an der Redoxregulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. Hirota und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Überexpression von Glutaredoxin in HEK293-Zellen zur Induktion von NF- κ B-regulierter Transkription führt (Hirota *et al.*, 2000).

In Keratinozyten ist NF- κ B entscheidend an der Regulation der terminalen Differenzierung beteiligt (Seitz *et al.*, 1998). Ist die Bereitstellung von funktionellem NF- κ B wegen der geringeren Expression von Glutaredoxin nicht mehr gewährleistet, so könnte dies die Homöostase der epidermalen Zellen durch Favorisierung der Proliferation stören. Die Auswirkung der Inhibition von NF- κ B in murinen Keratinozyten untersuchte van Hogerlinden. Er und seine Mitarbeiter zeigten die spontane Entstehung von SCC in transgenen Mausmodellen, die den NF- κ B-Inhibitor I- κ B α in der Epidermis überexprimierten (van Hogerlinden *et al.*, 1999).

Neueste Untersuchungen von Daily weisen auf eine mögliche Beteiligung von Glutaredoxin an der Regulation der Apoptose hin (Daily *et al.*, 2001).

4.1.1.3. „Teratocarcinoma-derived growth factor“ Cripto

Die Auswertung der cDNA-Arrays ergab, dass das Gen für Cripto in BCC im Vergleich zu gesunder Haut 4-fach stärker exprimiert wurde. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurden Transkripte in 8 von 10 BCC und in 2 von 10 Proben aus gesunder Haut detektiert. In den übrigen Proben konnte keine Expression nachgewiesen werden. Das 36 kDa schwere Cripto ist ein Mitglied der Proteinfamilie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF-Familie) (Brandt *et al.*, 1994). Dabei unterscheidet es sich von anderen Mitgliedern der EGF-Familie durch eine nicht vorhandene A-Schleife und eine verkürzte B-Schleife (Salomon *et al.*, 1999).

Cripto ist ein Wachstumsfaktor, der die Expression unterschiedlicher Gene reguliert. Die Arbeitsgruppen um Kannan und Bianco zeigte, dass Cripto in verschiedenen humanen Brustkrebs-Zelllinien an der Aktivierung des ras/raf/MEK/MAPK-Weges durch eine Transaktivierung von erb B-4 beteiligt ist (Bianco *et al.*, 1999; Kannan *et al.*, 1997).

Mehrere Expressionsstudien von Cripto in humanen Karzinomen deuten auf eine Korrelation zwischen der Cripto-Expression und dem Tumorgrad hin. Diese Daten sind in einem Übersichtsartikel von Salomon (2000) zusammengefasst.

Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in der Zervixkarzinom-Zelllinie Caski nach Transfektion eines Cripto-Expressionsvektors und Überexpression von Cripto wurden von Ebert und Mitarbeiter durchgeführt (Ebert *et al.*, 2000). Ein durch Überexpression von Cripto induziertes Gen ist Vimentin. Es ist bekannt, dass die Konzentration von Vimentin mit der Aggressivität von Zervixkarzinomen korreliert. In weiteren Versuchen konnten

Ebert und Mitarbeiter zeigen, dass Cripto-transfizierte Caski-Zellen verstärkt Kollagen- und Gelatinematrizes zerstören (Ebert *et al.*, 2000). Dies ist eine grundlegende Voraussetzung für das invasive Wachstum von Tumoren. Des Weiteren kann die Überexpression von Cripto *in vitro* zu einer vermehrten Phosphorylierung von β -Catenin führen, wodurch die Bindungsfähigkeit zu E-Cadherin eingeschränkt ist (Kannan *et al.*, 1997; Salomon *et al.*, 2000; Shibamoto *et al.*, 1994). Dadurch können sich Zellen leichter aus dem Zellverband lösen. Die Cripto-induzierte Genexpression von Vimentin und die Cripto-vermittelte Phosphorylierung von β -Catenin können zur Absiedelung von Tumorzellen und im folgenden zur Metastasierung führen.

Im Gegensatz zu Untersuchungen, in denen Cripto überexprimiert wird, zeigen Antisense-Experimente gegenläufige Ergebnisse. Kolonkarzinom-Zelllinien, die mit Cripto Antisense mRNA-Sonden behandelt wurden, zeigten gegenüber den unbehandelten Zelllinien ein stark eingeschränktes Zellwachstum (Ciardiello *et al.*, 1994).

Die besonders starke Expression von Cripto in BCC 46 ist auffällig. Laut des histologischen Befunds handelt es sich hierbei um ein am Kapillitium entstandenes, solides BCC ohne weitere Besonderheiten. Da anzunehmen ist, dass die Criptoexpression auch in BCC mit der Aggressivität der Tumoren korreliert, wäre es von Interesse, die Expression von Cripto in fortgeschrittenen, aggressiven BCC zu untersuchen. Möglicherweise könnte die Criptoexpression als Marker für aggressive BCC im Falle von Rezidiven eingesetzt werden.

4.1.1.4. Janus Tyrosin Kinase 3 (Jak3)

Dem Ergebnis der cDNA-Array-Analyse zur Folge wird das Gen für Jak3 in BCC im Vergleich zu gesunder Haut mehr als 10-fach überexprimiert. Die Untersuchungen der individuellen Hautproben mittels semiquantitativer RT-PCR konnten diese Daten nicht vollständig bestätigen. In 5 von 10 BCC und in 2 von 7 Proben aus gesunder Haut sind Transkripte nachweisbar. Keine Signale waren in einem SCC und in HaCaT detektierbar. Dem gegenüber wurde eine große Jak3-Transkriptmenge in NHK nachgewiesen. Bei Jak3 handelt es sich um eine Tyrosinkinase ohne eigenen extrazellulären Rezeptor. Jak3 spielt eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion von Zytokinen auf STAT5 („signal transducers and activators of transcription 5“). Die Aktivierung von Jak3 wird nur durch Bindung an die transmembrane γ_c -Proteinkette, welche von mehreren Zytokinrezeptoren (Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) benutzt wird (Russel, 1994), initiiert. Die ligandeninduzierte Oligomerisierung dieser Rezeptoren führt zu der Aktivierung von Jak3 durch Phosphorylierung und über eine Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung von STAT5 (Feng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997). Dieses homodimerisiert und transloziert in den Nukleus, wo STAT5 als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Genexpression beteiligt ist (Aringer *et al.*, 1999). Neben der Aktivierung von STAT5 kann Jak3 auch

MAP-Kinasen (Gadina *et al.*, 1998) und in T-Zellen die Phosphatidylinositol-3-Kinase aktivieren (Johnston *et al.*, 1995).

In humanen epithelialen Krebszellen und in hämatopoetischen Zellen wurden drei verschiedenen Spleiss-Varianten von Jak3 gefunden. Diese unterscheiden sich im C-Terminus des Proteins (Ihle & Kerr, 1995). Eine physiologische oder pathologische Relevanz dieser Varianten wurde bisher noch nicht nachgewiesen (Aringer *et al.*, 1999).

Bisher sind wenig Daten über die Expression und die Funktion des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges in Keratinozyten publiziert. Erst kürzlich wurden Ergebnisse immunhistologischer Untersuchungen zur Lokalisation des Jak/STAT-Weges in der Epidermis beschrieben (Nishio *et al.*, 2001). Proteine von Jak3 und STAT5 wurden von dieser Arbeitsgruppe in allen Schichten der Epidermis detektiert, wobei die größten Jak3 und STAT5-Menge im *Stratum corneum* entdeckt wurden (Nishio *et al.*, 2001).

In den kultivierten natürlichen humanen Keratinozyten wurde in der vorliegenden Arbeit eine sehr starke Expression von Jak3 nachgewiesen. Diese Überexpression im Vergleich zu den Hautbiopsien könnte durch die höhere Teilungsrate der Zellkultur hervorgerufen worden sein. Im Gegensatz dazu steht die geringere Expression in der HaCaT-Zelllinie. In dieser immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie ist der genetische Hintergrund allerdings stark verändert (Boukamp *et al.*, 1997), wodurch eventuell die Expression von Jak3 eingeschränkt ist

4.1.1.5. Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)

Die Auswertung der cDNA-Arrays ergab, dass das Gen für das Monozyten chemotaktische Protein-1 (MCP-1) in BCC 25-fach stärker exprimiert wird als in gesunder Haut. Nach Analysen der Expression in den individuellen Proben mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Überexpression in 5 von 10 BCC im Vergleich zu gesunder Haut festgestellt.

MCP-1 ist ein Mitglied der C-C Chemokin-Familie. Das 11 kDa grosse MCP-1-Protein aktiviert basophile Leukozyten und ist für die chemotaktische Migration von Monozyten (Yoshimura *et al.*, 1989) und T-Gedächtnis-Lymphozyten (Carr *et al.*, 1994) verantwortlich. Des weiteren wird vermutet, dass MCP-1 auch an der Chemotaxis von dendritischen Zellen in der Haut beteiligt ist (Nakamura *et al.*, 1995). Biochemisch kommt es nach spezifischer Bindung von MCP-1 an den CCR2B-Rezeptor zu einer Aktivierung des Jak2/STAT3-Weges (Mellado *et al.*, 1998). Unterbinden der Signaltransduktion durch Inhibition von Jak2 oder durch mutiertes Jak2 führte in der Monozytenzelllinie Mono Mac-1 zu dem Verlust der Migrationsfähigkeit nach MCP-1 Stimulation (Mellado *et al.*, 1998). Kürzlich wurde auch die MCP-1-vermittelte Signaltransduktion über den MAPK- und MEK- Weg beschrieben (Ashida *et al.*, 2001).

Über die Expression von MCP-1 in Keratinozyten liegen unterschiedliche Daten vor. Während Barker *et al.* die konstitutive Expression beschrieben (Barker *et al.*, 1991), zeigten Li *et al.* die Induktion der Genexpression durch TNF- α und INF- γ in Keratinozyten der Mundschleimhaut (Li *et al.*, 2000). Die hier detektierte Überexpression von MCP-1 könnte so in Folge einer Immunreaktion gegen das Tumorgewebe induziert worden sein.

Jüngste Untersuchungen von Szepietowski *et al.* deuten darauf hin, dass dysregulierte Chemokine karzinogene Wirkungen haben könnten. Hierbei soll die Überexpression von IL-8 und des Leukämie-Inhibitions-Faktors durch angiogene bzw. proliferationsstimulierende Wirkungen das Tumorstadium positiv beeinflussen (Szepietowski *et al.*, 2001). Es ist von Interesse, eine mögliche Beteiligung von MCP-1 an der Karzinogenese zu untersuchen.

4.1.2. DDRT-PCR

Durch Verwendung der DDRT-PCR war es möglich, die Genexpression von Zellen unterschiedlicher Herkunft vergleichend nebeneinander darzustellen. Die DDRT-PCR besitzt im Gegensatz zu anderen Methoden zur Analyse differenzieller Genexpression mehrere Vorteile: a) die parallele Untersuchung von verschiedenen Populationen, wobei gleichzeitig reprimierte und induzierte Gene detektiert werden können, b) sie ist eine äußerst sensitive Methode, so dass auch gering abundante Transkripte detektiert werden können, c) es werden nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial benötigt, d) es können bekannte und unbekannte Gene gleichermaßen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels DDRT-PCR 54 differenziell exprimierte cDNA-Fragmente identifiziert (Abbildung 3). Nach der Verifizierung mittels reverser Northern-Dot-Blot-Analysen wurden 25 dieser cDNA-Fragmente kloniert und sequenziert (Abbildung 4, Tabelle 2). Durch Suchen nach Homologien in der EMBL™-Datenbank wurden für 9 cDNA-Fragmente Übereinstimmungen zu bereits bekannten Genen festgestellt. Hierbei wurde der in BCC 4-fach induzierte Basalzellkarzinom-Klon 1 (BK 1) als das „ras-related botulinum toxin substrate“ *rac* identifiziert. Das GTP-bindende Rac ist ein stromabwärts liegender Effektor des Proto-Onkogens p21-ras und besitzt onkogenes Potential (Pervaiz *et al.*, 2001).

Der überwiegende Anteil der klonierten cDNA-Fragmente zeigte vollkommene oder teilweise Übereinstimmungen zu Nukleinsäuresequenzen mit bisher unbekannter Funktion, so genannten „expressed sequence tags“ (EST) oder „sequence tagged sites“ (STS). Diese cDNA-Fragmente sind Teilsequenzen neuer, tumorassoziierter Gene.

Interessanterweise wurde für BK 2 die 100%-ige Sequenzübereinstimmung zu dem cDNA-Klon HUR 8 festgestellt. HUR 8 wurde von unserer Arbeitsgruppe als UV-regulierbares Gen mittels DDRT-PCR detektiert (Abts *et al.*, 1997). Bisher durchgeführte Expressionsstudien deuten auf die Beteiligung des Gens an Vorgängen der Proliferation hin (Abts, persönliche Mitteilung). Des weiteren ist BK 2/HUR 8 nahezu 100%-ig homolog zu dem DNA-Klon RP1-137K2. Diese DNA Sequenz wurde durch Analysen des kleinen Arms von Chromosom 6 identifiziert. Diese Sequenz kodiert teilweise für ein neues Protein, welches Ähnlichkeiten zu B120 besitzt. Erste funktionelle Studien mit B120 deuten auf die Beteiligung des Proteins an dem Lipidstoffwechsel hin (Takeuchi *et al.*, 1998).

4.1.2.1. Das heterogene-nukleäre-RNA-bindende-Protein D0 (hnRNP D0)

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde das in der Kerationozyten-Zelllinie HaCaT UV-reprimierbare cDNA-Fragment HUR-F95 mittels DDRT-PCR detektiert. Nach Sequenzanalyse und Homologiesuche in der EMBL™-Genbank

bestand zwischen HUR-F95 und dem Gen für das heterogene-nukleäre-RNA-bindende-Protein D0 (hnRNP D0) eine 92%-ige Homologie über 635 Nukleotide. In 8 von 8 untersuchten BCC konnte mittels Northern-Blot-Analysen die Induktion der Genexpression im Vergleich zu NHK gezeigt werden. Darüber hinaus wurden in verschiedenen Tumorzelllinien große Transkriptmengen von hnRNP D0 mittels Northern-Blot-Analysen nachgewiesen (Welss, 1997).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression in 11 weiteren BCC im Vergleich zu 5 Proben aus gesunder Haut mittels Western-Blot-Analysen (Abb. 5) untersucht. Hierbei wurden in 6 der 11 untersuchten BCC größere hnRNP D0-Proteinmengen im Vergleich zu gesunder Haut nachgewiesen. Die zusätzliche immunhistologische Expressionsstudie von hnRNP D0 auf Einzelzellebene (Abb. 6) zeigte die tumorspezifische Überexpression in dem untersuchten BCC.

Das Protein des ubiquitär exprimierten hnRNP D0-Gens wird den RNA-bindenden Proteinen zugeordnet, welche durch zwei RNA-Bindedomänen und eine glycinreiche Region im C-terminalen Bereich des Proteins charakterisiert werden. Sequenzvergleiche zeigten, dass hnRNP D0 und das A- und U-reiche RNA-bindende Protein 1 (AUF1) die gleiche cDNA-Sequenz besitzen, was auf die Expression des selben Gens zurückzuführen ist (Wagner *et al.*, 1998). Alternatives Spleissen der hnRNP D0/AUF1 prä-mRNA führt zu 4 verschiedenen Isoformen (Kajita *et al.*, 1995). Dementsprechend kodieren diese Transkripte für 4 verschieden große Proteine mit Molekulargewichten von 37, 40, 42 und 45 kDa (Zhang *et al.*, 1993). Durch Western-Blot-Analysen konnten in BCC und gesunder Haut 3 Protein-Isoformen (37, 40 und 42 kDa) detektiert werden (Abb. 6). Dem gegenüber wurden in der zytosolischen Proteinfraction von HaCaT-Zellen 2 Isoformen (40 und 45 kDa) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben eine solche differenzielle Expression der Isoformen, die auf zell- und entwicklungspezifischen Regulationen beruhen können (Buzby *et al.*, 1996). Auch die intrazelluläre Verteilung von hnRNP D0/AUF1 Protein ist in Abhängigkeit vom Zellstatus gezeigt worden. So beschrieben Loflin und Mitarbeiter den Transport von hnRNP D0/AUF1-Isoformen vom Nukleus in das Zytoplasma nach Induktion der Differenzierung von K562-Zellen durch Hemin (Loflin *et al.*, 1999).

Bisher wurden verschiedene Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und hnRNP D0/AUF1 beschrieben. Ishikawa *et al.* publizierten die sequenzspezifische Bindefähigkeit von hnRNP D0/AUF1 sowohl an die prä-mRNA 3'-Spleiss-Konsensussequenz (UUAG/G) als auch an die Telomeren-DNA-Sequenz (TTAGGG)_n (Ishikawa *et al.*, 1993). Ebenfalls ist hnRNP D0/AUF1 an der posttranskriptionellen Regulation von Genen beteiligt, die A und U-reiche Elemente (ARE) in ihrem 3'-untranslatierten Bereich aufweisen. Häufig besitzen „early response genes“, wie Zytokine und Proto-Onkogene AREs. *In vitro* Experimente zeigten, dass hnRNP D0/AUF1 an dem kontrollierten Abbau der Proto-Onkogene *c-myc* und *c-fos* (DeMaria & Brewer 1996) und des Zytokins GM-

CSF (Buzby *et al.*, 1996) beteiligt ist. Darüber hinaus wurde auch ein mRNA-stabilisierender Effekt durch Bindung von hnRNP D0/AUF1 an den ARE von α -Globin-mRNA beschrieben (Kiledjian *et al.*, 1997).

Neueren Untersuchungen zur Folge bindet hnRNP D0/AUF1 auch an einzel- und doppelsträngige DNA. Tolnay und Mitarbeiter beschrieben die sequenzspezifische DNA-Bindung der hnRNP D0-Isoform B, die durch Interaktionen mit dem TFIID-Transkriptionskomplex an der Regulation der basalen Genexpression beteiligt ist (Tolnay *et al.*, 1999). Ferner zeigten Tolnay *et al.*, dass die in B-Zellen exprimierte Variante hnRNP D0B durch Bindung an das TATA-Box bindende Protein an der Regulation der Expression des „complement receptors 2“ beteiligt ist (Tolnay *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde erstmals die Überexpression von hnRNP D0/AUF1 in BCC auf Proteinebene im Vergleich zu gesunder Haut beschrieben. Diese Dysregulation könnte, aufgrund der Beteiligung von hnRNP D0/AUF1 an der Regulation der Genexpression von Proto-Onkogenen, zur Karzinogenese von Hauttumoren beitragen.

4.2. Untersuchungen des neuen Ov-Serpins Hurpin

Das in HaCaT-Zellen UV-reprimierbare Serpin Hurpin (SERPINB13) ist aufgrund seiner Aminosäurehomologie der Familie der Ovalbumin-Serpine (Ov-Serpine) zugeordnet worden (Abts *et al.*, 1999). Neben der physiologisch bedingten differentiellen Expression von Hurpin nach UV-Bestrahlung (Abts *et al.*, 1997) wurde von Spring *et al.* eine pathologisch bedingte differentielle Expression in SCC beschrieben (Spring *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung dieses Gens an der Pathogenese von BCC auf transkriptioneller Ebene untersucht. Neben der Charakterisierung des Hurpingens lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der funktionellen Analyse von Hurpin.

4.2.1. Expression von Hurpin in unterschiedlichen humanen Geweben

Mittels RT-PCR-Analysen wurde die Expression von Hurpin in verschiedenen humanen Geweben untersucht (Abbildung 9). Hierbei wurden grössere Transkriptmengen von Hurpin in Uterus- und Prostatagewebe detektiert. Beide Organe besitzen eine Schleimhaut als Abschlussgewebe, welche aus unverhornten, epithelialen Keratinozyten besteht. Dies könnte auf die Beteiligung von Hurpin an Prozessen der Differenzierung von Keratinozyten hinweisen.

4.2.2. Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation von Hurpin

Mit Hilfe der PCR-basierenden Durchmusterung eines „radiation hybrid panels“ konnte das Hurpingen auf dem langen Arm von Chromosom 18 lokalisiert werden (Abts *et al.*, 2001). Hurpin liegt damit in einem bekannten „gene cluster“ der Ov-Serpine (Scott *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1998).

Die konsekutiven Sequenzanalysen des im Rahmen dieser Arbeit isolierten genomischen Klons HP-GC-C (Abb. 10 und 11) ergaben eine Länge von 12.253 Basenpaaren für das vollständige Hurpingen. Der Vergleich der Sequenz des genomischen Klons mit der in den Vorarbeiten klonierten cDNA Sequenz ergab, dass das Gen aus 8 Exons zusammengesetzt und entsprechend durch 7 Introns unterbrochen wird. Diese genomische Organisation ist typisch für die Ov-Serpine im „gene cluster“ auf Chromosom 18. Ebenso zeigt das Hurpingen bezüglich der Position und der Phase der Exon-Intron-Übergänge vollständige Übereinstimmung zu anderen Ov-Serpinen wie PAI2, SCCA 1 und 2 und Ovalbumin (Abts *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit erforschten Ergebnisse wurden unabhängig durch Untersuchungen von Nakashima *et al.* bestätigt. Diese Arbeitsgruppe klonierte und analysierte parallel zu unseren eigenen Arbeiten das Gen für Headpin, welches identisch mit Hurpin ist (Nakashima *et al.*, 2000).

In Primerextensions-Experimenten zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde ein dominanter Startpunkt festgestellt (Abbildung 12 A). Dieser dominante Transkriptionsstartpunkt liegt 262 bp von dem 3'-Ende des verwendeten Primers GSP1 entfernt. Demnach besitzt das Transkript von Hurpin eine theoretische Länge von 3319 Basenpaaren. Der Startpunkt liegt innerhalb der konservierten Transkriptions-Initiator-Region YYAN(T/A)YY (Zhang, 1998). Mittels computerunterstützter Homologiesuche wurden verschiedene regulatorische Sequenzmotive in unmittelbarer Nähe des Startpunktes identifiziert (Abbildung 12 B). Dabei könnten die gefundenen C/EBP Bindungsstellen als positive Regulatoren des Hurpingens fungieren. Diese Sequenzmotive wurden bereits im Zusammenhang der epidermalen Differenzierung beschrieben (Oh & Smart 1998). Darüber hinaus könnte das oktamere Bindungsmotiv für die POU-Domänen-Proteine die negative Regulation des Hurpinpromoters nach UVB-Bestrahlung bewirken. Eine repressive Wirkung auf die Genexpression durch Bindung der POU-Domänen Transkriptionsfaktoren konnte Faus *et al.* in Keratinozyten nachweisen (Faus *et al.* 1994).

Der für Headpin publizierte Transkriptionsstartpunkt (Nakashima *et al.*, 2000) konnte von uns nicht bestätigt werden. Dieser liegt 119 bp stromaufwärts des in unseren Arbeiten bestimmten dominanten Startpunkt. Die in den Arbeiten zu Headpin veröffentlichte TATA-Box scheint in epidermalen Keratinozyten nicht funktionell zu sein, da dieser Sequenzabschnitt in dem Hurpin λ -Klon 1.1, der

die cDNA in voller Länge enthält, vorhanden ist. Die mögliche Verwendung von unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten könnte auf unterschiedliche Promotoren des Hurpings deuten.

4.2.3. Biochemische und funktionelle Untersuchungen von Hurpin

Die Etablierung geeigneter Expressionssysteme und Reinigungsverfahren zur Isolation von intaktem, rekombinantem Hurpin und die folgenden funktionellen Analysen waren ein Kernprojekt der vorliegenden Arbeit. Aus Vorversuchen war bekannt, dass Interaktionen von Serin- und Cysteinproteasen mit Hurpin bestehen. Abts *et al.* (1999) zeigten die Proteolyse von *in vitro* translatiertem Hurpin durch Chymotrypsin, humane Neutrophilen-Elastase, Cathepsin B (Cat B) und Cathepsin L (Cat L), wobei die resultierenden Proteingrößen auf die Interaktion der Protease mit dem RSL hindeuteten. Unter Verwendung eines prokaryotischen Expressionssystems konnte erstmals rekombinantes Hurpin synthetisiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses rekombinante Hurpin zeigte in Proteaseinhibitionsassays allerdings keine inhibitorische Aktivität gegenüber den oben genannten. Zum einen könnte Hurpin als Substrat für die Proteasen gedient haben, zum anderen könnten unterschiedliche posttranslationelle Modifikationen bei Verwendung des prokaryotischen Expressionssystems und der nachfolgenden Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen zu nicht funktionellem Hurpin geführt haben. Um letzteres zu überprüfen, wurde Hurpin auch in der Hefe *Pichia pastoris*, einem eukaryotischen Organismus, rekombinant exprimiert. Mittels chromatographischer Aufreinigung unter konsekutiver Verwendung zweier unterschiedlicher Säulenmatrizes konnte sehr reines, rekombinantes Hurpin (ryHurpin) in grossen Mengen aus *P. pastoris* isoliert werden (Abbildungen 14, 15 und 16).

Ov-Serpine sind komplex gefaltete Proteine mit 9 α -Helices und 3 β -Faltblättern. Diese Konformation und die Möglichkeit der Konformationsänderung nach Interaktion mit der Zielprotease ist entscheidend für die inhibitorische Aktivität. Mit Hilfe der durchgeführten TUG-PAGE-Analyse (Abbildung 17) konnte für ryHurpin die serpintypische Transition (Mast *et al.*, 1991) von der gespannten zur entspannten Konformation in Gegenwart steigender Harnstoffkonzentrationen gezeigt werden. Dieses Ergebnis deutete an, dass ryHurpin auf Grund der Konformation, bzw. der Möglichkeit der Konformationsänderung zur Inhibition von Proteasen befähigt ist.

Die mögliche Inhibition der Cysteinproteasen Cat B und Cat L durch ryHurpin wurde *in vitro* durch Proteaseinhibitionsassays untersucht. Während keine Inhibition von Cat B nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22 A), wurde Cat L in Gegenwart der 1,7-fachen Menge ryHurpin komplett inhibiert (Abbildung 23 A). Die Abweichung von der idealen Stöchiometrie der Inhibition (SI-Wert von 1) könnte durch kontaminierende Proteine, welche die Messung der

Proteinkonzentration beeinflussen, begründet sein. Es ist allerdings auch denkbar, dass durch die Aufreinigung und die Lagerung nicht das gesamte ryHurpin inhibitorisch aktiv war.

Der ermittelte k_{ass} -Wert von $2,00 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ der Cat L-Inhibition durch ryHurpin (Abbildungen 24 A, 25 A und Tabelle 5) zeigt, dass diese Reaktion in einen signifikanten Bereich der Inhibition von Serinproteasen einzuordnen ist. Allerdings handelte es sich bei dieser Inhibition um eine „cross-class“-Inhibition einer Cysteinprotease. Das mit Hurpin nah verwandte SCCA 1 ist ebenfalls ein potenter „cross-class“-Inhibitor von Cat L, welches von diesem Serpin mit einem k_{ass} -Wert von $3,0 \times 10^5 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ inhibiert wird (Schick *et al.*, 1998).

Entscheidend für den Mechanismus und die Spezifität der Inhibition ist die C-terminale reaktive Schleife (RSL) des Proteins. In diesem Bereich befindet sich die Gelenkregion und P1-P1'-Peptidbindung, die von der Ziel-Protease hydrolysiert wird. Durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen von Hurpin mit verwandten Ov-Serpinen wurde die mögliche P1-P1'-Schnittstelle zwischen Thr³⁵⁶ (P1) und Ser³⁵⁷ (P1') eingeordnet (Abts *et al.*, 1999). Zur Identifizierung der exakten P1-P1'-Schnittstelle nach Inkubation mit Cat L wurde die Aminosäuresequenz des freigesetzten C-terminalen Fragments (Abbildung 18) mittels massenspektroskopischer Verfahren bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass die von Abts *et al.* postulierte P1-P1'-Peptidbindung durch Cat L hydrolysiert wird (Sun und Bird, persönliche Mitteilung).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteaseinhibitionsassays mit zielgerichtet mutiertem Hurpin dienten zur Aufklärung des Mechanismus der Inhibition. Es wurde gezeigt, dass der Austausch der funktionell relevanten Aminosäure an der Gelenkposition P14 innerhalb des RSL (Mutation HP 501) zum Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber Cat L führt (Tabelle 5). Inhibitorische Serpine besitzen an der P14-Position meist Aminosäuren mit kurzen, ungeladenen Seitenketten wie Valin, Serin oder Threonin (Huntington *et al.* 1997). Der vorgenommene Austausch von Threonin durch Arginin führt hierbei zur sterischen Behinderung der Insertion des RSL in das β Faltblatt A und somit zum Verlust der inhibitorischen Aktivität (Abbildungen 23 B, 24 B, 25 B). Die Relevanz dieser Aminosäureposition für die Beweglichkeit des RSL wurde erstmals von Huntington an dem nicht inhibitorischen Serpin Ovalbumin beschrieben. Hierbei führte der Austausch des an der P14-Position vorkommenden Arginins durch Serin zur Mobilisierung des RSL nach Inkubation mit Elastase (Huntington *et al.* 1997).

Der Austausch von Threonin durch Alanin an der P1-Position (Mutation HP 502) führt zu eingeschränkter Inhibition von Cat L. Der erhöhte St-Wert von 5,5 (Tabelle 4) und der verringerte k_{ass} -Wert von $1,79 \pm 0,079 \times 10^4 \text{ [M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ (Abbildungen 24 C, 25 C und Tabelle 5) deuten darauf hin, dass es zu einem Verlust der Spezifität der Proteolyse der P1-P1'-Peptidbindung durch Cat L gekommen ist. Dass dennoch Inhibition festgestellt wurde, könnte daran liegen, dass in direkter Nachbarschaft der P1-P1'-Schnittstelle weitere Aminosäuren

für den Mechanismus der Inhibition verantwortlich sind und die Inhibition durch unspezifische Proteolyse vermittelt wurde. Grundlegende Untersuchungen hierzu wurden an den RSL von SCCA 1 und 2 durchgeführt. Die Proteine von SCCA 1 und 2 sind zu 92% identisch und unterscheiden sich innerhalb des RSL nur in 8 Aminosäuren. Dennoch inhibieren beide unterschiedliche Proteasefamilien. Während SCCA 1 ein „cross-class“-Inhibitor für die Cysteinproteasen Cat K, L und S ist, inhibiert SCCA 2 die Serinproteasen Cat G und die Mastzell-Chymase (Schick *et al.*, 1998a; Schick *et al.*, 1997). Zwei Arbeitsgruppen generierten SCCA-Mutanten, in denen die P1-Position jeweils untereinander vertauscht wurden (Luke *et al.* 2000). Hierbei zeigte sich, dass der alleinige Austausch an dieser Position nicht ausreicht, um aus SCCA 2 einen effektiven „cross-class“-Inhibitor von Cysteinproteasen und aus SCCA 1 einen Inhibitor für Serinproteasen zu machen.

Dieser Argumentation folgend ist es auch erklärbar, dass eine Inhibition von Cat B durch den alleinigen Austausch der P1-Aminosäure von Hurpin (HP 501) nicht hervorgerufen werden konnte (Abbildung 22).

Neben den Mutationen im RSL wurde auch eine Mutante generiert, in der die funktionelle Domäne des CD-interhelikalen Loops deletiert war. Im Fall dieser Mutante (HP 503) wurde kein relevanter Unterschied in der Stöchiometrie der Inhibition von Cat L im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Abbildung 23 D, Tabelle 4). Allerdings war der k_{ass} -Wert verglichen mit dem des Wildtyps nur halb so gross (Abbildungen 24 D, 25 D und Tabelle 5). Eine mögliche Strukturänderung des Proteins, hervorgerufen durch die Deletion der Aminosäuren Ser⁶⁵ bis Ile⁷⁶, könnte der Grund sein, dass der SI-Wert nahezu gleich bleibt, die Geschwindigkeit der Inhibition sich allerdings verlangsamt. Funktionell dient der CD-interhelikale Loop im Falle von Bomapin als Signalpeptid. Bei Bomapin ist er für die Translokation dieses zytosolischen Serpins in den Nukleus verantwortlich (Chuang & Schleef, 1999).

Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation von Hurpin in Keratinozyten sind bisher daran gescheitert, dass die verwendeten polyklonalen Antikörper mit verwandten Ov-Serpinen kreuzreagierten (Abbildung 13). Derzeit findet die Generierung von monoklonalen Antikörpern statt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das neue Ov-Serpin Hurpin ein spezifischer „cross-class“-Inhibitor für die Cysteinprotease Cat L ist und diese Inhibition über die serpintypische Mechanismen verlaufen.

4.2.4. Die mögliche Relevanz der Inhibition von Cat L durch Hurpin in pathologischen und physiologischen Situationen

Lange Zeit wurde die funktionelle Beteiligung von lysosomalen Cysteinproteasen alleinig in dem intrazellulären Proteinmetabolismus angenommen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Cat L ein wichtiger Bestandteil bei der Prozessierung von MHC II-Molekülen ist (Chapman *et al.*,

1997). In jüngster Zeit erschienen mehrere Publikationen, die eine mögliche Beteiligung von Cat L an apoptotischen Vorgängen beschreiben. Ishisaka *et al.* zeigten beispielsweise die Aktivierung der Caspase 3, einer zentralen Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Protease in der apoptotischen Kaskade proteolytischer Prozesse, durch eine Cysteinprotease mit einer Cat L ähnlichen Aktivität (Ishisaka *et al.*, 1998; Ishisaka *et al.*, 1999). Des weiteren zeigte die Arbeitsgruppe um Stoka, dass die Caspase 3 nicht direkt durch die Cat L-ähnliche Protease Cruzipain aktiviert wird, sondern über eine Kaskade verlaufen kann, an deren Anfang die Proteolyse von Bid, einem Mitglied der Bcl-2 Familie, steht (Stoka *et al.*, 2001). Als potenzieller Inhibitor von Cat L könnte Hurpin somit an der Regulation von apoptotischen Prozessen, die durch die lysosomale Cystein-Protease Cat L-vermittelt werden, beteiligt sein.

Für mehrere Ov-Serpine wurde die Beteiligung an der Regulation der Apoptose bereits beschrieben. Suminami *et al.* stellten in einer SCCA 1 überexprimierenden SCC-Zelllinie eine verringerte Apoptose fest, die durch Camptothecin, TNF α oder NK-Zellen induziert worden war (Suminami *et al.*, 2000). Sun *et al.* zeigten die spezifische Inhibition von Granzym B, einer proapoptotischen Serinprotease, durch PI9 (Sun *et al.*, 1996).

Auf Grund der funktionellen Analysen und der Expressionsprofile in pathologischen und physiologischen Situationen der humanen Epidermis wird für Hurpin die Beteiligung an antiapoptotischen Prozessen diskutiert. Hierbei deuten erste Experimente mit stabil Hurpin-transfizierten Keratinozyten auf eine Verminderung der UVB-induzierten Apoptose hin (Blum und Abts, persönliche Mitteilungen).

Mittels Expressionsanalysen von 10 BCC und 2 SCC konnte die Überexpression von Hurpin in 5 BCC und in 1 SCC (Abbildungen 7) nachgewiesen werden. Hypothetisch könnte die Überexpression von Hurpin in transformierten Zellen diese vor Apoptose schützen. Karzinogene Eigenschaften dysregulierter Ov-Serpine wurden eingehend für die SCC-Antigene beschrieben. Das Plattenepithelkarzinom-assoziierte SCCA 1 weist eine 58%-ige Aminosäurehomologie zu Hurpin auf und ähnelt Hurpin bezüglich des Expressionsprofils und der Inhibition von Cat L. Neueste Untersuchungen von Suminami *et al.* zeigten, dass die antiapoptotische Wirkung von SCCA 1 zur Tumorprogression und zum Wachstum von SCC beiträgt (Suminami *et al.*, 2000). Des weiteren zeigen SCCA 1 überexprimierende Tumorzellen auch eine antichemotaktische Wirkung auf NK-Zellen (Suminami *et al.*, 2001). Dadurch entziehen sich die neoplastischen Zellen der Abwehr durch das körpereigene Immunsystem.

Der Induktion von Hurpin in BCC steht die Repression der Genexpression in 7 von 8 verschiedenen SCC-Zelllinien im Vergleich zu HaCaT-Zellen (Abbildung 8) gegenüber. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind mit denen von Spring *et al.* (1999) konform, wonach Headpin in SCC der Mundschleimhaut verringert exprimiert wird (Spring *et al.*, 1999). Diese Arbeitsgruppe mutmaßt,

dass Headpin in die Differenzierung des Plattenepithels involviert ist (Spring *et al.*, 1999).

Da die terminale Differenzierung epidermaler Keratinozyten in Form eines programmierten Zelltods wesentliche Merkmale mit der Apoptose gemein hat, wird auch eine Beteiligung von Hurpin an der Differenzierung epidermaler Keratinozyten diskutiert. Untersuchungen an Mäusen, in denen die Genexpression von Cat L abgeschaltet wurde, zeigten, dass dies zu einer Störung der epidermalen Homöostase führt (Roth *et al.*, 2000). Phänotypisch fallen diese Cat L-„knock out“ Mäuse durch periodischen Verlust der Haare, epidermale Hyperplasien, Akanthosen und Hyperkeratosen auf. Roth und Mitarbeiter vermuten in der Haut dieser Mäuse die Verschiebung der epidermalen Homöostase zu Gunsten der Proliferation (Roth *et al.*, 2000).

Postuliert man, dass die Funktionen von Cat L im murinen und humanen System ähnlich sind, ist es denkbar, dass eine pathologisch-bedingte Überexpression von Hurpin zu verstärkter Inhibition von Cat L führt und somit ähnliche Phänotypen wie in den Cat L-„knock out“ Mäusen hervorrufen könnte.

Ein weiteres Indiz für die mögliche Beteiligung von Hurpin an der terminalen Differenzierung wird durch Expressionsstudien in psoriatischen Läsionen geliefert. Die Psoriasis oder Schuppenflechte ist eine humane Erkrankung, die in Europa mit einer Inzidenz von 2% sehr häufige ist. Hauptmerkmal der Psoriasis ist eine verzögerte Reifung der Keratinozyten in Folge einer gestörten terminalen Differenzierung. In psoriatischen Läsionen wurden im Vergleich zur Expression in gesunder Haut 10-14-fach erhöhte Hurpin-Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR detektiert (Abts *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte mittels RNA *in situ* Hybridisierung diese Überexpression von Hurpin in psoriatischen Läsionen in allen Schichten der Epidermis nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Einbindung von Hurpin in Prozesse der epidermalen Differenzierung sollen in nächster Zukunft an transgenen Mäusen untersucht werden, in denen das humane Hurpingen gezielt in der murinen Epidermis überexprimiert wird.

4.3. Ausblick

Weiterführende Charakterisierungen der detektierten BCC-assoziierten Gene auf RNA- und Proteinebene sind zukünftige Projekte, die aus dieser initialen Arbeit entstehen. Von besonderem Interesse sind hierbei Untersuchungen solcher Gene, von denen bisher keine Transkripte voller Länge und keine funktionellen Daten vorliegen. Die Suche nach Transkripten voller Länge in einer cDNA-Bibliothek, hergestellt aus Keratinozyten-mRNA, und die weiterführenden genetischen und biochemischen Charakterisierungen dieser Gene sind somit Schwerpunkte nachfolgender Arbeiten.

Die Ausdehnung der Analysen auf weitere epitheliale Tumore des Menschen bietet die Möglichkeit, die hier im Kontext mit Hauttumoren beschriebenen Gene auch in dem Zusammenhang anderer Verlaufsformen der Karzinogenese zu untersuchen. Stellt sich hierbei ein Gen als möglicher molekularer Marker für bestimmte Differenzierungsgrade, die Aggressivität oder das Metastasierungspotenzial von Tumoren heraus, soll die mögliche Beteiligung dieses Gens an der Karzinogenese in Tiermodellen untersucht werden.

Innerhalb des Sonderforschungsbereiches 503/ Teilprojekt A1 soll die Funktion von Hurpin näher analysiert werden. Mit Hilfe der Immunhistologie soll in verschiedenen hyperproliferativen, epidermalen Erkrankungen die mögliche differenzielle Expression auf Proteinebene untersucht werden. Dadurch könnten weitere Hinweise für eine Korrelation zwischen der Hurpinexpression und einer gestörten epidermalen Homöostase gesammelt werden. Des Weiteren sollen in transfizierte Keratinozyten die Wirkung der Überexpression von Hurpin auf apoptotische Prozesse, z.B. nach UVB-Bestrahlung der Zellen, eingehender studiert werden.

Die Untersuchungen an Hurpin befinden sich an der Schnittstelle von *in vitro* zu *in vivo* Versuchen. In Kooperation mit Frau Prof. Knust (Institut für Genetik, Heinrich-Heine Universität) findet derzeit die Generierung von Hurpin-transgenen *Drosophila* statt. Dieses initiale Experiment soll die mögliche Beteiligung von Hurpin an entwicklungsbiologischen Prozessen klären.

Darüber hinaus sind Experimente an Vertebraten von großer Bedeutsamkeit, da deren Haut am ehesten den Aufbau der humanen Haut widerspiegeln. Durch gezielte Überexpression von Hurpin in der Epidermis von vitalen, transgenen Mäusen soll hierbei die funktionelle Bedeutung von Hurpin untersucht werden. Bezüglich UV-induzierbarer Hauttumoren könnten Bestrahlungsexperimente mit Hurpin-transgenen Mäusen eine mögliche Korrelation zwischen der Überexpression und der UV-Karzinogenese von BCC und SCC klären.

5. Zusammenfassung

Basalzellkarzinome (BCC) und Plattenepithelkarzinome (SCC) sind die häufigsten bösartigen Krebserkrankungen in der kaukasischen Weltbevölkerung. Obwohl die Sterblichkeitsrate dieser Tumoren relativ niedrig ist, sind sie aufgrund des destruktiven und invasiven Wachstums für die betroffenen Patienten problematisch und belastend. Die Transformation eines normalen Keratinozyten in eine neoplastische Tumorzelle verläuft nicht spontan, sondern im Rahmen einer Mehrschrittkarzinogenese. Bis heute sind die vielfältigen, molekularen Prozesse, die zu der Pathophysiologie von BCC und SCC beitragen, nicht vollständig geklärt. Die Kenntnis aller an der Karzinogenese beteiligten Gene bietet hier die Möglichkeit einer besseren Diagnostik und einer spezifischeren, individuelleren Therapie der betroffenen Patienten.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Expressionsprofile von BCC und gesunder Haut mittels zweier unterschiedlicher Ansätze der Expressionsprofilierung verglichen. Mit Hilfe der „Differential Display“-RT-PCR wurde in diesem Kontext die differenzielle Expression von 54 Genen festgestellt, von denen 25 cDNA-Sequenzen kloniert wurden. Nach Homologiesuchen in der EMBL-Genbank wurden für 9 Klone Übereinstimmung mit bereits beschriebenen Genen festgestellt, während die übrigen isolierten cDNA-Klone Homologien zu funktionell bisher nicht beschriebenen „expressed sequence tags“ (EST) oder „sequence-tagged sites“ (STS) aufwiesen. Zum einen konnten durch diese Untersuchung bekannte Gene erstmals mit BCC assoziiert werden. Zum anderen bieten die Klone mit Homologien zu EST- oder STS-Fragmenten die Möglichkeit, bisher noch nicht beschriebene Gene funktionell zu charakterisieren.

Mittels differenzieller Hybridisierung von cDNA-Arrays und der anschließenden semiquantitativen RT-PCR-Analysen von 10 selektierten Genen wurde für 5 die Beteiligung an der Pathogenese von BCC und SCC festgestellt. Diese Gene, die mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1, Glutaredoxin, der „Teratocarcinoma-derived growth factor“ Cripto, die Janus Tyrosin Kinase 3 und das Monozyten chemotaktische Protein-1, waren bisher noch nicht im Kontext der Karzinogenese von BCC und SCC diskutiert worden. Aufgrund ihrer Funktion könnten die hier festgestellten Fehlregulationen an unterschiedlichen Stellen zur Karzinogenese beitragen.

Die differenzielle Expression des bereits in früheren Arbeiten von mir beschriebenen BCC-assoziierten Gens für das heterogene-RNA-bindende-Protein D0 (hnRNP D0) wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mittels Western-Blot-Analysen und immunhistochemischer Untersuchung auf Proteinebene nachgewiesen. Das ubiquitär exprimierte hnRNP D0 ist in die posttranskriptionelle Regulation von mRNAs mit A und U-reichen Elementen im 3'-untranslatierten Bereich, wie sie unter anderem in Proto-Onkogenen auftreten, involviert. Die Dysregulation von hnRNP D0 könnte somit zur Störung

der posttranskriptionellen Regulation anderer Gene führen und derart zur Karzinogenese beitragen.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die genetische und funktionelle Charakterisierung des neuen Serinprotease-Inhibitors (Serpins) Hurpin. Durch semiquantitative RT-PCR-Analysen wurde die fehlregulierte Expression von Hurpin in BCC und SCC festgestellt. Unter Verwendung unterschiedlicher molekulargenetischer Methoden konnte erstmals das Gen für Hurpin identifiziert und die chromosomale Lokalisation bestimmt werden. Das ca. 13 kb grosse Hurpingen zeigt dabei die typische genomische Organisation der Mitglieder der Ov-Serpinfamilie, die ebenfalls auf dem langen Arm von Chromosom 18 lokalisiert sind.

Initiale funktionelle Analysen des hier erstmals rekombinant exprimierten Hurpins deuteten auf dessen Fähigkeit der Inhibition von Proteasen hin. Mittels im Rahmen dieser Arbeit etablierter Protease-Inhibitionsassays konnte eine klassenübergreifende Inhibition der Cysteinprotease Cathepsin L durch Hurpin nachgewiesen werden. Darüber hinaus durchgeführte Protease-Inhibitionsassays mit mutierten Hurpin-Varianten, welche in funktionell entscheidenden Bereichen verändert waren, zeigten, dass Cathepsin L nach Serpin-typischer Konformationsänderung von Hurpin inhibiert wird. Durch diese Daten konnte Hurpin eindeutig als inhibitorisches Serpin charakterisiert werden. Aufgrund der starken Expression von Hurpin in hochproliferativen Keratinozyten und der Inhibition von Cathepsin L, welche möglicherweise proapoptische Funktion besitzt, wird für Hurpin eine Beteiligung an Prozessen des programmierten Zelltods, wie der Apoptose oder der terminalen Differenzierung epidermaler Zellen, angenommen. In zukünftigen Versuchen, welche *in vitro* an Zelllinien und *in vivo* an Mäusen durchgeführt werden, soll die mögliche antiapoptotische Wirkung von Hurpin aufgeklärt werden.

6. Literatur

Abts H.F., Breuhahn K., Michel G., Kohrer K., Esser P., & Ruzicka T. (1997) Analysis of UVB-modulated gene expression in human keratinocytes by mRNA differential display polymerase chain reaction. *Photochem.Photobiol.* 66, 363-367.

Abts H.F., Welss T., Mirmohammadsadegh A., Kohrer K., Michel G., & Ruzicka T. (1999) Cloning and characterization of hurpin (protease inhibitor 13): A new skin-specific, UV-repressible serine proteinase inhibitor of the ovalbumin serpin family. *J.Mol.Biol.* 293, 29-39.

Abts H.F., Welss T., Scheuring S., Scott F.L., Irving J.A., Michel G., Bird P.I., & Ruzicka T. (2001) Sequence, organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human serine protease inhibitor gene hurpin (PI13) which is upregulated in psoriasis. *DNA Cell Biol.* 20, 123-131.

Aringer M., Cheng A., Nelson J.W., Chen M., Sudarshan C., Zhou Y.J., & O'Shea J.J. (1999) Janus kinases and their role in growth and disease. *Life Sci.* 64, 2173-2186.

Ashida N., Arai H., Yamasaki M., & Kita T. (2001) Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *J.Biol.Chem.* 276, 16555-16560.

Barker J.N., Jones M.L., Swenson C.L., Sarma V., Mitra R.S., Ward P.A., Johnson K.J., Fantone J.C., Dixit V.M., & Nickoloff B.J. (1991) Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. *J.Immunol.* 146, 1192-1197.

Bianco C., Kannan S., De Santis M., Seno M., Tang C.K., Martinez-Lacaci I., Kim N., Wallace-Jones B., Lippman M.E., Ebert A.D., Wechselberger C., & Salomon D.S. (1999) Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erb B-4 through a novel receptor. *J.Biol.Chem.* 274, 8624-8629.

Bird P.I. (1998) Serpins and regulation of cell death. *Results Probl.Cell Differ.* 24, 63-89.

Bjornstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B., & Holmgren A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J.Biol.Chem.* 269, 29382-29384.

Boonchai W., Green A., Ng J., Dicker A., & Chenevix-Trench G. (2000) Basal cell carcinoma in chronic arsenicism occurring in Queensland, Australia, after ingestion of an asthma medication. *J.Am.Acad.Dermatol.* 43, 664-669.

Borges A.M. & Naresh K.N. (2000) The adhesion molecule expression pattern of basal cell carcinoma cells should be compared with outer root sheath cells of hair follicle and not with stratum basale of skin. *Hum.Pathol.* 31, 1181-1182.

Boukamp P., Popp S., Altmeyer S., Hulsen A., Fasching C., Cremer T., & Fusenig N.E. (1997) Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes.Cancer* 19, 201-214.

Brandt R., Normanno N., Gullick W.J., Lin J.H., Harkins R., Schneider D., Jones B.W., Ciardiello F., Persico M.G., Armenante F., & . (1994) Identification and biological characterization of an epidermal growth factor-related protein: cripto-1. *J.Biol.Chem.* 269, 17320-17328.

Brash D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., Halperin A.J., & Ponten J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 10124-10128.

Brash D.E., Ziegler A., Jonason A.S., Simon J.A., Kunala S., & Leffell D.J. (1996) Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1, 136-142.

Buettner P.G. & Raasch B.A. (1998) Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. *Int.J.Cancer* 78, 587-593.

Buzby J.S., Lee S.M., Van Winkle P., DeMaria C.T., Brewer G., & Cairo M.S. (1996) Increased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA instability in cord versus adult mononuclear cells is translation- dependent and associated with increased levels of A + U-rich element binding factor. *Blood* 88, 2889-2897.

Carr M.W., Roth S.J., Luther E., Rose S.S., & Springer T.A. (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 3652-3656.

Chapman H.A., Riese R.J., & Shi G.P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu.Rev.Physiol* 59, 63-88.

Chuang T.L. & Schleef R.R. (1999) Identification of a nuclear targeting domain in the insertion between helices C and D in protease inhibitor-10. *J.Biol.Chem.* 274, 11194-11198.

Ciardiello F., Tortora G., Bianco C., Selvam M.P., Basolo F., Fontanini G., Pacifico F., Normanno N., Brandt R., Persico M.G., & . (1994) Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides. *Oncogene* 9, 291-298.

Cooke M.S., Mistry N., Ladapo A., Herbert K.E., & Lunec J. (2000) Immunochemical quantitation of UV-induced oxidative and dimeric DNA damage to human keratinocytes. *Free Radic.Res.* 33, 369-381.

Daily D., Vlamis-Gardikas A., Offen D., Mittelman L., Melamed E., Holmgren A., & Barzilai A. (2001) Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *J.Biol.Chem.* 276, 1335-1344.

- DeMaria C.T. & Brewer G. (1996) AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J.Biol.Chem.* 271, 12179-12184.
- Deng W.P. & Nickoloff J.A. (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal.Biochem.* 200, 81-88.
- Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A.K., Moore M., Finlay C., & Levine A.J. (1993) Gain of function mutations in p53. *Nat.Genet.* 4, 42-46.
- Dumaz N., Drougard C., Sarasin A., & Daya-Grosjean L. (1993) Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 10529-10533.
- Ebert A.D., Wechselberger C., Nees M., Clair T., Schaller G., Martinez-Lacaci I., Wallace-Jones B., Bianco C., Weitzel H.K., & Salomon D.S. (2000) Cripto-1-induced increase in vimentin expression is associated with enhanced migration of human Caski cervical carcinoma cells. *Exp.Cell Res.* 257, 223-229.
- El Deiry W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin.Cancer Biol.* 8, 345-357.
- Esterbauer H., Eckl P., & Ortner A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat.Res.* 238, 223-233.
- Faus I., Hsu H.J., & Fuchs E. (1994) Oct-6: a regulator of keratinocyte gene expression in stratified squamous epithelia. *Mol.Cell Biol.* 14, 3263-3275.
- Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132, 6-13.
- Feng J., Witthuhn B.A., Matsuda T., Kohlhuber F., Kerr I.M., & Ihle J.N. (1997) Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol.Cell Biol.* 17, 2497-2501.
- Fisher M.S. & Kripke M.L. (1977) Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 1688-1692.
- Furstenberger G., Csuk-Glanzer B.I., Marks F., & Keppler D. (1994) Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 15, 2823-2827.
- Gadina M., Stancato L.M., Bacon C.M., Lerner A.C., & O'Shea J.J. (1998) Involvement of SHP-2 in multiple aspects of IL-2 signaling: evidence for a positive regulatory role. *J.Immunol.* 160, 4657-4661.
- Gettins P.G. (2000) Keeping the serpin machine running smoothly. *Genome Res.* 10, 1833-1835.
- Grossman D. & Leffell D.J. (1997) The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch.Dermatol.* 133, 1263-1270.

Günther, T. (2001) Untersuchungen zur Funktion und Regulation von Serinproteaseinhibitoren (Serpinen) in humanen Keratinozyten. Diplomarbeit im Rahmen der Diplom-Hauptprüfung der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Fachbereich Biologie.

Hirota K., Matsui M., Murata M., Takashima Y., Cheng F.S., Itoh T., Fukuda K., & Yodoi J. (2000) Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF- κ B, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 274, 177-182.

Holmgren A. & Karlsson G.B. (1978) Function of thioredoxin in oxidoreductions and as a subunit of phage-T7 deoxyribonucleic acid polymerase. *Biochem.Soc.Trans.* 6, 50-52.

Huntington J.A., Fan B., Karlsson K.E., Deinum J., Lawrence D.A., & Gettins P.G. (1997) Serpin conformational change in ovalbumin. Enhanced reactive center loop insertion through hinge region mutations. *Biochemistry* 36, 5432-5440.

Ihle J.N. & Kerr I.M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11, 69-74.

Ishikawa F., Matunis M.J., Dreyfuss G., & Cech T.R. (1993) Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)n. *Mol.Cell Biol.* 13, 4301-4310.

Ishisaka R., Utsumi T., Kanno T., Arita K., Katunuma N., Akiyama J., & Utsumi K. (1999) Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct.Funct.* 24, 465-470.

Ishisaka R., Utsumi T., Yabuki M., Kanno T., Furuno T., Inoue M., & Utsumi K. (1998) Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Lett.* 435, 233-236.

Jakobsson P.J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A., & Persson B. (2000) Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 161, S20-S24.

Johnston J.A., Wang L.M., Hanson E.P., Sun X.J., White M.F., Oakes S.A., Pierce J.H., & O'Shea J.J. (1995) Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J.Biol.Chem.* 270, 28527-28530.

Johnson R.L., Rothman A.L., Xie J., Goodrich L.V., Bare J.W., Bonifas J.M., Quinn A.G., Myers R.M., Cox D.R., Epstein E.H., Jr., & Scott M.P. (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.

- Kajita Y., Nakayama J., Aizawa M., & Ishikawa F. (1995) The UAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0. Common modular structure and binding properties of the 2xRBD-Gly family. *J.Biol.Chem.* 270, 22167-22175.
- Kannan S., De Santis M., Lohmeyer M., Riese D.J., Smith G.H., Hynes N., Seno M., Brandt R., Bianco C., Persico G., Kenney N., Normanno N., Martinez-Lacaci I., Ciardiello F., Stern D.F., Gullick W.J., & Salomon D.S. (1997) Cripto enhances the tyrosine phosphorylation of Shc and activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in mammary epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 272, 3330-3335.
- Karagas M.R., Greenberg E.R., Spencer S.K., Stukel T.A., & Mott L.A. (1999b) Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int.J.Cancer* 81, 555-559.
- Kato H., Morioka H., Aramaki S., & Torigoe T. (1979) Radioimmunoassay for tumor-antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cell Mol.Biol.* 25, 51-56.
- Kiledjian M., DeMaria C.T., Brewer G., & Novick K. (1997) Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. *Mol.Cell Biol.* 17, 4870-4876.
- Komiyama T., Ray C.A., Pickup D.J., Howard A.D., Thornberry N.A., Peterson E.P., & Salvesen G. (1994) Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J.Biol.Chem.* 269, 19331-19337.
- Kraemer K.H. (1997) Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 11-14.
- Kruger K., Blume-Peytavi U., & Orfanos C.E. (1999) Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle. *Arch.Dermatol.Res.* 291, 253-259.
- Laemmli U.K. (1970), *Nature* 227, 37-44
- Lane D.P. & Benchimol S. (1990) p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.* 4, 1-8.
- Lear J.T., Smith A.G., Bowers B., Heagearty A.H., Jones P.W., Gilford J., Aldersea J., Strange R.C., & Fryer A.A. (1997) Truncal tumor site is associated with high risk of multiple basal cell carcinoma and is influenced by glutathione S-transferase, GSTT1, and cytochrome P450, CYP1A1 genotypes, and their interaction. *J.Invest Dermatol.* 108, 519-522.
- Lee S.H. & DeJong J. (1999) Microsomal GST-I: genomic organization, expression, and alternative splicing of the human gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1446, 389-396.

Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

Levine A.J., Momand J., & Finlay C.A. (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.

Li J., Farthing P.M., & Thornhill M.H. (2000) Oral and skin keratinocytes are stimulated to secrete monocyte chemoattractant protein-1 by tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *J.Oral Pathol.Med.* 29, 438-444.

Loebermann H., Tokuoka R., Deisenhofer J., & Huber R. (1984) Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J.Mol.Biol.* 177, 531-557.

Loflin P., Chen C.Y., & Shyu A.B. (1999) Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 13, 1884-1897.

Longstreth J., de Gruijl F.R., Kripke M.L., Abseck S., Arnold F., Slaper H.I., Velders G., Takizawa Y., & van der Leun J.C. (1998) Health risks. *J.Photochem.Photobiol.B* 46, 20-39.

Luke C., Schick C., Tsu C., Whisstock J.C., Irving J.A., Bromme D., Juliano L., Shi G.P., Chapman H.A., & Silverman G.A. (2000) Simple modifications of the serpin reactive site loop convert SCCA2 into a cysteine proteinase inhibitor: a critical role for the P3' proline in facilitating RSL cleavage. *Biochemistry* 39, 7081-7091.

Mast A.E., Enghild J.J., Pizzo S.V., & Salvesen G. (1991) Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1- antichymotrypsin, antithrombin III, alpha 2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry* 30, 1723-1730.

Mellado M., Rodriguez-Frade J.M., Aragay A., del Real G., Martin A.M., Vila-Coro A.J., Serrano A., Mayor F., Jr., & Martinez A. (1998) The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J.Immunol.* 161, 805-813.

Metters K.M., Sawyer N., & Nicholson D.W. (1994) Microsomal glutathione S-transferase is the predominant leukotriene C4 binding site in cellular membranes. *J.Biol.Chem.* 269, 12816-12823.

Miller S.J. (1991) Biology of basal cell carcinoma (Part I). *J.Am.Acad.Dermatol.* 24, 1-13.

Morgenstern R., Guthenberg C., & Depierre J.W. (1982) Microsomal glutathione S-transferase. Purification, initial characterization and demonstration that it is not identical to the cytosolic glutathione S-transferases A, B and C. *Eur.J.Biochem.* 128, 243-248.

Mosialou E., Piemonte F., Andersson C., Vos R.M., van Bladeren P.J., & Morgenstern R. (1995) Microsomal glutathione transferase: lipid-derived substrates and lipid dependence. *Arch.Biochem.Biophys.* 320, 210-216.

Nakamura K., Williams I.R., & Kupper T.S. (1995) Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J.Invest Dermatol.* 105, 635-643.

Nakashima T., Pak S.C., Silverman G.A., Spring P.M., Frederick M.J., & Clayman G.L. (2000) Genomic cloning, mapping, structure and promoter analysis of HEADPIN, a serpin which is down-regulated in head and neck cancer cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1492, 441-446.

Nawata S., Nakamura K., Tanaka T., Numa F., Suminami Y., Tsunaga N., Kakegawa H., Katunuma N., & Kato H. (1997) Electrophoretic analysis of the "cross-class" interaction between novel inhibitory serpin, squamous cell carcinoma antigen-1 and cysteine proteinases. *Electrophoresis* 18, 784-789.

Nishio H., Matsui K., Tsuji H., Tamura A., & Suzuki K. (2001) Immunolocalisation of the janus kinases (JAK)--signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway in human epidermis. *J.Anat.* 198, 581-589.

Oh H.S. & Smart R.C. (1998) Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J.Invest Dermatol.* 110, 939-945.

Park J.B. & Levine M. (1996) Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. *Biochem.J.* 315 (Pt 3), 931-938.

Pervaiz S., Cao J., Chao O.S., Chin Y.Y., & Clement M.V. (2001) Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* 20, 6263-6268.

Petersen A.B., Gniadecki R., Vicanova J., Thorn T., & Wulf H.C. (2000) Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *J.Photochem.Photobiol.B* 59, 123-131.

Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., & Vogelstein B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.

Punnonen K., Puntala A., & Ahotupa M. (1991) Effects of ultraviolet A and B irradiation on lipid peroxidation and activity of the antioxidant enzymes in keratinocytes in culture. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* 8, 3-6.

Remold-O'Donnell E. (1993) The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett.* 315, 105-108.

- Rich T., Allen R.L., & Wyllie A.H. (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.
- Riewald M. & Schleef R.R. (1996) Human cytoplasmic antiproteinase neutralizes rapidly and efficiently chymotrypsin and trypsin-like proteases utilizing distinct reactive site residues. *J.Biol.Chem.* 271, 14526-14532.
- Roth W., Deussing J., Botchkarev V.A., Pauly-Evers M., Saftig P., Hafner A., Schmidt P., Schmahl W., Scherer J., Anton-Lamprecht I., Von Figura K., Paus R., & Peters C. (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 14, 2075-2086.
- Russell M. & Hoeffler J.P. (1996) Signal transduction and the regulation of cell growth. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1, 119-122.
- Salomon D.S., Bianco C., & De Santis M. (1999) Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia. *Bioessays* 21, 61-70.
- Salomon D.S., Bianco C., Ebert A.D., Khan N.I., De Santis M., Normanno N., Wechselberger C., Seno M., Williams K., Sanicola M., Foley S., Gullick W.J., & Persico G. (2000) The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. *Endocr.Relat Cancer* 7, 199-226.
- Salzet M., Vieau D., & Stefano G.B. (1999) Serpins: an evolutionarily conserved survival strategy. *Immunol.Today* 20, 541-544.
- Schechter I. & Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 27, 157-162.
- Schick C., Pemberton P.A., Shi G.P., Kamachi Y., Cataltepe S., Bartuski A.J., Gornstein E.R., Bromme D., Chapman H.A., & Silverman G.A. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 37, 5258-5266.
- Schmidt-Krey I., Mitsuoka K., Hirai T., Murata K., Cheng Y., Fujiyoshi Y., Morgenstern R., & Hebert H. (2000) The three-dimensional map of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution. *EMBO J.* 19, 6311-6316.
- Scott F.L., Eyre H.J., Lioumi M., Ragoussis J., Irving J.A., Sutherland G.A., & Bird P.I. (1999) Human ovalbumin serpin evolution: phylogenetic analysis, gene organization, and identification of new PI8-related genes suggest that two interchromosomal and several intrachromosomal duplications generated the gene clusters at 18q21-q23 and 6p25. *Genomics* 62, 490-499.
- Seitz C.S., Lin Q., Deng H., & Khavari P.A. (1998) Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 2307-2312.

Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Coughlin P.B., Gettins P.G., Irving J.I., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J., & Whisstock J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J.Biol.Chem.* 276, 33292-33296

Shibamoto S., Hayakawa M., Takeuchi K., Hori T., Oku N., Miyazawa K., Kitamura N., Takeichi M., & Ito F. (1994) Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes.Commun.* 1, 295-305.

Spring P., Nakashima T., Frederick M., Henderson Y., & Clayman G. (1999) Identification and cDNA cloning of headpin, a novel differentially expressed serpin that maps to chromosome 18q. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 264, 299-304.

Starke D.W., Chen Y., Bapna C.P., Lesnefsky E.J., & Miessler J.J. (1997) Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* 23, 373-384.

Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Özman T., Snipas S.J., Ellerby L.M., Bredesen D., Freeze H., Abrahamson M., Bromme D., Krajewski S., Reed J.C., Yin X.M., Turk V., & Salvesen G.S. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J.Biol.Chem.* 276, 3149-3157.

Stratikos E. & Gettins P.G. (1997) Major proteinase movement upon stable serpin-proteinase complex formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 453-458.

Suminami Y., Nagashima S., Murakami A., Nawata S., Gondo T., Hirakawa H., Numa F., Silverman G.A., & Kato H. (2001) Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res.* 61, 1776-1780.

Suminami Y., Nagashima S., Vujanovic N.L., Hirabayashi K., Kato H., & Whiteside T.L. (2000) Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br.J.Cancer* 82, 981-989.

Sun J., Bird C.H., Sutton V., McDonald L., Coughlin P.B., De Jong T.A., Trapani J.A., & Bird P.I. (1996) A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 271, 27802-27809.

Sun J., Stephens R., Mirza G., Kanai H., Ragoussis J., & Bird P.I. (1998) A serpin gene cluster on human chromosome 6p25 contains PI6, PI9 and ELANH2 which have a common structure almost identical to the 18q21 ovalbumin serpin genes. *Cytogenet.Cell Genet.* 82, 273-277.

- Sun J., Whisstock J.C., Harriott P., Walker B., Novak A., Thompson P.E., Smith A.I., & Bird P.I. (2001) Importance of the P4' residue in human granzyme B inhibitors and substrates revealed by scanning mutagenesis of the proteinase inhibitor 9 reactive center loop. *J.Biol.Chem.* 276, 15177-15184.
- Szepietowski J.C., Walker C., McKenna D.B., Hunter J.A., & McKenzie R.C. (2001) Leukaemia inhibitory factor and interleukin-8 expression in nonmelanoma skin cancers. *Clin.Exp.Dermatol.* 26, 72-78.
- Takeuchi T., Furihata M., Heng H.H., Sonobe H., & Ohtsuki Y. (1998) Chromosomal mapping and expression of the human B120 gene. *Gene* 213, 189-193.
- Tolnay M., Baranyi L., & Tsokos G.C. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 contains transactivator and DNA-binding domains. *Biochem.J.* 348 Pt 1, 151-158.
- Tolnay M., Vereshchagina L.A., & Tsokos G.C. (1999) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0B is a sequence-specific DNA-binding protein. *Biochem.J.* 338 (Pt 2), 417-425.
- Travis J. & Salvesen G.S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu.Rev.Biochem.* 52, 655-709.
- Van Hogerlinden M., Rozell B.L., Ahrlund-Richter L., & Toftgard R. (1999) Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.* 59, 3299-3303.
- Vural P., Canbaz M., & Selcuki D. (1999) Plasma antioxidant defense in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* 13, 96-101.
- Wagner B.J., DeMaria C.T., Sun Y., Wilson G.M., & Brewer G. (1998) Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48, 195-202.
- Weinstock M.A. (1993) Nonmelanoma skin cancer mortality in the United States, 1969 through 1988. *Arch.Dermatol.* 129, 1286-1290.
- Wells W.W., Yang Y., Deits T.L., & Gan Z.R. (1993) Thioltransferases. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 66, 149-201.
- Welss T. (1997) Analysen zur differentiellen Genexpression humaner Keratinozyten in physiologischen und pathologischen Situationen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Yoshimura T., Yuhki N., Moore S.K., Appella E., Lerman M.I., & Leonard E.J. (1989) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244, 487-493.
- Zhang M.Q. (1998) Identification of human gene core promoters in silico. *Genome Res.* 8, 319-326.

Zhang W., Wagner B.J., Ehrenman K., Schaefer A.W., DeMaria C.T., Crater D., DeHaven K., Long L., & Brewer G. (1993) Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol.Cell Biol.* 13, 7652-7665.

Zhou H.M., Bolon I., Nichols A., Wohlwend A., & Vassalli J.D. (2001) Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice. *Cancer Res.* 61, 970-976.

Zhou Y.J., Hanson E.P., Chen Y.Q., Magnuson K., Chen M., Swann P.G., Wange R.L., Changelian P.S., & O'Shea J.J. (1997) Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 13850-13855.

Publikationsliste

Abts HF., **Welss T.**, Mirmohammadsadegh A., Köhrer K., Michel G., & Ruzicka T. (1999) Cloning and characterization of hurpin (Protease Inhibitor 13): a new skin specific, UV-repressible serine protease inhibitor of the ovalbumin serpin family. *J. Mol.Biol.* 293, 29-39

Abts H. F., **Welss T.**, Breuhahn K., Ruzicka T. (2000) UVB-regulated gene expression in human keratinocytes: Analysis by differential display. In: *Stress Response. Methods and Protocols.* S. M. Keyse, editor. HUMANA Press, Totowa, N.J. 347-366

Abts H.F., **Welss T.**, Scheuring S., Scott F.L., Irving J.A., Michel G., Bird P.I., & Ruzicka T. (2001) Sequence, organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human serine protease inhibitor gene hurpin (PI13) which is upregulated in psoriasis. *DNA Cell Biol.* 20, 123-131.

Welss T., Sun J., Irving J. A., Bird P. I., Pike R. N., Ruzicka T., & Abts H. F. The novel ov-serpin Hurpin (PI13, Serpin B13) is a potent cross class inhibitor of the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L. Eingereicht bei *J.Biol.Chem.*

Welss T., Papoutsaki M., Reifenberger J., Michel G., Ruzicka T., & Abts H. F. Molecular basis of Basal Cell Carcinom: Analysis of differential gene expression by differential display PCR and expression arrays. Eingereicht bei *Int.J.Cancer*

“Abstracts”

Welss T., Scheuring S., Michel G., Ruzicka T., & Abts H. F. (1998) Molecular basis of Basal Cell Carcinoma: Analysis of differential gene expression in malignant and non-malignant keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.* 110, 519

Welss T., Reifenberger J., Michel G., Ruzicka T., & Abts H. F. (1999) Differential gene expression in Basal Cell Carcinoma: Analysis by differential display PCR and cDNA expression arrays. 29th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Montpellier.

Welss T., Papoutsaki M., Reifenberger J., Michel G., Ruzicka T., & Abts H. F. (2001) Molecular Basis of skin cancer: large scale analysis of differentially gene expression in BCC and SCC. *J.Invest.Dermatol.* 117, 780.

Abts H. F., **Welss T.**, Sun J., Pike R. N., Bird P. I., & Ruzicka T. (2001) Anti-apoptotic mechanisms in UV-mediated apoptosis: cross-class inhibition of the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L by the novel ov-serpin hurpin (PI13). *J.Invest.Dermatol.* 117, 787.

Papoutsaki M., Kosztolanyi R., Stege H., Krutmann J., **Welss T.**, Chimenti S., Ruzicka T., & Abts H. F. (2001) DNA damage mediates downregulation of the UV-repressible serpin hurpin (PI13) in HaCaT keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.* 117, 814.

Die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen stammen teilweise aus veröffentlichten Publikationen

Abbildung II: Gettins, 2000)

Abbildung 10, 11, 12, : Abts *et al.* (2001)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Hautklinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. h.c. Dr. med. Thomas Ruzicka und Herrn Dr. rer. nat. Harry F. Abts angefertigt

Herrn Professor Dr. h. c. Dr. med. Thomas Ruzicka danke ich für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre, sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und der Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Werner Kunz danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein herausgehobener Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Harry F. Abts für seine vorbildliche Unterstützung dieser Arbeit durch wertvolle Anregungen und stetige Diskussionsbereitschaft.

Darüber hinaus gilt ein besonderer Dank Herrn PD Dr. rer. Nat. Günter Michel für seine Hilfsbereitschaft in Fragen des Laboralltags und des "normalen Lebens" eines Wissenschaftlers.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Hautklinik für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihre Diskussionsbereitschaft. Mein Dank gilt besonders Rainer Blum, Roya Doroudi, Tanja Günther, Beata Jarzebska-Deussen, Rita Kosztolanyi, Kerstin Meinert, Alireza Mirmohammadsadegh, Anke Müschen, Marina Papoutsaki und Ronald Wolf.

Im Rahmen der funktionellen Analysen von Hurpin verweilte ich 3 Monate im Department of Biochemistry and Molecular Biology der Monash-University in Clayton, Australien. Dass diese Zeit äußerst ertragreich genutzt werden konnte verdanke ich vor allem Professor Phil I Bird, Cathy Bird, Ph. D. Juiru Sun, Ph. D. Fiona Scott, James Irving, Claire Hirst, Margaruite Buzza und George.

"Last but not least" danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern für die stete Unterstützung meiner Lehre und meinen Freunden, die mich bis hierher begleitet haben.

Lebenslauf

Zur Person

Thomas Weiß,
geboren am 08.03.1972
in Trier

Schulbildung

1978-1982	Barbara-Grundschule Trier
1982-1988	Treviris-Gymnasium Trier
1988-1991	Hindenburg-Gymnasium Trier. Abschluß: Abitur

Zivildienst

1991-1992	Rettungshelfer bei der Berufsfeuerwehr Trier
-----------	--

Hochschulstudium

1992:	Begin des Biologiestudiums (Diplom) an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
1995:	Vordiplom, Note: sehr gut
1995-1997:	Hauptstudium; Abschlußprüfungen in Biologischer Chemie (Hauptfach), Pflanzenphysiologie und Organischer Chemie
Jan. – Okt. 1997:	Diplomarbeit im Zytokinlabor der Hautklinik der Heinrich-Heine Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. h.c. Dr. med. Thomas Ruzicka mit dem Thema: "Analysen zur differentiellen Genexpression humaner Keratinozyten in physiologischen und pathologischen Situationen"
Okt 1997:	Abschluß als Diplom-Biologie, Gesamtnote: sehr gut
Seit Jan. 1998:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Zytokinlabor der Hautklinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Promotion unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. h.c. Dr. med. Thomas Ruzicka mit dem Thema: "Molekularbiologische Untersuchungen differenziell exprimierter Gene in Tumoren der humanen Epidermis"
Aug. – Nov. 2000:	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. P. I. Bird im Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der Monash University in Clayton, Australien.
Seit Dez. 2001:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung VTB Biochemie Haut der Firma Henkel KgaA.