"Molekularbiologische Untersuchungen zur Bedeutung von Kallikreinen und Serinproteinase-Inhibitoren für die Entstehung von Hautkrankheiten und Allergien. "

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Claudia Keil

geb. am 19.10.1980 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter

1. Prof. Dr. M.T. Stubbs

2. Prof. Dr. H.-J. Mägert

3. Prof. Dr. G. Fischer

Halle (Saale), 24.09.2012

Für meinen Opa Georg Sowade.

ZUSAMMENFASSUNG

Die äußerste Schicht der Haut, das Stratum corneum, ist eine effektive Barriere, die das Körperinnere vor chemischen, osmotischen, thermischen und mechanischen Einwirkungen sowie vor xenobiotischen Infektionen schützt. Die kontinuierliche Abschilferung der obersten Zellschichten ist ein Kallikrein katalysierter Prozess, welcher der Hautregeneration dient. Die Regulation der Kallikreinaktivität ist dabei für den Erhalt einer intakten Hautbarriere genauso wichtig wie ihre physiologische Funktion. Diverse Krankheitsbilder, wie atopische Dermatitis, Psoriasis vulgaris und das Netherton Syndrom gehen mit einer aberranten Kallikrein-Konzentration im Stratum corneum einher. Das humane Kallikreine 11 (hK11) wird zwar stark in der Haut exprimiert, über die physiologische, wie auch pathologische Bedeutung dieser Proteinase ist bisher jedoch wenig bekannt. Im Zuge dieser Arbeit wurde hK11 in maturer- und Pro-Form sowie in zwei N-terminal verkürzten Varianten in der Hefe *Pichia methanolica* zur Sekretion gebracht. Ebenfalls wurden auch die in der Haut vorkommenden Kallikreine hK5, hK7, hK8 und hK14 durch *P. methanolica* produziert. Die proteolytische Aktivität wurde durch Zymographie detektiert und mit Hilfe chromogener Peptidsubstrate in Aktivitätsuntersuchungen quantifiziert. Dabei zeigten alle hK11-Varianten eine nahezu identische Aktivität. Pro-hK11 wurde als Fusionsprotein mit Hexa-Histidin-tag exprimiert, durch Ni^{2+}-Affinitätschromatographie aus dem *P. methanolica* Kulturüberstand isoliert und nach Aktivierung mit Thermolysin in Aktivitätsstudien zur Bestimmung der kinetischen Parameter eingesetzt. Vergleichend dazu, wurde die Pro-Form von hK11 als natives Protein in CHO-Zellen sekretorisch exprimiert, durch Kationenaustausch-chromatographie gereinigt und ebenfalls in Aktivitätsstudien untersucht. Die Gegenüberstellung der kinetischen Parameter zeigte, dass beide rekombinanten Proteine einen annähernd gleichen K_m-Wert von ca. 1,5 mM haben. Jedoch ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von hK11 aus CHO-Zellen mit 2,1 µM/min etwa 6fach höher als für hK11 aus *P. methanolica*. Auch die katalytische Konstante und die Spezifitätskonstante waren für hK11 aus CHO-Zellen signifikant höher. Mit den durch CHO-Zellen exprimierten rekombinanten hK11 konnte in dieser Arbeit erstmals die Aktivitätshemmung durch Domänen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI nachgewiesen werden. Bei einem molaren Verhältnis zwischen Proteinase und Inhibitor von 1:10 wurden durch die Domänen 6 und 9 über 50% der Proteinaseaktivität gehemmt. Die Domänen 7-8 und 8 zeigten hingegen kaum einen Effekt. In weiterführenden Versuchen konnte für die LEKTI-Domäne (LD) 6 ein K_i-Wert von 0,63 µM ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zudem darauf hin, dass LD6 als gemischt nicht-kompetitiver Inhibitor gegenüber hK11 wirkt. Ergänzende Versuche zur Hemmung der hK7-Aktivität zeigten, dass die zusammenhängenden Domänen 7-8 einen effektiven Inhibitor dieses chymotrypsinähnlichen Kallikreins darstellen. Zudem bestätigen die Ergebnisse, dass die verschiedenen LEKTI-Domänen spezifisch die Aktivität von Mitgliedern der Kallikreinfamilie hemmen. Das Verständnis der Regulation der Kallikreinaktivität ermöglicht die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen eine Vielzahl entzündlicher Hautkrankheiten.

SUMMARY

The outermost layer of skin, the stratum corneum, is an effective barrier, which protects the inside of the body against chemical, osmotic, thermal and mechanical influences, as much as it protects against xenobiotic infections. The constant desquamation of the superficial cell layer is catalysed by kallikreins, which serves the regeneration of the skin. The regulation of the kallikrein-activity is just as important for the maintenance of the skin barrier, as there physiological functions are. Several skin diseases, for example atopic dermatitis, psoriasis vulgaris and the netherton syndrome go hand in hand with an abnormal kallikrein concentration in the stratum corneum. The human kallikrein 11 (hK11) is strongly expressed in the skin, however the physiological and pathological effect of this protease are rather unclear. In this thesis the mature form, the pro-form and two N-terminal truncated forms of hK11 were brought to secretion in the yeast *P. methanolica.* Furthermore, the kallikreins hK5, hK7, hK8 and hK14 found in the skin were also produced by *P. methanolica.* The proteolytic activity was detected by zymography and with the help of chromogenic peptidesubstrate quantified in activity experiments. All hK11 varieties showed near identical activity. Pro-hK11 was isolated as a fusion-protein with hexa-histidin-tag through Ni^{2+}-affinitychromatography from the *P. methanolica* culture supernatant and set after activation with thermolysin in activity-studies to the determination of kinetic parameters. Comparative, the pro-form of hK11 was expressed, as native protein, in CHO-cells, purified by cation-exchange chromatography and also analysed in activity-studies. The comparison of the kinetic parameter showed that both recombinant proteins have a nearly identical K_m-value of around 1.5 mM. However the maximum valocity V_{max} of hK11 from CHO cells (2,1 µM/min) is around 6 times higher than that of hK11 from *P. methanolica*. The catalytic constant and specific constant were also significantly higher for hK11 from CHO cells. With the hK11, that was recombinant expressed by CHO cells, the inhibtion of activity were able to be proven through domains of the serin-protease-inhibitor LEKTI. 50% of protease activity was inhibited by the domains 6 and 9 due to a protease to inhibitor relationship of 1:10. However the domains 7-8 and 8 showed hardly any effect. In further attempts it was possible to establish the K_i- value of 0,63 µM for the LEKTI domain (LD) 6. The results of this thesis point to the fact that LD6 is a mixed non-competitive inhibitor of hK11. Further inhibition studies of hK7 activity showed that the connected domains 7-8 present an effective inhibitor of this chymotrypsin-like kallikrein. The results also prove that different LEKTI-domains inhibit specific members of the kallikrein family. The understanding of kallikrein regulation allows the development of novel therapeutic strategies for the treatment of various skin disorders.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung 1

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut 2
1.2 Die humanen Gewebekallikreine 5
1.3 Kallikrein-katalysierte Prozesse in der Haut 8
1.3.1 Die Rolle von Kallikreinen bei der Desquamation 11
1.3.2 PAR-vermittelte Effekte 12
1.4 Regulationsmechanismen der Kallikreinaktivität 13
1.4.1 Transkriptionale Regulation 13
1.4.2 Regulation der Proteolytischen Aktivität 14
1.4.3 Endogene Kallikreininhibitoren 15
Elafin (Skin-derived Antileukoprotease / SKALP) 16
Sekretorischer Leukozyten-Proteinase-Inhibitor/SLPI 16
Lympho-epithelialer Kazal-Typ verwandter Inhibitor/LEKTI 17
SPINK9/LEKTI-2 19
1.5 Kallikrein bei entzündlichen Hautkrankheiten 19
Atopische Dermatitis 20
Psoriasis 21
Netherton Syndrom und Peeling Skin Syndrom 21
1.6 Ziele 23

2. Material und Methoden 24

2.1 Molekularbiologische Methoden 24
2.1.1 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Auftrennung 24
2.1.2 Nukleinsäureisolierung 24
Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen 24
Isolierung von Plasmid-DNA 25
Isolierung genomischer DNA aus *P. methanolica* 25
2.1.3 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren 25
2.1.4 PCR Anwendungen 25
Standard-PCR 25
Kolonie-PCR 27
RT-PCR 27
Sequenzier-PCR 27
2.1.5 Reinigung von DNA 28
Isolierung von DNA aus Agarosegelen 28
Aufeinigung von DNA über Silikagel 28
Aufreinigung durch DNA-Präzipitation 28
2.1.6 Modifikation von DNA 28

Restriktion 28
Ligation mit T4-DNA-Ligase 29
Ligation mit Topoisomerase 29
Linearisierung der Plasmid-DNA 29
2.1.7 DNA-Sequenzierung 29
2.2 Transformationsmethoden 29
Transformation von *E. coli*-Zellen 29
Transformation von *P. methanolica*-Zellen 30
Transfektion von CHO-Zellen 30
2.3 Mikrobiologische Arbeiten 30
2.3.1 *E. coli*-Kulturen 30
Allgemeine Kulturbedingungen 30
Herstellung kompetenter *E. coli* XL2 blue-Zellen 31
Expression der LEKTI-Domänen 31
2.3.2 *P. methanolica*-Kulturen 31
Herstellung kompetenter Hefezellen 31
Expression der Kallikreine 32
Overlay-Assay 32
In situ-Zymographie mit Proteinase-Indikator-Platten 32
2.4 Zellkulturarbeiten 33
Allgemeine Zellkulturtechniken 33
Expression von hK11 in CHO-Zellen 33
2.5 Arbeiten auf Proteinebene 34
2.5.1 Probenaufbereitung 34
Zellaufschluß 34
Konzentrierung zellfeier Kulturüberstände durch Ultrazentrifugation 34
Aktivierung der Pro-Kallikreine durch Thermolysin 34
2.5.2 Proteinaufreinigung 34
Ni^{2+}-Affinitätschromatographie 35
Kationenaustauschchromatographie 35
2.5.3 Proteindetektion 35
Bestimmung der Proteinkonzentration 35
SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 35
Zymographie 36
Protein-Färbung mit Coomassie Brilliant Blau 36
Protein-Färbung mit Silbernitrat 36
Westen-Blot und Immunodetektion 36
2.6 Enzymkinetische Untersuchungen 37
2.6.1 Aktivitätsbestimmung der Kallikreine 37
2.6.2 Bestimmung der kinetischen Parameter 37
2.6.3 Inhibitionsuntersuchungen 38

Hemmung der Trypsinaktivität 38
Hemmung der Kallikreinaktivät 38
Bestimmung der IC_{50} und K_i-Werte 38
2.7 Berechnungen 39

3. Ergebnisse 40

3.1 Heterologe Expression von LEKTI-Domänen in *E. coli* 40
3.1.1 Synthese und Klonierung der LEKTI-cDNA 40
3.1.2 Heterologe Expression diverser LEKTI-Domänen in *E. coli* 41
3.2 Heterologe Expression von rekombinaten humanem Kallikrein 11 und Überprüfung der proteolytischen Aktivität 43
3.2.1 mature hK11-Varianten 43
Synthese und Klonierung der maturen hK11-Varianten 44
Vorauswahl geeigneter Expressionsklone 46
3.2.2 Heterologe Expression maturer hK11 Varianten in der Hefe *Pichia methanolica* 49
Chromatographische Reinigung der rekombinanten hK11-Varianten 51
3.2.3 Pro-hK11 Varianten 52
3.2.4 Heterologe Expression von Pro-hK11 in *P. methanolica* 53
Bestimmung der proteolytischen Aktivität 55
Optimierung der Expression 56
3.2.5 Heterologe Expression von Pro-hK11 in CHO-Zellen 60
Bestimmung der proteolytischen Aktivität 62
3.2.6 Charakterisierung der Proteinaseaktivität von hK11 64
3.3 Heterologe Expression weiterer Kallikreine in *Pichia methanolica* und Überprüfung ihrer proteolytischen Aktivität *in vitro* 68
3.4 Untersuchungen zur Inhibition der Kallikreinaktivität durch LEKTI-Domänen 72
3.4.1 Hemmung der hK11-Aktivität 72
3.4.2 Hemmung der hK7-Aktivität 76
3.4.3 Hemmung weiterer Kallikreine 78

4. Diskussion und Ausblick 79

4.1 Motivation 79
4.2 Heterologe Expression der LEKTI-Domänen 81
4.3 Heterologe Expression der Kallikreine in *Pichia methanolica* 83
hK11 85
4.3.1 Vergleich der Expression von Pro-hK11 in *P.methanolica* und CHO-Zellen86
4.4 Hemmung der hK11 Aktivität 88
4.5 Hemmung weiterer Kallikreine 90
4.6 LEKTI als potentielles Therapeutikum für Kallikrein-assozierte Hauterkrankungen 91

Literaturverzeichnis 95

Anhang

Chemikalien und Materialien
Bezugsquellen
Abkürzungsverzeichnis
Danksagung
Curriculum vitae
Selbstständigkeitserklärung

1 EINLEITUNG

Als äußere Oberfläche des menschlichen Organismus stellt die Haut eine sehr effiziente Barriere dar, die das innere Milieu des Körpers von der Umwelt abtrennt. Sie übernimmt, gebunden an ihre Struktur, multiple Funktionen, wie die Wärmeregulation zur Aufrechterhaltung der Kerntemperatur, die Speicherung von Wasser und Nährstoffen und die Vitamin-D-Synthese. Sie bietet Schutz gegen äußere Einflüsse jeglicher Art sowie gegen exzessiven transepidermalen Wasserverlust. Darüber hinaus dient sie als Sinnes-, Immun- und Sekretionsorgan.

Histologisch lässt sich die Haut in drei funktionelle Schichten einteilen: die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut). Für die Barrierefunktion ist der äußerste Bereich der Haut, die Epidermis, zuständig. Sie schützt den Körper vor mechanischen, chemischen und thermischen Einflüssen, zudem wehrt sie schädliche Einflüsse, entstehend durch Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte, ab und filtert einfallende Strahlung [Übersicht bei ELIAS, 2005].

Die Epidermis ist ein dynamisches Gewebe das durch Zellneubildung, Differenzierung und Abschilferung in ständiger Erneuerung ist. Anhand des unterschiedlichen Reifungszustandes der Epidermiszellen (Keratinozyten) lässt sich diese in vier Schichten unterteilen: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Die Keratinozyten stellen eine sich ständig erneuernde Zellpopulation dar, die in ihrem Endstadium im Stratum corneum zu kernlosen, rigiden und vergleichsweise sehr großen, abgeflachten Zellen, den Korneozyten werden. Die Korneozyten sind in einer streng geometrischen Anordnung durch Korneodesmosomen miteinander verbunden [Übersicht bei ECKERT, 1989 und CHAPMAN *et al.*, 1991]. Der kontrollierte enzymatische Abbau der Korneodesmosomen führt zur Abschilferung der Zellen (Desquamation) [LUNDSTROM und EGELRUD, 1988], wobei einzelne Korneozyten abgelöst und abgestoßen werden [FARTASCH *et al.*, 1993].

Dieser proteolytische Degradationprozess wird von extrazellulären hydrolytischen Enzymen (Proteinasen) realisiert, zu denen auch die Kallikreine gehören [SIMON *et al.*, 2001]. Das gesunde Gleichgewicht zwischen Proliferation und Desquamation führt innerhalb von ungefähr vier Wochen zu einer vollständigen Erneuerung der Epidermis und bildet die Grundlage für den Erhalt der biologischen Funktion der Haut. Eine Dysregulation der beteiligten Proteinasen, beispielsweise durch ihre Inhibitoren, kann zu einer gestörten Hautabschilferung führen, wie es bei den Krankheitsbildern von Comèl-Netherton-Syndrom, atopische Dermatitis, Peeling Skin Syndrom und Psoriasis vulgaris anzutreffen ist [Übersicht bei MÄGERT *et al.*, 2005]. Im Hinblick auf die Kallikreinaktivität spielt der Serinproteinase-Inhibitor LEKTI als negativer Regulator eine entscheidende Rolle. LEKTI ist ein 15 Domänen-Serinproteinase-Inhibitor, der nach seiner Bildung als Vorläuferprotein proteolytisch gespalten wird. Dadurch entstehen eine Vielzahl von

einzelnen oder verbundenen Domänen, die durch Keratinozyten in den Übergangsbereich von Stratum corneum und Stratum granulosum
sekretiert werden [ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 2005; DERAISON *et al.*, 2007]. Alle LEKTI Domänen, mit Ausnahme der Domäne 1, zeigen sehr unterschiedliche und spezifische Inhibitionseigenschaften gegenüber den Mitgliedern der Kallikreinfamilie [EGELRUD *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2006; DERAISON *et al.*, 2007]. Die Funktion der Kallikreine im Zusammenhang mit der Barrierefunktion der Haut und damit verbundenen Krankheiten ist jedoch nicht nur auf die Proteolyse der Korneodesmosomen beschränkt. Vielmehr sind sie einzeln und/oder als Teil von Enzymkaskaden an verschiedenen Aspekten der epidermalen Biologie und Pathologie, wie der Permeabilität der Lipidbarriere [HACHEM *et al.*, 2005], der Entstehung von Entzündungen und der antimikrobiellen Abwehr beteiligt [YAMASAKI *et al.*, 2006; JONCO *et al.*, 2009]. Damit stellen sowohl die Kallikreine wie auch LEKTI wichtige Targetmoleküle dar, um auf molekularer Ebene die Interaktionen zwischen Proteinase und Inhibitor besser zu charakterisieren und damit neue Ansatzpunkte für die Therapie der erwähnten Hautkrankheiten zu finden.

1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER MENSCHLICHEN HAUT

Die menschliche Haut läßt sich im wesentlichen in Subkutis und Kutis, die Haut im engeren Sinne, unterteilen. Sie ist mit Nerven, Blutgefässen sowie mit Sinnesorganen versehen und enthält Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen, die als Adnexen (Hautanhangsgebilde) angesehen werden. Die Kutis wiederum setzt sich aus zwei Schichten, Dermis und Epidermis, zusammen. Die äußere Abgrenzung des Körpers zur Umwelt bildet die Epidermis. Von der Oberfläche zum Körperinneren schließen sich dann die Dermis und die Subkutis an.
Die Subkutis ist ein lockeres Gewebe, das hauptsächlich aus läppchenartigem Fettgewebe sowie aus den, die Haut versorgenden, Blut- und Lymphgefäßen und peripheren Nerven besteht und von Bindegewebssepten unterteilt wird. Die Funktion der Subkutis liegt in der Speicherung von Wasser und Nährstoffen, der Körperisolation gegen thermische Veränderungen sowie dem Schutz vor mechanischen Einwirkungen.
Ohne scharfe Grenze geht die Subkutis in die Dermis über. Diese stellt ein Bindegewebe dar, das von kollagenen Faserbündeln und einem Netzwerk elastischer Fasern durchdrungen ist. In die Dermis sind auch die epidermalen Anhangsgebilde (Haare, Talg- und Schweißdrüsen) eingelagert. Sie ist in das lockere kapillarreiche Stratum papillare und das sehr viel festere Stratum reticulare gegliedert. Das Stratum reticulare besteht vorwiegend aus kaum dehnbarem Kollagen vom Typ I, sowie aus dehnbaren Elastin- und Retikulinfasern und ist für die hohe Zugfestigkeit und Elastität der Haut verantwortlich. Diese strukturbildenden Fasersysteme, wie auch die Zellen der Dermis (vor allem Fibroblasten), sind in eine gelartige Grundsubstanz eingelagert, die im wesentlichen aus Proteoglykanen und

Glykosaminoglykanen besteht. Diese Interzellulärsubstanzen zeichnen sich durch ihr hohes Wasserbindevermögen aus und spielen bei der Regulation des Gewebeinnendruckes eine entscheidende Rolle. Zur Epidermis hin folgt das Stratum papillare, ein dünner zell- und gefäßreicher Bereich, der die Nährstoffversorgung der epidermalen basalen Zellen gewährleistet und eine große Zahl von Zellen der Immunabwehr, wie Lymphozyten und Plasmazellen, sowie Monozyten, Mastzellen und Makrophagen beherbergt. Da sich viele Nervenendigungen im Stratum papillare befinden ist es auch der Ort der Reizaufnahme. Aus der Dermis ragen Bindegewebspapillen in Vertiefungen der Epidermis und sorgen somit für eine Verzahnung beider Schichten.

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel mit großem Regenerationsvermögen. 90% der Epidermiszellen sind Keratinozyten. Darüber hinaus sind noch Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans-Zellen (Makrophagozyten) sowie Merkelzellen (Tastzellen) in der Epidermis zu finden. Die Keratinozyten sind eine sich ständig erneuernde Zellpopulation, die fortlaufend in der untersten Schicht der Epidermis, dem Stratum basale, neu gebildet werden. Unter Differenzierung wandern diese dann durch das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum, wo sie als verhornte Zellen (Korneozyten) abschilfern (Abb.1-1).
Das Stratum basale ist einschichtig und besteht aus zylindrischen bis hochprismatischen Zellen mit hoher mitotischer Aktivität. Durch ständige Zellteilung entstehen immer neue Zellen, die in die oberen Schichten verschoben werden. Dem Stratum basale schließt sich das Stratum spinolosum an, in dem es zu einer deutlichen Volumenzunahme sowie zu einer Abflachung der Zellen kommt. Die Keratinozyten sind untereinander durch eine Vielzahl von Desmosomen verbunden und bilden dadurch ein stabiles Netzwerk. Das Stratum spinolosum besteht aus zwei bis fünf Zellschichten, wobei sich in der obersten Lage membranumgrenzte Vakuolen, die Lamellarkörperchen (Odland Körperchen), ausbilden. Ferner ist diese Schicht durch eine hohe Stoffwechselaktivität geprägt, in der viele Lipide und Proteine synthetisiert werden. Im darüberliegenden Stratum granulosum, findet die terminale Differenzierung der Keratinozyten statt. Die Zellen des Stratum granulosum sind charakterisiert durch das Vorhandensein von stark basischen Keratohyalinkörperchen, welche die Vorläufer der Keratinmatrix darstellen. Außerdem wird die Plasmamembran der Zellen durch das Cornified envelop (Proteinhülle) ersetzt. Das Cornified envelope besteht aus mehreren vernetzten Proteinen und ist eine 15 nm dicke, schwer lösliche Schicht an der Innenseite der Zellmembran. Im oberen Teil des ein bis dreilagigen Stratum granulosum kommt es zur Abflachung der Zellen. Die Zellorganellen und der Zellkern lösen sich auf. Das Stratum corneum stellt das Endprodukt der epidermalen Zelldifferenzierung dar, wobei aus den lebenden Keratinozyten kernlose, rigide und vergleichsweise sehr große, abgeflachte Zellen, die Korneozyten, entstehen. Die Korneozyten bestehen aus Keratinfilamenten in einer amorphen Proteinmatrix und dem versteifenden Cornified envelope, woraus die außergewöhnliche chemische wie mechanische Stabilität der Zellen resultiert. An der

Grenze zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum werden die Lamellarkörperchen exocytiert und geben ihren Inhalt in den extrazellulären Raum ab, wodurch ein Lipidfilms zwischen den Korneozyten ausgebildet wird. Dieser sorgt für die Aufrechterhaltung des Hydrationszustandes und für eine intakte epidermale Barriere.
Im Stratum corneum sind die Zellen in einer streng geometrischen Anordnung durch Korneodesmosomen, die von den Desmosomen abgeleitet sind, aneinander fixiert. Die enzymvermittelte Auflösung dieser Strukturen bewirkt eine Abschwächung der Bindungskräfte zwischen den Korneozyten und führt zur Abschilferung (Desquamation) der äußersten Hautschichten [Übersicht bei: FRITSCH, 2003; SMOLL, 2003]. In der gesunden Haut besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Desquamation, das innerhalb von ca. vier Wochen zur vollständigen Erneuerung führt. Der Transit der sich differenzierenden Keratinozyten bis zum Stratum corneum dauert etwa zwei Wochen. Die entstehenden Korneozyten werden dann nach etwa zwei weiteren Wochen abgestoßen. Dieser kontinuierliche Prozess von Proliferation, Migration, Differenzierung, Zelltod und Abschilferung der Korneozyten dient der permanenten Regeneration der Epidermis und wird durch eine Reihe verschiedener Proteinasen reguliert [Übersicht bei EGELRUD, 2000].

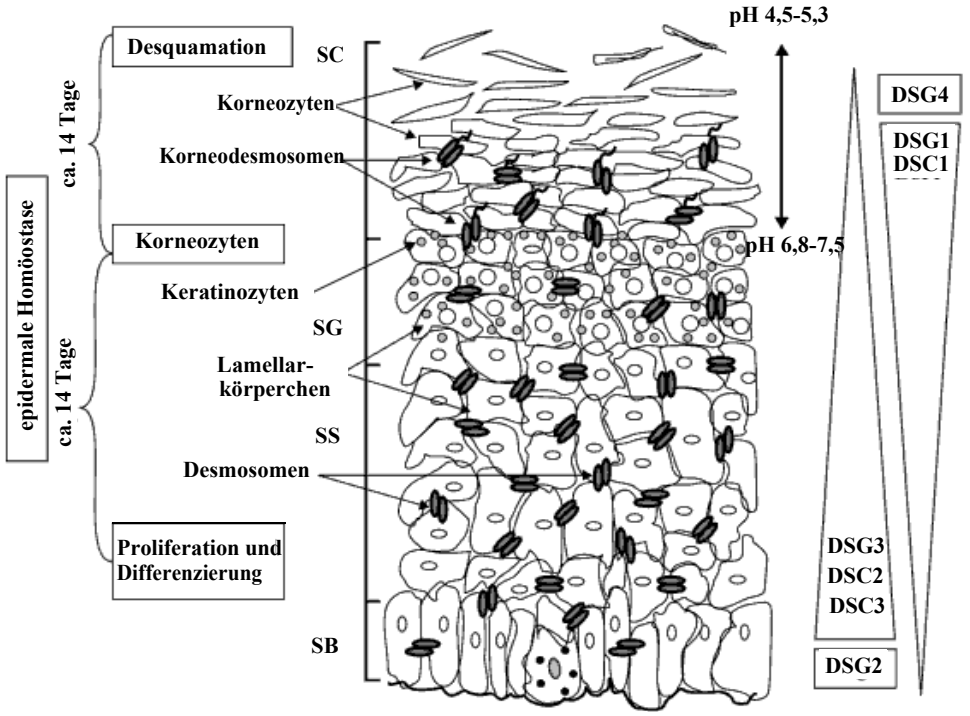
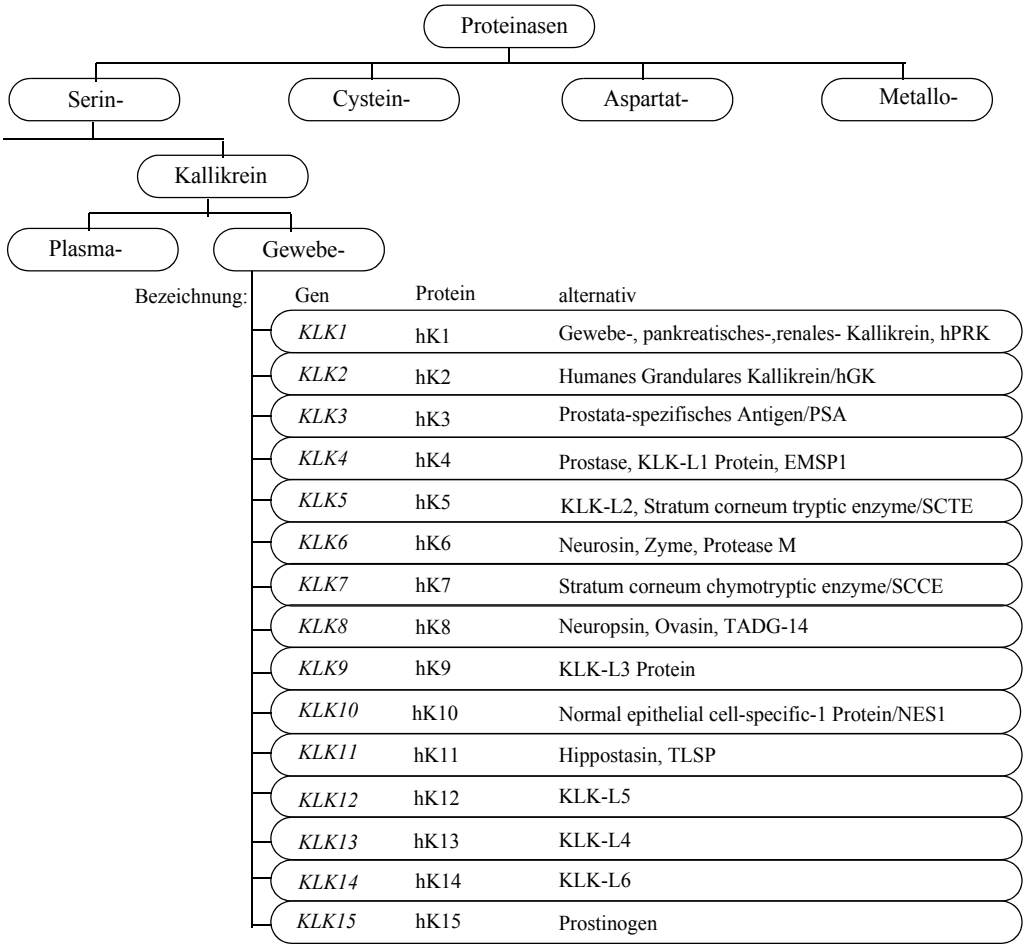


Abbildung 1-1. Aufbau der menschlichen Epidermis. Die Epidermis besteht aus dem Stratum basale (SB), Stratum spinolosum (SS), Stratum granulosum (SG) und Stratum corneum (SC). Die epidermale Homöostase ist gekennzeichnet durch Proliferation, Differenzierung, Kornifizierung und Desquamation der Keratinozyten. Der Transit der sich differenzierenden Zellen bis zum SC dauert zwei Wochen, der Abstoßungsprozess der äußeren Zellschichten danach weitere zwei Wochen. Die Expressionsmuster von desmosomalen bzw. korneodesmosonalen Proteinen, sowie der pH-Wert der Epidermis sind auf der rechten Seiten dargestellt [Abbildung nach EISSA *et al.*, 2009].

1.2 DIE HUMANEN GEWEBEKALLIKREINE

Proteinasen (Endopeptidasen) sind hydrolytische Enzyme, die selektiv und irreversibel Peptidbindungen zwischen bestimmten Aminosäuren im Inneren von Proteinen spalten, wodurch letztlich eine Konformations- und Funktionsänderung ihrer Zielsubstrate resultiert. Sie werden entsprechend ihrem katalytischen Mechanismus in Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen eingeteilt [LASKOWSKI und KATO, 1980]. Die 15 humanen Gewebekallikreine sind extrazelluläre Serinproteinasen, die zur Gruppe der Trypsin/Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteinasen S1A gehören [YOUSEF *et al.*, 2005]. Der Begriff Kallikrein wurde 1930 von der Arbeitsgruppe um WERLE eingeführt, die eine größere Menge einer Proteinase (hK1) aus dem Pankreas, im griechischen Kallikreas, isolierten [KRAUT *et al.*, 1930]. hK1 weist eine deutliche Kininogenase-Aktivität auf, wobei sie die hydrolytische Umwandlung eines Kininogens (low mol wt Kininogen) in ein bioaktives Kinin (Lysly-Bradykinin/Kallidin) katalysiert, welches an den Kininrezeptor bindet und dadurch vielfältige biologische Reaktionen auslöst. Eine zweite Proteinase mit Kininogenaseaktivität wird heute als Plasmakallikrein (hK1B) oder Fletcher Faktor bezeichnet. Sie wird durch ein einziges Gen auf dem Chromosom 4q35 kodiert und ausschließlich in der Leber exprimiert [ASAKAI *et al.*, 1987]. HK1B ist an den Prozessen der Blutkoagulation und der Fibrolyse beteiligt und durch die Freisetzung von Bradykinin aus dessen hochmolekularer Vorstufe (high mol wt Kininogen) auch an der Regulation des Gefäßdruckes sowie an entzündlichen Reaktionen [BHOOLA *et al.*, 1992]. Plasmakallikrein unterscheidet sich jedoch von den Gewebekallikreinen sowohl in den biochemischen, wie auch in den physiologischen Eigenschaften sehr stark. Die Einteilung und Nomenklatur der Kallikreine ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Die Mitglieder der Gewebekallikreine werden durch einen Multigenkomplex auf Chromosom 19q13.3-13.4 kodiert und stellen die größte zusammenhängende Gruppe von Proteinasegenen im menschlichen Genom dar. Alle 15 Kallikreingene und ein Pseudogen (Ψ*KLK1*) sind kontinuierlich in einem Kluster von ca. 400 kbp ohne Unterbrechung durch „Nicht-Kallikreingene“ angeordnet.



Bezeichnung: Gen	Protein	alternativ
KLK1	hK1	Gewebe-, pankreatisches-,renales- Kallikrein, hPRK
KLK2	hK2	Humanes Grandulares Kallikrein/hGK
KLK3	hK3	Prostata-spezifisches Antigen/PSA
KLK4	hK4	Prostase, KLK-L1 Protein, EMSP1
KLK5	hK5	KLK-L2, Stratum corneum tryptic enzyme/SCTE
KLK6	hK6	Neurosin, Zyme, Protease M
KLK7	hK7	Stratum corneum chymotryptic enzyme/SCCE
KLK8	hK8	Neuropsin, Ovasin, TADG-14
KLK9	hK9	KLK-L3 Protein
KLK10	hK10	Normal epithelial cell-specific-1 Protein/NES1
KLK11	hK11	Hippostasin, TLSP
KLK12	hK12	KLK-L5
KLK13	hK13	KLK-L4
KLK14	hK14	KLK-L6
KLK15	hK15	Prostinogen

Abbildung 1-2. Die Familie der humanen Gewebekallikreine. Die 15 humanen Gewebekallikreine gehören zur Klasse der Serinproteinasen. Angegeben sind die Gen- und Proteinbezeichnungen nach YOUSEF und DIAMANDIS [2001], wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, sowie alternative Bezeichnungen, die ebenfalls in Veröffentlichungen verwendet werden.

Die Gewebekallikreine weisen untereinander starke Ähnlichkeiten sowohl auf Gen- wie auch auf Proteinebene auf (Abb.: 1-3). So enthalten alle Gene fünf kodierende Exons mit ähnlicher Größe und vier dazwischen liegende Introns, die in ihre Länge beträchtlich variieren. Weiterhin besitzen die Kallikrein-Gene am 5′ und 3′ Ende untranslatierte Regionen und die meisten Kallikrein-Gene zusätzlich noch ein oder mehrere 5′-terminale untranslatierte Exons. Mit Ausnahme von *KLK14* hat jedes Kallikreingen mindestens eine alternative Splicing Variante, sodass etwa 82 verschiedene Kallikrein-mRNA-Formen bekannt sind. Die Kallikrein-Transkripte kodieren für Einzelstrang-Prä-Proenzyme von 248-293 Aminosäuren. Das N-terminale 16 bis 57 Aminosäuren lange Signalpeptid (Präpeptid) ist für die Sekretion entscheidend. Danach folgt ein kurzes Propeptid (mit Ausnahme von hK5, dessen Propeptid 37 Aminosäuren lang ist) vor der eigentlichen

Serinproteinasedomäne mit der charakteristischen katalytischen Triade von His57, Asp102 und Ser195.
Jedes Kallikrein-Protein enthält 10 bis 12 Cysteinreste, die 5 (hK1-3, hK13) bzw. 6 (hK4-12, hK14-15) Disulfidbrücken bilden. Generell weisen die Kallikreine untereinander eine 40%ige bis 80%ige Homologie in der Aminosäuresequenz auf. So enthalten beispielsweise alle 15 Kallikreine 39 invariante Aminosäuren im Bereich des reaktiven Zentrums. Das theoretische Molekulargewicht der Pro-Kallikrein Proteine liegt zwischen 23 und 26 kDa. Aufgrund von Glykosylierung und potentiellen weiteren posttranslationalen Modifikationen wurde *in vivo* für die meisten Kallikreine ein höheres Molekulargewicht beobachtet. Analog zu anderen proteolytischen Enzymen werden alle Kallikreine nach der Abspaltung des Präsignalpeptides als inaktive Pro-Kallikrein Zymogene sekretiert, deren Umwandlung in die aktive Form durch proteolytische Abspaltung des Propeptides erfolgt. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung im aktiven Zentrum und in der Substratbindungstasche. Die Abspaltung des Propeptids erfordert im Allgemeinen (außer bei hK4) eine Trypsin-ähnliche Aktivität, wobei in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass einige Kallikreine sich selbst oder andere Kallikreine aktivieren können (Übersicht bei YOUSEF und DIAMANDIS, 2001; YOUSEF *et al.*, 2005; EMANI und DIAMANDIS, 2007).
Die Substratspezifität der Kallikreine wird neben der S1-P1-Interaktion (SCHLECHTER und BERGER, 1967) insbesondere durch die Aminosäure in Position 189 bestimmt (HEDSTROM, 2002). Zwölf Kallikreine haben, theoretisch bestimmt oder experimentell nachgewiesen, eine Trypsin-ähnliche Spezifität, da Aspartat (hK1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14) bzw. Glutamat (hK15) in Position 189 die Bindung von Lysin oder Arginin in der P1 Position unterstützen. Im Gegensatz dazu besitzen hK3, hK7 und hK9 die Aminosäuren Ser189, Asn189 bzw. Gly189, die dafür verantwortlich sind, dass diese Kallikreine wie Chymotrypsin C-terminal von Aminosäuren mit aromatischen oder voluminösen Seitenketten spalten. Sekundäre Interaktionen außerhalb des aktiven Zentrums werden von sechs umliegenden, hoch variablen Oberflächenschleifen vermittelt und sind für die diversifierte Substratspezifität der Kallikreine verantwortlich [Übersicht bei YOUSEF *et al.*, 2005; EMANI und DIAMANDIS, 2007].
Durch Röntgenstrukturanalysen konnte die 3D-Struktur einiger Kallikreine aufgeklärt werden. Diese ist in zwei hydrophobe Domänen aus sechs β-Faltblatt-Strängen und einer α-Helix strukturiert. Die katalytische Triade ist an der Schnittstelle der beiden Domänen lokalisiert.

Kallikreine werden in verschieden Geweben und Körperflüssigkeiten exprimiert und nehmen Schlüsselrollen in einem weiten Bereich von physiologischen Prozessen ein. Sie nehmen einzeln oder als Teil von Enzymkaskaden an Prozessen der Blutkoagulation, der Fibrolyse, der zellulären und humuralen Immunantwort, der Fertilisation sowie der embrionalen Entwicklung teil. Zudem sind sie an der Entstehung verschiedenster Krankheiten beteiligt und werden zunehmend als Biomarker in der Krebsdiagnostik genutzt [Übersicht bei BORGONO und DIAMANDIS, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2004].

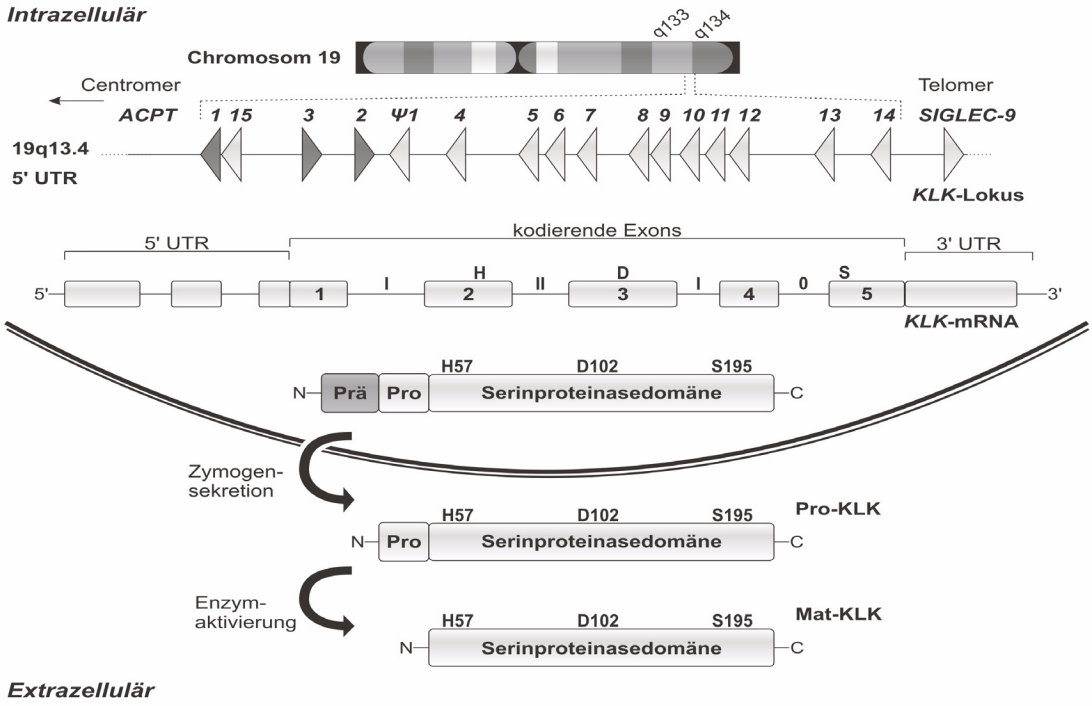


Abbildung 1-3. Genomische und proteomische Organisation der Kallikreine. Die Kallikreine weisen untereinander starke genomische und proteomische Homologien auf. Sie sind als Genkluster auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert. Jeder Pfeil entspricht einem bestimmten Kallikrein-Gen in seiner Transkriptionsrichtung. Die 5´ und 3´ untranslatierten Regionen (UTR) sind im mRNA-Transkript dargestellt. H, D, und S repräsentieren die katalytischen Triande. Im mRNA-Schema stellen die Rechtecke Exons und die Linien Introns dar. Die Kallikrein-mRNA wird als inaktives Prä-Pro-Protein translatiert, welches durch sein Präpeptid in den sekretorischen Pfad zum Endoplasmatischen Retikulum derigiert wird. Die extrazelluläre Abspaltung des Propeptids erfolgt durch Trypsin-ähnliche Proteinasen. Die erhaltenen maturen Kallikreine (Mat-hK) besitzen eine Trypsin- oder Chymotrypsin-ähnliche enzymatische Aktivität. [Darstellung nach YOUSEF *et al.*, 2005]

1.3 KALLIKREIN-KATALYSIERTE PROZESSE IN DER HAUT

In der Haut werden Kallikreine von granulären Keratinozyten zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum sekretiert [ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 2005]. Sie sind in der Lage verschiedene Substrate zu hydrolysieren und dienen damit als promiskuitive Vermittler verschiedener Funktionen der Haut, wie der Desquamation, der antimikrobiellen Abwehr sowie die Permeabilität der Lipidbarriere. Weiterhin sind Kallikreine an der Pigmentierung, der Tumorsupression (-progression) und an der Entstehung von Entzündungen beteiligt, wobei sie ihre Wirkung nicht nur unmittelbar ausüben, sondern z.T. durch die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) vermitteln [Übersicht bei EISSA und DIAMANDIS, 2008, 2009]. In der Epidermis sowie den dazugehörigen Adnexes werden verschiedene Kallikreine sowohl als aktive Enzyme wie auch als inaktive Proform exprimiert. Diese wurden als mRNA Transkripte und/oder als Proteine in den verschiedenen

Schichten der Epidermis, in Talgdrüsen, ekkrinen Schweißdrüsen, Haarfollikeln und Nerven nachgewiesen. Außerdem wurden verschiedene Kallikreine in humanem Schweiß gefunden [KOMATSU *et al.*, 2003, 2005ab, 2006b].

Da Kallikrein-mRNA im inneren und/oder äußeren Wurzelschaft von Haarfollikel-Epithelien gefunden wurde [KOMATSU *et al.*, 2003], wird angenommen, dass Kallikreine an der Entwicklung der Haare beteiligt sind. Ebenso nimmt man an, dass Kallikreine bei der Differenzierung von Talgdrüsen eine Rolle spielen, da sie in undifferenziertem Talgdrüsengewebe stark exprimiert sind [EISSA und DIAMANDIS, 2008].

Die Kallikreine 5 und 7 stehen im Zusammenhang mit der Prozessierung von antimikrobiell-wirksamen Peptiden. In der Epidermis sezernieren Keratinozyten und neurophile Granulozyten β-Defensine und Cathelizidin. Diese antimikrobiellen Peptide sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, die Bakterien, Pilze und bestimmte Viren inaktivieren und abtöten können. Während β-Defensine in der Haut konstitutiv exprimiert werden, wird Cathelizin als Propeptid gebildet und nur bei Entzündungsreaktion infolge einer Infektion proteolytisch aktiviert und anschließend fragmentiert. HK5 und hK7 regulieren die Wirkung von Cathelizidin, indem sie entweder die Pro-Cathelizidin Form (hCAP18) oder die aktive, reife Form (LL-37) hydrolytisch spalten. Damit wirken die beiden Kallikreine sowohl als Aktivator, wie auch als Inaktivator [YAMASAKI *et al.*, 2006]. Im Falle einer Infektion führt die Prozessierung des inaktiven hCAP18 zu aktivem LL-37. Dieses wirkt antibakteriell [ZAIOU *et al.*, 2003], bindet LPS, induziert die Proliferation und Migration von Epithelzellen und wirkt chemotaktisch auf Immunzellen. Anschließend ermöglicht die hydrolytische Spaltung von LL-37 zu proinflammatorisch unwirksamen Peptiden, der Haut, zu ihrem normalen Gleichgewicht zurückzukehren [YAMASAKI *et al.*, 2006; MOTTA *et al.*, 1994].

Die Barrierefunktion der Haut wird zum Großteil durch die Lipidschicht zwischen den Korneosomen vermittelt. Die größte Fraktion dieser Lipidschicht bilden Ceramide, die zusammen mit Cholesterol und freien Fettsäuren geordnete bilamelläre Membranen mit dicht gepackten Zwischenräumen bilden. Ceramidvorstufen werden intrazellulär gebildet und von Lamellarkörperchen zusammen mit den hydrolytischen Enzymen, die für ihre Gewinnung nötig sind, zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum exocytiert. An der Synthese der Ceramide sind vor allem die β-Glucocerebrosidase und die saure Spingomyelinase beteiligt [HACHEM *et al.*, 2006]. Beide Enzyme können von hK7 hydrolysiert und somit reguliert werden [HACHEM *et al.*, 2005]. Eine Dysregulation führt zu einer Beeinträchtigung des Ceramidprofils des Stratum corneum, wie es bei Krankheiten wie atopischen Dermatitis, Psoriasis und einigen Ichtyoseformen typisch ist [YAMAMOTO *et al.*, 1991; HAMANAKA *et al.*, 1997].

Die physiologische Rolle der Kallikreine umfasst die ganze Epidermis. HK6 und hK8 stehen im Zusammenhang mit der Degradation der extrazellulären Matrix. Kallikreine sind in der Lage Adhäsionsmoleküle der Basalmembran der unteren Epidermis, sowie der extrazellulären Matrix (ECM) zu spalten. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass neben hK6 und hK8, auch die Kallikreine 5, 13 und 14 in der Lage sind, Bestandteile der ECM (Laminin,

Fibronectin und Kollagen 1-4) zu hydrolysieren [BORGONO und DIAMANDIS, 2004; GHOSH *et al.*, 2004; KAPADIA *et al.*, 2004, RAJAPASKSE *et al.*, 2005]. Für die Degradation der ECM sind vor allem Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) verantwortlich. hK8 ist ebenfalls in der Lage, die einkettige Vorstufe des gewebespezifischen Plasminogenaktivator (t-PA) in das zweikettige Protein umzuwandeln [RAJAPASKSE *et al.*, 2005]. Mit Hilfe des t-PA wird aus Plasminogen Plasmin, welches wiederum eine Vielzahl von Pro-MMPs in die aktive Form überführt. Während der Metastasierung ist die Auflösung der Zell-Stroma-Adhäsionsverbindungen ein wichtiger Punkt, der es Tumorzellen ermöglicht den Primärtumor zu verlassen. Mittels ELISA konnte im Zellkulturüberstand von Brustkrebsepitelzellen außer MMPs auch hK6 nachgewiesen werden [GHOSH *et al.*, 2004]. Die durch Überexpression von Kallikrein 6 beschleunigte Tumorprogression ist verbunden mit einer verstärkten Degradation der Basal-Membran und der ECM, was vermutlich auf die Proteolyse der extrazellulären Domäne von E-Cadherin zurückzuführen ist [KLUCKY *et al.*, 2007]. Damit stellen Kallikreine, insbesondere hK6 und hK8, Angriffspunkte für eine epitheliale Antitumortherapie dar.
Außerdem wird angenommen, dass hK8 in die Keratinozyten-Proliferation involviert ist. KISHIBE und Mitarbeiter [2007] konnten nachweisen, dass sich in der Haut von hK8 Knockout-Mäusen weniger proliferierende Zellen befinden, als bei Wildtyp-Mäusen.

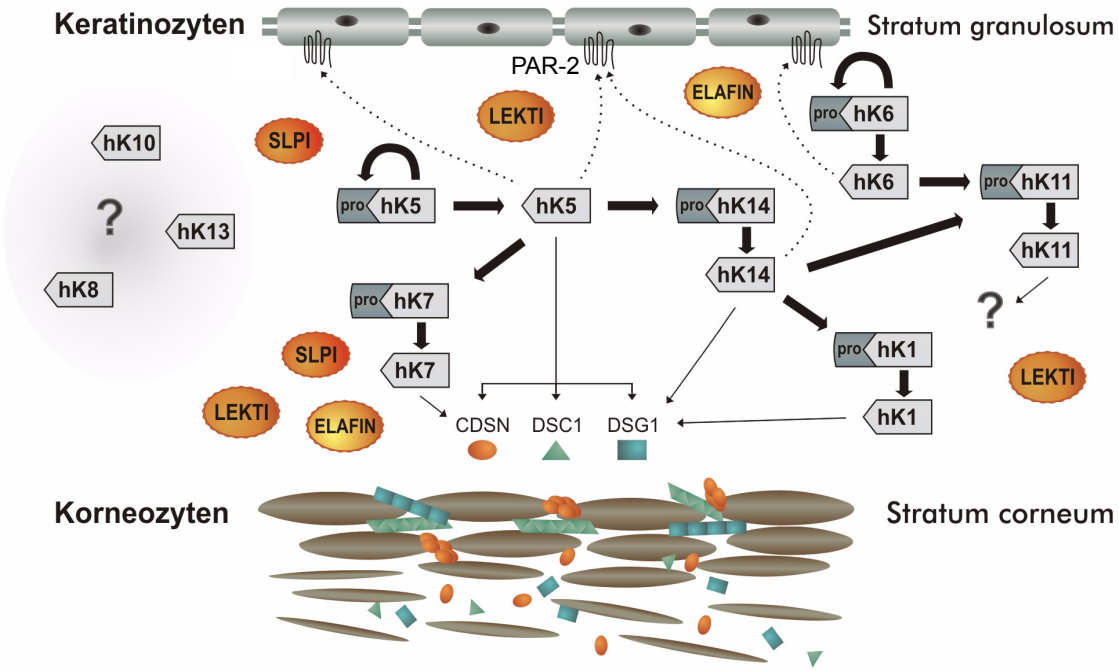


Abbildung 1-4. Bekannte Interaktionen der im Stratum corneum exprimierten Kallikreine. Kallikreine bilden eine gewebespezifische Aktivierungskaskade, die durch die schwarzen Pfeile dargestellt ist. Unbekannte Interaktionen sind durch Fragezeichen versehen. Nach ihrer Aktivierung können Kallikreine Bestandteile der Korneodesmosomen (DSG, DSC und CDSN) degradieren, was zur Desquamation führt oder PAR-2 aktivieren. Die enzymatische Aktivität der Kallikreine wird durch die Serinproteinase-Inhibitoren (LEKTI, Elafin und SLPI) reguliert.[Übersicht modifiziert nach YOUSEF *et al.*, 2005; EMAMI und DIAMANDIS., 2007]

Kallikreine nehmen auf viele unterschiedlichen Aspekte der Hautphysiologie Einfluss. Wichtige Wirkbereiche der Kallikreine stellen dabei der Prozess der Korneozytenabschilferung/Desquamation sowie verschiedene PAR-vermittelte Effekte dar. Diese sind in Abbildung 1-4 zusammengefasst und werden im Folgenden genauer erläutert [Übersicht bei EISSA und DIAMANDIS, 2008, 2009]

1.3.1 DIE ROLLE VON KALLIKREINEN BEI DER DESQUAMATION

Unter Desquamation versteht man die Abschilferung von Zellen des Stratum corneum von der Hautoberfläche. Dieser Prozess wird durch die Lipidsynthese, desmosomale Verbindungen, Zellmorphologie, Zellproliferation, Proteinsynthese, sowie verschiedene Proteinasen und ihre Inhibitoren beeinflusst [EGELRUD, 2000; SIMON *et al.*, 2001].
Das Stratum corneum enthält verschiedene Proteinasen, die bei der Desquamation eine entscheidende Rolle spielen: zwei Cysteinproteinasen (Stratum corneum Thiol Protease, SCTP/ Kathepsin L2 und Kathepsin L-ähnliche Proteinase), zwei Aspartatproteinasen (Kathepsin D und Kathepsin E-ähnliche Proteinase) sowie Serinproteinasen aus der Gruppe der Kallikreine [HANSSON *et al.*, 1994, HORIKOSHI *et al.*, 1998; EKHOLM *et al.*, 2000, BERNARD *et al.*, 2003]. Die Zellen der Epidermis sind durch Adhäsionsverbindungen miteinander verbunden. Der Halt zwischen basalen Zellen und der Basal-Membran wird durch Hemidesmosomen und fokale Adhäsion gewährleistet. Während Desmosomen und adhärente Verbindungen dem interzellulären Zusammenhalt dienen. Sie gewährleisten den widerstandsfähigen Zusammenhalt der Zellen, indem zwei Gruppen von calciumabhängigen transmenbranen Cadherinen, Desmoglein (DSG1-4) und Desmocollin (DSC1-3) für die Adhäsion zwischen benachbarten Epithelzellen sorgen. Während der Differenzierungsvorgänge verändern die Desmosomen ihre Proteinzusammensetzung gemäß ihrer Funktion und werden im Stratum corneum zu Korneodesmosomen [HAFTEK *et al.*, 2006]. Die Korneodesmosomen beinhalten Korneodesmosin (CDSN) als Glykoproteinbestandteil, sowie die Cadherine DSG1, DSG 4 und DSC1 [GREEN und SIMPSON, 2007; JONCO *et al.*, 2009]. Im Zusammenhang mit dem proteolytischen Abbau dieser Proteine werden insbesondere hK5 (frühere Bezeichnung: stratum corneum tryptic enzyme/SCTE) und hK7 (frühere Bezeichnung: stratum corneum chymotryptic enzyme/SCCE) genannt, da diese in der Lage sind die Proteine der Desmosomen, DSC1 und CDSN abzubauen [SIMON *et al.*, 2001]. Im Gegensatz zu hK7 kann hK5 zusätzlich DSG1 hydrolysieren [CAUBET *et al.*, 2004]. HK7 ist das einzige Chymotrypsin-ähnliche Kallikrein das in der Epidermis vorkommt. Neben hK5 werden noch sechs weitere Trypsin-ähnliche Kallikreine (hK 1, 6, 8, 10, 11, 13 und 14) im Stratum corneum exprimiert [Komatsu *et al.*, 2005ab, 2006b; SON *et al.*, 2009]. Die Arbeitsgruppe von KOMATSU [2005a, 2006b] hat gezeigt, dass die absolute Trypsin-ähnliche Kallikreinkonzentration im Stratum corneum etwa doppelt so hoch ist, wie die totale Chymotrypsin-ähnliche Kallikreinkonzentration, so dass hK7 den Hauptteil der proteolytischen Aktivität im Stratum coreum ausmacht. hK8 und hK11 sind die Trypsin-ähnlichen Kallikreine mit der höchsten

Proteinkonzentraion in Stratum corneum. Die Proteinkonzentration ist ca. 200 mal höher gegenüber den gering exprimierten Kallikreinen 13 und 14 [KOMATSU *et al.*, 2005a]. Außer hK5 können auch hK1, hK6, und hK14 DSG1 hydrolytisch spalten. Von diesen zeigt hK14 die größte Effizienz, deutlich mehr als hK5. Das geringste Spaltvermögen besitzt hK1 [BORGONO *et al.*, 2007a].

Die im Stratum corneum vorkommenden Kallikreine wirken nicht nur unmittelbar durch den Abbau korneodesmosonaler Strukturen, sondern üben auch indirekt in Form von proteolytischen Aktivierungskaskaden Einfluss auf den Prozess der Desquamation aus (Abb.: 1-4). So ist beispielsweise hK5 in der Lage Pro-hK7 und Pro-hK14 sowie sein eigenes Zymogen in die aktive Form zu überführen. Auch andere Kallikreine sind in dieses Aktivierungsnetzwerk involviert, wobei die genaue Funktion der einzelnen Mitglieder noch weitgehen unbekannt ist [BRATTSAND *et al.*, 2005].

Die Wirkung der Kallikreine bei der Desquamation ist pH-Wert abhängig, wobei sowohl deren Aktivität wie auch die Hemmung durch den Serinproteinase-Inhibitoren LEKTI dadurch beeinflußt werden [DERAISON *et al.*, 2007]. hK5 und hK7 zeigen bei neutralem pH-Wert die optimale Aktivität und behalten auch bei dem in den äußeren Schichten des Stratum corneum leicht sauren pH-Wert von ca. 4,5 eine signifikante Aktivität [CAUBET *et al.*, 2004]. Eine experimentelle Erhöhung des pH-Wertes führt zur einer gesteigerten Aktivität der Kallikreine was eine übermäßige Degradation der Korneodesmosomen bewirkt [HACHEM *et al.*, 2005]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass hK5 mit Domänen des Inhibitors LEKTI bei einem pH-Wert von 7,5, wie er an der Grenze von Stratum granulosum und Stratum corneum vorhanden ist, stabile Komplexe bildet. Diese Komplexe dissoziiern bei sinkenden pH-Wert von 7,5 zu 4,5 zunehmend [DERAISON *et al.*, 2007]. Die Inhibierung der Kallikreine in den unteren Schichten sowie deren Freigabe in den oberen Schichten des Stratum corneum, aufgrund des pH-Gradienten, ermöglicht eine regulierte Degradation der Korneodesmosomen und die Abschilferung der oberflächlichen Hautschichten.

1.3.2 PAR-VERMITTELTE EFFEKTE

Die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) sind eine Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren, die durch Serinproteinasen irreversibel aktiviert werden. Sie bestehen aus sieben transmenbranen Helices, wobei eine spezifische Aminosäurefolge am extrazellulären N-Terminus die Erkennungssequenz für Serinproteinasen bildet. Durch gezielte Proteolyse entsteht ein neuer N-Terminus der als „Rezeptorgebundener“ Ligand (tethered ligand) fungiert. Dieser interagiert mit der zweiten extrazellulären Schleife was eine Konformationsänderung des Rezeptors herbeiführt. Dies resultiert im gebundenen heterotrimeren G-Protein in einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) und in einer Dissoziation in die α- und β/γ- Untereinheit, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden initiiert werden [Übersicht bei MACFARLANE *et al.*, 2001].

Die Familie der PARs umfasst vier verschiedene Rezeptoren, PAR-1 bis PAR-4. In der Haut werden PARs von Keratinozyten (PAR-2), dermalen Endothelzellen (PAR-2), dermalen Mastzellen (PAR-2), Melanozyten (PAR-1), Fibroblasten (PAR-2), Neuronen (PAR-2) und dermalen Kapillaren (PAR-1) gebildet [RATTENHOLL und STEINHOFF, 2003]. Im Hinblick auf die Wirkung von Kallikreinen ist besonders PAR-2 interessant, da dieser von Trypsin-ähnlichen Proteinasen aktiviert wird [STEINHOFF *et al.*, 1999]. PAR-2 steht im Zusammenhang mit Zellproliferation, Tumorsuppression, Hautpigmentierung und dem Feuchtigkeitsbindevermögen der Haut. Er ist an der Wundheilung und am Prozess der Narbenbildung beteiligt. Zudem ist PAR-2 von wesentlicher Bedeutung bei entzündlichen Reaktionen der Haut. Keratinozyten exprimieren PAR-2 in einem hohen Ausmaß, und sind wichtige Zielzellen, als auch Generatoren für Entzündungsmediatoren. PAR-2 Agonisten induzieren die Expression von proinflammatorischen Interleukinen wie IL-1β, IL-6 und IL-8 in verschiedenen Zelltypen, darunter auch in Keratinozyten [Übersicht bei STEINHOFF *et al.*, 2005]. Studien an PAR-2 Knock-out-Mäusen bestätigen die wichtige Rolle von PAR-2 bei Entzündungen und immunologischen Reaktionen. So zeigten Wildtyp-Mäuse nicht aber PAR-2 defiziente Mäuse nach der Behandlung mit Trypsin IV eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten, sowie Überempfindlichkeitsreaktionen und ein gestörtes Schmerzempfinden [KNECHT *et al.*, 2007]. STEINHOFF und Mitarbeiter [2003] konnten auch die Entstehung von Juckreiz (Pruritus) in der Haut mit der Aktivierung von PAR-2 in Verbindung bringen. Weiterhin ist bekannt, dass PAR-2 Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten negativ beeinflusst, während PAR-1 Agonisten die Proliferation stimulieren [DERIAN *et al.*, 1997].
Zusammen mit Kallikreinen ist PAR-2 im Stratum granulosum, in den Keratinozyten der Haarfollikel und der Talgdrüsen colokalisiert. Für hK5, hK6 und hK14 konnte die Aktivierung von PAR-2 nachgewiesen werden (Abb.: 1-4), wobei sich hK6 und hK14 als wesentlich bessere Aktivatoren als hK5 erwiesen. hK14 ist zusätzlich in der Lage PAR-4 zu aktivieren und PAR-1 zu inaktivieren [OIKONOMOPOULOU *et al.*, 2006].

1.4 REGULATIONSMECHANISMEN DER KALLIKREINAKTIVITÄT

1.4.1 TRANSKRIPTIONALE REGULATION

Verschiede transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen regulieren die Kallikreinexpression bzw. deren proteolytische Aktivität. Die Gen-Expression wird durch eine Vielzahl von stimulierend oder inhibierend wirkenden Faktoren beeinflusst. Die am besten untersuchten Regulatoren sind Steriodhormone. Die rezeptorvermittelte Wirkung von Steroidhormonen spielt eine entscheidende Rolle bei der normalen Entwicklung verschiedener Organe und bei der Pathogenese von endokrinen Tumoren.
Die Genregulation durch Steroidhormone wird durch die Bindung des Hormons an den entsprechenden Rezeptor und die Freigabe von komplexiertem Hsp90 initiiert. Hsp90 ist ein

ubiquitouses Chaperon, dass die Aktivität verschiedener Signalproteine, inklusive der Steroidhormon-Rezeptoren, reguliert. Durch die Bindung des Hormons an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Freisetzung des Hsp-Komplexes bewirkt und eine Dimerisierung des Rezeptors ermöglicht. Das aktive Rezeptordimer kann dann an cis-regulierte DNA-Bereiche (Hormon-responsive-Elemente) binden. Der Steroidhormonrezeptor kann selbst als Transkriptionsfaktor wirken und/oder andere Transkriptionsfaktoren zum Promotor rekrutieren, welche die nachgeschaltete Genexpression induzieren [Übersicht bei BEATO, 1989; ROUSSEAU, 1994].

Diese transkriptionalen Ereignisse werden weiterhin durch Phosphorilierung der Rezeptoren, durch Transkriptionsfaktor-relevante Kinasen, reguliert [ROCHETTE-EGLY, 2003].

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Mehrheit der Kallikrein-Gene durch Steroidhormone reguliert wird (*KLK* 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14) [Übersicht bei YOUSEF und DIAMANDIS, 2002]. In einer Vielzahl von Zelllinien konnte die Expression von Kallikreinen sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene, durch Behandlung mit Steroidhormonen, induziert werden [SHAW und DIAMANDIS, 2008]. *KLK2* und *KLK3* sind typische Androgen-regulierte Gene. Im *KLK3*-Promotor konnten zwei Androgen-responsive Elemente (AREI -170 bp und AREII -400 bp) identifiziert werden [RIEGMAN *et al.*, 1991, CLEUTJENS *et al.*, 1996]. Ein weiteres ARE (AREIII) wurde weiter stromaufwärts bei ca. -4000 bp gefunden und dient als Enhancer der *KLK3*-Expression [SCHUUR *et al.*, 1996]. Bei *KLK2* wurden zwei ähnliche ARE in Position -300 und -3000 bp experimentell nachgewiesen [MURTHA *et al.*, 1993]. Weitere Studien belegen, dass zusätzliche regulatorische Faktoren in die Transkription dieser Kallikreine-Gene involviert sind, z.B. ein Fos-enthaltender Proteinkomplex der distal zu den AREs im *KLK2*- und *KLK3*-Promotor bindet [SUN *et al.*, 1997].

Im Gegensatz dazu sprechen andere Kallikrein-Gene, inklusive *KLK5* und *KLK6*, stärker auf Östrogen an. Eine interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die Kallikreine-Gene in verschiedenen Geweben durch unterschiedliche Hormone reguliert werden. So wird beispielsweise die *KLK4*-Expression in Prostata- und Brustkrebs-Zelllinien durch Androgen und in Endometerialkarzinom-Zelllinien (Krebs der Uterusschleimhaut) durch Östrogen hochreguliert [NELSON *et al.*, 1999; MYERS und CLEMENTS, 2001]. Auch für die *KLK12*-Expression wurde eine Hochregulation durch Androgen und Progestin in Prostatakrebs-Zelllinien und durch Östrogen und Progestin in Brustkrebs-Zelllinien nachgewiesen [YOUSEF *et al.*, 2000a]. Alternativ kann die *KLK*-Expression auch durch epigenetische Faktoren, vor allem durch DNA-Methylisierung, reguliert werden. So wird zum Beispiel die negative Regulation der *KLK10*-Expression mit der Hypermethylierung der CpG-Inseln bei Brustkrebs und Lymphoblastischer Leukämie in Zusammenhang gebracht [LI *et al.*, 2001]. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus ist auch für *KLK5, KLK6, KLK11* und *KLK12* bekannt [PAMPALAKIS *et al.*, 2006ab]

1.4.2 Regulation der Proteolytischen Aktivität

Die irreversibele Natur der proteolytischen Aktivität von Proteinasen erfordert sorgfältig aufeinander abgestimmte Regulationsmechanismen, um schädlichen Effekten durch unkontrollierte Proteinaseaktivitäten entgegenzuwirken. Eine Dysregulation der Proteolyse steht im Zusammenhang mit verschiedenen pathogenen Auswirkungen, wie der Amyloidogenese bei Alzheimer, der intravaskulären Koagulation bei Sepsis, sowie der neoplastischen Progression verschiedener Tumoren [Übersicht bei Hoosu-Hava *et al.*, 1997; Amaral *et al.*,2004; Borg, 2004]. Ein wichtiger Regulationsmechanismus der Kallikreine ist deren Produktion als inaktive Zymogene und die gezielte Aktivierung [Übersicht bei Neurath und Walsh, 1976]. Die Aktivierung der Kallikrein-Proenzyme findet in Form von genau regulierten Kaskaden statt, wobei verschiedene Rückkopplungsmechanismen und endogene Inhibitoren orchestriert sind. Die Aktivierung der Pro-Kallikreine kann intrazellulär (z.B. im trans-Golgi-Netzwerk) oder extrazellulär nach der Sekretion erfolgen. Mit Ausnahme von hK4 werden alle Proformen der Kallikreine durch C-terminale Spaltung nach Arginin oder Lysin aktiviert, was eine Trypsin-ähnliche Aktivität erfordert. Trypsin kann hK5 und hK7 in die aktive Form überführen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass viele Kallikreine in der Lage sind sich selbst und/oder andere Kallikreine zu aktivieren (Abb.: 1-4). Eine genaue Übersicht ist bei Yoon und Mitarbeitern [2007] zu finden. Auf diese Weise sind Kallikreine in Form von Aktivierungskaskaden an verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Blutkoagulation, der Samenverflüssigung und der Desquamation beteiligt [Michael *et al.*, 2006; Emami und Diamandis, 2008].

Ein negativer Kontrollmechanismus ist die Inaktivierung durch interne Spaltung und anschließende Degradation. Dieser Mechanismus, der bei den Kallikreinen 2, 6, 7, 11, 13 und 14 nachgewiesen wurde, kann autolytisch erfolgen oder durch andere Proteinasen vermittelt werden [Hansson *et al.*, 1994; Magklara *et al.*, 2003; Sotiropoulou *et al.*, 2003; Michael *et al.*, 2006; Borgono *et al.*, 2007b; Sano *et al.*, 2007]. Außerdem können divalente Ionen, wie Zink, die Aktivität einiger Kallikreine inhibieren [Debela *et al.*, 2007]. Weitere wichtige negative Regulatoren sind die endogenen Serinproteinase-Inhibitoren.

1.4.3 Endogene Kallikreininhibitoren

Endogene Inhibitoren stellen die natürlichen peptidischen Gegenregulatoren der Proteinasen dar. Ähnlich wie bei anderen Proteinasen erfolgt die Inhibierung der Kallikreine meist durch eine direkte Blockierung des aktiven Zentrums, indem der Inhibitor auf eine dem Substrat oder Produkt analoge Weise bindet [Huber und Bode, 1978]. Aber auch eine indirekte Blockierung des aktiven Zentrums durch Bindung an eine dem aktiven Zentrum benachtbarte Stelle und/oder zusätzliche Bindung an der Molekülaußenseite (exosite binding) sowie eine Inhibierung durch allosterische Wechselwirkung ist möglich.

In vitro konnte eine Vielzahl von potentiellen endogenen Kallikrein-Inhibitoren identifiziert werden. Jedoch zeigen die meisten dieser Inhibitoren eine relativ geringe Spezifität.

Zum Beispiel konnte für den Protein C Inhibitor (PCI) eine effiziente Inhibition der Kallikreine 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11, 13 und 14 nachgewiesen werden [ESPANA *et al.*, 1995; LUO L.Y. und JIANG W., 2006b]. Die größte bisher bekannte Hemmspezifität zeigt Kallistatin, ein Inhibitor für hK1 und hK7 [CHEN *et al.*, 2000; LUO L.Y. und JIANG W., 2006b].
In der Epidermis sind eine Reihe verschiedenen Serinprotease-Inhibitoren lokalisiert, von denen in Bezug auf die Kallikreinwirkung insbesondere Elafin, SLPI und LEKTI interessant sind [Übersicht bei MÄGERT *et al.*, 2005].

Elafin (Skin-derived Antileukoprotease / SKALP)

Skin-derived Antileukoprotease, auch bekannt als Elafin, wurde ursprünglich aus humaner psoriatischer Epidermis isoliert. Elafin gehört zur Trappin Familie, einer Gruppe von Proteinen die Transglutaminase-Substrate sind und eine WAP(whey acid protein)-Domäne aufweisen. Das Elafin-Gen ist 2,3 kb groß und liegt auf Chromosom 20q12-13 [SCHALKWIJK *et al.*, 1999]. Der Inhibitor wird als 12,3 kDa große Proform gebildet, liegt jedoch als aktives Enzym in einer 6 kDa großen freien und 9,9 kDa großen immobilisierten Form vor [MOLHUIZEN *et al.*, 1993]. In der normalen Epidermis ist Elafin kaum nachweisbar. Die Expression ist jedoch nach Verletzungen, Infektionen und Entzündungen stark hochreguliert [PFUNDT *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 2000]. Besonders zeigt Haut mit dermaler Infiltration von Leukozyten in der immunhistochemischen Färbung ein deutliches Elafin-Signal in der subkornealen Dermis [TANAKA *et al.*, 2000]. Es wird angenommen, dass proinflammatorische Mediatoren wie IL-1β und TNF-α, die von dermalen Neurophilen sekretiert werden, an der Überexpression von Elafin in Keratinozyten beteiligt sind [YING und SIMON, 2001; VACHON *et al.*, 2002].
Elafin hemmt vor allem die von Leukozyten produzierte Elastase und Proteinase 3 [PFUNDT *et al.*, 1996]. Die Relevanz dieses Inhibitors auf die Hemmung der Kallikreinaktivität ist noch unsicher. Dennoch zeigt Elafin einen schwachen inhibitorischen Effekt gegenüber hK7 [FRANZKE *et al.*, 1996]. Zusätzlich zu der Proteinase-hemmenden Funktion hat Elafin Defensin-ähnliche Eigenschaften und besitzt eine antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien, Pilze und möglicherweise gegen HIV [SALLENAVE *et al.*, 2002].

Sekretorischer Leukozyten-Proteinase-Inhibitor/SLPI

Der sekretorische Leukozyten-Proteinase-Inhibitor (SLPI) auch Antileukoproteinase (ALP) oder Human seminal inhibitor (HUSI-I) ist ein 11,7 kDa großes Glykoprotein, dass aus zwei funktionalen Domänen besteht [SEEMÜLLER *et al.*, 1986]. Wie Elafin gehört auch SLPI zur Trappin Familie [RAWLINGS *et al.*, 2004]. Er zeigt eine inhibitorische Aktivität gegenüber Leukozytenelastase, Kathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin sowie hK7 [THOMPSON und OHLSSON, 1986; EISENBERG *et al.*, 1990; FRANZKE *et al.*, 1996]. SLPI ist ein potenter hK7 Inhibitor, der eine wichtige regulatorische Funktion in der Desquamation übernimmt [FRANZKE *et al.*, 1996]. 1988 haben LUNDSTRÖM und EGELRUND in einem *in vitro* Model gezeigt, dass SLPI die Korneozytenabschilferung von humaner planer Haut komplett hemmt. Für andere an der

Desquamation beteiligte Kallikreine wie hK5, hK6, hK13 und hK14 konnte keine Hemmung durch SLPI festgestellt werden. Jedoch sind diese Kallikreine in der Lage SLPI zu hydrolysieren, wodurch zwei oder vier kleinere inhibitorisch inaktive Degradationsfragmente entstehen [BORGONO *et al.*, 2007a]. Außer seiner inhibitorischen Funktion, konnte eine antimikrobielle Aktivität von SLPI nachgewiesen werden [HIEMSTRA *et al.*, 1996]. Weiterhin beschrieben MULLIGAN und Mitarbeiter [2000] antiinflammatorische Effekte von SLPI, wobei ein Zusammenhang mit der Reduktion der Akkumulation von Neurophilen und der Unterdrückung der NF-κB Aktivierung besteht.

Lympho-epithelialer Kazal-Typ verwandter Inhibitor/LEKTI

LEKTI wurde 1999 in der Arbeitsgruppe von MÄGERT entdeckt, als aus menschlichem Hämofiltrat zwei bis dato unbekannte Proteine isoliert wurden. Sie wurden als Teile eines 1064 Aminosäure großen Vorläuferproteins identifiziert, das sich in 15 Domänen (LD1-LD15), die partielle strukturelle Homologien zu Kazal-Typ Serinproteinase-Inhibitoren aufweisen, einteilen lässt. Das LEKTI-Protein besteht aus einem N-terminalen kurzen Signalpeptid und 15 ihrer Aminosäuresequenz nach homologen Serinproteinase-Inhibitordomänen von denen zwei (LD2 und LD15) drei Disulfidbrücken mit Kazal-typischem Verbrückungsmuster besitzen. Den anderen 13 Domänen fehlt das dritte und sechste Kazal-typische Cystein. Das LEKTI-Vorläuferprotein wird posttranslational proteolytisch prozessiert, wodurch bis zu 14 einzelne bioaktive Inhibitordomänen entstehen. Zwischen den einzelnen Domänen (ausgenommen zwischen Domäne 2 und 3) befinden sich Erkennungssequenzen für Subtilisin-ähnliche Proproteinkonvertasen (SCP) (Lys/Arg -X_n-Lys/Arg (X = beliebige Aminosäure, n = Anzahl 0, 2, 4 und 6) bzw. Furin (Arg-X-Lys-Arg) [Übersicht bei MÄGERT *et al.*, 2002]. BITOUN und Mitarbeiter [2003] konnten zeigen, dass das komplette offensichtlich glykosyliert LEKTI-Protein schnell prozessiert wird und nach Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums in wenigstens drei (42, 65 und 68 kDa) großen Fragmenten vorliegt. Bei Anwesenheit eines Hemmstoffes gegen Furin (SPC1), einen Vertreter der SCPs, wurde hingegen keine Fragmentierung beobachtet. LEKTI wird von dem Gen *SPINK5 (serin protease inhibitor kazal-typ 5)* codiert, dass auf dem Chromosom 5q32 lokalisiert ist und sich in 33 Exons und 32 Introns organisiert. CHAVANNAS und Mitarbeiter [2000] fand mit Hilfe der Kopplungsanalyse heraus, dass Mutationen im *SPINK5*-Gen, die in einem vorzeitigen Stop der Translation resultieren, zu der seltenen jedoch schweren Hautkrankheit Netherton Syndrom führen (weitere Erläuterungen zum Netherton Sydrom siehe 1.5). Zusätzlich wurde von WALLEY und Mitarbeitern [2001] berichtet, dass bestimmte Polymorphismen im *Spink5*-Gen mit Atopie, Asthma und Ekzemen assoziert sind. LEKTI wird besonders stark in epidelialen Geweben exprimiert und konnte bislang unter anderem in der Mundschleimhaut, im Ösophagus, in den Tonsillen, im Thymus, in den Glandulae Parathyroidea, in den Bartholinschen Drüsen der Vagina, im Ektozervix des Uterus und in der Epidermis nachgewiesen werden [MÄGERT *et al.*, 1999].

In der Epidermis ist LEKTI vor allem im oberen Stratum spinosum, im Stratum granulosum sowie in den Haarfollikeln und Talgdrüsen zu finden [BITOUN *et al.*, 2003; ONG *et al.*, 2004].

.

```
                                                  P1  P1´
D  Signalpeptid: MKIATVSVLLPLALCLIQDAAS           | |                                                  AS
1                KNEDQEMCHEFQAFMKNGKLFCPQDKKFFQSLDGIMFINKCATCKMILEKEAKSQKR                              79
2     ARHLARAPKATAPTELNCDDFKKGERDGDFICPDYYEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGECKSSNP                 156
3                      EQDVCSAFRPFVRDGLGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRNAEK              222
4                        DFCKYEKQVRNGRLFCTRESDPVRGPDGRMHGNKCALCAEIFKRRFSEENSKTDQNLGKAEEKTKVKR          291
5                  EIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCOVYFQAENEEKKKAEARARNKR                   355
6           ESGKATSYAELCNEYRKLVRNGKLACTRENDPIQGPDGKVHGNTCSMCEVFFQAEEEEKKKKEGESRNKR                    425
7           QSKSTASFEELCSEYRKSRKNGRLFCTRENDPIQGPDGKMHGNTCSMCEAFFQQEERARAKAKR                          489
8                EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEEEEKKNDKEEKGKVEAEKVKR             560
9                EAVQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQEEAKEKERAEPRAKVKR                   625
10               EAEKETCDEFRRLLQNGKLFCTREDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQR                       689
11  NAAGHGSSGGGGGNTQDECAEYQEQMKNGRLSCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEYSRSR                       761
12         SNGTGSESGKDTCDEFRSQMKNGKLICTRESDPVRGPDGKTHGNKCTMCKEKLEREAAEKKKKEDEDR                     831
13 SNTGERSNTGERSNDKEDLCREFRSMQRNGKLICTRENNPVRGPYGKMHINKCAMCQSIFDREANERKKKDEEKSSSKPSNNAKNAK       916
14                   DECSEFRNYIRNNELICPRENDPVHGADGKFYTNKCYMCRAVFLTEALERAKLQEKPSHVR                    974
15 ASQEEDSSPDSFSSLDSEMCKDYRVLPRIGYL-CPKDLKPVCGDDGQTYNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPPSDE  1064
```

Abbildung 1-5. Aminosäuresequenz des LEKTI-Proteins. Die 15 Domänen (D) sind nach ihrem Cystein-Muster (rot markiert) untereinander dargestellt.

In mehren Studien konnte die Hemmung verschiedener Serinproteinasen, wie, Subtilisin A, Kathepsin G, Neutrophilen-Elastase, sowie von einigen Kallikreinen nachgewiesen werden [MITSUDO *et al.*, 2003; JAYAKUMAR *et al.*, 2004; EGELRUD *et al.*, 2005; SCHECHTER *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2006; DERAISON *et al.*, 2007]. Die einzelnen Domänen oder Fragmente bestehend aus mehreren Domänen zeigen eine sehr unterschiedliche Spezifität und Effiziens bezüglich der Serinproteinase-Inhibition. In der, für die Proteinase-Spezifität bedeutenden P1-Position, befindet sich bei den Domänen 3 bis 14 Arginin, was auf eine bevorzugte Hemmung von Trypsin und Trypsin-ähnlichen Proteinasen hinweist. Eine Trypsin-Hemmung konnte für die einzelnen LEKTI-Domänen 3, 5, 6, 8 und 15 [MÄGERT *et al.*, 1999; 2002; VITZITHUM *et al.*, 2008], sowie für die verbunden LD 2-3, 6-9, 8-11, 9-15 [DERAISON *et al.*, 2007] festgestellt werden. LD6 erwies sich als effizienter, allerdings nur temporärer Inhibitor der Trypsinaktivität [KREUZMANN *et al.*, 2004]. Für diese Domäne die ebenfalls effiziente, jedoch permanente Hemmung der Kallikreine hK5 und hK7 durch die Arbeitsgruppe um EGELRUD nachgewiesen wurde [2005]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch große LEKTI-Fragmente, bestehen aus LD 6-9 und LD 9-12, in der Lage sind hK5 zu inhibieren, während nur LD 6-9 hK7 hemmt [SCHECHTER *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2006]. Dies konnte durch DERAISON und Mitarbeiter [2007] bestätigt werden, die in Untersuchungen mit mehreren LEKTI-Fragmenten die stärkste Hemmung von hK5 durch LD 8-11 mit einem sehr niedrigen K_i-Wert von 3,7 nM feststellten.
Außer hK5 und hK7 konnte durch diese Arbeitsgruppen ebenfalls die Hemmung der Kallikreine 6, 13 und 14 durch LEKTI-Fragmente nachgewiesen werden. Gegenüber all diesen Kallikreinen zeigen die untersuchten LEKTI-Fragmente ein individuelles selektives Inhibitionsprofil.

SPINK9/LEKTI-2

LEKTI-2 ist ein 7 kDa großes Protein, das vom Gen *SPINK9* codiert wird und große Homologien zu den LEKTI-Domänen 2 und 15 aufweist. LEKTI-2 besitzt mit P2-P2´ His His Met Tyr eine für Kazal-Inhibitoren ungewöhnliche Aminosäuresequenz des reaktiven Zentrums, was auf eine hohe Selektivität gegenüber seiner Zielproteinasen hindeutet. 2003 wurde die *SPINK9*-mRNA Sequenz von WU, BARTELS und SCHRÖDER veröffentlicht [http://www.ncbi.nlm.nih.go/entrez/viewer.fcgi?val=AY396740.1]. Die Arbeitsgruppe um Brattsand konnten in einer Reverse-Phase-Chromatographie Fraktion aus planarem Stratum corneum Extrakt, welche eine hK5 Inhibition zeigte, LEKTI-2 identifizieren [BRATTSAND *et al*, 2008]. Darauf hin wurde von der Arbeitsgruppe das inhibitorische Potential von rekombinatem LEKTI-2 gegenüber den Kallikreinen 5, 7, 8 und 14 sowie gegenüber Thrombin, bovinem Trypsin und bovinem Chymotrypsin untersucht. Dabei konnte nur eine physiologisch relevante Inhibition von hK5, mit einem K_i-Wert von 65 nM, festgestellt werden. Analysen mit Oberfläche-Plasmon-Resonanz Spektroskopie zeigten eine heterogene Bindung von LEKTI-2 mit hK5 und hK8. Bei Verwendung von Fibrinogen als Substrat wurde auch eine schwache Inhibition von hK8 bei hohen LEKTI-2 Konzentrationen festgestellt, welche jedoch auf eine sterische Behinderung zurückgeführt wird. WU und Mitarbeiter beschreiben auch eine antimikrobielle Aktivität von LEKTI-2 [WU *et al*, 2008].

1.5 KALLIKREIN BEI ENTZÜNDLICHEN HAUTKRANKHEITEN

Die Wirkung von Kallikreinen in der Haut umfasst ebenfalls inflammatorische und immunologische Reaktionen. So gehen verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen, wie atopischen Dermatitis (AD), Netherton Syndrom (NS), Peeling Skin Syndrom Typ B (PSS) und Psoriasis vulgaris mit Abweichungen im Kallikrein Level und/oder der Kallikreinaktivität einher [KOMATSU *et al.*, 2002, 2005b, 2006ab, 2007ab]. Ein gemeinsames Charakteristikum dieser Hauterkrankungen ist die abnormale Desquamation und, damit verbunden, eine massive Störung der natürlichen Hautbarriere.

In Hautläsionen von atopischer Dermatitis wurde eine Überexpression von verschiedenen Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Kallikreinen, hK5, hK6, hK7, hK8, hK10, hK13 und hK14 gefunden, wobei die Chymotrypsin-ähnliche Erhöhung auffälliger ist. Überraschender Weise spiegelt sich diese Erhöhung nicht in einer signifikanten Zunahme der Trypsin- oder Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität im Stratum corneum wieder [KOMATSU *et al.*, 2007a]. Eine ähnliche Überexpression von Kallikreinen wurde auch bei Patienten mit Psoriasis und PSS beobachtet [KOMATSU *et al.*, 2006a, 2007b]. Besonders bei psoriatischer Haut konnte eine deutliche Hyperaktivität von hK7 nachgewiesen werden. Studien an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Überexpression von hK7 zur Ausbildung einer juckenden Dermatitis führt, die durch Hyperkeratinose, sowie durch dermale Entzündungsreaktionen und Pruritus (Juckreiz) gekenntzeichnet ist [HANSSON *et al.*, 2002; NY und EGELRUD, 2004]. Die Rolle von hK7

bei der Entstehung von entzündlichen Hauterkrankungen beruht möglicherweise auch auf der Fähigkeit, proinflammatorisch wirkenden Zytokine, wie IL-1β, in die aktive Form zu überführen [NYLANDER-LUNDQVIST und EGELRUD, 1997].
Die Bedeutung der Regulation von Kallikreinen durch Serinproteinase-Inhibitoren der Haut wird am Beispiel vom Netherton Sydrom deutlich. Die Ausbildung von Netherton Syndrom steht im direkten Zusammenhang mit Mutationen im *SPINK5*-Gen, die zu einem nicht vollständig gebildeten LEKTI-Protein führen [CHAVANAS *et al.*, 2000; SPRECHER *et al.*, 2001; DESCARGUES *et al.* 2005]. Da bei Patienten mit Netherton Syndrom auch eine erhöhte Trypsin-ähnliche proteolytische Aktivität im Stratum corneum festzustellen ist, wird angenommen, dass eine unzureichende Inhibierung von Kallikreinen, aufgrund des LEKTI-Mangels, die Ursache für die charakteristische übermäßig starke Hautschuppung darstellt [KOMATSU *et al.*, 2002; DESCARGUES *et al.*, 2006]. Zudem bestärken mehrere Studien an *SPINK5* defizienten Mäusen die Bedeutung von LEKTI für die Regulation der proteolytischen Prozesse und der Differenzierung der Haut, da SPINK5$^{-/-}$ Mäuse eine beeinträchtigte epidermale Barrierefunktion zeigen und eine erhöhte proteolytische Aktivität der Haut aufweisen [YANG *et al*., 2004; DESCARGUES *et al*., 2005; HEWETT *et al*., 2005].
Das Netherton Syndrom und die anderen erwähnten Kallikrein-assoziierten Hautkrankheiten werden im Folgenden kurz beschrieben.

Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis, auch bekannt als Neurodermitis oder atopisches Ekzem, ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die in Abhängigkeit vom Lebensalter und dem Krankheitszustand ein individuell komplexes Symptomspektrum zeigt. Diagnostische Hautkriterien der Erkrankung sind spröde, trockene und rissige Haut, die stark zu Entzündungen neigt, Puritus, sowie ein chronischer Verlauf der Dermatitis. Zudem können Patienten atopische Manifestationen, wie allergisches Asthma bronchiale oder allergische Rhinitis, entwickeln. Bei 70 bis 80% der Betroffenen findet man erhöhte IgE-Titer. Die atopische Dermatitis setzt meist im Kindesalter ein. Weltweit sind 10 bis 20% der Kinder und 2 bis 3% der Erwachsenen daran erkrankt. Oft vermindern sich die Symptome mit dem Älterwerden, wobei es in der Pubertät häufig zu einer spontanen Abheilung der Krankheit kommt. Die Ursachen der atopischen Dermatis sind multifaktional und derzeit noch nicht vollständig geklärt.
Es besteht eine starker Zusammenhang von AD mit Mutationen im Filaggrin-Gen, die zu einer Verminderung von Filaggrin in den äußersten Hautschichten führen [O´REGAN *et al.*, 2008]. Filaggrin ist entscheidend für die Aggregation der Keratinfilamente und deren Vernetzung durch Disulfidbrücken. Ein Mangel an Filaggrin bedingt eine gestörte Differenzierung und Kornifikation der Keratinozyten. Charakteristisch ist auch ein Ungleichgewicht der natürlichen Hautflora, so wird die Haut von AD-Patienten teilweise massiv von Bakterien, wie *Staphylococcus aureus,* und Hefepilzen, wie *Candida* und *Malassezia,* besiedelt [JOHANSSON *et al.*, 2003; RIPPKE *et al.*, 2004]. Die gestörte Hautbarriere erleichtert das

Eindringen von Allergenen und Mikroorganismen, was Entzündungsreaktionen der Haut verstärkt [Übersicht bei Fritsch, 2003; LEUNG und BIEBER, 2003, ALTMEYER und BACHARACH-BUHLES, 2010].

Psoriasis

Bei Psoriasis (Schuppenflechte) handelt es sich um eine häufig vorkommende Hautkrankheit, die hauptsächlich durch epidermale Hyperproliferation und (auto)-immunologische Entzündungsprozesse gekennzeichnet ist. Sie kann sowohl chronisch stationär, wie auch rezidivierend in Schüben verlaufen. Die am häufigsten vorkommende Form ist die Psoriasis vulgaris oder Plaque-Psoriasis bei 90% der Betroffenen. Zum typischen Erscheinungsbild dieser Form gehören die verdickten, geröteten, scharf begrenzten Plaques mit silbrig-weißen Schuppen, die durch die übermäßige Keratinozytenproliferation entstehen Die am häufigsten betroffenen Hautstellen sind Ellenbogen, Kniescheiben, Kopfhaut, sowie Hände und Füße. Die Ätiologie der Krankheit ist bisher nicht vollständig geklärt. Eine genetische Disposition gilt als gesichert, wobei verschiedene Faktoren wie mechanische Reize, chronische Schädigungen, bakterielle Infekte, Stoffwechselstörungen oder Stress zum erstmaligen Ausbruch oder zu Krankheitsschüben führen können.

Psoriasis ist gekennzeichnet durch einen stark gesteigerten epidermalen Turnover. Der Zellzyklus ist auf zwei bis vier Tage verkürzt, was in einer unvollständigen Differenzierung der Keratinozyten resultiert. Neuere Erkenntnisse zur Psoriasisentstehung [Übersicht bei FRITSCH, 2003; LINHART, 2003; WEYERS, 2003] gehen davon aus, dass es sich um eine Autoimmunreaktion handelt, wobei eine Interaktion von aktivierten dendritischen Zellen und T-Lymphozyten zur Auslösung einer Th-1 vermittelten Entzündung führt. In psoriatischen Hautläsionen wurde eine erhöhte Anzahl an T-Lymphozyten, sowie dendritischen Zellen und neurophilen Granulozyten beobachtet [BONIFATI und AMEGLIO, 1999]. Zudem sezernieren stimulierte Keratinozyten proinflammatorische Zytokine, INF-γ (Interferon γ), und Transforming growth factor α (TGFα), die als Entzündungsmediatoren dienen. Neben der Hyperproliferation und den bestehenden lokalen Entzündungsreaktion sind psoriatische Plaques durch das Fehlen des Stratum granulosum, durch subkorneale Mikroabszesse und durch eine verstärkte dermale Angiogenese charakterisiert [Übersicht bei ALTMEYER und BACHARACH-BUHLES, 2010].

Netherton Syndrom und Peeling Skin Syndrom

Netherton Syndrom und Peeling Skin Syndrom sind erbliche Hautkrankheiten, die zur Gruppe der Ichthyosen gehören. Der Begriff „Ichthyose“ leitet sich vom altgriechischen *ichthys,* für Fisch, ab und heißt wörtlich übersetzt „Fischschuppenkrankheit“. Heutzutage ist Ichthyose ein Überbegriff für eine Vielzahl hereditärer Verhornungsstörungen mit unterschiedlichen genetischen Ursachen und variablem Erscheinungsbild. Die meisten Ichthyosen bestehen lebenslänglich und stellen, je nach Ausprägung, für die Betroffenen schwere Erkrankungen dar.

Das **Netherton Syndrom** (auch Cormél-Netherton Syndrom) ist eine seltene, autosomal rezessive Genodermatose, die mit Verhornungsstörungen, Haarschaftanomalien und Atopien kombiniert einhergeht. Die Inzindenz beträgt 1 zu 200 000. Unmittelbar nach der Geburt zeigt sich in den ersten Lebenswochen eine ichthyosiforme Erythrodermie (kleinförmige Schuppung), was in schweren Fällen zu hypernatriämischer Dehydration, Infektionen, Wachstumsretardierung und Nierenversagen führen kann. Die Erythrodermie kann lebenslang bestehen oder entwickelt sich nach und nach in eine Ichtyosis linearis circumflexa mit polyzyklisch wanderenden Plaques, die häufig eine doppelkantige Schuppung am Rand aufweisen. Nicht obligat, aber charakteristisch, ist der Haardefekt Trichorrhexis invaginata, auch als Bambushaar bezeichnet, der aus vorübergehenden, aber wiederkehrenden Defekten der Keratinisation herrührt und zum leichten Abbrechen der Haare führen kann. Ähnlich wirken sich auch andere Haaranomalien, wie Pili torti und Trichorrhexis nodosa, bei NS aus. Darüberhinaus besteht eine atopische Diathese mit deutlich erhöhtem IgE Spiegel und Prädispositionen für Überempfindlichkeitsreaktion wie Heuschnupfen und Asthma [Übersicht bei TRAUPE H., 1989; HÖGER, 2007; NIRK Netzwerk Ichthyose].
Wie schon erwähnt steht NS in direktem Zusammenhang mit Mutation im LEKTI-kodierenden Gen *SPINK5*. Es wurden verschiedene Mutationen im *SPINK5*-Gen bei NS beschrieben, die zu vorzeitigen Stop-Codons führen, was einen frühzeitigen Abbruch der Translation zur Folge hat. Dadurch entsteht ein LEKTI-Mangel, der für Ausprägung von NS entscheidend ist [SPRECHER *et al.*, 2001; BITOUN *et al.*, 2001, DESCARGUES *et al.*, 2005).
Das **Peeling Skin Syndrom** ist ebenfalls eine seltene kongenitale ichthyosiforme Dermatose, die sich in eine nicht-entzündliche (Typ A) und eine entzündliche (Typ B) Variante unterteilt. Bei Typ A handelt es sich um eine nicht-entzündliche Form, die durch eine wiederholte und spontane Ablösung des Stratum corneum charakterisiert ist. Besonders häufig sind die Extremitäten davon betroffen. Die mit der Geburt oder innerhalb der ersten Lebensjahre beginnende Verhornungsanomalie, bleibt meist zeitlebens bestehen. Die Ablösung der obersten Hautschicht kann in eignen Fällen symptomlos erfolgen, während es von anderen Patienten als juckend oder brennend empfunden wird. Die entzündliche Form des PSS zeichnet sich durch eine exfolative Erythrodermie aus und ist mit Wachstumsstörungen und ständigen Hautinfektionen verbunden. Histologisch ist die Epidermis psoriasisformer ohne oder mit stark reduzierten Stratum granulosum und einer deutlichen Hyperkeratose verbunden. Die Annahme, dass es sich beim PSS Typ B wahrscheinlich um eine Variante des Netherton Syndroms handelt, geht auf Prof. Traupe vom NIRK-Netzwerk zurück. Jedoch liegen beiden Krankheiten, trotz der Ähnlichkeit in der phänotypischen Ausbildung, unterschiedliche genetische Ursachen zugrunde [KOMATSU *et al.*, 2006a]. So führen CASSIDY und Mitarbeiter [2005] die Adhärenzdefiziens innerhalb des Stratum corneums bei akralem PSS auf einen Mangel an Transglutaminase 5 zurück, der durch Mutationen im entsprechenden Gen *TGM5* bedingt ist [Übersicht bei ALTMEYER und BACHARACH-BUHLES, 2010; NIRK Netzwerk Ichthyose].

1.6 ZIELE

In der menschlichen Haut werden mehrere Kallikreine exprimiert die an verschiedenen Aspekten der Hautphysiologie beteiligt sind und einen wichtigen Beitrag zum Erhalt ihrer Barrierefunktion leisten. Eine Dysregulation dieser Serinproteinasen steht im Zusammenhang mit einer Reihe entzündlicher Hautkrankheiten. Unter den endogenen Kallikreininhibitoren ist insbesondere der Multidomänen-Serinproteinase-Inhibitor LEKTI als Regulator der Kallikreinaktivität von Interesse, da ein durch Mutationen bedingter LEKTI-Mangel ursächlich für die Ausprägung der seltenen jedoch schweren Hautkrankheit Netherton Syndrom ist. Bei Patienten mit Netherton Syndrom wurde eine erhöhte Trypsin-ähnliche Aktivität festgestellt, welche auf eine unzureichende Hemmung der Kallikreine 5 und 7 zurückgeführt wurde.

Um das regulatorische Zusammenspiel von Kallikreinen und LEKTI besser charakterisieren zu können, war das Hauptziel dieser Arbeit die Durchführung von *in vitro* Hemmtest mit den in der Haut vorkommenden Kallikreinen und ausgewählten LEKTI-Domänen. Dafür sollten sowohl die cDNA-Fragmente der LEKTI-Domänen, wie auch der Kallikreine kloniert werden und diese dann durch heterologe Expression rekombinant herzustellen. Um für die Untersuchungen ausreichende Mengen an rekombinanten Proteinen zur Verfügung zu haben, war es erforderlich effiziente Expressions- und Reinigungsysteme zu etabliert, wobei der Erhalt der biologischen Aktivität besondere Priorität hatte. Mit Hilfe chromogener Peptid-Substrate sollten die hydrolytischen Eigenschaften der Kallikreine charakterisiert werden. Anschließend sollte auf diese Weise auch das Hemmpotential der LEKTI-Domänen gegenüber den Kallikreinen untersucht werden.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand zunächst Kallikrein 11, da dieses zwar stark in der Haut exprimiert wird, es aber bis dato keine Hinweise aus auf physiologische sowie pathologische Funktion in der Haut existieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dem besseren Verständnis der komplexen Kallikrein/LEKTI-Interaktionen dienen und damit mittel- und langfristig zur Entwicklung von Kallikreininhibitoren für die Therapie entzündlicher Hautkrankheiten beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Alle im folgenden Kapitel verwendeten Medien, Puffer, Chemikalien und Geräte sind bezüglich ihrer Hersteller, Zusammensetzung und/oder Anfertigung im Anhang ausführlich aufgeführt.

2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die meisten molekularbiologischen Methoden wurden in Anlehung an die Beschreibung von SAMBROOK und Mitarbeitern [1989] durchgeführt, daher werden diese im Folgenden nur kurz beschrieben.

2.1.1 AGAROSEGELELEKTROPHORESE ZUR DNA-AUFTRENNUNG

Zu präparativen und analytischen Zwecken wurden DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht in horizontalen, 1,0 - 1,7%igen (w/v) Agarose/1xTAE-Gelen aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde den Gelen vor der Polymerisierung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen 5x DNA-Gelladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte mit TAE-Laufpuffer in Mini- oder Midigelen bei 90V bzw. 110V in Elekrophoresekammern der Firma Biometra. Zur Dokumentation der Gele wurde das Fotodokumentationsprogramm Argus X1 (Biostep GmbH) genutzt. Zur Abschätzung der relative Größe der DNA wurden die Molekulargewichtsstandards 100 bp (Roth), 1 kbp (Roth) oder Quantitas DNA Leiter (Biozym) verwendet.

2.1.2 NUKLEINSÄUREISOLIERUNG

Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden mit sterilen, gestopften Pipettenspitzen sowie RNase freien Lösungen und Materialien durchgeführt. Aus den kultivierten Zelllinien HaCaT bzw. CHO wurde die Gesamt-RNA mittels Peq-Gold RNAPure (Peqlab), All Prep RNA/Protein Kit (Quiagen) oder SV Total RNA Isolation System (Promega) gemäß den Angaben der Hersteller isoliert. Bei Verwendung der Kits Peq-Gold RNAPure und All Prep RNA/Protein Kit schloß sich ein DNase-Verdau mit dem Turbo DNA-free Kit (Ambion), nach dem mitgelieferten Standardprotokoll, an. Pro 10 µg RNA wurden dabei 1 µl DNase eingesetzt. Durch Gelelektrophorese wurde die RNA-Isolierung überprüft. Die RNA-Proben wurden zunächst bei 65°C für 15 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde zu einem Probenvolumen von 2,5 µl jeweils 7,7 µl RotiLoad RNA (Roth) hinzugefügt und das Probengemisch in die

Ladetaschen eines 1,7%igen (w/v) Agarose/1x TAE-Geles pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben. Die Reinheit und Konzentration der RNA-Präzipitate wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Plasmid Mini-Prep-Kit (Peqlab),Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder Prep Pro Plasmid Miniprep Kit (Biozym) aus 1-5 ml üNKultur nach dem jeweilige Protokoll des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch ermittelt.

Isolierung genomischer DNA aus *P. methanolica*

Die Präparation genomischer DNA wurde mit dem DNeasy-Tissue-Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Arbeiten erfolgten laut Protokoll des Herstellers. Die isolierte genomische DNA wurde anschließend mittels PCR überprüft.

2.1.3 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Messung erfolgte mit dem NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) mit automatischer Quantifizierung oder mit einem Einstrahlphotometer Cadas 100 (Dr Lange), wobei UV-Einmal-Plastikküvetten (Brand) mit einer Schichtdicke (d) von 1 cm verwendet wurden. Dabei wurde zu Grunde gelegt, dass eine Absorptionseinheit bei 260 nm (A260 = 1,0) einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml, einer ssDNA-Konzentration von 33 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 42 µg/ml entspricht [Sambrook *et al.*, 1989]. Der Grad der Reinheit kann photometrisch aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A260/A280) bestimmt werden. Für die weiteren Arbeiten wurden nur Proben verwendet bei denen dieser Quotient zwischen 1,5 und 2 lag.

2.1.4 PCR Anwendungen

Standard-PCR

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Mullis *et al.*, 1986] dient der selektiven exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Sequenzen *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit fanden, in Abhängigkeit des Versuches, verschiedene DNA-Templates, Oligonukleotid-Primer, sowie DNA-Polymerasen Verwendung.Die Temperatur zur Oligonukleotidanlagerung wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Wenn nicht anders erwähnt wurde zur Amplifikation eine *Taq*-Polymerase in einem Mastermix mit dNTPs und dem entsprechenden Puffer der Firmen Promega, Quiagen oder Peqlab verwendet. Die Polymerasen der verschiedenen Hersteller wurden als gleichwertig

angesehen. Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Kallikrein-Konstrukte für die Transformation von *P. methanolica* erfolgte mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase (Peqlab). Das Pro-hK11 3S/2AS-Konstrukt wurde mit *KOD*-Polymerase (Merck) amplifiziert. Exemplarisch sind drei Standardreaktionsansätze (50µl) mit den verwendeten Polymerasen angegeben.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
DNA-Template (1 - 500 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Sense-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	1,5 µl
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	0,75 µl
Taq-Master Mix (0,05 U/µl *Taq*-Polymerase, 0,4 mM dNTP-Mix, Puffer)	25 µl		
KOD Hot Start DNA Polymerase (1,0 U/µl)			1 µl
KOD-Master Mix			13 µl
Pfu-Polymerase (5 U/µl)		0,5 µl	
dNTP-Mix (40 mM)		1 µl	
10x Pfu-Puffer		5 µl	
ddH_2O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler GeneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems) unter Verwendung variierender Programme. Die Synthesezeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes. Ein typischer Ablauf erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Initiale Denaturierung	95 °C	120 s	
Denaturierung	95 °C	20 s	
Oligonukleotidanlagerung	50 °C - 65 °C	15 - 30 s	
Elongation	72 °C[1]	30 - 120 s	20 - 40 Zyklen
End-Elongation	72 °C[1]	300 s	
Reaktionsende	4 °C		

1) bei Verwendung von *KOD*-Polymerase 68°C

Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnten Transformanten ohne vorherige Plasmidisolierung auf eine erfolgreiche Klonierung hin getestet werden. Bakterienkolonien dienten dabei als Quelle für die Matrizen-DNA und wurden vorsichtig mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte genommen, auf einer neuen Selektivagarplatte vereinzelt und der Zahnstocher anschließend in ein mit 11 µl bidest. Wasser gefülltes PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 99°C aufgeschlossen Dann wurden die restlichen Reaktionkompomenten hinzugegeben (siehe Standard PCR, die Hälfte des Ansatz 1). Als Primer dienten der jeweilige fragmentspezifische Senseprimer (10 pmol/µl) und ein vektorspezifischer Antisenseprimer (Invitrogen, nach Herstellerangabe). Die Amplifikation erfolgte wie bei der Standard-PCR.

RT-PCR

Die reverse Transkription ist eine abgewandelte Form der PCR in deren Verlauf mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse-Transkriptase aus einer RNA komplementäre DNA (cDNA) generiert wird. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Science) oder dem SuperScript First Strand Synthesis System Kit (Invitrogen). Für einen 20 µl Ansatz wurde jeweils 2-5 µg Gesamt-RNA und 1-2µg Oligo(dt)18-Primer in 12 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 min bei 70°C denaturiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach der Herstellerangabe. Die erhaltene cDNA wurde mittels Standard-PCR mit dem Primerpaar b-Tubulin-1S/b-Tubulin-2AS überprüft.

Sequenzier-PCR

Für die Erzeugung von Kettenabbruchfragmenten zur Kapillarsequenzierung wurde das DTCS-Quick Start-Kit (Beckmann-Coulter) verwendet. In Abhängigkeit von der DNA-Länge wurden zwischen 30 ng und 100 ng gereinigtes PCR-Fragment bzw. 400 ng Plasmid als DNA-Matrize eingesetzt. Plasmide wurden zusätzlich für 10 min bei 85°C denaturiert. In einen 10 µl Reaktionsansatz wurde 4 µl DTCS-Mastermix, 50 pmol Sense- oder Antisenseprimer und bidest. Wasser zugegeben. Die Amplifikation erfolgte nach folgenden Bedingungen:

Denaturierung	94 °C	30 s	
Oligonukleotidanlagerung	50 °C	30 s	
Elongation	60 °C	4 min	30 Zyklen
End-Elongation	60 °C	10 min	
Reaktionsende	4 °C		

Nach Abschluß der PCR wurden alle Reaktionsansätze durch DNA-Präzipitation aufgereinigt.

2.1.5 Reinigung von DNA

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um die DNA wieder aus Agarosegelen zu isolieren und zu reinigen, wurden die Kits NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel) und QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen) verwendet. Nach Auftrennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese, wurden die jeweiligen Banden unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Mit der ausgeschnittenen Bande wurde nach Herstellerangaben weiter verfahren. Die Reinheit wurde per Agarosegelelektrophorese überprüft.

Aufeinigung von DNA über Silikagel

Zum Entsalzen der DNA und Abtrennung eingesetzter DNA-modifizierender Enzyme wurden die Kits, NucleoTrap Kit (Macherey-Nagel) und MiniElute ™ Reaction Clean up Kit (Qiagen) mit Silikagel nach Herstellerangaben verwendet.

Aufreinigung durch DNA-Präzipitation

Zur Fällung der DNA wurde der Reaktionsansatz mit bidest. Wasser auf 80 µl aufgefüllt und anschließend 10 µl 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2 und 250 µl 96%igen Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min bei -20°C wurde der Ansatz für 15 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das DNA-Präzipitat zweimal mit 1 ml 70%igem Ethanol bei 12 000 x g für 10 min zentrifugierend gewaschen und anschließend bei 37°C luftgetrocknet.

2.1.6 Modifikation von DNA

Restriktion

Zur Klonierung wurde sowohl der jeweilige Vektor pBADgIII, pMetaA oder pZeoSV2 wie auch das entsprechende DNA-Fagment mit Restriktionsendonukleasen der Firmen NEBioLabs oder Invitrogen hydrolysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Restriktionen in diversen Enzym-Kombinationen und unter variierenden Bedingungen durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze richtete sich nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften. Die Inkubation erfolgte in der Regel im Brutschrank bei 37°C für 3h. Eine gleichzeitige Restriktion der DNA mit unterschiedlichen Enzymen war möglich, falls diese bei gleichen Pufferbedingungen aktiv waren. Anderfalls erfolgte der Verdau nacheinander. Die DNA wurde nach jedem Inkubationsschritt gereinigt. Eine Agarosegelelektrophorese diente zur Kontrolle.

Ligation mit T4-DNA-Ligase

Für die Ligation wurde das jeweilige DNA-Fragment in 2-5 molarem Überschuss zum Vektor mit Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen) im 10 µl Ansatz gemischt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT und anschließend üN bei 4-8°C. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde gereinigt und anschließend zur Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt.

Ligation mit Topoisomerase

Die Ligation der DNA-Fragmente mit dem pBAD/Thio-TOPO Vektor (Invitrogen) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Linearisierung der Plasmid-DNA

Zur Vorbereitung der Transformation der Hefe *P. methanolica* wurden, die nach Restriktionsanalysen ausgewählten Plasmide (8 µg), durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *AscI* (10 U, NEBioLabs) in entsprechendem Puffer linearisiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

2.1.7 DNA-SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA erfolgte mit dem 8-Kapillar-Sequenzierer CEQ 8000 (Beckmann-Coulter). Da das Gerät nach dem Sanger-Prinzip arbeitet [SANGER *et al.*, 1977], mussten alle Proben zuvor eine Sequenzier-PCR mit nachgeschalteter DNA-Präzipitation (2.1.4 und 2.1.5) durchlaufen. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte automatisiert nach der Standardmethode LFR-1, jedoch ohne vorangegangene Denaturierung durch den CEQ 8000. Die Auswertung der Fluoreszenzdiagramme wurde mit der SEQ 8000 Genetic Analysis System-Software (Beckmann-Coulter) durchgeführt.
Alternativ wurde die Sequenzierung von Plasmid-DNA von der Firma MWG durchgeführt.

2.2 TRANSFORMATIONSMETHODEN

Transformation von *E. coli*-Zellen

Nachdem die transformationskompetenten *E. coli* Top 10 oder XL2 blue Zellen leicht auf Eis angetaut waren, wurden 5 µl des Ligationsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei einer Temperatur von 42°C. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis überführt. Anschließend wurden 250 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium (Invitrogen) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte eine Inkubation bei 37°C schüttelnd bei 140 rpm. Auf selektiven

LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Zeocin (25 µg/ml) wurden nun jeweils 25 µl und 200 µl ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von *P. methanolica*-Zellen

Nach Protokollangaben des *P. methanolica* Expressionskits (Invitrogen) wurden elektrokompetente *P. methanolica* Hefezellen, der Stämme PMAD16 und PMAD11 mit ca. 2 µg linearisierter Plasmid-DNA mittels Elektroporation transformiert. Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Einstellungen am EasyJecT Prima (EquiBio):
Spannung: 1800 V , Kapazität: 50 µF , Widerstand:
Danach erfolgte das Ausplattieren von je 50 µl transformierter Hefesuspension auf 2 MD-Nähragarplatte. Die Platten wurden für 3 d bei einer Temperatur von 30°C inkubiert.

Transfektion von CHO-Zellen

Für die Transfektion der CHO-Zellen wurde das Roti-Fect PLUS (Roth) Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben verwendet. In Zellkulturflaschen (25 cm²) wurden die Zellen mit einer Dichte von $2{,}5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und mit 5 ml frischem HAM`s F12-Komplettmedium für 24 h in Kultur gehalten. Ab einer Konfluenz von 50-90 % wurden diese mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus 5 µg Plasmid-DNA, 60 µl Roti-Fect PLUS in ca. 5 ml HAM`s F12-Medium mit 10% BS gleichmäßig überschichtet. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 5 ml frisches HAM`s F12-Komplettmedium ersetzt. Die Zellkulturflaschen wurden erneut für 20 h bei 37°C inkubiert, bevor ein weiterer Medienwechsel mit zeozinhaltigem HAM`s F12-Komplettmedium erfolgte. Zur Selektion wurden die Zellkulturflaschen mit 0, 50, 250, 500, 750 und 1000 µg/ml Zeozin über fünf Tage inkubiert. Als Negativkontrolle dienten dabei untransfizierte CHO-Zellen.

2.3 Mikrobiologische Arbeiten

2.3.1 *E. coli*-Kulturen

Allgemeine Kulturbedingungen

Routinemäßig erfolgte die Anzucht aller verwendeter *E. coli*-Zellen in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten (Luria/Miller) aerob bei 37°C. Bei transformierten Klonen mit (pBADgIIIA und ThioTopo) war zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin enthalten. Bei Klonen die mit ZeoSV2 transformiert waren, wurde LB-Medium/LB-Agarplatten (Lennox) mit 25 µg/ml Zeocin verwendet. Flüssigkulturen wurden bei 140 rpm schüttelnt inkubiert. Von positiven Klonen wurde für die Konservierung über längere Zeiträume Aliquots mit 30% Glycerin hergestellt und bei -80°C eingefroren.

Herstellung kompetenter E. coli XL2 blue-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* XL2 blue-Zellen kam die PEG-Methode zum Einsatz [NISHIMURA et al., 1990]. Eine *E. coli*-üN-Kultur wurde mit Medium A 1:100 verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,5 schüttelnt inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen 10 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 2 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 0,01 Volumen eiskaltem Medium A resuspendiert und tropfenweise mit 0,05 Volumen Medium B vermischt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Expression der LEKTI-Domänen

Die rekombinaten LEKTI-Domänen wurden mit Hilfe des Vektors pBAD/Thio-TOPO bzw .pBADgIIIA exprimiert. In Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Medium wurden üN-Kulturen aus einzelnen Bakterienklonen bis zu einer OD_{600} = 1-2 inkubiert. Anschließend wurden die Expressionsansätze mit der üN-Vorkultur (1:100 Verdünnung) beimpft. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} = 0,5-0,6 durch Zugabe von Arabinose induziert und anschließend weiter inkultiviert. Um die optimalen Bedingungen für die Expression zu erhalten, wurden Versuche unter Variation der Arabinosekonzentration (0,002-0,2%), Induktionsdauer (4-24 h) und Induktionstemperatur (RT und 37°C) gemacht. Als Grundlage für die veränderlichen Parameter wurden die Herstellerangaben des pBAD/gIII A, B, and C Expressionskits (Invitrogen) genommen.

2.3.2 *P. METHANOLICA*-KULTUREN

Die folgenden Protokolle sind im Wesentlichen dem Handbuch des Pichia Expression Kits (Invitrogen) entnommen.

Allgemeine Kulturbedingungen

Die routinemäßige Anzucht erfolgte in YPAD-Flüssigmedium bzw. YPAD-Agarplatten bei 30°C. Nach Transformation wurden die Hefeklone auf Adenin-freiem Minimalmedium, MD-Agarplatten, selektiert. Die weitere Kultivierung der *P. methanolica*-Klone erfolgte in MD-Flüssigmedium bei 30°C und 220 rpm. Zur Langzeitaufbewahrung wurden Aliquots mit 15% Glycerin bei -80°C eingefroren.

Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter *P. methanolica*-Zellen der Stämme pMAD11 und pMAD16 erfolgte nach der im Handbuch des Pichia Expression Kits (Invitrogen) beschriebenen Methode.

Expression der Kallikreine

Die rekombinaten Kallikreine wurden mit Hilfe des Vektors pMETaA exprimiert und anschließend ins Medium sekretiert. Dazu wurde BMDY-Medium mit einzelnen Hefekolonien, von MD-Selektionsagar, beimpft und bei 30°C und 220 rpm im Schüttler über Nacht inkubiert. Diese Vorkulturen wurden zum Beimpfen der Expressionsansätze BMDY-Medium mit Zusatz von 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin in Erlenmeyer-Kolben verwendet. Zur Optimierung der Kallikreinexpression wurden die im Handbuch des Pichia Expression Kits (Invitrogen) angegebenen Bedingungen variiert und einzeln oder in verschiedenen Kombinatationen getestet:

- Sauerstoff-Eintrag: durch Verwendung von Erlenmeyerkolben mit oder ohne Schikanen
- Induktionszeitpunkt: MeOH-Zugabe nach vollständigem Glukoseverbrauch oder bei einer Restglukosekonzentration von 2 g/l
- Induktionsart: abzentrifugieren der Zellen und resuspendieren in BMMY-Medium oder supplementieren des alten Mediums mit MeOH (Endkonzentration 0,5% (v/v))
- Induktionsdauer: 3-5 d
- Methanolzugabe: alle 24 h 0,1 Volumen 5%igen MeOH oder nach Bedarf einstellen auf eine Endkonzentration von 0,5% (v/v)

Der Verbrauch der Glukose- und Methanolkonzentration wurde mit dem YSI 2700 Select (YSI Incorporated) unter Verwendung entsprechender Messzellen nachvollzogen. Zur Ermittlung der Methanolkonzentration wurde eine Ethanolmesszelle verwendet. In Vorversuchen mittels einer Methanolverdünnungsreihe wurde eine Kalibrierfunktion erstellt. Die Methanolkonzentration wurde bei allen Messungen mit Hilfe der nachfolgenden Formel (Kalibrierfunktion) berechnet.

$$c_{Methanol} = 0{,}22 \cdot c_{Ethanol} - 0{,}028$$

Overlay-Assay

Einzelkolonien wurden von einer MD-Agarplatten auf eine MM-Agarplatten übertragen und kultiviert. Auf die MM-Argarplatte wurde eine PVDF-Membran (Roth) gelegt und diese dann weitere 3 d bei 30 °C inkubiert. Zur ausreichenden Versorgung der Zellen mit MeOH wurde täglich 1 ml 100% MeOH in den Deckel der umgedrehten Kulturplatte gegeben. Die anschließende Immunodetektion erfolgte analog zum Western Blot (siehe 2.5.3).

***In situ*-Zymographie mit Proteinase-Indikator-Platten**

Die Hefeklone wurden auf MM-Agarplatten, die 1% (w/v) Magermilchpulver als Proteinasesubstrat enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend für 9 d, bei täglicher Zugabe von 1 ml 100% MeOH (in den Deckel der umgedrehten Kulturplatte), inkubiert. Proteinaseaktivität führt zur Entstehung klarer Höfe um die Hefekolonien. Zur besseren Visualisierung wurden die Hefekolonien mit dest. Wasser abgespült, die Platten 2 min mit

Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung and anschließend mit Entfärbe-Lösung schüttelnd inkubiert.

2.4 ZELLKULTURARBEITEN

Allgemeine Zellkulturtechniken

Im Rahmen der Arbeit wurden die Zelllinie CHO (Chinese-Hamster-Ovarialzellen) [KAO und PUCK, 1968], für die Transfektion mit dem Vektor pZeoSV2 und die Expression von Pro-hK11 sowie die humanen Keratinozytenzellinie HaCaT [BOUKAMP *et al*., 1988] als mRNA-Quelle für die cDNA-Synthese verwendet.
Sämtliche Arbeiten erfolgten nach den von LINDL [2002] publizierten Empfehlungen für den Umgang mit eukaryotischen Zellen.
Die Kultivierung der HaCaT-Zellen erfolgte in Dulbecco´s Mod Eagle Medium (DMEM) dem 10% Rinderserum (BS) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. CHO-Zellen wurden in Ham´s F12 mit 10 % BS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Bei transfizierten CHO-Zellen wurde dem Medium als Antibiotikum 250 µg/ml Zeocin zugegeben. Die verwendeten Zelllinien wuchsen als adhärente Monolayer und wurden in 25cm² bzw. 75 cm² Kulturflaschen bei 37°C in mit Wasserdampf gesättigter Luft und 5 % CO_2 im Brutschrank CB 150 (Memmert) inkubiert, mindestens zweimal wöchentlich mit frischen Medium versorgt und nach Bedarf mit 0,25%igem Trypsin-EDTA abgelöst und verdünnt neu ausgesät. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach Neubauer (LO Laboroptik) bestimmt und dabei die Vitalität der Zellen mittels Trypanblaufärbung [LINDL 2002] überprüft. Die Langzeitaufbewahrung der Zelllinien erfolgte in entsprechendem Medium mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff.

Expression von hK11 in CHO-Zellen

Die heterologe Expression von Pro-hK11 erfolgte sekretorisch mit Hilfe des Vektors pZeoSV2. $1{,}5 \cdot 10^6$ transfizierte CHO-Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und mit 15 ml HAM`s F12-Medium mit Zusatz von 10% BS über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und für 24 h in 8 ml serumfreien Medium kultiviert.

2.5 ARBEITEN AUF PROTEINEBENE

2.5.1 PROBENAUFBEREITUNG

Zellaufschluß

Da die verwendeten *E. coli*-Expressionssysteme nur eine intrazelluläre Proteinproduktion ermöglichen, war es nötig, die Bakterien-Zellen aufzuschließen. Dafür wurde die Bakteriensuspension für 20 min bei 1 500 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt im Puffer resuspendiert. Als Puffer wurden die jeweiligen für die nachfolgende Aufreinigung verwendeten Bindungspuffer mit Zusatz von 4 mg/ml Lysozym und 25 mM Magnesiumchlorid verwendet. Das Gemisch wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend mechanisch aufgeschlossen. Alle weiteren Arbeiten fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Mittels Ultra-Turrax T18 basic (IKA) wurde die Suspension 4–5 mal für je 30 s bei 18000 m^{-1} homogenisiert. Alternativ erfolgte der Zellaufschluß sonographisch mit dem Sonopuls (Brandelin) durch 5-6 Zyklen von 10 s Beschallung und 30 s Abkühlphase. Zum Abtrennen von Zelltrümmer erfolgte eine Zentrifugation bei 1 500 x g für 15 min. Der erhaltene Überstand stand für weitere Analysen bzw. für die chromatografische Aufreinigung zur Verfügung.

Konzentrierung zellfeier Kulturüberstände durch Ultrazentrifugation

Die *P. methanolica*-Kulturen wurden bei 2 500 x g zentrifugiert und der zellfreie Kulturüberstand weiter verwendet. Der CHO-Medienüberstände wurde durch Sterilfiltration (0,22 µm) von restlichen Zellen und Zelltrümmern befreit. Die Konzentrierung der Kulturüberstände erfolgte mittels Centricon, Ultrafiltrationseinheiten (Millipore Corporation) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa, durch Zentrifugation bei 2 500 x g und 4°C.

Aktivierung der Pro-Kallikreine durch Thermolysin

Um die Pro-Kallikreine in ihre aktive Form zu überführen, wurde jeweils pro 100 µl Kulturüberstand bzw. pro 10 µg gereinigtem Pro-hK11 1 µg Thermolysin sowie $CaCl_2$ (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 10 mM) wurde die Reaktion gestoppt.

2.5.2 PROTEINAUFREINIGUNG

Im Nachfolgenden werden nur die Chromatographiemethoden beschrieben die letztlich zur Aufreinigung der heterolog überexprimierten Proteine aus *E. coli*-Lysat bzw. aus *P. methanolica*- und CHO-Kulturüberständen verwendet wurden. Optimierungsschritte sowie nicht weiter verfolgte Chromatographiemethoden werden nicht aufgeführt. Als Chromatographiesystem diente die FPLC-Anlage ÄKTAprime plus (GE-Haelthcare).

Die Aufzeichnung und Dokumentation der durchgeführten Versuche erfolgte unter Verwendung der Software PrimeView 5.0 (GE-Haelthcare).

Ni^{2+}-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung der rekombienanten Proteine mit Hexa-Histidin-Fusionsanteil wurde eine 1ml HisTrap FF crude Säule (GE Healthcare) genutzt. Die Säule wurde mit Bindungspuffer (20mM Natriumphosphat-Puffer, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,5) äquilibriert. Nach Applikation von 5 ml Proteinsupension (bei Kulturüberständen 1:2 mit Bindungspuffer gemischt) wurde die Säule mit Bindungspuffer gewaschen. Die Proteine wurden durch Imidazolstufenelution von der Säule gelöst. Der Elutionspuffer (20 mM Natriumphosphat-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7,5) enthielt 0,25 M Imidazol für die LEKTI-Domänen bzw. 0,5M Imidazol für Pro-hK11. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Kationenaustauschchromatographie

Als Säule wurde der starke Kationenaustauscher HiTrap SP XL (GE Healthcare) verwendet. Die Säule wurde mit Natriumphosphat-Bindungspuffer äquilibriert. Danach erfolgte die Applikation der Proteinsuspension und das Waschen der Säule mit Bindungspuffer. Die Proteinelution erfolgte im Gradientenverfahren mit steigender $NaCl_2$-Konzentration. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Bei der Isolierung der LD7/8 aus 5 ml *E. coli*-Lysat wurde als Bindungspuffer 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 5,5 verwendet. Die maximale Salzkonzentration bei der Elution betrug 1 M NaCl. Für die Aufreinigung von Pro-hK11 wurden 25 ml CHO-Kultivierungsüberstand zusammen mit 25 ml Bindungspuffer auf die Säule aufgetragen. Der Bindungspuffer bestand aus 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 5,5. Die maximale Salzkonzentration bei der Elution betrug 0,5 M NaCl.

2.5.3 PROTEINDETEKTION

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte unter Verwendung der Methode nach BRADFORD [1976] mit Hilfe des Bradford-Reagenz Roti-Nanoquant bzw. Roti-Quant universal (Roth) laut den Anweisungen des Herstellers.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE unter Verwendung der Methode nach LAEMMLI [1970] analysiert. Die Auftrennung erfolgte in 14%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen mittels Vertikalelektrophorese in der Aparatur X-Cell *sure* Lock (Invitrogen). Die Proteinproben wurden zu gleichen Teilen mit 2fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 99°C denaturiert, und anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt (Elektrodenpuffer: 25mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Zur Abschätzung des Molekulargewichts diente der Proteinmarker Broad Range P7708S (NEBioLabs).

Zymographie

Bei der Zymographie handelt es sich um eine Spezialform der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen [HEUSSEN und DOWDLE, 1980; KLEINER und STETLER-STEVENSON, 1994]. Im Trenngel war zusätzlich 0,01% Trockenmilch als Enzym-Substrat enthalten. Die Proben wurden vor dem Auftragen zu gleichen Teilen mit Zymographie-Probenpuffer versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele für 1h in Triton X-100haltigem Renaturierungspuffer und anschließend üN bei 37°C in Inkubationspuffer inkubiert. Die Detektion der Aktivität erfolgte durch Coomassie-Färbung.

Protein-Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Für das Anfärben der Proteine wurden die Gele üN in Coomassie Brilliant Blau Färbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend bis zum gewünschten Kontrast mit Entfärbe-Lösung gewaschen.

Protein-Färbung mit Silbernitrat

Die Silberfärbung wurde mit dem Roti-Black N Kit (Roth) nach Herstellerangaben mit dem Protokoll für "freie PAA -Gele" durchgeführt.

Westen-Blot und Immunodetektion

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des XCell II™ Blot Modul (Invitrogen) für 90 min bei 15 Volt auf eine PVDF-Membran (Roth) transferriert. Die Membran wurde auf eine, dem SDS-PAA-Gel angepassten Größe, zugeschnitten, für 30 s in MeOH inkubiert. Alle Bestandteile wurden mit Transferpuffer äquilibriert. Zum Zusammenbau des Blots wurde ein Blotting-Pad (Invitrogen) sowie mind. zwei Lagen Filterpapier (3mm, Whatman) auf die Anode gelegt. Darauf wurden luftblasenfrei die PVDF-Membran, das SDS-PAA-Gel und weitere mind. zwei Lagen Filterpapier und Blotting-Pad als Verbindung zur Kathode geschichtet.
Die geblottete Membran wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen mit 3%iger Magermilchlösung (w/v) in PBS (Gibco Life Technologies) schüttelnd über Nacht inkubiert und anschließend für je 10 min mit PBS und PBS mit 0,05% Tween 20 gewaschen. Danach wurde die Membran mit den in PBS mit 1% (w/v) Magermilchpulver verdünnten Primär-Antikörpern (nach jeweiligen Herstellerangaben) 2 h bis üN inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen IgG mit alkalischer Phosphatase (2mg/ml) (Molecular Probes) schüttelnd in PBS-Puffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver in der Verdünnug 1:500 für 1-2 h. Die Membran wurde danach erneut, einmal mit PBS und einmal mit TBS-Puffer pH 9,0 für

10 min gewaschen. Abschließend wurde die Membran in 10 ml TBS-Puffer pH 9,0, 66µl NBT (50mg/ml) und 33µl BCIP (50mg/ml) inkubiert, bis eine Färbung zu erkennen war. Um die Reaktion zu stoppen wurde für 30 min mit dest. Wasser gespült.

2.6 Enzymkinetische Untersuchungen

2.6.1 Aktivitätsbestimmung der Kallikreine

Die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der heterolog exprimierten Kallikreine erfolgte durch Aktivitätsbestimmungen unter Verwendung der chromogenen Substrate: S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA), S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) und S2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Try-pNA) von Chromogenix. Bei der Hydrolyse der Peptidbindung entsteht p-Nitroanilin, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm spektralphotometrisch detektiert werden kann. Die zeitliche Zunahme der Absorptionsänderung (DA/Dt [min^{-1}]) ist somit ein Maß für die Proteinaseaktivität. Ein Standardmessansatz (100 µl) bestand aus 50 µl Reaktionspuffer, 25 µl Substrat und 25 µl (konzentriertem) Kulturüberstand. Die jeweiligen genauen Bedingungen (Pufferzusammensetzung, Substratkonzentration, Enzymkonzentration) sind den entsprechenden Punkten im Ergebnis Teil zu entnehmen. Wenn nicht anderes erwähnt, fanden alle Messungen im Einstrahlphotometer Cadas 100 (Dr Lange), unter Verwendung einer Mikro-Einmal-Plastikküvetten (Brand) mit einer Schichtdicke von 1 cm bei RT statt. Zum besseren Vergleich wurden die Ergebnisse als Volumenaktivität angegeben und auf die unkonzentrierten Kulturüberstände bezogen. Ein katal (kat) entspricht dabei der Enzymmenge, die unter den verwendeten Parametern benötigt wird, um ein Mol p-Nitroanilin pro Sekunde freizusetzen. Die Berechnung der Volumenaktivität ($u_V$erfolgte nach der Formel:

$$\upsilon_V\ [kat/l] = \frac{u \cdot \Delta A}{w \cdot \Delta t \cdot d \cdot \varepsilon \cdot 60}$$

u = Gesamtvolumen des Messansatzes
w = Ausgangsvolumen der Enzymlösung
d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)
ε = molare Absorptionskoeffizient (9450 l mol-1 cm-1)
A = Absorption

2.6.2 Bestimmung der kinetischen Parameter

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter wurden von jeweils 200 ng aufgereinigtem und aktiviertem hK11 bzw. hK7-Inkubationen (siehe unten) mit verschiedenen Substratkonzentrationen in Mikrotiterplatten bei 37°C im Plattenreader Infinite M 200 (Tecan) oder Synergy 2 (BioTek) die Absorptionänderung bei 405 nm über die Zeit bestimmt. Die Ermittlung der Parameter K_m und V_{max} erfolgte graphisch nach der Methode von Hanes [1932], wobei der

Quotient Substratkonzentration/Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen wurde. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abzissenachse entspricht dem negativen K_m-Wert und der Anstieg der Geraden dem reziproken V_{max}-Wert. Die Reaktionsgeschwindigkeit (v) wurde zuvor nach folgender Formel berechnet.

$$v = \frac{\Delta A}{d \cdot \varepsilon}$$

Mit den ermittelten Parametern wurden dann die katalytische Konstante (Wechselzahl) $K_{cat}=V_{max}/ c_{Enzym}$ und die Spezifitätskonstante K_{cat}/K_m berechnet.

Enzyminkubation	hK11	hK7
Enzymkonzentartion	200 ng	100 ng
Substrat	S2288	S2586
Reaktionspuffer	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,01% Tween 20; pH 7,5	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8

2.6.3 INHIBITIONSUNTERSUCHUNGEN

Hemmung der Trypsinaktivität

Zur Bestimmung der Hemmaktivität wurden 100 ng/ml Trypsin im Reaktionspuffer (Endkonzentration: 80 mM Tris-HCl, 80 mM NaCl, pH 8) mit 2,3 mM S2288 und steigender Inhibitorkonzentration bei 37°C inkubiert und die Absorption jede Minute über einen Zeitraum von 20 min gemessen. Die Messung erfolgte im Plattenreader Infinite M 200 (Tecan) oder in einer temperierbaren Mikro-Quarzküvette im Photometer (Cadas 100). Die Absorptionszunahme je Zeiteinheit (DA/Dt) ohne Zugabe eines Inhibitors stellt die 100%ige Proteinaseaktivität dar. Alle anderen Aktivitäten wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

Hemmung der Kallikreinaktivät

Die Untersuchungen zur Inhibition von hK5- und hK7 in *P. methanolica* Kulturüberständen fanden mit den unter Punkt 2.6.1 beschriebenen Bedingungen statt. Der Kulturüberstand, wurde 1:2 mit Reaktionpuffer (Endkonzentration im Ansatz: hK5: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH8; hK7: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) gemischt, Substrat (hK5 S2288; hK7 S2586) mit einer Endkonzentration von 2,3 mM und Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und wie oben beschrieben gemessen und ausgewertet.

Bestimmung der IC_{50} und K_i-Werte

Für die Aktivitätshemmung von gereinigtem und aktiviertem hK11 aus CHO-Zellen und hK7 aus *E. coli* wurden die kinetischen Parameter IC_{50} und K_i bestimmt. Zur Ermittlung des IC_{50}-Wertes wurden Enzyminkubationen mit konstanter Substratkonzentration (2,3 mM) und steigender Inhibitorkonzentration mit den unter Punkt 2.6.2 angebenenen Bedingungen durchgeführt. Die prozentuale Restaktivität bezogen auf den Ansatz ohne Inhibitor wurde gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und der IC_{50}-Wert durch nicht lineare Regression bestimmt. Aus den K_m-Werten und den IC_{50}-Werten wurde die Dissoziationskonstante (K_i), entsprechend der Gleichung von CHENG und PRUSOFF [1973] berechnet:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)}$$

S=Substratkonzentration

Zusätzlich wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Ansätze bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt und diese reziprok gegen die Inhibitorkonzentration im Dixon-Diagramm aufgetragen [DIXON, 1953]. Der negative K_i-Wert enspricht dem Schnittpunkt der Geraden.

2.7 BERECHNUNGEN

Die Signifikanz wurde unter Verwendung des Student´s-t-Test für unverbundene Stichproben berechnet. Als signifikant verschieden gelten Werte mit $p \leq 0{,}05$.

Berechnungen zu proteinbiochemischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt, erfolgten anhand der Aminosäuresequenz mit dem Programm VectorNTI, Version 10 von Invitrogen.

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollten die in der menschlichen Haut vorkommenden Kallikreine 5, 7, 8, 11 und 14, sowie verschiedene Domänen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI rekombinat produziert werden. Das übergeordnete Ziel war die Durchführung von Hemmversuchen mit LEKTI-Domänen und den verschiedenen Kallikreinen, wodurch weitere Einblicke in die Interaktion dieser beiden, an der Physiologie und Pathophysiologie der Haut essentiell beteiligten Proteine erhalten werden sollten. Besonderes Augenmerk lag dabei auf hK11, welches zwar stark in der Haut exprimiert wird, dessen biologische Bedeutung jedoch noch weitgehen unklar ist.

3.1 HETEROLOGE EXPRESSION VON LEKTI-DOMÄNEN IN *E. COLI*

Um Untersuchungen zur Kallikrein-LEKTI-Interaktion vornehmen zu können, wurden im Verlauf dieser Arbeit eine Vielzahl verschiedener LEKTI-Domänen und Kombinationen von LEKTI-Domänen rekombinant hergestellt. Zugunsten der Übersichtlichkeit werden im Nachfolgenden nur die Ergebnisse der letztlich verwendeten LEKTI-Domänen aufgeführt.

3.1.1 SYNTHESE UND KLONIERUNG DER LEKTI-CDNA

Als Basis für die Amplifikation diente cDNA aus humaner Haut, die von der Firma Invitrogen bezogen wurde. Die relevanten cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe spezifischer Primer (Tabelle 3-1) und *Taq*-Polymerase (2.1.4, Ansatz 1) amplifiziert. Es wurde auch ein cDNA-Fragment erzeugt, das die Konsensussequenz der Domänen 4 bis 12 codiert. Die gereinigten PCR-Produkte der LEKTI-Domänen 6 und 7-8 wurden unter Verwendung der *Nco*I- und *Xba*I-Restriktionsenzyme in den Vektor pBAD/gIIIA kloniert. Dieser von pBR322-Plasmid abgeleitete Vektor ermöglicht durch die GenIII-Signalsequenz, die Sekretion der rekombinanten Proteine in den periplasmatischen Raum [BOEKE *et al.*, 1982]. Der Vektor verfügt über den arabinoseinduzierbaren Promotor araBAD sowie über ein Ampicillinresistenz-Gen. Durch Verwendung eines Antisense-Primers ohne Stop-Sequenz wurden am C-Terminus von LD6 die vektorkodierten Sequenzen für ein myc-Epitop und einen Hexa-Histidin-tag (His6-tag) angefügt. Alle weiteren cDNA-Fragmente der LEKTI-Domänen wurden direkt in den Vektor pBAD/Thio-TOPO ligiert. Die kovalent gebundene Topoisomerase I ermöglicht eine schnelle und einfache Ligation von den mit *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten mit dem Vektor. Weiterhin besitzt der Vektor ebenfalls ein Ampicillinrestistenz-Gen. Die rekombinanten Proteine waren N-terminal mit Thioredoxin und C-terminal mit einem V5-Epitop und einem His6-tag fusioniert.

Thioredoxin bewirkt eine erhöhte Translationseffizienz sowie eine Zunahme der Löslichkeit der rekombinanten Proteine und wirkt damit der Bildung unlöslicher Proteinaggregate (inclusion bodies) entgegen. Die Fusionierung mit dem V5-Epitop und His6-tag ermöglicht eine spätere Reinigung der Expressionsprodukte über Ni^{2+}-Affinitätschromatographie sowie den Nachweis der Proteine, da keine spezifischen Antikörper für die einzelnen Domänen zur Verfügung standen.
Die generierten Expressionsplasmide wurden zur Transformation der *E. coli*-Stämme XL2 blue bzw. Top10 verwendet. Der Nachweis der erfolgreichen Transformation erfolgte durch Selektion auf ampicillinhaltigen Agarplatten und anschließender Kolonie-PCR der erhaltenen Klone. Die als positiv identifizierten Klone wurden im Anschluss sequenziert um Mutationen auszuschließen.

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der klonierten und zur Transformation von *E. coli* eingesetzten cDNAs der LEKTI-Domänen

LEKTI-Domäne(n)	**zur Amplifikation der cDNA verwendete Primerkombination Sense-/Antisense-Primer**	**Expressionsvektor**	**transformierter *E. coli*-Stamm**
4	LD4-1S/LD4-3AS	pBAD/Thio-TOPO	TOP10
6	LD6FM-1S/LD6FM-3AS	pBAD/gIIIA	TOP10
7-8	MALD7-3S/MALD8-7AS	pBAD/gIIIA	TOP10
8	LD8-1S/LD8-3AS	pBAD/Thio-TOPO	XL2 blue
8-9	LD8-1S/LEKTID9-2AS	pBAD/Thio-TOPO	XL2 blue
9	LEKTID9-1S/LEKTID2-2AS	pBAD/Thio-TOPO	XL2 blue
11	LEKTID11-3S/LEKTID11-4AS	pBAD/Thio-TOPO	TOP10
Konsensus	LEKTI6JL-1S/LEKTI6JL-2AS LEKTI6JL-1S/LEKTI6JLMM-7AS LEKTI6JLMT-5S/LEKTI6JL-2AS LEKTI6JL-1S/LEKTI6JL-2AS	pBAD/Thio-TOPO	TOP10

3.1.2 Heterologe Expression diverser LEKTI-Domänen in *E. coli*

Die heterologe Expression der LEKTI-Domänen erfolgte durch *E. coli* in ampicillinhaltigem LB-Medium nach Induktion durch Arabinose. In ergänzenden Versuchen wurde als optimale Arabinosekonzentration für die Induktion 0,02% (w/v) ermittelt. Zusätzlich wurde abweichend von der Herstellerangabe die Syntheserate durch Reduktion der Kultivierungstemperatur nach der Induktion auf 25°C herabgesetzt, was der Proteinfehlfaltung und Bildung von inclusion bodies entgegenwirken sollte. Die Ausbeute an rekombinantem Protein betrug

maximal 50 mg/l Kultur. Die Reinigung, der mit His6-tag fusionierten LEKTI-Domänen, erfolgte durch Ni^{2+}-Affinitätschromatographie mit einem Imidazol-Stufengradienten. Die gereinigten Proteine wurden anschließend durch Ultrazentrifugation entsalzt und konzentriert. Eine Ausnahme bildeten die zusammenhängenden Domänen 7-8, welche ohne His6-tag vorlagen und daher über Kationenaustauschchromatographie aus dem Zelllysat isoliert wurden. Die Optimierung der chromatographischen Reinigung ist in der Bachelorarbeit von HÄNEL [2009] ausführlich beschrieben.
Die Detektion der LEKTI-Domänen erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot Analysen (Abb.: 3-1).

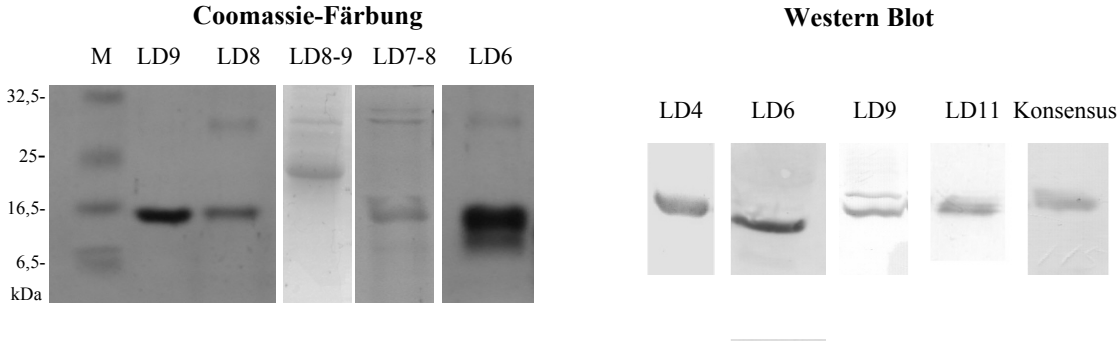


Abbildung 3-1. Expression der LEKTI-Domänen in *E. coli*. Die Proteine wurden nach der chromatographischen Reinigung in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt oder durch Western Blot und Immunodetektion mit dem Sekundärantikörper Anti-Histidin-IgG detektiert.

Für LD6 wird eine temporäre inhibitorische Wirkung gegenüber Trypsin beschrieben [MÄGERT *et al.*, 2002]. Um die Funktionalität der in *E. coli* exprimierten rekombinanten LEKTI-Domänen zu überprüfen, wurden in Anlehung an die von EGELRUD und Mitarbeitern [2005] beschrieben Testbedingungen Trypsininhibitionsuntersuchungen mit LD6 durchgeführt. Zur Bestimmung der Trypsinaktivität wurde das synthetische Peptidsubstrat S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) verwendet. Durch Hydrolyse der Peptidbindung entsteht p-Nitroanilin, das bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann. Die zeitliche Zunahme der Absorption korreliert dabei mit der Enzymaktivität. Trypsin mit einer Konzentration von 100 ng/ml wurde in Reaktionspuffer (Endkonzentration: 80 mM Tris-HCl, 80 mM NaCl) mit 2,3 mM Substrat und steigender Inhibitorkonzentration bei 37°C inkubiert und die Absorption jede Minute über einen Zeitraum von 20 min gemessen. Zur graphischen Darstellung wurde ΔA/min als prozentuale Enzymaktivität angegeben, wobei der Quotient der Messungen ohne Inhibitor 100% entspricht. Aus den erhaltenen Messpunkten konnte durch nichtlineare Regression die zu 50% inhibitorisch wirkende Konzentration (IC_{50}-Wert) von 1,2 µM ermittelt werden.

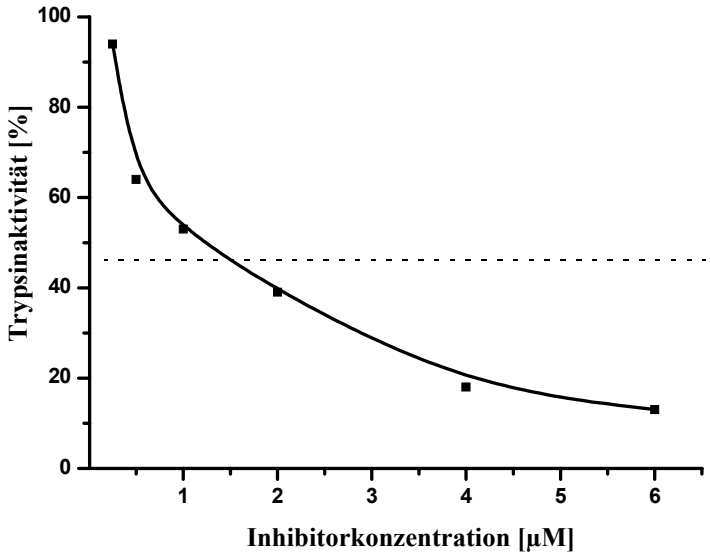


Abbildung 3-2. Hemmung der Trypsinaktivität durch LD6. Für die Messung wurden 100 ng/ml Trypsin und 2,3 mM Substrat S2288 im Reaktionspuffer (80 mM Tris-HCl, 80 mM NaCl) bei 37°C inkubiert mit steigenden Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration spektralphotometrisch bei 405 nm bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor wurde als 100% definiert. Der IC_{50}-Wert beträgt 1,2 µM.

Um einen negativen Einfluss des Fusionsanteils auf die Hemmeigenschaften auszuschließen, wurden korrespondierende Trypsininhibitionsversuche mit der nativen LD6-Domäne durchgeführt. Die cDNA wurde unter den leichen Bedingungen wie die cDNA von LD6 mit His6-tag amplifiziert, wobei der zur Amplifikation verwendete Antisense-Primer (LD6FM-4AS) eine Stopcodon-Sequenz enthielt. Sowohl die native wie auch die Domäne mit Fusionsanteil wurden für die Inhibitionversuche als vorgereinigtes Rohextrakt nach der Bakterienlyse verwendet. Für beide Varianten konnte eine annähert gleiche inhibitorische Wirkung gegenüber Trypsin festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt), weshalb aufgrund der einfacheren und schnelleren Reinigungsmöglichkeit die Variante mit His6-tag vorgezogen wurde.

3.2 Heterologe Expression von rekombinaten humanem Kallikrein 11 und Überprüfung der proteolytischen Aktivität

3.2.1 mature hK11-Varianten

In den folgenden Kapiteln werden die hier dargestellten Abkürzungen für die maturen hK11-Varianten verwendet (Tabelle 3-2). Ebenfalls sind die zur Amplifikation der cDNA verwendeten Primerkombinationen, sowie die dadurch bedingten Restriktionsenzyme angegeben. In Abbildung 3-3 ist die Aminosäuresequenz von hK11 (Isoform 1) gezeigt, die unterschiedlichen Varianten des Proteins sind durch ihre Anfangsbereiche farbig gekennzeichnet.

Tabelle 3-2: Zusammenstellung der hK11 Varianten

Abkürzung	entsprechende AS-Sequenz	Primer zur Amplifikation der jeweiligen cDNA Sense-/Antisense-Primer	verwendete Restriktionsen-donukleasen
hK11 4S/1AS	L^{22} - N^{250} ohne His6-tag	KLK11JD-4S/KLK11JD-1AS	*Xho*I; *Eco*RI
hK11 4S/2AS	L^{22} - N^{250} mit His6-tag	KLK11JD-4S/KLK11JD-2AS	*Xho*I, *Spe*I
hK11 5S/1AS	L^{45} - N^{250} ohne His6-tag	KLK11JD-5S/KLK11JD-1AS	*Xho*I; *Eco*RI
hK11 5S/2AS	L^{45} - N^{250} mit His6-tag	KLK11JD-5S/KLK11JD-2AS	*Xho*I, *Spe*I
hK11 6S/1AS	W^{56} - N^{250} ohne His6-tag	KLK11JD-6S/KLK11JD-1AS	*Xho*I; *Eco*RI
hK11 6S/2AS	W^{56} - N^{250} mit His6-tag	KLK11JD-6S/KLK11JD-2AS	*Xho*I, *Spe*I

```
  1 MRILQLILLALATGLVGGETRIIKGFECKPHSQPWQAALFEKTRLLCGATLIAPRWLLTA
 61 AHCLKPRYIVHLGQHNLQKEEGCEQTRTATESFPHPGFNNSLPNKDHRNDIMLVKMASPV
121 SITWAVRPLTLSSRCVTAGTSCLISGWGSTSSPQLRLPHTLRCANITIIEHQKCENAYPG
181 NITDTMVCASVQEGGKDSCQGDSGGPLVCNQSLQGIISWGQDPCAITRKPGVYTKVCKYV
241 DWIQETMKNN
```

Abbildung 3-3. Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) von humanem Kallikrein 11 (Isoform 1): Dargestellt ist das Prä-Proenzym, wobei das Präpeptid einfach- und das Propeptid doppelt unterstrichen ist. Die Anfangssequenzen der hK11 Varianten durch Verwendung unterschiedlichen Sense-Primer sind farbig geschrieben: Grün: hK11 4S/; Blau: hK11 5S/; Pink: hK11 6S/

Synthese und Klonierung der maturen hK11-Varianten

Für die Amplifikation des Kallikreins wurde als Ausgangsmaterial cDNA verwendet, die aus der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT gewonnen wurde. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und zur reversen Transkription eingesetzt. Ob die dabei generierte cDNA das gewünschte Kallikrein kodiert, wurde mittels PCR überprüft, wobei nur ein Abschnitt der hK11-cDNA amplifiziert wurde (Abb.: 3-4). Die aus HaCaT-Zellen generierte cDNA wurde mit Hilfe verschiedener hK11-spezifischer Primer amplifiziert (2.1.4, Ansatz 2) und durch diese auch mit den zum Expressionsvektor pMETαA kompatiblen Restriktionsschnittstellen versehen. Durch die Auswahl der Sense-Primer wurden unterschiedliche Amplifikate erzeugt, die für sich hinsichtlich ihrer N-terminalen Anfangsbereiche unterscheidende Varianten des Kallikreins kodieren. Da der Vektor die DNA-Sequenz für einen C-terminalen His6-tag trägt, wurden durch Verwendung von Antisense-Primern ohne Stop-Codon-Sequenz zusätzlich hK11-Amplifikate erzeugt, die Varianten des Proteins mit V5-Epitop und His6-tag am carboxyl-Terminus ermöglichen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 3-5).

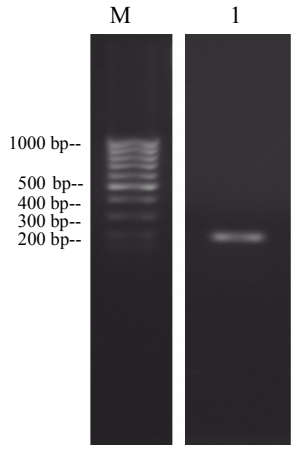


Abbildung 3-4. Kontrolle der generierten cDNA nach PCR mit der Primerkombination KLK11-RT15S/KLK11-RT16AS. Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2%igem Agarosegel. [M] Molekulargewichtsstandard 100 bp [**1**] Das hK11 Amplifikat [1] besitzt eine Größe von ca. 200 bp.

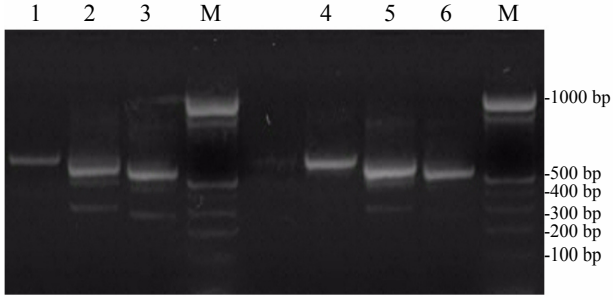


Abbildung 3-5. Darstellung der maturen-hK11 PCR-Produkte amplifiziert mit *Pfu*-Polymerase u. den Primerkombinationen [1]KLK11JD-4S/KLK11JD-1AS, (692bp) [2]KLK11JD-5S/KLK11JD-1AS, (620bp) [3]KLK11JD-6S/KLK11JD-1AS, (590bp) [4]KLK11JD-4S/KLK11JD-2AS, (689bp) [5]KLK11JD-5S/KLK11JD-2AS, (617bp) [6]KLK11JD-6S/KLK11JD-2AS, (587bp) [M]Molekulargewichtsstandard 100 bp nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,2%igem Agarosegel.

Nach der Aufreinigung der cDNA-Amplifikate wurden diese zusammen mit dem Expressionsvektor durch entsprechende Restriktionsendonukleasen (Tabelle 3-2) hydrolysiert und anschließend ligiert. Da es sich bei dem Vektor pMETαA um einen shuttle-Vektor handelt, der über eine Replifikationsfähigkeit in *E. coli* sowie in *P. methanolica* verfügt, wurden zur Vermehrung der generierten Plasmide zunächst *E. coli* XL2 blue-Zellen mit diesen transformiert und auf Selektivagarplatten kultiviert. Mehrere positive Transformanden wurden per Kolonie-PCR auf erfolgreiche Insertion der hK11-cDNA-Amplifikate überprüft. Von Klonen mit gewünschter Amplifikationslänge wurde die jeweilige Plasmid-DNA isoliert. Die auf diese Weise in ausreichender Menge erhaltenden Konstrukte wurden durch Restriktion mit dem Enzym *Asc*I liniarisiert und von bakterieller DNA abgeleiteten Sequenzen befreit. Dadurch steigt die Insertionsrate bei der anschließenden Transformation des Hefeexpressionsstammes pMAD11. Die Selektion der transformierten Hefezellen erfolgte durch rot-weiß-Screening auf MD-Agarplatten (Adenin-Mangel-Platten), was durch die im Vektor enthaltende ADE2-Gensequenz ermöglicht wird. Die verwendeten Hefestämme besitzen das ade2-11 Allel und sind phänotypisch ADE^-. Durch erfolgreiche Transformation wird dieses Allel komplettiert, das Genprodukt 5-Aminoimidazol Ribonucleotid-Carboxylase wird gebildet und die ADE^+-Klone erscheinen auf

Adenin-Mangel-Platten weiß. ADE$^-$-Klone erscheinen rot und wurden für die weiteren Analysen ausgeschlossen.
Auf diese Weise konnten von den Varianten hK11 4S/2AS, hK11 5S/1AS, hK11 5S/2AS und hK11 6S/1AS Klone erhalten werden, die zur Expression der entsprechenden rekombinaten Proteine verwendet wurden.

Vorauswahl geeigneter Expressionsklone

Die rekombinaten Varianten des hK11 wurden von der fakultativ methylotrophen *Hefe Pichia methanolica* unter Verwendung des Vektors pMETαA exprimiert und sekretiert. Der verwendete Vektor zeichnet sich durch den starken *Pichia methanolica*-alcohol(oxidase)-utalization-gene Promotor (AUG1) aus, der eine kontrollierbare Genexpression ermöglicht. Durch Glucose im Medium wird der Promotor reprimiert. Der Wechsel zu Methanol als Kohlenstoffquelle induziert die Expression des gewünschten Proteins. Die α-Faktor-Signalsequenz (α-mating factor aus *Saccaromyces cerevisiae*) ermöglicht die Sekretion des Zielproteins ins Kulturmedium. Die Integration erfolgt zu über 90% durch nicht-homologe Rekombination an verschiedenen Stellen des *P. methanolica* Genoms. Die Hefe ist in der Lage, mehrer Kopien der transformierenden DNA zu integrieren, wodurch sich die Expressionsrate erhöht. *P. methanolica* wurde als eukaryontischer Wirtsorganismus gewählt, da dieser in der Lage ist, die Expressionsprodukte im nativen Zustand, d.h. mit korrekter Konformation und Disulfidverbrückung, zu exprimieren.
In wieweit die erhaltenen Klone die rekombinaten Proteine bildeten, wurde mit einem Overlay-Assay überprüft (Tabelle 3-3). Die Detektion der Proteine erfolgte colorimetrisch, mit Hilfe eines spezifischen gegen hK11 gerichteten Primärantikörpers und einem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Sekundärantikörper.
Bei allen Klonen konnte die Expression von hK11 nachgewiesen werden, wobei jedoch deutliche Unterschiede, auch zwischen den Doppelbestimmungen, in der Intensität der Farbreaktion zu erkennen waren. Eindeutige Aussage über die Stärke der rekombinanten Expression sind durch diesen Assay nicht möglich
Die erzeugten Klone sollten hK11 in aktiver Form exprimieren, wodurch ein nachträglicher Aktivierungsschritt umgangen werden kann. Zum Nachweis der proteolytischen Aktivität wurde eine *In situ*-Zymographie mit Proteinase-Indikator-Platten (Tabelle 3-3) durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Klone auf MM-Platten mit Magermilchpulver als Proteinasesubstrat kultiviert. Wird das im Magermilchpulver enthaltene Casein hydrolysiert, bilden sich auf der undurchsichtigen Agarplatte transparente Lysehöfe um die Hefekolonien. Zur besseren Visualisierung wurden die Platten nach der Inkubation kurz mit Coomassie-Brillant Blue gefärbt. Als Negativkontrolle wurden zum Expressionskit zugehörige transformierte *P.methanolica*-Zellen, die humanes Serumalbumin (HSA) exprimieren, mit einbezogen. Dadurch sollte eine Degradation des Caseins durch konstitutiv exprimierte Hefeproteinasen ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Overlay-Assays und der *In situ*-Zymographie sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse von Overlay-Assay und *In situ*-Zymographie. Overlay-Assay und *in situ*-Zymographie wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Doppelbestimmung (Ausnahme hK11 5S/1AS 3; hK11 5S/2AS 7; hK11 6S/1AS 3) dargestellt. n.d.= nicht durchgeführt; N.K. = Negativ Kontrolle HSA exprimierende Hefezellen (Invitrogen). Zur besseren Darstellung wurden die Abbildungen der *in situ* Zymographie farblich invertiert.

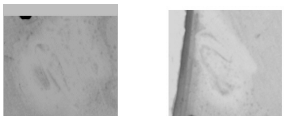
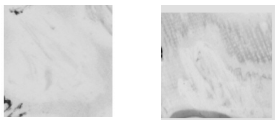
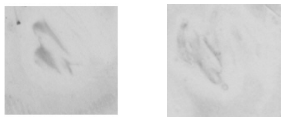
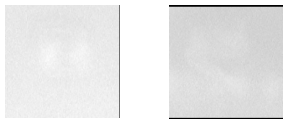
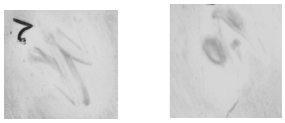
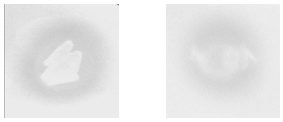
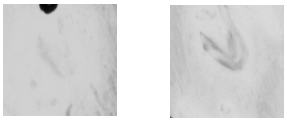
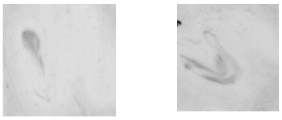
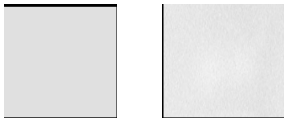
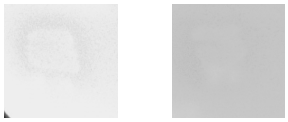
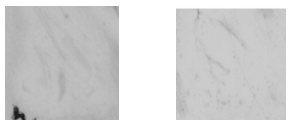
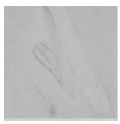
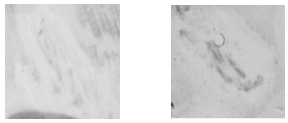
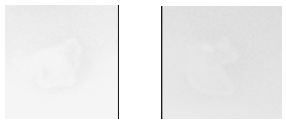
hK11 Variante	Klon	Overlay-Assay	*in situ* Zymographie
hK11 4S/2AS	1		
hK11 4S/2AS	2		n.d.
hK11 5S/1AS	1		
hK11 5S/1AS	3		
hK11 5S/1AS	10		
hK11 5S/2AS	2		
hK11 5S/2AS	4		
hK11 5S/2AS	7		

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse von Overlay-Assay und *In situ*-Zymographie. Overlay-Assay und *in situ*-Zymographie wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Doppelbestimmung (Ausnahme hK11 5S/1AS 3; hK11 5S/2AS 7; hK11 6S/1AS 3) dargestellt. n.d.= nicht durchgeführt; N.K. = Negativ Kontrolle HSA exprimierende Hefezellen (Invitrogen). Zur besseren Darstellung wurden die Abbildungen der *in situ* Zymographie farblich invertiert.

hK11 Variante	Klon	Overlay-Assay	*in situ* Zymographie
hK11 6S/1AS	1		
hK11 6S/1AS	3		n.d.
hK11 6S/1AS	5		
N.K.		n.d.	

Alle hK11 Varianten zeigten bei der *in situ*-Zymographie proteolytische Aktivität. Sowohl die verkürzten hK11 5S/ und hK11 6S/ wie auch die Varianten mit C-terminalen His6-tag sind in der Lage Casein zu degradieren. Unter den verschiedenen Klonen der einzelnen hK11 Varianten ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede.

Die stärkste proteolytische Aktivität sowie die intensivste Farbreaktion im Overlay-Assay zeigte der Klon 10 der Variante hK11 5S/1AS. Auch hK11 6S/1AS Klon 1 zeigte eine starke proteolytische Aktivität gegenüber Casein. Bei beiden Klonen handelt es sich um Varianten, die um die jeweils ersten 23 bzw. 33 AS verkürzt sind. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass diese N-terminalen Aminosäuren nicht essentiell an der Substratumsetzung beteiligt sind. Auch bei zwei Klonen die mit einem His6-tag fusioniert waren, hK11 4S/2AS 1 und hK11 5S/2AS 7, konnte in der *In situ*-Zymographie enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Bei den Klonen hK11 5S/1AS 1 und hK11 5S/2AS 4 wurde keine Degradation des Casein festgestellt. Im Overlay-Assay war bei beiden Klonen eine deutliche Farbreaktion sichtbar. Es ist davon auszugeben, dass zwar hK11 gebildet wird, dieses jedoch nicht enzymatisch aktiv ist. Eine Sequenzierung sollte Aufschluss darüber geben, ob die korrekte DNA-Sequenz in das Hefe-Genom integriert wurde. Dabei ergab sich, dass bei hK11 5S/1AS 1 eine Insertion von vier zusätzlichen Nucleotiden erfolgt war, was zur Verschiebung des Leserasters und dadurch zur Bildung eines fehlerhaften Proteins führt. Bei hK11 5S/2AS

zeigte die DNA-Sequenzierung, dass an verschiedenen Stellen Punktmutationen vorhanden waren, die auf Proteinebene zum Aminosäure-Austausch (139 Ala zu Val; 142 Ser zu Arg; 227 Thr zu Tyr) führen.
Für die weiteren Versuche wurde für jede hK11 Variante der Klon mit der größten proteolytischen Aktivität verwendet: hK11 4S/2AS 1; hK11 5S/1AS 10; hK11 6S/1AS 1

3.2.2 Heterologe Expression maturer hK11 Varianten in der Hefe *Pichia methanolica*

Die erfolgreich transfizierten und hinsichtlich der Expression von aktiven Kallikreinen positiv getesteten Hefezellen wurden zunächst für eine rasche Zellvermehrung in dem glucosehaltigen Anzuchtmedium BMDY kultiviert. Nach Verbrauch der Glucose wurde durch Methanolzugabe die Expression induziert. Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte über einen Zeitraum von drei Tage unter Schütteln (220 rpm) bei 30°C, wobei täglich 0,1 Volumen 5%igem Methanols zugegeben wurde (Endkonzentration 0,5% (v/v)). Die im Expressionsvektor codierte Sekretionssignalsequenz (α-Faktor), ermöglicht dass die rekombinanten Proteine in das endoplasmatische Retikulum exportiert wird, weiter im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert und unter Abspaltung des α-Faktors schließlich in das Kulturmedium sekretiert wird. Das Kulturmedium wurde sterilfiltiert und durch Ultrazentrifugation konzentriert (2.5.1). Der Nachweis der hK11-Expression erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot Analysen (Abb. 3-6).

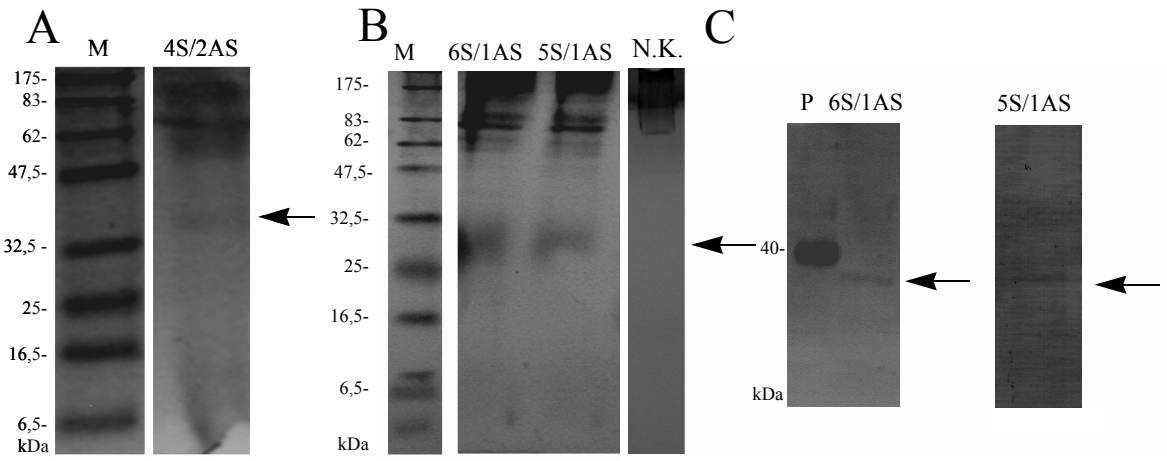


Abbildung 3-6. Nachweis der hK11 Expression durch *P. methanolica*. Aufgetragen wurden die konzentrierten Kulturüberstände 72 h nach der Induktion **(A)** 10fach konzentrierter Kulturüberstand von hK11 4S/2AS in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. **(B)** 5fach konzentrierter Kulturüberstand von hK11 6S/1AS und hK11 5S/1AS in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung **(C)** 5fach konzentrierter Kulturüberstand von hK11 6S/1AS und 5S/1AS in einem Western Blot und Immunodetektion mit einem gegen hK11 gerichteten Primärantikörper und einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper. [M] Proteinmarker P7708S; [N.K.] Negativ Kontrolle (5fach konzentrierter Kulturüberstand von hK11 5S/1AS vor der Induktion); [P] Positivkontrolle (hK11 R&D Systems ca. 40 kDa, 2,5 µg); Die relevanten Banden sind durch Pfeile markiert.

Sowohl in den SDS-PAGE wie auch bei den Western-Blots waren schwache spezifische hK11 Banden zu erkennen. Als Negativkontrolle fungierte bei allen Analysen der Kulturüberstand eines HSA exprimierenden *P. methanolica* Klons (Invitrogen). Anhand der Proteinkonzentration des Standardmarkers von 0,5 - 1 µg pro Bande und der zur Gelelektrophorese eingesetzten Probenmenge wurde eine durchschnittliche Rohausbeute von 1 bis 5 mg rekombinanten Protein pro Liter Kulturüberstand ermittelt.
Für hK11 5S/1AS und 6S/1AS wurden Banden bei ca. 30 kDa detektiert. Das aus der Primärstruktur ermittelte Molekulargewicht beträgt ca. 22 kDa. Im Fall von hK11 4S/2AS (theoretisches Molekulargewicht 25 kDa) ist das Fusionsprotein aufgrund des C-terminalem V5-Epitop und His6-tag zusätzlich um ca. 3 kDa vergrößert. Berücksichtigt man weiterhin, dass hK11 vier potentielle N-Glykosylierungssequenzen besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten Proteinen um glykosylierte Formen handelt. Der Glykosylierungsmechanismus von *P. methanolica* ist bisher nicht ausreichend charakterisiert. Von der ebenfalls methylotropen Hefe *Pichia pastoris* ist bekannt, dass diese überwiegend N-Glykosylierungen vom mannosereichen Typ mit durchschnittlich 8-10 Zuckerresten vornimmt [GRINNA und TSCHOPP, 1989]. Im Gegensatz zu anderen Hefen, wie *Saccaromyces cerevisiae,* findet jedoch keine Hyperglykosylierung statt. Zum Nachweis der Glykosylierung wurden die Proben mit der Deglykosylase Endopeptidase H behandelt und anschließend erneut im Western Blot analysiert. Wahrscheinlich aufgrund der sehr geringen Mengen an hK11 waren keine Banden detektierbar (Ergebnisse nicht gezeigt). In den SDS-PAA-Gelen waren zudem im höhermolekularen Bereich von 65-150 kDa hefespezifische Proteine zu erkennen, die schon vor der Induktion mit Methanol exprimiert wurden (Abb. 3-6 A).

Zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität wurden Untersuchungen mit chromogenem Substrat durchgeführt. Davon ausgehend, dass es sich bei hK11 um ein Trypsin-ähnliches Enzym handelt, welches synthetische Peptide nach Arginin, nicht aber nach Lysin spaltet [MITSUI *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2006a] wurde das Substrat S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) gewählt. Dieses Substrat wurde von der Arbeitsgruppe um EGELRUD [2005] ebenfalls zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von hK5 genutzt. Gleiche Volumina der hK11 Kulturüberstände wurden verdünnt im Reaktionspuffer (Endkonzentration: 80 mM Tris-HCl, 80 mM NaCl, pH 8) mit 1,2 mM Substrat versetzt. Die enzymatische Umsetzung, bei der p-Nitroanilin frei wird, wurde durch die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 405$ nm spektralphotometrisch bei Raumtemperatur gemessen. Als Negativkontrolle diente wieder der HSA exprimierende Kontrollklon des Expressionskits. Im Diagramm (Abb. 3-7) wurde die Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Sie Steigung $\Delta A/\Delta t$ der resultierenden Geraden beschreibt die Substratumsetzung pro Minute und diente zur Berechnung der Volumenaktivität pro ml Kulturüberstand (2.6.1).

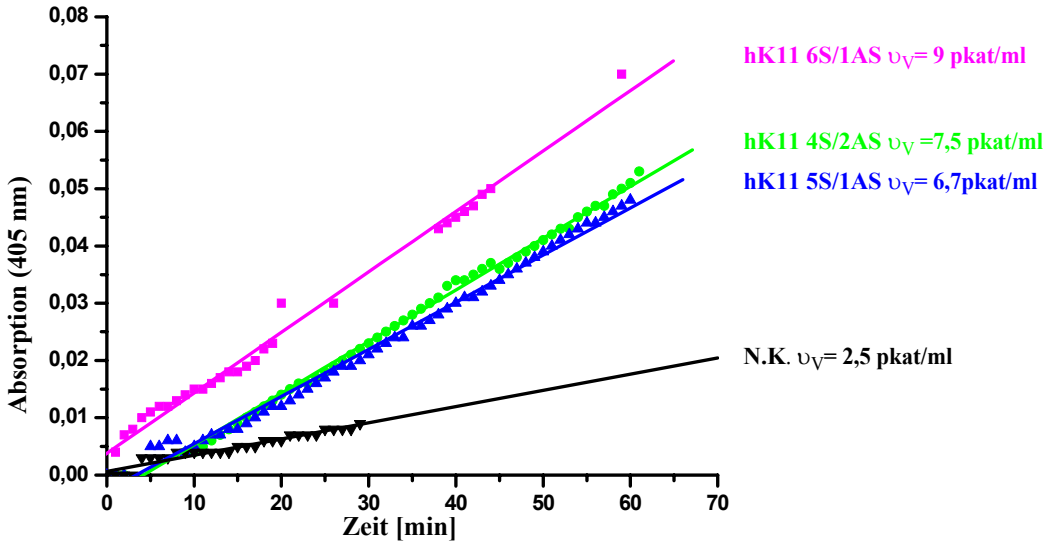


Abbildung 3-7. Vergleich der Enzymaktivität von hK11 Varianten in 5fach konzentrierten *P. methanolica* Kulturüberständen durch proteolytische Spaltung des chromogenen Substrates S2288 (1,2 mM) bei RT. Der Anstieg der Absorption bei λ = 405 nm gegen die Zeit (ΔA/t ermittelt durch lineare Regression) diente zur Berechnung der Volumenaktivität [υ_V]. Als Negativkontrolle [NK] diente der Kulturüberstand von HSA exprimierenden *P. methanolica* Zellen. Die Kurven der hK11 Varianten zeigen eine signifikante höhere Steigung als die der Negativkontrolle ($p< 0,05$).

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass die kürzeste Variante hK11 6S/1AS die stärkste Enzymaktivität zeigt. Bei hK11 4S/2AS und hK11 5S/1AS ist ebenfalls eine Zunahme der Absorption mit annähernd gleichem Anstieg erkennbar. Die proteolytische Aktivität der Negativkontrolle ist dagegen vernachlässigbar gering. Die Versuche wurden mit Kulturüberständen verschiedener Expressionen sowie in unterschiedlicher Konzentrierung durchgeführt. In nahezu allen Fällen zeigte sich eine Enzymaktivität, die signifikant verschieden ($p<0,05$) zur Negativkontrolle war. Zwischen den einzelnen hK11 Varianten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Chromatographische Reinigung der rekombinanten hK11-Varianten

Es wurde versucht, die in *Pichia methanolica* rekombinant hergestellten hK11 Varianten durch unterschiedliche chromatographische Verfahren anzureichern und zu reinigen. Hierbei zeigte sich, dass keine der angewendeten Methoden, Kationenaustausch-, Umkehrphasen- oder Affinitätschromatographie mit Benzamidin zu befriedigenden Resultaten führte, danach der Reinigung keine oder nur noch sehr geringe Proteinaseaktivität detektiert werden konnte. Versuche, die mit einem C-terminalen Hexa-Histidin-tag fusionierte Variante hK11 4S/2AS über Ni^{2+}-Affinitätschromatographie zu isolieren, scheiterten ebenfalls. Ein generelles Problem bei der chromatographischen Reinigung stellte die geringe Menge des

zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials, sowie das ungünstige Mengenverhältnis zwischen gewünschten Expressionsprodukten und unerwünschten Hefeproteinen und Nährmedienbestandteilen dar. Zudem ist davon auszugehen, dass die während der Reinigung herrschenden Bedingungen wie organisches Lösungsmittel, hohe Ionenstärke oder starke pH-Wert Änderung, einen Verlust der Proteinaseaktivität bedingen.

3.2.3 PRO-HK11 VARIANTEN

Kallikrein 11 wird natürlicherweise als enzymatisch inaktives Zymogen sezerniert. Da für die Durchführung von Hemmversuchen die Produktion einer möglichst authentischen Proteinstruktur gewährleistet sein sollte, wurden DNA-Konstrukte erzeugt, welche für die hK11 Proform codierten. Für diese Form wurden zwei verschiedene Expressionsstrategien gewählt. Pro-hK11 sollte sowohl in der Hefe *P. methanolica* wie auch in der Säugerzelllinie CHO sekretorisch exprimiert werden.

Für die heterologe Expression in *P. methanolica* wurde die für die Pro-und Serinproteinase-Domäne kodierende cDNA amplifiziert (Abb. 3-8 A) und, analog zu den maturen Varianten (3.2.1), in den Hefevektor pMETαA kloniert (Tabelle 3-4). Als Sekretionssignal diente der im Vektor enthaltene α-Faktor. Durch die Wahl des Antisense-Primers waren die resultierenden rekombinanten Proteine mit einem C-terminalen V5-Epitop und His6-tag fusioniert, was eine spätere Reinigung der Expressionsprodukte aus dem Hefekulturmedium erleichtern sollte.
Zusätzlich dazu wurde für die Expression in CHO-Zellen die komplette hK11 cDNA amplifiziert, die für die Prä-, Pro- sowie die Serinproteinase-Domäne kodiert (Abb. 3-8 B). Über die Restriktionsstellen KpnI und SpeI wurde das PCR-Produkt in den Expressionsvektor pZeoSV2 ligiert. Der verwendete Vektor ermöglicht eine konstitutive Expression in Säugerzellen unter Kontrolle des Simian Virus 40 (SV40) Promoter. Zur Selektion verfügt er über ein Sh-ble-Gen (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin gene*) gegen des Bleo-/Pheomycin-Antibiotikum Zeocin aus *Streptomyces*, das stark toxisch auf Prokaryonten und Eukaryonten wirkt. Dem zu exprimierenden Pro-hK11 geht eine Signalsequenz (Prä-Peptid) voran, welche die rekombinanten Proteine in den sekretorischen Pfad durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat dirigiert. Es wird kurz vor der Sekretion ins Medium entfernt.
Abgeleitet von der Bezeichnung der aktiven hK11-Varianten wurden die Pro-hK11 Varianten mit hK11 2S/1AS und hK11 3S/2AS abgekürzt. Tabelle 3-4 gibt einen Überblick über die wesentlichen Charakteristika dieser Konstrukte.

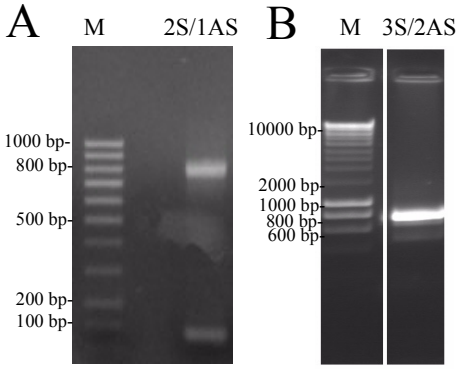


Abbildung 3-8. Nachweis der Pro-hK11 PCR-Produkte. (A) Elektrophoretische Auftrennung der hK11 2S/1AS PCR-Produkte (762 bp) amplifiziert mit *Taq* -Polymerase (2.1.4, Ansatz 1) in einem 1,7%igem Agarosegel. [M] Molekulargewichtsstandard 100 bp **(B)** Elektrophoretische Auftrennung der hK11 3S/2AS PCR-Produkte (697bp) amplifiziert mit *KOD* Hot Start-Polymerase (2.1.4, Ansatz 3) in einem 1,7%igen Agarosegel. [M] Quantitas DNA Leiter

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der wesentlichen Charakteristika der Pro-hK11-Varianten.

	hK11 2S/1AS	**hK11 3S/2AS**
entsprechende AS-Sequenz	M^{1}- N^{250} ohne His6-tag	E^{19}- N^{250} mit His6-tag
Primer zur Amplifikation der jeweiligen cDNA Sense-/Antisense-Primer	Zosch1S/Zosch2AS	KLK11JD-3S/KLK11JD-2AS
verwendete Restriktionsendo-nukleasen	*Kpn*I, *Spe*I	*Spe*I, *Xho*I
verwendeter Vektor	pZeoSV2	pMETαA
Expressionsorganismus	CHO-Zellen	*Pichia methanolica*

Mit beiden erzeugten Plasmide wurden *E. coli* TOP10 bzw. XL2 blue-Zellen transformiert. Nach der Selektion positiver Klone wurde die Plasmide isoliert und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt. Dabei wurde bei dem Plasmid für hK11 2S/1AS eine Punktmutation festgestellt, die im Protein zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Alanin an Position 132 führt. Um diese zu beseitigen wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt, die durch Verwendung von spezifischen Oligonukleotidprimern (SShK11C2S/SShK11C1AS) eine gezielte Basen-substitution ermöglicht. Nach erneuter Klonierung und *E. coli*-Transformation konnte durch DNA-Sequenzierung die korrekte hK11 Basensequenz des Plasmides bestätigt werden.

3.2.4 Heterologe Expression von Pro-hK11 in *P. methanolica*

Durch Elektroporation von *P. methanolica*-Zellen des Stammes PMAD11 wurden aus zwei linearisierten Plasmiden, bei denen durch Sequenzierung die korrekte Insertion der Pro-hK11 cDNA nachgewiesen wurde, jeweils vier Hefeklone erhalten. Aus diesen acht Hefeklonen wiederum zeigte eine Probeexpressionen im Selektivmedium bei zweien die stabile Integration ins Hefegenom. Für die heterologe Expression wurde der Klon mit der höheren proteolytischen Aktivität weiterverwendet.

Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte bei 30°C und 220 rpm auf glukosehaltigem Medium (BMDY). Nach dem Verbrauch der Glukose wurde durch Zugabe von 0,5% (v/v) Methanol die Expression induziert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde jeweils nach Verbrauch 0,5% (v/v) Methanol zugegeben. Zur Kontrolle der Expression wurden täglich Proben entnommen, durch Ultrazentrifugation konzentriert und anschließend in einem SDS-PAA-Gel untersucht (Abb.: 3-9 A).

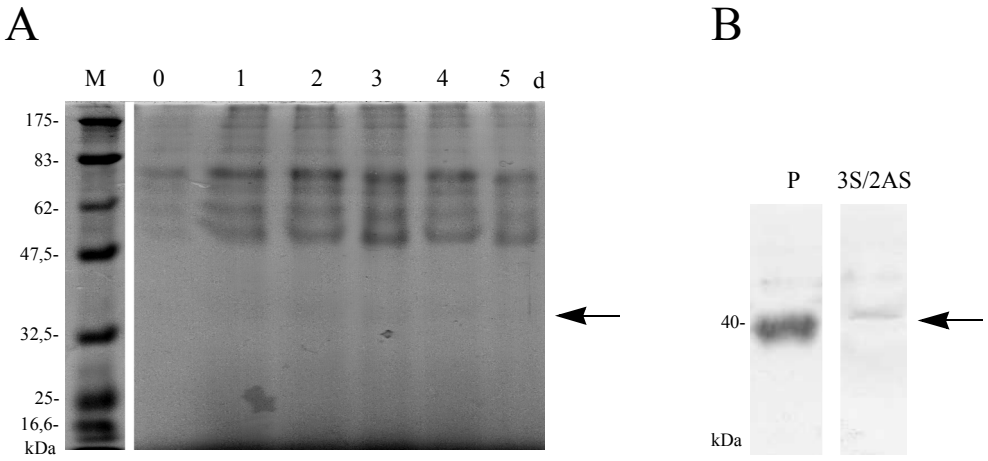


Abbildung 3-9. Nachweis der Pro-hK11 Expression durch *P. methanolica*. (A) 5fach konzentrierte Kulturüberstande von hK11 3S/2AS jeweils 0 bis 5 Tage nach der Induktion durch MeOH in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. [M] Proteinmarker P7708S **(B)** Western Blot mit anschließender Immunodetektion mit einem gegen hK11 gerichteten Primärantikörper und einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper des 2fach konzentrierter Eluent nach affinitätschromatographischer Abtrennung von hK11 3S/2AS. [P] Positivkontrolle (Pro-hK11 R&D Systems, ca. 40 kDa); Die relevanten Banden sind durch Pfeile markiert.

Im Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel konnten für hK11 3S/2AS nur sehr schwache Banden detektiert werden. Vom ersten bis dritten Tag nach der Induktion ließen sich sehr schwache distinkte Proteinbanden bei etwa 40 kDa erkennen. Ab dem vierten Tag nach der Induktion waren in dieser Größe keine Banden mehr sichtbar. Deshalb wurde für weitere Versuche die Kulturzeit auf drei Tage beschränkt. Die Ausbeute an rekombinaten Protein wurde in Relation zum Proteinmarker bestimmt und betrug bis zu 2 mg /l.

Für die Reinigung der Variante hK11 3S/2AS bot sich aufgrund der sechs Histidin-Reste am C-Terminus die Ni^{2+}-Affinitätschromatographie an. Das Eluat wurde durch Ultrazentrifugation entsalzt und konzentriert. Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung war das Zielprotein im PAA-Gel nicht sichtbar. Zusätzlich erfolgte die Detektion des Zielproteins durch Western-Blot (Abb.: 3-9 B). Durch einen gegen hK11 gerichteten Primärantikörper wurde die Positivkontrolle (Pro-hK11, R&D Systems), die nach Herstellerangabe ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa besitzt, sowie eine etwas höher gelegene Bande, die dem Pro-hK11 Fusionsprotein entspricht, detektiert.

Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität wurde eine Zymogramm angefertigt. Zymographie ist eine Methode zur Detektion proteolytischer Aktivität, die auch bei inhomogenen Proben mit hoher Sensitivität angewendet werden kann. Als Substrat diente Casein aus Trockenmilch, die dem PAA-Gel zugegeben war. Bei der Coomassie-Färbung erscheint das intakte (nicht hydrolysierte) Casein im Gel farbig, wodurch die Bereiche mit proteolytischer Aktivität als farblose Areale sichtbar wurden. Zusätzlich zum Nachweis der Aktivität erlaubt die Zymographie die Abschätzung des Molekulargewichts einer aktiven Proteinase. Da hK11 als Zymogen mit Pro-Peptid (ETR) exprimiert werden sollte, ist eine nachträgliche Aktivierung zur Gewinnung der vollständigen Enzymaktivität nötig. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde Thermolysin zur Aktivierung von rekombinant hergestellten Pro-Kallikreinen, darunter auch Pro-hK11 (Sano), verwendet. Thermolysin ist eine Metalloproteinase die auf der Aminoseite nach großen hydrophoben Resten wie Phenylalanin, Leucin und Isoleucin hydrolysiert. Der Zusatz von EDTA als Inhibitor führt zur Inaktivierung des Enzyms. Abbildung 3-10 zeigt das Zymogramm von unkonzentrierten und 5fach konzentrierten *P. methanolica* Kulturüberstand mit und ohne Aktivierung durch Thermolysin. Dabei wurde bereits im unkonzentrierten Überstand nach Thermolysinaktivierung proteolytische Aktivität detektiert. Im gefärbten Gel waren transparente Areale im Bereich bis etwa 40 kDa sichtbar. Im 5fach konzentrierten Kulturüberstand waren diese, etwas stärker, bereits vor der Aktivierung zu erkennen. Daher ist anzunehmen, dass hK11, zumindest teilweise, in aktiver Form im *P. methanolica* Kulturüberstand vorlag.

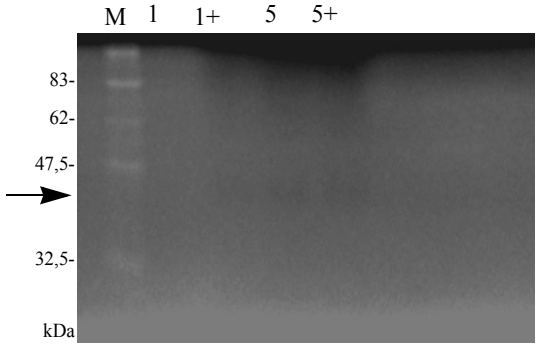


Abbildung 3-10. Detektion der proteolytischen Aktivität von hK11 3S/2AS im Zymogramm. Aufgetragen wurden ungereinigte *P. methanolica* Kulturüberstande. [1] unkonzentriert; [5] durch Ultrazentrifugation 5fach konzentriert. Bei den mit Plus gekennzeichnete Proben wurden jeweils 100µl mit 1 µg Thermolysin 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mM EDTA. [M] Proteinmarker P7708S; Die relevanten Banden sind durch den Pfeil markiert. Zur besseren Darstellung wurde die Abbildung farblich invertiert.

Um die Aktivität von hK11 3S/2AS zu quantifizieren, wurde das gereinigte Protein in kinetischen Untersuchungen zur Spaltung des synthetischen chromogenen Substrates S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) eingesetzt. Anhand der Zunahme der Absorption bei 405 nm über die Zeit konnte ein Umsatz des chromogenen Substrates nachgewiesen werden. Der *P.methanolica* Kulturüberstand wurde durch Ni^{2+}-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend erfolgte durch Ultrazentrifugation der Pufferaustausch, sowie eine Konzentrierung der Probe. Aus 5 ml Kulturüberstand konnten durch Ni^{2+}-Affinitätschromatographie etwa 3 µg gereinigtes Protein erhalten werden, was einer Ausbeute an gereinigtem

Protein von 0,6 mg/l Kulturüberstand entspricht. Zusätzlich bleibt zu berücksichtigen, dass aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von rekombinanten Protein zu konstitutiv in das Medium sekretierten *P. methanolica*-Proteine die chromatographische Reinigung nicht bis zur völligen Homogenität erfolgen konnte (Abb.: 3-14 B). Auf weitere Reinigungsschritte wurde zugunsten der Proteinausbeute verzichtet.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden 200 nM gereinigtes hK11 3S/2AS zusammen mit 1 mM Substrat im Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) bei 37°C inkubiert. Die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 405$ nm wurden spektralphotometisch (Plattenreader) über einen Zeitraum von 10 Stunden gegen eine proteinasefreie Referenz bestimmt. Abbildung 3-11 zeigt den Vergleich von Thermolysin-aktiviertem und unaktiviertem hK11 3S/2AS.

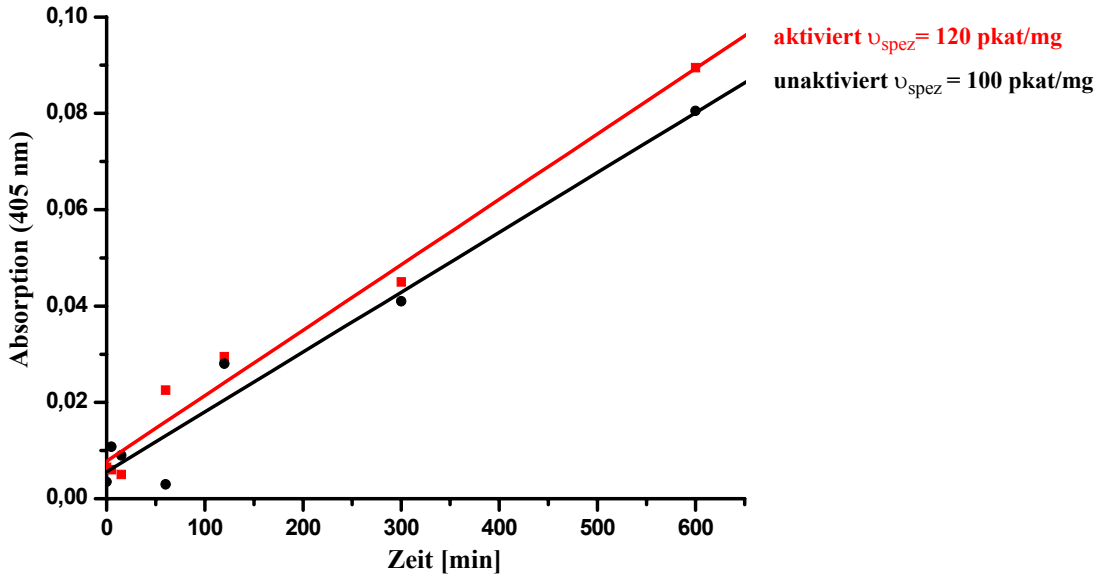


Abbildung 3-11. Bestimmung der Enzymaktivität von hK11 3S/2AS durch proteolytische Spaltung des chromogenen Substrates S2302 (1 mM). Der Anstieg der Absorption bei $\lambda = 405$ nm gegen die Zeit ($\Delta A/\Delta t$ ermittelt durch lineare Regression) diente zur Berechnung der spezifischen Aktivität [υ_{spez}]. Eingesetzt wurden 200 nM hK11 [unaktiviert] ohne Aktivierung sowie [aktiviert] nach Aktivierung mit 10 µg/ml Thermolysin. Der Anstieg beider Proben ist nahezu identisch.

Wie schon anhand der Zymographie zu erwarten war, konnte für die mit Thermolysin aktivierte, wie auch die unaktivierte hK11 3S/2AS Probe, eine Zunahme der Absorption, mit annähernd gleichem Anstieg festgestellt werden. Die proteolytische Aktivität beider Proben war jedoch vergleichsweise gering.

Optimierung der Expression

P. methanolica ist in der Lage hK11 zu exprimieren, wobei dieses, zumindest teilweise, schon in der aktiven Form vorlag. Die Rohausbeuten an rekombinanten hK11 waren mit ca. 2 mg/l jedoch gering. Daher wurde versucht durch Optimierung der Expression die Ausbeute an rekombinanten hK11 zu erhöhen. Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der Hefe durch Bestimmung der optischen Dichte bei $\lambda = 600$ über einen Zeitraum von 6 Tagen charakterisiert (Abb.: 3-10). Nach Herstellerangabe entspricht eine OD_{600} etwa $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Die Wachstumskurve zeigte zu Beginn des Wachstums auf Glukose eine Zuwachsrate von $1{,}5 \cdot 10^7$- $2 \cdot 10^7$ Zellen pro Stunde. Nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle auf Methanol nach 24 h ist ein deutliches Abflachen der Kurve zu erkennen. In dieser Phase setzten die Zellen das zugegebene Methanol zwar um, nutzen es aber nur teilweise zur Biomassebildung. Die Zuwachsrate beträgt mit $0{,}19 \cdot 10^7$ - $0{,}25 \cdot 10^7$ Zellen pro Stunde nur rund ein Zehntel des Zuwachses an Zellen auf glukosehaltigem Medium. Dieses Stagnieren der Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch nicht alleine auf die Umstellung des Organismus von der Umsetzung von Glukose auf Methanol zurückzuführen, sondern auch auf die große Zelldichte im Kolben, die zur Flokkulation der Hefezellen führte. Durch den regelmäßigen Verbrauch des Methanols im Medium ist zu erkennen, dass die Hefeklone sich an Methanol als neue Kohlenstoffquelle gut assimilieren und dieses zur Biomassebildung nutzen. Der Stoffwechselweg des Methanols ist bei allen methylotrophen Hefen gleich. Im Peroxisom wird Methanol durch die, bei *P.methanolica* im AUG1-Gen kodierte Alkoholoxidasen zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid oxidiert. Durch die peroxisomale Katalase erfolgt die katalytische Aufspaltung des toxischen Wasserstoffperoxids in Wasser und molekularen Sauerstoff, während das gebildete Formaldehyd zur Energiegewinnung und zum Aufbau von Biomasse verwendet wird [GELLISSEN, 2000].

Die mikroskopischen Bilder (Abb.: 3-10) der Hefen bei 1000facher Vergrößerung zeigen deutlich den Unterschied zwischen dem Erscheinungsbild der Hefenzellen auf glukosehaltigem Medium (A) im Vergleich zum Wachstum auf methanolhaltigem Medium (B).

Die Hefezellen haben am Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach Verbrauch der Glukose noch die typische ovale Hefezellform, wohingegen die Zellen in Bild (B), auf Grund der häufigen Teilung durch Sprossung schon vernarbte Zellformen ausweisen und mehr Zellorganellen besitzen. Ursache dafür ist das Methanol, dass nur in den Peroxisomen der Hefezelle umgesetzt wird, weshalb die Peroxisomenproliferation bei Assimilation an das neue Medium verstärkt wird [GELLISSEN, 2000]. Zur Erhöhung der Ausbeute an rekombinantem Protein wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet. Durch die Verwendung von Schikanenkolben sollte der Sauerstoffeintrag verbessert werden und der Flokkulation der Hefezellen entgegen gewirkt werden. Die Bestimmung des MeOH-Gehaltes und die bedarfgerechte Zugabe sollte sicher stellen, dass es während der Expression weder zu MeOH-Mangel noch zur Anreicherung des toxischen MeOHs kam. Zudem sollte durch die Einführung einer Bisubstrat- bzw. MeOH-Induktionsphase, die

bessere Adaption der Hefe an MeOH als neue Kohlenstoffquelle erreicht werden [DUDDA-BÖHM, 2007].
Durch die Variation der Wachstumsbedingungen waren jedoch nur graduelle, schlecht reproduzierbare Veränderungen in der Menge an rekombinantem Protein zu erkennen.

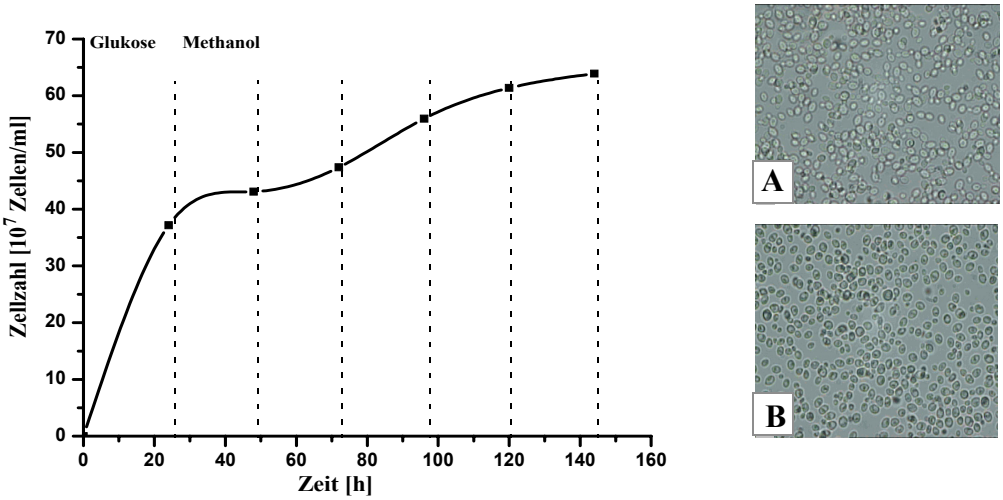


Abbildung 3-12. Wachstum und Morphologie von *P. methanolica* hK11 3S/2AS. Das Wachstum der Hefen auf Glukose- (BMDY) und Methanolhaltigem (BMMY) Medium wurde anhand der Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600}) verfolgt, wobei eine OD_{600} $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml entspricht. Die gestrichelten Linien zeigen die Zugabe von 0,5% (v/v) Methanol an. Die mikroskopischen Abbildungen zeigen die Hefezellen bei 1000fachen Vergrößerung (A) nach 24 h und (B) nach 72 h.

Eine weitere Möglichkeit die Ausbeute von rekombinantem hK11 aus *P. methanolica* zu erhöhen, bietet die Fermentation, die bei sehr hoher Zelldichte und optimaler Sauerstoffversorgung eine bessere Expressionsrate ermöglicht. Die Fermentation von *P. methanolica* im 5-Liter-Rührreaktor wurde bereits in der Diplomarbeit von DUDDA-BÖHM [2007] etabliert und für hK11 3S/2AS im Zuge einer Projektarbeit von EICHHORN durchgeführt [2009].
Die Verwendung des sythetischen MBS (Minimal Basal Salts)-Medium erleichtert zusätzlich die nachfolgende chromatographische Aufreinigung, da es weniger störende Medienbestandteile wie Hefeextrakt und Pepton enthält. Die Abbildung 3-13 stellt den Expressionsverlauf von hK11 3S/2AS im SDS-PAA-Gel nach Coomassiefärbung dar. Nach der Induktion mit Methanol können in der für hK11 erwarteten Größe von etwa 40 kDa, zwei unterschiedlich große Banden detektiert werden. Anhand der vorhergehenden Ergebnisse ist anzunehmen, dass es sich dabei um die Proform und die mature Form von hK11 handelt. Obwohl die Rohausbeute an rekombinanten Protein deutlich gesteigert werden konnte (etwa 15 bis 20 mg/l), ist weiterhin ist zu erkennen, dass trotz optimierter Bedingungen ein deutliches Missverhältnis zwischen gewünschtem Protein und konstitutiv sekretiertem Hefe-Protein besteht.

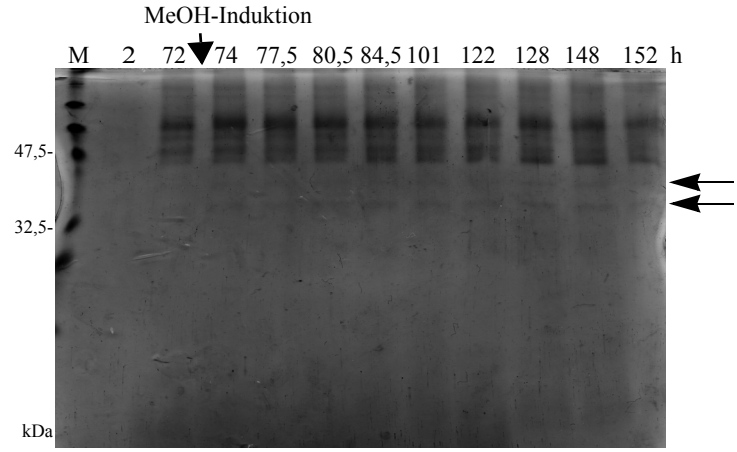


Abbildung 3-13. Nachweis der heterologen hK11 3S/2AS Expression durch *P. methanolica* im 5l-Fermentor durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung. Aufgetragen wurden Proben des unkonzentrierten Fermentationsüberstandes über einen Zeitraum von 152 h. [M] Proteinmarker P7708S; Die relevanten Banden sind durch Pfeile markiert.

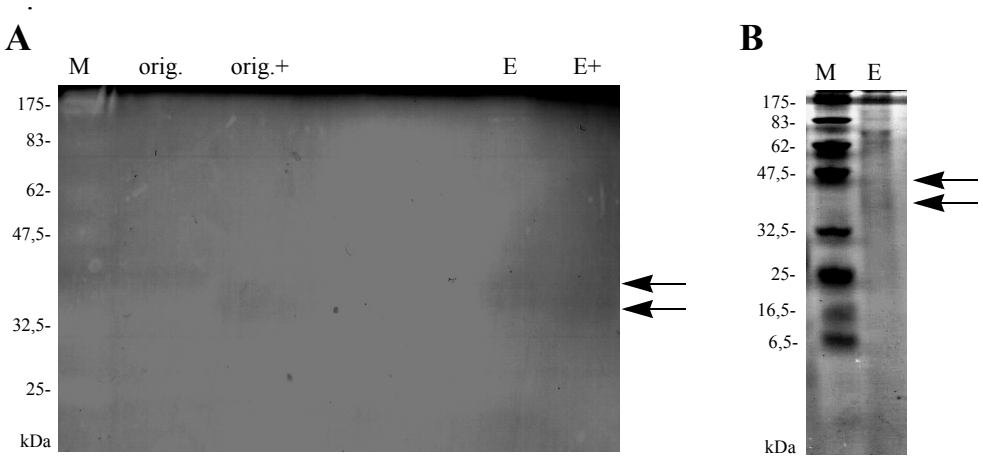


Abbildung 3-14. Detektion von hK11 3S/2AS nach Ni2+-Affinitätschromatographie durch Zymographie **(A)** und SDS-PAGE nach Coomassiefärbung **(B).** Aufgetragen wurden der ungereinigte *P. methanolica* Fermentationsüberstand [orig.] und der 20fach konzentrierte Eluent [E] der Chromatographie. Die mit Plus gekennzeichnete Proben wurden mit 1 µg Thermolysin 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mM EDTA. [M] Proteinmarker P7708S; Die relevanten Banden sind durch Pfeile markiert. Zur besseren Darstellung wurde Abbildung A farblich invertiert.

Im Zymogramm zeigten sich wie erwartet sowohl bei dem nicht aktivierten, wie auch bei dem mit Thermolysin aktivierten Fermentationsüberstand transparente Banden. Diese waren im konzentrierten Eluenten wesentlich stärker. Da die Pro-Form von hK11 nur eine sehr geringe proteolytische Aktivität besitzt [SANO *et al*., 2007], entspricht diese Bande der maturen

hK11-Form. Nach der Aktivierung erscheint die Bande etwas tiefer, was wahrscheinlich auf eine weitere Prozessierung von hK11 durch Thermolysin zurückzuführen ist. Wie schon anhand der Variante hK11 6S/1AS gezeigt wurde, besitz hK11 trotz Verlust von 33 AS am N-Terminus keine beeinträchtigte proteolytische Aktivität.

3.2.5 Heterologe Expression von Pro-hK11 in CHO-Zellen

Die Transfektion von CHO-Zellen mit dem hK11 2S/1AS Plasmid erfolgte Liposomen-vermittelt. Durch Zugabe von verschiedenen Zeozin-Konzentrationen (50-1000 µg/ml) in das Kulturmedium war eine Selektion der Transformanden möglich. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte CHO-Zellen, die durch Zeozin-haltiges Medium nach drei Tagen komplett abstarben. Zusätzlich wurde für den Nachweis der erfolgreichen Transfektion eine RNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese durchgeführt. Die gereinigten RNA-Präzipitate aus transfizierten, sowie unbehandelten CHO-Zellen wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb.: 3-15 A). Die ribosomale 28S- und die 18S-RNA, welche ungefähr 80% der Gesamt-RNA ausmachen, diente dabei als interner Marker für eine intakte mRNA. Nach anschließender reverser Transkription wurde, ausgehend von der cDNA eine Amplifikation mit hK11 spezifischen Primern (Zosch1S/Zosch2AS) durchgeführt (3-15 B). Gleichzeitig wurde mit β-Tubulin-Primern (β-Tubulin-1S/b-Tubulin-2AS) ein 461 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert, das die erfolgreiche reverse Transkription bestätigte. Für die heterologe Expression wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert. Die Expression von Pro-hK11 wurde in einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abb.: 3-16).

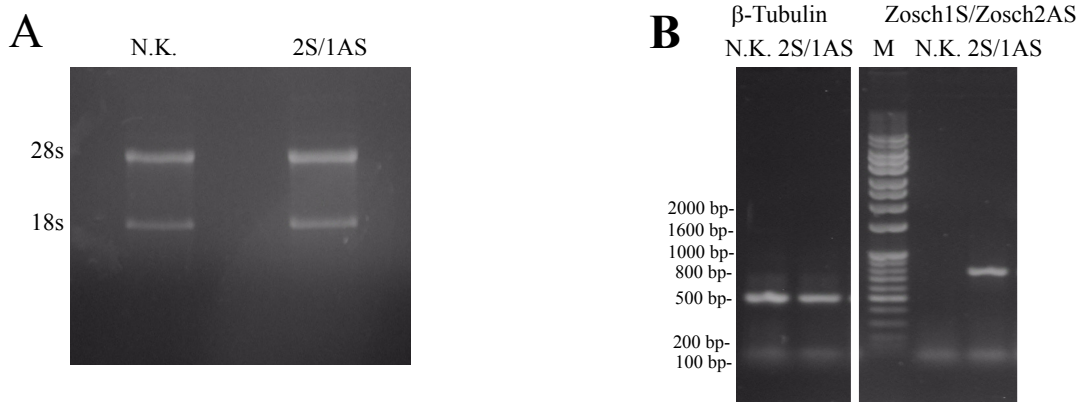


Abbildung 3-15. Nachweis der erfolgreichen Transfektion von CHO-Zellen. (A) Elektrophoretische Auftrennung der isolierten RNA aus transfizierten [2S/1AS] und nicht transfizierten [N.K.] CHO-Zellen in einem 1,7%igen Agarosegel. **(B)** Kontrolle der generierten cDNA nach PCR mit der Primerkombination Zosch1S/Zosch2AS [2S/1AS] und β-Tubulin-1S/β-Tubulin-2AS [β-Tubulin] durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1,7%igen Agarosegel. [M] Molekulargewichtsstandard 1 kbp

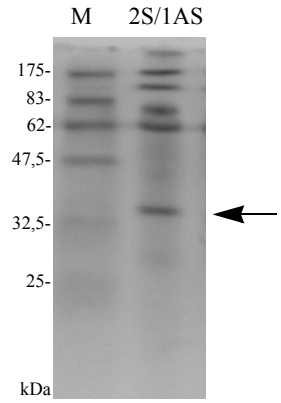


Abbildung 3-16. Nachweis der Pro-hK11 Expression durch CHO-Zellen. 10fach konzentrierte Kulturüberstande von hK11 2S/1AS in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. [M] Proteinmarker P7708S; Die relevante Bande ist durch den Pfeil markiert.

Die Reinigung der CHO-Medien Überstände erfolgte aufgrund des theoretische errechneten isoelektrischen Punktes von 8,7 durch Kationenaustauschchromatographie. Für die Chromatographie wurden 25 ml CHO-Medienüberstand mit einem Äquilibrierungspuffer (50 mM Natrium-Phosphat) bei pH 5,5 an die SP-Sepharose-Matrix gebunden. Durch einen linearen Ionenstärkegradienten bis 0,5 M NaCl wurden die Proteine von der Säule eluiert und fraktioniert. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrazentrifugation entsalzt und konzentriert. Nach der Reinigung war für das 10fach konzentrierte Eluat im SDS-PAA-Gel keine Bande sichtbar. Da die Proteinkonzentration wahrscheinlich die Nachweisgrenze der Coomassiefärbung unterschritt, erfolgte der Nachweis von hK11 in einer korrespondierenden Zymographie (Abb.: 3-18). Da in der SDS-Page nach der Kationenaustauschchromatographie keine Bande detektiert wurden, kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Proteine in der Probe vorhanden sind, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Unter dem Vorbehalt relativer Reinheit wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Die Ausbeute an gereinigten hK11 2S/1AS war mit 0,64 mg/l CHO-Kulturüberstand vergleichbar mit dem gereinigten hK11 3S/2AS aus *P. methanolica*.

Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Die enzymatische Aktivität des durch CHO-Zellen exprimierten hK11 2S/1AS wurde zymographisch nachgewiesen (Abb.: 3-17). Wie auch bei dem durch *P. methanolica* exprimierten hK11 3S/2AS wurde zur proteolytischen Aktivierung Thermolysin verwendet. Um sicherzugehen, dass es sich bei der detektierten Enzymaktivität nicht um CHO-spezifische Proteinasen handelt, dienten untransfizierte CHO-Zellen als Negativkontrolle.

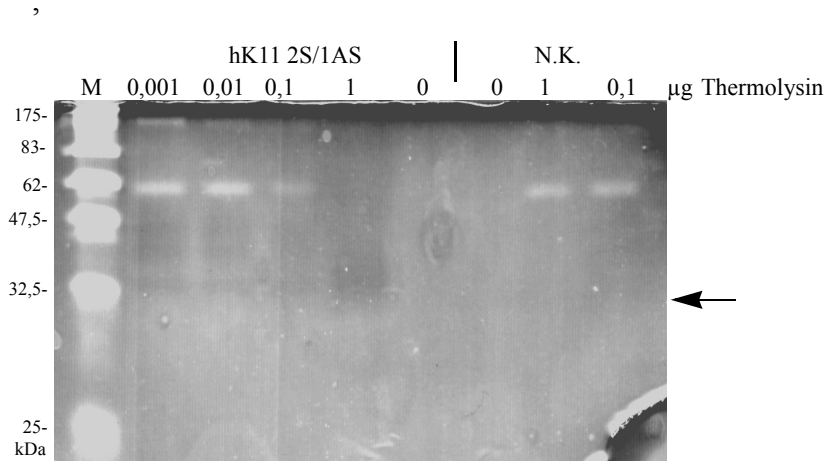


Abbildung 3-17. Detektion der proteolytischen Aktivität von hK11 2S/1AS im Zymogramm. Aufgetragen wurden ungereinigte CHO-Medienüberstande. [hK11 2S/1AS] von transfizierten Zellen und [N.K.] von untransfizierten Zellen. Die Medienüberstände durch unterschiedliche Konzentrationen von Thermolysin 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mM EDTA. [M] Proteinmarker P7708S; Die relevanten Banden sind durch den Pfeil markiert. Zur besseren Darstellung wurde die Abbildung farblich invertiert.

Aus dem Zymogramm wird deutlich, dass hK11 2S/1AS erst nach Aktivierung proteolytische Aktivität zeigt. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei dem durch CHO-Zellen exprimierten hK11 um die Pro-Form handelt. Weiterhin ist zu erkennen, dass bei niedrigen Thermolysinkonzentrationen mehrere distinkte Banden zwischen 32,5 kDa und 47,5 kDa (Proteinmarker) zu erkennen sind. In einer Veröffentlichung von SANO und Mitarbeitern [2007] wird für rekombinantes hK11 aus CHO-Zellen ein Molekulargewicht von 40 kDa beschrieben. Die im Zymogramm detektivierte unterste Bande bei etwa 32,5 kDa könnte möglicherweise ähnlich wie bei 3S/2AS aus *P. methanolica*, durch Thermolysinüberschuss degradiertes hK11 sein. Im Gegensatz dazu war nach der Ionenaustauschchromatographie im unaktivierten Eluat eine schwache Degradationsbande bei etwa 40 kDa zu erkennen, die hK11 zugeordnet werden kann (Abb.: 3-18). Nach Aktivierung durch Thermolysin war die Bande auf gleicher Höhe wesentlich stärker sichtbar. Es ist davon auszugehen, dass geringe Mengen hK11 bereits in aktivierter Form vorlagen.

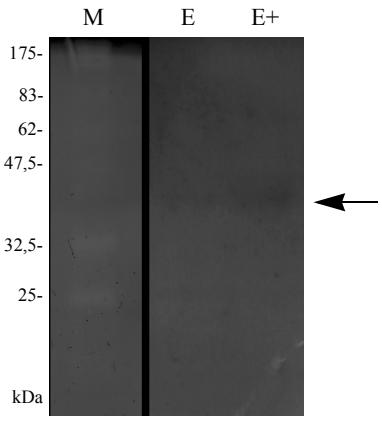


Abbildung 3-18. Detektion der von hK11 2S/1AS nach Kationenaustauschchromatographie durch Zymographie**.** Aufgetragen wurden der 10fach konzentrierte Eluent [E] der Chromatographie. Die mit Plus gekennzeichnete Probe wurden mit 1 µg Thermolysin 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mM EDTA. [M] Proteinmarker P7708S; Die relevanten Banden sind durch Pfeile markiert. Zur besseren Darstellung wurde die Abbildung farblich invertiert.

Die heterologe Expression von hK11 2S/1AS in CHO-Zellen und die Sekretion ins Medium konnte nachgewiesen werden. Die Expression zeigte jedoch hinsichtlich der Menge an rekombinanten Protein und dem Verhältnisses von enzymatisch aktivem und inaktivem Pro-hK11 große Unterschiede. Aus diesem Grund wurde versucht, die Expressionbedingungen zu optimieren und zu standardisierten. Dabei erwies sich eine möglichst kurze (max. 48 h) Inkubationsdauer in serumfreien Medium als entscheidend für den Erhalt von hK11 als Pro-Form (Abb.: 3-19). Zudem konnte durch den Zusatz von 0,5% w/v BSA (Bovines Serum Albumin) im Kulturmedium eine Erhöhung der Pro-hK11 Ausbeute erreicht werden. Da sich der Zusatz von BSA jedoch negativ auf die nachfolgende Chromatographie auswirkte, wurde auf eine Ausweitung dieser Option verzichtet.

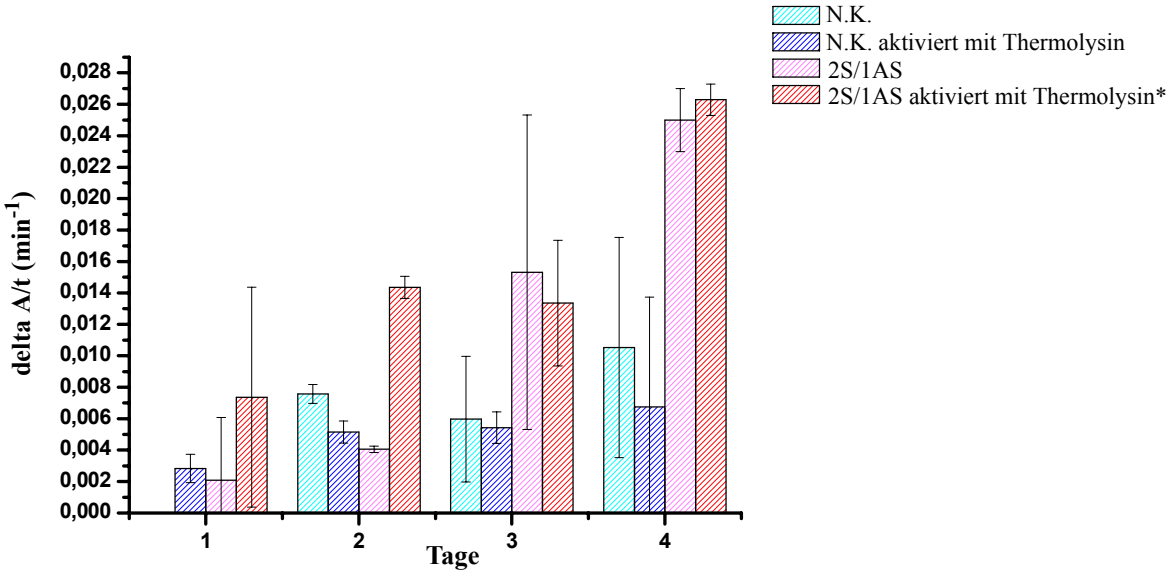


Abbildung 3-19. Abhängigkeit der hK11-Aktivität von Kultivierungsdauer. Transfizierte CHO-Zellen [2S/1AS], sowie untransfizierte Zelle [N.K.] wurden 4 Tage in serumfreien Ham´s F12-Medium kultiviert. Täglich wurden Proben genommen und zur Bestimmung der Enzymaktivität durch proteolytische Spaltung des chromogenen Substrates S2302 (1 mM) eingesetzt. Der Anstieg der Absorption bei λ = 405 nm gegen die Zeit ($\Delta A/\Delta t$ ermittelt durch lineare Regression) diente als Maß zur Bewertung der Enzymaktivität. Getestet wurde der unaktivierte, sowie der mit 10 µg/ml Thermolysin aktivierte Kulturüberstand. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (±STD) von zwei unter gleichen Bedingungen kultivierten Ansätzen. *signifikant verschieden zur Negativ Kontrolle (N.K.) $p < 0,05$

3.2.6 Charakterisierung der Proteinaseaktivität von hK11

Nachdem die hK11-Expression durch *P. methanolica* und CHO-Zellen nachgewiesen wurde, war ein wichtiger Schritt zur Etablierung von Hemmtests die Auswahl geeigneter Parameter zur Bestimmung der Enzymaktivität und nachfolgend die Charakterisierung der hK11-Aktivität. Ein praktikabler Test zur Bestimmung der Proteinaseaktivität ist die Absorptionsmessung zur Spaltung von synthetischen Peptidsubstraten. Für hK11 fanden sich entsprechende Daten in einigen Originalarbeiten.

Da sich die publizierten Testbedingungen aber zum Teil erheblich unterscheiden und bisher keine vergleichenden Untersuchungen vorliegen, wurde mit Voruntersuchen zur Abhängigkeit der Enzymaktivität von unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen und pH-Wertenbegonnen (Abb.: 3-20). In den bisherigen Veröffentlichungen zur Bestimmung der hK11-Aktivität wird Tris-Puffer unter Zusatz von NaCl verwendet. Da kein Unterschied in der Enzymaktivität von hK11 bei den verwendeten Puffern zu erkennen war, wurde für die weiteren Versuche der Puffer nach Luo [2006a] (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl, 0,01% Tween 20 pH 7,5) unter Zugabe von 10 mM EDTA verwendet.

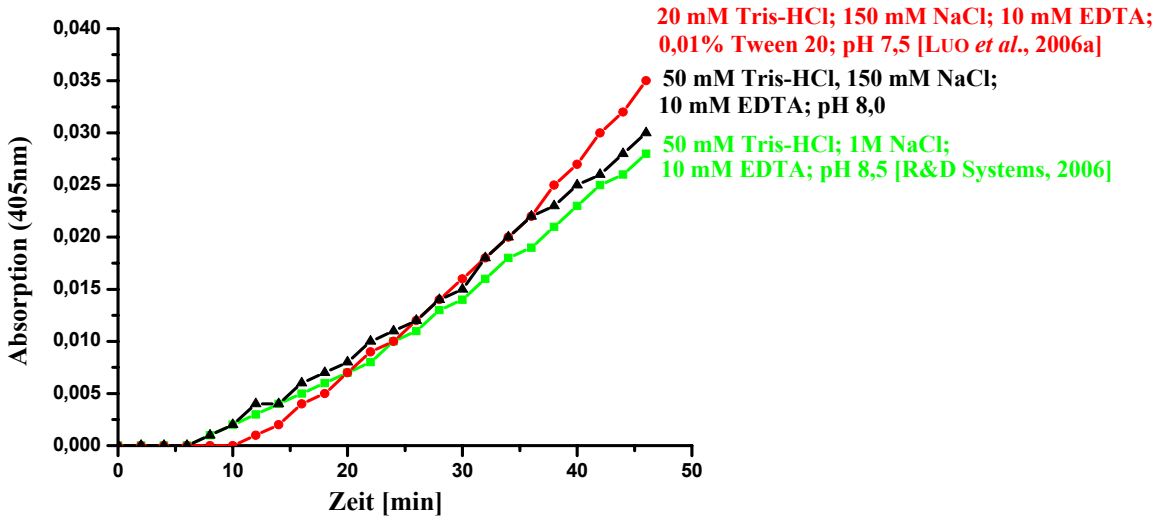


Abbildung 3-20. Vergleich der hK11-Aktivität in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung durch proteolytische Spaltung des chromogenen Substrates S2302 (1 mM) bei RT. Eingesetzt wurde hK11 2S/1AS CHO-Kulturüberstand nach Aktivierung mit 10 µg/ml Thermolysin. Der Absorptionsanstieg ist bei allen Proben nahezu identisch.

Für die bisherigen Untersuchungen wurde das synthetische Peptidsubstrat S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) verwendet, das auch in den Veröffentlichungen von LUO [2006a] und MITSUI [2000] Anwendung fand. Da die bestimmte Enzymaktivität mit diesem Substrat generell gering war, wurden auch andere kommerziell erhältlichen Substrate getestet. Ein Substrat mit der Aminosäuresequenz Val-Leu-Lys (S2251, H-D-Val-Leu-Lys-pNA) wird von R&D System [2006] für rekombinantes hK11 empfohlen und auch von EMAMI [2007] und Yoon [2007] verwendet. S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), das bereits bei der Aktivitätsbestimmung der maturen hK11-Varianten (3.2.2) eingesetzt wurde, kam in mehreren Veröffentlichungen, unter anderem bei der Detektion der hK5 und hK14-Aktivität, zur Anwendung [EGELRUD *et al.*, 1999; BRATTSAND *et al.*, 2005; DERAISON *et al.*, 2007]. Da für hK11 in einer Publikation von DEBELA und Mitarbeitern [2007] zur Substratspezifität von Gewebekallikreinen eine ambivalente Spezifität, die sowohl basische wie auch große aliphatische Aminosäuren in der P1-Position erlaubt, beschrieben wird, wurde auch das Chymotrypsin-spezifische Substrat S2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Try-pNA) getestet.

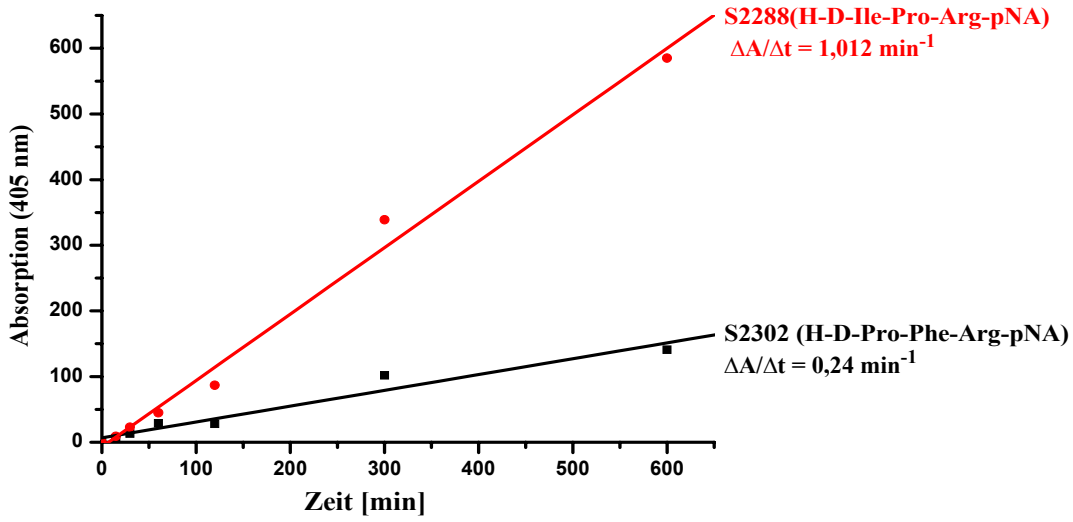
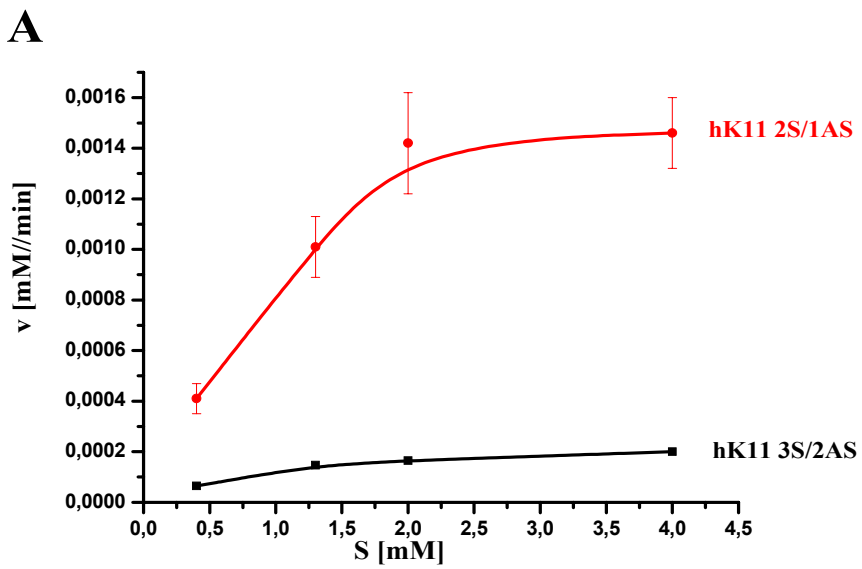
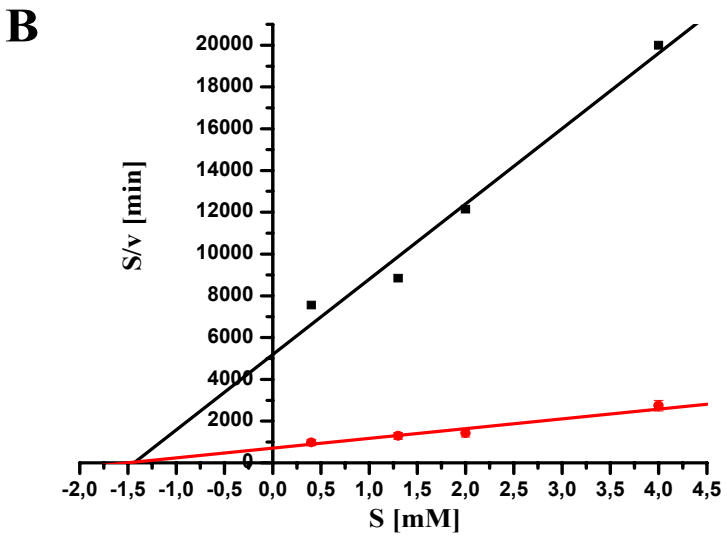


Abbildung 3-21. Bestimmung der hK11-Aktivität durch proteolytische Spaltung der chromogenen Substrate S2302 (1 mM) und S2288 (1mM). Eingesetzt wurde hK11 2S/1AS CHO-Kulturüberstand nach Aktivierung mit 10 µg/ml Thermolysin. Die angegebenen Werte sind durch Abzug der Negativkontrolle (untransfizierte CHO-Zellen) korrigiert. Der Anstieg der Absorption bei λ = 405 nm gegen die Zeit (ΔA/Δt ermittelt durch lineare Regression) diente als Maß zur Bewertung der Enzymaktivität. Der Anstieg der Probe mit S2288 ist etwa vier mal so groß wie bei dem bisher verwendeten S2302. Bei Verwendung der Substrate S2251 und S2586 konnte kein signifikant erhöhter Anstieg zur Negativkontrolle festgestellt werden.

Aus Abbildung 3-21 ist ersichtlich, dass die Zunahme der Absorption und somit die proteolytische Spaltung des Substrates S2288 etwa vier mal so groß war, wie bei S2302. Bei Verwendung der Substrate S2251 und S2586 konnte kein signifikant erhöhter Anstieg zur Negativkontrolle festgestellt werden. Daher wurde für die weitere Charakterisierung das Substrat S2288 verwendet.

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m wurde der lineare Umsatz des chromogenen Substrats S2288 bei verschiedenen Konzentrationen (0,4 bis 4 mM) gemessen (Abb.: 3-22). Die Michaelis-Menten-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) wurden aus den Werten der Absorptionsmessung entsprechend dem Verfahren nach HANES [1932] bestimmt.
Anhand der Werte für K_m und V_{max} konnten dann die katalytische Konstante k_{cat} und die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m berechnet werden. In Abbildung 3-22 ist vergleichend die Michaelis-Menten-Kinetik und das Hanes-Diagramm zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität von hK11 3S/2AS und 2S/1AS dargestellt. Jeweils 200 nM Enzym wurden nach Aktivierung mit 10 µg/ml Thermolysin im Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,01% Tween 20; pH 7,5) bei 37°C inkubiert. Die Zunahme der Absorption bei λ = 405 nm wurde im Plattenreader gemessen.





hK11	2S/1AS	3S/2AS
K_m [mM]	1,58	1,43
V_{max} [µM/min]	2,1	0,33
k_{cat} [min^{-1}]	11	1,65
k_{cat}/K_m [$mM^{-1} min^{-1}$]	6,7	1,2

Abbildung 3-22. Quantifizierung der hK11-Aktivität durch (A) Michaelis-Menten-Kinetik und (B) Hanes-Auftrag. Gemessen wurden jeweils 200 nM hK11 nach Aktivierung mit 10 µg/ml Thermolysin im Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,01% Tween 20 pH 7,5) bei unterschiedlichen Konzentrationen von S2288 [S]. Die Werte von hK11 2S/1AS stellen Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Meßwerten dar, die Geraden entsprechen der linearen Regression.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von hK11 2S/1AS aus CHO-Zellen betrug 2,1 µM/min und war damit um den Faktor 6 höher als für hK11 3S/2AS aus *P. methanolica*. Die Michaelis-Menten-Konstante war für beide hK11-Varianten annähert gleich. Dem entsprechend ist die katalytische Effizienz, der Quotient k_{cat}/K_m, für hK11 2S/1AS ebenfall deutlich größer als für hK11 3S/2AS.

3.3 HETEROLOGE EXPRESSION WEITERER KALLIKREINE IN *PICHIA METHANOLICA* UND ÜBERPRÜFUNG IHRER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT *IN VITRO*

Neben hK11 sollten auch die in der Haut verkommenden Kallikreine 5, 7, 8 und 14 heterolog in *P. methanolica* exprimiert werden. Durch die Wahl der Primer wurden für die Kallikreine 5, 8 und 14 cDNA-Fragmente erzeugt, die für die maturen aktiven Enzyme kodieren. Für hK7 wurde ein cDNA-Fragment amplifiziert, das der Pro-Form entspricht, sowie ein weiteres, welches für eine N-terminal um 34 Aminosäuren verkürzte Variante des Enzyms kodiert. Abbildung 3-23 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden analog zu der oben beschrieben Klonierung von hK11 nach Restriktion in den Expressionsvektor pMETαA ligiert. Die generierten Plasmide wurden nach der Zwischenklonierung in *E. coli* zur Transformation von *P. methanolica*-Zellen der Stämme pMAD11 oder pMAD16 verwendet. Positiv identifizierte Klone wurden zur heterologen Expression eingesetzt. Die rekombinanten Proteine konnten durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung bzw. bei hK14 Western-Blot und Immunodetektion nachgewiesen werden (Abb.: 3-24). Tabelle 3-5 gibt einen Überblick über die wesentlichen Charakteristika der hergestellten Klone.

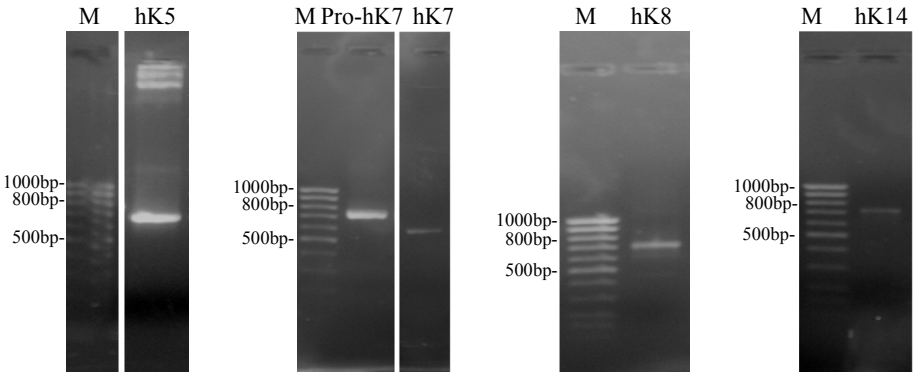


Abbildung 3-23. Nachweis der Amplifikation der Kallikrein cDNAs. Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (amplifiziert mit Pfu-Polymerase, 2.1.4 Ansatz 2) in einem 1,2%igem Agarosegel. [M] Molekulargewichtsstandard 100 bp; [hK5] KLK5MM-2S/KLK5MM-3AS (680 bp); [Pro-hK7] KLK7MM-1S/KLK7MM-4AS (692 bp); [hK7] KLK7MM-3S/KLK7MM-4AS (559 bp); [hK8] KLK8MMD-1S/KLK8MMD-2AS (692 bp); [hK14] KLK14MMD-1S/KLK14MMD-2AS (668 bp)

Tabelle 3-5: Zusammenstellung der klonierten und durch *P. methanolica* rekombinant exprimierten Kallikreine.

Kallikrein	Primer zur Amplifikation der jeweiligen cDNA Sense-/Antisense-Primer	verwendete Restriktionsendo-nukleasen	Expressionsstamm
hK5	KLK5MM-2S/KLK5MM-3AS	*Xho*I; *Spe*I	pMAD11
Pro-hK7	KLK7MM-1S/KLK7MM-4AS	*Xho*I; *Eco*RI	pMAD16
hK7	KLK7MM-3S/KLK7MM-4AS	*Xho*I; *Eco*RI	pMAD16
hK8	KLK8MMD-1S/KLK8MMD-2AS	*Xho*I; *Spe*I	pMAD11
hK14	KLK14MMD-1S/KLK14MMD-2AS	*Xho*I; *Eco*RI	pMAD11

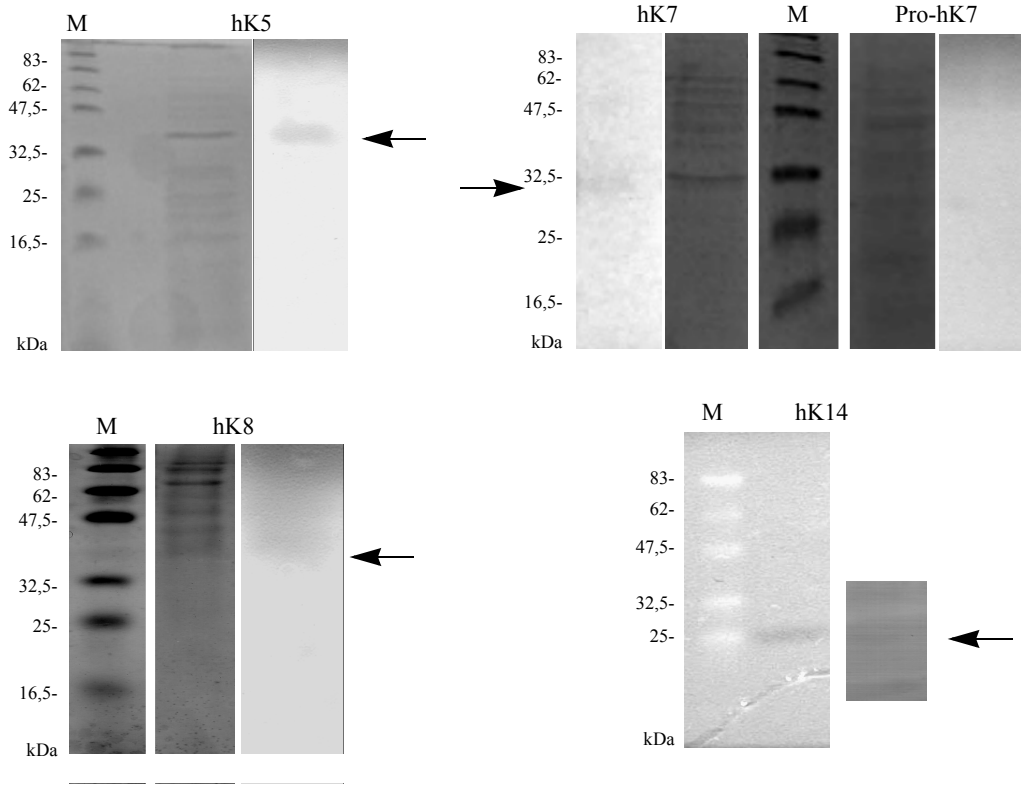


Abbildung 3-24. Nachweis der heterologen Kallikreinexpression durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. bei hK14 durch einen Anti-hK14-Antikörper im Western Blot sowie durch korrespondierende Casein-Zymographie. Aufgetragen wurden der ungereinigte *P. methanolica* Fermentationsüberstand (teilweise durch Ultrazentrifugation konzentriert) [M] Proteinmarker (P7708S, NEBioLabs, 6-175 kDa). Die relevanten Banden sind durch Pfeile markiert. Zur besseren Darstellung wurden die Abbildung der jeweiligen Zymographie farblich invertiert.

Sowohl durch SDS-PAGE (hK14 Westen-Blot) wie auch durch Zymographie wurden Banden detektiert, die den jeweiligen Kallikreinen zugeordnet werden können. Mit Ausnahme von hK14 ist das apparente Molekulargewicht, wie schon für hK11 beobachtet, gegenüber dem berechneten zu größeren Massen verschoben. Pro-hK7 konnte keine eindeutige Bande zugeordnet werden. Zudem konnte bei einigen Expressionen kleinere Proteinbanden detektiert werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte der Kallikreine handelte. Bis auf Pro-hK7 zeigten alle Kallikreine im Zymogramm eine hydrolytische Aktivität gegenüber Casein. Zur näheren Charakterisierung der Enzymaktivität wurden zusätzlich synthetische chromogene Peptidsubstrate genutzt. Das Substrat S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) wurde für die Trypsin-ähnlichen Kallikreine hK5, hK8 und hK14 verwendet. Für hK7 und durch Thermolysin-aktiviertes Pro-hK7 wurde das Chymotrypsin-Substrat S2586 genutzt. Anhand der Absorptionszunahme konnte für alle Kallikreine eine Substratumsetzung nachgewiesen werden. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Aktivitätstest war es möglich, die Volumenaktivität der Kulturüberstände zu bestimmen. In Abbildung 3-25 sind die Volumenaktivitäten aller in *P. methanolica* exprimierten Kallikreine vergleichend dargestellt. Trotz der ubiquitär vorhandenen enzymatischen Aktivität, traten zwischen den einzelnen Kallikreinen signifikante Unterschiede auf. Von den Trypsin-ähnlichen Kallikreinen hob sich hK8 deutlich von den anderen ab. Mit 29 pkat/ml war die hK8-Volumenaktivität etwa 150 mal höher als die von hK5, welches mit 0,2 pkat/ml die geringste Aktivität aufwies. Alle hK11-Varianten zeigten eine vergleichbare Aktivität. Für die verkürzte hK7-Variante zeigten sich sehr starke Schwankungen in der Volumenaktivität. Diese deutlichen Unterschiede spiegelten sich auch in der Zymographie wieder. Abbildung 3-26 zeigt das Zymogramm sowie ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAA-Gel von drei exemplarischen Expressionen unter vergleichbaren Kulturbedingungen

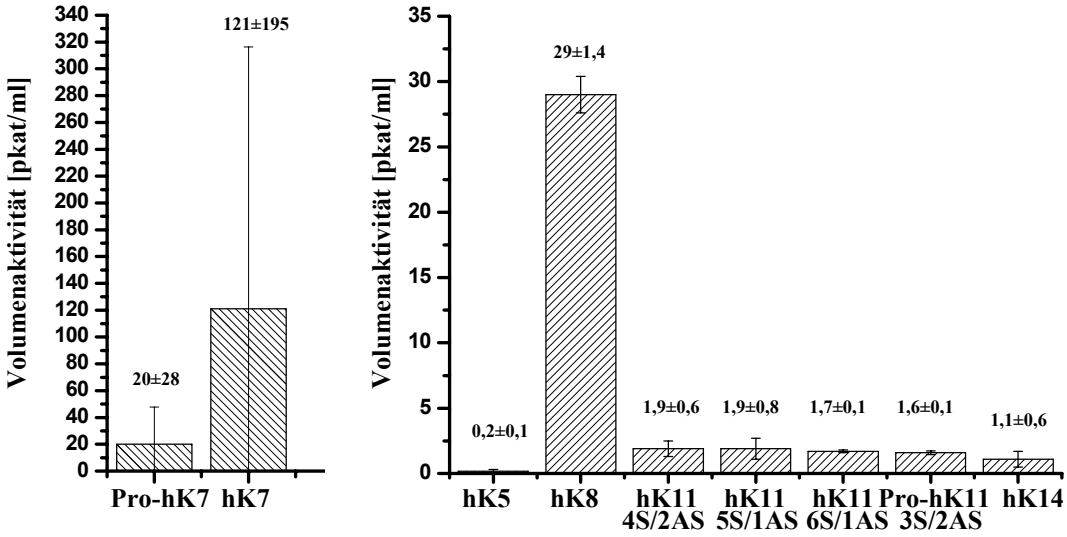


Abbildung 3-25. Vergleich der Volumenaktivität der in *Pichia methanolica* exprimierten Kallikreine durch proteolytische Spaltung chromogener Substrate (S2288 1,2 mM, für hK5, hK8, hK11 und hK14; S2586 1,2 mM für hK7) bei RT. Der Anstieg der Absorption bei λ = 405 nm gegen die Zeit (ΔA/min ermittelt durch lineare Regression) diente zur Berechnung der Volumenaktivität. Die angegebenen Werte beziehen sich auf unkonzentrierte *P. methanolica* Kulturüberstände aus mindestens zwei vergleichbaren Expressionen.

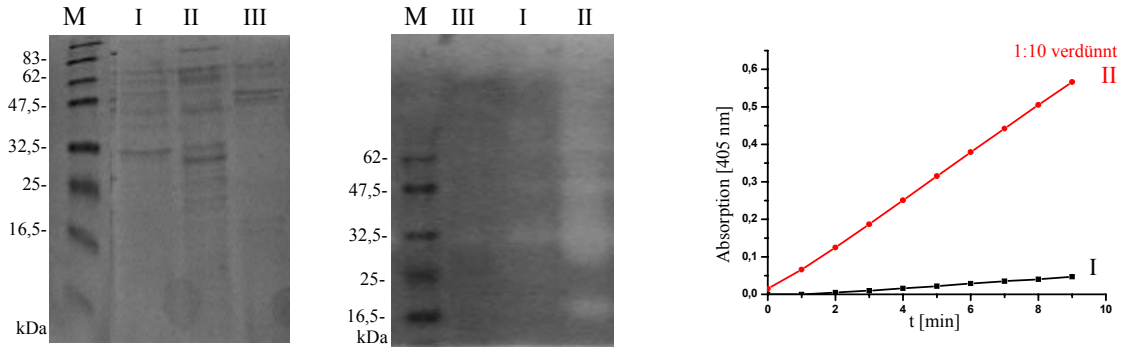


Abbildung 3-26. SDS-PAGE mit ihrem korrespondierenden Zymogramm sowie der Aktivitätsbestimmung mit chromogenen Substrat (S2586) von drei vergleichbaren hK7 Expressionen. Eingesetzt wurde der unkonzentrierte P.methanolica Kulturüberstand (für Expression II bei der Aktivitätsbestimmung 1:10 verdünnt).Expression II zeigte die stärkste proteolytische Aktivität, während Expression III kaum Aktivität aufwies.

3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR INHIBITION DER KALLIKREINAKTIVITÄT DURCH LEKTI-DOMÄNEN

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen LEKTI-Domänen auf die Aktivität der in der Haut vorkommenden humanen Gewebekallikreine. Diese Versuche sollten zum besseren Verständnis der in der Haut des Haut und Hautkrankheiten. Für mehrere Kallikreine wurde eine Hemmung der Enzymaktivität durch LEKTI beschrieben. Für die stark in der Haut exprimierten Proteinase hK11 liegen bisher noch keine veröffentlichten Ergebnisse vor.

3.4.1 HEMMUNG DER HK11-AKTIVITÄT

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der einzelnen LEKTI-Domänen 6, 8 und 9, sowie den zusammenhängenden LEKTI-Domänen 7 und 8 auf die hK11-Aktivität untersucht. Für diese Versuche wurde hK11 2S/1AS aus transfizierten CHO-Zellen eingesetzt. Dieses wurde durch Kationenaustauschchromatographie gereinigt, durch Ultrazentrifugation entsalzt und konzentriert und anschließend durch Thermolysin aktiviert. Für die Hemmversuche wurden jeweils 200 nM Enzym mit konstanter Substratkonzentration von 2,3 mM und steigender Inhibitorkonzentrationen bei 37 °C inkubiert. Die hydrolytische Spaltung des chromogenen Substrates wurde durch Absorptionsänderung bei λ = 405 nm spektralphotometrisch bestimmt. Die bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration erhaltene Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta A/\Delta t$) wurde gegen die Inhibitorkonzentration in einem Diagramm aufgetragen. Der Anstieg der Absorption ohne Inhibitor wurde als 100% definiert und die anderen Werte entsprechend berechnet. Die Kurven sind in Abbildung 3-27 gezeigt. Anhand des Diagrammes konnte die Inhibitor-Konzentration, bei der 50% der hK11-Aktivität gehemmt wird (IC_{50}-Wert) für LD6 mit 1 µM und für LD9 mit 1,6 µM bestimmt werden. LD7-8 und LD8 zeigten nur eine geringfügige hK11-Inhibition. Der IC_{50}-Wert ist vom K_m-Wert des Substrates und der Konzentration des Substrates abhängig. Aus dem unter 3.2.6 ermittelten K_m-Wert für hK11 und den IC_{50}-Werten für LD6 und LD9 wurden die Ki-Werte, die Dissoziationskonstante der Inhibitoren, entsprechend der Gleichung von CHENG und PRUSOFF [1973] berechnet. Für LD6 ergibt sich daher ein Ki-Wert von 0,63 µM und für LD9 ein Ki-Wert von 1,03 µM.
Um einen eventuellen Anhaltspunkt bezüglich des Hemmtyps zu bekommen, wurde die Inhibition durch LD6 bei vier verschiedenen Substrat Konzentrationen gemessen (Abb.: 3-28).

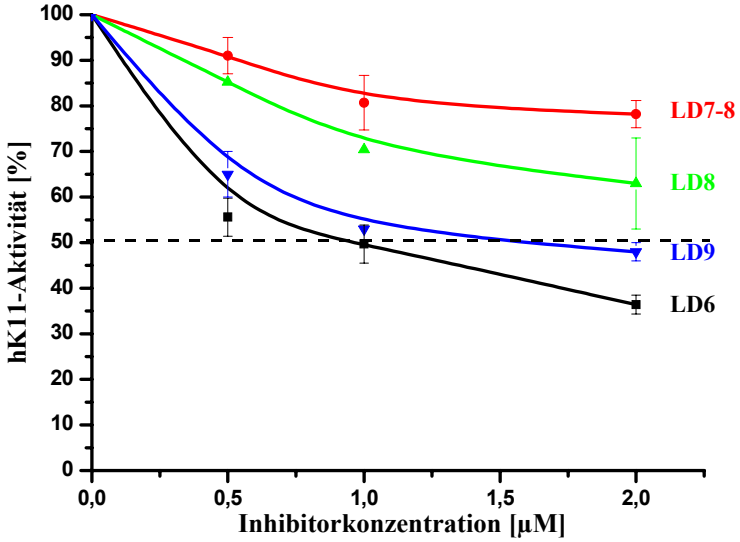
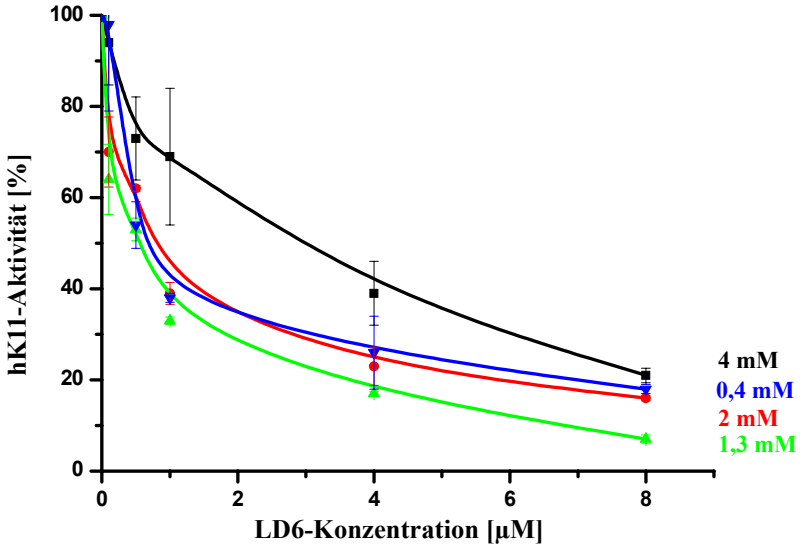


Abbildung 3-27. Inhibition der hK11-Aktivität durch die LEKTI-Domänen 6, 7-8, 8 und 9. Für die Messung wurden 200 nM aktiviertes hK11 2S/1AS und 2,3 mM Substrat S2288 im Reaktionspuffer bei 37°C mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration im Plattenreader bei 405 nm bestimmt. ΔA/Δt ohne Inhibitor wurde als 100% definiert. Die Messwerte geben die Mittelwerte (±SD) der Doppelbestimmung an.



S [mM]	IC_{50} [µM]
0,4	0,68
1,3	0,54
2	0,77
4	3,0

Abbildung 3-28. Inhibition der hK11-Aktivität durch LD6 bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Für die Messung wurden 200 nM aktiviertes hK11 2S/1AS im Reaktionspuffer bei 37°C mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen und S2288 Substratkonzentrationen [S] inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration im Plattenreader bei 405 nm bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor wurde als 100% definiert. Die Meßwerte geben die Mittelwerte (±SD) der Dreifachbestimmung an.

Abbildung 3-28 zeigt, dass die niedrigen Substratkonzentrationen bis 2 µM kaum einen Einfluß auf den IC_{50}-Wert haben. Im Gegensatz dazu wird der IC_{50}-Wert bei der höchsten eingesetzten Substratkonzentration von 4 µM in der graphischen Darstellung deutlich in Richtung höherer Inhibitor-Konzentration verschoben. Dies könnte als Hinweis auf einen kompetitiven Hemmtyp gewertet werden. Um aber den Hemmtyp exakt zu bestimmen und den Einfluß des Inhibitors auf K_m und V_{max} zu ermitteln, wurde die Meßwerte im Hanses-Diagramm dargestellt (Abb.: 3-29). Dabei wichen die Meßdaten aufgrund der Komplexität des Reaktionsansatzes von der theoretisch zu erwartenden strengen Linearität ab, wobei die ermittelten Meßwerte der höchsten Inhibitorkonzentration (8 µM) am stärksten davon betroffen waren.

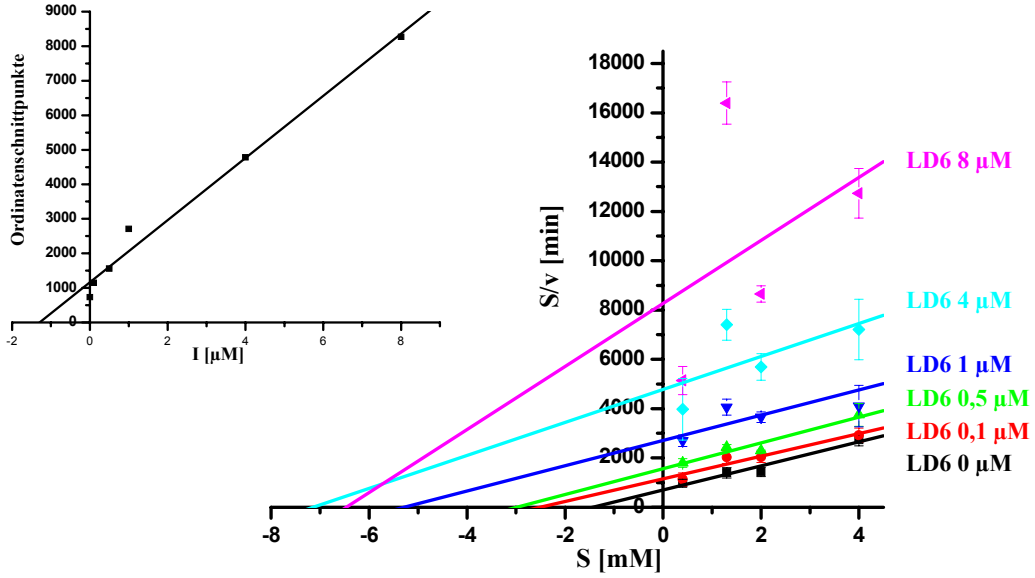


Abbildung 3-29. Hanses-Diagramm und Sekundärauftrag der hK11-Hemmung durch LD6. Der Quotient aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufgetragen. Die Werte stellen Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Meßwerten dar, die Geraden entsprechen der gewichteten linearen Regression. Der Sekundärauftrag (kleines Diagramm) diente der Ermittlung von Ki (Schnittpunkt mit der Abszissenschnittpunkt). Ki = 1,29 µM

Unter Annahme einer kompetitiven Hemmung ergibt sich aus dem Sekundärauftrag des Hanes-Diagramms (Ordinatenschnittpunkte gegen die Inhibitorkonzentration) ein Ki-Wert von 1,29 µM. Dieser unterscheidet sich deutlich von dem anhand des IC_{50}-Wertes nach Cheng und Prusoff berechneten Ki-Wertes von 0,63 µM. Daher wurde zur Bestimmung des Ki-Wertes zusätzlich ein Dixon-Diagramm herangezogen (Abb.: 3-30). Die reziproke hK11-Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Aus der Dixon-Auftrag kann der Ki-Wert als gemeinsamer Schnittpunkt der Geraden abgelesen werden.

Aufgrund der größen Divergenz der Werte bei der LD6-Konzentration von 8 µM, wurden diese im Dixon-Auftrag nicht berücksichtigt. Der erhaltene Ki-Wert von 0,67 µM entspricht in guter Annäherung dem zuvor berechneten Ki-Wert.

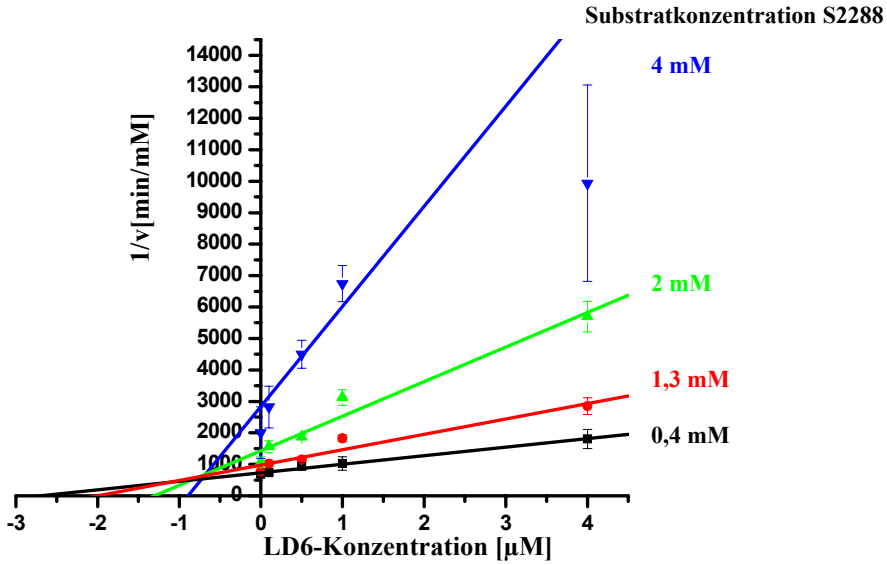


Abbildung 3-30. Dixon-Diagramm der hK11-Hemmung durch LD6. Aufgetragen wurde die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen gegen die Inhibitorkonzentration. Die Werte stellen Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Meßwerten dar, die Geraden entsprechen der linearen Regression (für S2288 4 µM gewichtete lineare Regression). Der negative Ki-Wert entspricht dem Schnittpunkt der Geraden. Ki = 0,67 µM

Aus dem Hanes-Auftrag ergeben sich die folgenden in Tabelle 3-6 dargestellten apparenten Werte für K_m und V_{max}:

Tabelle 3-6: Kinetische Parameter der hK11-Hemmung durch LD6. Die Werte wurden im Hanes-Diagramm ermittelt.

Inhibitorkonzentration [µM]	K_m [mM]	V_{max} [µM/min^{-1}]
0	1,58	2,1
0,1	2,50	2,2
0,5	2,98	1,9
1	5,28	2,0
4	7,14	1,5
8	6,46	0,08

Die kinetischen Parameter zeigten, dass bis zu einem molaren Verhältnis von 1:5 nur der K_m-Wert steigt während V_{max} unverändert bleibt, was typisch für eine kompetitive Hemmung ist. Bei hohen Inhibitorkonzentrationen, ab einen molaren Verhältnis von 1:20,

nimmt V_{max} deutlich ab, was wiederum auf eine gemischt nicht kompetitive Hemmung hindeutet. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass gerade bei diesen Inhibitorkonzentrationen die Schwankungen der Meßwerte am stärksten zum Tragen kommen.

3.4.2 Hemmung der hK7-Aktivität

Das für die Inhibitionstests verwendete hK7 wurde freundlicherweise von Ludgar Ständker (IPF Hannover) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um unglykosyliertes, rekombinantes Protein aus *E. coli*. Durch Nutzung der Vektors pRHOT7 wurde es periplasmatisch exprimiert und konnte in korrekter Faltung als aktives Enzym isoliert werden [Fernández *et al.*, 2008]. Neben der LEKTI-Domänen 6 wurde auch der Einfluss der zusammenhängenden LEKTI-Domänen 7 und 8 auf die hK7-Aktivität untersucht (Abb.: 3-31).

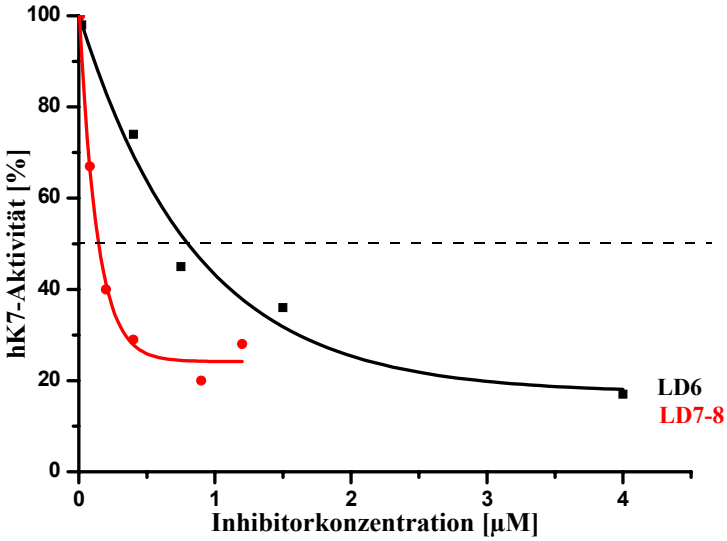


Abbildung 3-31. Inhibition der hK7-Aktivität durch die LEKTI-Domänen 6 sowie 7-8. Für die Messung wurden 100 nM hK7 und 2,3 mM Substrat S2586 im Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) bei 37°C inkubiert mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration im Plattenreader bei 405 nm bestimmt. $\Delta A/\Delta t$ ohne Inhibitor wurde als 100% definiert

Zur Bestimmung der Inhibitor-Konzentration, bei der 50% der hK7-Aktivität gehemmt werden (IC_{50}-Wert), wurden jeweils 100 nM Enzym mit konstanter Substratkonzentration (S2586) 2,3 mM und steigender Inhibitorkonzentrationen bei 37 °C inkubiert. Für LD6 wurde ein IC_{50}-Wert von 0,78 µM und für LD7-8 ein IC_{50}-Wert von 0,14 µM bestimmt (Abb.: 3-31). Unter Berücksichtigung des zuvor ermittelten K_m-Wertes von 0,8 mM (ermittelt im Hanses-Diagramm, nicht dargestellt) und der verwendeten Substratkonzentration wurden nach der Gleichung von Cheng und Prusoff [1973] die K_i-Werte berechnet.

Für LD6 ergibt sich ein K_i-Wert von 0,2 µM. Der K_i-Wert für LD7-8 war mit 0,04 µM fünfmal kleiner.
Zur besseren Charakterisierung der Inhibitoreigenschaften wurde die hK7-Hemmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt und im Hanes- sowie im Dixon-Auftrag dargestellt (Abb.: 3-32). Anhand des Hanes-Diagramms wird deutlich, dass beide LEKTI-Fragmente V_{max} beeinflussen, dies deutet auf eine nicht-kompetitive hK7-Inhibierung hin. Im Fall der LD6 blieb der K_m-Wert nahezu unverändert, was für einen Sonderfall, die reine nicht-kompetitive Hemmung spricht. Aus dem Dixon-Diagramm konnte für LD7-8 ein K_i-Wert von 0,18 µM bestimmt werden, der sich jedoch deutlich von dem zuvor berechnetet K_i-Wert von 0,04 µM unterscheidet. Für LD6 war die Bestimmung des K_i-Wertes anhand des Dixon-Diagramms nicht möglich.

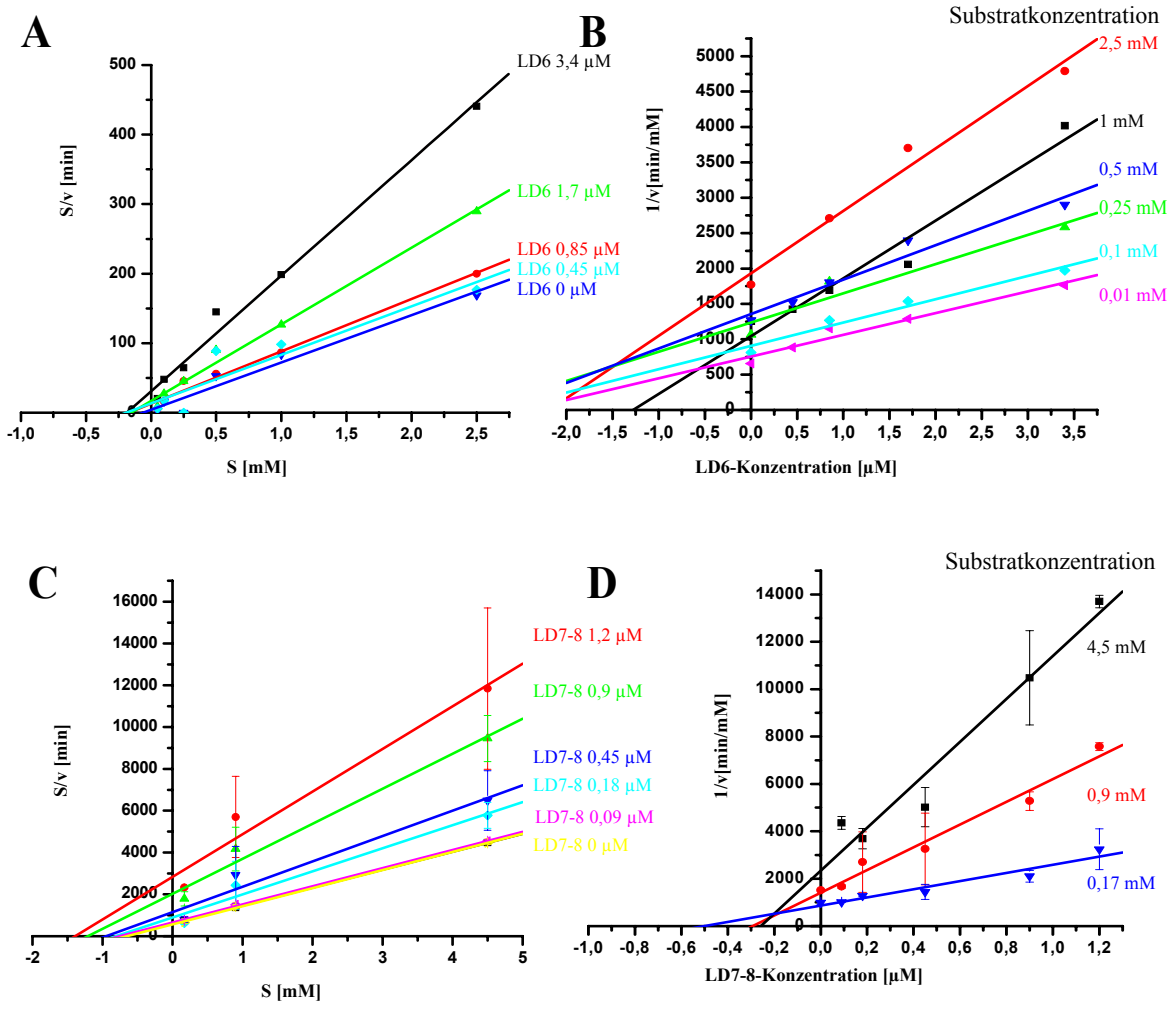


Abbildung 3-32. Hemmung der hK7-Aktivität durch LD6 (A und B) **und LD7-8** (C und D) dargestellt im Hanes-Diagramm (A und C) und Dixon-Diagramm (B und D). Die Geraden entsprechen der linearen Regression.

3.4.3 HEMMUNG WEITERER KALLIKREINE

Da die in *P. methanolica* exprimierten Kallikreine aufgrund mangelnder Reinigungsstrategien nicht als isolierte Proteine vorlagen, wurden für die Kallikreine 5 und 7 Hemmversuche mit dem *P. methanolica* Kulturüberstand durchgeführt. Die sich daraus ergebenen Aussagen sind jedoch nur ungenau und wurden in grober Einteilung in Tabelle 3-7 zusammengefaßt. Zusätzlich ist in Tabelle 3-7 das Inhibitionspotential der LEKTI-Domänen gegenüber Trypsin angegeben. Trotz der großen Sequenzhomologie der einzelnen Domänen, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Effektivität der Inhibition.

Tabelle 3-7: Zusammenfassung der Hemmung von hK5 und hK7 im *P.methanolica*-Kulturüberstand durch verschiedene LEKTI-Domänen. Ebenfalls ist die Trypsinhemmung angegeben. Die Hemmeigenschaften werden wie folgt kategorisiert: ++ starke Hemmung; + moderate Hemmung; ± schwache bis keine Hemmung. LD2-3 wurde von DUDDA-BÖHM [2007] in *P. methanolica* exprimiert und durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt.

	LD2-3	LD4	LD6	LD7-8	LD8-9	LD9	LD11	Konsensus
hK5	n.d.	n.d.	++	n.d.	n.d.	++	++	n.d.
hK7	±	++	+	++	+	±	+	±
Trypsin	n.d.	±	++	++	n.d.	+	±	+

4 DISKUSSION UND AUSBLICK

4.1 MOTIVATION

Die humanen Gewebekallikreine sind eine Gruppe von 15 sekretorischen Serinproteinasen, die in diversen Geweben exprimiert werden und dort multiple physiologische Funktionen übernehmen [YOUSEF *et al.*, 2005]. In der menschlichen Haut werden verschiedene Kallikreine exprimiert, welche im unteren Stratum granulosum, im Stratum corneum und in den Hautanhangsgebilden, wie den Epithelien der Haarfolikel und Schweißdrüsen, lokalisiert sind [KOMATSU *et al.*, 2003, 2005ab, 2006b]. In den letzten Jahren wurde die Wirkung der Kallikreine als promiskuitive Vermittler verschiedener Barrierefunktionen der Haut beschrieben, da diese in der Lage sind, verschiedene Substrate zu spalten die bei der Desquamation [SIMON *et al.*, 2001; CAUBET *et al.*, 2004], der antimikrobiellen Abwehr [YAMASAKI *et al.*, 2006] und der Lipidpermeabilität [HACHEM et al,. 2005] entscheidend sind. Aufgrund ihrer Rolle bei der Regulation dieser essentiellen Vorgänge unterliegen sie strengen Kontrollen auf DNA-, wie auch auf Proteinebene. Fehlregulationen der Kallikreinaktivität werden mit einer Reihe entzündlicher Hautkrankheiten wie atopischer Dermatitis und Psoriasis vulgaris in Zusammenhang gebracht [KOMATSU *et al.*, 2007a und 2007b]. Bis vor kurzem wurde die proteolytische Aktivität der Kallikreine in der Haut hauptsächlich auf hK5 und hK7 zurückgeführt. Die Regulation dieser beiden Enzyme durch endogene Inhibitoren wurde vielfach untersucht [FRANZKE *et al.*, 1996; EGELRUD *et al.*, 2000; Michael *et al.*, 2005; SCHECHTER *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2006]. Neben dem potenten hK7 Inhibitor SLPI steht dabei insbesondere der Multidomänen Serinproteinase-Inhibitor LEKTI im Fokus. Dieser 1999 in der Arbeitsgruppe von MÄGERT entdeckte Inhibitor ist insofern außergewöhnlich, da er über die hohe Anzahl von 15 potentiellen Hemmdomänen verfügt, die über 13 mögliche Prozessierungsstellen für Proproteinkonvertasen miteinander verbunden sind. Zwei der LEKTI-Domänen (LD2 und LD15) entsprechen dem Kazal-Typ, die anderen 13 Domänen weisen eine Disulfidbrücke weniger auf. Mutationen im LEKTI kodierenden Gen *SPINK5*, die zu einem unfunktionellen Protein führen, stehen im Zusammenhang mit der schweren erblichen Hautkrankheit Netherton Syndrom. Zu den Hauptsymptomen dieser Krankheit, die gemeinsame Charakteristika mit Psoriasis und atopischer Dermatitis aufweist, gehören eine unvollständige Verhornung der Haut sowie ständige Hautabschilferung [Übersicht bei MÄGERT *et al.*, 2002]. Die nachgewiesene erhöhte Trypsin-/Chymotrypsin-ähnliche Hydrolyseaktivität im Stratum corneum von Netherton Syndrom Patienten wird auf eine unzureichende Inhibierung der Kallikreine durch LEKTI zurückgeführt [KOMATSU *et al.*, 2002]. Die Arbeitsgruppe von EGELRUD [2005] konnte eine Inhibition der Kallikreine 5 und 7 durch die LEKTI-Domäne 6 zeigen. In weiteren Publikationen konnte auch für andere LEKTI-Fragmente eine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden, wobei die einzelnen

Fagmente sehr unterschiedliche Spezifitäten besitzen [SCHECHTER *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2006; DERAISON *et al.*, 2007]. In der Haut werden neben hK5 und hK7 auch eine Reihe weiterer Kallikreine exprimiert, deren physiologische Bedeutung jedoch doch nicht vollständig bekannt ist. KOMATSU und Mitarbeiter [2005ab, 2006b] stellten in Expressionanalysen fest, dass hK8 und hK11 die am stärksten im Stratum corneum exprimierten Trypsin-ähnlichen Kallikreine sind. Die gleiche Arbeitsgruppe hatte zuvor nachgewiesen, dass die *KLK11*-mRNA etwa in gleichem Umfang wie die *SPINK5*-mRNA, aber in fünffacher Menge wie die mRNA für *KLK5* und *KLK7* vorliegt [KOMATSU *et al.*, 2003]. Die starke epidermale Expression zusammen mit den bisherigen Erkenntnissen über die inhibitorischen Eigenschaften von LEKTI, legt hK11 als potentielle LEKTI-Zielproteinase nahe. Zudem sind sowohl hK11 als auch LEKTI hauptsächlich in epithelialen Geweben zu finden und sind unter anderem in der Prostata, der Speicheldrüse, dem Gehirn, dem Thymus, der Luftröhre und der Lunge koexprimiert, was einen möglichen regulatorischen Zusammenhang nicht nur auf die Haut beschränkt [MÄGERT *et al.*, 1999; YOUSEF *et al.*, 2000b, DIAMANDIS *et al.*, 2002]. Die hK11 Expression wurde bisher insbesondere im Zusammenhang mit ihrer Krankheitsrelevanz bei verschiedenen Krebsarten untersucht. Neben dem humanen Kallikrein 3 (PSA) wird auch hK11 als Biomarker für Prostata- und Brustkrebs in Betracht gezogen. In mehrere Studien konnte eine hK11 Überexpression in Zusammenhang mit den erwähnten Krebsarten gebracht werden [DIAMANDIS *et al.*, 2002; BORGONO *et al.*, 2003a; NAKAMURA *et al.*, 2003; SHIGEMASA *et al.*, 2004; STAVROPOULOU *et al.*, 2005; MCINTOSH *et al.*, 2007]. Im Serum von Patienten mit Prostata- und Ovariarkrebs wurde von DIAMANDIS und Mitarbeitern [2002] durch Größenausschluss chromatographie neben einer ca. 30 kDa großen Fraktion auch ein geringer Teil einer ca. 100 kDa großen Fraktion erhalten, in denen durch Immunodetektion hK11 nachgewiesen wurde. Das ca. 30 kDa große Protein entspricht der freien Form von hK11, während angenonnen wird, dass in der 100 kDa großen Fraktion hK11 komplexiert mit Serinproteinase-Inhibitoren vorliegt, wie es bereits für hK3 beschrieben wurde [CHRISTENSSON *et al.*,1990; STENMAN *et al.*, 1991].

Bei Inhibitionsstudien mit gängigen Serinproteinase-Inhibitoren, wie bspw. α1-Antitrypsin, Protein C Inhibitor, α2-Antiplasmin und C1-Inhibitor, konnte keine relevante Hemmung von hK 11 festgestellt werden [LUO *et al.*, 2006a]. Untersuchungen zur Inhibition durch den Serinproteinase-Inhibitor LEKTI sind bisher nicht bekannt, obwohl eine effektive und selektive Inhibition von verschiedenen Kallikreinen durch LEKTI-Domänen bereits mehrfach nachgewiesen wurde. Daher war das Ziel dieser Arbeit die inhibitorische Wirkung verschiedener LEKTI-Domänen auf die hK11 Aktivität zu untersuchen und die damit verbundenen kinetischen Parameter zu bestimmen. Für die Durchführung von Hemmversuchen war es notwendig, die erforderlichen Proteine in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung zu stellen. Zur Expression der rekombinanten Proteine standen verschiedene Expressionssysteme zur Verfügung. Bei der Entscheidung für ein bestimmtes System spielten neben Eigenschaften und Komplexität des zu exprimierenden Proteins die erwartete Expressionsrate, sowie die Verfügbarkeit bestimmter Technologien eine Rolle.

Die LEKTI-Domänen wurden in *E. coli* exprimiert, wobei die rekombinaten Proteine in nativer gelöster Form erhalten wurden. Kallikrein 11 wurde als reifes aktives Protein durch die Hefe *P. methanolica* exprimiert. Alternativ wurde die Pro-Form von hK11 neben *P.methanolica* auch in der Säugerzelllinie CHO exprimiert. Zusätzlich wurden zwei N-terminal verkürzte Varianten erzeugt, die Aussagen über damit verbundene Stabilitäts- und Aktivitätsänderungen erlauben. Die proteolytische Aktivität der rekombinant hergestellten hK11-Varianten wurden mittels Zymographie detektiert und durch Spaltung chromogener Peptidsubstrate näher charakterisiert.
Neben hK11 wurden auch die in der Haut vorkommenden Kallikreine 5, 7, 8 und 14 rekombinant durch *P. methanolica* erzeugt. Neuere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass hK14 als Teil der proteolytischen Aktivierungskaskade eine Schlüsselrolle im Prozess der Desquamation zukommt [BRATTSAND *et al.*, 2005; STEFANSSON *et al.*, 2006; EMAMI *et al.* 2007]. Zudem stellt hK14 von allen getesteten Kallikreinen den effektivsten PAR-2 Aktivator dar [STEFANSSON *et al.*, 2008]. Neben hK11 wird hK8 am stärksten im Stratum corneum exprimiert [KOMATSU *et al.*, 2005a, 2006b]. Die Bedeutung von hK5 und hK7 für die Physiologie der Haut wurde mehrfach aufgezeigt. Für diese Kallikreine wurden ebenfalls Inhibitionsversuche mit verschiedenen LEKTI-Fragmente von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt. Daher sind diese für den Vergleich sowie die kritische Betrachtung der eigenen Inhibitionsergebnisse gut geeignet.
Viele Arbeitsgruppen verwendeten für Hemmungtests relativ große LEKTI-Fragmente bestehend aus mehreren Domänen. In Hinblick auf eine pharmakologische Anwendung ist es jedoch von Vorteil die LEKTI-Domänen einzeln oder als möglichst kleine Fragmente zu betrachten. Das durch Inhibitionsuntersuchungen ermittelte LEKTI-Fragment mit dem größten Hemmpotential könnte dann als Leitstruktur zur Medikamentenentwicklung dienen. Ein vielversprechender Kandidat dafür ist LD6, da diese Domäne zum Einen fast exakt die Konsensussequenz von elf der 15 Domänen repräsentiert und zum Anderen bereits als natürliches Fragment *in vivo* nachgewiesen wurde [MÄGERT *et al.*, 1999]. Zudem wurde die Hemmung der Kallikreine 5 und 7 durch LD6 gezeigt [EGELRUD *et al.* 2005, DERAISON *et al.*, 2007]. In dieser Arbeit wurde LD6 vergleichend mit anderen Domänen zur Hemmung von hK11, hK5 und hK7 eingesetzt. Die Inhibition von hK11 durch LD6 wurde durch Bestimmung der kinetischen Parameter näher charakterisiert um dadurch eine besseres Verständnis der Regulation dieser bisher noch nicht ausreichend charakterisierten Proteinase zu erhalten.

4.2 HETEROLOGE EXPRESSION DER LEKTI-DOMÄNEN

Die Domänen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI wurden einzeln oder als Kombination aus zwei zusammenhängenden Domänen durch das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* rekombinant exprimiert. Als Ausgangsmaterial für die Synthese der LEKTI-Domänen diente cDNA aus der humanen Haut, die von der Firma Invitrogen bezogen wurde.

Durch geeignete Primer wurden die entsprechenden Amplifikate erzeugt und in den Expressionsvektor kloniert. Die codierenden cDNAs der LEKTI-Domäne 6 sowie der zusammenhängenden Domänen 7-8 wurden nach Restriktion und Reinigung mit dem Vektor pBAD/gIIIA ligiert, während die Domänen 4, 8, 8-9, 9 und 11 direkt in den TOPO-Vektor pBAD/Thio-TOPO kloniert wurden und anschließend *E. coli*-Zellen damit transformiert. Die Verwendung von *E. coli* als Expressionssystem bietet viele Vorteile, wie schnelles Wachstum, die Fähigkeit zur Fermentation und die hohe Syntheseleistung. Ein großer Nachteil bei der Produktion komplexer eukaryontischer Proteine in *E. coli* liegt vor allem in der mangelnden Fähigkeit, post-translationale Modifikationen, wie z. B. die Ausbildung von Disulfid-Brücken, Glykosylierungen und Phosphorylierungen durchzuführen [YIN *et al.*, 2007]. Ein generelles Problem bei der bakteriellen Expression besteht darin, dass die Fremdproteine zwar in großer Menge vorliegen, aber oftmals nicht in gelöster Form, sondern als Proteinaggregate in sogenannten „inclusion bodies". Dadurch ist eine Rückfaltung zum löslichen Protein notwendig, was häufig mit großen Ausbeuteverlusten sowie Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist. Durch die Wahl des Vektorsystems und der Expressionsparameter wurde versucht, die rekombinanten LEKTI-Domänen als native lösliche Proteine zu erhalten. Der Vektor pBAD/gIIIA verfügt über die Gen III Signalsequenz, die eine Sekretion der Fragmente in den periplasmatischen Raum bewirkt [BOEKE *et al.*, 1982]. Dieser besitzt einerseits im Gegensatz zum Zytoplasma ein oxidatives Milieu was die Ausbildung von Disulfid-Brücken begünstigt und andererseit bakterieller Chaperone mit deren Hilfe rekombinante Proteine korrekt gefaltet werden können.

Der Vektor pBAD/Thio-TOPO ermöglicht die Expression der LEKTI-Domänen als Fusionsproteine mit Thioredoxin, was die Löslichkeit der überexprimierten Proteine erhöht und die relativ kleinen LEKTI-Fagmente stabilisiert [YASUKAWA *et al.*, 1995]. Zusätzlich wurde die Bildung von inclusion bodies durch eine limitierte Induktion vermindert. Die Überexpression erfolgte bei niedriger Temperatur (25 °C), während die Zellernte nach 24 h erfolgte [SCHEIN und NOTEBORN, 1988]. Beide Vektoren besitzen einen durch Arabinose induzierbaren Promotor, wodurch die Menge der exprimierten Proteine reguliert werden kann [MIYADA *et al.*, 1984; Übersicht bei SCHLEIF, 1992]. Bei einer Endkonzentration von 0,02% w/v Arabinose zeigte sich die Expression aller LEKTI-Domänen unter den oben genannten Bedingungen erfolgreich. Die rekombinanten Proteine konnten nach dem mechanischen Aufschluss der Zellen in der flüssigen Fraktion nachgewiesen werden. Die Fusion der LEKTI-Domänen mit einem Hexa-Histidin-tag ermöglichte die einfache und effektive Isolierung der Proteine auf dem Zelllysat durch immobilisierte Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie. Die LEKTI-Domänen 7-8 ohne Hexahistidin-Fusionsanteil wurden, nach einem von HÄNEL [2009] ausgearbeiteten Protokoll, durch Kationenaustauschchromatographie isoliert. Die Funktionalität der LEKTI-Domänen wurde in Hemmversuchen mit Trypsin bestätigt. In mehreren Veröffentlichungen wird die signifikante Hemmung von Trypsin durch die einzelnen Domänen 3, 5, 6, 8 und 15 [MÄGERT *et al.*, 1999; 2002; VITZITHUM *et al.*, 2008], durch das

vollständige LEKTI-Vorläuferprotein [MITSUDO *et al.*, 2003], sowie Fragmente bestehend aus den Domänen 2-3, 6-9 [JAYAKUMAR *et al.*, 2004], 8-11 und 9-15 [DERAISON *et al.*, 2007] beschrieben.
Der für Domäne 6 erhaltene IC_{50}-Wert von 1,2 µM (bei 100 ng/ml Trypsin) liegt in der gleichen Größenordnung wie der von EGELRUND [2005] unter ähnlichen Bedingungen ermittelten IC_{50}-Wert von 3,3 µM (bei 25 ng/ml Trypsin). Ein negativer Einfluss des Fusionsanteils konnte durch vergleichende Trypsinhemmtest mit nativer und fusionierter Domäne 6 ausgeschlossen werden, da kein signifikanter Unterschied in der Hemmwirkung zu erkennen war.

4.3 HETEROLOGE EXPRESSION DER KALLIKREINE IN *PICHIA METHANOLICA*

Für die Expression der Kallikreine wurde als Wirtsorganismus die Hefe *Pichia methanolica* auf Grund ihrer Fähigkeit, Fremdproteine zu exprimieren, posttranslational zu prozessieren, zu modifizieren und in das umgebende Medium sekretieren zu können, ausgewählt. Die Species der *Pichia* gehören wie *Candida spp.*, *Hansenula spp*. und *Turolopsis spp*. auch zu den fakultativ methylotrophen Hefen [GELLISSEN, 2000]. Die Produktion rekombinanter Proteine in methylotrophen Hefen basiert weitgehend auf der Nutzung des AOX1-Promotors aus *Pichia pastoris*. Im Gegensatz dazu ist *Pichia methanolica* ein relativ neues Expressionssystem, dass weniger gut charakterisiert ist. RAYMOND und Mitarbeiter entwickelten 1998 das pCZR 139-Plasmid unter Nutzung des AUG1-Promotors zur heterologen Expression von humaner Glutamat-Decarboxylase in *P. methanolica*. Die Expressionsraten des Proteins in *P. pastoris* und *P. methanolica* waren gleichwertig, jedoch wies die in *P. methanolica* exprimierte und isolierte Glutamat-Decarboxylase die höhere Reinheit und enzymatische Aktivität auf. TSAI und HUANG [2008] berichteten allerdings von einer stärkeren Expression endogener Hefeproteine durch *P. methanolica* und wiesen ebenfalls auf ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster zu *P. pastoris* hin, welches sich wahrscheinlich positiv auf die thermo- und pH-Stabilität der rekombinanten Proteine auswirkt.
P. pastoris wurde von mehreren Arbeitsgruppen zur Expression von Kallikreinen verwendet [BORGONO *et al.*, 2003b; YOUSEF *et al.*, 2003; BRATTSAND *et al.*, 2005; OBIEZU *et al.*, 2005; MICHAEL *et al.*, 2005; OIKONOMOPOULOU *et al.*, 2006; BORGONO *et al.*, 2007b]. Die erhaltene Menge an rekombinanten Kallikreinen variierte zwischen 1,5 mg [MICHAEL *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2007b] und 15 mg [BRATTSAND *et al.*, 2005] pro Liter Hefekulturüberstand. Verglichen damit liegt die Ausbeute an rekombinanten Pro-hK11 3S/2AS aus *P. methanolica* mit ca. 2 mg/l im unteren Bereich.
Trotz Optimierung der Expressionsbedingungen war eine Erhöhung der hK11 Ausbeute nur bedingt möglich. Bei der Expression im Schüttelkolben erfolgte die Methanolzufuhr nicht kontinuierlich, der Sauerstoffgehalt konnte weder gemessen noch geregelt werden; dadurch

variierte die Zelldichte und die Versorgung mit Nährstoffen war unregelmäßig, was sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auswirkte. Es ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der Volumenaktivität zwischen den einzelnen Expressionen, die sich besonders stark bei hK7 äußerten. Eine Möglichkeit die heterologe Expression unter optimierten und standardisierten Bedingungen durchzuführen, bietet die Fermentation.
Für *Pichia methanolica* wurde eine geeignete Fermentationsstrategie von DUDDA-BÖHM [2007] entwickelt und für Pro-hK11 3S/2AS von EICHHORN [2009] durchgeführt. Unter Fermentationsbedingungen konnte die Ausbeute an rekombinanten Pro-hK11 signifikant auf 15 - 20 mg pro Liter gesteigert werden. Jedoch liegt die Ausbeute an rekombinanten Protein auch in diesen Fall im unteren Bereich. Speziell für die Fermentation von *P. methanolica* wurden von RAYMOND und Mitarbeitern [1999] Mengen an sekretorisch exprimierten Proteinen von 10 mg/l für den humanen Zytokin-Rezeptor und 500 mg/l für humanes Leptin beschrieben. Da die Fermentationsstrategien annähert gleich aufgebaut sind, könnte die Expressionsmenge bestimmter Proteine ähnlich wie bei *P. pastoris* von proteinspezifischen Eigenschaften [HELLWIG *et al.*, 2000] abhängig sein.

Die Detektion der in *P. methanolica* exprimierten Kallikreine erfolgte durch Standardmethoden wie SDS-PAGE mit anschließender Coomassie- oder Silberfärbung oder Western Blot und Immunodetektion. Zusätzlich wurde die proteolytische Aktivität der Kallikreine durch Casein-Zymographie nachgewiesen. Durch Kombination der Detektionsmöglichkeiten konnten nahezu alle Kallikreine als diskrete Proteinbanden nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von hK14 war die apparente molare Masse höher als die anhand der Aminosäuresequenz berechnete, weshalb von einer Glykosylierung dieser Kallikreine auszugehen ist. Pro-hK7 konnten nicht eindeutig Proteinbanden zugeordnet werden. Im Fall von hK5 und hK7 waren teilweise Proteinbanden mit geringem Molekulargewicht im SDS-PAA-Gels zu erkennen, wobei es sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte dieser Poteinasen handelt. Bei der Expression von hK14 in *P. pastoris* detektierte die Arbeitsgruppe von BORGONO [2007b] in SDS-PAA-Gel mehrere Proteinbanden, die auf Autodegradation der Proteinase zurückgeführt werden. Die Degradation der Kallikreine durch Autolyse oder durch Hefeproteinasen hatte einen entscheidenden Einfluss auf die erhaltene Volumenaktivität. Für die Stabilität der Kallikreine erwies sich eine Verkürzung der Induktionsdauer auf drei Tage als vorteilhaft. Durch die allgemein geringe Expressionsrate in Verbindung mit dem ungünstigen Verhältnis von endogenen Hefeproteinen und Kallikreinen, war die Etablierung effektiver chromatographischer Reinigungsverfahren nicht möglich. Deshalb wurde zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der Kallikreine ungereinigte Hefekulturüberstände verwendet. Als Maß der proteolytischen Aktivität diente dabei die Geschwindigkeit der Umsetzung von synthetischen chromogenen Peptidsubstraten bezogen auf das eingesetzte Volumen. Für alle in *P. methanolica* exprimierten Kallikreine konnte eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich zwischen den verschiedenen Kallikreinen signifikante Unterschiede. Die minimalen und maximalen

Volumenaktivitäten unterschieden sich um mehr als den Faktor 1000. Von allen in dieser Arbeit untersuchten Kallikreinen wies hK5 mit 0,2 pkat/ml die geringste Volumenaktivität auf. Dies beruht wahrscheinlich auf der geringen Spezifität gegenüber dem verwendeten Substrat S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA). Die Arbeitgruppe von BRATTSAND [2005] bestimmte für hK5 bei Verwendung des gleichen Substrates eine wesentlich geringer Spezifitätskonstante verglichen mit hK14. Von den Trypsin-ähnlichen Kallikreine zeigte hK8 mit 29 pkat/ml die größte Aktivität. Die Volumenaktivität von hK7 unterlag starken Schwankungen, die sich auch im Zymogramm und SDS-PAA-Gel äußerten. KISHI und Mitarbeiter [2004] konnten sowohl natives als auch rekombinantes hK7 aus Säugerzellen durch zwei Banden bei ca. 30 kDa im SDS-PAA-Gel nachweisen. Die Unterschiede im Molekulargewicht führten sie auf eine heterogene Glykosylierung zurück. Auch bei der heterologen Expression von hK7 in *P.methanolica* konnten teilweise Doppelbanden bei ca. 30 kDa detektiert werden, was mit einer hohen Aktivität bis ca. 300 pkat/ml einherging. War im SDS-PAA-Gel hingegen nur die obere der beiden Banden sichtbar, war die Aktivität deutlich reduziert. In etwa der Hälfte aller angesetzten Expressionen war für hK7 keine oder nur eine minimale Aktivität messbar. Im den korrespondierenden SDS-PAA-Gelen waren dann keine Banden im erwarteten Größenbereich erkennbar. In einigen Fällen waren jedoch mehrere Degradationsfragmente vorhanden.

hK11

Zu Beginn der Arbeit war die N-terminale Aminosäuresequenz des reifen hK11 noch nicht bekannt, weshalb drei Varianten erzeugt wurden.
Interessanterweise zeigten alle hK11-Varianten eine nahezu identische Volumenaktivität. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die N-terminalen Bereiche kaum Einfluss auf die Proteinaseaktivität, sowie auf die Stabilität des Enzyms haben. HK11 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 28362 Da und besitzt vier mögliche N-Glykosylierungsstellen. Für natives, aus Samenflüssigkeit isoliertes hK11 wurde in einer Publikation von DIAMANDIS [2002] ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa beschrieben während LOU und Mitarbeiter [2006b] ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa angeben. Dieser Massenunterschied könnte auf unterschiedlichen Glykosylierungsformen beruhen, aber auch eine Prozessierung des aktiven Enzyms durch Autolyse oder Spaltung durch andere Proteinasen wären denkbar. Es wird angenommen, dass die proteolytische Aktivität von hK11 hauptsächlich durch intramolekulare Spaltung reguliert wird. In Samenflüssigkeit liegt ca. die Hälfte des detektierten hK11 in gespaltener Form vor [LUO *et al.*, 2006a]. SANO und Mitarbeiter [2007] konnten zeigen, dass aktives hK11 sich effektiv selbst proteolytisch spaltet, was in einem starken Verlust der Aktivität resultiert. Ebenfalls wird eine weniger effektive Spaltung von hK11 durch Plasmin beschrieben [LUO *et al.*, 2006a]. Unter reduzierten Bedingungen wurde neben der 40 kDa großen hK11-Bande eine weitere bei 20 kDa detektiert. Möglicherweise aufgrund der geringen Ausbeute an rekombinantem hK11 konnten wir bei keiner Expression Banden bei 20 kDa finden.

Die Spaltung von hK11 erfolgt zwischen den Aminosäuren an Position 156 und 157 nach Arginin [LUO *et al.*, 2006a]. Die Regulierung ihrer Aktivität durch intramolekulare Spaltung ist ein Mechanismus, der für mehrere Kallikreine inklusive hK14 [BORGONO *et al.*, 2007b], hK13 [SOTIROPOULOU *et al.*, 2003] und hK6 [MAGKLARA *et al.*, 2003] nachgewiesen wurde. Für andere Kallikreine wie hK2 und hK3 wurde auch eine hK5-vermittelte Spaltung beschrieben [MICHAEL *et al.*, 2006]. Ausgehend von den durch Sequenzvergleiche erhaltenen Strukturen befinden sich die meisten Spaltstellen in einer exponierten Oberflächen-Schleife [LUO *et al.*, 2006a]. Weiterhin wurden für hK5 und hK7 verkürzte Formen in vitro und/oder in vivo gefunden [HANSSON *et al.*, 1994; BRATTSAND und EGELRUD, 1999].
Die verkürzten hK11 Varianten 5S/1AS und 6S/1AS beginnen nach Arginin, was eine Spaltung durch Trypsin-ähnliche Serinproteinasen erfordert. Zudem befindet sich der Anfangsbereich der Variante 5S/1AS nach einer exponierten Schleife. Beide Varianten enthalten alle Aminosäuren der katalytische Triade, was den Erhalt zumindest eines Teils der proteolytischen Aktivität nahelegt. Zusätzlich zum Verlust der proteolytischen Aktivität könnte die Spaltung an speziellen Positionen auch eine Änderung in der Spezifität hervorrufen, wie es bereits von Thrombin berichtet wurde [BRAUN *et al.*, 1988]. Da bei der Spaltung des Peptidsubstrates S2288 kein Unterschied in der Aktivität der verkürzten Varianten gegenüber der maturen Form festgestellt wurde, ist davon auszugegen, dass eine mögliche N-terminale Prozessierung weder die Aktivität noch die Spezifität von hK11 beeinflußt.

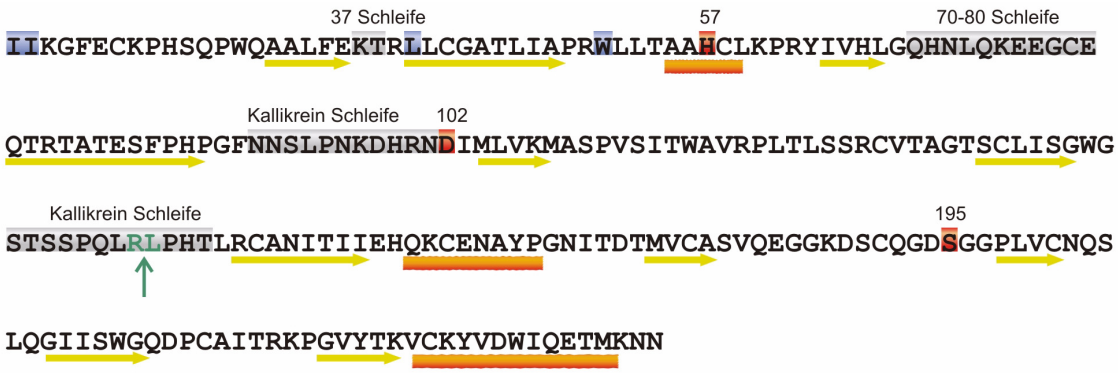


Abbildung 4-1. Primärstruktur mit topologischen Eigenschaften von aktivem hK11 nach DEBELA *et al.* [2006]. Wichtige Merkmale sind farbig gekennzeichnet: Die Anfangsaminosäuren der Kallikrein-Varianten blau, die Aminosäuren der katalytischen Triade rot und die Schleifen grau hinterlegt. Die gelben Pfeile stellen β-Faltblatt- und die orangen Rechtecke α-Helice-Strukturen dar. Zusätzlich ist in grün die interne Spaltstelle nach LUO [2006a] gekennzeichnet.

4.3.1 VERGLEICH DER EXPRESSION VON PRO-HK11 IN P.METHANOLICA UND CHO-ZELLEN

Die Pro-Form des humanen Kallikreins 11 wurde heterolog sowohl in der Hefe *Pichia methanolica* als auch in der Säugerzelllinie CHO überexprimiert. Das rekombinate hK11 wurde bei *P. methanolica* als Fusionsprotein mit Hexa-Histidin-tag bzw. bei CHO-Zellen als

natives Enzym in sezernierter Form erhalten. Die Ausbeute an gereinigtem hK11 war nahezu identisch. Bei beiden Systemen lag das Kallikrein zumindest teilweise als aktives Enzym ohne Pro-Peptid im Kulturmedium vor. Da hK11 nur bedingt in der Lage ist sich autokatalytisch zu aktivieren [SANO *et al.*, 2007], ist die Aktivierung sehr wahrscheinlich auf eine Prozessierung durch zelleigene Proteinasen zurückzuführen. Ob das dabei erhaltenen hK11 die korrekte Aminosäuresequenz der maturen Form am N-Terminus aufweist, muss noch mittels Edman-Abbau bestätigt werden. Durch Anpassung der Kultivierungsdauer konnte das durch CHO-Zellen sezernierte hK11 zum größten Teil als inaktive Pro-Form erhalten werden. Bei der *P. methanolica* Expression hatten die durchgeführten Änderungen der Kultivierungsbedingungen kaum einen Einfluss. Eine in dieser Arbeit nicht untersuchte Möglichkeit das Zielprotein in der Pro-Form zu stabilisieren besteht in der Zugabe von reversiblen Protease-Inhibitoren und/oder Casaminoacids, welches den im Kulturmedium vorhanden Proteinasen als zusätzliches Substrat dient.

Pro-hK11 kann durch Thermolysin in die aktive Form konvertiert werden. Die Thermolysinaktivierung von Kallikreinen, auch von hK11, wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben [NODA *et al.*, 1985; TAKADA *et al.*, 1985; LU S.H. *et al.* 1996; R&D Systems, 2006; SANO *et al.*, 2007, YOON *et al.*, 2007]. Das Verhältnis von Thermolysin zu hK11 wird mit 1:10 [R&D Systems, 2006] bis 1:40 [SANO *et al.*, 2007] angegeben. Da die hK11-Konzentration im Kulturüberstand nicht bekannt ist, ist eine standardisierte Aktivierung nicht möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass ein Überschuss an Thermolysin zur weiteren Prozessierung des aktiven hK11 führt, was auch einen Verlust von Aktivität bewirkt.

Für die Aktivitätsstudien wurde hK11 durch Chromatographie aus dem Kulturmedium isoliert, in bekannten Konzentration aktiviert und zur Bestimmung der enzymatischen Parameter eingesetzt. Zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität diente das chromogene Peptidsubstrat S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA). In Veröffentlichungen wird die Substratspezifität von hK11 von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers beschrieben. Untersuchungen von LUO [2006a] und MITSUI [2000] ergaben, dass hK11 Peptidsubstrate nach Arginin, nicht aber nach Lysin spaltet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Aussage. Auch konnte keine Spaltung eines Chymotrypsin-typischen Substrates beobachtet werden.

Die Gegenüberstellung von hK11 aus *P. methanolica* und CHO zeigt, dass beide Proteine einen annähert gleichen K_m-Wert haben. Jedoch weist hK11 aus *P. methanolica* eine niedrigere maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf. Die katalytische Effizienz, die durch den Quotient k_{cat}/K_m gekennzeichnet ist, ist für die Proteinase aus *P. methanolica* ebenfalls signifikant kleiner. Es gibt mehrer Ansatzpunkte um diese Aktivitätsunterschiede zu erklären.

Zum Einen kann sich die zu Mammalia unterschiedliche Glykosylierung nachteilig auswirken. Diese posttranslationalen Modifikationen beeinflussen die Struktur eines Proteins welche wiederum entscheidend für dessen biologische Aktivität ist [JENKINS *et al.*,

1994]. Zum Anderen kann auch der Fusionsanteil die Konformation des Zielproteins verändern [FITZPATRICK *et al.*, 2004]. Da das Verhältnis von aktiven und inaktiven hK11 nicht genau bestimmt werden kann, ist eine Degradation von aktiven hK11 durch Thermolysin mit resultierendem Aktivitätsverlust ebenfalls nicht auszuschließen. Weiterhin bleibt zu bedenken, dass für hK11 aus *P. methanolica* nur eine partielle Aufreinigung durch Ni^{2+}-Affinitätschromatographie gelang. Das SDS-PAA-Gel zeigte noch mehrere Proteine, deren Einfluss die bestimmte hK11-Konzentration in Richtung höher Konzentration verfälscht.
Es bleibt jedoch spekulativ, ob einer der genannten Punkte als Hauptursache für den Aktivitätsunterschied angesehen werden kann oder ob verschiedene Faktoren kumulativ wirken.
Für die anschließenden Versuche wurde ausschließlich hK11 aus CHO-Zellen verwendet.

4.4 HEMMUNG DER HK11 AKTIVITÄT

In dieser Arbeit wurde erstmals der Effekt von Domänen des Serinproteinase-Inhibitors LEKTI auf die Aktivität von humanem Kallikrein 11 untersucht. KOMATSU und Mitarbeiter [2008] konnten zeigen, dass eine signifikant erhöhte hK11 Expression bei Netherton-Syndrom Patienten mit einem verkürzten LEKTI-Fragment bis Domäne 5 einhergeht. Daher wurden die Domänen 6, 7-8, 8 und 9 zur Hemmung eingesetzt. Von den verwendeten Domänen erwies sich LD6 mit einem K_i-Wert von 0,63 µM als effektivster Inhibitor. Auch für LD9 konnte eine hK11 Hemmung festgestellt werden (K_i-Wert = 1,03µM), wohingegen LD8 und LD7-8 kaum ein Einfluss auf die hK11-Aktivität hatten.
Verglichen mit der Hemmung anderer Kallikreine durch LEKTI-Fragmente ist die beobachte Inhibition von hK11 sehr gering. Als Hauptzielproteinasen von LEKTI werden hK5 und hK14 angesehen [DERAISON *et al.*, 2007]. Bei Inhibitionstest mit LEKTI-Fragmenten, bestehend aus drei bis sechs zusammenhängenden Domänen, wurden in verschiedenen Veröffentlichungen Inhibitionskonstanten von unter 10 nM beschrieben [SCHECHTER *et al.*, 2005; BORGONO *et al.*, 2006; DERAISON *et al.*, 2007]. Auch für die einzelne Domäne 6 sind K_i-Werte von 83 nM für die hK5-Hemmung bzw. 296 nM für die hK7-Hemmung angegeben [DERAISON *et al.*, 2007]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass es sich auch bei hK11 um eine physiologische Targetproteinase von LEKTI handelt. Bisher wurde nur Protein C-Inhibitor, APMSF und Aprotinin als hK11-Inhibitoren beschrieben. Als effektivster Inhibitor wird der niedermolekulare synthetische Inhibitor APMSF genannt, welcher bei einer Konzentration von 2,5 µM die hK11-Aktivität komplett hemmt. Bei der gleichen Konzentration hemmt Aprotinin, einer der stärksten bekannten kompetitiv wirkenden Serinproteinaseinhibitoren, nur 30% bis 40% der Enzymaktivität [LUO *et al.*, 2006b]. Andere Serinproteinase-Inhibitoren aus der Gruppe der Serpine, wie Antithrombin, α1-Antichymotrypsin, α2-Antiplasmin und α1-Antitrypsin, zeigten bei einem molaren

Verhältnis von 1:10 keinen Einfluss auf die hK11-Aktivität [LUO *et al.*, 2006ab], wohingegen durch LD6 und LD9 bei diesem Verhältnis bereits über 50% der Enzymaktivität inhibiert werden.
Da alle bisherigen Veröffentlichungen das spezifische Inhibitionspotential einzelner LEKTI-Fragmente gegenüber den Mitgliedern der Kallikreinfamilie hervorheben, ist es sehr wahrscheinlich, dass durch weiterführende Versuche mit verschiedenen LEKTI-Domänen noch besser wirkende hK11-Inhibitoren identifiziert werden können. Zusätzlich muß noch erwähnt werden, dass die verwendeten Domänen 8 und 9 mit Thioredoxin fusioniert waren und somit ein störender Einfluss des Fusionsanteils nicht ausgeschlossen werden kann. Um die ermittelte Hemmung zu verifizieren, sollten die Versuche mit LD8 und LD9, nach Abspaltung des Fusionsanteils durch Enterokinase und erneuter Reinigung, wiederholt werden.

Durch Messung der hK11-Aktivität unter Variation der Inhibitor- und Substratkonzentration und anschließender graphischer Auswertung, wurde für die Domäne 6 der Hemmtyp bestimmt. Die meisten Serinproteinase-Inhibitoren reagieren nach dem Standardmechanismus. Dabei erfolgt die Inhibierung der Zielproteinase durch eine direkte Blockierung des aktiven Zentrums, indem der Inhibitor auf eine substratanaloge Weise bindet (kompetitive Hemmung) [HUBER und BODE, 1978]. Die Spezifität des Inhibitors wird dabei hauptsächlich durch die Aminosäure in der P1-Position bestimmt [LASKOWSKI und KATO, 1980]. Auch für die Hemmung von hK11 durch LD6 lässt sich auf Grund von Arginin in der P1-Position eine kompetitive Inhibition vermuten. Die durchgeführten Hemmkinetiken weisen jedoch auf eine gemischte nicht-kompetitive Hemmung hin. Dabei kann der Inhibitor sowohl an das freie Enzym wie auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden [LASCH, 1987]. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4-2 gezeigt.

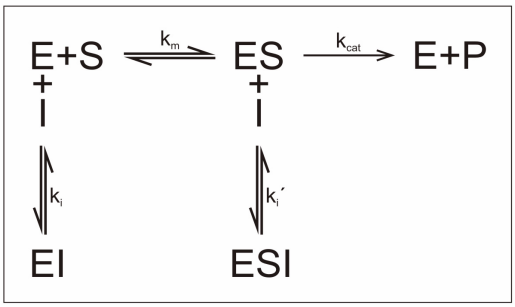


Abbildung 4-2. Reaktionsschema der nicht-kompetitive Hemmung. E-Enzym; S-Substrat; I-Inhibitor; P-Produkt

Streng genommen sind zwei Konstanten K_i und K_i' für diesen Inhibitionstyp relevant. K_i definiert die Bindung des Enzyms mit dem Inhibitor, während K_i' die Bildung des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes beschreibt. Nur wenn K_i und K_i' gleich groß sind, handelt es sich um eine reine nicht-kompetitive Hemmung und K_m bleibt unverändert [LASCH, 1987]. Da für den Vergleich mit Literaturdaten ausschließlich der K_i-Wert relevant ist, wurde der K_i'-Wert nicht berücksichtigt.

Bei Hemmtests von hK1, hK5, hK6, hK13 und hK14 mit verschiedenen LEKTI-Fragmenten wurde durch BORGONO und Mitarbeiter [2006] eine reine bzw. gemischte nicht-kompetitive Hemmung nachgewiesen. Auch das komplette LEKTI-Protein, bestehend aus 15 Hemmdomänen, wird als nicht-kompetitiver Inhibitor von Trypsin, Plasmin, Subtilisin A, Kathepsin G und humaner Neurophilen Elastase genannt [MITSU *et al.*, 2003]. Da es sich dabei jedoch um größere Fragmente aus mehreren Domänen handelt, wurde die nicht-kompetitive Hemmung darauf zurückgeführt, dass eine Domäne kompetitiv im aktiven Zentrum des Enzyms bindet, während andere Domänen allosterisch auf das Enzym wirken [JAYAKUMAR *et al.*, 2004]. Hingegen verhält sich die einzelne Domäne 15 gegeüber Trypsin und Plasmin als kompetitiver Inhibitor [VITZITHUM *et al.*, 2008]. Da es sich bei LD6 um eine einzelne Domäne handelt und diese bei Hemmtest mit niedrigen molaren Verhältnissen bis 1:5 das typische Verhalten deines kompetitiven Inhibitors zeigt (K_m steigt und V_{max} bleibt unverändert), ist es denkbar, dass ein und dieselbe Domäne sowohl mit dem aktiven Zentrum, als auch mit einer Bindungsstelle außerhalb des aktiven Zentrums interagieren kann. Bekannt ist bereits die bivalente Wechselwirkung von Hirudin und Thrombin, wobei Hirudin sowohl an das aktiven Zentrum des Enzyms, als auch an eine Substraterkennungsstelle außerhalb des aktiven Zentrums (Fibrin(ogen)bindungsstelle) bindet. Bei Hirudin aus Blutegel sind die C-terminalen Sequenzbereiche mit zahlreichen sauren Aminosäuren versehen, die zur Verankerung auf der Thrombinoberfläche dienen [GRÜTTER *et al.*, 1990; RYDEL *et al.*, 1991; STUBBS und BODE, 1995]. Einen Hinweis darauf, dass auch bei LEKTI die carboxyterminalen Bereiche einen Einfluss auf das Hemmverhalten haben könnten, liefert eine Studie von WALLEY und Mitarbeitern [2001]. Diese zeigte, dass bestimmte Polymorphismen im LEKTI-kodierenden Gen auch bei Patienten ohne Netherton Syndrom mit Atopie, Dermatitis und Asthma assoziiert sind. Ein solcher Polymorphismus führt am C-Terminus der LEKTI Domäne 6 zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Lysin.

Eine zweite Möglichkeit, diesen Hemmmechanismus zu erklären, besteht in der Möglichkeit, dass der Inhibitor in zwei alternativen Orientierungen an derselben Bindungsstelle des Enzyms bindet. KUZMIC und Mitarbeite [2006] konnten nachweisen, dass die Aminoglykoside Neomycin B und Neamin in zwei verschiedenen strukturellen Orientierungen an der gleichen Stelle der Metalloproteinase Anthrax-Lethalfaktor binden, was in kinetischen Untersuchungen als gemischte nicht-kompetitive Inhibition deutlich wird.

LD6 fehlt im Vergleich zu klassischen Kazal-Inhibitoren, wie bespielsweise LD15, die dritte Disulfidbrücke und der dritte Faltblattstrang, was in einer weniger starren Bindungsschleife sowie in einem instabilen Proteinrückrad resultiert [KREUZMANN et al., 2004]. Diese weniger rigide Struktur der Domäne 6 könnte das atypische Hemmverhalten ermöglichen [LAUBER *et al.*, 2003]. Genauere Erkenntnisse über die dem Inhibitionsmechanismus zugrundeliegenden Wechselwirkungen könnten durch kristallographische Untersuchungen des LD6/hK11-Komplexes erhalten werden.

4.5 HEMMUNG WEITERER KALLIKREINE

Neben Kallikrein 11 wurde auch die Hemmung von Kallikrein 7 durch die LEKTI-Domänen 6 und 7-8 näher untersucht. Das dafür verwendete hK7 wurde uns freundlicherweise von Ludger Ständker zur Verfügung gestellt und in einer Veröffentlichung von FERNÁNDEZ und Mitarbeitern [2008] näher beschrieben. Die von uns erhaltenen Hemmkonstanten stehen im Einklang mit den bereits 2007 von DERAISON und Mitarbeitern [2007] veröffentlichten Ergebnissen. Für LD6 wurde ein K_i-Wert von 0,2 µM ermittelt. Bei DERAISON ist ein K_i-Wert von ca. 0,3 µM angegeben. Ebenfalls konnten DERSAISON und Mitarbeiter eine wesentlich bessere Inhibition durch ein LEKTI-Fragment bestehend aus den Domänen 8-11 feststellen (K_i-Wert 34 nM). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Domänen 7-8 mit einem Ki-Wert von 40 nM als stärkerer Inhibitor gegenüber hK7 fungieren.
Wie die weiteren Untersuchungen der enzymkinetischen Eigenschaften ergab, verhalten sich beide LEKTI-Fragmente gegenüber hK7 als nicht-kompetitive Inhibitoren. Diese Ergebnisse festigen die Annahme von multiplen Kallikrein-LEKTI-Interaktionen. Da es sich bei hK7 um eine Chymotrypsin-ähnliche Proteinase handelt, ist anzunehmen, dass für die Regulierung der Proteinaseaktivität die Inhibierung durch LEKTI verglichen mit den Trypsin-ähnlichen Kallikreinen eine untergeordnete Rolle spielt. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass es bei den Untersuchungen von FERNÁNDEZ und Mitarbeitern [2008] nicht möglich war, stabile hK7/LD6 Komplexe zu isoliert.

4.6 LEKTI ALS POTENTIELLES THERAPEUTIKUM FÜR KALLIKREIN-ASSOZIIERTE HAUTERKRANKUNGEN

Verschiedene, zum Großteil entzündliche Hautkrankheiten gehen mit einer erhöhten Kallikreinkonzentration und/oder -aktivität einher. Dazu zählen atopische Dermatitis, Psoriasis und die Ichthyosen Netherton Syndrom und Peeling Skin Syndrom Typ B [KOMATSU *et al.*, 2002, 2005b, 2006ab, 2007ab]. Diese Hauterkrankungen sind vielfach nicht nur unangenehm, sondern können auch zu einer drastischen Einschränkung der physischen und psychischen Lebensqualität der Betroffenen führen. Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht über die Kallikreinaberrationen bei den erwähnten Krankhe

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Kallikreinaberrationen bei verschiedenen entzündlichen Hautkrankheiten. Untersucht wurden hK5, hK6, hK7, hK8, hK10, hK11, hK13 und hK14.

Hautkrankheit	hK-Konzentation	hK-Aktivität
atopische Dermatitis [KOMATSU *et al.*, 2007a]	signifikante Erhöhung der Trypsinähnlichen Kallikreine mit Ausnahme von hK11, stärkste Erhöhung von hK7	kein signifikanter Unterschied
Psoriasis [KOMATSU *et al.*, 2007b]	signifikante Erhöhung aller Kallikreine in Hautläsionen, hK6, hK10, hK13 sind auch in gesunder Haut erhöht	signifikante Erhöhung Trypsinähnlicher Aktivität, geringfügig erhöhte Chymotrypsinähnliche Aktivität
Netherton Syndrom [KOMATSU *et al.*, 2002]	individuell erhöhte Konzentration verschiedener Kallikreine	signifikante Erhöhung Trypsinähnlicher Aktivität, vereinzelt erhöhte Chymotrypsinähnliche Aktivität
Peeling Skin Syndrom Typ B [KOMATSU *et al.*, 2006a]	signifikante Erhöhung der Trypsin- und Chymotrypsinähnlichen Kallikreine, besonders deutlich bei hK6, hK8 und hK13	erhöhte oder normale Trypsinähnliche Aktivität, normale Chymotrypsinähnliche Aktivität

Während hK5 und hK7 in Bezug auf ihre physiologische Wirkung in der Haut schon seit längerer Zeit intensiv untersucht werden, sind in den letzten Jahren weitere Kallikreine wie hK8 und hK14 in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Die Bedeutung der Kallikreine 6, 10, 11 und 13 ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Die pathologisch erhöhte Konzentration und/oder Aktivität aller oder individuell verschiedener Kallikreine zeigt das große Potential dieser Proteinasen als Targets für die Entwicklung von therapeutischen Strategien gegen entzündliche Hauterkrankungen. Die Behandlung der erwähnten Krankheiten erfolgt symptomatisch nach den individuellen Krankheitszeichen. Neben Maßnahmen zur Hautrückfettung und zur Bekämpfung mikrobieller Superinfektionen werden größtenteils lokal wirksame Glukokorticoide auf Grund ihrer antiinflammatorischen, antiallergischen und immunsuppressiven Wirkung eingesetzt. Auch topische oder systemische Behandlungen mit Calcineurininhibitoren (Tacrolimus, Primecrolimu) als Immunmodulatoren oder dem Retinoid Acitretin, welches regulierend auf die Homöostase der Keratinozyten wirkt, stehen als therapeutische Möglichkeiten zur Verfügung [NIRK NETZWERK ICHTHYOSE, ALTMEYER und BACHARACH-BUHLES, 2010].

Mittlerweile gibt es auch eine Reihe konkreter Ansätze, die auf der spezifischen Hemmung der in der Haut lokalisierten Serinproteinasen durch Inhibitoren beruhen. Bereits 1963 wurde das pharmakologische Potential des Inhibitors Aprotinin (Handelsname Trasylol®, Bayer), der bereits zur Therapie der akuten Pankreatitis, sowie des septischen Schocks zum Einsatz

kommt, bei Dermatosen untersucht. Die Studie von KLASCHKA [1963] befasste sich überwiegend mit bullösen Erkrankungen, aber auch mit Erythrodermie, akuten Ekzemen und Dermatomyositis. Dabei wurden jedoch im Allgemeinen keine nachhaltigen Erfolge erzielt und der Hemmstoff in Bezug auf diese Erkrankungen als nicht hinreichend wirksam eingestuft. Der Inhibitor α1-Antitrypsin (AAT) stellt ein potentielles Therapeutikum zur Behandlung von atopischer Dermatitis und Psoriasis dar. Die topische Anwendung von aus Plasma gewonnenen AAT zeigte in vorklinische Untersuchungen vielversprechende Erfolge [BROWN, 2006]. Das Gel Dermolastin™ (Arriva/ProMetic, Inc.) welches rekombinantes AAT aus Hefen enthält, wurde zur Phase II der klinischen Erprobung bei Patienten mit atopischer Dermatitis eingesetzt, wobei jedoch keine statistisch signifikanten Therapieerfolge festgestellt werden konnten [PIHL-CAREY, 2004].
Die Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency, EMA) gibt α1-Antichymotrypsin unter dem Namen „rekombinanter Kallikrein-Inhibitor“als designiertes Therapeutikum des Netherton Syndroms an. Bisher befindet sich der Hemmstoff noch nicht auf der Stufe der klinischen Erprobung an Netherton Syndrom Patienten.

Insbesondere am Beispiel des Netherton Syndroms wird die zentrale Rolle von LEKTI als Regulator der Kallikreinaktivität deutlich. Ein durch Mutationen im Gen SPINK5 verursachter Mangel an LEKTI bewirkt eine unzureichende Inaktivierung von Kallikreinen. In Folge dessen kommt es zu einer vorzeitigen Desquamation und Entzündung der Epidermis [KOMATSU *et al.*, 2002; DESCARGUES *et al.*, 2006]. Eine schwere atopische Dermatitis ist klinisch kaum vom Netherton Syndrom zu unterscheiden. Beide Erkrankungen gehen mit stark erhöhten Serum IgE-Spiegeln und atopischer Diathese einher [TRAUPE, 1989; LEUNG und BIEBER, 2003]. Walley und Mitarbeiter [2001] beschreiben einen Zusammenhang von SPINK5-Polymorphismen mit Asthma und atopischer Dermatitis. Dieser wird allerdings von weiteren Autoren kontrovers diskutiert [JONGEPIER *et al.*, 2005]. Auf immunhistochemischer Ebene finden sich einige Gemeinsamkeiten der Psoriasis vulgaris mit dem Netherton Syndrom, so auch eine ebenfalls erniedrigte LEKTI Expression [OJI, 2005].

Die vorrangegangenen Ausführungen zeigen, dass der Multidomänen Serinproteinase-Inhibitor LEKTI einen interessanten Ansatzpunkt zur Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien, bei der Behandlung des Netherton-Syndroms und den Kallikrein-assoziierten entzündlichen Dermatosen bietet. Entscheidend für die Wirkung ist dabei eine möglichst spezifische Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Proteinase. Die Aufklärung der Kallikreinstrukturen, sowie das Verständnis der molekularen Enzym/Inhibitor-Interaktionen, ermöglichen die gezielte Konstruktion pharmokologisch wirksamer Kallikrein-Inhibitoren ausgehend von LEKTI-Domänen als Leitstruktur. Obwohl einzelne LEKTI-Fragmente auf die verschiedenen Kallikreine unterschiedlich stark wirken, lassen sich Tendenzen erkennen, dass einige Domänen/Fragmente alle untersuchten

Kallikreine besser hemmen als andere. So konnten DERAISON und Mitarbeiter [2007] zeigen, dass LD5, im Vergleich zu LD6, ein stärkerer Inhibitor gegenüber hK5, hK7 und hK14 ist. Strukturelle Untersuchungen von der Arbeitsgruppe von Laskoswski an Kazal Domänen Komplexen ergaben, dass zwölf Kontaktpositionen (P6, P5, P4, P3, P2, P1, P1´, P2´, P3´, P14´, P15´, P18´) für Interaktion von Kazal-Domänen und ihren Zielproteinasen verantwortlich sind [LU W. *et al.*, 1997; LU S.M. *et al.*, 2001]. Dass dies auch für einen atypischen Kazalinhibitor mit nur zwei Disulfidbrücken zutrifft, konnte in Untersuchungen von TIAN und KAMOUN [2005] bestätigt werden. Die Unterschiede im Inhibitionspotential der LEKTI-Fragmente lassen sich durch die Varianz dieser Aminosäuren erklären. Ausgehend von einer einzelnen LEKTI-Domäne wie z.B. LD5 kann die gezielte schrittweise Substitution der genannten Aminosäuren und die Durchführung von Hemmtests mit krankheitsrelevanten Kallikreinen zur Ermittlung eines optimal und möglichst pleiotroph wirkenden Inhibitors dieser Kallikreine führen.

ANHANG

CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die allgemein verwendeten Chemikalien und Materialen von den Firmen Biomol, Sigma, Serva oder Roth bezogen und in der Qualität pro Analysis (p.a.) eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen stammten, soweit nichts anderes angegeben ist, von der Firma Gibco Life Technologies. Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Nunc oder Roth bezogen.

Oligonukleotide (Primer)

Sämtliche für PCR-Reaktionen und DNA-Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen und MWG-Biotech bezogen.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5´-->3´	Verwendung
β-Tubulin-1S[2]	TTCCCTGGCCAGCTSAANGCNGACCTNCGCAAG	degenerierter Primer Überprüfung der cDNA
β-Tubulin-2AS[2]	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAAGGC	degenerierter Primer Überprüfung der cDNA
AUG1F-1S	CAATTTACATCTTTATTTATTAACG	pMETaA
AUG1R-3AS	CATAGAAGAGAAAAACATTAGTTGGC	pMETaA
KLK5MM-2S	ACCGATGCTCGAGAAGAGAATCATCAATGGATCCGACTGCGA	hK5
KLK5MM-3AS	TCGCGGAACTAGTTCAGGAGTTGGCCTGGATGGTTTCCTG	hK5
KLK7MM-1S	ACCGATGCTCGAGAAGAGAGAAGAAGCCCAGGGTGACAAGATTAT	Pro-hK7
KLK7MM-3S	ACCGATGCTCGAGAAGAGATGGGTGCTCACTGCCGCCCACTG	hK7
KLK7MM-4AS	CCACGTAGAATTCTTAGCGATGCTTTTTCATGGTGTCATTTATCC	Pro-hK7 und hK7
KLK8MMD-1S	TCCGGTTCTCGAGAAAAGAGTGCTGGGGGGTCATGAGTGCCAACC	hK8
KLK8MMD-2AS	AGCCGAGGAATTCTCAGCCCTTGCTGCCTATGATCTTCTTGATCCA	hK8
KLK11JD-1AS	TCGCGGAGAATTCCTAATTGTTCTTCATCGTCTCCTGGAT	hK11 4S/1AS; 5S/1AS; 6S/1AS
KLK11JD-2AS	TCGCGGAACTAGTCCATTGTTCTTCATCGTCTCCTGGATCC	hK11 3S/2AS; 4S/2AS; 5S/2AS; 6S/2AS
KLK11JD-3S	GATCGCACTCGAGAAAAGAGAGACCAGGATCATCAAGGGGTT	hK11 3S/2AS
KLK11JD-4S	GATCGCACTCGAGAAAAGAAGGATCATCAAGGGGTTCGAGTG	hK11 4S/1AS; 4S/2AS
KLK11JD-5S	GATCGCACTCGAGAAAAGACTACTCTGTGGGGCGACGCTCAT	hK11 4S/1AS; 4S/2AS
KLK11JD-6S	GATCGCACTCGAGAAAAGATGGCTCCTGACAGCAGCCCACTG	hK11 4S/1AS; 4S/2AS
KLK11-RT15S	CAAGACCCTCTACGAACATTCT	Überprüfung der cDNA
KLK11-RT16AS	ACCTTGATATATGGCCAGGAG	Überprüfung der cDNA

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5´-->3´	Verwendung
KLK14MMD-1S	TGGCTTTCTCGAGAAAAGAATAATTGGTGGCCATACGTGCACCCG	hK14
KLK14MMD-2AS	GGCTTTCTCGAGAAAAGAATAATTGGTGGCCATACGTGCACCCG	hK14
LD4-1S	GCTGAAAAGGATTTTTGCAAGGA	LD4
LD4-2AS	TCTTTTAACTTTAGTTTTTTCTTCAGC	LD4
LD6FM-1S	TTGCGATCCATGGAATCTGGAAAAGCAACCTCATATGC	LD6
LD6FM-3AS	ACCGAATCTAGACCGTTTCTTGATTCGCCTTCCTTCTTTTTCTTTTCTTC	LD6
LD6FM-4AS	ACCGAATCTAGATCAGTTTCTTGATTCGCCTTCCTTCTTTTTCTTTTCTTC	LD6 (nativ)
LEKTI6JL-1S	GAATCTGAAAAAGCAACCTCA	Konsensus
LEKTI6JL-2AS	GTTTCTTGATTCGCCTTCCTT	Konsensus
LEKTI6JLMM-5S	CAGGGCCCAGATGGGAAAATGCACGGCAACAAATGCTCCATGTGTGAG	Konsensus
LEKTI6JLMM-7AS	GACCTCACACATGGAGCATTTGTTGCCGTGCATTTTCCCATCTGGGCC	Konsensus
LD8-1S	GAAGCTGCAAAGGAAATCTGCAGTGA	LD8 und LD8-9
LD8-3AS	TCATCTCTTAACTTTTTCAGCCTCAAC	LD8
LEKTID9-1S	GAAGCAGTTCAGGAGCTGTGCAG	LD9
LEKTID9-2AS	GACTTTTGCTCTGGGTTCAGC	LD9 und LD8-9
LEKTID11-3S	GCTGCAGGACATGGTTCCAGTGG	LD11
LEKTID11-4AS	ATTTGATCTGGAGCGAGAATACTC	LD11
MALD7-3S	TGAAATTCCATGGGCCAATCTAAGAGTACAGCTTCCTTTGA	LD7-8
MALD8-7AS	GCAATGGTCTAGATCAAACTTTTTCAGCCTCAACTTTCCC	LD7-8
PBADF-1S	CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCC	pBAD/gIIIA
PBADR-3AS	GTTCTGATTTAATCTGTATCAGGC	pBAD/gIIIA
T7		
TRXF-2S	TTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTG	

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

Plasmidvektoren

Plasmid	Herkunft / Referenz
pBAD/Thio-TOPO	pBAD/Thio-TOPO Expression Kit / Invitrogen
pBAD/gIIIA	pBAD/gIIIA, B, and C / Invitrogen
pMETαA	P. methanolica Expression Kit / Invitrogen
pZeoSV2(+)	pZeoSV2(+) or pZeoSV2 (-) / Invitrogen

Biologisches Material

E. coli Stamm	Herkunft
XL2 blue	Stratagene
TOP10	Invitrogen
***P. methanolica* Stamm**	**Herkunft**
PMAD11	P. methanolica Expression Kit / Invitrogen
PMAD16	P. methanolica Expression Kit / Invitrogen
pMAD16/pMETαB/HSA	P. methanolica Expression Kit / Invitrogen
Zelllinien	**zur Verfügung gestellt von**
HaCaT	
CHO K1	Probiodrug AG, Halle

Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung - 100 mg/ml Ampicillin (Invitrogen) in dest. Wasser

Arabinose-Stammlösung - 20% in dest. Wasser

Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung
0,25% Coomassie-Brilliant-Blau (R250)
45 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbe-Lösung
64 % Ethanol (70 %)
10 % Essigsäure

DNA-Gelladepuffer 5x
10 mM Tris-HCl pH8
50% Glycerin
0,2% (w/v) Bromphenolblau
0,05% SDS

Elektrodenpuffer 50xTAE - vor der Benutzung wird der Puffer 1:50 mit dest. Wasser verdünnt
2 M Tris
1 M Essigsäure
100 mM EDTA
pH 8,0

Ethidiumbromid-Stammlösung - 10 mg/ml in dest. Wasser

Inkubationspuffer
150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl pH 8

Laemmli-Probenpuffer (2x)
20 mM Tris/HCl, pH 8,0
2 mM EDTA
20 % Glycerin
10 % Mercaptoethanol
2 % SDS
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Penicillin/Streptomycin - 100 U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin

Renaturierungspuffer
50 mM Tris-HCL pH 8
2,5% (v/v)Triton X-100

SDS-Polyacrylamidgel:

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

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

TBS-Puffer pH 9
100 mM Tris
100 mM NaCl
20 mM $MgCl_2$

Transferpuffer
150 mM Glycin
25 mM Tris
10% Methanol
0,02% SDS

Trypanblau-Lösung - 0,1% Trypanblau in PBS

Zeocin-Stammlösung (Invitrogen) - 100 mg/ml

Zymographie Probenpuffer
20 mM Tris-HCl pH 8,0
20% Glycerin
2 % SDS
0,01% (w/v) Bromphenolblau

Kulturmedien

LB-Platten - 40% (w/v) LB-Agar (Luria/Miller) bzw. 35% (w/v) LB-Agar (Lennox) in dest. Wasser

LB-Medium - 25% (w/v) LB-Medium (Luria/Miller) bzw. 20% (w/v) LB-Medium (Lennox) in dest. Wasser

Medium A
LB-Medium (Luria/Miller)
10 mM Magnesiumchlorid
0,2% Glukose

Medium B
LB-Medium (Luria/Miller)
12 mM Magnesiumchlorid
36% Glycerin
12% Polyetylenglykol PEG 8000

MD/MM-Platten
2% Glukose/0,05% Methanol
1,5% Agar-Agar
1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base mit (NH4)2SO4 ohne AS) (Becton-Dickons)
40 ppm Biotin

YPAD-Medium
2% Glukose
2% Pepton (Merck)
1% Hefe-Extrakt
0,01% Adenin (Serva)

BMDY/BMMY-Medium
0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6
2% Glukose/0,05% Methanol
2% Pepton (Merck)
1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base mit (NH4)2SO4 ohne AS) (Becton-Dickons)
1% Hefe-Extrakt
40 ppm Biotin

Komplettmedium für CHO-Zellen
HAM´s F12 Nutrient Mixture (Genaxxon)
10% BS (Bovines Serum)
1% Penicillin/Streptomycin bzw. 250 µg/ml Zeocin (Invitrogen)

Komplettmedium für CHO-Zellen
Dulbecco´s Mod Eagle Medium (DMEM)
10% BS (Bovines Serum)
1% Penicillin/Streptomycin

Sonstiges
dNTP-Mix (Invitrogen)

bidest. Wasser (Promega)
RNAse-freies Wasser (Roth)

Bezugsquellen:
Ambion (Austin, USA); Applied Biosystems (Foster City, USA); Beckmann-Coulter (Krefeld); Becton-Dickons (Sparks, USA); Biometra (Göttingen); Biomol (Hamburg); Biostep GmbH (Jahnsdorf); BioTek; Biozym (Oldenburg); Boehringer/Roche; Brand (Wertheim); Brandelin (Berlin); Chromogenix (Mailand, Italien); Dr Lange (Düsseldorf); EquiBio (Massachusetts, USA); Fermentas Life Science (St. Leon Rot); Fluka (Steinheim); GE-Haelthcare (München); Genaxxon (Ulm); Gibco Life Technologies (Karlsruhe); IKA (Staufen); Invitrogen (Karlsruhe); LO Laboroptik (Friedrichsdorf); Macherey-Nagel (Düren); Memmert (Schwabach); Merck (Darmstadt); Millipore Corporation (Bedford, USA); Molecular Probes; MWG (München); NEBioLabs (Franfurt Main); Nunc (Roskilke, Dänemark); Peqlab (Erlangen); Promega (Mannheim); Qiagen (Hilden); Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg); Tecan (Crailsheim); Thermo Fisher Scientific (Wilmington,USA); YSI Incorporated (Yellow Springs, USA)

LITERATURVERZEICHNIS

Altmeyer P., Bacharach-Buhles (Hrsg), 2010, Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Amaral A., Opal S.M., Vincent I.L., 2004, Coagulation in sepsis, Intensive Care Med, 6, 1032-1040

Asakai R, Davie E.W., Chung D.W., 1987, Organization of the gene for human Factor X, Biochemistry, 26, 7221–7228

Beato M., 1989, Gene regulation by steroid hormones, Cell, 56, 335–344

Bernard D., Mehul B., Thomas-Collignon A., Simonetti L., Remy V., Bernard M.A., Schmidt R., 2003, Analysis of proteins with caseinolytic activity in human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cystein protease ans identified the so-called „stratum corneum thiol protease“ as cathepsin L2, Invest Dermatol, 120, 592-600

Bhoola K.D., Figueroa C.D., Worthy K., 1992, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases, Pharmacol Rev, 44, 1–80

Bitoun E., Chavanas S., Irvine A.D., Lonie L., Bodemer C., Paradisi M, Hamel-Teillac D., Ansai S., Mitsuhashi Y., Taieb A., de Prost Y., Zambruno G., Harper J.I., Hovnanian A., 2001, Netherton syndrome: Disease expression and spectrum of *SPINK5* Mutations in 21 Families, J Invest Dermatol, 118, 352-361

Bitoun E., Micheloni A., Lamant L., Bonnart C., Tartaglia-Polcini A., Cobbold C., Saati T.A., Mariotti F., Mazereeuw-Hautier J., Boralevi F., Hohl D., Harper J., Bodemer C., D'Alessio M., Hovnanian A., 2003, LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome, Hum Mol Genet, 12, 2417-2430

Boeke J.D., Model P., 1982, A prokaryotic membrane anchor sequence: Carboxyl terminus of bacteriophage fl gene III protein retains it in the membrane, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 79, 5200-5204

Bonifati C, Ameglio F, 1999, Cytokines in psoriasis, Int J Dermatol, 38, 241-251

Borg T.K., 2004. It's the matrix! ECM, proteases, and cancer, Am J Pathol, 164, 1141–1142

Borgono C.A., Fracchioli S., Yousef G.M., Rigault de la Longrais I.A., Luo L.Y., Soosaipillai A., Puopolo M., Grass L., Scorilas A., Diamandis E.P., Katsaros D., 2003, Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma, Int J Cancer, 106, 605-610.

Borgono C.A., Grass L., Soosaipillai A., Yousef G.M., Petraki C.D., Howarth D.H., Fracchioli S., Katsaros D., Diamandis E.P., 2003b, Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer, Cancer Res, 63, 9032–9041

Borgono C.A., Diamandis E.P,. 2004, The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer, Nat Rev Cancer, 4, 876–890.

Borgono C.A., Micheal I.P., Kumatsu N., Jayakumar A., Kapadia R., Clayman G.L., Sotiropoulou G., Diamandis E.P., 2006, A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation, J. Biol. Chem. 282, 3640-3652

Borgono C.A., Michael I.P., Komatsu N., Jayakumar A., Kapadia R., Clayman G.L., Sotiropoulou G., Diamandis E.P., 2007a, A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation, J Biol Chem, 282, 3640–3652

Borgono C.A., Michael I.P., Shaw J.L., Luo L.Y., Ghosh M.C., Soosaipillai A., Grass L., Katsaros D., Diamandis E.P., 2007b, Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14, J Biol Chem, 282, 2405-2422

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusening N.E., 1988, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, J Cell Biol, 106, 761-771

Bradford M.M., 196, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt Biochem, 72, 248-254

Brattsand M., Egelrud T., 1999, Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation, J Biol Chem, 274, 30033-30040

Brattsand M., Stefansson K., Lundh C., Haasum Y., Egelrud T., 2005, A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum, J Invest Dermatol, 124, 198-20

Brattsand M, Stefansson K, Hubiche T, Nilsson SK, Egelrud T., 2009, *SPINK9:* A Selective, Skin-specific Kazal Type Serine Protease Inhibitor, J Investig Dermatol, 129, 1656-1665

Braun P.J., Hofsteenge J., Chang J.Y., Stone S.R., 1988, Preparation and characterization of proteolyzed forms of alpha-thrombin, Thromb Res, 50, 273–283

Brown W.M., 2006, rAAt (dermatological) Arriva/ProMetic, Curr Opin Mol Ther, 8, 69-75

Cassidy A.J., van Steensel M.A., Steijlen D.M., van Geel M., van der Velten J., Morley S.M., Terrinoni A., Melino G., Cand E., McLeab W.H., 2005, A homozygons missense mutation in TGM5 abolshes epidermal transglutaminas 5 activity and causes acral PSS, Am J Hum Genet, 77, 909-917

Chapman S.J., Walsh A., Jackson S.M., Friedmann P.S., 1991, Lipids, proteins and corneocyte adhesion, Arch Dermatol Res 283, 167–173

Caubet C., Jonca N., Brattsand M., Guerrin M., Bernard D., Schmidt R., Egelrud T., Simon M., Serre G., 2004, Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7, J Invest Dermatol, *122*, 1235–1244

Chavanas S., Bodemer C., Rochat A., Hamel-Teillac D., Ali M., Irvine A.D., Bonafe J.L., Wilkinson J., Taieb A., Barrandon Y., et al, 2000, Mutations in *SPINK5*, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome, Nat Genet, 25, 141–142

Chen V.C., Cha, L., Chao J., 2000,. Roles of the P1, P2, and P3 residues in determining inhibitory specificity of kallistatin toward human tissue kallikrein, J Biol Chem, 275, 38457–38466.

Cheng Y., Prusoff W.H., 1973, Relationship between the inhibition constant (Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaktion. Biochem Pharmacol, 22, 3099-3108

Christensson A., Laurell C.B., Lilja H, 1990, Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reaction with extracellular serine proteinase inhibitors, Eur J Biochem, 194, 755–763

Clements J., Willemsen N., Myers S., Dong Y., 2004, The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers, Crit Rev Clin Lab Sci, 41, 265-312

Cleutjens K.B.J.M., van Eekelen C.C.E.M., van der Korput H.A.G.M., Brinkman A.O., Trapman J., 1996, Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostatespecific antigen promoter, J Biol Chem, 271, 6379–6388

Cork M.J., Danby S., Vasilopoulos Y., Moustafa M., MacGowan A., Varghese J., Duff G.W., Tazi-Ahnini R., Ward S.J., 2008, Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis, In: Reitamo S., Luger T.A., Steinhoff M. (Hrsg.), Textbook of Atopic Dermatitis, informa healthcare, 35-58

Debela M., Magdolen V., Schechter N., Valachova M., Lottspeich F., Craik C.S., Choe Y., Bode W., Goettig P., 2006, Specificity profiling of seven human tissue kallikreins reveals individual subsite preferences, J Biol Chem, 281, 25678-25688

Debela M., Goettig P., Magdolen V., Huber R., Schechter N., Bode W., 2007, Structural basis of the zinc inhibition of human tissue kallikrein 5, J Mol Biol, 373, 1017-1031

Deraison C., Bonnart C., Lopez F., Besson C., Robinson R., Jayakumar A., Wagberg F., Brattsand M., Hachem J.P., Leonardsson G., Hovnanian A., 2007, LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction, Mol. Biol. Cell, 18, 3607-3619

Derian C.K., Eckardt A.J., Andrade-Gordon P., 1997, Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors, Cell Growth Differ, 8, 743–749

Descargues P., Deraison .C, Bonnart C., Kreft M., Kishibe M., Ishida-Yamamoto A, Elias P., Barrandon Y., Zambruno G., Sonnenberg A., Hovnanian A., 2005, Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity, Nat Genet, 37, 56-65

Descargues P., Deraison C., Prost C., Fraita, S., Mazereeuw-Hautier J., D'Alessio M., Ishida-Yamamoto A., Bodemer C., Zambruno, G., Hovnanian A., 2006, Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome, J Invest Dermatol, 126, 1622–1632

Diamandis E.P., Okui A., Mitsui S., 2002, Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma, Cancer Res, 62, 295-300

Dixon M., 1953, The determination of enzyme inhibitor constants, Biochem J, 55, 170-171

Dudda-Böhm A., 2007, Untersuchungen zur Fermentation der methylothrophen Hefe Pichia methanolica zur rekombinanten Herstellung der LEKTI-Domänen 2/3, Diplomarbeit, Hochschule Anhalt (FH), Köthen

Eckert R.L., 1989, Structure, function, and Differentiation of the Keratinocyte, Physiol. Rev., 69, 1316-1361

Egelrud T., 2000, Desquamation in the stratum corneum, Acta Derm Venereol Suppl, 208, 44-45.

Egelrud T., Brattsand M., Kreuzmann P., Walden M., Vitzithum K., Marx U.C., Forsmann W.G., Mägert H.J., 2005, hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6, Br. J. Dermatol., 153, 1200-1203

Eichhorn I, 2009, Fermentation der methylothrophen Hefe Pichia methanolica zur rekombinanten Herstellung von humanem Kallikrein 11, Projektarbeit, Hochschule Anhalt (FH), Köthen

Eisenberg S., Hale K., Heimdal .P, Thompson R., 1990, Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor, J Biol Chem, 265, 7976-7981

Eissa A., Diamandis E.P., 2008, Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier function, Biol. Chem., 389, 669-680

Eissa A., Diamandis E.P., 2009, Kallikrein-related peptidases: An emerging family of pivotol players in epidermal desquamation and barrier function, In: A. V. Rawlings, J. J. Leyden (Hrsg.) Skin Moisturization, 2. Edition, Informa Healthcare USA, Inc.,125-148

Ekholm I., Brattsand M., Egelrud T., 2000, Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process?, J Invest Dermatol, 114, 56-63.

Elias P.M., 2005, Stratum corneum defensive functions: An integrated view, J Invest Dematol, 125, 183-200

Emami N., Diamandis E.P., 2007, Human Kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade, , Molecular Oncology 1, 269-287

Emami N., Diamandis E.P., 2008, New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family, J Biol Cem, 283, 3031-3041

Espana F., Fink E., Sanchez-Cuenca J., Gilabert J., Estelles A., Witzgall, K., 1995, Complexes of tissue kallikrein with protein C inhibitor in human semen and urine, Eur J Biochem, 234, 641–649.

European Medicines Agency, EMA, http://www. ema.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/74466009en.pdf

Fartasch M., Bassukas I.D., Diepgen T.L., 1993, Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: An ultrastructural study, Br J Dermatol, 128, 1–9

Fernández I.S., Ständker L., Mägert H.J., Forssmann F.G., Giménez-Gallego G., Romero A., 2008, Crystal Structure of Human Epidermal Kallikrein 7 (hK7) Synthesized Directly in its Native State in E. coli: Insights into the Atomic Basis of its Inhibition by LEKTI Domain 6 (LD6), J Mol Bio, 377, 1488–1497

Fitzpatrick T:B., Auweter S., Kitzing K., Clausen T., Amrhein N., Macheroux P., 2004, Structural and functional impairment of an Old Yellow Enzyme homologue upon affinity tag incorporation, Protein Exp Prurif, 36, 280-291

Franzke C.W., Baici A., Bartels J., Christophers E., Wiedow O., 1996, Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation, J Biol Chem, 271, 21886–21890

Franzke C.W., Baici A., Christophers E., Wiedow O., 1997, Epidermal serine protease inhibitors regulate human corneocyte cell shedding, In: Hoosu-Hava V.K., Järvinen M., Kirschke H. (Hrsg.), Proteolysis in Cell Functions, IOS Press, 438-446

Fritsch P.O., 2003, Aufbau und Funktion der Haut, In: Fritsch P.O. (Hrsg.), Dermatologie Venerologie, 2., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3-42

Gellissen G., 2000, Heterologous protein production in methylotrophic yeasts, Applied Microb Biotechn, 54, 741-750

Ghosh M.C., Grass L., Soosaipillai A., Sotiropoulou G., Diamandis E.P., 2004, Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may enhance the metastatic potential of tumour cells, Tumour Biol, 25, 193–199

Green K.J., Simpson C.L., 2007, Desmosomes: New Perspectives on a Classic, J Invest Dermatol, 127, 2499-2515

Grinna L.S., Tschopp J F., 1989, Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, Pichia pastoris, Yeast, 5, 107-115

Grütter M.G., Priestle J.P., Rahuel J., Grossenbacher H., Bode W., Hofsteenge J., Stone S.R., 1990, Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition, EMBO J, 9, 2361-2365

Hachem J.P., Man M.Q., Crumrine D., Uchida Y., Brown B.E., Rogiers V., Roseeuw D., Feingold K.R., Elias P.M., 2005, Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity, J Invest Dermatol, 125, 510–520

Hachem J.P., Houben E., Crumrine D., Man M.Q., Schurer N., Roelandt T., Choi E.H., Uchida Y., Brown B.E., Feingold K.R., Elias P.M., 2006, Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis, J Invest Dermatol, 126, 2074-2086

Haftek M., Simon M., Serre G., 2006, Corneodesmosomes: Pivotal actors in the stratum corneum cohesion and desquamation, In: Elias P.M., Feingold K.R. (Hrsg.), Skin Barrier, Taylor & Francis Grou, LLC, 171-190

Hamanaka S., Ujihara M., Serizawa S., Nakazawa S., Otsuka F., 1997, A case of recessive X-linked ichthyosis: scale-specific abnormalities of lipid composition may explain the pathogenesis of the skin manifestation, J Dermatol, 24, 156-160

Hänel N., 2009, Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung der Domänen 7 und 8 des krankheitsrelevanten humanen Serinproteinase-Inhibitors LEKTI, Bachelorarbeit, Hochschule Anhalt (FH), Köthen

Hanes C.S., 1932, Studies on Plant Amylases, the effect of starch concentrations upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, Biochem J, 26, 1406-1421

Hansson L., Stromqvist M., Backman A., Wallbrandt P., Carlstein A., Egelrud T., 1994, Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase, J Biol Chem, 269, 19420–19426

Hansson L, Bäckman A., Ny A., Edlund M., Ekholm E., Ekstrand Hammarström B., Tornell J., Wallbrandt P., Wennbo H., Egelrud T., 2002, Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis, J Invest Dermatol, 118, 444-449

Hedstrom L., 2002, Serine protease mechanism and specificity, Chem Rev, 102, 4501-4524.

Hellwig S.T., Emde F., Raven N.G., Henke M., Van Der Logh P., Fischer R., 2001. Analysis of single-chain antibody production in Pichia pastoris using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. Biotechnology and Bioengineering, 74, 344–352

Heussen C., Dowdle E.B., 1980, Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates, Anal Biochem, 102, 196-202

Hiemstra P.S., Maassen R.J., Stolk J., Heinzel-Wieland R., Steffens G.J., Dilkman J.H., 1996, Antibacterial activity of antileukoprotease, Infect Immun, 64, 4520-4524

Höger P.H. (Hrsg), 2007, Kinderdermatologie, Differentialdiagnostik und Therapie bei Kindern und Jugendlichen, 2. Auflage, Schattauer GmbH, Stuttgart

Hoosu-Hava V.K., M. Järvinen, H. Kirschke (Hrsg.), 1997, Proteolysis in Cell Functions, IOS Press

Horikoshi T. Arany I. Rajaraman S., Chen S.H., Brysk H., Lei G., Trying S.K., Brysk M.M., 1998, Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation, Biochimie, 80, 605-612

Huber R., Bode W.,1978, Structural basis of the activation and action of trypsin, Acc Chem Res, 11, 114-122

Ishida-Yamamoto A., Deraison C., Bonnart C., Bitoun E., Robinson R., O´Brain T.J., Wakamatsu K., Ohtsubo S., Takahashi H., Hashimoto Y., Dopping-Hepenstal P.J., McGrath J.A., Iizuka H., Richard G., Hovnanian A., 2005, LEKTI is localized in lamellar grandules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extrazellular space of the superficial stratum granulosum, J Invest Dermatol, 124, 360-366

Jayakumar A., Kang Y., Mitsudo K., Henderson Y., Frederick M. J., Wang M., El-Naggar A.K., Marx U. C., Briggs K., Clayman G. L., 2004, Expression of LEKTI domains 6-9' in the baculovirus expression system: recombinant LEKTI domains 6-9' inhibit trypsin and subtilisin, A Protein Expr Purif, 35, 93-101

Jenkins N., Curling E.M., 1994, Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects, Enzyme Microb. Technol., 16, 354-364

Johansson C., Sandström M., Bartosik .J, Särnhult T., Christiansen .J, Zargari A., 2003, Atopy patch test reactions to Malassezia allergens differentiate subgroups of atopic dermatitis patients, Br J Dermatol, 148, 479-488

Jonco N., Caubet C., Guerrin M., Simon M., Serre G., 2009, Corneodesmosomal Proteins, In: A. V. Rawlings, J. J. Leyden (Hrsg.), Skin Moisturization, 2. Edition, Informa Healthcare USA, Inc., 99-124

Jongepier H., Koppleman G.H., Nolte I.M., Bruinenberg M., Bleecker E.R., Meyer D.A., te Meerman G.J., Postma D.S., 2005, Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma in a Dutch population, Allergy Clin Immunol, 115, 486-492

Kao F.T., Puck T.T., 1968, Genetics of somatic mammalian cells, VII. introduction and isolation of nutritional mutants in chinese haster cells, Proc Natl Acad Sci, 60, 1275-1281

Kapadia C., Ghosh M.C., Grass L., Diamandis E.P., 2004, Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation, Biochem Biophys Res Commun, 323, 1084–1090.

Kishi T., Soosaipillai A.,Grass L., Little S.P., Johnstone E.M., Diamandis E.P., 2004, Development of an Immunofluorometric Assay and Quantification of Human Kallikrein 7 in Tissue Extracts and Biological Fluids, Clin Chem 50, 709–716

Kishibe M., Bando Y., Terayama R., Namikawa K., Takahashi H., Hashimoto Y., Ishida-Yamamoto A., Jiang Y.P., Mitrovic B., Perez D., Iizuka H., Yoshida S., 2007, Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins, J Biol Chem, 282, 5834-5841

Klaschka F., 1963, Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (Trasylol®) bei Dermatosen, Arch klin exp Derm, 217, 71-81

Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G., 1994, Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases, Anal Biochem, 218, 325-329

Knecht W., Cottrell G., Amadesi S., Mohlin J., Skåregärde A., Gedda K., 2007, Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia, J Biol Chem, 282, 26089-26100

Komatsu N., Takata M., Otsuki N., Ohka R., Amano O., Takehara K., Saijoh K., 2002, Elevated strateum corneum hydrolytic activity in netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides, J Invest Dermatol, 118, 436-443

Komatsu N., Takata M., Otsuki N., Toyama T., Ohka R., Takehara K., Saijoh K., 2003, Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages., J Invest Dermatol, 121, 542–549

Komatsu N., Saijoh K., Sidiropoulos M., Tsai B., Levesque M.A., Elliott M.B., Takehara K., Diamandis E.P., 2005a, Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender, J Invest Dermatol, 125, 1182–1189

Komatsu N., Saijoh K., Toyama T., Ohka R., Otsuki N., Hussack G., Takehara K., Diamandis E.P., 2005b, Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases, Br J Dermatol, 153, 274–281

Komatsu N., Suga Y., Saijoh K., Liu A.C., Khan S., Mizuno Y., Ikeda S., Wu H.K., Jayakumar A., Clayman G.L., 2006a, Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes, J Invest Dermatol, 126, 2338–2342

Komatsu N., Tsai B., Sidiropoulos M., Saijoh K., Levesque M.A., Takehara K., Diamandis E.P., 2006b, Quantification of eight tissue kallikreins in the stratum corneum and sweat, J Invest Dermatol, 126, 925–929

Komatsu N., Saijoh K., Kuk C., Liu A.C., Khan S., Shirasaki F., Takehara K., Diamandis E.P., 2007a, Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients, Exp Dermatol, 16, 513–519

Komatsu N., Saijoh K., Kuk C., Shirasaki F., Takehara K., Diamandis E.P., 2007b, Aberrant human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of patients with psoriasis: dependence on phenotype, severity and therapy, Br J Dermatol, 156, 875–883

Komatsu N. Saijoh K., Jayakumar A., Clayman G.L., Tohyama M., Suga Y., Mizuno Y., Tsukamoto K., Taniuchi K., Takehara K., Diamandis E.P., 2008, Correlation between spink5 gene mutations and clinical manifestations of netherton syndrom patiens, J Invest Dermatol, 128, 1148–1159

Kraut H, Frey EK, Werle E. 1930, Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse, Hoppe-Seyler´s Z Physiol Chem, 189, 97-106.

Kreuzmann P., Schulz A., Ständker L., Forssmann W.G., Mägert H.J., 2004, Recombinant production of domain 6 of LEKTI: a temporary Kazal-type-related serine proteinase inhibitor, J. Chromatogr. B, 803, 75-81

Kurlender L., Borgono C.A., Michael I.P, Obiezu C., Elliott M.B., Yousef G..Y., Diamandis E.P., 2005, A survey of alternativ transkripts of human tissue kallikrein genes, Biochim. Biophys. Acta, 1755,1-14

Kuzmic P., Cregar L., Millis S.Z., Goldman M., 2006, Mixed-type noncompetitive inhibition of anthrax lethal factor protease by aminoglycosides, FEBS Journal, 273, 3054–3062

Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.

Laskowski M. Jr., Kato I., 1980, Protein inhibitors of proteinases, Annu Rev Biochem, 49, 593-626

Lasch J., 1987, Enzymkinetik, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Lauber T., Schulz A., Schweimer K., Adermann K., Marx U.C., 2003, Homologous Proteins with Different Folds: The three-dimensional structures of domains 1 and 6 of the multiple kazal-tye inhibitor LEKTI, J Mol Biol, 328, 205-219

Lee N., Francklyn C., Hamilton E.P., 1987, Arabinose-induced binding of the araC protein to araI2 activates the araBAD operon promotor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8814-8818

Leung D.M., Bieber T., 2003, Atopic dermatitis, Lancet, 361, 151-160

Li B., Goyal J., Dhar S., Dimri G., Evron E., Sukumar S., Wazer D.E., Band V., 2001, CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression, Cancer Res, 61, 8014–8021

Lindl T., 2002, Zell- und Gewebekultur, 5. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Linhart C., Wolter M., Kaufmann R., 2003, Psoriasiforme entzündliche Dermatosen, Histopathologie der Haut, Springer-Verlag, 148-150

Lu H.S., Hsu Y.R., Narhi L.O., Karkare S., Lin F.K., 1996, Purification and Characterization of Human Tissue Prokallikrein and Kallikrein Isoforms Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells, Protein Exp Purif, 8, 227–237

Lu S.M., Lu W., Qasim M.A., Anderson S., Apostol I., Ardelt W., Bigler T., Chiang Y.W., Cook J., James M.N., Kato I., Kelly C., Kohr W., Komiyama T., Lin T.Y., Ogawa M., Otlewski J., Park S.J., Qasim S., Ranjbar M., Tashiro M., Warne N., Whatley H., Wieczorek A., Wieczorek M., Wilusz T., Wynn R., Zhang W., Laskowski M.J., 2001, Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases, Proc Natl Acad Sci, 98,1410-1415.

Lu W., Apostol I., Qasim M.A., Warne N., Wynn R., Zhang W. L., Anderson S., Chiang Y.W., Ogin E., Rothberg I., Ryan K. & Laskowski M.J., 1997, Binding of amino acid sidechains to S1 cavities of serine proteinases, J Mol Biol, 266, 441-461

Klucky B., Müller R., Vogt I., Teurich S., Hartenstein B., Breuhahn K., Flechtenmacher C., Angel P., Hess J., 2007, Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion, Cancer Res, 67, 8198–8206

Lundstrom A., Egelrud T., 1988, Cell shedding from human plantar skin in vitro: Evidence of its dependence on endogenous proteolysis, J Invest Dermatol, 91, 340–343

Luo L.Y., Shan S.J., Elliott M.B., Soosaipillai A., Diamandis E.P., 2006a, Purification and characterization of human kallikrein 11, a candidate prostate and ovarian cancer biomarker, from seminal plasma. Clin Cancer Res, 12, 742-750

Luo L.Y., Jiang W., 2006b, Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors, Biol Chem, 387, 813-816

Macfarlane S.R., Seatter M. J., Kanke T., Hunter G.D., Plevin R., 2001, Proteinase-Activated Receptors, Pharmacol Rev, 53, 245-282

Mägert H.J., Standker L., Kreutzmann P., Zucht H.D., Reinecke M., Sommerhoff C.P., Fritz H., Forssmann W.G., 1999, LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor, J Biol Chem, 274, 21499–21502

Mägert H.J., Kreuzmann P., Drögemüller K., Ständker L., Adermann K. A., Walden M., John H., Korting H.C., Forsmann W.G., 2002, The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: Biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role, Eur J Med Res, 7, 49-56

Mägert H.J., Drögemüller K., Raghunath M., 2005, Serine Proteinase Inhibitors in the Skin: Role in Homeostasis and Disease, Curr. Protein Pept. Sci, 6, 241-254

Magklara A., Mellati A.A., Wasney G.A., Little S.P., Sotiropoulou G., Becker G.W., Diamandis E.P., 2003, Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: Autoactivation, substrat specificity, and regulation by inhibitors, Biochem Biophys Res Commun, 307, 948–955

McIntosh M.W., Liu Y., Drescher C., Urban N., Diamandis E.P:, 2007, Validation and Characterization of Human Kallikrein 11 as a Serum Marker for Diagnosis of Ovarian Carcinoma, Clin Cancer Res, 13, 4422-4428

Michael I.P., Sotiropoulou G., Pampalakis G., Magklara A., Ghosh M., Wasney G., Diamandis E.P., 2005, Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression, J Biol Chem, *280*, 14628–14635

Michael I.P., Pampalakis G., Mikolajczyk S.D., Malm J., Sotiropoulou G., Diamandis E.P., 2006, Human tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression, J Biol Chem, 281, 12743–12750

Mitsudo K., Jayakumar A., Henderson Y., Frederick M.J., Kang Y., Wang M., El-Naggar A.K., Clayman G.L., 2003, Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: A kinetic analysis, Biochemistry, 42, 3874-3881

Mitsui S, Yamada T, Okui A, Kominami K, Uemura H, Yamaguchi N., 2000, A novel isoform of a kallikrein-like protease, TLSP/hippostasin, (PRSS20), is expressed in the human brain and prostate, Biochem Biophys Res Commun, 272, 205-211

Miyada C.G., Stoltzfus L., Wilcox G., 1984, Regulation of the araC Gene of Escherichia coli: Catabolite Repression, Autoregulation, and Effect on araBAD Expression, Proc Natl Acad Sci USA, 81, 4120-4124

Molhuizen H., Alkemade H., Zeeuwen P., de Jongh G., Wieringa B., Schalkwijk J., 1993, SKALP/elafin: an elastase inhibitor from cultured human keratinocytes.,Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase cross-linking. J Biol Chem, 268, 12028-12032

Motta S., Monti M., Sesana S., Mellesi L., Ghidoni R., Caputo R., 1994, Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions, Arch Dermatol, 130, 452-456

Mulligan M.S., Lentsch A.B., Huber-Lang, M., Guo R.F., Sarma V., Wright C.D., Ulich T.R., Ward P.A., 2000, Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor, Am J Pathol, 156, 1033-1039

Murtha P., Tindall D.J., Young C.Y., 1993, Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 50 promoter region of the gene, Biochemistry 32, 6459–6464

Myers S.A., Clements J.A, 2001, Kallikrein 4 (KLK4), a new member of the human kallikrein gene family is up-regulated by estrogen and progesterone in the human endometrial cancer cell line, KLE, J Clin Endocrinol Metab, 86, 2323–2326

Nakamura T., Scorilas A., Stephan C., Jung K., Soosaipillai A.R., Diamandis E.P., 2003, The usefulness of serum human kallikrein 11 for discriminating between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, Cancer Res, 63, 6543-6546

Nelson P.S., Gan L., Ferguson C., Moss P., Gelinas R., Hood L., 1999, Molecular cloning and characterization of prostase, an androgenregulated serine protease with prostate-restricted expression, Proc Natl Acad Sci, 96, 3114–3119

Neurath H., Walsh K.A., 1976, Role of proteolytic enzymes in biological regulation, Biochem, 73, 3825-3832

NIRK Netzwerk Ichthyose, http://www.netzwerk-ichthyose.de

Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y., 1990, A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells, Nucleic Acids Res, 18, 6169

Noda Y., Takada Y., Erdos E., 1985, Activation of human and rabbit prokallikrein by serine and metalloproteases, Kidney Int, 27, 630-635

Ny A., Egelrud T., 2004, Epidermal hyperproliferation and decreased skin barrier function in mice overexpressing stratum corneum chymotryptic enzyme, Acta Derm Venereol, 84, 18-22

Nylander-Lundqvist E., Egelrud T., 1997, Formation of active Il-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro, Acta Derm Venereol, 77, 203-206

Obiezu C.V., Shan S.J.C., Soosaipillai A., Luo L.Y., Grass L., Sotiropoulou G., Petraki C.D., Papanastasiou P.A, Levesque M.A., Diamandis E.P., 2005, Human Kallikrein 4: Quantitative Study in Tissues and Evidence for Its Secretion into Biological Fluids, Clin Chem, 51, 1432-1442

Oikonomopoulou K., Hansen K.K., Saifeddine M., Tea I., Blaber M., Blaber S.I., Scarisbrick I., Andrade-Gordon P., Cottrell G.S., Bunnett, N.W., Diamandis E.P, Hollenberg M.D., 2006, Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling, J Biol Chem, 281, 32095–32112

Oji M.E., 2005, Expression von Serin-Proteinase-Inhibitoren in der Haut: Vergleich vom Netherton Syndrom mit Psoriasis vulgaris und atopischer Dermatitis, Dissertation, Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster

Ong C., O'Toole E., Ghali L., Malone M., Smith V., Callard R., 2004, LEKTI demonstrable by immunohistochemistry of the skin: a potential diagnostic skin test for Netherton syndrome, Br J Dermatol, 151, 1253-1257

O´Ragan G.M., Sandilands A., McLean W.H.I., Irvine A.D., 2008, Filaggrin in atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol, 122, 689-693

Ovaere P., Lippens S., Vandenabeele V, Declercq W., 2009, The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis, Cell Press 34, 453-463

Pampalakis G., Diamandis E.P., Sotiropoulou G., 2006a, The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers, Biol Chem, 387, 795–799

Pampalakis G., Sotiropoulou G., 2006b, Multiple mechanisms underlie the aberrant expression of the human kallikrein 6 gene in breast cancer, Biol Chem, 387, 773–782

Pfundt R., van Ruissen F., van Vlijmen-Willems I., Alkemade H., Zeeuwen P., Jap P., Dijkman H., Fransen J., Croes H., van Erp P.E.J., Schalkwijk J., 1996, Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides antielastase defense in human epithelia, J Clin Invest, 198, 1389-1399

Pihl-Carey K., 2004, RAAT phase II study missed in atopic dermatitis; prometic falls, BIOWORLD Today

R&D Systems, Inc., 2006, Recombinant Human Kallikrein 11, 1-800-343-7475

Rajapaskse S., Ogiwara K., Takano N., Moriyama A., Takahashi T., 2005, Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins, FEBS Letters, 579, 6879-6884

Ramsay A.J., Reid J.C., Adams N.M., Samaratunga H., Dong Y., Clements J.A., Hooper J.D., 2008, Prostatic trypsin-like kallikrein-related peptidases (KLKs) and other prostate-expressed proteinases as regulators of signalling via proteinase-activated receptors (PARs), Biol Chem, 389, 653-668

Rattenholl A., Steinhoff M., 2003, Role of proteinaseactivated receptors in cutaneous biology and disease. Drug, Dev Res, 59, 408–416

Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett, A.J., 2004, Evalutionary families of peptidase inhibitors, Biochem J, 378, 705-716

Raymond C.K., Bukowski T., Holderman S.D., Ching A.F.T., Vanaja E., Stamm M.R, 1998, Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 Kilodalton Isoform of Human Glutamate Decarboxylase, Yeast, 14, 11-23

Riegman P.H.J., Vlietstra R.J., van der Korput J.A.G.M., Brinkmann A.O., Trapman J., 1991, The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element, Mol Endocrinol, 5, 1921–1930

Rippke F., Schreiner V., Doering .T, Maibach H., 2004, Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with Staphylococcus Aureus, Am J Clin Dermatol, 5, 217-223

Rochette-Egly C., 2003, Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation, Cell Signal, 15, 355–366.

Rousseau G.G., 1984, Control of gene expression by glucocorticoid hormones, Biochem J, 224, 1–12

Rydel T.J., Tulinsky A., Bode W., Huber R., 1991, Refined structure of the hirudin-thrombin complex, J Mol Biol, 221, 583-601

Sallenave J.M., 2002, Antimicrobial activity of antiproteinases, Biochem Soc Trans, 30, 111-115

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning - A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laborarory Press, New York

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977, DNA sequenzing with chain-terminating inhibitors, Proc Natl Acad Sci USA, 74, 5463-5467

Sano A., Sangai T., Maeda H., Nakamura M., Hasebe T., Ochiai A., 2007, Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor through degradation of IGFBP-3, Int J Oncol, 30, 1493-1498

Schalkwijk J., Wiedow O., Hirose S., 1999, The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core, Biochem J, 340, 569-577

Schechter N.M., Choi E.J., Wang Z.M., Hanakawa Y., Stanley J.R., Kang Y., Clayman G.L., Jayakumar A., 2005, Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI), Biol Chem, 386, 1173-1184

Schein C.H, Noteborn M.H.M., 1988, Formation of soluble rekombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature, BIO/Technology, 6, 291-294

Schlechter I., Berger A., 1967, On the size of the active site in proteasis. I. papain, Biochem Biophys Res Commun, 27, 157-162

Schleif R.S., 1992, DNA Looping, Ann Rev Biochem, 61, 199-223

Schuur E.R., Henderson G.A., Kmetec L.S., Miller J.D., Lamparski H.G., Henderson D.R., 1996, Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer, J Biol Chem, 271, 7043–7051

Seemüller U., Arnhold M., Fritz H., Wiedenmann K., Machleidt W., Heinzel R., Appelhans H., Gassen H.G., Lottspeich F., 1986, The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor, FEBS Lett, 199, 43-48

Shaw Julie L.V., Diamandis E.P., 2008, Regulation of human tissue kallikrein-related peptidase expression by steroid hormones in 32 cell lines, Biol Chem, 389, 1409-1419

Shigemasa K., Gu L., Tanimoto H., O'Brien T.J. Ohama K., 2004, Human kallikrein gene 11 (*KLK11*) mRNA overexpression is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, Clin Cancer Res, 10, 2766-2770

Simon M., Jonca N., Guerrin M., Haftek M., Bernard D., Caubet C., Egelrud T., Schmidt R., Serre G., 2001, Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation, J Biol Chem, *276*, 20292–20299

Smoll J., 2003, Histologische Strukturen der normalen Haut, In: Kerl H., Garbe C., Cerroni L, Wolff H.H. (Hrsg.), Histopathologie der Haut, Springer-Verlag Berlin , 73-86

Son D.N., Li L., Katsuyama H. Komatsu N., Saito M., Tanii H., Saijoh K., 2009, Abundant expression of kallikrein 1 gene in human keratinocytes was mediated by GATA3, Gene, 436, 121-127

Sotiropoulou G., Rogakos V., Tsetsenis T., Pampalakis G., Zafiropoulos N., Simillides G., Yiotakis A., Diamandis E. P. , 2003, Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer, Oncol. Res. 13, 381–391

Sprecher E., Chavanas S., DiGiovanna J.J., Amin S., Nielsen K., Prendiville J.S., Silverman R., Esterly N.B., Sparker M.K., Guelig E., de Luna M.L., Williams M.L., Buehler B., Siegfried E.C., Maldergem L.V., Pfendner E., Bale S.J., Uitto J., Hovnanian A., Richard G., 2001, The spectrum of pathogenic mutations in *SPINK5* in 19 families with Netherton syndrome: Implications for mutation detection and first case prenatal diagnosis, J Invest Dermatol, 117, 179-187

Stavropoulou P., Gregorakis A.K., Plebani M., Scorilas A., 2005, Expression analysis and prognostic significance of human kallikrein 11 in prostate cancer, Clin Chim Acta, 357, 190-195

Steinhoff M., Corvera C., Thoma M., Kong W., McAlpine B., Caughey G.H., Ansel J.C., Bunnett N.W., 1999, Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase, Exp Dermatol, 8, 282-294

Steinhoff M., Neisius U., Ikoma A., Fartasch M., Heyer G., Skov P., Schmelz M., 2003, Proteinaseactivated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin, J Neurosci, 23, 6176-6180

Steinhoff M., Buddenkotte J. Shpacovitch V., Rattenholl A., Moormann Corinna, Vergnolle N. Luger T.A., Hollenberg M.D., 2005, Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response, Endocrine Rev, 26, 1-43

Stefansson K., Brattsand M., Ny A., Glas B., Egelrud T., 2006, Kallikrein-related Peptidase 14 may be a Major Contributor to Trypsin-like Proteolytic Activity in Human Stratum Corneum, Biol Chem, 387, 761-768

Stefansson K., Brattsand M., Roosterman D., Kempkes C., Bocheva G., Steinhoff M., Egelrud T., 2008, Activation of Proteinase-activated Receptor-2 by Human Kallikrein-related Peptidases, J Invest Dermatol, 128, 18-25

Stenman U.H., Leinonen J., Alfthan H., Rannikko S., Tuhkanen K., Alfthan O., 1991, A complex between prostate-specific antigen and 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer, Cancer Res, 51, 222–226

Stubbs M.T., Bode W., 1995, The clot thickens: clues provided by thrombin structure, Trends Biochem Sci, 20, 23-28

Sun Z., Pan J., Balk S.P., 1997, Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen-responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes, Nucleic Acids Res, 25, 3318–3325

Tanaka N., Fujioka A., Tajima S., Ishibashi A., Hirose S., 2000, Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1â and tumor necrosis factor-á stimulate its secretion *in vitro*, Br J Dermatol, 143, 728-732

Takada Y., Skidgel R.A., Erdos E.G., 1985, Purification of human prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin, Biochem J, 232, 851– 858

Thompson R., Ohlsson K., 1986, Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase, Proc Natl Acad Sci U S A, 83, 6692-6696

Tian M., Kamoun S., 2005, A two disulfide bridge Kazal domain from Phytophthora exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family, Plant Physiology, 138, 1785–1793

Traupe H., 1989, The ichthyosis. A guide to clinical diagnosis, genetic counselling, and therapy, Springer-Verlag Berlin

Tsai C.T., Huang C.T., 2008, Overexpression of the Neocallimastix frontalis xylanase gene in the methylotrophic yeasts Pichia pastoris and Pichia methanolica, Enzyme Microb Technol, 42, 459–465

Vachon E., Bourbonnais Y., Bingle C.D., Rowe S.J., Janelle M.F., Tremblay, G.M., 2002, Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation, Biol Chem, 383, 1249-1256

Vitzithum K., Lauber T., Kreutzmann P., Schulz A., Sommerhoff C.P., Rösch P, Marx U.C., 2008, Protein Expr. Purif. ,57, 45–56

Walley A., Chavanas S., Moffatt M., Esnouf R., Ubhi B., Lawrence R., Wong1 K., Abecasis1 G.R., Jones E.Y., Harper J.I., Hovnanian A., Cookson1 W.O.C., 2001, Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease, Nat Genet, 29, 175-178

Weyers W., 2003, Entzündliche Dermatosen mit Spongiose, In: Kerl H., Garbe C., Cerroni L, Wolff H.H. (Hrsg.), Histopathologie der Haut, Springer-Verlag Berlin, 102-105

Wildt S., Gerngross T.U., 2005, The humanization of N-glycosylation pathways in yeast, Nat. Rev., Microbiol, 3, 119-128

Wu Z., Bartels J., Schröder J., 2008, Lympho-ephithelial-Kazal-type-inhibitor (LEKTI)-2: a novel ephitelial peptide antibiotic, J Investig Dermatol,128, 178

Yamamoto A., Serizawa S., Ito M., Sato Y., 1991, Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis, Arch Dermatol Res, 283, 219-223

Yamasaki K., Schrauber J., Coda A., Lin H., Dorschner A.R., Schechter N.M., Bonnart C., Descargues P., Hovnanian A., Gallo R.L., 2006, Kallikrein-mediated proteolysis regulatetes the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. FASEB J., 20, 2068-2080

Yasukawa T., Kanei-Ishii C., Maekawa T., Fujimoto J., Yamamoto T., Ishii S., 1995 Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin, J Biol Chem, 270, 25328-25331

Yin J., Li G., Ren X., Herrler G., 2007, Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, J Biotechnol, 127, 335-347

Ying Q.L., Simon, S.R., 2001,Kinetics of the the proteinase 3 by elafin, Am J Respir Cell Mol Biol, 24, 83-89

Yoon H., Laxmikanthan G., Lee J., Blaber S.I., Rodriguez A., Kogot J.M., Scarisbrick I.A., Blaber M., 2007, Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikreinrelated peptidases, J Biol Chem, 282, 31852–31864

Yousef G.M., Magklara A., Diamandis E.P, 2000a, KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family-differential expression in breast cancer, Genomics, 6, 331–341

Yousef G.M., Scorilas A., Diamandis E.P., 2000b, Genomic Organization, Mapping, Tissue Expression, and Hormonal Regulation of Trypsin-like Serine Protease (TLSP PRSS20), a New Member of the Human Kallikrein Gene Family, Genomics, 63, 88-96

Yousef G., Diamandis E., 2001, The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease, Endocr Rev, 22, 184-204

Yousef G., Diamandis E., 2002, Human tissue kallikreins: A new enzymatic cascade pathway?, Biol Chem, 383, 1045-1057

Yousef G.M., Polymeris M.E., Grass L., Soosaipillai A., Chan P.C., Scorilas A., Borgono C., Harbeck N., Schmalfeldt B., Dorn J., Schmitt M., Diamandis E.P., 2003, Human Kallikrein 5: A Potential Novel Serum Biomarker for Breast and Ovarian Cancer, Cancer Res, 63, 3958–3965

Yousef G.M., Obiezu C.V., Luo L.Y., Magklara A., Borgono C.A., Kishi T., Memari N., Michael I.P., Sidiropoulos M., Kapadia C., Economopolou K., Kapadia C., Komatsu N., Petraki C., Elliott M., Scorilas A., Katsaros D., Levesque M.A., Diamandis E.P., 2005, Human tissue kallikreins: From gene strukture to function and clinial applications, In: G. S. Makowski (Hrsg.), Advances in Clinical Chemistry, 39, Elsevier Academie Press, 12-50

Zaiou M., Nizet V., Gallo R., 2003, Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence, J Invest Dermatol, 120, 810-816

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
APMSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid Hydrochlorid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure/n
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
bidest.	bidestilliet
bp	Basenpaar/e
BS	Rinderserum (*bovine serum*)
cDNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
Da	Dalton
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelstrangige DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTCS	*dye terminator cycle sequencing*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*enzyme linked immuno-sorbent assay*
EMSP1	*enamel matrix serine protease 1*
hPRK	humanes pankreatisches-renales-Kallikrein
Hsp	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
kat	Katal
KLK-L	Kallikrein-ähnliches Protein (*kallikrein-like protein*)
low/high mol wt	*low/high moleculare weight*
LPS	Liposaccarid
MeOH	Methanol

NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NF-κB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
OD_{600}	optische Dichte bei λ = 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*phosphat-buffered saline*)
P. methanolica	*Pichia methanolica*
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
rpm	Umdrehungen proMinute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdedecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte-Kochsalzlösung (*tris-buffered saline*)
TEMED	N-,N-,N´-,N´-Tetramethylethylendiamin
TLSP	*trypsin-like serine protease*
TNF-α	Tumornekrosefaktor alfa
Tris	Tris(hydromethyl)-aminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
v/v	Volumen je Volumen
w/v	Gewicht je Volumen
ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Die Abkürzungen zur Bezeichnung der Aminosäuren entsprechen der Drei- bzw. Einbuchstaben-Nomenklatur.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde keiner anderen Fakultät oder Universität als Prüfung vorgelegt.

Berlin, den 06.09.2012 Claudia Keil

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Claudia Keil
Geburtsdatum:	19.10.1980
Geburtsort:	Lutherstadt Wittenberg
Familie:	in fester Partnerschaft, ein Kind

Werdegang

09/1987 - 9/1993	Grundschule/Sekundarschule Klieken
09/1993 - 7/1999	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Coswig/Anhalt Abschluss: Abitur 2,4
10/1999 - 06/2004	Studium an der Hochschule Anhalt (FH) in Köthen Studiengang Biotechnologie / Richtung Biotechnische Verfahren Abschluss: Dipl. Ing. (FH) 1,7
5/2003 - 6/2004	Diplomarbeit Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch AG Experimentelle Pharmakologie Thema: Untersuchungen zum Einfluss von Liposomen auf Aggregation und Adhäsion von Tumorzellen bei Anwesenheit von Thrombozyten. Abschluss: 1,0
08/2004 - 09/2004	Praktikum EPO experimentelle Pharmakologie & Onkologie Berlin

10/2004 - 12/ 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Hochschule Anhalt (FH) / AG Molekulare Biotechnologie Projekt: Molekularbiologische Untersuchungen zur Bedeutung von Kallikreinen und Proteinase-Inhibitoren für die Entstehung von Hautkranheiten und Allergien. Mit dem Ziel der Promotion
09/2005	Vorstellung als Doktorandin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie und Biotechnologie bei Prof. Dr. Milton T. Stubbs
12/2008 - 12/2009	Elternzeit
01/2010 - 09/2010	Arbeitssuchend / Zusammenschrift der Dissertation
09/2010 - 09/2011	WITA GmbH, Teltow Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich Proteinanalytik
seit 09/2011	AptaRes AG, Mitenwalde (Arbeitsort Berlin) Projektleitung in Bereich Analytik

Publikationen

Originalarbeiten:

C. Keil, R. Zeisig, I. Fichtner
Effect of modified liposomes on the aggregation of platelets and tumor cells
Thrombosis and Haemostasis 2005; 94: 404- 411

C.Keil, I. Eichorn, S. Sempert, H.J. Mägert
The multidomain serine proteinase inhibitor LEKTI is a potent inhibitor of the kallikrein-related peptidase KLK11.
In Vorbereitung

A. Dudda-Böhm, **C. Keil**, R. Pätz, H.J. Mägert
Recombinant production and inhibitory activities of LEKTI domains 2/3
In Vorbereitung

Publizierte Abstrakta:

C. Keil, R. Stahn, R. Zeisig, I. Fichtner
Enhancement of aggregation between tumour cells and platelets in the presence of surface modified liposomes
Platelets 2004; 15: 479- 517

P. Birowo, S. Ückert, G. Kedia, **C. Keil**, M. Meyer, H.J. Mägert, S. Machtens, W.F. Thon, F. Scheller, U. Jonas, A. Taher, D. Rahardjo
The peirpheral role of serotonin reuptake inhibitors on the human seminal vesicle: in vitro study
Urology 2007; 70 (Suppl 3A): 15

P. Birowo, S. Ückert, M. Meyer,**C. Keil**, H.J. Mägert, S. Machtens, W.F. Thon, F. Scheller, U. Jonas, A. Taher, D. Rahardjo
In-vitro-effects of serotonin reuptake inhibitors on human seminal vesicle and its potential role in the ejaculation process
Eur. Urol. Suppl 7 2008; 3: 15

P. Birowo, A. Brauer, S. Ückert, M. Meyer,**C. Keil**, H.E. Rahardio, H.J. Mägert, A. Taher, D. Rahardjo, U. Jonas
Expression of different serotonin receptors in the human corpus cavernosum penis: a molecular biological study
Urologe 2008 (Suppl 1): 56

Nichtpublizierte Abstrakta:

S. Herrling, **C. Keil**, R. Pätz, H.J. Mägert
Proteinase-Inhibitoren als Leitstruktur zur Entwicklung von Therapeutika für Hauterkrankungen und Überempfindlichkeitsreaktionen
12. Innovationstag der AiF,
Berlin, 01. Juni 2005

C. Keil, K. Dögemüller, S. Herrling, P. Kreutzmann, T. Egelrud, M. Brattsand, W.G. Forssmann, H.J. Mägert
Inhibitory profile and regulation of the 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI
4th General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS)
associated with the International Conference on Protease Inhibitors (ICPI)
Quebec City, Kanada, 15.-19. Oktober 2005

K. Dögemüller, E. Maronde, **C. Keil**, S. Herrling, W.G. Forssmann, H.J. Mägert
Regulation and regulatory role of the multidomain serine proteinase inhibitor LEKTI
9th Joint Meeting Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes
Weimar, 10. -12. November 2005

C. Keil, S. Herrling, K. Drögemüller, E. Maronde, P. Kreutzmann, T. Egelrud, M. Brattsand, W.G. Forssmann, H.J. Mägert
Regulation und regulatorische Rolle des Serinproteinase Inhibitors LEKTI im Kontext entzündlicher Hautkrankheiten
Tag der Forschung
Köthen, 19. Mai 2006

P. Birow, S. Ückert, G. Kedia, **C. Keil**, M. Meyer, H.J. Mägert, S. Machtens, W.F. Thon, F. Scheller, U. Jonas, A. Taher, D. Rahardjo
The peripheral role of serotonin reuptake inhibitors on the human seminal vesicle: In vitro study
Société International d´Urologie 29th World Congress
Paris, Frankreich, 02.-06. September 2007

C. Keil, K. Dögemüller, P. Kreutzmann, L. Ständker, I. Fernandez, A. Romero, G. Gimenez-Gallego, W.G. Forssmann, H.J. Mägert
Inhibition of Recombinant Human Kallikrein hK7 by LEKTI Domains 7/8
11th Joint Meeting Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes
Weimar, 01. - 03. November 2007

H.E. Rahardjo, S. Ückert, **C. Keil**, M. Meyer, H.J. Mägert, W. Kauffels, U. Jonas, A. Taher,
Expression of vasoactive intestinal polypeptide and c-type natriuretic peptide receptor genes in human vagina
Annual Meeting of the International Society for the study of Woman´s Sexual Health
San Diego, USA, 21. - 24. Februar 2008

C. Keil, L. Ständker, W.G. Forssmann, I. Fernandez, H.J. Mägert
Inhibition des rekombinanten Kallikreins hK7 durch die LEKTI-Domänen 7/8
9. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz der Hochschule Anhalt (FH)
Köthen, 29. April 2008

C.Keil, I. Eichhorn, S. Sempert, H.J. Mägert
The multidomain serine proteinase inhibitor LEKTI is a potent inhibitor of the kallikrein-related peptidase KLK11
15th Joint Meeting Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes
Weimar, 07.-09. November 2011
Eingereicht zur Präsentation als Poster

Vorträge:

C. Keil, J. Zwanzig, S. Herrling, D. Friebe, C. Meeske, H.J. Mägert
Inhibitory potentials of native and modified domains of the serine proteinase inhibitor LEKTI
23rd Winter School on Proteinases and their Inhibitors
Tiers, Italien, 01.- 05. März 2006

C. Keil, H.J. Mägert
Die Hemmung proteinabbauender Enzyme als neuer therapeutischer Ansatz bei Hautkrankheiten und Entzündungen
Tag der Forschung
Köthen, 19. Mai 2006

C. Keil
Gegenwärtige Forschungs- und Entwicklungsschwerpunkte der Biotechnologie in Köthen
Patent Workshop
Köthen, 07. Dezember 2007

C. Keil, L. Ständker, G. Gimenez-Gallego, W.G. Forssmann, H.J. Mägert
3D Structure of Kallikrein hK7 and its Inhibition by LEKTI Domains 7/8
25th Winter School on Proteinases and their Inhibitors
Tiers, Italien, 01. -05. März 2008

DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Mägert für die Überlassung dieses vielseitigen Themas und die engagierte Betreuung. Insbesondere danke ich ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen wie auch für die vielen fachlichen und nicht fachlichen Gespräche.

Prof. Dr. Milton Stubbs danke ich sehr für die nicht selbstverständliche Übernahme der universitären Betreuung, wodurch mir diese Promotion ermöglicht wurde. Ich danke auch für die Geduld und die mir jederzeit entgegengebrachte Unterstützung.

Ein großes DANKE an alle vom MoBioLabHAKö! Vielen Dank für eure Mithilfe und vorallem für die schöne Zeit. Es hat Spaß gemacht jeden Tag mit euch im Labor zusammenzuarbeiten. Besonderer Dank gilt Sabine Herrling, Anke Dudda-Böhm und Jessica Zwanzig für ihr ehrliches Interesse, ihre tatkräftige Hilfe im praktischen Laboralltag wie auch für multivalente Anregungen bei theoretischen Überlegungen.

Ludger Ständker danke ich für die Bereitstellung von hK7.

Ich danke meinen Eltern für ihre jahrelange Unterstützung und dafür, dass sie die Hoffnung nicht aufgegeben haben.

Nobi, mein Liebster, dir danke ich natürlich für die Erstellung der Grafiken, für dein Verständnis und deinen Rückhalt auch in schwierigen Zeiten.

Ich danke von ganzem Herzen Inga Eichhorn. Danke für die viele praktische Arbeit, die Inspiration bei zahlreichen Diskussionen. Danke für die Korrektur der schriftlichen Arbeit, die stete Anteilnahme und Motivation. Und vor allem Danke, dass du immer für mich da bist.

Meinem Tildchen dank ich für viel Freude und dafür, dass es immer wichtigere Dinge im Leben gibt.