

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Die Isoformen der Airway Trypsin-like Protease  
bei Mensch, Maus und Ratte**

*Charakterisierung einer neuen Proteasen-Familie  
und ihre  
Rolle in der humanen Nebennierentumorgenese*

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Markus Schammann  
aus Michelfeld

Würzburg, Juni 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. Martin Fassnacht

Koreferent: Prof. Dr. Bruno Allolio

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2010.

Der Promovend ist Arzt.

*Meinen Eltern.*

# Inhalt

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Nebennieren.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Nebennierenrinde	1
1.1.2 Nebennierenmark	2
<b>1.2 Funktion der NNR.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Steuerung der Hormonsynthese	3
1.2.2 Glukokortikoide	3
1.2.3 Mineralokortikoide	4
1.2.4 Adrenale Androgene	4
<b>1.3 Das Nebennierenwachstum.....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Die Bedeutung von ACTH für das Nebennierenwachstum	5
1.3.2 Die Rolle des N-terminalen POMC für das Nebennierenwachstum	6
1.3.3 Die Adrenal secretory Protease (AsP)- ein Schlüsselprotein für das Nebennierenwachstum der Ratte	8
1.3.4 Charakterisierung des „Adrenoproliferins“	9
1.3.5 Modell für die Interaktion von POMC und Nebennierenwachstum	10
<b>1.4 Tumöröse Veränderungen der Nebennierenrinde.....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Das Nebennierenrindenadenom	12
1.4.2 Das Nebennierenrindenkarzinom	12
<b>1.5 Die Fragestellung dieser Arbeit.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Tiere.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Menschliches Gewebe.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 RNA-Proben.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Allgemeines zum Arbeiten mit RNA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 RNA-Extraktionen.....</b>	<b>17</b>
2.5.1 Gesamt-RNA-Extraktion mit dem TRIzol®-Verfahren	17
2.5.2 mRNA-Extraktion mit dem Qiagen®-Oligotex™-Verfahren	17
<b>2.6 DNA-Isolation aus Blut.....</b>	<b>18</b>
<b>2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR).....</b>	<b>19</b>
2.7.1 Die PCR-Reaktion	19
2.7.2 Praktische Durchführung	22
2.7.3 Weitere PCR Anwendungen	24
2.7.4 Q-PCR oder Realtime-PCR	25
2.7.5 Exkurs: Vergleich verschiedener RT-PCR-Kits	26
2.7.6 Die Kits und Reaktionen im Überblick	26
2.7.7 Ergebnis	27
<b>2.8 Agarose-Gelelektrophorese.....</b>	<b>27</b>
<b>2.9 Rapid Amplification of cDNA Ends ('RACE').....</b>	<b>27</b>
2.9.1 Ablauf einer RACE	28
<b>2.10 Southern Blot.....</b>	<b>30</b>
2.10.1 Prinzip	30
2.10.2 Spezifikationen unserer Southern Blots	31
<b>2.11 Immunhistochemie.....</b>	<b>32</b>
<b>2.12 Sequenzierung von DNA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.13 Klonierung von DNA.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Isolation und Sequenzanalyse der cDNA-Klone von RAT, MAT und HAT.....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Identifizierung von zwei AT-Isoformen	34
<b>3.2 Analyse der AT-DNA und -mRNA.....</b>	<b>35</b>

## Inhalt

---

3.2.1	Vergleich der AT-Isoformen auf DNA-Ebene (Southern Blot)	35
3.2.2	Vergleich der AT-Isoformen auf mRNA-Ebene (RT-PCR)	36
<b>3.3</b>	<b>Organisation des AT-Gens.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Ratte	38
3.3.2	Maus	39
3.3.3	Mensch	39
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der AT-Isoformen .....</b>	<b>40</b>
3.4.1	Fehlen der kurzen AT-Isoform im Menschen	42
3.4.2	Strukturdomänen der langen Isoformen RAT1, MAT1, HAT	44
3.4.3	Strukturdomänen der kurzen Isoformen (RAT2 (AsP) und MAT2)	44
3.4.4	Funktionelle Einheiten der ATs	47
<b>3.5</b>	<b>Expression der AT-Isoformen in verschiedenen Geweben und Spezies.....</b>	<b>47</b>
3.5.1	Die Gewebsexpression von RAT1/2 (AsP)	51
3.5.2	Die Gewebsexpression von MAT1/2	51
3.5.3	Die Expression von HAT	52
3.5.4	Immunhistochemischer Nachweis von RAT und MAT	53
<b>3.6</b>	<b>HAT-Expression in der normalen Nebenniere und in adrenalen Tumoren.....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Airway Trypsin-like Proteasen- eine „neue“ Familie von Proteasen .....</b>	<b>58</b>
4.1.1	Fünf Isoformen- eine Familie: Die Nomenklatur der ATs	58
4.1.2	Verwandtschaftsverhältnisse der AT-Isoformen, Existenz zweier Isoformen	59
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der AT-Proteasen .....</b>	<b>60</b>
4.2.1	Biochemische Eigenschaften der ATs	60
4.2.2	HAT, ein Vertreter der ATs	63
<b>4.3</b>	<b>Weshalb existiert kein „HAT2“? .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b>Expressionsmuster und potentielle Funktion der ATs .....</b>	<b>66</b>
<b>4.5</b>	<b>Nebennierentumorgenese und POMC .....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>72</b>
6.1	Primer.....	73
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
AsP	Adrenal secretory Protease (synonym: RAT2)
AT	Airway trypsin-like Protease
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool
bp	Basenpaar(e)
cDNA	Complementary DNA
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DESC1/2/3	Differentially Expressed in Squamous cell Carcinoma protease 1/2/3
DHEA/ DHEA-S	Dehydroepiandrosteron/ ...-Schwefelsäureester
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
EST	Expressed Sequence Tag
HAT	Human Airway Trypsin-like Protease
MAT	Mus musculus Airway trypsin-like Protease
mRNA	Messenger-RNA
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NN	Nebenniere
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
ORF	Open Reading Frame. mRNA-Bereich, aus dem translatiert wird.
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
POMC	Pro-Opiomelanocortin
Q-PCR	Quantitative-PCR (= Realtime PCR)
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RAT	Rattus norvegicus Airway trypsin-like Protease
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
Tryp_SPc	Trypsin-like Serinproteasen-Domäne
TTSP	Type Two Transmembrane Serine Protease
Y1-Zellen	Murine Nebennierenrindenzelllinie

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Nebennieren

Die humanen Nebennieren sind paarige endokrine Drüsen. Sie liegen retroperitoneal, cranial der Nierenoberpole. Die Einzelgröße beträgt ca. 5x2x5 cm, das Gewicht jeweils ca. 8- 10g. Größe und Gewicht schwanken aber je nach Alter und Funktionszustand.

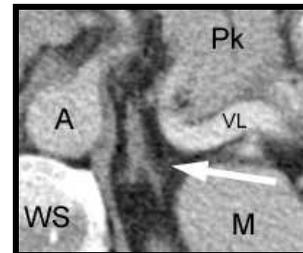
Eine Organkapsel aus kollagenem Bindegewebe umgibt das Organinnere. Hier läßt sich makroskopisch die gelblich-braune Nebennierenrinde (NNR) vom rotbraunen Nebennierenmark (NNM) unterscheiden.

Entwicklungsgeschichtlich und funktionell handelt es sich bei NNR und NNM um zwei unterschiedliche Organe: Die NNR entwickelt sich aus dem Mesoderm des Coeloms, das NNM ist ektodermalen Ursprungs und geht auf die Neuralleiste zurück. Deren wesentlicher Bestandteil sind sympathische Ganglienzellen. Somit kann das NNM als modifiziertes sympathisches Ganglion betrachtet werden, dessen postganglionäre Neurone während der Entwicklung ihre Äste verloren haben und zu sezernierenden NNM-Zellen geworden sind [1, 2].

Nebennieren bzw. nebennierenartige Organe und Gewebe findet man ubiquitär bei allen Vertebraten. Vergleichende Studien der einzelnen Spezies sind dadurch möglich.

### 1.1.1 Nebennierenrinde

Die NNR gliedert sich in drei Zonen: Die subkapsuläre Zona glomerulosa, darunter die Zona fasciculata und marknah die Zona reticularis. Hauptaufgabe der Parenchymzellen in der NNR ist die Produktion von Steroiden. In der Zona glomerulosa werden hauptsächlich Mineralokortikoide, vor allem Aldosteron, produziert. Die Zona fasciculata ist die breiteste der drei Rindenschichten. Ihre Zellen bilden 1 oder 2 Zellen breite Faszikel. Zwischen diesen verlaufen Kapillaren. In der Z. fasciculata findet die Glukokortikoidbildung (⇒ Cortisol) statt, zu einem geringen Teil werden auch Geschlechtshormone gebildet. Die innerste Rindenschicht, die Zona reticularis, verdankt ihren Namen



**Abbildung 1.1: Die Nebenniere.** Computertomographisches Bild der linken Nebenniere (Pfeil). A- Aorta, Pk- Pankreas, VL- V. lienalis, WS- Wirbelsäule, M- Milz.

dem netzartigen Aussehen. Hier werden die adrenalen Androgene (Endprodukt: DHEA) synthetisiert.

Mit zunehmendem Alter finden Veränderungen an der NNR statt. Diese spielen sich v.a. an den Grenzen von Z. glomerulosa/fasciculata (= äußeres Transformationsfeld) sowie zwischen Z. fasciculata/reticularis (= inneres Transformationsfeld) ab. Neugeborene besitzen in Relation zur Körpergröße eine recht große NNR. Dies hängt mit der Existenz einer recht breiten, vorläufigen „fetalen“ NNR zusammen, die zwischen der dünnen *endgültigen* NNR und dem NNM lokalisiert ist. Mit dem Zeitpunkt der Geburt bildet sich die fetale Rindenschicht zurück und es entwickelt sich die bekannte dreischichtige NNR. Bis zur Pubertät überwiegt die Z. fasciculata, ab der Pubertät gewinnen auch die übrigen beiden Schichten deutlich an Größe. Im Klimakterium verschmälern sich die Zonae glomerulosa und reticularis wiederum und in geringem Maße auch die Z. fasciculata. Letztere erscheint nun in der Relation wieder prominent.

Unter anhaltendem Streß findet eine Hypertrophie aller drei Rindenschichten mit Einlagerung von Lipiden statt. Nach Abklingen des Stresses ist diese Hypertrophie reversibel [1, 2].

### 1.1.2 Nebennierenmark

Die Zellen des NNM können als modifizierte, postganglionäre Neurone aufgefaßt werden. Ein wesentliches Merkmal der NNM-Zellen sind Sekretgranula in großer Anzahl in Richtung der kapillar-zugewandten Seite. Diese Granula nehmen Dopamin als Vorstufe auf und bilden mit Hilfe von Enzymen Adrenalin bzw. Noradrenalin (80% Adrenalin, 20% Noradrenalin). Auf äußere Reize hin erfolgt neural-vermittelt eine Exozytose der Sekretgranula.

In den NNM-Zellen lassen sich zahlreiche weitere Peptide nachweisen, wie z.B. Pro-Opiomelanocortin (POMC),  $\beta$ -Endorphin, Enkephaline, MSH, STH, Substanz P etc. Die Fähigkeit, Hormone in Sekretgranula zu speichern, unterscheidet die Zellen des NNM von denen der NNR. [1, 2].

## **1.2 Funktion der NNR**

### **1.2.1 Steuerung der Hormonsynthese**

Die genaue Steuerung der Hormonsynthese ist sehr komplex und bis heute nur zum Teil verstanden. Eine wesentliche Rolle spielt das Hypophysenpeptidhormon Adrenocorticotropin (ACTH). ACTH reguliert in einem komplexen Wechselspiel mit Wachstumsfaktoren und lokalen Steuerungshormonen die Sekretion der Glukokortikoide und adrenalen Androgene sowie zusammen mit Angiotensin-II die Mineralokortikoid-Biosynthese [3, 4].

### **1.2.2 Glukokortikoide**

Die tägliche Cortisol-Sekretion liegt beim Menschen zwischen 40 und 80  $\mu\text{mol}$  (10- 15 mg) und zeigt eine ausgeprägte Tagesrhythmik [5]. Die Cortisolausschüttung unterliegt unter anderem der Kontrolle von ACTH. Es wird mit einer Anzahl weiterer Peptide (Lipotropine, Endorphine und Melanozyten-stimulierende Hormone) aus dem großen Vorläufermolekül POMC (vgl. Abbildung 1.2) gebildet. POMC wird in vielen Geweben, einschließlich Gehirn, Hypophyse und in den Lymphozyten synthetisiert. Je nach Gewebe werden dann unterschiedliche POMC-Fragmente sezerniert. Die Freisetzung von ACTH aus dem Hypophysen-Vorderlappen wird durch das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) gesteuert, welches im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildet wird. Neben CRH modulieren unter anderem die freie Cortisolkonzentration im Plasma, Vasopressin und Zytokine des Immunsystems direkt oder indirekt die ACTH-Ausschüttung [6]. Der Plasmaspiegel von ACTH folgt ebenfalls weitgehend einem Tageszyklus mit einer Spitze kurz vor dem Aufwachen und einem Tiefpunkt vor dem Schlafengehen. Die biologische Halbwertszeit von ACTH im Kreislauf beträgt weniger als 10 Minuten und führt innerhalb dieser Zeit unter anderem zur Freisetzung von Cortisol aus der NNR.

Zu den physiologischen Wirkungen der Glukokortikoide zählen, vereinfacht dargestellt, die Regulation des Proteinstoffwechsels (vorwiegend katabol), des Glukosestoffwechsels (blutzuckersteigernd), des Lipidstoffwechsels (fettsäuremobilisierend) und des Nukleinsäurestoffwechsels. Daneben wirken diese Steroide (wahrscheinlich unter Be-

einflussung der kleinen Blutgefäße und der zellulären Immunabwehr) entzündungshemmend.

### **1.2.3 Mineralokortikoide**

Bei gesunden Versuchspersonen liegt die durchschnittliche Aldosteronsekretion bei normaler Salzaufnahme zwischen 0,1 und 0,7  $\mu\text{mol}$  (50- 250  $\mu\text{g}$ ) [7]. Aldosteron hat physiologisch zwei Hauptaufgaben im Organismus: 1. Es ist Hauptregulator des Kaliumstoffwechsels und steuert 2. das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen. Diese beiden Wirkungen werden in den Zielgeweben durch Bindung an den Typ-I-Glucokortikoid-(Mineralokortikoid-) Rezeptor vermittelt.

Drei Hauptmechanismen kontrollieren die Aldosteronfreisetzung: das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, der Kalium- und der ACTH-Serum-Spiegel.

### **1.2.4 Adrenale Androgene**

Das wichtigste von der NNR sezernierte Androgen ist das Dehydroepiandrosteron (DHEA), sowie dessen  $\text{C}_3$ -Schwefelsäureester (DHEA-S). 15- 30 mg dieser Verbindungen, die selbst nur geringe androgene Wirkung besitzen, werden täglich ausgeschüttet [7]. Ihre Androgenität ist von der peripheren Konversion zu Testosteron abhängig.

Die Androgene regulieren die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und können bei Frauen bei gesteigerter Produktion die Symptome einer Virilisierung auslösen. Die Freisetzung der NNR-Androgene wird durch ACTH (und nicht etwa durch die Gonadotropine LH bzw. FSH) stimuliert.

## **1.3 Das Nebennierenwachstum**

Die Nebenniere ist auch nach Abschluss ihrer Entwicklung (s.o.) ein dynamisches Organ. Ein konstanter Nachschub von neuen, differenzierten Zellen erhält die Funktion des NNR-Parenchyms aufrecht [8]. Entsprechend ist eine ständige Proliferation der NNR erforderlich, um die Zellen zu ersetzen, die im Rahmen des regelmäßigen Zellturnovers verloren gehen. Die Mechanismen, durch die die adrenale Mitogenese unter physiologischen Bedingungen gesteuert wird, sind nur unvollständig verstanden [9]. Ein genaues Verständnis ist aber von großem Interesse, da davon ausgegangen werden kann, dass die pathologische Aktivierung dieser Mechanismen (z.B. eine konstitutiv aktivierte Mitogenese) eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Nebennieren-

tumoren spielt. Sowohl klassische endokrine Mechanismen wie auch parakrine, intraadrenale Prozesse scheinen für die Homöostase der adrenalen Mitogenese erforderlich zu sein.

### 1.3.1 Die Bedeutung von ACTH für das Nebennierenwachstum

In zahlreichen tierexperimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Resektion der Hypophyse langfristig zur Atrophie der Nebennieren führt [10-13]. Gut dokumentiert ist durch experimentelle Studien, aber auch durch klinische Erfahrung, der suppressive Effekt einer chronischen Glucokortikoidtherapie auf die NNR. Der Atrophie-induzierende Effekt der Glucokortikoide wird dabei auf eine Suppression der Hypothalamus- und Hypophysenfunktion zurückgeführt [14-16]. Allerdings wurden auch direkte inhibitorische Effekte der Glucokortikoide auf die adrenale Zellproliferation vermutet [17, 18].

Als wichtigster Stimulator des Nebennierenwachstums wurde klassischerweise das ACTH angesehen. Die Gabe von ACTH führt zu einer Steigerung der Steroidsekretion, die auch in klinischen Funktionstests genutzt wird. Darüber hinaus stimuliert ACTH die adrenale RNA- und Protein-Synthese [10]. Allerdings zeigte sich, dass es sich bei der Gewichtszunahme der NNR unter ACTH-Stimulation im wesentlichen um eine *Zellhypertrophie* mit einer Zunahme des Zellvolumens handelt [19, 20]. Die Steigerung der Zellaktivität ist mit einer verstärkten Aktivität von steroidsynthetisierenden Enzymen verbunden und somit eher Ausdruck einer Zelldifferenzierung [21]. Die beobachtete *mitogene* Wirkung von ACTH ist hingegen umstritten [9] und könnte auf die damalige Applikation von hyperphysiologischen Dosen des Hormons zurückzuführen sein [22] oder auch auf Verunreinigungen der verwendeten Extrakte. Verschiedene Experimente sprechen nämlich dafür, dass ACTH eher hemmend auf die Zellteilung wirkt: In vitro und in vivo wurde gezeigt, dass ACTH die Zellproliferation von NNR-Zellen inhibiert [18, 23-25] und sogar Apoptose induzieren kann [26]. Die gleichen Effekte beobachtet man, bei Zugabe von Derivaten des cAMP oder des Adenylatzyklasenstimulators Forskolin [26, 27]. Neutralisierende Anti-ACTH-Antikörper führen zu keiner Inhibition der Nebennierenproliferation [25].

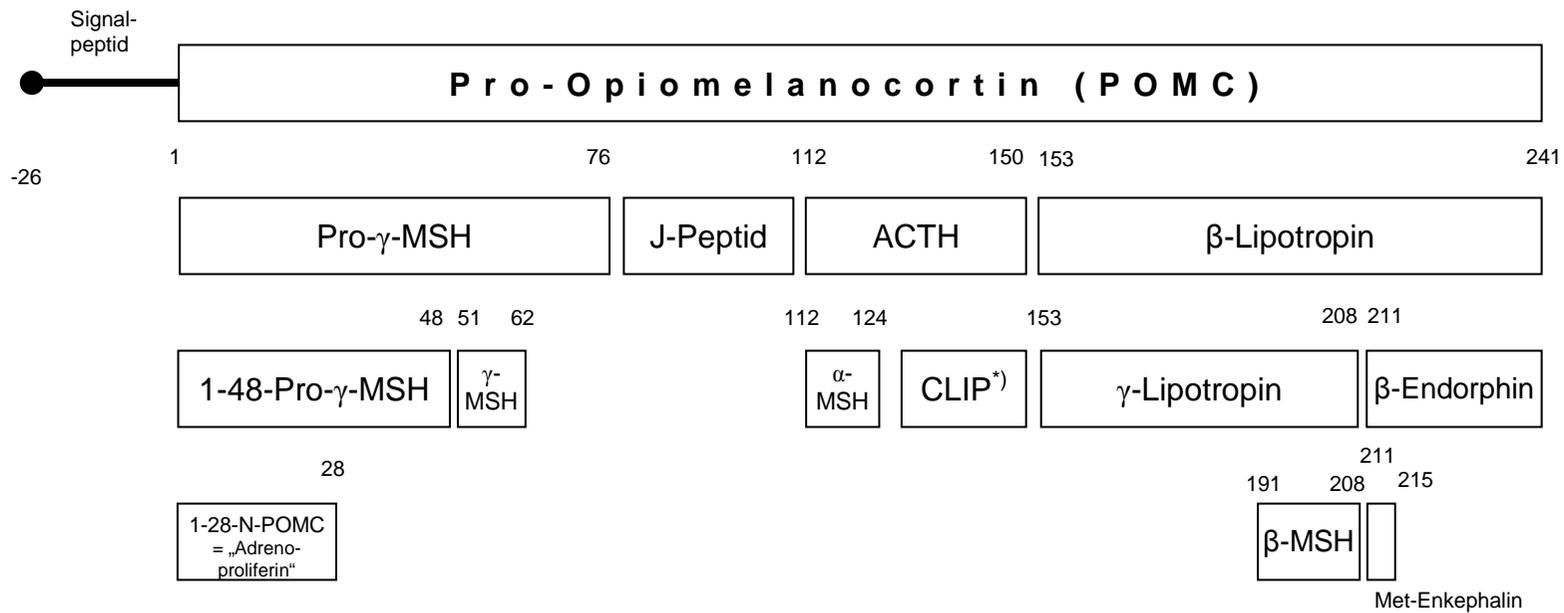
### 1.3.2 Die Rolle des N-terminalen POMC für das Nebennierenwachstum

In-vivo-Untersuchungen an hypophysektomierten Ratten zeigten keine trophischen Effekte von 1-76-N-POMC auf die Nebennieren [28]. Kürzere, weit N-terminal gelegene POMC-Peptide (vgl. **Abbildung 1.2**), die die  $\gamma$ -MSH-Sequenz nicht mehr enthalten, zeigten dagegen eine starke mitogene Aktivität auf die Nebennieren erwachsener Ratten, sowohl nach Hypophysektomie als auch nach Dexamethasonbehandlung [15, 16, 25, 29, 30].

1983 untermauerten Lowry et al. [31] diese Beobachtungen durch Versuche mit Antisera gegen verschiedene POMC-Bestandteile: Extrem N-terminale POMC-Peptide zeigten einen deutlichen Einfluß auf das Größenwachstum der Nebenniere, wohingegen ACTH *keinen* Effekt hatte. Erstaunlicherweise unterband die Neutralisation von  $\gamma$ -MSH das NN-Größenwachstum komplett (obwohl  $\gamma$ -MSH bereits als eindeutig nicht-mitogen identifiziert worden war). Nach einer Hypothese entstehen die kurzen, mitogenen Fragmente durch proteolytische Abspaltung aus dem Pro- $\gamma$ -MSH. Durch die Bindung des  $\gamma$ -MSH-Antikörpers an das Vorläufermolekül könnte die Anlagerung einer postulierten Protease verhindert werden, die Abspaltung der kurzen Fragmente wäre dann nicht möglich.

Für eine Beteiligung von Pro- $\gamma$ -MSH am Nebennierenwachstum spricht auch der drastische Abfall von Pro- $\gamma$ -MSH bei Schafen in der Fetalzeit (der Zeit, in der die Nebennierenentwicklung abläuft): Umgekehrt proportional zum Pro- $\gamma$ -MSH nehmen hier die kurzen, N-terminalen Fragmente drastisch zu. Durch Infusion von externem Pro- $\gamma$ -MSH kann das Nebennierenwachstum weiter gesteigert werden [32].

Die absolute Notwendigkeit von POMC-Peptiden für das Nebennierenwachstum zeigt sich auch im kompletten Fehlen der Nebennieren bei POMC-Knockout-Mäusen [33].



*\*) CLIP= Corticotropin-like intermediary peptide*

**Abbildung 1.2: Das humane Pro-Opiomelanocortin (POMC).**

Das humane POMC hat eine Länge von 241 AS und wird im Hypothalamus und einer Reihe anderer Organe exprimiert. Ein Signalpeptid aus 26 AS ist für die korrekte intrazelluläre Weiterleitung und die Sekretion des Peptids

verantwortlich. Die einzelnen Peptidhormone werden gewebespezifisch durch posttranslationale Prozessierung freigesetzt. (Die Zahlen geben die Start- und Endpunkte der einzelnen Bestandteile wieder.)

### 1.3.3 Die Adrenal secretory Protease (AsP)- ein Schlüsselprotein für das Nebennierenwachstum der Ratte

Für die Nebennierenproliferation sollen, wie erwähnt, kurze N-terminale Fragmente des POMC verantwortlich sein. Diese Fragmente entstehen wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung: Nach Behandlung von 1-76-N-POMC mit Trypsin (einer Serinprotease) konnte eine proliferative Aktivität in der Nebenniere bei erwachsenen Ratten induziert werden [25].

Ein weiteres bekanntes Phänomen ist das kompensatorische Wachstum der verbliebenen Rest-Nebenniere bei Ratten nach unilateraler Adrenalektomie. Dieser Effekt läßt sich schon nach 24 Stunden nachweisen. Ein Zusammenspiel zentralnervöser/neuraler Mechanismen sowie lokal aktiver Proliferationsfaktoren sollen hierfür verantwortlich sein [31]. Bei diesen Proliferationsfaktoren könnte es sich um die N-terminalen POMC-Fragmente handeln, die z.B. durch eine hochregulierte Protease, ähnlich dem o.g. Trypsin, erzeugt werden. Tatsächlich schwächt die Gabe eines Serinproteasen-Inhibitors *in vivo* das kompensatorische Wachstum der kontralateralen Nebenniere nach einseitiger Adrenalektomie ab. Dieser Sachverhalt konnte nicht nur an Ratten, sondern auch an Y1-Zellen der Maus (einer murinen Nebennierenkarzinom-Zelllinie) *in vitro* nachgewiesen werden.

Die proliferativen N-POMC-Fragmente lassen sich nicht in der Blutzirkulation nachweisen und entstehen wohl erst lokal am Erfolgsorgan. Die vermutete Protease wäre also direkt in der Nebenniere zu suchen.

Es wurde versucht, die postulierte Protease in Ratten-Nebennierenextrakten nachzuweisen. Da man annahm, es handele sich wie Trypsin um eine Serinprotease, führte man PCR-Analysen mit Primern für die hochkonservierte katalytische Triade der Serinproteasen durch. Es konnte neben zwei bereits bekannten Serinproteasen eine zu diesem Zeitpunkt unbekannte Serinprotease identifiziert und sequenziert werden. Erste Sequenzanalysen hatten eine sekretorische Signalsequenz gezeigt, was zur Namensgebung „Adrenal secretory Protease“ (AsP) führte [34].

Die Lokalisation der AsP in der Nebenniere konnte mittels In-situ-Hybridisierung auf die NNR eingegrenzt werden, genauer den Bereich zwischen Z. glomerulosa und Z. fasciculata, der vermuteten Proliferationszone der Nebenniere. Immunhistochemisch wurde eine postsekretorische Membranständigkeit von AsP nachgewiesen.

Zellkulturversuche mit der Y1-Zelllinie der Maus bestätigten AsP als gesuchte Protease und Pro- $\gamma$ -MSH als zugehöriges Substrat.

### 1.3.4 Charakterisierung des „Adrenoproliferins“

Das adrenale Mitogen „Adrenoproliferin“, das durch AsP gemäß der Modellvorstellung aus N-terminalem POMC abgespalten werden soll, entspricht dem N-terminalen Ende des POMC. Wie man nachweisen konnte, sind mehrere unterschiedlich lange Fragmente des N-terminalen POMC geeignet, als Adrenoproliferin zu fungieren. In der AS-Sequenz des N-POMC befindet sich an Position 48/49 (Arg/Lys) eine sog. *dibasische Cleavage Site*, welche bekanntermaßen von Serinproteasen favorisiert wird. Eine Affinität von AsP zu dieser Stelle konnte nachgewiesen werden. Physiologischerweise erfolgt die Spaltung jedoch zu einem weit höheren Anteil an Position 52/53 (Val/Met), wie massenspektrometrische Untersuchungen zeigten.

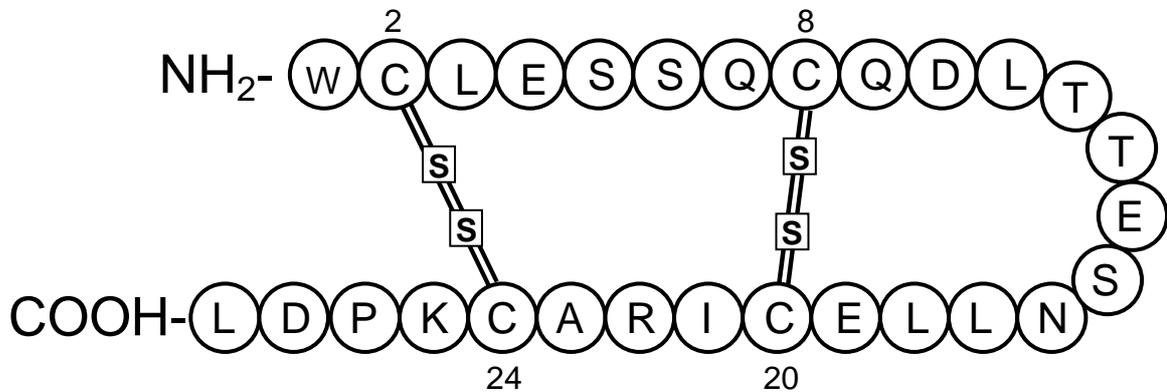
Eine Arbeit von Ross et al. [32] konnte klären, dass 1-48-N-POMC mitogen *inaktiv* ist wohingegen das 1-52-N-POMC die natürlicherweise mitogen *aktive* Form darstellen soll.

Unsere Arbeitsgruppe fand heraus, dass die mitogenen Eigenschaften des N-POMC weit N-terminal lokalisiert sind: Als kürzestmögliches mitogen aktives N-POMC konnten wir 1-28-N-POMC identifizieren. [35]. Essentiell für die Funktionalität ist dabei die korrekte Lage von zwei Disulfidbrücken [36]: So ist *synthetisches* 1-28-N-POMC im Vergleich zu *purifiziertem* 1-28-N-POMC deutlich weniger potent [37]. Ursächlich ist die falsche Disulfidbrückenstruktur des synthetischen Peptids. Das korrekte Peptid enthält 4 Cysteine an den Positionen 2, 8, 20 und 24, welche *in vivo* zwei Disulfidbrücken an Position 8/20 und 2/24 ausbilden [38, 39] (**Abbildung 1.3**). Diese Konfiguration ist phylogenetisch hochkonserviert und findet sich auch in den Sequenzen anderer Spezies wieder [39].

Die Schwierigkeiten in der Synthese von 1-28-N-POMC und die zunehmend fehlende Verfügbarkeit von Hypophysenextrakten nach Markteinführung von synthetischem Wachstumshormon hatten dazu geführt, dass die Bedeutung von Pro- $\gamma$ -MSH für die adrenale Mitogenese über lange Zeit nicht weiter aufgeklärt wurde.

Nachdem das 1-28-N-POMC heute aber korrekt synthetisiert werden kann, läßt sich damit der postulierte signifikante Wachstumsanstieg in unterschiedlichen Nebennieren-

zellmodellen herbeiführen. Die Bezeichnung von 1-28-N-POMC als „Adrenoproliferin“ erscheint damit gerechtfertigt [35].



**Abbildung 1.3:** 1-28-N-POMC („Adrenoproliferin“). Die korrekte Anordnung der Disulfidbrücken ist eingezeichnet.

### 1.3.5 Modell für die Interaktion von POMC und Nebennierenwachstum

Ein Modell für die Interaktion von POMC und Nebennierenwachstum könnte folgendermaßen aussehen: In den corticotropen Zellen der Hypophyse wird POMC synthetisiert. Nach posttranslationaler Prozessierung wird unter anderem ACTH sezerniert. Dieses wirkt über den bekannten ACTH-Rezeptor (MC-2-R) und induziert über Stimulierung des cAMP-Protein-Kinase-A-Transduktionsweges eine Steigerung der Steroidbiosynthese. Parallel wird aber auch 1-76-N-POMC aus der Hypophyse freigesetzt. Wie gezeigt werden konnte, spaltet bei der Ratte die AsP hiervon das mitogen aktive „Adrenoproliferin“ ab, welches über einen noch unbekanntem Rezeptor die Zellteilung vermittelt.

Mit dem Adrenoproliferin und der Protease stünde der Nebenniere ein potentes Mittel zur Autoregulation zur Verfügung. Unabhängig von Stimuli über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse könnte sie selbst Einfluß auf ihr Wachstum nehmen. In weiterer Konsequenz wäre hier auch an einen Zusammenhang mit der Nebennierentumorgengese zu denken.

Es wären mit diesem Modell aber auch einige weitere interessante klinische Beobachtungen erklärbar: So zeigen Nebennieren-Inzidentalome, bei welchen sich eine leicht vermehrte Cortisolsekretion nachweisen läßt, erstaunlicherweise im Verlauf oft keine

weitere Größenzunahme. Diese relativ häufig anzutreffende Konstellation ließe sich nun dadurch erklären, dass bei diesen Tumoren die erwähnte adrenale Protease konstitutiv überexprimiert ist und die Tumorzellen damit einen Wachstumsvorsprung gegenüber den gesunden Nebennierenzellen besitzen. Bevor das Inzidentalom aufgrund einer gesteigerten Cortisolsekretion ein manifestes Cushing-Syndrom auslösen kann, wird die hypophysäre POMC-Synthese supprimiert, womit die Quelle für 1-76-N-POMC versiegt und der entscheidende Wachstumsstimulus für den Tumor entfiel. Das Ergebnis wäre ein Nebennierentumor stabiler Größe bei subklinischem Cushing-Syndrom.

#### **1.4 Tumoröse Veränderungen der Nebennierenrinde**

Die Tumoren der NNR können unterteilt werden in *funktionell-bedingte hyperplastische* Veränderungen und in *echte* Parenchymneoplasien. Letztere werden primär nach ihrer Dignität in Adenome und Karzinome mit jeweils unterschiedlicher Hormonsyntheseaktivität eingeteilt.

Die klinische Symptomatik **cortisol-produzierender Tumoren** kann unter dem Bild des *Cushing-Syndroms* zusammengefaßt werden (u.a. zentripetale Fettsucht, die Ausbildung des sog. „Mondgesichts“, Glukoseintoleranz, Bluthochdruck und Striae rubrae distensae).

Als Ursache für den Cortisolexzess kommen in Frage: das kortikotrophe Hypophysen-Adenom (= M. Cushing; 70 %), das NNR-Adenom (7,5 %), das NNR-Karzinom (7,5 %) und ektop ACTH-bildende Tumoren (15 %). Die mit Abstand häufigste Ursache eines Cushing-Syndroms ist dagegen die iatrogene Verabreichung von Steroiden, die sich klinisch kaum von den adrenalen Cushing-Formen unterscheiden läßt [40].

**Aldosteron-produzierende Tumoren** imponieren klinisch klassischerweise durch Hypokaliämie und Hypertonie. In den letzten Jahren hat man aber erkannt, dass die Hypokaliämie ein Spätsymptom ist und die meisten Patienten eine normokaliämische Verlaufsform haben. Der primäre Hyperaldosteronismus wird als *Conn-Syndrom* bezeichnet.

**Androgen-bildende Tumoren** führen zu einem Androgen-Überschuss (u.a. Testosteron, DHEA,...). Klinische Symptome sind z.B. Hirsutismus und Virilisierung.

### 1.4.1 Das Nebennierenrindenadenom

Benigne Adenome der NNR sind nach dem 50. Lebensjahr relativ häufige, meist zufällig entdeckte Tumoren mit einer Prävalenz von 0,5 - 4,4 % [41, 42]. Entsprechend ihrer endokrinen Aktivität unterteilt man diese Tumoren in Cortisol-, Aldosteron- und Androgen-produzierende sowie endokrin-inaktive Adenome. Über die Ätiologie dieser Tumoren ist mit Ausnahme von Adenomen, die im Rahmen seltener familiär gehäufte Syndrome auftreten, wenig bekannt.

Die Prävalenz endokrin-inktiver Adenome der NNR ist im Zeitalter moderner Bildgebungsverfahren vermeintlich deutlich angestiegen und macht 80 % aller zufällig gefundenen Nebennierenraumforderungen („Inzidentalome“) aus [43, 44]. Die Mehrzahl dieser Raumforderungen weist einen Durchmesser von weniger als 2 cm auf. Eine rein histologische Unterscheidung von den endokrin-aktiven Adenomen ist nicht möglich.

### 1.4.2 Das Nebennierenrindenkarzinom

Das NNR-Karzinom ist mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2 pro 1 Million Einwohner ein seltener maligner Tumor mit einer ungünstigen Prognose [45] [46]. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei etwa 50%. Im Stadium IV beträgt das mediane Überleben ca. 12 Monate. Das Karzinom kann in jedem Alter auftreten, es gibt jedoch zwei Erkrankungsgipfel: das Kindesalter und die 5./6. Dekade. Die Pathogenese ist noch weitgehend unklar.

Klinisch sind Hormonüberschuss-bedingte Symptome führend, z.B. Cushing-Syndrom oder Hyperandrogenämie. Endokrin inaktive Karzinome äußern sich erst durch die zunehmende Raumforderung. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose haben 30% bereits metastasiert (lymphatisch, pulmonal und hepatisch, seltener ossär).

Die Diagnostik und das Staging erfolgt mittels CT, MRT oder 18-FDG-PET. Ein wichtiger Malignitätsmarker ist die Tumorgröße: Über 6 cm gilt der Tumor bis zum Beweis des Gegenteils als maligne.

Die Therapie der Wahl ist bei Malignomverdacht die (möglichst R0-)Resektion. Da das Hormonprofil für das weitere Procedere essentiell ist, sollte präoperativ unbedingt eine Hormondiagnostik erfolgen. Angesichts der hohen Rezidivrate empfiehlt sich eine adjuvante Chemotherapie mit Mitotane. Bei fortgeschrittener Erkrankung werden Mitotane + EDC (Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin) oder Mitotane + Streptozotocin eingesetzt.

Auch wenn keine Heilung der Patienten möglich ist, sollte unbedingt der Hormonexzess kontrolliert werden. Neben Mitotane stehen hierfür verschiedene Inhibitoren der Steroidbiosynthese zur Verfügung.

Ein Problem in der Therapie des NNR-Karzinoms stellte lange Zeit die sehr dünne Studienlage dar. Erst in den letzten Jahren wurden mehrere vielversprechende Projekte begonnen- u.a. die FIRM-ACT-Studie<sup>1</sup>, die SIRAC-Studie<sup>2</sup> oder das Deutsche Nebennierenkarzinom-Register (NKR)<sup>3</sup>. [45, 47]

---

<sup>1</sup> **F**irst **I**nternational **R**andomized trial in locally advanced and **M**etastatic **A**drenocortical **C**arcinoma **T**reatment

<sup>2</sup> **S**utinib **I**n **R**efractory **A**drenocortical **C**arcinoma patients; Einsatz eines Tyrosinkinase-Inhibitors

<sup>3</sup> [www.nebennierenkarzinom.de](http://www.nebennierenkarzinom.de)

## **1.5 Die Fragestellung dieser Arbeit**

Da das Verständnis der Regulation des Nebennierenwachstums von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis der Entwicklung, Physiologie und Pathophysiologie der Nebenniere ist, ist das Ziel der Arbeit, die Steuerung des Nebennierenwachstums besser zu verstehen.

Ausgehend von den Beobachtungen zum kompensatorischen Nebennierenwachstum nach unilateraler Adrenalektomie bei der Ratte sollte die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf die Regulation des menschlichen Nebennierenwachstums untersucht werden. Im Mittelpunkt stand hierbei der Nachweis des humanen und murinen Homologs für die bei der Ratte entdeckte Adrenal secretory Protease (AsP), welche nach den Untersuchungen von Bicknell et al. [34, 48] aus Pro- $\gamma$ -MSH ein adrenales Mitogen generiert.

### **Daraus ergeben sich folgende wesentliche Fragestellungen für diese Arbeit:**

1. Gibt es ein humanes Homolog der Ratten-Protease AsP? Besitzt die Maus ebenfalls ein entsprechendes Homolog?
2. Wie ist das Gen dieser Protease bei Mensch, Maus und Ratte aufgebaut und gibt es Spezies-spezifische Unterschiede?
3. Wie ist die Gewebeexpression der Proteasen bei den drei genannten Spezies?
4. Gibt es eine Interaktion der humanen Protease mit dem Nebennierenwachstum?
5. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression der humanen Protease und der Entwicklung der unterschiedlichen Nebennieren-Tumoren beim Menschen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Erwachsene männliche CD-1<sup>®</sup>-Mäuse und WISTAR<sup>®</sup>-Ratten wurden von Charles River Breeding Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Die Tiere wurden unter Standardlaborbedingungen mit einem 12-Stunden hell-dunkel-Zyklus gehalten. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, die Anzahl der benötigten Tiere sowie deren Streß möglichst gering zu halten. Alle Abläufe wurden nach den anerkannten Standards der Tierpflege durchgeführt.

### 2.2 Menschliches Gewebe

Für die Gewebeuntersuchungen kamen chirurgische Präparate von Patienten zum Einsatz, die eine Adrenalektomie erhalten hatten. Alle Patienten waren über die weitere Verwendung aufgeklärt und hatten ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg liegt vor.

Unmittelbar nach der Resektion erfolgte die Einlagerung der Gewebeproben bei -80°C. Folgende Tumorproben wurden untersucht: 15 NNR-Adenome (5 aldosteronproduzierende, 5 cortisolproduzierende und 5 hormoninaktive Adenome), 2 NNR-Hyperplasien (ein Patient mit Cushingsyndrom und ein Patient mit ektopem ACTH-Syndrom), 5 benigne Phäochromozytome und 9 NNR-Karzinome (siehe Anhang, **Tabelle 6.1**, S. 72). In allen Fällen ist die klinische Diagnose histopathologisch gesichert. Als Kontrollgewebe wurden normale Nebennieren von 5 Patienten mit *Nierentumoren* verwendet, bei denen die (tumorfreien) Nebennieren im Rahmen der Nephrektomie mitentfernt worden waren.

### 2.3 RNA-Proben

RNA-Extraktionen (s.u.) aus Mensch-, Maus- und Rattengewebe erfolgten mit dem TRIzol<sup>®</sup>-Verfahren (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder dem Oligotex<sup>™</sup>-Verfahren (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland).

Kommerziell erworbene RNA-Proben waren: Gesamt-RNA von humaner Nebenniere, Trachea, Lunge, Niere, Herz, Plazenta, Rückenmark, fetalem Gehirn, adultem Gehirn,

Kleinhirn, fetaler Leber, adulter Leber, Hoden, Prostata, Magen, Dünndarm, Kolon und Harnblase (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland). Gesamt-RNA der humanen Nebennierenrinde und des Ösophagus (von Ambion, Cambs, UK), Gesamt-RNA von humaner Zunge (von Stratagene, Amsterdam, Niederlande) und Gesamt-RNA von humaner fetaler Nebenniere (von BioCat, Heidelberg, Deutschland). Zusätzlich wurde Gesamt-RNA der humanen NNR-Karzinomzelllinie NCI-h295 extrahiert. Für die Analyse von NN-Tumorgewebe diente die kommerziell erworbene Probe von BD Clontech (Heidelberg, Deutschland) als Referenz.

### **2.4 Allgemeines zum Arbeiten mit RNA**

Beim Arbeiten mit RNA muss stets an die Gefahr des RNA-Abbaus durch sog. *RNAsen* gedacht werden. Mögliche Kontaminationsquellen sind u.a. die Haut bzw. dort ansässige Bakterien, aber auch kontaminierte Instrumente. Um die Kontaminationsgefahr möglichst gering zu halten, wurde mit puderfreien Einmalhandschuhen gearbeitet. Die Verarbeitung der Proben erfolgte in sterilen, RNase-freien Einmal-Plastikartikeln. Auf die Sauberkeit von Instrumenten wurde großer Wert gelegt, um die Gefahr von Verunreinigungen und Querkontamination zu vermeiden. Glasware kann durch Erhitzen auf 150°C über 4 Stunden RNase-frei gemacht werden. Plastikartikel werden 10 min in 0,5 M NaOH eingelegt, gut abgespült (DEPC<sup>4</sup>-Wasser) und anschließend autoklaviert. Auch die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung ist möglich.

Beim Verarbeiten des zu extrahierenden Zellmaterials wurde eine möglichst schnelle Weiterverarbeitung angestrebt, mit dem Ziel die Zellen möglichst schnell zu lysieren, denn sowohl beim TRIzol<sup>®</sup>- als auch beim Oligotex<sup>™</sup>-Verfahren kommen dann Reagenzien zum Einsatz, die die RNAsen inaktivieren (das chaotrope Guanidinium-Isothiocyanat (GIT), welches die Zellen lysiert und die Proteine von den Nukleinsäuren trennt (TRIzol<sup>®</sup>-Verfahren) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, das effizient die RNAsen denaturiert (Oligotex<sup>™</sup>-Verfahren)).

---

<sup>4</sup> Diethylpyrocarbonat. Das Agens inhibiert RNAsen irreversibel.

## **2.5 RNA-Extraktionen**

### **2.5.1 Gesamt-RNA-Extraktion mit dem TRIzol<sup>®</sup>-Verfahren**

#### **Prinzip**

TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>, Karlsruhe) ist eine monophasige Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Es stellt eine Weiterentwicklung der Single-Step RNA-Extraktionsmethode von Chomczynski und Sacchi [49] dar. TRIzol<sup>®</sup> bewahrt die RNA während der Homogenisation oder Lyse der Gewebeproben, wohingegen Zellen und Zellkomponenten zerstört bzw. aufgelöst werden. Die Zugabe von Chloroform mit anschließender Zentrifugation trennt die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA verbleibt ausschließlich in der wässrigen Phase. Diese Phase wird mehrfach gewaschen, bevor die Präzipitation der RNA mit Isopropylalkohol erfolgt. Falls erforderlich, können aus der verbleibenden wässrigen Phase anschließend in sequentieller Präzipitation noch DNA oder Proteine extrahiert werden.

Ein Vorteil des TRIzol<sup>®</sup>-Verfahrens ist die einfache Handhabbarkeit, besonders im Hinblick auf die parallele Verarbeitung vieler Einzelproben.

Da das TRIzol<sup>®</sup>-Verfahren am Ende Gesamt-RNA (also mRNA inklusive rRNA und tRNA) liefert, muss u.U. noch eine Aufreinigung z.B. mit dem Oligotex<sup>™</sup>-Verfahren<sup>5</sup> erfolgen. Dies ist aber nur selten erforderlich, z.B. bei RACE-Analysen.

#### **Ablauf**

Alle Arbeitsschritte wurden gemäß dem vom Hersteller vorgegebenen Standardprotokoll ausgeführt unter Beachtung der o.g. Regeln zum RNase-freien Arbeiten und der besonderen Arbeitsschutzmaßnahmen zum Umgang mit dem stark ätzenden TRIzol<sup>®</sup>.

### **2.5.2 mRNA-Extraktion mit dem Qiagen<sup>®</sup>-Oligotex<sup>™</sup>-Verfahren**

Das Qiagen<sup>®</sup>-Oligotex<sup>™</sup>-Verfahren zur mRNA-Extraktion macht sich die Poly-Adenylierung der eukaryontischen mRNA zunutze, die durch einen poly-A-Schwanz aus 20- 250 Adenosinresten von rRNA und tRNA differenzierbar ist. An die Adeno-

---

<sup>5</sup> Oligotex<sup>™</sup>-Handbook, Ausgabe 7/99, S.21 ff., „Oligotex<sup>™</sup> mRNA Batch Protokoll“

sinsequenz kann ein poly-dT-Anker hybridisieren. In der Vergangenheit wurde dies u.a. durch Oligo-dT-Zellulose realisiert, was aber ausgiebige Wasch- und Aufarbeitungsschritte erforderlich machte. Beim Qiagen<sup>®</sup>-System werden 1,1µm große Polystyren-Latex-Partikel als Träger für dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub>-Oligonukleotide verwendet. Die Verbindung mit dem Träger-Latex (,Oligotex<sup>TM</sup>') wird durch eine Kondensationsreaktion herbeigeführt und macht sie relativ stabil gegenüber Hitze, alkalischen Einwirkungen und Formamid. Die so gebundenen Oligonukleotide hybridisieren selektiv mit dem poly-A<sup>+</sup>-Ende der mRNAs. Die mRNA-Oligotex<sup>TM</sup>-Komplexe verbleiben nach Zentrifugation in einer speziellen Filtermembran. Nach 1- 2 Reinigungsschritten kann die Hybridisierung bei 70°C und Änderung des chemischen Milieus (Zugabe von Elutionspuffer) gelöst werden. Die Oligotex<sup>TM</sup>-Partikel verbleiben im Filter, die aufgereinigten mRNAs befinden sich im Eluat.

Bei der Durchführung des Verfahrens hielten wir uns an die vorgegebenen Arbeitsschritte im Protokoll<sup>6</sup> des Herstellers.

### **2.6 DNA-Isolation aus Blut**

Einige Analysen (z.B. Southern Blots) erfordern genomische DNA. Diese extrahierten wir aus dem Zellkern von Leukozyten mittels dem „DNA Isolation Kit for Mammalian Blood“<sup>7</sup>.

#### **Prinzip**

Das Verfahren der Firma Roche basiert auf der Separation von Leukozyten durch bevorzugte Lyse von Erythrozyten. Danach werden in Gegenwart eines stark anionischen Lösungsmittels die verbliebenen Leukozyten lysiert und die Proteine durch Dehydratation und Präzipitation entfernt. Die aufgereinigte DNA wird danach in ethanolischer Präzipitation ausgefällt.

---

<sup>6</sup> Oligotex<sup>TM</sup>-Handbook, Ausgabe 7/99, S. 53ff. „Oligotex<sup>TM</sup> Direct mRNA Protocol For Isolation of Poly-A<sup>+</sup>-mRNA from Animal Tissues“

<sup>7</sup> Cat. No. 1 667 327, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

### **Ablauf**

Es wurden 10 ml Blut eingesetzt, die beste Ausbeute gelang mit möglichst frischem Blut. Das Blut sollte ungerinnbar gemacht worden sein (z.B. mit Heparin, Citrat oder EDTA).

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten gemäß dem mitgelieferten Protokoll<sup>8</sup>.

## **2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

### **Prinzip**

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), wurde erstmals in den 1970er Jahren in einem norwegischen Labor theoretisch erdacht, aber zunächst nicht weiterverfolgt. Entwickelt wurde das Verfahren erst 1985 von Kary Mullis (USA)<sup>9</sup> [50]. Kleinste Mengen von DNA können nachgewiesen werden, durch Modifikation des Verfahrens aber u.a. auch RNA (s.u.). In einer Kettenreaktion wird die gesuchte Zielsequenz millionenfach amplifiziert und ist in dieser Konzentration nachgeschalteten Nachweisverfahren (z.B. Gelelektrophorese, siehe *Abs. 2.8*) gut zugänglich.

### **2.7.1 Die PCR-Reaktion**

Eine PCR-Reaktion verläuft prinzipiell in 3 Schritten: *Denaturierung*, *Annealing* und *Extension*.

Das Basis-Reaktionsmix beinhaltet die sog. Primer (forward und reverse) (s.u.), die 4 Desoxyribonukleinsäuretriphosphate („dNTPs“) in ausreichender Menge, die Template-DNA sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die Reaktionsgemische werden in Microtubes pipettiert und zur Reaktion in den sog. *PCR-Cycler* verbracht. Dieses Gerät steuert durch Änderung der Reaktionstemperatur jeweils die entsprechenden Reaktionsphasen. Die PCRs im Rahmen dieser Arbeit wurden größtenteils in einem Mastercycler gradient<sup>®</sup> (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Im folgenden werden die ablaufenden Reaktionsmechanismen näher erläutert. *Tabelle 2.1* zeigt den schematischen Reaktionsablauf. *Abbildung 2.1* dient zur Illustration der Vorgänge auf molekularer Ebene.

---

<sup>8</sup> Version 1, August 1999

<sup>9</sup> Kary Mullis: Nobelpreis für Chemie 1993, für die Entwicklung der PCR.

	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer
(I)	Reverse Transkription (s.u.)	50°C	30 min
II	Inaktivierung der RT-Reaktion und Aktivierung der PCR-Reaktion	95°C	15 min
III	 Cycling (25- 40 Zyklen): - Denaturierung - Annealing - Extension	94°C 65°C*) 72°C	30- 60 sek 30- 60 sek 60 sek
IV	Finale Extension	72°C	10 min

\*) siehe unten: abhängig vom verwendeten Primer

**Tabelle 2.1: Reaktionsschritte einer PCR bzw. RT-PCR.** Das „Basisprotokoll“ der PCR umfaßt die Schritte II- IV. Die RT-PCR wird weiter unten erläutert. Bei ihr ist die sog. *Reverse Transkription* vorge-schaltet.

### Denaturierung

Üblicherweise liegt DNA als Doppelstrangmolekül vor. Eine Neusynthese von DNA kann jedoch nur an Einzelsträngen stattfinden. Die Auftrennung in Einzelstränge erfolgt bei der PCR durch Erhitzen auf ca. 94°C für etwa 1 min. (In vivo geschieht dies in der Zelle mit entsprechenden Enzymen.)

### Annealing

Die Primer lagern sich an ihre komplementären Zielsequenzen der DNA-Einzelstränge. Der Schritt dauert ca. 1 min.

### Extension

Die Extension oder DNA-Synthese beginnt an den Primern und wird enzymatisch von DNA-Polymerasen ausgeführt. Sehr häufig wird bei PCRs die sog. *Taq-Polymerase* („**T**hermus-**a**quaticus“-Polymerase) verwendet. Sie stammt ursprünglich aus thermophi-len Bakterien in geothermalen Quellen und ist hitzestabil. Die Polymerasen „normaler“ eukaryontischer Zellen oder die des Menschen eignen sich nicht für PCRs, weil sie den notwendigen Denaturierungsschritt mit Temperaturen von fast 100°C nicht überstehen würden. Das Reaktionsoptimum der Taq-Polymerasen liegt bei ca. 70°C.

Die DNA-Neusynthese erfolgt immer stromabwärts von 5' nach 3'. Dauer der Extensi-on: ca. 1 min.

### **Weiterer Ablauf**

Eine „Standard-PCR“ beinhaltet 20-40 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Extension. In jedem Zyklus dienen die zuvor neusynthetisierten DNA-Moleküle bereits selbst als Matrizen, an denen sich Primer anlagern können. Die Anzahl der Kopien wächst damit (theoretisch) exponentiell mit jedem Zyklus (nach  $n$  Zyklen  $2^n$  Kopien).

Die Auswertung von PCR-Analysen erfolgt üblicherweise in einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (siehe **Abs. 2.8**): Die vielfach amplifizierte Kopien der Zielsequenz bilden hier eine solide Bande. Bei speziellen Fragestellungen (z.B. Sequenzanalysen) kann diese Bande ausgeschnitten werden und eine Sequenzierung (siehe **Abs. 2.12**) der DNA-Kopien erfolgen.

### **Primer**

Entscheidend für eine effektive PCR ist die Konstruktion der Primer. Das *Primerpaar* flankiert die Zielsequenz in der Ausgangs-DNA.

Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide von optimalerweise 18- 30 Nukleotiden Länge und einem G/C-Gehalt von 40- 60%. Beim Primerdesign müssen mehrere Faktoren beachtet werden:

- **Primersequenz:** Der 5'-Primer („forward-Primer“) besteht aus der identischen Abfolge der Nukleotide am 5'-Ende der Zielsequenz, der 3'-Primer („reverse-Primer“) muss revers-komplementär zum 3'-Ende der Sequenz lauten.
- Die **Schmelztemperatur** ( $T_m$ ) des konstruierten Primers. Sie errechnet sich näherungsweise nach der Formel:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})^{10}$$

Die Schmelztemperaturen beider Einzelprimer sollten nicht zu weit auseinander liegen.

- **Annealingtemperatur:** Sie liegt optimalerweise ca.  $5^\circ\text{C}$  unter der  $T_m$  der Primer. Bei komplexen Versuchsreihen sollte die optimale Annealingtemperatur im Vorfeld in einer sog. *Gradienten-PCR* exakt ermittelt werden!

---

<sup>10</sup> Im Internet verfügbare Tools errechnen nach Eingabe der Primersequenz die zu erwartende  $T_m$ .

### 2.7.2 Praktische Durchführung

PCR-Analysen führten wir mit dem Qiagen<sup>®</sup> PCR Core Kit (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland, Cat. No. 201223) durch. RT-PCRs mit dem OneStep-RT-PCR-Kit der Firma Qiagen<sup>®</sup> (Cat. No. 210212). Es wurde nach den mitgelieferten Protokollen gearbeitet-grundsätzlich kamen die „Q-Solution“-Protokolle<sup>11</sup> zum Einsatz. Hierdurch ließ sich stets eine bessere Ausbeute erzielen (eigene Vergleichsdaten liegen vor).

- Ermitteln der optimalen Annealingtemperatur mit Hilfe eines Gradienten-Cyclers.
- Extra-Zugabe von Mg<sup>2+</sup>.
- Einsatz von sog. *Q-Solution*<sup>11</sup> bei Qiagen-Systemen
- Einsatz optimaler Primer (Länge, GC-Gehalt, Schmelztemperatur, ...).
- Veränderung der Zyklenzahl (Cave: je mehr Zyklen, desto mehr Hintergrundamplifikation!)
- Touchdown-PCR<sup>12</sup>

**Info.** *Optimierungsmöglichkeiten bei PCRs.*

**Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf einer PCR.** **A** - Die (doppelsträngige) Ausgangs-DNA. Der Plusstrang ist weiß, der Minusstrang schwarz dargestellt. **B** - Erster Zyklus der PCR-Reaktion. Alle Einzelschritte sind dargestellt. Die Primer tragen ein schachbrettartiges Muster. Die Amplifikation erfolgt stromabwärts in 5' ⇒ 3'- Richtung (siehe Pfeilspitzen an den neu gebildeten Strängen). Die neu gebildeten Stränge sind schwarz bzw. weiß gepunktet. *Die Farbgebung der Einzelstränge wurde jeweils in allen Abbildungsteilen beibehalten, um ihren Weg nachvollziehbar zu machen.* **C** - Resultat des 2. PCR-Zyklus. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Einzelschritte verzichtet: Sie sind analog zum ersten Zyklus. Außerdem wurden lediglich die im vorigen Zyklus *neu* gebildeten DNA-Stranghälften weiter dargestellt. **D** - Stand nach dem 3. Zyklus. Auch hier sind nur die in C neu gebildeten Stränge weiterverfolgt. Wenngleich auch die restlichen, in B und C dargestellten ursprünglichen Einzelstränge weiterhin mitamplifiziert werden- allerdings nimmt ihre Anzahl nur *linear* zu. Demgegenüber liegen ab dem 3. Zyklus DNA-Fragmente vor, die an beiden Enden von Primern begrenzt sind. Ihre Anzahl steigt theoretisch *exponentiell* und beträgt so nach n Zyklen rechnerisch 2<sup>n</sup>.

<sup>11</sup> Das „Q-Solution“-Additiv soll das Schmelzverhalten von Nukleinsäuren positiv beeinflussen.

<sup>12</sup> Bei der Touchdown-PCR wird mit Annealingtemperaturen oberhalb der Schmelztemperatur der Primer begonnen, die Temperatur wird dann in den folgenden Zyklen schrittweise in den Bereich der normalerweise üblichen Annealingtemperatur gesenkt. Hierdurch werden anfangs die hochspezifischen Primer-Template-Bindungen gegenüber unspezifischen Bindungen bevorzugt, was zu einer Erhöhung der Ausbeute der gesuchten Zielsequenz führt.

2. Material und Methoden



**A**

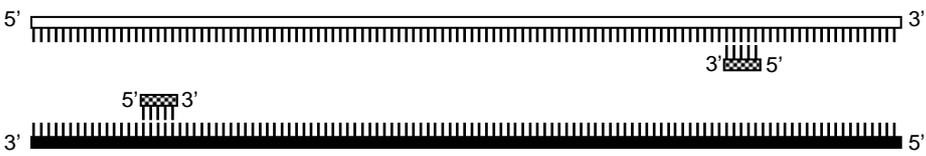


1. Zyklus

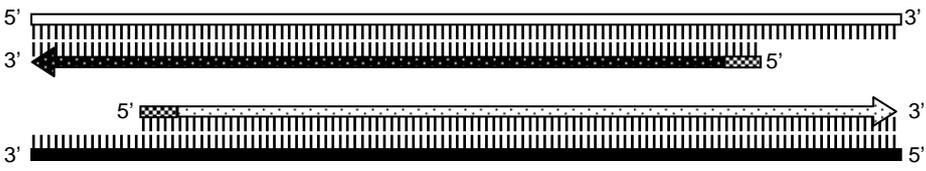


Denaturierung

Primer



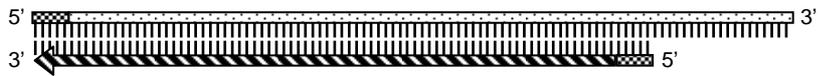
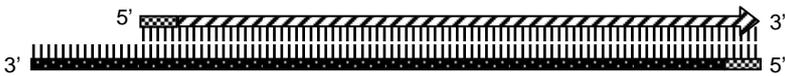
Annealing



Elongation

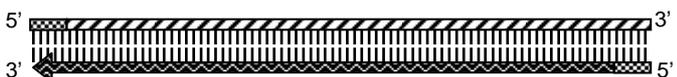
**B**

2. Zyklus...



**C**

3. Zyklus...



**D**



USW...

### 2.7.3 Weitere PCR Anwendungen

Es existieren zahlreiche Modifikationen des PCR-Basisverfahrens. Die in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren sollen hier kurz vorgestellt werden:

#### **RT-PCR**

Der RT-PCR kam in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Bedeutung zu. Durch Analyse der mRNAs einer Zelle erhält man einen Einblick, welche Genom-Abschnitte von der Zelle tatsächlich genutzt werden. Denn nur diese DNA-Abschnitte werden in mRNAs transkribiert und danach in Proteine translatiert.

Die RT (Reverse Transkriptase)-PCR dient dem Nachweis von *RNA*-Zielsequenzen. Die in einer Probe enthaltenen RNAs werden vorab durch ein Reverse-Transkriptase-Enzym in DNA umgeschrieben und können danach mit den bekannten Werkzeugen der PCR analysiert werden.

Wir benutzten das „OneStep, one tube“-Verfahren der Firma Qiagen<sup>®</sup>. Bei „One tube“-Verfahren erfolgen alle Reaktionen in einem einzigen Tube. Bei „OneStep“-Verfahren sind keine Zwischenschritte (z.B. Umpipettieren) notwendig. Alle Reagenzien werden in das Tube vorgelegt, im Cycler erfolgt die Reaktion ohne weitere Unterbrechung. (Bei Two Step/ Two Tube-Verfahren erfolgt zunächst die Reverse Transkription, aus dem Produkt wird ein zweites Reaktionsmix pipettiert, mit dem die PCR ausgeführt wird.) One-Step/One-Tube-Verfahren bieten methodisch-bedingt geringere Kontaminations- und Fehlerraten, auch entfallen Verluste durch zusätzliche Pipettierschritte. Eigene Vergleichsstudien bestätigten eine hohe Ausbeute mit dem „OneStep, one tube“-Verfahren. Die entsprechenden Ergebnisse aus einem Vergleich mehrerer Hersteller und Verfahren sind am Ende dieses Kapitels (siehe *Abs. 2.7.5*) kurz zusammengestellt.

Im Qiagen<sup>®</sup>-Kit kommt ein Enzym-Mix aus zwei Reversen Transkriptasen zum Einsatz: Die Omniscript<sup>™</sup>-RT ist für RNA-Mengen > 50 ng optimiert, die Sensiscript<sup>™</sup>-RT hat ihr Optimum bei kleineren RNA-Mengen. Somit ist, lt. Hersteller, ein Einsatzbereich von 1 pg bis 2 µg RNA-Menge abgedeckt. Bei unseren RT-PCRs setzten wir i.d.R. 500 ng Gesamt-RNA ein.

Die Reversen Transkriptasen kehren, vereinfacht dargestellt, den physiologischen Prozeß der Transkription um, die in einer Probe vorhandenen RNAs werden (unselektiv) in

cDNAs ‚revers transkribiert‘ und können danach als Templates einer PCR dienen. Erst die PCR ist dann hochspezifisch für die gesuchte Zielsequenz.

Die Reverse Transkription erfolgt beim Qiagen<sup>®</sup>-System über ca. 30 min bei einem Temperaturoptimum von 50°C. Für die anschließende PCR muss eine Änderung des Reaktionsmilieus vollzogen werden- beim Qiagen<sup>®</sup>-Verfahren geschieht dies durch Anheben der Reaktionstemperatur auf 95°C für 15 min. Hierbei werden die Reversen Transkriptasen inaktiviert und zugleich die HotStarTaq<sup>™</sup>-DNA-Polymerase aktiviert. Außerdem erhöht der Zwischenschritt die Spezifität, durch Lösen unspezifisch erfolgten Annealings.

Die weiteren Reaktionsschritte entsprechen der Standard-PCR-Reaktion (s.o.)

### 2.7.4 Q-PCR oder Realtime-PCR

Die ursprüngliche PCR ist ein *qualitatives* Verfahren, das z.B Aufschluß darüber gibt, ob eine Zielsequenz in einer Probe vorhanden ist. Ggf. kann anhand der Stärke einer Bande im Agarosegel *semi-quantitativ* abgeschätzt werden, ob die Zielsequenz in hoher oder niedriger Konzentration in einer Probe vorliegt. Mit einer Modifikation der PCR, der sog. Q-(quantitativen) PCR (auch „Realtime-PCR“ genannt), ist es möglich, quantitative Aussagen über eine Zielsequenz zu erhalten. Hierbei wird mittels Fluoreszenz oder radioaktiver Markierung in Echtzeit („Realtime“) während der Reaktion die Anzahl der Kopien detektiert und gegen einen Standard normalisiert.

Wir führten die Realtime-PCR mit kommerziell erhältlichen HAT- und 18s-spezifischen FAM-dye-gelabelten TaqMan MGB-Sonden (Assays on Demand Gene Expression Products; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems) aus. Jede Reaktion hatte ein Volumen von 25 µl und wurde in einem Dreifach-Ansatz ausgeführt. Es wurden 250 ng Gesamt-RNA für die Gewebeexpressions-Analysen eingesetzt und bis zu 500 ng für die Analyse der unterschiedlichen Nebennierengewebe. Die vom Hersteller empfohlenen Cycling-Parameter wurden übernommen (2 min 50°C, 10 min 95°C, 50 Zyklen mit 15s/ 95°C und 1 min/ 60°C). Als Cycler kam ein iCycler Thermocycler (BioRad, München, Deutschland) zum Einsatz und die Ergebnisse wurden mit der Software ‚iCycler iQ Real Time Detection System‘ ausgewertet. Die Expressionshöhe jeder Variante wurde durch Vergleich mit Standardkurven bestimmt, welche durch eine Vierfach-Dilutions-Serie mit humaner Trachea-cDNA (Becton Dickinson) erstellt wurden. Als endogene Kontrolle wurde eine Quanti-

fizierung mit 18s in separaten Tubes geführt. Alle Ergebnisse wurden gegen die 18s-Expression normalisiert.

### 2.7.5 Exkurs: Vergleich verschiedener RT-PCR-Kits

Die RT-PCR stellt ein zentrales Verfahren dieser Arbeit dar. Vielfältige Systeme und Kits sind erhältlich und so standen wir zu Beginn vor der Frage, welches System das am besten geeignete sei. Im folgenden eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse.

Wichtige Auswahlkriterien waren Ausbeute, Handhabung und Kontaminationsmöglichkeiten. Sowohl One-Step- als auch Two-Step-Verfahren kamen zum Einsatz.

Wir führten mit jedem Kit 2 Reaktionen durch: Zunächst eine Amplifikation des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin. In einer 2. Reaktion kam ein Primerpaar für die RAT2-Sequenz zum Einsatz, mit dem später auch unsere Untersuchungen erfolgen sollten. Als Probenmaterial dienten mRNA-Extrakte zweier Ratten-Nebennieren.

### 2.7.6 Die Kits und Reaktionen im Überblick

#### **Getestete RT-PCR-Kits**

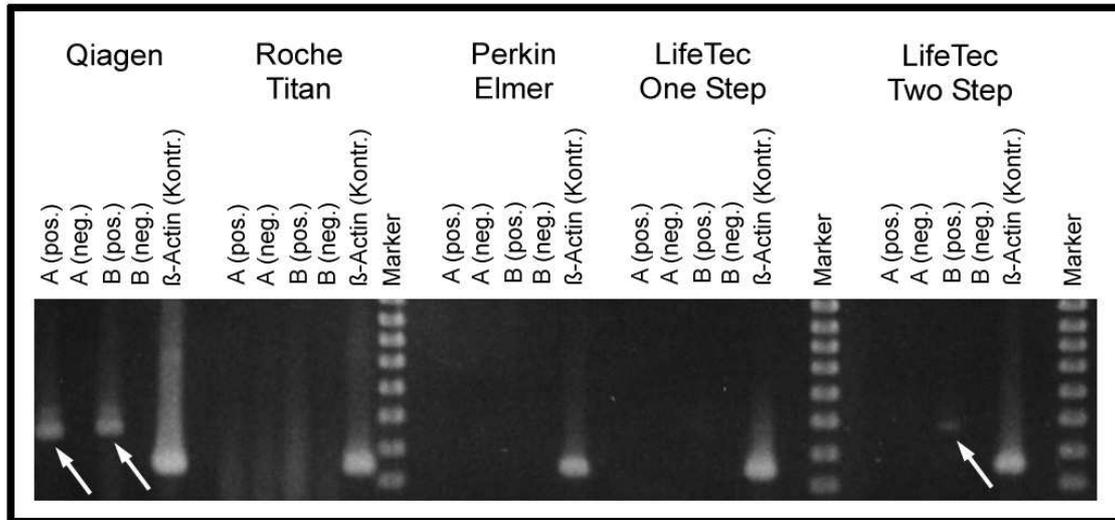
- Qiagen<sup>®</sup> One-step-RT-PCR-Kit (*Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland*)
- PerkinElmer<sup>®</sup> GeneAmp<sup>™</sup>, Two-Step-Verfahren (*PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland*)
- Roche<sup>®</sup> Titan<sup>™</sup> RT-PCR-Kit, One-Step-Verfahren (*Roche, Mannheim, Deutschland*)
- Lifetec<sup>®</sup> One-Step-RT-PCR-Kit (*Lifetec/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*)
- Lifetec<sup>®</sup> Two-Step-RT-PCR-Kit (*Lifetec/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*)

Wir hielten uns bei allen Systemen an die vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten Protokolle. Die Reaktionen wurden in einem MasterCycler Gradient (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Die RT-PCR-Reaktionen waren bei allen 5 Systemen korrekt abgelaufen ( $\beta$ -Actin-Positivkontrollen sowie die Negativkontrollen waren einwandfrei). Wir erhielten jedoch lediglich bei Qiagen<sup>®</sup> und Lifetec<sup>®</sup> Two-Step ein RAT2-Signal (siehe **Abbildung 2.2**). Bei Lifetec<sup>®</sup> nur in einer der beiden RAT2-Spuren, bei Qiagen<sup>®</sup> liegt das Signal in beiden Positivspuren sehr deutlich vor.

**Fazit:** Das Qiagen<sup>®</sup>-One-step-Verfahren ist sehr einfach zu handhaben und liefert in unserem Vergleich auch die beste Ausbeute. Wir führten deshalb die RT-PCRs dieser Arbeit mit diesem Verfahren durch.

### 2.7.7 Ergebnis



**Abbildung 2.2: Vergleich von fünf verschiedenen kommerziell erhältlichen RT-PCR-Systemen.** Als Proben wurden 2 verschiedene (A/B) Ratten-Nebennierenewebe verwendet, als Primer kam ein RAT2-Primer sowie zur Kontrolle ein  $\beta$ -Actin-Primer zum Einsatz. Mit jedem Kit wurde eine RAT2-Positiv- und Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase) gecyclt sowie eine  $\beta$ -Actin-Positivkontrolle. Alle Systeme haben funktioniert und ergaben jeweils eine kräftige  $\beta$ -Actin-Amplifikation. Große Unterschiede gab es hingegen bei den RAT2-PCRs, bei denen nur 2 Hersteller verwertbare Reaktionsprodukte erzeugten (weiße Pfeile).

## 2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Endprodukte von PCRs, RNA-Extraktionen u.a. wurden auf ein 1,5%iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Es kamen handelsübliche Loading-Dyes und Marker zum Einsatz. Im Gleichspannungsfeld wurde das Gemisch aus Nukleinsäuren nach Größe und Ladung in verschiedene Banden aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer *Canon-PowerShot-G1-Kamera* dokumentiert.

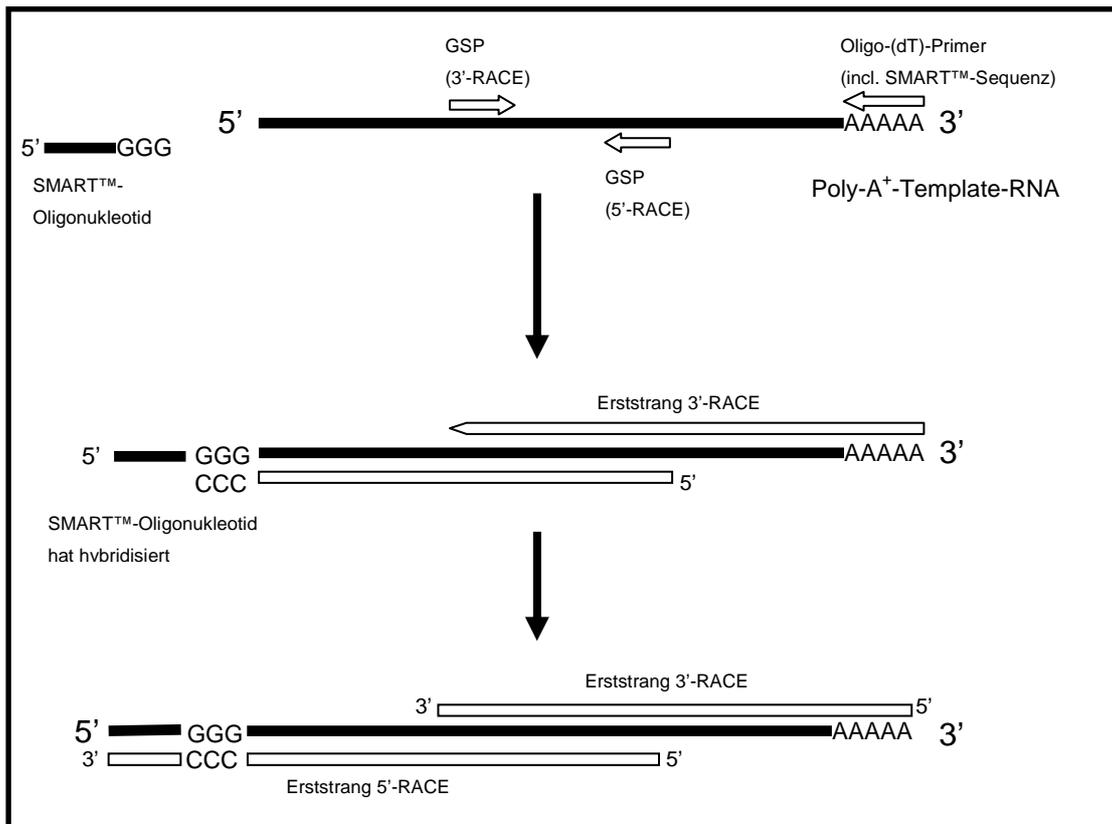
## 2.9 Rapid Amplification of cDNA Ends ('RACE')

Viele molekularbiologische Analysen von Genen und Genregionen setzen die genaue Kenntnis der kompletten cDNA-Sequenz eines Gens/ einer Genregion voraus. Aus einem nur zum Teil bekannten Sequenzabschnitt kann mittels „RACE“ die Sequenz komplett bis zum 5'- und/ oder 3'-Ende amplifiziert werden. In einem Folgeschritt ist es möglich, die komplette cDNA zu klonieren (durch Zusammenfügen der beiden Teilstü-

cke aus 5'- und 3'-RACE an einer Restriktionsstelle oder durch End-zu-End-PCR, beginnend am neu entschlüsselten 5'-Ende).

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir das SMART™<sup>13</sup> RACE cDNA Amplification Kit (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland) und hielten uns bei der Durchführung an das mitgelieferte Protokoll des Herstellers. Der Ablauf soll hier kurz umrissen werden:

### 2.9.1 Ablauf einer RACE



**Abbildung 2.3: RACE: Mechanismus der SMART™-cDNA-Synthese<sup>14</sup>.** Die Erststrangsynthese für die 3'-RACE wird mit einem modifizierten Oligo(dT)-Primer gestartet, welcher die SMART™-Sequenz beinhaltet. Sie läuft bis zum „Gen-spezifischen Primer“ (GSP). Die 5'-RACE beginnt an einem GSP und läuft bis zum Ende der RNA-Vorlage. Dort fügt die RT selbständig einige dC-Reste ein, an die das SMART™-Oligonukleotid hybridisiert. Nach einem *Template Switching* überträgt die RT dann die SMART™-Sequenz an das Ende der neuen cDNA.

<sup>13</sup> **S**witching **M**echanism **A**t 5' end of **R**NA **T**ranscript

<sup>14</sup> Nach: BD Clontech „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual“, Cat.-No. K1811-1, Ausgabe: 5.01.2001

Die RACE basiert auf den Mechanismen der PCR. Allerdings ist bei der RACE nur *eine* flankierende Sequenz bekannt, das kontralaterale Ende wird durch die RACE ermittelt. Unser Ausgangsmaterial war Gesamt-RNA, aus der wir mit dem Qiagen® Oligotex™ Direct mRNA-Kit zunächst Poly-A<sup>+</sup>-RNA generierten, was die Effizienz des Verfahrens deutlich steigert. Mit 0,5µg dieser Poly-A<sup>+</sup>-RNA erfolgte die „Erststrangsynthese“, bei der die RNA in „RACE-taugliche“ cDNA umgeschrieben wird. Man unterscheidet zwischen einer 5'- und einer 3'- RACE. Die Reaktionen der Erststrangsynthese weichen geringfügig voneinander ab:

Die Herstellung des Erststrangs für die **5'-RACE** (siehe **Abbildung 2.3**) erfordert eine besondere Funktionalität der Reversen Transkriptase (RT). Beim RACE-System von Clontech wird die reverse Transkription von der PowerScript™-MMLV Reversen Transkriptase übernommen. Ein Gen-spezifischer Primer („GSP“) <sup>15</sup>, der sich innerhalb der bereits bekannten Sequenz befindet, bildet den Transkriptionsstartpunkt. Die Reverse Transkription erfolgt nun stromaufwärts in 3' ⇨ 5'-Richtung. Eine spezielle Funktionalität der PowerScript™-Reversen Transkriptase generiert am 5'-Ende der Sequenz einen Primer-Andockpunkt: Die *terminale Transferase-Aktivität*, sowie die sog. *SMART™-Technologie*: Sobald die RT das 5'-Ende der Vorlage erreicht, werden selbständig 3- 5 dC-Reste angefügt. An diese kann das im Reaktionsmix enthaltene SMART™-Oligonukleotid hybridisieren (poly-G-Schwanz). Jetzt vollzieht die PowerScript™-RT ein sog. *Template-Switching*, d.h., sie benutzt nun das neu hybridisierte SMART™-Oligonukleotid als Template und hängt dessen Sequenz an das Ende der cDNA an. Das Resultat der 5'-RACE-Erststrangsynthese ist also eine cDNA, die an beiden Enden eine bekannte Sequenz trägt: Am 5'-Ende die GSP-Sequenz, am 3'-Ende die SMART™-Sequenz.

Bei der **3'-RACE** gestaltet sich die Erststrangsynthese etwas einfacher: Die verwendete poly-A<sup>+</sup>-RNA trägt am 3'-Ende eine bekannte Sequenz: den poly-A<sup>+</sup>-Schwanz. An ihm kann mit einem Oligo-dT-Primer (der zusätzlich auch die SMART™-Sequenz beinhaltet) auf einfache Weise die RT gestartet werden. Den Endpunkt bildet ein GSP innerhalb der bekannten Sequenz (siehe **Abbildung 2.3**).

---

<sup>15</sup> Die Sequenzen der GSPs sind in *Tabelle 6.3* im Anhang (*S. 74*) dargestellt. Die Universalprimer für die SMART™-Sequenz sind im RACE-Kit enthalten.

Der zweite Teil der RACE-Reaktion gleicht einer *konventionellen* PCR. Die cDNAs der Erststrangsynthese tragen zwei bekannte flankierende Sequenzen, die als Andockstellen für Primer fungieren<sup>16</sup> (siehe *Abs. 2.12*).

## **2.10 Southern Blot**

### **2.10.1 Prinzip**

Der Southern Blot weist mittels sog. Sonden (in Form von DNA, RNA oder Plasmiden) eine DNA-Zielsequenz in einer Ausgangs-DNA qualitativ und semiquantitativ nach. Die Sonden hybridisieren dabei an die komplementären DNA-Sequenzabschnitte der auf eine Trägermembran geblotteten Ausgangs-DNA.

#### ***Schematischer Ablauf:***

Die Ausgangs-DNA wird zunächst in einem Restriktionsverdau in Teilstücke aufgespalten und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die folgenden Schritte muss die DNA auf einer Nylonmembran dauerhaft fixiert werden. Diesen Vorgang nennt man „Blotting“. Hierzu wird eine Nylonmembran auf das Agarosegel gelegt. Durch Kapillarkraft wird nun Pufferlösung aus einer Vorratswanne durch Gel und Membran in einen Stapel saugfähiger Tücher gesogen. Die Nukleinsäuren werden so an die Membranoberfläche transportiert und heften sich dort an. Eine anschließende kurze Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (254 nm) sorgt dafür, dass sich ein kleiner Teil der DNA-Basen mit den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran verbindet, und die DNA irreversibel fixiert bleibt (sog. *Crosslinking*).

Die so immobilisierten DNA-Fragmente werden anschließend mit einer markierten („gelabelten“) Sonde *hybridisiert*. Gelabelte Sonden tragen ein funktionelles Molekül, das sie mittels Radioaktivität, Chemilumineszenz oder auf enzymatischer Ebene detektierbar macht. Qualitativ bzw. semiquantitativ erkennt man dann, ob und wo eine Hybridisierung stattgefunden hat.

Um die geblotteten DNAs mit verschiedenen Sonden untersuchen zu können, müssen Nylonmembranen nach erfolgter Auswertung „gestrippt“ werden. Die hybridisierten

---

<sup>16</sup> Anm.: Keine cDNA-Synthesemethode kann eine 100% vollständige cDNA garantieren. Wird Wert auf größtmögliche Genauigkeit gelegt, sollten, vor allem bei 5'-RACEs, jeweils 5- 10 Proben parallel sequenziert und verglichen werden.

Sonden werden dabei wieder gelöst und die Membranen (mit den Ausgangs-DNAs) stehen für weitere Hybridisierungen bereit.

### 2.10.2 Spezifikationen unserer Southern Blots

Der Restriktionsverdau erfolgte in drei parallelen Ansätzen mit den Enzymen „Dra I“, „Ssp I“ und „Xba I“. Sie schneiden die DNA des Menschen und der Nager in Fragmente von ca. 1000- 4000 bp Länge (Man beachte: keinesfalls sollte die DNA-Zielsequenz, hier also die HAT- oder RAT-Region, eine Schnittstelle für das eingesetzte Restriktionsenzym bieten!<sup>17</sup>).

Das Labeling der (RNA-)Sonden erfolgte mittels „DIG-Labeling“, bei dem die DIG (Digoxigenin)-Gruppe angehängt wird. Sie stellt einen „universellen Andockpunkt“ dar, an den je nach gewünschter Detektionsmethode (Radioaktivität, Chemolumineszenz, enzymatisch,...) wiederum ein entsprechendes Funktionsmolekül gekoppelt (Antigen-Antikörper-Reaktion) wird. In dieser Arbeit kam der „DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)<sup>18</sup>“ zum Einsatz, da unsere Zielsequenzen in einem TOPO<sup>®</sup>-Plasmid (s.u.) mit viralem Promotor (SP6, T7) vorlagen. Wir hielten uns an das mitgelieferte Protokoll.

Die **Hybridisierung** erfolgte in DIG-EasyHyb-Lösung<sup>19</sup>. Vorgehen nach Herstellerprotokoll.

**Detektiert** wurde mit dem CSPD-Verfahren<sup>20</sup>. Es handelt sich um ein *Chemolumineszenz-Verfahren*. CSPD wird von Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und in ein metastabiles Phenolat-Anion überführt. Beim Zerfall dieses Anions wird Licht mit einer maximalen Wellenlänge von 477 nm emittiert. Die Lumineszenz hält für mindestens 48 Stunden an und kann in dieser Zeit mit speziellen Detektoren (z.B. Lumi-Imager) oder auch mit einem Röntgenfilm festgehalten werden. Die Belichtungszeit liegt bei 15- 25 min.

---

<sup>17</sup> Im Internet verfügbare Softwaretools zeigen z.B. nach Eingabe einer Sequenz alle enthaltenen Schnittstellen für bestimmte Enzyme an.

<sup>18</sup> Cat. No. 1 175 025, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

<sup>19</sup> Cat.-No.: 1 603 558, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

<sup>20</sup> CSPD, ready to use, Cat.-No. 1 755 633, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

### **2.11 Immunhistochemie**

Wir verwendeten einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen die AS 23-47 („DQDTENVLTQECGARPDLITLSEER“<sup>21</sup>) des vollständig translatierten Produkts von RAT2 [34]. Sowohl die kurze als auch die lange Isoform enthalten dieses Peptid. Außerdem ist es zu 100% konserviert zwischen Maus und Ratte. Der Antikörper erkennt also die AT-Isoformen in beiden Spezies.

Longitudinale Gefrierschnitte (10µm) von Maus- und Rattenembryonen, von Maus-Zunge und -Ösophagus wurden bei Zimmertemperatur 2 Stunden mit 3%igem normalem Ziegenerum in 0,5X PAT (1X NaCl/ P<sub>i</sub>, 1% Albumin, 0,5% Triton X-100) geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit Anti-RAT2-IgG (10µg\*µl<sup>-1</sup> in 0,5X PAT) inkubiert. Nach 3maligem Waschen mit NaCl/P<sub>i</sub>, wurden die Schnitte für 2 h bei Raumtemperatur mit einem Cy2 (Cyanin 2-OSu bisfunktional)-konjugierten affinitätsgereinigten Ziegen-Anti-Kaninchen IgG (1:50; Rockland, Gilbertsville, PA) in 0,5X PAT inkubiert. Nach intensivem Waschen Betrachtung der Schnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Solms, Deutschland), Fotodokumentation mittels Pixera-Kamera. Die Spezifität der MAT-Immunreaktion wurde durch Weglassen des primären Antikörpers und durch Verwendung des o.g. Peptids als Blocking-Peptid verifiziert. Wir inkubierten 100µg Peptid mit MAT-Antikörper (1:500) in einem Gesamtvolumen von 500µl für 2 h bei Raumtemperatur vor der Applikation auf die Schnitte.

### **2.12 Sequenzierung von DNA**

Bei unseren Untersuchungen lagen DNA-Proben nach einer PCR oder RACE gelelektrophoretisch getrennt vor. Die interessierende Bande wird ausgeschnitten und in einer Millipore-Säule<sup>22</sup> durch Zentrifugation vom Gel extrahiert. Nach ethanolischer Fällung (siehe **Tabelle 2.2**) und Trocknen ist die Probe „versandfertig“. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte in einem kommerziellen Labor.

---

<sup>21</sup> Der Antikörper wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Andrew Bicknell, University of Reading.

<sup>22</sup> Ultrafree®-DA, Cat.-No. 42600, Millipore-Corp., Eschborn, Deutschland

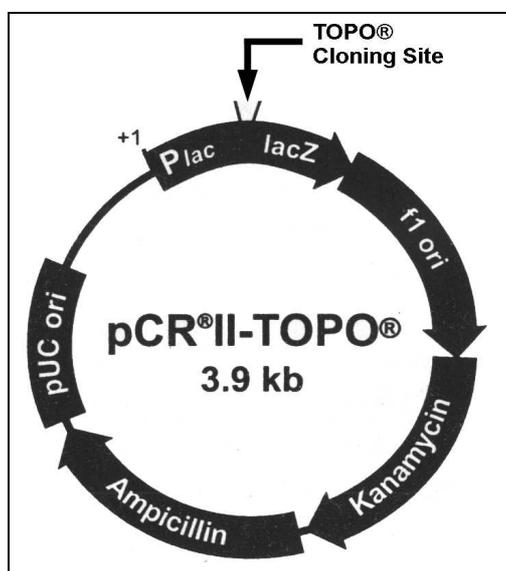
Ethanolische Fällung	
20 µl	gelöste DNA (z.B. aus Millipore oder MiniPrep)
2 µl	3M NaAc (= 1/10 Probenvolumen)
40 µl	100% EtOH (= 2x Probenvolumen)

Tabelle 2.2: Ansatz zur ethanolischen Fällung von Plasmiden u.a. Nukleinsäuren

### 2.13 Klonierung von DNA

Die Klonierung von DNA erfolgte mit dem TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit<sup>23</sup>. Die zu vervielfältigende Sequenz wird hierbei in den Vektor „pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>“ (siehe *Abbildung 2.4*) eingebaut. Wir hielten uns an das mitgelieferte Protokoll.

Die Vektoren werden in einer sog. *Über-Nacht-Kultur* auf bakterieller Ebene vervielfältigt und danach in einer sog. *MiniPrep*<sup>24</sup> extrahiert. Die TOPO<sup>®</sup>-Plasmide liegen danach in wässriger Lösung vor. Vor der endgültigen Einlagerung sollten die Proben einer Qualitätskontrolle<sup>25</sup> unterzogen werden, denn ein Teil der Ansätze führt zu keiner verwertbaren DNA!



**Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektors.**

An der TOPO<sup>®</sup> Cloning Site werden die zu vervielfältigenden Produkte einkloniert.

Nach: TOPO<sup>®</sup>-Cloning-Kit-Manual, S. 11.

<sup>23</sup> Cat.-No. K4650-01, Invitrogen, Paisley, UK

<sup>24</sup> QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland)

<sup>25</sup> Eine kleine Probenmenge wird z.B. mit EcoRI verdaut. Hierbei wird die einklonierte DNA-Sequenz aus dem TOPO<sup>®</sup>-Vektor herausgeschnitten und kann einer Agarose-Gelelektrophorese zugeführt werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 *Isolation und Sequenzanalyse der cDNA-Klone von RAT, MAT und HAT*

Ausgehend von der bereits veröffentlichten cDNA-Sequenz der Adrenal secretory Protease (AsP) der Ratte, suchten wir u.a. mittels *BLASTn* in der Public-Domain-Datenbank *GenBank*<sup>TM</sup> nach ähnlichen Sequenzen im Genom der Ratte und anderen Spezies. Wir erhielten einen EST<sup>26</sup>-Klon, der aus Lungengewebe der Maus isoliert worden war (*dbEST BF143606*), sowie weitere genomische Sequenzen der Maus und auch des Menschen, welche der Ratten-AsP sehr ähnlich sind. Die humane Sequenz (Human Airway Trypsin-like Protease, „HAT“) und das zugehörige Protein des EST-Klons der Maus wiesen eine hohe Homologie auf. Mit der AsP zeigten beide eine starke Ähnlichkeit im C-Terminus.

In Analogie zu HAT bezeichneten wir das vom EST-Klon der Maus codierte Protein als „*Mus musculus* Airway Trypsin-like Protease 1“ (MAT1). „1“, weil es nach unserer Hypothese bei der Maus eine lange, HAT-artige Isoform (MAT1), sowie eine kurze, AsP-artige Isoform (MAT2, siehe unten) gibt. Die entsprechenden Sequenzen der Ratte wurden mit RAT1 und RAT2 (=AsP) bezeichnet.

*Die weiteren Untersuchungen erfolgten jeweils mit RNA aus Trachea (dort war die lange Isoform HAT ursprünglich isoliert worden, [51]) und Nebenniere (hier hatte man die kurze Isoform AsP isoliert [34]).*

#### 3.1.1 Identifizierung von zwei AT-Isoformen

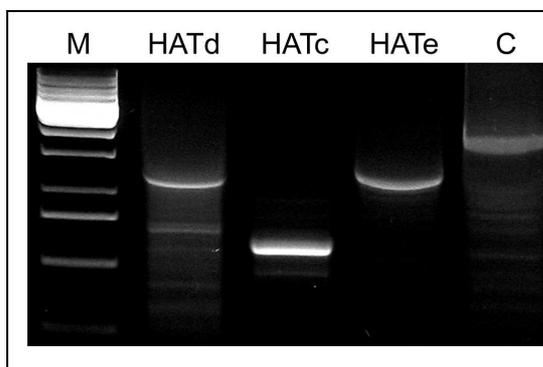
Aus Gesamt-RNA von Mensch, Maus und Ratte wurden in RACE-Analysen<sup>27</sup> die 5'- und 3'-Enden der AT-Isoformen identifiziert, die zur Herstellung von spezifischen Primern führten. Mittels PCR erfolgte die Amplifikation der vollständigen cDNA-Sequenzen. **Abbildung 3.1** zeigt exemplarisch das Agarose-Gel der 5'-RACE von humaner Trachea. (Zur Kontrolle wurden 3 Ansätze mit 3 verschiedenen Primern

---

<sup>26</sup> Expressed Sequence Tag

<sup>27</sup> Primer: siehe Anhang (**Abs. 6.1**, S. 73 f.)

(siehe *Tabelle 3.1*) parallel durchgeführt.)



**Abbildung 3.1:** Ergebnis der 5'-RACE von humaner Trachea mit 3 verschiedenen Primern und einem Kontrollprimer.

**M:** 100bp-Marker. **HATc-e:** Resultate der 3 verschiedenen 5'-RACEs. Bei HATd und c sind außer der Hauptbande auch Nebenbanden erkennbar. **C:** im Kit enthaltener Kontrollprimer. Die Haupt- und Nebenbanden wurden sequenziert und daraus die komplette 5'-terminale Sequenz rekonstruiert.

Ansatz	5'-Primer	3'-Primer
1	Universalprimer aus Kit	HATc
2	Universalprimer aus Kit	HATd
3	Universalprimer aus Kit	HATe
4	Universalprimer aus Kit	mitgelieferter Kontrollprimer

**Tabelle 3.1:** Primer der 5'-RACE-Analyse von humaner Trachea.

Nachdem die kompletten Sequenzen der AT-Isoformen von Mensch, Maus und Ratte nun vorlagen, zeigte sich, dass das AT-Gen von Maus und Ratte jeweils für eine lange und eine kurze Isoform kodiert. Die *lange Isoform* entspricht dem schon beim Menschen beschriebenen HAT, die *kurze Isoform* der von der Arbeitsgruppe um Phil Lowry in Ratten-Nebennieren entdeckten AsP [34]. Beim Menschen fanden wir nur die lange Isoform. Insgesamt konnten bei den drei untersuchten Spezies damit 5 AT-Isoformen identifiziert werden.

Die Sequenzen der neuen cDNA-Klone MAT1, 2 und RAT 1 wurden in *GenBank*<sup>TM</sup> publiziert (vgl. auch Anhang, *Tabelle 6.2*, S. 73).

## 3.2 Analyse der AT-DNA und -mRNA

Die Unterschiede der langen und kurzen Isoformen werden im folgenden am Beispiel von HAT und RAT dargestellt.

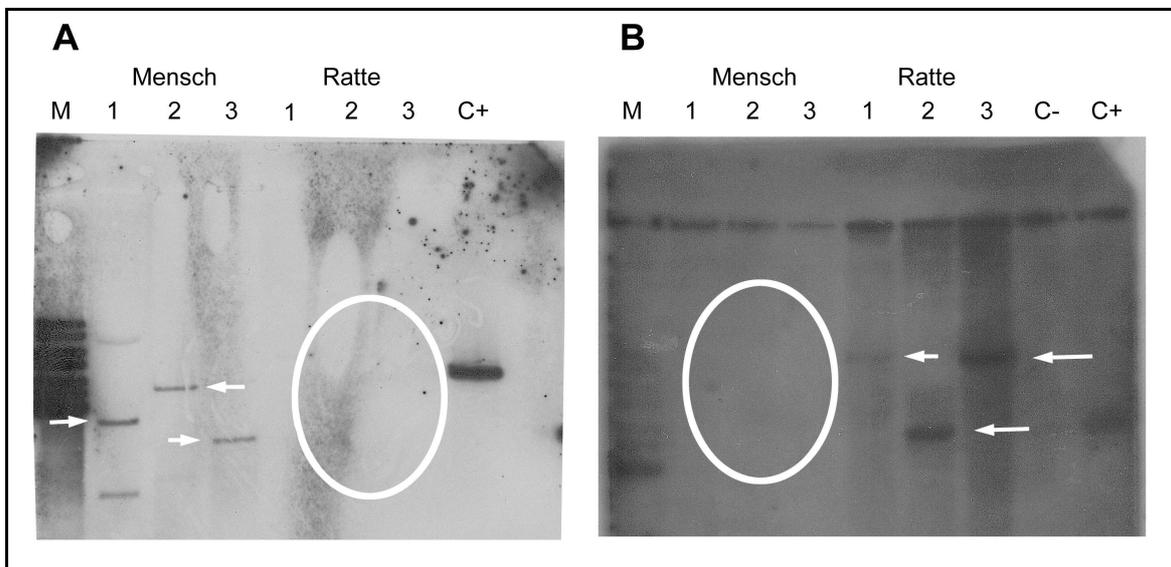
### 3.2.1 Vergleich der AT-Isoformen auf DNA-Ebene (Southern Blot)

Die Frage, ob es sich bei HAT und RAT um Spezies-spezifische Isoformen handelt (bei denen die eine nur beim Menschen, die andere nur bei der Ratte zu finden ist), unter-

suchten wir mit Southern Blots. Zum Einsatz kamen HAT- und RAT-Sonden am geblotteten Genom von Mensch und Ratte.

Die zum Southern Blotting benötigten DNAs wurden aus Blutproben (vgl. Abs. 2.6) mehrerer Probanden sowie mehrerer Ratten gewonnen. Die Sonden synthetisierten wir aus Plasmiden von HAT und RAT2 unserer Plasmid-Bank. Die DNAs von Mensch und Ratte wurden nebeneinander auf die Trägermembran geblottet, dann in getrennten Experimenten zuerst mit der humanen, anschließend mit der Sonde der Ratte hybridisiert.

Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.2** dargestellt. Es bestätigt sich, dass die Hybridisierungen nur Spezies-spezifisch stattfinden, also HAT nur an die menschliche DNA und RAT nur an die Ratten-DNA.



**Abbildung 3.2: Gegenüberstellung zweier Southern Blots. A:** Hybridisierung mit der HAT-Sonde, **B:** Hybridisierung mit der RAT-Sonde. **M-** Markerspur. Die **Spuren 1- 3** sind jeweils humane bzw. Ratten-DNA, welche mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut wurde: **1-** Eco RI, **2-** BamHI, **3-** Xba. Die Hauptbanden sind mit weißen Pfeilen markiert. **C+:** Positivkontrolle, **C-:** Negativkontrolle. Die HAT-Sonde hybridisiert spezifisch an humane DNA, die RAT-Sonde nur an Ratten-DNA. In den eingekreisten Bereichen finden sich keine Hybridisierungsbanden. (Abgebildet sind zwei verschiedene Membranen. Die Banden (mit Pfeilen markiert) sind im Original besser zu erkennen, können aber in den Fotografien dennoch gut nachvollzogen werden.)

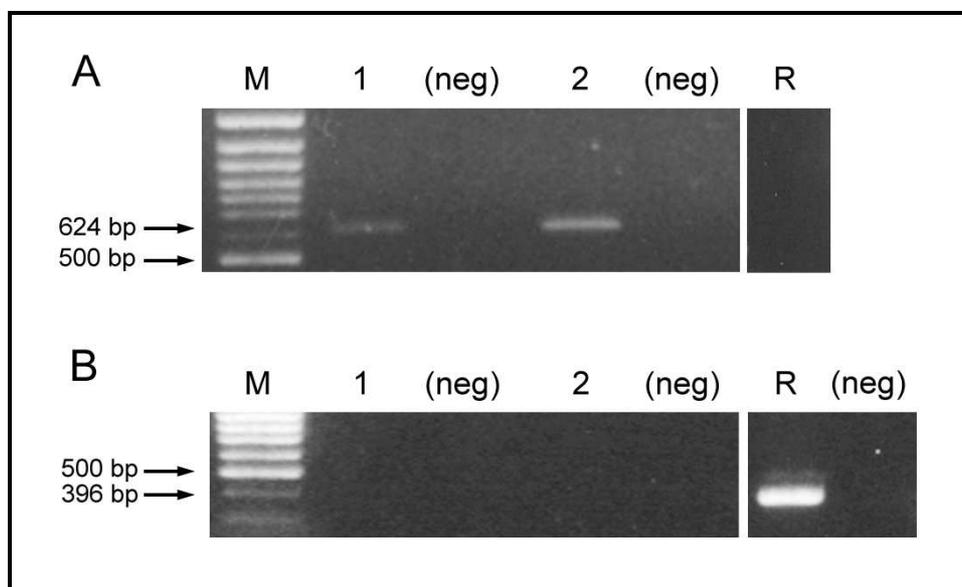
### 3.2.2 Vergleich der AT-Isoformen auf mRNA-Ebene (RT-PCR)

Um die auf DNA-Ebene dargestellte Speziespezifität der ATs auch auf Ebene der mRNAs zu verifizieren, benutzten wir eine RT-PCR-Strategie. Die Zielsequenz der Rattenprimer wurde dabei bewußt in den C-terminalen Bereich gelegt, der bei kurzer und

langer Isoform von RAT identisch ist, um die Spezifität nicht von vornherein methodisch einzuschränken. Auch die HAT-Primer wurden für den C-terminalen Bereich gewählt.

Wir stellten RNAs von humaner Nebenniere und von Ratten-Nebenniere gegenüber. Das HAT-spezifische Primerpaar (HATf/ HATg, siehe Anhang, **Tabelle 6.3**, S. 74) sollte ein erwartetes Fragment von 624bp Länge amplifizieren. Die korrekte Lage der HAT-Primer in der RNA wurde im Vorfeld durch einen BLAST-Vergleich belegt.

Die Auswertung der Agarose-Gele zeigte in den humanen Proben deutliche Banden, wohingegen HAT bei der Ratten-RNA erwartungsgemäß keine Bande ergab (siehe **Abbildung 3.3**). In analoger Weise untersuchten wir nun die Expression von RAT. Es kamen die beiden o.g. Gesamt-RNAs zum Einsatz. Das Primerpaar war nun RAT-spezifisch mit einem erwarteten Fragment von 396bp. Das Ergebnis stellte sich wie erwartet spiegelbildlich zur ersten Versuchsanordnung dar: Die humanen Spuren blieben negativ, wohingegen die Ratten-RNA ein deutliches Signal zeigte. *Die  $\beta$ -Actin-Positivkontrollen (nicht abgebildet) waren bei allen Analysen jeweils einwandfrei.*



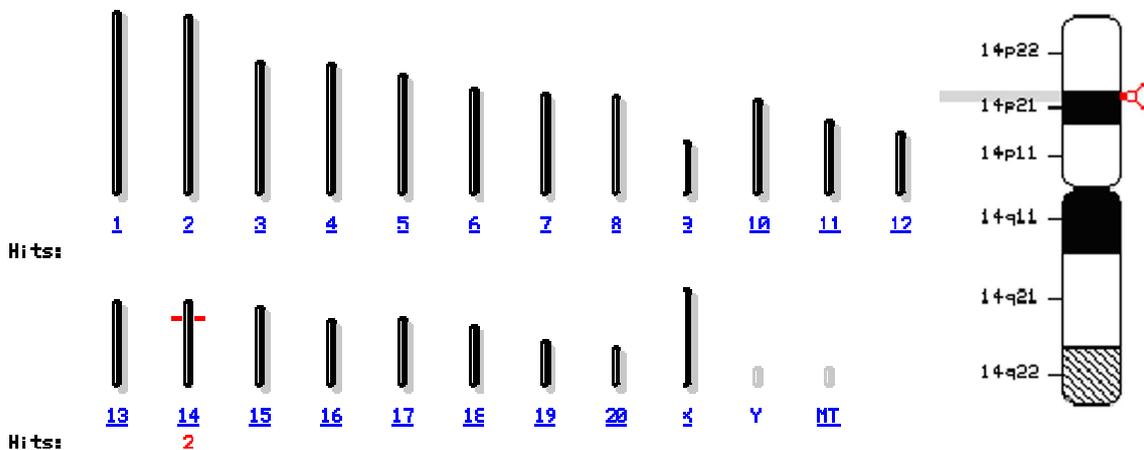
**Abbildung 3.3: Spezies-spezifische Expression der AT-mRNAs in Mensch und Ratte.** RT-PCR-Untersuchungen mit Gesamt-RNAs von drei Geweben: **1-** humane Nebenniere (Firma Clontech®), **2-** humane Nebenniere (eigene Extraktion), **R-** Ratten-Nebenniere. ‚(neg)‘ zeigt jeweils die zugehörigen Negativkontrollen, **M** einen 1000-kb-Marker. **A:** Einsatz eines HAT-spezifischen Primerpaares (erwartete Fragmentlänge: 624bp): Es sind nur bei den humanen Proben Banden erkennbar. **B:** Dieselbe Anordnung unter Verwendung eines RAT-spezifischen Primerpaares (erwartete Fragmentlänge: 396 bp). Hier stellt sich nur in der Rattenprobe eine Bande dar.

### 3.3 Organisation des AT-Gens

Mit Hilfe der im Internet zugänglichen Gensequenzen und der Ergebnisse unserer Experimente läßt sich die Lage der AT-Gene im Genom von Mensch, Maus und Ratte wie folgt charakterisieren:

#### 3.3.1 Ratte

Das RAT-Gen der Ratte liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 14 an Position 14p21. (Contig „NW\_047424 [gi:34876954]“ in Entrez®). Es wird vom Plus-Strang codiert, umspannt 61.992 bp und ist eines von rund 800 bislang verzeichneten Genen auf Chromosom 14. In der näheren Umgebung von RAT liegen unter anderem Gene für mehrere UDP-Glucuronosyltransferasen, für einen Splicingfaktor und einen GnRH-Rezeptor. Das RAT-Gen selbst umfasst 10 Exons und 9 Introns (siehe Anhang, **Abbildung 6.3**, S. 76). Die lange Isoform (RAT1) wird von allen 10 Exons codiert, die kurze (RAT2) lediglich von den 5 Exons 6- 10. Ein alternativer Transkriptionsstartpunkt, 58 bp upstream der Exon/Intron-Grenze von Exon 6 gelegen, ermöglicht die Expression der zweiten, kurzen Isoform.

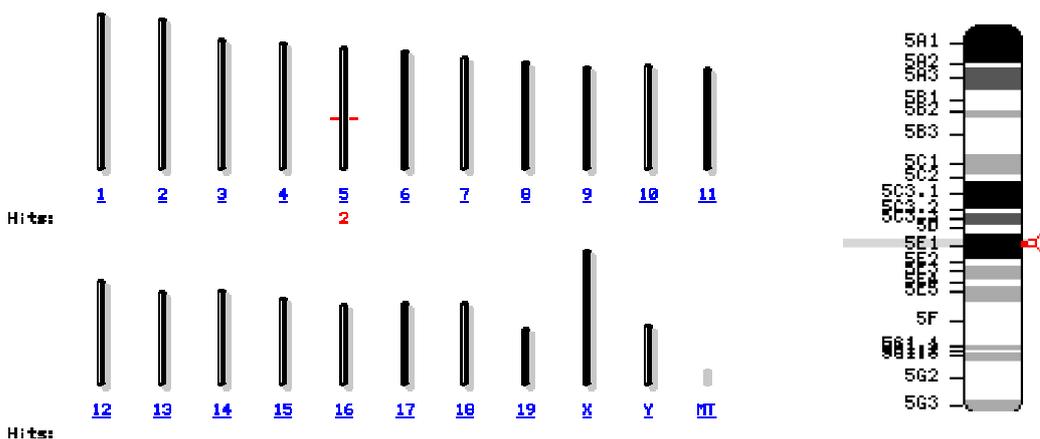


**Abbildung 3.4:** Lage von RAT im Rattengenom. Rechts schematisierte Vergrößerung von Chromosom 14.

### 3.3.2 Maus

Das MAT-Gen der Maus liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 an Position E1. Es umspannt 71.180bp, wird vom Minus-Strang codiert und beinhaltet 10 Exons und 9 Introns (siehe Anhang, **Abbildung 6.4**, S. 77). Analog zu RAT ermöglicht ein alternativer Transkriptionsstartpunkt die Expression von 2 Isoformen- der langen (MAT1, Exons 1- 10) und der kurzen (MAT2, Exons 6- 10).

Auf Chromosom 5 der Maus sind bislang rund 2.000 Gene bekannt. Im näheren Umfeld des MAT-Gens (LOC231382) sind etliche weitere Gene beschrieben, u.a. für einen GnRH-Rezeptor, zwei UDP-Glucuronosyltransferasen und einen unserem MAT-Gen ähnlichen EST-Klon (LOC194597). Das Vorliegen des EST-Klons deutet bei der Maus auf eine Genduplikation hin.



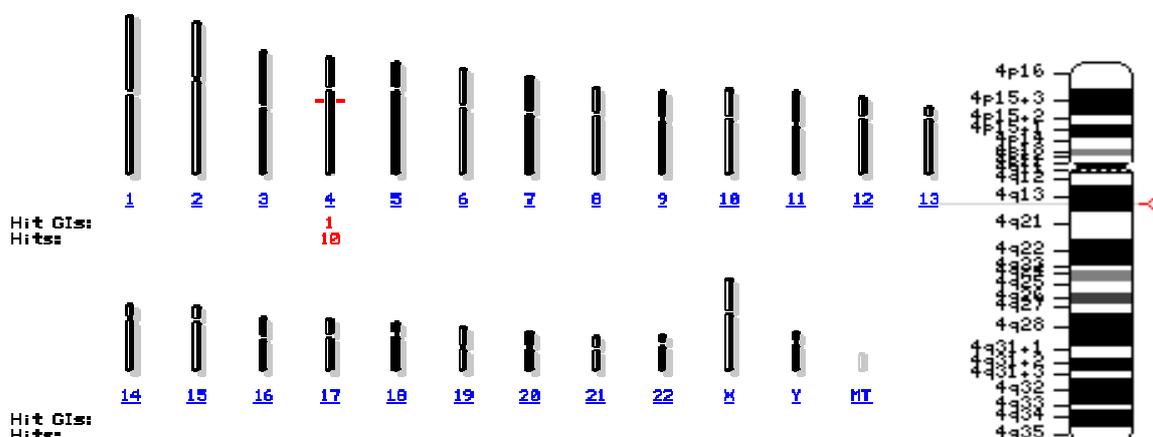
**Abbildung 3.5: Lage von MAT im Mausgenom.** Rechts schematisierte Vergrößerung von Chromosom 5.

### 3.3.3 Mensch

Das Gen der humanen Airway trypsin-like Protease liegt auf dem langen Arm von Chromosom 4 an Position 4q13.3. (Contig NT\_022778.14). Das HAT-Gen wird vom Minus-Strang codiert und umspannt 61.840bp. Hierin enthalten sind 10 Exons und 9 Introns (siehe Anhang, **Abbildung 6.2**, S. 75). Beim Menschen existiert nur eine (lange) Isoform. Diese besteht aus 10 Exons.

Insgesamt befinden sich auf Chromosom 4 des Menschen rund 1.100 Gene. In der unmittelbaren Nachbarschaft des HAT-Gens liegt das DESC1-Gen, das ebenfalls zur Fa-

milie der Serinproteasen gehört. Es weist die gleiche Exon/Intron-Struktur wie HAT auf, wie bei einer Genduplikation.



**Abbildung 3.6: Lage von HAT im menschlichen Genom.** Rechts schematisierte Vergrößerung von Chromosom 4.

### 3.4 Charakterisierung der AT-Isoformen

Die korrespondierenden kurzen/langen Isoformen der einzelnen Spezies sind von Größe und Molekulargewicht nahezu identisch (siehe *Tabelle 3.2*):

Isoform	Länge der mRNA [Nukleotide]	Bereich des ORF auf mRNA	Größe des ORF [AS]	Molekulargewicht [kDa]
HAT	1500	Pos. 62- 1318	418	46,27
MAT1	2043	Pos. 15- 1268	417	46,23
RAT1	1683	Pos. 247- 1500	417	46,30
MAT2	1626	Pos. 23- 862	279	30,60
RAT2	1045	Pos. 32- 871	279	30,53

**Tabelle 3.2: Charakteristika der einzelnen Isoformen.**

**Abbildung 3.7: Gegenüberstellung der AS-Sequenzen der AT-Isoformen.** Die Hinterlegungen bringen den Grad der übereinstimmenden AS zum Ausdruck: **schwarz**= in allen Isoformen identisch, **grau**= starke Ähnlichkeit). In der jeweils untersten Zeile ist der Konsensgrad noch einmal dargestellt: (\*) = identisch, (:) = starke Ähnlichkeit, (.) = schwache Ähnlichkeit. Die Signalpeptide der beiden kurzen Isoformen sind unterstrichen.

Die AS der katalytischen Triade (His<sup>227</sup>, Asp<sup>272</sup>, Ser<sup>368</sup>) sind eingerahmt und zusätzlich mit Pfeilen (⇓) versehen. Die wichtigen Strukturdomänen sind in der jeweils obersten Zeile verzeichnet (Zytoplasmatische Domäne (1- 20), Transmembrandomäne (21-41), SEA-Domäne (44- 164) und Trypsin-like-Serinproteasen-Domäne (187- 417)).



Auf AS-Ebene zeigen die *Nager*-Isoformen eine hohe Ähnlichkeit: ca. 89% *vollkommen* identische AS (funktionell *ähnliche* AS: 95%). Stellt man den *Nager*-Isoformen das menschliche HAT gegenüber, ergeben sich immer noch ca. 66% *vollkommen* identische AS (*ähnliche* AS: rd. 83%) (vgl. **Tabelle 3.3**). (Das strukturverwandte DESC1-Protein, in derselben Genregion wie HAT gelegen, hat mit diesem 37% identische AS).

	MAT1	RAT1	MAT2
HAT	(*): 66,3% (:): 82,1%	(*): 67,2% (:): 83,4%	
RAT1	(*): 88,5% (:): 94,7%		
RAT2			(*): 88,5% (:): 94,2%

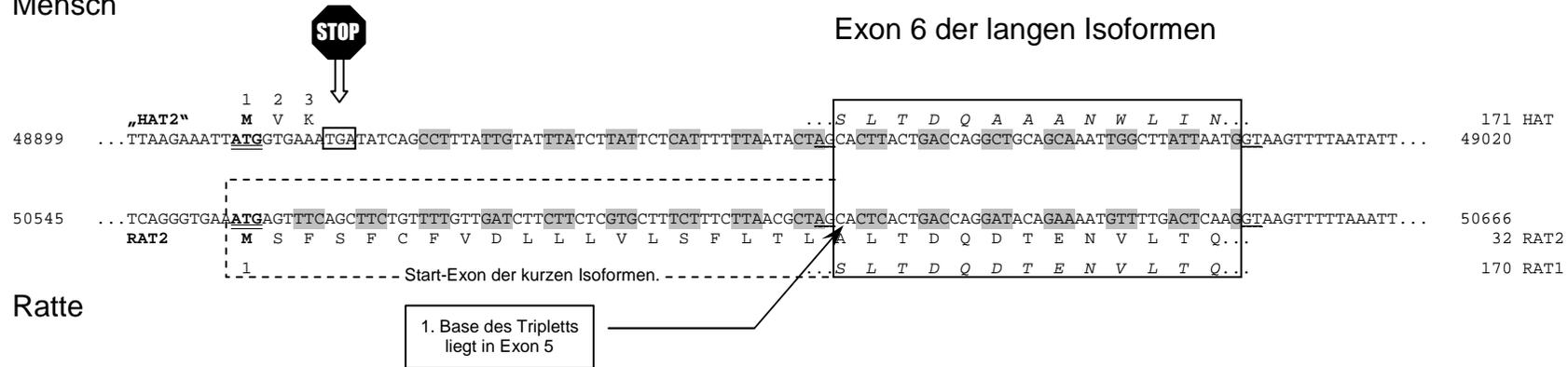
**Tabelle 3.3: Prozentuale Ähnlichkeit der AT-Isoformen** (nach Anzahl der jeweiligen AS an der Gesamtzahl). (\*) = identisch, (:) = starke Ähnlichkeit. Die *Nager*-Isoformen zeigen untereinander jeweils eine sehr hohe Ähnlichkeit, aber auch zwischen Mensch- und *Nager*isoformen besteht ein hoher Verwandtschaftsgrad.

### 3.4.1 Fehlen der kurzen AT-Isoform im Menschen

Um das Fehlen einer kurzen AT-Isoform im Menschen näher aufzuklären, haben wir alle sechs möglichen Leseraster der AT-cDNAs nach *offenen* Leserastern (Open reading Frames, ORF) durchsucht. Hierbei findet sich in Exon 6 eine interne Splicing-Site, die bei der Transkription der langen Isoform verwendet wird. Zusätzlich existiert ca. 60 bp stromaufwärts von dieser Splicing-Site bei allen 3 Spezies ein zweiter, alternativer Transkriptionsstartpunkt des Exon 6. Dieser wird bei den *Nagern* zur Expression der kurzen Isoform benutzt und bildet dort das erste Exon.

Auch beim Menschen ist dieses Startcodon an der entsprechenden Stelle nachweisbar, allerdings folgt 9 bp später ein Stop-Codon, so dass die Translation bereits nach 3 AS wieder terminiert wird. Eine kurze Isoform existiert deshalb beim Menschen nicht. In **Abbildung 3.7** ist der entscheidende Bereich um das Exon 6 von Mensch und Ratte gegenübergestellt.

Mensch



Ratte

Nummerierung der cDNAs wie in den jeweiligen Übersichtsbildern von HAT/ RAT im Anhang (S. 75ff.)

**Abbildung 3.8: Der alternative Transkriptionsstartpunkt bei Mensch und Ratte.** Gegenüberstellung der betreffenden cDNA-Abschnitte von HAT und RAT. Der durchgezogene Kasten kennzeichnet Exon 6. Es wird, wie bei Eukaryonten typisch, flankiert von AG/ GT (wellig unterstrichen). Die codierenden Nukleotidtripletts mit resultierenden AS sind beginnend vom alternativen Startpunkt vor Exon 6 (Startcodon ATG, fettgedruckt und doppelt unterstrichen) dargestellt. Das Startcodon liegt bei beiden cDNAs an analoger Stelle. Bei der Ratte (auch bei der Maus) bildet diese Region eine interne Splicingstelle, die

alternativ die Ausbildung einer kurzen Isoform (RAT2, MAT2) ermöglicht. Das verlängerte Start-Exon der kurzen Nager-Isoformen ist gestrichelt eingerahmt. Beim Menschen folgt 9 bp nach dem Startcodon bereits ein Stopcodon (gekennzeichnet durch „STOP“). Ein „HAT2“ gibt es deshalb beim Menschen nicht.

Mittels PCR-Analysen konnten wir die zunächst nur durch Recherche in Genomdatenbanken gewonnenen Erkenntnisse auch experimentell nachweisen: Wir amplifizierten ein 177bp-Fragment aus humaner DNA, welches das postulierte Stop-Codon enthalten sollte. Die Primer („STC\_f“ und „STC\_r“) sind in der Primer-Tabelle im Anhang (**Tabelle 6.3**, S. 74) verzeichnet. Das in der PCR amplifizierte Fragment wurde sequenziert und enthielt das postulierte Stopcodon.

#### **3.4.2 Strukturdomänen der langen Isoformen RAT1, MAT1, HAT**

Der Aufbau der drei langen Isoformen ist nahezu identisch: Einem kurzen, zytoplasmatischen Anteil von 12 bzw. 20 AS folgt eine Transmembrandomäne (ca. 20 AS). Der extrazelluläre Anteil (ca. 380 AS) untergliedert sich in zwei große Strukturregionen, welche durch ein Verbindungspeptid von 19 (HAT) bzw. 22 AS verbunden sind: Bei der einen handelt es sich um die SEA<sup>28</sup>-Domäne (ca. 120 AS), die bei der Bindung an benachbarte Kohlenwasserstoffmoleküle eine Rolle spielt (siehe auch Abs. 4.2.1), bei der anderen um die Trypsin-like-Serinproteasen-Domäne (ca. 230 AS), die für die eigentliche proteolytische Funktion der vorliegenden Proteasen verantwortlich ist. Dieser charakteristische strukturelle Aufbau ordnet die Proteasen der Gruppe der Typ-II-Transmembran-Serinproteasen (TTSP) zu.

Sog. *Hydropathy Blots* stellen die hydrophilen und hydrophoben Regionen der AT-Proteine dar. Hiermit kann auf intrazellulär, extrazellulär oder transmembran gelegene Abschnitte rückgeschlossen werden (**Abbildung 3.9**). Gemäß den allgemeingültigen Regeln zur Orientierung eukaryontischer Transmembranproteine [52, 53], muss bei den ATs der N-Terminus intrazellulär liegen, der C-Terminus (mit der katalytischen Region) extrazellulär.

#### **3.4.3 Strukturdomänen der kurzen Isoformen (RAT2 (AsP) und MAT2)**

Bei den kurzen Isoformen lassen sich 2 Domänen unterscheiden: N-terminal ein hydrophobes Signalpeptid (11 bzw. 23 AS) sowie C-terminal die hochkonservierte Trypsin-

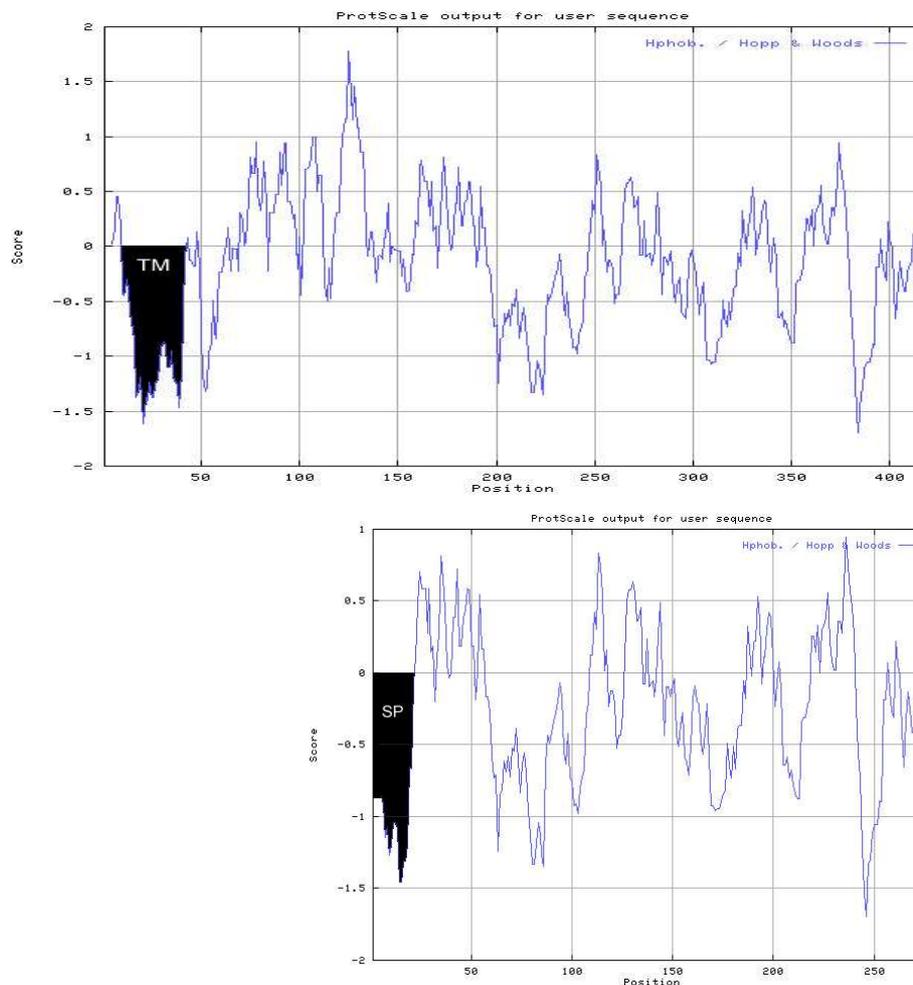
---

<sup>28</sup> Proteindomäne, benannt nach den Proteinen, worin sie erstmals entdeckt wurde (Sea urchin sperm protein, Enterokinase und Agrin)

### 3. Ergebnisse

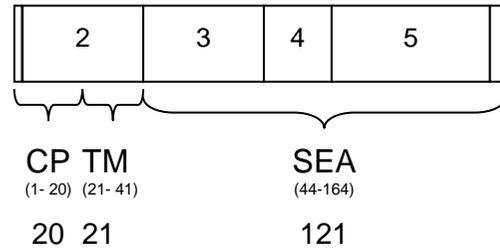
like-Serinproteasen-Domäne (Tryp\_SPc). Dazwischen liegt ein Verbindungspeptid von 25 (RAT2) bzw. 37 AS (MAT2) Länge.

Bei den kurzen Isoformen fehlen der intrazelluläre Anteil, die Transmembrandomäne und die SEA-Domäne. Dies könnte darauf hindeuten, dass die kurzen Isoformen nicht in der Zellmembran verankert sind, vielleicht sogar sezerniert werden können.



**Abbildung 3.9: Hydropathy blots der AS-Sequenzen von RAT1 (oben) und RAT2 (unten).** Nach der Methode von Hopp und Woods [54] (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>). Hydrophobe Reste zeigen negative Werte, hydrophile Reste positive. **TM:** Transmembrandomäne, **SP:** Signalpeptid. Die Blots von HAT und MAT stellen sich analog dar.

Lange Isoformen  
(HAT, MAT1,  
RAT1):

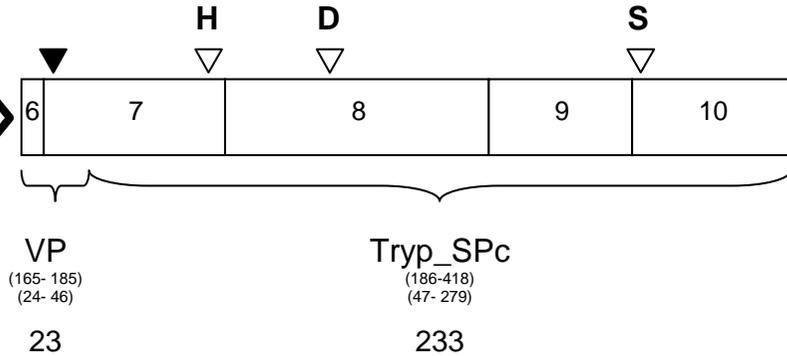


Kurze Isoformen  
(MAT2, RAT2):



SP  
(1-23)

23



### Abbildung 3.10: Struktureller Aufbau der AT-Isoformen.

Die Balken symbolisieren die AT-Isoformen mit ihren Exons (jeweils nummeriert). Die kurzen Isoformen setzen sich aus den Exons 6- 10 zusammen plus dem Signalpeptid (SP). Die langen Isoformen werden N-terminal zusätzlich von den Exons 1- 5 codiert.

Unter den Balken sind die einzelnen Domänen verzeichnet: **CP**: Cytoplasmatischer Anteil, **TM**: Transmembrandomäne, **SEA**: SEA-Domäne, **SP**: Signalpeptid, **VP**: Verbindungspeptid, **Tryp\_SPc**: Trypsindomäne.

In Klammern: die AS-Positionen im fertigen Protein, große Zahlen darunter: Länge der jeweiligen Domäne. Im C-terminalen Balken ist die hochkonservierte katalytische Triade (AS H, D und S) mit weißen Dreiecken gekennzeichnet, die Aktivierungsstelle mit einem schwarzen Dreieck.

### 3.4.4 Funktionelle Einheiten der ATs

Funktionell untergliedern sich die ATs in einen nicht-katalytischen N-terminalen (ca. 186 AS, 20.995 Da (lange Isoform)) und einen katalytischen C-terminalen Anteil (ca. 232 AS, 25.308 Da). Der katalytische Teil wird durch die Exons 7- 10 gebildet und ist bei den kurzen und langen Isoformen identisch. Er beinhaltet die hochkonservierte Tryp\_SpC-Domäne. Diese enthält zwischen ihren ersten beiden AS die wichtige Aktivierungsstelle, an der die Spaltung durch sog. *limitierte Proteolyse* erfolgt, welche das inaktive Vorläufermolekül in die reife, aktive Form überführt. Bei HAT befindet sich die Aktivierungsstelle an Pos. Arg<sup>186</sup>/ Ile<sup>187</sup>, bei MAT2 an Pos. Arg<sup>47</sup>/ Ile<sup>48</sup> <sup>(29)</sup>. Dieses Aktivierungsmuster ist bei den trypsinartigen Serinproteasen hochkonserviert.

Das funktionelle Zentrum der katalytischen Domäne liegt in der ebenso hochkonservierten *katalytischen Triade*. Sie besteht bei den hier betrachteten ATs aus den drei AS His<sup>227</sup>, Asp<sup>272</sup> und Ser<sup>368</sup> <sup>(29)</sup>. Sie sind entscheidend für die proteolytische Funktionalität der ATs: Die Reste -6, 15, 16, 17 und 28 (bezogen auf das aktive Serin) sollen bei mehreren Serinproteasen die Spezifität einer sog. *substratbindenden Tasche* bestimmen, welche essentiell für die katalytische Funktion dieser Proteasen ist. Das Aspartat an Position -6 verleiht dem Enzym die Spezifität gegenüber basischen Resten [55, 56].

Anhand der Konstellation des aktiven, katalytischen Zentrums erfolgt die Einteilung der Proteasen in „Familien“ und „Clans“. Hierbei werden die ATs dem Clan „SA“ innerhalb der Familie „S1“ der Serinproteasen zugeordnet.

Neben der katalytischen Triade ist auch die Disulfidbrückenstruktur bei den TTSPs charakteristisch [57]: Eine hochkonservierte Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>173</sup> und Cys<sup>292</sup> <sup>(29)</sup> verknüpft das Verbindungspeptid mit der Tryp\_SpC-Domäne. Drei weitere Disulfidbrücken befinden sich an den Positionen 212/228, 337/353 und 364/393.

### 3.5 Expression der AT-Isoformen in verschiedenen Geweben und Spezies

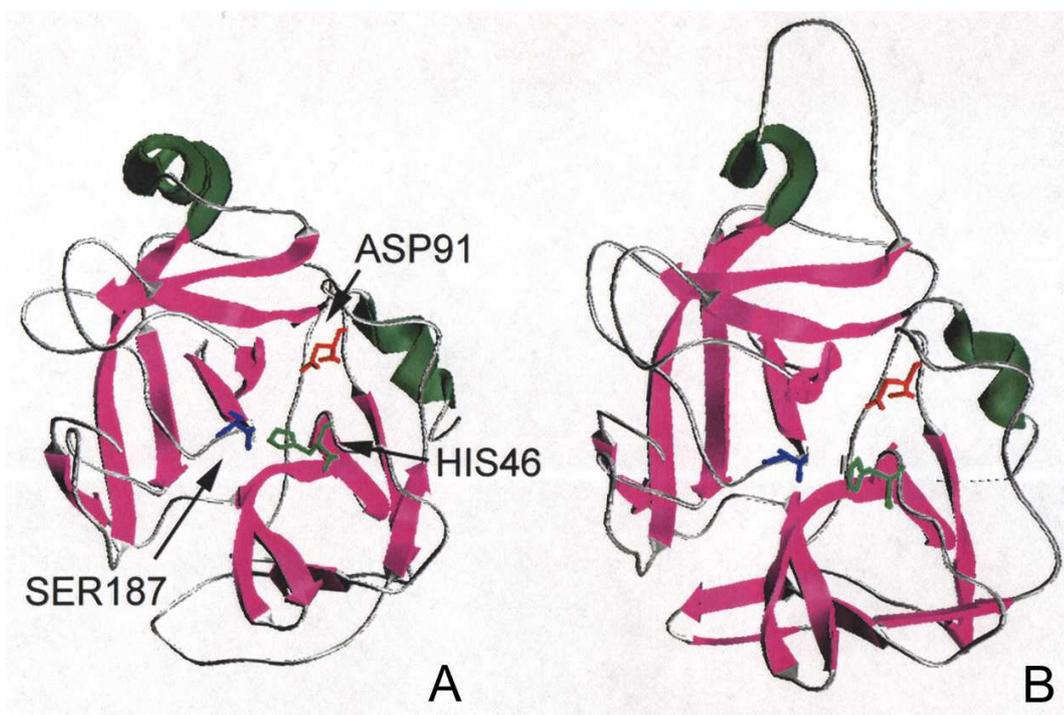
Nach der intrazellulären Synthese der ATs erfolgt die Translokation zur Zelloberfläche und die dortige Spaltung zur aktiven Form. Bisher unklar ist, ob oder inwieweit hier

---

<sup>29</sup> Positionsangaben exemplarisch für HAT, Positionen bei den anderen Isoformen: siehe **Abbildungen 6.2- 6.4** im Anhang (S. 75ff.)

eine Freisetzung erfolgt, ebensowenig, ob der transmembrane Anteil nach der Spaltung noch eine Funktion erfüllt. Denkbar wäre, dass er in weitere physiologische Abläufe auf der Zelloberfläche eingebunden ist, z.B. durch Interaktion mit Liganden oder anderen Proteinen.

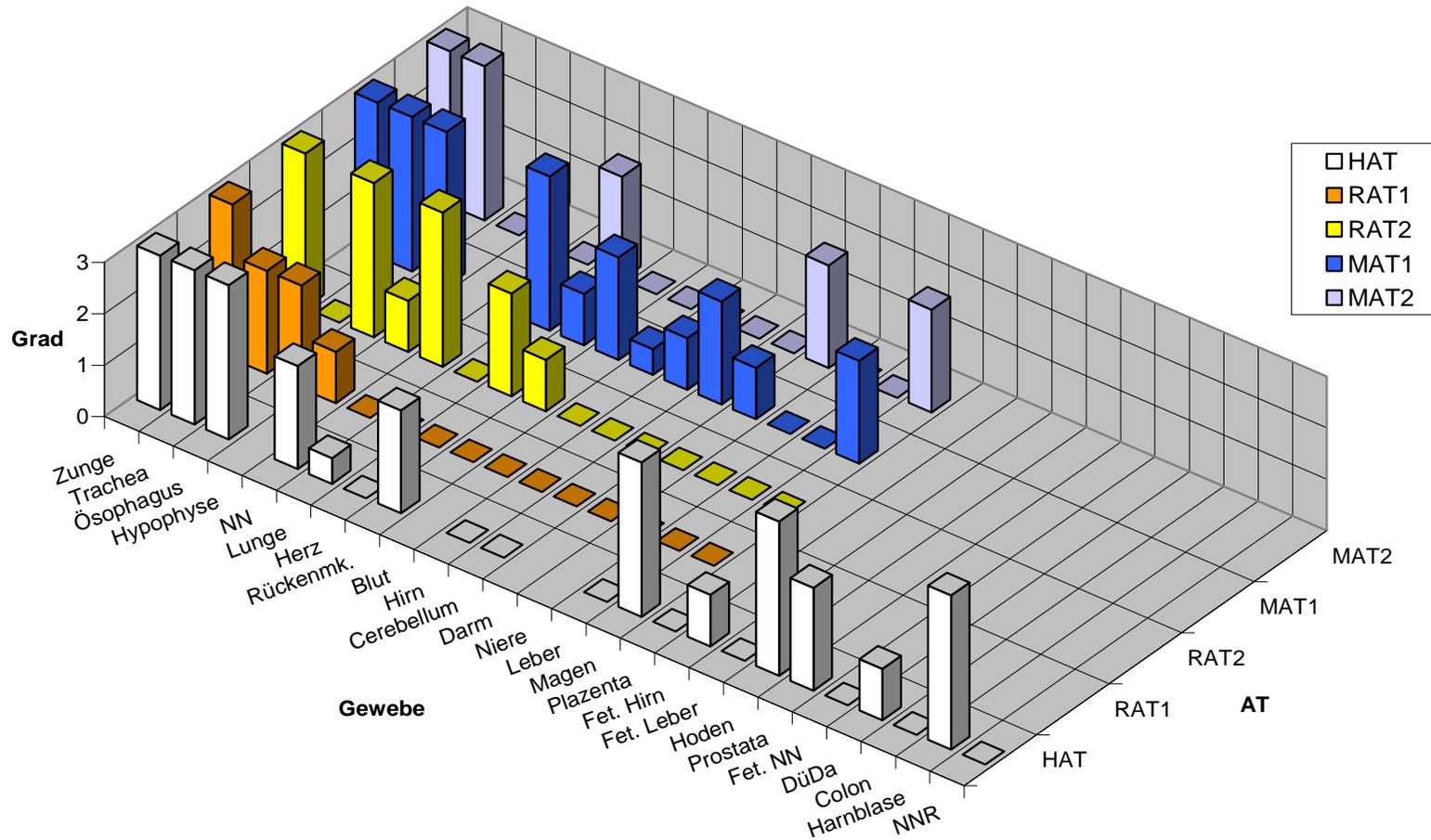
Bisher waren nur wenige Gewebe untersucht, in denen diese AT-Expression stattfindet: z.B. die Rattennebenniere (AsP/ RAT2) [34] oder Sputum bzw. Atemwegsepithelien im Falle von HAT [51]. Mittels RT- und Q-PCR haben wir eine größere Anzahl an Geweben von Mensch, Maus und Ratte gescreent, um weitere Orte der AT-Expression zu finden (*Abbildung 3.12*).



**Abbildung 3.11: 3D-Modelle der langen und kurzen Isoform im Vergleich.** **A** – Kurze Isoformen (hier RAT2): Die Aminosäuren His<sup>46</sup>- Asp<sup>91</sup>- Ser<sup>187</sup> der katalytischen Triade sind hervorgehoben. **B** – Lange Isoformen (hier HAT): Auch hier ist die katalytische Triade hervorgehoben.

Deutlich ist die speziesübergreifende hohe Ähnlichkeit in der 3D-Struktur zu erkennen, vor allem im Bereich der katalytischen Triade, die die sog. ‚substratbindende Tasche‘ ausbildet.

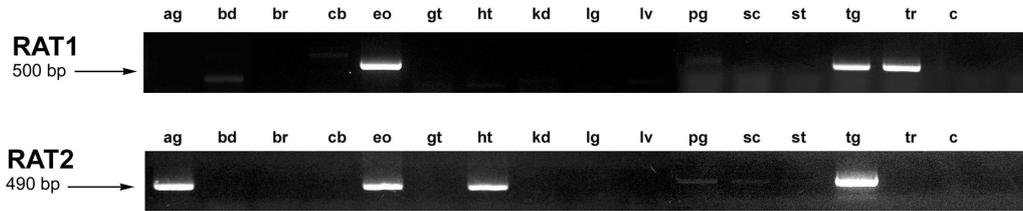
### Expression der ATs in verschiedenen Geweben



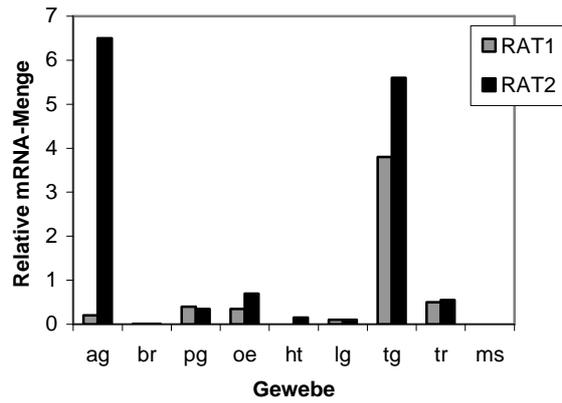
**Abbildung 3.12: Gesamtüberblick: Relative Expression AT-mRNAs in den getesteten Geweben.** Dargestellt sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die RT-PCR-Ergebnisse. Es erfolgte eine relative Gewichtung nach dem Grad der Expression in den RT-PCR-Untersuchungen (Grad 0 (flache Rauten: keine

nachweisbare Expression) bis Grad 3 (hohe Expression)). Wenn für einzelne Gewebe kein Material zur Verfügung stand, fehlt in der Abbildung die Farbmarkierung.

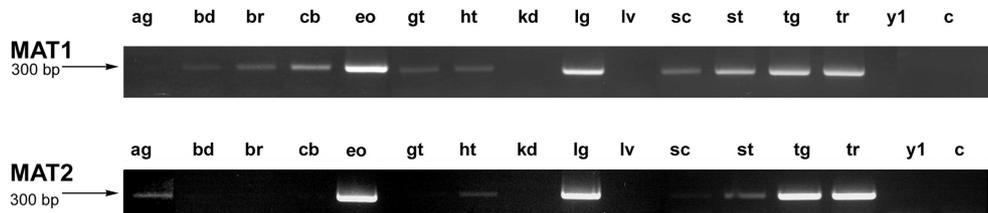
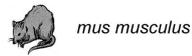
### 3. Ergebnisse



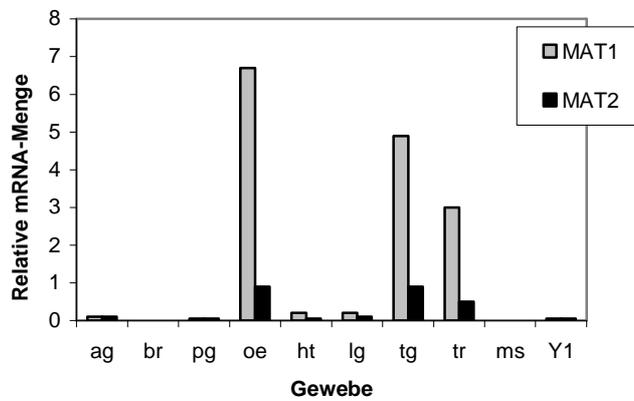
**A**



**B**



**C**



**D**

### 3.5.1 Die Gewebsexpression von RAT1/2 (AsP)

**RAT1** zeigt eine deutliche Expression (*Abbildung 3.13*) in der Zunge, sowohl in der Q-PCR als auch in der RT-PCR. Wesentlich geringere mRNA-Mengen finden sich in Trachea, Ösophagus und Hypophyse (in dieser nur sehr schwaches RT-PCR-Signal). Die Q-PCR weist auch in Nebenniere und Lunge eine sehr schwache Expression auf (das Signal bewegt sich hier aber im Bereich der Nachweisbarkeitsgrenze, in dem keine zuverlässige Aussage möglich ist). Die RT-PCR bleibt bei diesen beiden Geweben negativ.

**RAT2** ergibt starke Signale in Nebenniere, Zunge, Ösophagus, Trachea und Hypophyse. Bis auf die Hypophyse (nur schwaches RT-PCR-Signal) und Trachea (kein Nachweis in der RT-PCR) sind hier Q-PCR und RT-PCR konform. Herzgewebe ist in der RT-PCR deutlich RAT2-positiv, auch die Q-PCR zeigt hier ein schwaches Signal. Dieses ist aber, wie das von Lungengewebe, an der Nachweisbarkeitsgrenze. Eine sehr schwache Bande liefert die RT-PCR bei Rückenmark (dies war allerdings nicht im Q-PCR-Panel enthalten).

### 3.5.2 Die Gewebsexpression von MAT1/2

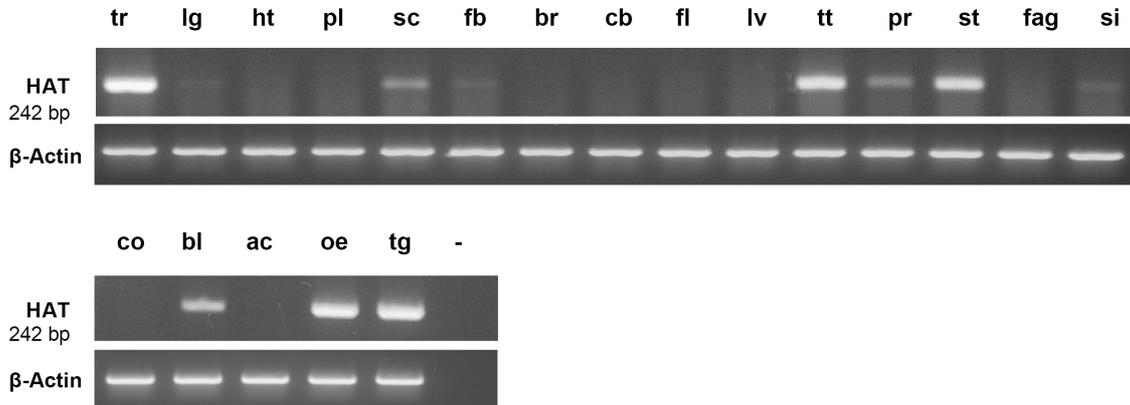
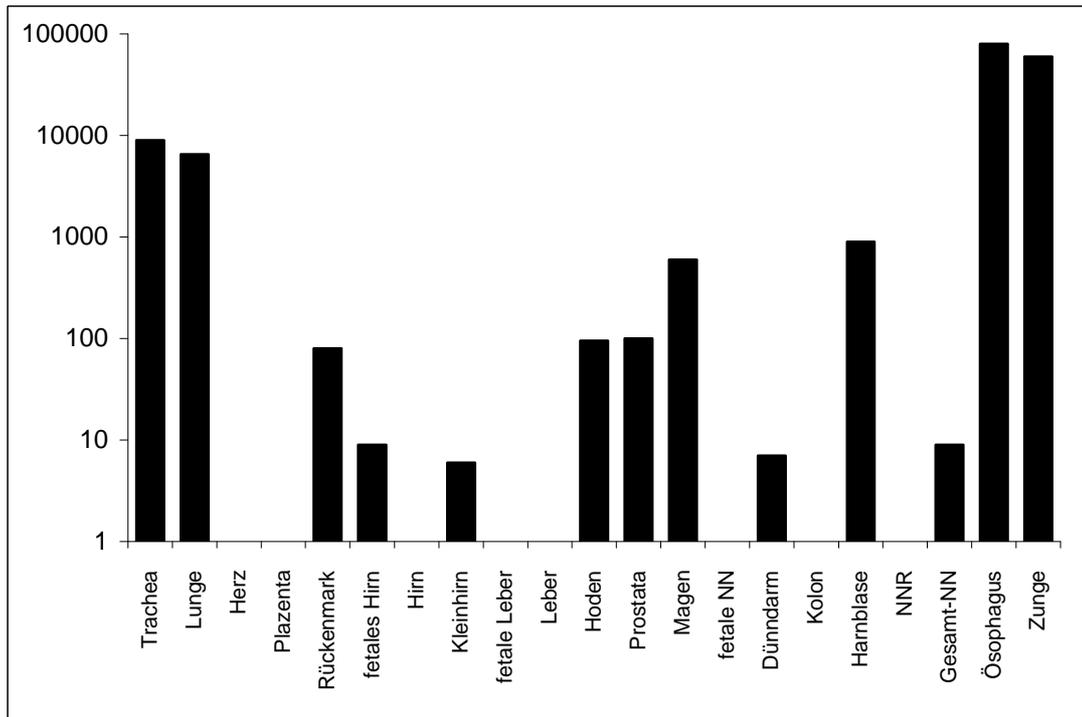
**MAT1** zeigte übereinstimmend in Q-PCR und RT-PCR deutliche Expression in Ösophagus, Zunge und Trachea. Auch Lungengewebe war in beiden positiv (in der Q-PCR allerdings relativ schwach), ebenso Herz (bei beiden Verfahren schwach ausgebildet). Ferner lieferte die RT-PCR deutliche Banden für Magen, Cerebellum, Hirn und Rückenmark sowie schwache Banden für Darm und Blut.

**MAT2** zeigte insgesamt weniger kräftige Signale als die MAT1-Proben. Übereinstimmend war aber eine Expression in Zunge und Trachea. Ösophagus war nur in der Q-PCR sicher positiv. Lunge zeigte bei beiden Verfahren ein schwaches Signal. In der RT-PCR auch Nebenniere und Magen.

**Abbildung 3.13: Expression der MAT- und RAT- Isoformen in verschiedenen Geweben von Maus und Ratte.** **A-** RT-PCR: Expression von RAT1/ RAT2 in Rattengeweben. **B-** Q-PCR: Relative RAT1/ RAT2-mRNA-Mengen in verschiedenen Rattengeweben. **C-** RT-PCR: Expression von MAT1/ MAT2 in Mausgeweben. **D-** Q-PCR: Relative MAT1/ MAT2-mRNA-Mengen in verschiedenen Mausgeweben. Als Template wurde bei allen RT- und Q-PCRs jeweils 500ng Gesamt-RNA verwendet (Ausnahme Blut: 50ng poly-A<sup>+</sup>-RNA). In allen RT-PCR-Proben (auch den AT-negativen) waren die  $\beta$ -Actin-Kontrollproben positiv. Die Normalisierung der Q-PCR erfolgte mit GAPDH.

*ag-* Nebenniere; *bd-* Blut; *br-* Hirn; *cb-* Kleinhirn; *oe-* Ösophagus; *gt-* Darm; *ht-* Herz; *kd-* Niere; *ms-* Muskel; *lg-* Lunge; *lv-* Leber; *pg-* Hypophyse; *sc-* Rückenmark; *st-* Magen; *tg-* Zunge; *tr-* Trachea; *y1-* Y1-Zellen; *--* keine RNA (Kontrollprobe).

## 3.5.3 Die Expression von HAT



**Abbildung 3.14: Expression der HAT-mRNA in verschiedenen humanen Geweben.** Oben: Q-PCR-Analyse der relativen Signalstärken der HAT-mRNA. Die relative Quantifizierung wurde mit FAM-dye-gelabelten TaqMan-Sonden durchgeführt. Template: je 250ng Gesamt-RNA. Die Normalisierung erfolgte gegen 18s. Unten: RT-PCR-Analyse der HAT-mRNA-Expression. Template: jeweils 500ng Gesamt-RNA. Alle Proben waren positiv für  $\beta$ -Actin.

*Beschriftung:* **tr-** Trachea; **lg-** Lunge; **ht-** Herz; **pl-** Plazenta; **sc-** Rückenmark; **fb-** fetales Gehirn; **br-** Gehirn; **cb-** Kleinhirn; **fl-** fetale Leber; **lv-** Leber; **tt-** Hoden; **pr-** Prostata; **st-** Magen; **fag-** fetale Nebenniere; **si-** Dünndarm; **co-** Colon; **bl-** Harnblase; **ac-** Nebennierenrinde; **oe-** Ösophagus; **tg-** Zunge; **-:** Negativkontrolle (ohne RNA). Die Ergebnisse der Nebenniere sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

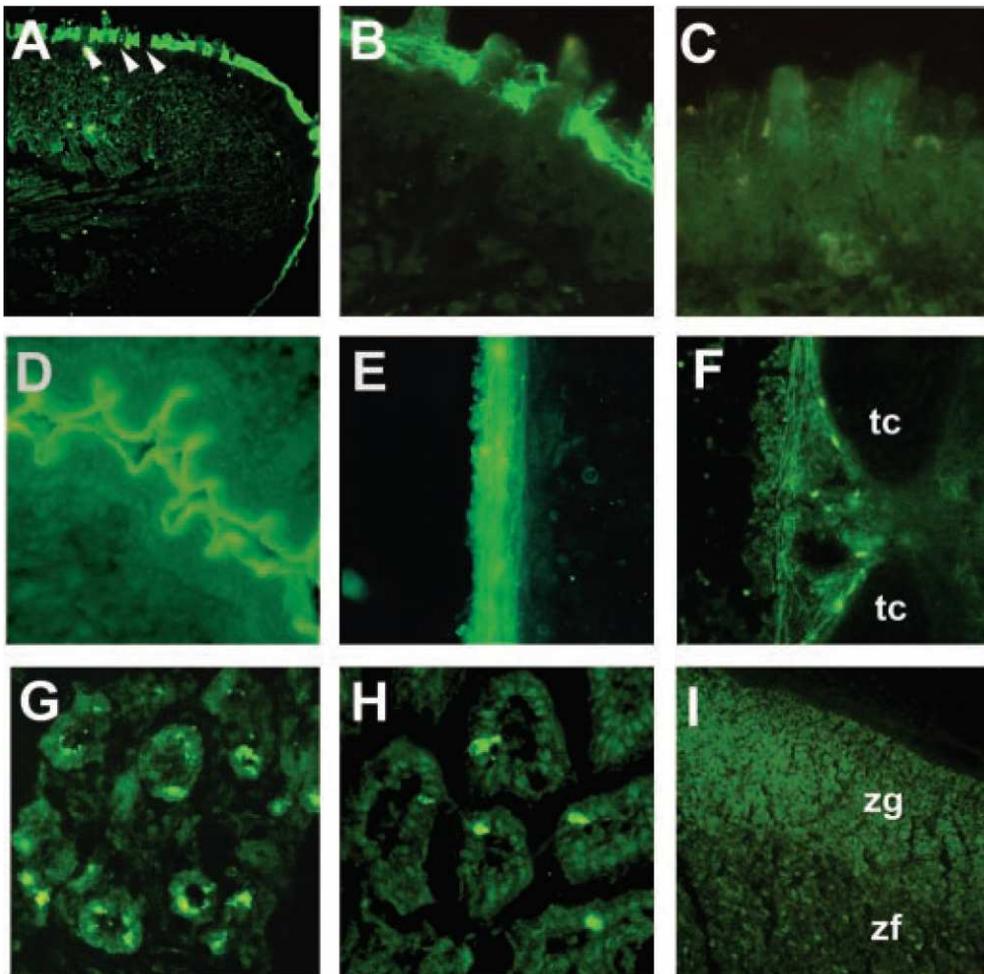
Mittels RT-PCR und Q-PCR untersuchten wir eine Auswahl humaner Gewebe auf die Expression von HAT (**Abbildung 3.14**). Beide Verfahren stimmen in den HAT-positiv gewerteten Geweben weitgehend überein: Eine deutliche Expression der HAT-mRNA findet sich demnach in Trachea, Rückenmark, Hoden, Prostata, Magen, Harnblase, Ösophagus und Zunge. Schwach positiv in beiden Verfahren sind fetales Hirngewebe, Dünndarm und Gesamt-Nebenniere (Nebennieren-RT-PCR: siehe separates Panel, **Abbildung 3.17**). Lunge und Kleinhirn erscheinen nur in der Q-PCR positiv.

#### **3.5.4 Immunhistochemischer Nachweis von RAT und MAT**

Gefrierschnitte von embryonalen und adulten Mäusen und Ratten wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen die Maus- bzw. Rattenprotease behandelt. Mit dem Antikörper lassen sich bei RAT und MAT jeweils *beide* Isoformen nachweisen.

Starke Immunreaktivität zeigte sich bei adultem Zungen- und Ösophagusoberflächenepithel. Einzelne Zellen ließen sich bei adulter Trachea, embryonaler Lunge und embryonalem Darm anfärben. Nur schwache Anfärbung gelang im äußeren Teil der Nebennierenrinde (*Zona glomerulosa*) von adulten Mäusen und Ratten. Die Immunreaktivitätsmuster bei Maus und Ratte sind größtenteils ähnlich.

Die Spezifität des Antikörpers wurde bewiesen durch Präinkubation mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid, was zu einer Blockierung des Antikörpers führte. Am Beispiel eines Zungenschnittes (**Abbildung 3.15-C**) konnte dann gezeigt werden, dass die Immunreaktivität dadurch vollständig unterbunden wurde.



**Abbildung 3.15: Immunhistochemische Lokalisation von MAT in verschiedenen Mausemweben.** Der Antikörper ist spezifisch für eine in beiden MAT-Isoformen vorkommende Sequenz. **A-** Querschnitt der Zunge einer adulten Maus (100fache Vergrößerung). Ungefärbte Papillen an der Zungenoberfläche sind mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet. **B-** Detailausschnitt von Bild A, 400fache Vergrößerung. **C-** Querschnitt der Zunge: Antikörper mit einem Blocking-Peptid präinkubiert (400fache Vergrößerung). **D-** Querschnitt des Ösophagus einer adulten Maus (400fache Vergrößerung). **E-** Längsschnitt des Ösophagus einer adulten Maus (400fache Vergrößerung). **F-** Längsschnitt der Trachea einer adulten Maus (400fache Vergrößerung). **tc:** tracheal cartilages- Trachealknorpel. **G-** Lungengewebe eines Mausembryos 23 Tage nach Befruchtung (400fache Vergrößerung). **H-** Querschnitt des Darms eines Mausembryos, 23 Tage nach Befruchtung (400fache Vergrößerung). **I-** Querschnitt der Nebenniere einer adulten Maus (200fache Vergrößerung). **zg:** Zona glomerulosa, **zf:** Zona fasciculata.

### **3.6 HAT-Expression in der normalen Nebenniere und in adrenalen Tumoren**

Mittels RT- und Q-PCR untersuchten wir die HAT-Expression in normaler Nebenniere sowie in verschiedenen adrenalen Tumorgeweben. Nahezu alle Gewebe zeigten eine recht niedrige HAT-Konzentration.

In der **Q-PCR** stellte sich die Expression von HAT in humaner Trachea ungefähr 20.000fach höher dar als die in der humanen Referenz-Nebenniere der Firma Clontech.

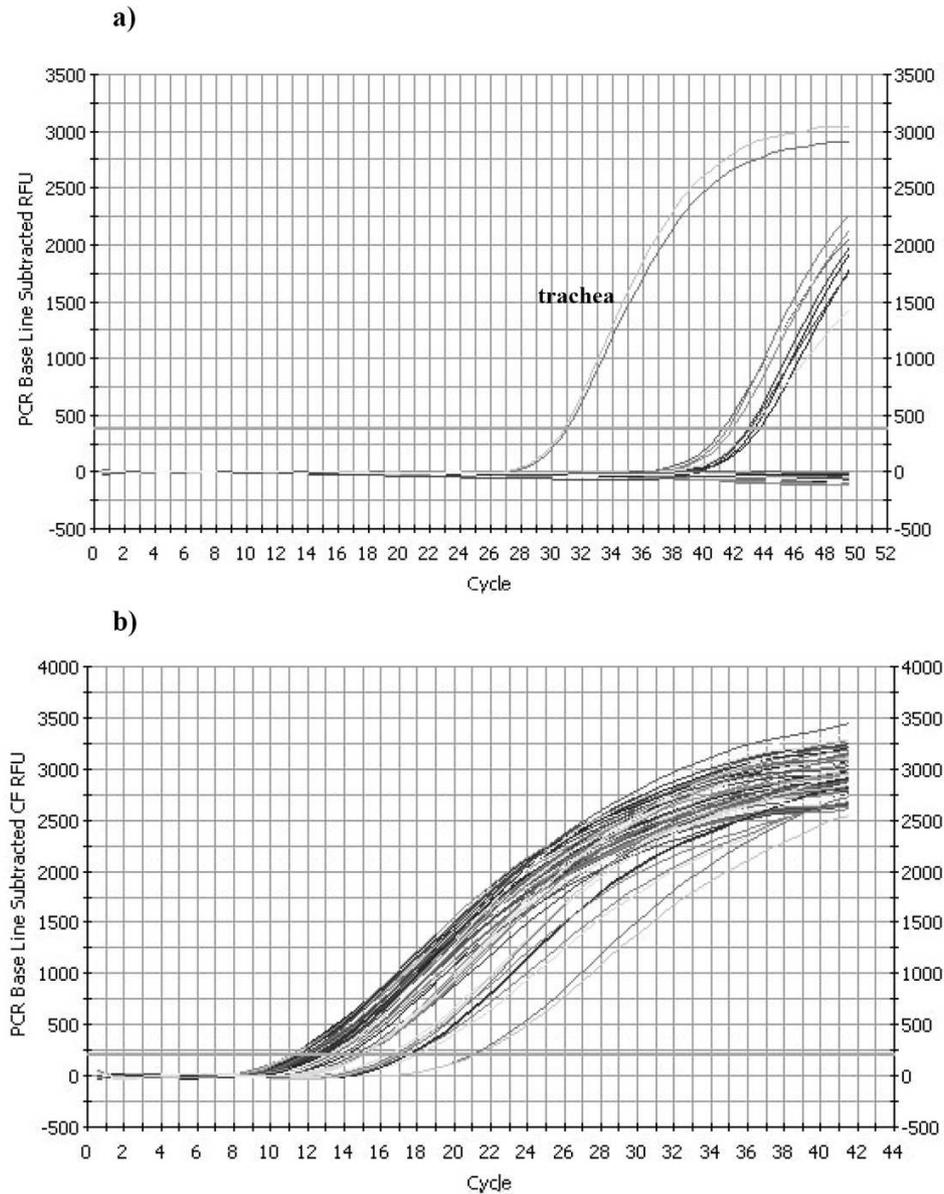
Die Q-PCR zeigte eine schwache HAT-Expression in 2 der 5 normalen Nebennieren, in 1 von 15 Nebennierenrinden-Adenomen, in keinem der 9 Nebennierenrinden-Karzinome und in 4 von 5 Phäochromozytomen.

In fetaler Nebenniere war keine HAT-Expression nachweisbar. Ebenso wenig in NCI-h295-Zellen<sup>30</sup>.

Die **RT-PCR**-Ergebnisse stellen sich ähnlich dar (**Abbildung 3.17**): Unter Berücksichtigung einer relativ kräftigen Hintergrundamplifikation lassen sich im Vergleich der verschiedenen Spuren auf den Agarosegelen bei 3 der 5 normalen Nebennieren zarte Banden feststellen, bei 2 der 5 Nebennierenrindenkarzinome und bei 1 der Phäochromozytome.

---

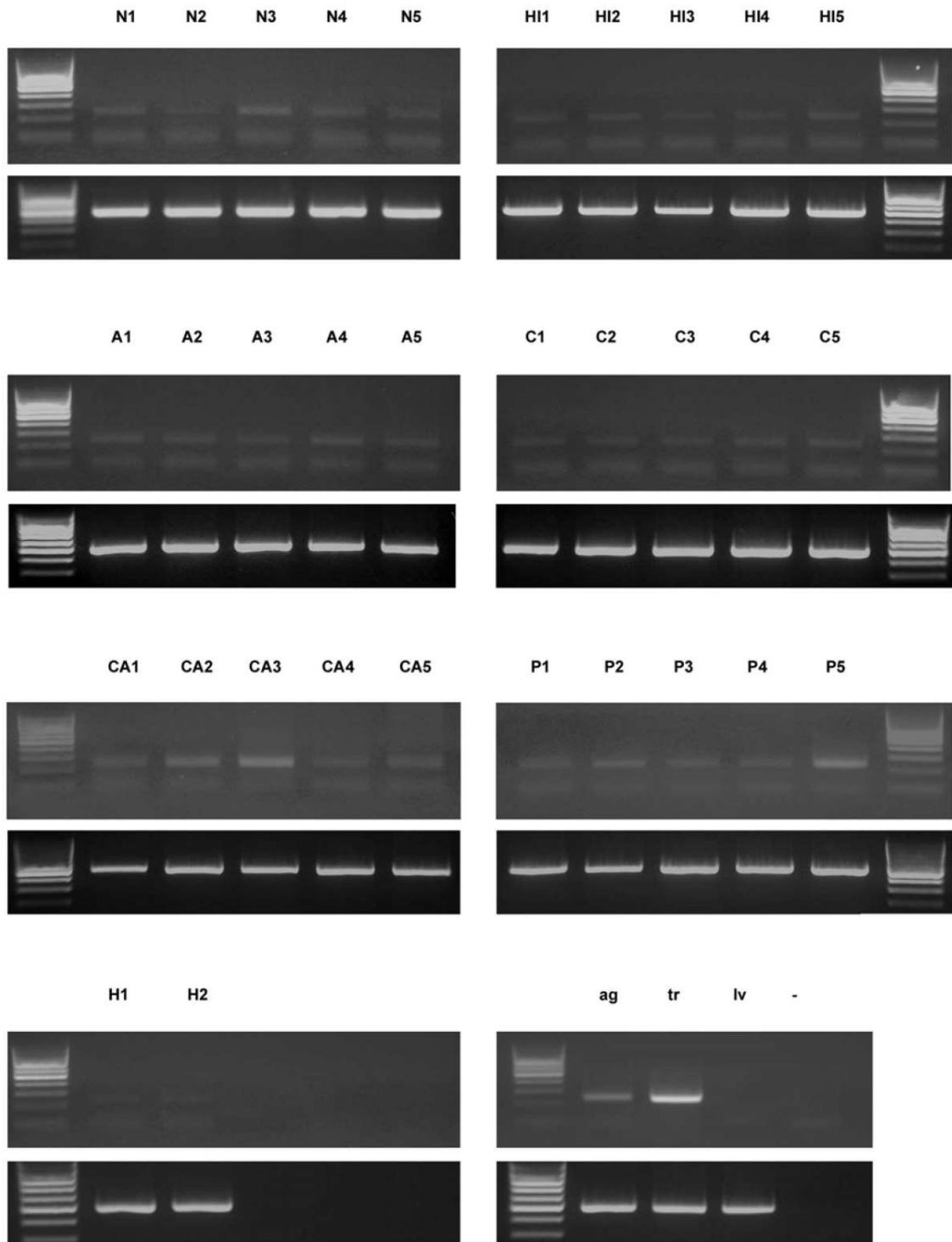
<sup>30</sup> Eine hormonproduzierende humane NNR-Karzinom-Zelllinie



**Abbildung 3.16: Ergebnisse einer Q-PCR-Analyse der HAT-mRNA-Expression in humanen Nebennierengeweben.** Repräsentatives Beispiel einer von mindestens vier unabhängigen Untersuchungen. **a)** Analyse der HAT-Expression; Amplifikationskurve der Tumorproben. Jede Tumorprobe (500ng cDNA) wurde doppelt untersucht. Trachea (150ng cDNA) diente als Positivkontrolle. **b)** 18s-Normalisierung. Patientendaten: siehe *Tabelle 6.1* im Anhang (S. 72).

In einem Großteil der Proben ist keine HAT-Expression nachweisbar. In den wenigen restlichen Fällen zeigt sich erst nach mehr als 40 Zyklen eine Amplifikation, was auf eine extrem niedrige Expression hindeutet, wohingegen in der Trachea eine starke HAT-Expression zu verzeichnen ist.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.17: RT-PCR-Analyse der HAT-mRNA-Expression in verschiedenen Nebennierengeweben.** Dargestellt sind: Fünf normale Nebennieren (**N1- 5**), fünf hormon-inaktive Adenome (**HI 1- 5**), fünf Aldosteron-produzierende Adenome (**A1- 5**), fünf Cortisol-produzierende Adenome (**C1- 5**), fünf Nebennierenrindenzinome (**CA1- 5**), fünf Phäochromozytome (**P1- 5**) und zwei ACTH-abhängige Nebennierenhyperplasien (**HI- 2**). Patientendaten: siehe Anhang, *Tabelle 6.1*, S. 72. Als Kontrollproben dienten mRNAs von Gesamt-Nebenniere (**ag**), Trachea (**tr**), Leber (**lv**) und eine Negativkontrolle (**-**) (Ansatz ohne RNA).

## 4. Diskussion

### 4.1 *Die Airway Trypsin-like Proteasen- eine „neue“ Familie von Proteasen*

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist das ursprünglich bei Ratten beobachtete kompensatorische Nebennierenwachstum: Nach unilateraler Adrenalectomie läßt sich dort eine Größenzunahme der verbleibenden Nebenniere feststellen. Die Arbeitsgruppe um Phil Lowry (University of Reading, GB) hatte daraufhin eine neue Serinprotease, die „Adrenal secretory Protease (AsP)“, gefunden, welche am Wachstum der Nebenniere beteiligt sein sollte. Im Laufe unserer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass AsP Teil einer Familie von Serinproteasen ist, zu der auch ein humaner Vertreter gehört. Dieser war ursprünglich aus Atemwegsepithel isoliert worden, die ‚*Human Airway Trypsin-like Protease (HAT)*‘. Von HAT leiteten wir die Bezeichnung ‚Airway Trypsin-like Proteasen‘ („AT“) für diese Familie ab.

In der vorliegenden Arbeit werden die AT-Isoformen von Mensch, Maus und Ratte charakterisiert, es wird u.a. auf ihre gegenseitige Verwandtschaft eingegangen, den strukturellen Aufbau, die postulierte Funktion in Zusammenhang mit der POMC-Prozessierung und dem Nebennierenwachstum sowie die Expression in verschiedenen Geweben.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Familie der Airway Trypsin-like Proteasen beim Menschen nicht oder nur relativ untergeordnet in die Steuerung des Nebennierenwachstums und die Nebennierentumor-Entwicklung involviert ist.

#### 4.1.1 **Fünf Isoformen- eine Familie: Die Nomenklatur der ATs**

Ausgehend von der cDNA-Sequenz der AsP haben wir mittels BLASTn die Public-Domain-Datenbank ‚Genbank™‘ nach vergleichbaren Sequenzen im Genom von Maus und Mensch durchsucht. Bei der Maus fand sich ein aus Lungengewebe isolierter EST-Klon (*dbEST BF143606*), beim Menschen die aus Atemwegsepithel isolierte HAT. HAT und die Maussequenz sind sich sehr ähnlich, die AsP der Ratte ist deutlich kürzer. Jedoch zeigen alle drei Sequenzen vor allem im C-terminalen Bereich der daraus hervorgehenden Proteine eine hohe Ähnlichkeit.

Wir fanden heraus, dass von der Protease zwei Isoformen existieren: Eine kurze und eine lange. Die Nager besitzen beide Isoformen, der Mensch nur die lange.

Bei der Nomenklatur orientierten wir uns an der humanen Isoform HAT und bezeichneten analog die Isoformen der Maus mit „MAT“ (*Mus musculus* Airway Trypsin-like Protease), die der Ratte mit „RAT“ (*Rattus norvegicus* Airway Trypsin-like Protease). Die lange Isoform wurde jeweils mit „1“ beziffert (MAT1, RAT1), die kurze mit „2“ (MAT2, RAT2(=AsP)). Bei der HAT erübrigt sich eine Unterscheidung, denn es existiert nur die lange Isoform.

#### **4.1.2 Verwandtschaftsverhältnisse der AT-Isoformen, Existenz zweier Isoformen**

Die Expression zweier Isoformen aus einem Gen geht auf den Mechanismus der „alternativen Transkription“ zurück: Aus *einem* Gen können durch alternatives Splicing während der Transkription *zwei* (oder mehr) mRNAs, respektive Proteine, exprimiert werden. Dadurch existieren bei den Nagern die beiden erwähnten Isoformen des AT-Proteins, beim Menschen hingegen verhindert ein Stopcodon die Ausbildung einer kurzen Isoform.

Die AT-Gene aller drei Spezies verfügen jeweils über 10 Exons. Die lange AT-Isoform wird von allen zehn Exons codiert. Ca. 60 bp stromaufwärts vor Exon 6 befindet sich der alternative Transkriptionsstartpunkt der kurzen Isoformen, die folglich lediglich aus den Exons 6- 10 (inclusive der ca. 60 bp vor dem „eigentlichen“ Exon 6) codiert werden. Die zusätzlichen Basenpaare codieren für ein Signalpeptid. Ein solches kann darauf hindeuten, dass das Protein nicht membranständig bleibt, sondern sezerniert wird. Für RAT2 konnte dies gezeigt werden, allerdings verbleibt es dann wohl aber doch auf der Zelloberfläche [34, 58]: Die hohe Dichte von Argininresten an der Rückseite des aktiven Zentrums soll das Enzym hier verankern. Dieses Muster findet sich auch bei humaner *MT-SP1* (*Membrane-type Serine Protease 1*), welcher die Transmembrandomänen entfernt wurden: Sie bleibt dennoch an die Oberfläche von COS-Zellen gebunden. Ursächlich soll hier die Interaktion zwischen MT-SP1 und einem weiteren Protein der Zelloberfläche sein [58, 59].

Die enge Verwandtschaft der AT-Gene von Mensch, Maus und Ratte zeigt sich nicht zuletzt im hohen Anteil ähnlicher bzw. identischer AS der exprimierten Proteine: HAT stimmt mit RAT1 und MAT1 in jeweils ca. 66% der AS *exakt* überein, zählt man noch die AS mit „starker“ (funktioneller) Ähnlichkeit hinzu, kommt man auf eine Über-

einstimmung von ca. 82%. Die beiden Nager-Isoformen untereinander zeigen 88% *exakt* identische AS und sogar 95% *funktionell* übereinstimmende AS.

Der Gebrauch alternativer initialer Exons ist im übrigen ein bekanntes Phänomen: In einer Studie wurde eine Gesamt-cDNA-Sammlung mit dem Mausgenom verglichen und man konnte zeigen, dass 31% der Gene mit Splicingvarianten über alternative initiale Exons verfügen [58]. Es gibt jedoch nur wenige Berichte über andere TTSPs, die wie die ATs sowohl membranständige als auch sekretorische Isoformen hervorbringen [60, 61].

### **4.2 Charakterisierung der AT-Proteasen**

HAT, MAT und RAT werden den Serinproteasen zugerechnet. Je nach reaktiver Gruppe unterscheidet man (derzeit) noch vier weitere Proteasenarten (Threonin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen). Die einzelnen Arten werden in „Clans“ und „Familien“ unterteilt- je nach Struktur und Reaktionsmechanismus. Das Zentrum des Reaktionsmechanismus bildet bei den Proteasen zumeist die sog. *katalytische Triade*, in der Regel bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat. Bei der Proteolyse fungiert die Hydroxylgruppe des Serins als Nucleophil, welches die Peptidbindung attackiert. Das Histidin fungiert in der Regel als Base/Protonendonator, das Aspartat wird zur Ausrichtung des Imidazolrings im Histidin benötigt. Nach der Stellung der drei AS der katalytischen Triade zueinander erfolgt die Zuordnung zu den Clans.

Die in dieser Arbeit betrachteten Airway Trypsin-like Proteasen gehören zur Familie S1 im Clan SA. S1 ist die größte Peptidasen-Familie; andere Mitglieder sind z.B. Acrosin, Trypsin, Chymotrypsin, mehrere Gerinnungsfaktoren, Plasmin, Protein C, Thrombin, Enteropeptidase, Pankreaselastase uva. Es handelt sich bei allen Mitgliedern um Endopeptidasen. Die meisten besitzen ein N-terminales Signalpeptid, das sie durch den Secretory Pathway leitet. Als Propeptide synthetisiert, bedürfen sie zur Aktivierung einer proteolytischen Spaltung. Ist hierbei das N-terminale Spaltprodukt länger, bleibt es in vielen Fällen durch Disulfidbrücken an das aktive Enzym gebunden und bildet mit diesem ein Heterodimer.

#### **4.2.1 Biochemische Eigenschaften der ATs**

Als „trypsinartige Proteasen“ schneiden die ATs bei einem pH-Optimum im Bereich von 8 sehr spezifisch Aminosäuren an der P1-Position nach einem Arg- oder Lys-Rest.

Entscheidend für diese Substratspezifität ist die sog. *Substrat-bindende Tasche*, an deren Boden sich eine Serin-, Histidin- und Aspartat-Seitenkette befindet. Hochkonserviert sind außerdem sechs Disulfidbrücken, beim Trypsin an den Positionen 15/145, 33/49, 117/218, 124/191, 156/170 und 181/205. (Die korrespondierenden Positionen bei den ATs sind aus den Schaubildern im Anhang, **Abb. 6.2- 6.4**, S. 75 ff., ersichtlich.)

Die langen AT-Isoformen sind ihrer Struktur nach noch einer weiteren Serinproteasen-Subgruppe zuzuordnen, den sog. *Typ-II-Transmembran-Serinproteasen (TTSP)*.

Bereits vor über 100 Jahren wurde mit der Enteropeptidase der erste Vertreter der TTSPs entdeckt [62]. Seit einigen Jahren werden nun mehr und mehr TTSPs kloniert: Hepsin [63], HAT [64], Corin [65], MT-SP1 [66], DESC1 [67], DESC2 und DESC3 [68] uva.

Die TTSPs sind im Bereich der Zellmembran lokalisiert und durchqueren sie. Ihr schematischer Aufbau ist wie folgt:

1. extrazelluläre proteolytische Domäne (hier befindet sich u.a. die Stammregion mit verschiedensten Strukturdomänen)
2. Transmembrandomäne
3. kurze zytoplasmatische Domäne

Die **extrazelluläre Domäne** liegt C-terminal und enthält u.a. die funktionelle katalytische Triade. Um neu sezernierte TTSPs zu aktivieren, erfolgt (hochkonserviert) die Spaltung nach einem Arg- oder Lys-Rest. Aufgrund der hochkonservierten Disulfidbrückenbindung zwischen Vorläuferanteilen und katalytischer Domäne, bleiben TTSPs auch nach der Aktivierung meist membranständig. Der Extrazellulärteil ist von seiner Lage her prädestiniert, mit anderen Zelloberflächenproteinen zu interagieren, aber auch mit gelösten Proteinen, Matrixkomponenten und Proteinen auf benachbarten Zellen.

In der *Stammregion* der extrazellulären Domäne wurden bislang 11 verschiedene Strukturdomänen nachgewiesen. Sie sind für regulatorische Aufgaben sowie für Bindungen zuständig. Die Enteropeptidase etwa besitzt hier eine sehr komplexe Domänenstruktur (von N-terminal-wärts: SEA-, LDLa-, CUB-, MAM-, CUB-, LDLa-, SR-, Tryp\_SPC-Domäne [69]), bei HAT/MAT1/RAT1 besteht die Stammregion lediglich aus der SEA- und der Tryp\_SPC-Domäne.

Tryp\_SPC stellt bei den ATs die katalytische Domäne dar. Sie wird von den Exons 7- 10 codiert und kommt bei den langen und kurzen Isoformen in identischer Weise vor. Eine

identische katalytische Domäne beider Isoformen läßt eine mögliche gleiche Substratspezifität vermuten.

Die **Transmembrandomäne** ist für die korrekte Ausrichtung des Proteins verantwortlich, insbesondere für die stets extrazelluläre Lage der proteolytischen Domäne. Ausserdem verankert sie die Protease in der Membran.

**Zytoplasmatische Domäne:** Sie ist N-terminal gelegen und eher kurz: 12 AS bei HAT bis 112 AS bei murinem Corin. Sie spielt eine Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion [70]. Bei polar ausgerichteten Zellen soll sie auch für die Positionierung an einer bestimmten Stelle der Zelloberfläche verantwortlich sein.

#### **SEA-Modul**

Bei den TTSPs sind außer den ATs bislang nur vier weitere Vertreter mit SEA-Modul bekannt (Enteropeptidase und DESC 1-3 [68, 71]), dennoch ist es aber auch in vielen anderen Proteinen enthalten [72]. Sein Name besteht aus den Anfangsbuchstaben der drei Proteine, in denen ein solches Modul erstmals nachgewiesen wurde: Sea urchin sperm protein, Enterokinase und Agrin. Das SEA-Modul hat eine Größe von ca. 120 AS und ist normalerweise extrazellulär lokalisiert. Alle Proteine, die ein SEA-Modul enthalten, sind stark glykosyliert. Zusätzlich enthalten die besser charakterisierten Proteine, wie z.B. Heparansulfat, zumeist O-glykosidisch verbundene Kohlenhydrate, welche erheblichen Anteil am Molekulargewicht haben. Das Modul könnte also die Bindung an benachbarte Kohlenhydratgruppen regulieren oder begünstigen [72]. Ferner bildet es eine Schnittstelle mehrerer Transmembranproteine [71]. Bei den TTSPs läßt die Vielzahl der gefundenen Strukturdomänen auf die Verknüpfung zu ‚Signalkomplexen‘ schließen, welche verschiedenste Wege der Signaltransduktion an der Zelloberfläche vermitteln.

Man vermutet, dass viele membranständige Proteine, die SEA enthalten, eine proteolytische Spaltung durchlaufen und dann Ligand-Rezeptor-Verbände bilden (vgl. z.B. MUC1), welche eine Rolle in der Signaltransduktion spielen könnten [73].

## 4.2.2 HAT, ein Vertreter der ATs

### **Lokalisation**

In Northern-Blot-Analysen hatten Yamaoka et al. [64] verschiedene Gewebe auf HAT untersucht. Die höchste Konzentration konnten sie dabei in der Trachea nachweisen [74].

Die trypsinartige Aktivität von Sputumproben konnte hauptsächlich auf HAT zurückgeführt werden. Dieses wird wahrscheinlich ins Lumen der Atemwege abgegeben. [75].

Woher HAT sezerniert wird, ist noch nicht letztendlich geklärt: Kido et al. [76] hatten an Ratten gezeigt, dass *Clara-Zellen* in der Wand der unteren Atemwege eine trypsinartige Protease sezernieren. Beim Menschen konnte HAT allerdings in den Clara-Zellen nicht nachgewiesen werden. HAT unterscheidet sich aber auch noch in anderen Eigenschaften von der Clara-Zell-Protease der Ratte, so dass es sich wohl um unterschiedliche Proteasen handelt. Von Yasuoka et al. [51] wurden seröse Zellen der Submucosa als Ursprung von HAT identifiziert- ein direkter Vergleich zu den Nagern ist hier wiederum nicht möglich, weil diese keine Drüsen in der Submucosa besitzen.

Genauer soll HAT im Zytoplasma von zilienträgenden Zellen des bronchialen Epithels und im basalen Anteil von Zilien lokalisiert sein [74]. Eine Beziehung der HAT-Expression zum physiologischen Zustand des Atemwegsepithels wird vermutet.

### **Struktureller Aufbau und Funktion**

HAT ist ein aus 418 AS bestehendes Polypeptid mit einer Molekularmasse von rund 46 kDa. Funktionell gliedert es sich in die o.g. katalytische Region im C-Terminus und die nicht-katalytische Region N-terminal. Die katalytische Region zeigt die Verwandtschaft zu anderen humanen Serinproteasen. Homologien bestehen u.a. zu Hepsin (38%), Enteropeptidase (32%), Acrosin (30%) und Mastzelltryptase (29%) [64]. HAT wird von Trypsin-Inhibitoren (z.B. DFP, Aprotinin) inhibiert, zählt damit zu den trypsinartigen Serinproteasen (nicht zu den Metalloproteasen, die z.B. durch EDTA oder Phosphoramidon inhibiert würden) [51]. Nicht nur die C-Termini von HAT/Trypsin/Tryptase ähneln sich [51], ebenso ihre Substratspezifität [77]: Alle drei hydrolysieren Fibrinogen [51]- wie man dies z.B. physiologischerweise bei den Tryptasen in Mastzellen beobachtet. Wie Trypsin ist HAT ein Monomer (die Mastzell-Tryptase ist ein Tetramer). Vom Molekulargewicht her sind Trypsin (23,5 kDa) und HAT (26 kDa) vergleichbar.

Biochemisch gesehen schneidet HAT bevorzugt C-terminal an der P1-Position [78] nach Arginin-Resten, das pH-Optimum dieser Reaktion liegt bei pH 8,6.

HAT wird von seiner inaktiven Form durch *limitierte Proteolyse* in die aktive, reife Form (232 AS, 26 kDa) gespalten. Dieses Muster ist auch bei anderen proteolytischen Enzymen wohlbekannt, denn sie dürfen keinesfalls ihre zersetzende Wirkung schon am Syntheseort oder im zuführenden Gangsystem entfalten (ein Selbstverdau des Organismus wäre die fatale Folge). Ein typischer Vertreter ist z.B. Trypsin mit seinem Vorläufermolekül Trypsinogen.

Noch relativ unklar ist die physiologische Rolle von HAT. Reifes HAT schneidet sehr gut Fibrinogen [75]. Je nach Konzentration oder Einwirkdauer vermindert sich z.B. das Thrombin-induzierte Gerinnungsvermögen von Fibrinogen oder verschwindet ganz. Nicht nur im Blut, auch im Sputum zählt Fibrinogen zu den Hauptproteinen. So wird vermutet, HAT könnte an der Antikoagulation innerhalb der Atemwege beteiligt sein, indem es (das auf dem Blutweg antransportierte) Fibrinogen schneidet. Yoshinaga et al. hypothetisieren z.B., ob HAT vor Fibrinablagerung auf der Atemwegsschleimhaut schützen kann [75].

Auch eine Rolle in der körpereigenen Abwehr der Atemwegsschleimhaut ist vorstellbar entweder eigenständig durch proteolytische Spaltung exogen inhalierter Proteine oder im Zusammenspiel mit anderen lokalen Substanzen (z.B. Lysozym, IgA, sekretorischem Leukozyten-Protease-Inhibitor) oder auch indirekt durch den bereits erwähnten Abbau von Fibrinablagerungen (welche die mukoziliäre Beweglichkeit beeinträchtigen, das grundlegendste Abwehrsystem der Atemwege).

In einer neueren Publikation [79] wird berichtet, dass HAT in der Lage sei, das Hämagglutinin des Influenza-A-Virus zu aktivieren. Hierdurch wird die Vervielfältigung des Virus in der Wirtszelle möglich.

Ferner kann HAT den PAR2 (Protease activated receptor 2)-Rezeptor zu aktivieren [75, 80-82]. Man vermutet daher, dass HAT eine doppelte Wirkung auf die Mucin-Regulation der Atemwege hat: Zum einen durch Erhöhung der Mucin-Produktion über einen Wachstumsfaktor/Rezeptor-Pfad im Amphiregulin-epidermalen System, zum anderen durch einen PAR2-vermittelten Pfad, der ebenfalls eine Erhöhung der Mucin-Sekretion zur Folge haben soll [83].

In Keratinozyten bewirkt HAT eine PAR2-vermittelte Interleukin-8-Ausschüttung und es konnte gezeigt werden, dass es in psoriatischer Epidermis hochreguliert wird [84].

Die Funktion von HAT im oberen Gastrointestinaltrakt ist momentan noch unklar.

### **4.3 Weshalb existiert kein „HAT2“?**

Die Nager besitzen jeweils eine kurze und eine lange AT-Isoform, beim Menschen gibt es nur die lange. In Datenbankrecherchen wie auch in RACE-Analysen findet sich kein Hinweis auf eine kurze humane Isoform. Dass ein „HAT2“ tatsächlich nicht exprimiert werden *kann*, konnten wir durch Analyse der Sequenz des HAT-Gens zeigen: Zwar befindet sich auch beim Menschen ein alternatives Startcodon stromaufwärts von Exon 6, es folgt jedoch bereits neun Nukleotide später ein Stop-Codon- d.h. es könnten theoretisch maximal Proteinfragmente mit 3 AS Länge entstehen. In vivo würden die RNA-Fragmente aber bereits vor der Translation eliminiert (sog. *Nonsense-mediated mRNA Decay* [85]).

Bei den Nagern findet sich an vergleichbarer Stelle kein Stopcodon und das offene Leseraster (ORF) kann ein ca. 280 AS langes Protein codieren.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Frage, ob beim Menschen die Ausbildung einer kurzen Isoform während der Evolution *verlorengegangen* ist (z.B. durch Mutation an der Position des heutigen Stopcodons) oder ob es sich um eine tatsächliche *Neuentwicklung* bei den Nagern handelt (falls ja: zu welchem Zweck?). Gegen eine Neuentwicklung spricht, dass der alternative Transkriptionsstartpunkt beim Menschen wie bei den Nagern an exakt derselben Stelle im Gen zu finden ist. Handelte es sich um eine Nager-exclusive Ausprägung, wäre es ein sehr großer „Zufall“ dass beim Menschen an identischer Stelle ebenfalls ein Startcodon steht. (Bei 3 Nukleotiden gäbe es rein rechnerisch immerhin  $4^3$  (= 64) mögliche Tripletts an einer bestimmten Position). Plausibler erscheint, dass es sich um ein Relikt aus einer gemeinsamen Evolutionsvorstufe handeln könnte. Beim Menschen könnte die hier eigentlich beginnende kurze Isoform nutzlos geworden sein, weil die entsprechenden Aufgaben von anderen Systemen übernommen wurden. Eine Degeneration von „HAT2“ durch z.B. Mutationsvorgänge hätte dann keine evolutionäre Bedeutung mehr. Im Gegensatz dazu könnten die Nager den „MAT2/RAT2“-Mechanismus nach wie vor zur Steuerung bestimmter Abläufe nutzen. Er bekäme somit dort auch eine andere evolutionäre Priorität: Individuen mit

einem degenerierten MAT2/RAT2-System hätten einen Überlebensnachteil und würden folglich im Laufe der Evolution verschwinden.

#### **4.4 Expressionsmuster und potentielle Funktion der ATs**

Mittels RT-PCR und Q-PCR untersuchten wir die Expression von HAT, MAT und RAT in verschiedenen Geweben. Wir stellten fest, dass die Proteasen in weitaus mehr Geweben zu finden sind, als aus bisherigen Publikationen hervorgeht. RT-PCR und Q-PCR liefern bis auf kleine Abweichungen annähernd deckungsgleiche Gewebeexpressionsmuster der ATs.

Die Expressionsmuster der drei langen Isoformen HAT, MAT1 und RAT1 sind sehr ähnlich. Bei HAT zeigt sich neben der bereits bekannten signifikanten Expression in der Trachea [64] auch eine Expression in vielen anderen Geweben: Z.B. im Oberen Gastrointestinaltrakt (vor allem in Zunge, Ösophagus und Magen), in Harnblase, Hoden, Prostata und Rückenmark.

Die Gewebeverteilung der beiden Isoformen bei den Nagern erfordert eine differenziertere Betrachtung, denn hier zeigen sich mitunter deutliche Speziesunterschiede: So ist die kurze Isoform bemerkenswerterweise in Ratten-Nebenniere sehr hoch exprimiert, aber nur relativ schwach in der Maus-Nebenniere. Dasselbe gilt für Herzmuskelgewebe. Eine vorangegangene Studie hatte RAT2 (AsP) in der Ratten-Hypophyse nachgewiesen [86]. Wir können zeigen, dass dies für beide Isoformen zutrifft, jedoch nur bei der Ratte. In entsprechenden Mausgeweben konnte keine AT-Expression gefunden werden.

Der Vergleich Nebenniere - Trachea zeigt für HAT eine um drei Größenordnungen niedrigere Expression in der Nebenniere. Das deckt sich mit der niedrigen Expression der langen Nagerisoformen in Nebennierengewebe. Unsere Ergebnisse sprechen damit gegen eine wachstumsfördernde Rolle der langen Isoformen (HAT, RAT1, MAT1) in der Nebenniere.

HAT wird in bisherigen Publikationen eine besondere Bedeutung in der Trachea zugeschrieben. Dies wird durch die deutliche Expression von MAT1 und RAT1 in der Nager-Trachea unterstrichen. Eine ebenfalls signifikante Expression findet sich im oberen Gastrointestinaltrakt. Dies legt den Schluß nahe, dass auch hier eine physiologische Funktion der ATs zu erwarten ist und sich diese nicht nur auf die zilienträgenden Zellen im Respirationstrakt beschränkt.

RAT2 soll, wie bereits erwähnt, spezifisch 1-76-N-POMC spalten und daraus ein kürzeres adrenales Mitogen entstehen lassen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von RAT2 das Wachstum von Maus-Y1-Zellen vermindert [34, 48].

Bei der Ratte zeigt sich an der Nebenniere eine deutliche Expression der kurzen Isoform, im Gegensatz zur geringen Expression der langen [87]. (Bei der Maus kommt dieser Unterschied nicht so zum Vorschein, da hier beide Isoformen in der Nebenniere keine signifikante Expression aufweisen.) Die RAT2-Expression ist aber nicht allein auf die Nebenniere beschränkt, auch oberer GI-Trakt, Herz u.a. sind RAT2-positiv. Sollte damit eine 1-76-N-POMC-Spaltung auch in anderen Geweben stattfinden, würde dies wiederum die exklusive Rolle in der Nebennieren-Mitogenese in Frage stellen. Die Expression von RAT2 auf der Oberfläche von Ösophagus und Zunge deutet jedenfalls auf zusätzliche Funktionen von RAT2 jenseits der POMC-Spaltung hin.

2004 wurde eine hohe Expression von RAT2 in fetaler Nebenniere der Ratte beschrieben [88]. Wir untersuchten, ob beim Menschen HAT (zwar die lange, aber einzige humane AT-Isoform) hier ebenfalls nachweisbar ist, konnten aber keine Expression feststellen.

Interessanterweise konnte in exokrinen Drüsen, Nebennieren und anderen peripheren Organen von Nagern eine Melanocortin-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden [89, 90]. In Ösophagus und Nebenniere der Ratte gleicht dabei das Expressionsmuster des MC5R (einer der Melanocortin-Rezeptoren) dem Muster, welches wir für die ATs gefunden haben. Dies läßt an einen Zusammenhang von ATs und MC5R denken und wirft gleichzeitig die Frage auf, wie ATs und MC5R interagieren und welche weiteren Funktionen die ATs besitzen könnten.

### **4.5 Nebennierentumorgenese und POMC**

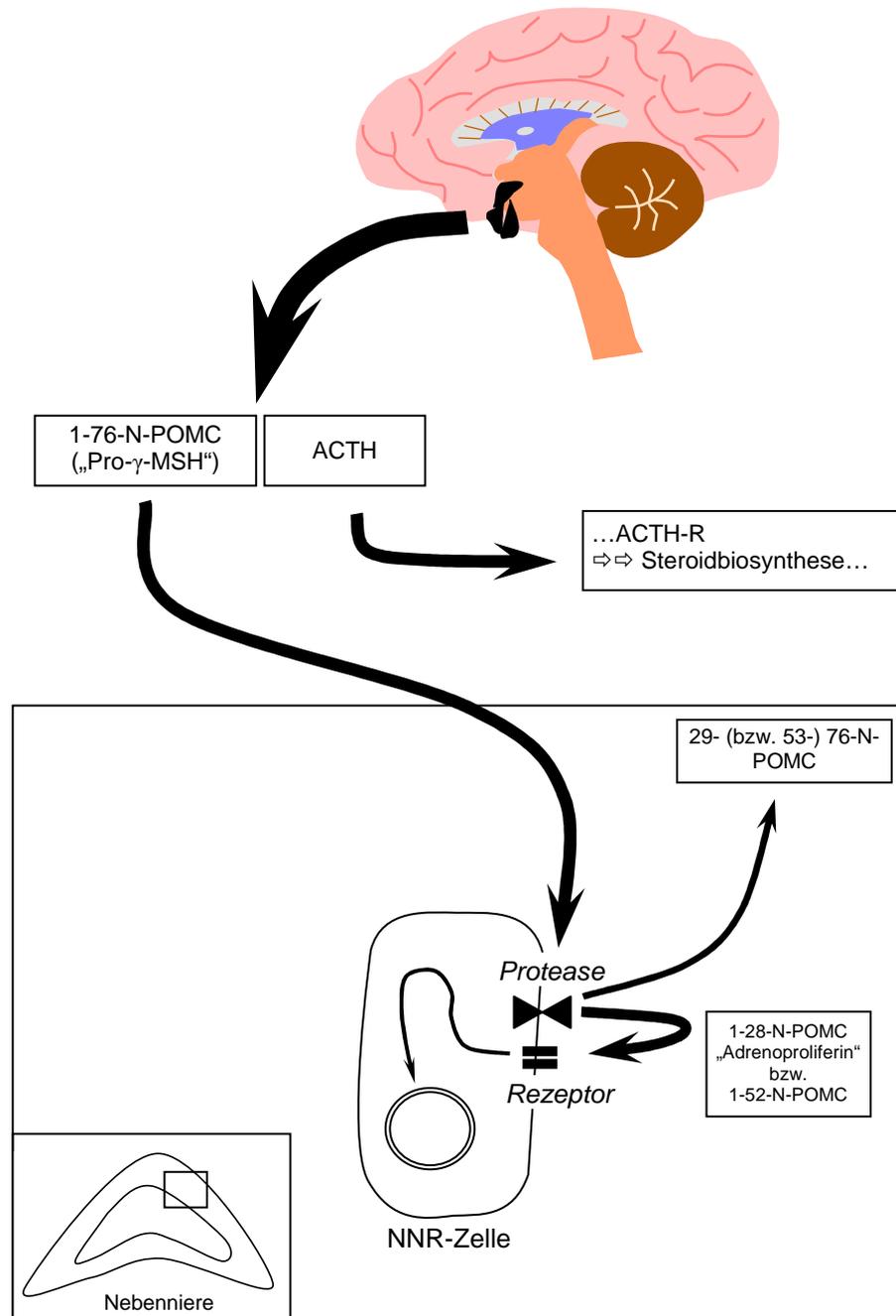
Für HAT konnte die postulierte Funktion in der Nebennierentumorgenese nicht nachgewiesen werden (vgl. auch [91]). Wie sähe aber ein Interaktionsmodell für eine Protease aus, die dieses Potenzial hätte?

POMC (vgl. Abbildung 1.2) dient in der Hypophyse als Vorläufermolekül für eine Reihe von Proteinen, u.a. für ACTH. Bei der Sekretion von ACTH wird gleichzeitig N-terminales, 1-76-N-POMC co-sezerniert, das bei der Abspaltung von ACTH aus POMC

quasi als Nebenprodukt anfällt (vgl. **Abbildung 4.1**). Über den Blutweg gelangt dieses zur Nebenniere und könnte von einer dort angesiedelten Protease zu kürzeren Fragmenten („Adrenoproliferin“) geschnitten werden. Über einen postulierten „Adrenoproliferinrezeptor“ gelangten die Fragmente in die Zelle und zum Zellkern. Dort eingeschleust könnten sie als adrenale Mitogene wirken. Für 1-52- oder 1-28-N-POMC ist diese Wirkung *in vitro* und teilweise auch *in vivo* nachgewiesen. Würde eine entsprechende Protease von einer Nebennierentumorzelle überexprimiert, ergäbe sich für diese Zelle ein Wachstumsvorteil. Die Protease hätte das Potenzial eines Onkogens. In der Tat konnte dieser Sachverhalt für RAT2 in NNR-Tumorzellen bei Nagern nachgewiesen werden [34].

Beim Menschen hingegen ist die Expression von HAT in der normalen Nebenniere per se schon sehr niedrig und es gelang uns nur in 1 von 24 NNR-Tumorgeweben, HAT nachzuweisen- die restlichen 23 Gewebe blieben in der Q-PCR HAT-negativ. HAT scheint damit in der Nebennierenrinden-Tumorgenese wohl keine Rolle zu spielen. Darüberhinaus ist auch eine Beteiligung am *physiologischen* NNR-Wachstum fraglich. Allerdings fanden wir in 4 von 5 Phäochromozytomen (Tumoren des NN-Marks) eine schwache HAT-Expression. Außerdem ist die Expression von POMC-Peptiden eine typische Eigenschaft von chromaffinen Zellen im Nebennierenmark [92]. Es wäre deshalb denkbar, dass HAT hier an der Spaltung von POMC beteiligt ist.

Damit einhergehend konnte HAT in Extrakten aus totalem Nebennierengewebe (bestehend aus Rinde *und* Mark) nachgewiesen werden- nicht jedoch in reinem *Rindengewebe*. Dies legt den Schluß nahe, dass chromaffine Zellen eine physiologische Quelle von HAT darstellen könnten. Kürzere POMC-Peptide könnten im NNM generiert werden und über parakrine Mechanismen sowohl auf Zellen des NNM als auch die angrenzende NNR einwirken.



**Abbildung 4.1: Modell der Interaktion von POMC und NN-Wachstum.** Mit der Sekretion von ACTH erfolgt in der Hypophyse eine Co-Sekretion von Pro- $\gamma$ -MSH. Dieses erreicht auf dem Blutweg die NNR-Zelle, auf deren Oberfläche eine Protease sitzt, die das Pro- $\gamma$ -MSH spezifisch spaltet. Wahrscheinlich erfolgt die physiologische Spaltung an Pos. 52/ 53. (In vitro ergab sich durch Spaltung an Pos. 28/ 29 ebenfalls ein potentes Spaltprodukt („Adrenoproliferin“)). Die neu entstandenen (reifen) N-terminalen Spaltprodukte setzen über einen postulierten Adrenoproliferinrezeptor in der Zellwand die beobachteten mitogenen Effekte im Zellkern in Gang. Unsere Untersuchungen legen aber nahe, dass dieses nur bei Nagern (und da vor allem bei der Ratte) gilt, während beim Menschen andere Regulationsmechanismen vorliegen müssen.

## 5. Zusammenfassung

Ausgehend von der bereits bekannten AsP (RAT2) der Ratte, haben wir in dieser Arbeit die neue Familie der „Airway Trypsin-like Serinproteasen“ anhand ihrer Isoformen bei Maus, Ratte und Mensch (MAT, RAT und HAT) untersucht. Die jeweils codierenden Gene wurden identifiziert. Bei Maus und Ratte konnten wir zwei Isoformen, eine kurze und eine lange, nachweisen, die das Ergebnis von alternativer Transkription sind. Beim Menschen wird keine kurze (HAT-)Isoform gebildet, es gibt also kein Homolog zur AsP bzw. MAT2 der Nagetiere.

Ferner wurden der Aufbau, die Strukturdomänen und die Gewebeverteilung der Isoformen charakterisiert. Die Ergebnisse deuten auf ein multifunktionelles Protein hin, welches in viele physiologische Prozesse involviert sein dürfte. Unter anderem unsere Ergebnisse legen nahe, dass auch die Rolle von AsP über die Steuerung der adrenalen Mitogenese hinausreicht.

Die weitverbreitete Expression der ATs in vielen Geweben stellt ihre spezifische Rolle für eine ausschließliche N-POMC-Spaltung und die Bildung von adrenalen Mitogenen in Frage, denn diese Spaltung fände an vielen verschiedenen Stellen statt, welche erkennbar in keiner Beziehung zur Nebennieren-Physiologie stehen.

Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit ist die Tatsache, dass sich die Ergebnisse bei der Ratte und der dortigen physiologischen Funktion der AsP in der adrenalen Mitogenese nicht auf den Menschen übertragen lassen. Beim Menschen läßt sich HAT nicht in der Nebennierenrinde nachweisen, HAT stellt also nicht das humane Gegenstück zur AsP der Ratte dar. Umgekehrt finden sich auch bei den Nagetieren die langen, HAT-ähnlichen Isoformen nicht in der Nebenniere.

Ferner konnte eine Beteiligung von HAT an der Nebennierentumorgenese anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. HAT ließ sich in Nebennierenrindentumoren praktisch nicht nachweisen. In Phäochromozytomen fanden wir in 4 von 5 Gewebeproben eine HAT-Expression. Die chromaffinen Zellen im Nebennierenmark exprimieren u.a. POMC, so dass HAT hier evtl. doch eine physiologische Rolle einnehmen könnte.

Über die Funktion der AT-Proteasen an anderen Orten ist bislang nur wenig bekannt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ihre Eigenschaften und Aufgaben in den verschiedenen Geweben zu definieren.

Zusammenfassend gelang in dieser Arbeit die Charakterisierung einer interessanten, in mehreren Spezies konservierten Proteasenfamilie, die über ein komplexes Expressionsmuster verfügt. Im Gegensatz zum Menschen existieren in den Nagern zwei Isoformen: eine kurze und eine lange. Sie gehen durch den Mechanismus der alternativen Transkription aus einem einzigen Gen hervor. Aufgrund der breiten Expression in vielen Geweben dürfte die Funktion sehr vielschichtig sein. Eine Rolle in der humanen Nebennierentumorgenese konnte für das humane Homolog nicht nachgewiesen werden.

## 6. Anhang

Bez.	Diagnose	Geschl.	Alter	Größe (cm)
N1	Normale Nebenniere	m	49	-
N2		m	42	-
N3		m	56	-
N4		w	37	-
N5		m	79	-
H11	Hormoninaktives Adenom	w	62	5
H12		w	34	7
H13		w	67	7
H14		w	71	2,7
H15		m	71	9
A1	Aldosteronproduzierendes Adenom	m	46	1,1
A2		m	44	1
A3		m	51	1,7
A4		m	55	kA
A5		m	63	0,5
C1	Cortisolproduzierendes Adenom	w	72	3
C2		w	43	2,8
C3		w	46	3
C4		w	42	2,9
C5		w	34	4
CA1	Nebennierenrindenzarzinom	w	70	13
CA2		m	71	14
CA3		m	14	17
CA4		m	64	kA
CA5		m	1	9
CA6		m	52	17
CA7		w	37	13
CA8		w	42	17
CA9		m	49	kA
H1	ACTH-abhängige Hyperplasie	w	66	-
H2		m	37	-
P1	Phäochromozytom	m	50	4,5
P2		w	49	8
P3		w	45	3,6
P4		m	35	4,5
P5		w	61	3,3

kA= keine Angaben verfügbar

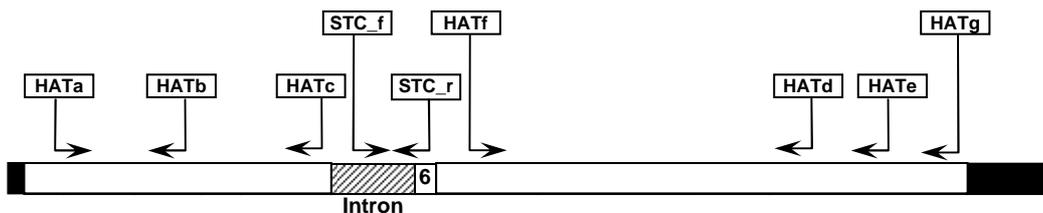
**Tabelle 6.1: Patientendaten.** Alle Diagnosen sind histologisch gesichert.

	mRNA		Protein	
	Acc.-No.	gi	Acc.-No.	gi
HAT	NM_004262	4758507	NP_004253	4758508
MAT1	AF448809	17864975	AAL47139	17864976
MAT2	AF539752	33187749	AAP97729	33187750
RAT1	AF453776	17981041	AAL50817	17981042
RAT2	NM_022630	12018321	NP_072152	12018322

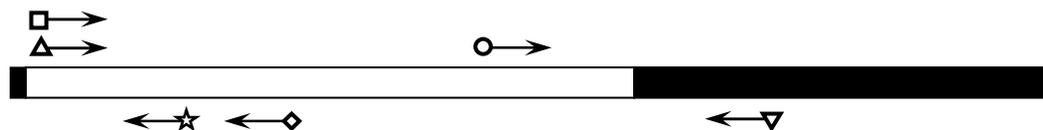
**Tabelle 6.2: Datenbanknummern der AT-Isoformen in NCBI-Entrez.** Angegeben ist jeweils die Accession-No., sowie die gi von mRNA und zugehörigem Protein.

## 6.1 Primer

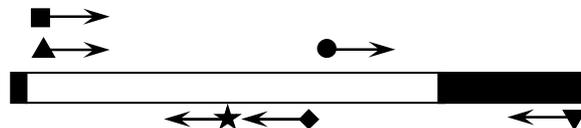
### HAT



### MAT1/ RAT1



### MAT2/ RAT2



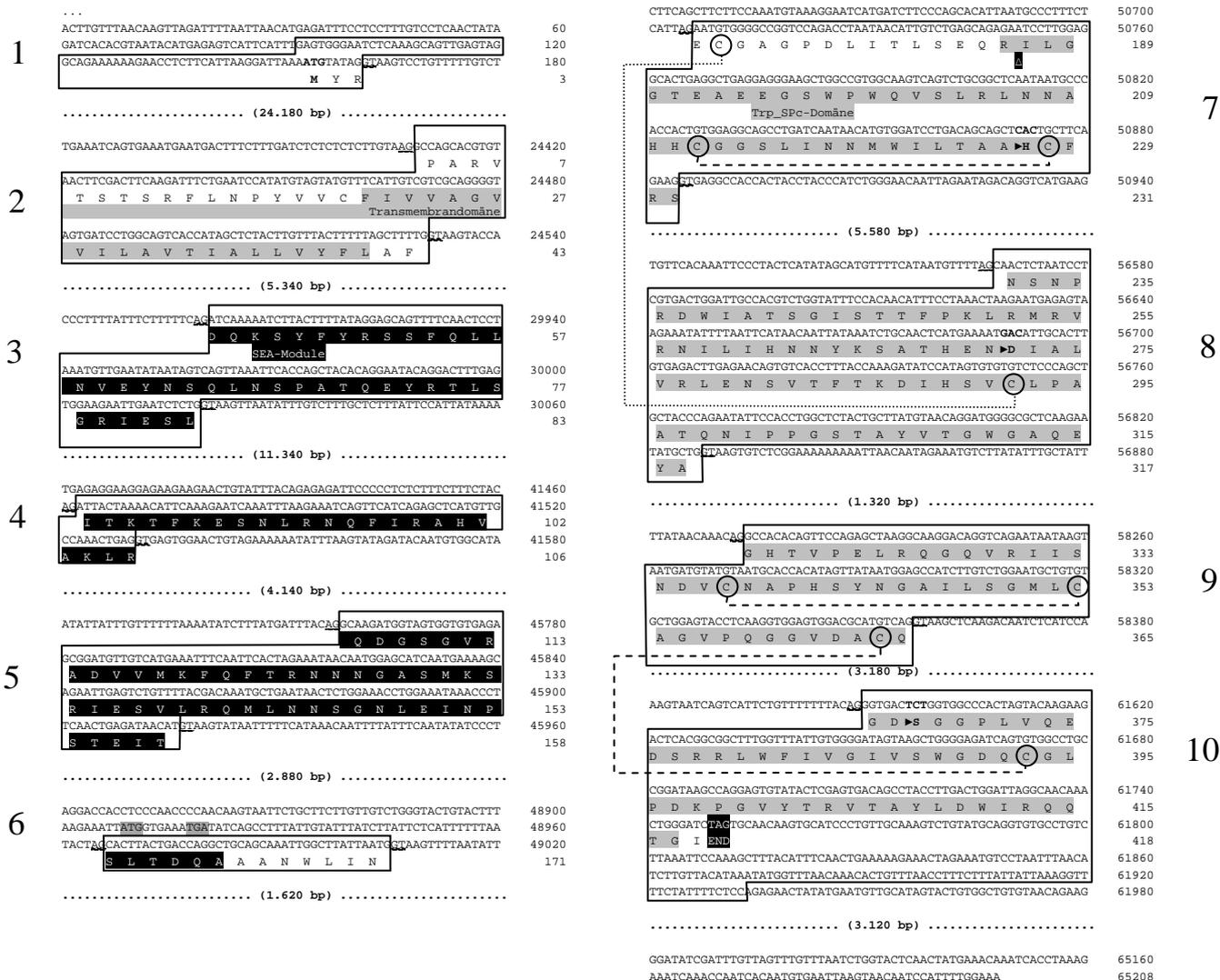
**Abbildung 6.1: Lage der Primer.** Die Balken zeigen die cDNAs der langen und kurzen AT-Isoform. Die nicht-translatierten Bereiche sind schwarz, der Open Reading Frame ist weiß. Die Symbole kennzeichnen die Begrenzungen der von uns verwendeten Primer (siehe **Tabelle 6.3**, S. 74).

## 6. Anhang

Primer	Sym- bol	Sequenz	Einsatz
<b>Mensch</b>			
HATa	---	5'-ATG TAT AGG CCA GCA CGT GTA ACT TCG ACT TC-3'	RT-PCR (232 bp-Fragment)
HATb	---	5'-CAC TCA AAG TCC TGT ATT CCT GTG TAG CTG GTG AAT TTA ACT G-3'	
HATc	---	5'-AGT TGA AGG GTT TAT TTC CAG GTT TCC AGA GTT ATT-3'	5'-RACE
HATd	---	5'-TGA GTC TTC TTG TAC TAG TGG GCC ACC AGA-3'	
HATe	---	5'-ATA CAG ACT TTG CAA CAG GGA TGC ACT TGT T-3'	
HATf	---	5'-CTG TGG AGG CAG CCT GAT CAA TAA CAT GTG GAT CCT G-3'	RT-PCR (624 bp-Fragment)
HATg	---	5'-TAG ATC CCA GTT TGT TGC CTA ATC CAG TCA AGG TAG GCT GTC ACT C-3'	
STC f	---	5'-GCC TAG GAA TCT GCA TTT TAG AGG ACC ACC TCC C-3'	Stop-Codon-PCR
STC r	---	5'-GCC AAT TTG CTG CAG CCT GGT CAG TAA GTG C-3'	
<b>Maus</b>			
MAT1a	▲	5'-ATG TAT AGG CCA AGA CCA ATG CTA TCA CCG TCA AGA TTC T-3'	Full-lengt- cDNA
MAT1b	▼	5'-CTA GAT TCC CGT CTG CTG TCT GAT CCA GTT G-3'	
MAT1c	★	5'-GTG TCC TGA TAA ACT CAC TTT TTA GAC TTG ATC CTC GAA ATT CAT-3'	5'-RACE
MAT1d	○	5'-ATA AGC CAG GCG TGT ATA CTC GAG TGA CAG CCT ACC GC-3'	3'-RACE
MAT1e	□	5'-ATG TAT AGG CCA AGA CCA ATG CTA TCA CCG TCA AGA TTC T-3'	RT-PCR
MAT1f	◇	5'-GTG TCC TGA TAA ACT CAC TTT TTA GAC TTG ATC CTC GAA ATT CAT-3'	
MAT2a	▲	5'-ATG ATT TTC AGC TTC TGT TTT GTT GAT TTT GTT CTC AC-3'	Full-lengt- cDNA
MAT2b	▼	5'-CTA GAT TCC CGT CTG CTG TCT GAT CCA GTT G-3'	
MAT2c	★	5'-CTA TCA TTA AGA AAG AAA AGG TGA GAA CAA AAT CAA CAA AAC AGA AGC TGA AAA TCA T-3'	5'-RACE
MAT2d	●	5'-ATA AGC CAG GCG TGT ATA CTC GAG TGA CAG CCT ACC GC-3'	3'-RACE
MAT2e	■	5'-AGC TTC CTG AGA GCC AGG TGA AAT GAT TTT CAG C-3'	RT-PCR
MAT2f	◆	5'-TAG CTT TTG AAG CAA TGA GCT GCT GTC AGG ACC-3'	
<b>Ratte</b>			
RAT1a	▲	5'-ATG TAT AGG CCA AGA TCA ATG GTA TCA CCT TCA AGA TTC TTC AA-3'	Full-lengt- cDNA
RAT1b	▼	5'-CTA GAT TCC AGT CTG CTG CCT AAT CCA GTT GCG GTA-3'	
RAT1c	★	5'-CTT GAA TAA TGA AGA GGT CCT TGG TTC TGT CCG TCC TAC T-3'	5'-RACE
RAT1d	○	5'-ACG CGC CGC CTC CCG TGA AGT CTG TAC CCA-3'	3'-RACE
RAT1e	□	5'-CAC CAG CTA CGC ATG AAT ACA GAA CCT TGA GTG AAA G-3'	RT-PCR
RAT1f	◇	5'-ATT CGA GTA GCT TCT GAA GCA GTG AGC GGC TGT-3'	
RAT2a	▲	5'-ATG AGT TTC AGC TTC TGT TTT GTT GAT CTT CTT CTC GTG-3'	Full-lengt- cDNA
RAT2b	▼	5'-CTA GAT TCC AGT CTG CTG CCT AAT CCA GTT GCG GTA-3'	
RAT2c	★	5'-GTC AGT GAG TGC TAG CGT TAA GAA AGA AAG CAC GAG AAG A-3'	5'-RACE
RAT2d	●	5'-ACG CGC CGC CTC CCG TGA AGT CTG TAC CCA-3'	3'-RACE
RAT2e	■	5'-CTC ATG AAA TCA GGG TGA AAT GAG TTT CAG CTT-3'	RT-PCR
RAT2f	◆	5'-GCA ATA TCA TTA TCA CGA GTT ATG GAG TTG TAC TCA GC-3'	
<b>Sonstige</b>			
β-Actin_f	---	5'-AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA ATC TGG CAC-3'	RT-PCR (Kontrolle)
β-Actin_r	---	5'-ATG TAT AGG CCA GCA CGT GTA ACT TCG ACT TC-3'	

**Tabelle 6.3: Primerübersicht.** Dargestellt sind die Sequenzen der Primer sowie ihr Einsatzbereich. Die Symbole beziehen sich auf die obige *Abbildung 6.1*. Hierbei sind die Symbole der langen Isoformen in innen weiß, die der kurzen ausgefüllt.

# Das HAT-Gen



**Abbildung 6.2: Der Bereich des HAT-Gens in der menschlichen DNA.** Dargestellt ist jeweils die cDNA. Die zehn Exons (Nummerierung am Rand) sind jeweils durch Kästen hervorgehoben. Die korrespondierende Proteinsequenz befindet sich jeweils unter der cDNA-Sequenz. Auch sie ist durchnummeriert, bei MAT und RAT stehen die *kursiv* gedruckten Zahlen für die Sequenz der kurzen Isoformen. Die flankierenden Exon-Erkennungssequenzen AG bzw. GT sind jeweils wellig unterstrichen. Die Introns sind nicht komplett abgedruckt, lediglich Beginn und Ende, sowie die Anzahl der ausgeblendeten Basenpaare. Die Strukturdomänen von HAT sind grau hinterlegt: Die **Transmembrandomäne**, die **SEA-Domäne** und die **Trypsin-like Serinproteasen-Domäne**. Nicht gesondert eingezeichnet ist der zytoplasmatische Anteil am Anfang. Bei MAT und RAT ist in Exon 6 jeweils noch das Signalpeptid am Beginn der kurzen Isoform hervorgehoben. Die Lage der Disulfidbrücken ist folgendermaßen eingezeichnet: die Disulfidverbindungskette zwischen Linkerpeptid und Trypsindomäne ist gepunktet (.....), die übrigen Disulfidbrücken sind gestrichelt dargestellt (- - - - -). Das weiße Dreieck (▲) kennzeichnet die Aktivierungsstelle der Trypsindomäne, die drei Aminosäuren der hochkonservierten katalytischen Triade sind jeweils mit Pfeilspitzen (▶) markiert.

# Das RAT-Gen

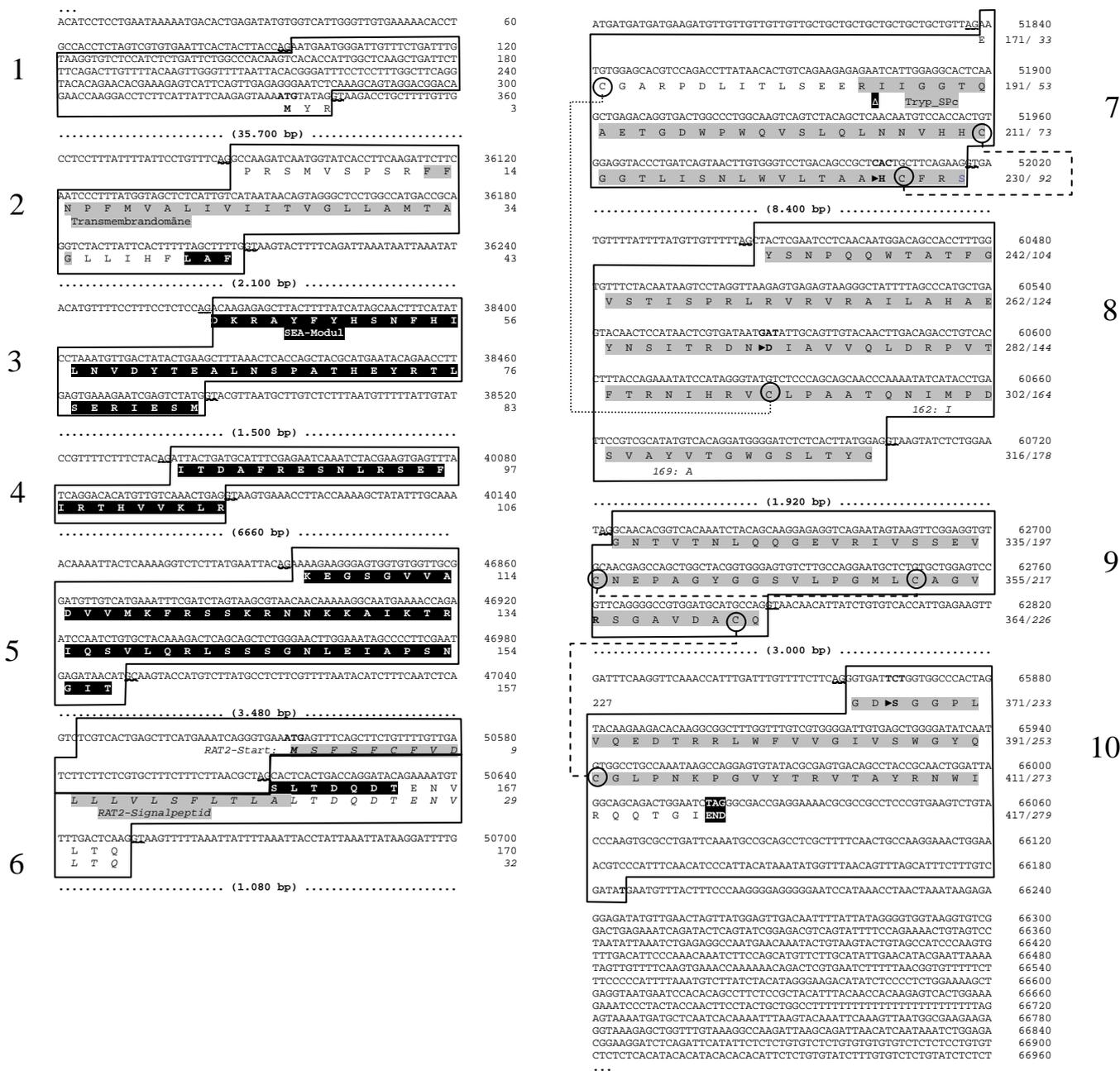


Abbildung 6.3: Der Bereich des RAT-Gens in der DNA der Ratte. Legende siehe Abb. 6.2.

# Das MAT-Gen

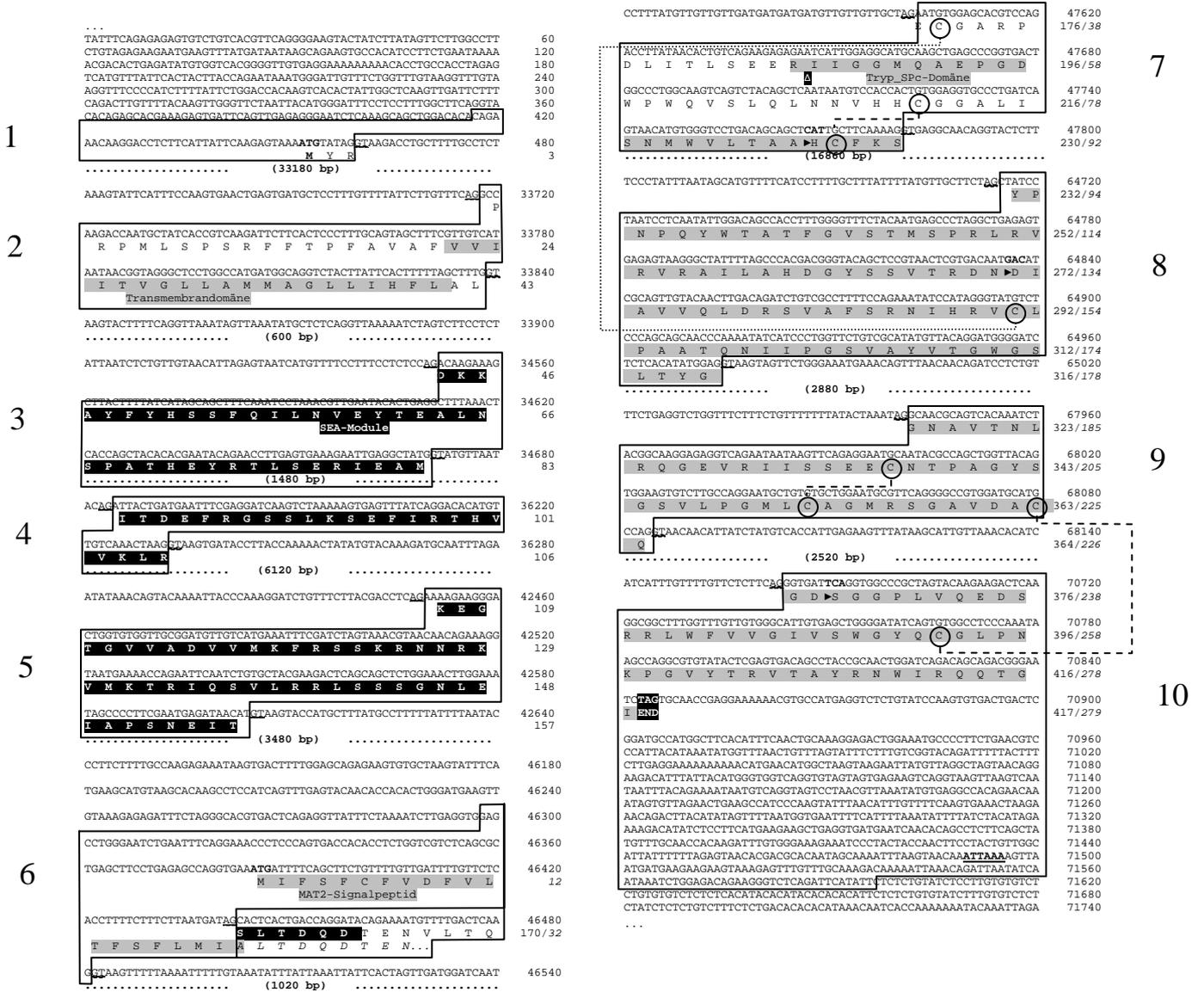


Abbildung 6.4: Der Bereich des MAT-Gens in der DNA der Maus. Legende siehe Abb. 6.2.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Schiebler, T.H., *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. 1996, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
2. Pschyrembel, W., *Klinisches Wörterbuch*. 257. Auflage ed. 1994, Berlin, New York: de Gruyter.
3. Baxter, J. and J. Tyrell, *The adrenal cortex*, in *Endocrinology and Metabolism*, L. Frohmann, Editor. 1986, MacGraw-Hill: New York. p. 511-692.
4. Orth, D., W. Kovacs, and C. DeBold, *The Adrenal Cortex*, in *Williams Textbook of Endocrinology*, D. Foster, Editor. 1992, Saunders: Philadelphia. p. 489- 621.
5. Esteban, N.V. and A.L. Yergey, *Cortisol production rates measured by liquid chromatography/mass spectrometry*. *Steroids*, 1990. **55**(4): p. 152-8.
6. Wilchens, T. and H. Schulte, *Regulation der ACTH-Freisetzung.*, in *Nebenniere und Streß*, A.B.u.S. H., Editor. 1995, Schattauer-Verlag. p. 101-4.
7. Williams, G. and R. Dluhy, *Erkrankungen der Nebennierenrinde*, in *Harrisons Innere Medizin*, H.I. Medizin, Editor. p. 2285-2298.
8. Jones, I.C., *Evolutionary aspects of the adrenal cortex and its homologues. The Sir Henry Dale Lecture for 1976*. *J Endocrinol*, 1976. **71**(2): p. 3P-31P.
9. Estivariz, F.E., Lowry P.J., and S. Jackson, *Control of Adrenal Growth*, in *The Adrenal Gland*, J. VHT, Editor. 1992. p. 43- 70.
10. Dallman, M.F., et al., *Adrenocorticotropin inhibits compensatory adrenal growth after unilateral adrenalectomy*. *Endocrinology*, 1980. **107**(5): p. 1397-404.
11. Dunlap, N.E. and W.E. Grizzle, *Golden Syrian hamsters: a new experimental model for adrenal compensatory hypertrophy*. *Endocrinology*, 1984. **114**(5): p. 1490-5.
12. Smith, P.E., *Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat*. *American J of Anatomy*, 1930. **45**: p. 205- 74.
13. Nussdorfer, G.G., *Cytophysiology of the adrenal cortex*. *Int Rev Cytol*, 1986. **98**: p. 1-405.
14. Walsh, S.W., R.L. Norman, and M.J. Novy, *In utero regulation of rhesus monkey fetal adrenals: effects of dexamethasone, adrenocorticotropin, thyrotropin-releasing hormone, prolactin, human chorionic gonadotropin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone on fetal and maternal plasma steroids*. *Endocrinology*, 1979. **104**(6): p. 1805-13.
15. Bransome, E.D., Jr., *Regulation of adrenal growth. Differences in the effects of ACTH in normal and dexamethasone-suppressed guinea pigs*. *Endocrinology*, 1968. **83**(5): p. 956-64.
16. Wright, N.A., D.R. Appleton, and A.R. Morley, *Effect of dexamethasone on cell population kinetics in the adrenal cortex of the prepubertal male rat*. *J Endocrinol*, 1974. **62**(3): p. 527-36.
17. Arola, J., et al., *Corticosterone regulates cell proliferation and cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of fetal rat adrenals*. *Endocrinology*, 1994. **135**(5): p. 2064-9.
18. Ramachandran, J. and A.T. Suyama, *Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(1): p. 113-7.
19. Mesiano, S. and R.B. Jaffe, *Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(3): p. 378-403.
20. Nickerson, P.A., *Quantitative study on the effect of an ACTH-producing pituitary tumor on the ultrastructure of the mouse adrenal gland*. *Am J Pathol*, 1975. **80**(2): p. 295-308.
21. Hornsby, P.J., et al., *Loss of expression of a differentiated function gene, steroid 17 alpha-hydroxylase, as adrenocortical cells senescence in culture*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(6): p. 1580-4.
22. Studzinski, G.P., D.C. Hay, and T. Symington, *Observations on the weight of the human adrenal gland and the effect of preparations of corticotropin of different purity on the weight and morphology of the human adrenal gland*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1963. **23**: p. 248-54.
23. Di Blasio, A.M., et al., *Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotropic hormone: rationalization of in vitro and in vivo findings*. *Biol Reprod*, 1990. **42**(4): p. 683-91.
24. Hornsby, P.J., *Regulation of adrenocortical cell proliferation in culture*. *Endocr Res*, 1984. **10**(3-4): p. 259-81.

25. Estivariz, F.E., et al., *Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides*. Nature, 1982. **297**(5865): p. 419-22.
26. Kahri, A.I., et al., *ACTH-induced selective death of rat adrenocortical cells in primary culture*. Endocr Res, 1996. **22**(4): p. 409-10.
27. McAllister, J.M. and P.J. Hornsby, *Improved clonal and nonclonal growth of human, rat and bovine adrenocortical cells in culture*. In Vitro Cell Dev Biol, 1987. **23**(10): p. 677-85.
28. Estivariz, F.E., et al., *Purification and characterization of a gamma-melanotropin precursor from frozen human pituitary glands*. Biochem J, 1980. **191**(1): p. 125-32.
29. Lowry, P.J., et al., *The case for pro-gamma-MSH as the adrenal growth factor*. Endocr Res, 1984. **10**(3-4): p. 243-58.
30. Estivariz, F.E., et al., *Adrenal regeneration in the rat is mediated by mitogenic N-terminal pro-opiomelanocortin peptides generated by changes in precursor processing in the anterior pituitary*. J Endocrinol, 1988. **116**(2): p. 207-16.
31. Lowry, P.J., et al., *Pro-gamma-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth*. Nature, 1983. **306**(5938): p. 70-3.
32. Ross, J.T., et al., *Infusion of N-proopiomelanocortin-(1-77) increases adrenal weight and messenger ribonucleic acid levels of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase in the sheep fetus during late gestation*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2153-8.
33. Yaswen, L., et al., *Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1066-70.
34. Bicknell, A.B., et al., *Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth*. Cell, 2001. **105**(7): p. 903-12.
35. Fassnacht, M., et al., *N-terminal pro-opiomelanocortin (POMC) acts as an adrenal mitogen*. Proceedings of the Endocrine Society, 2000: p. P864.
36. Deneff, C., M. Roudbaraki, and A. Van Bael, *Growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of pro-opiomelanocortin*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001. **28**(3): p. 239-43.
37. Estivariz, F.E., et al., *Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis*. J Endocrinol, 1988. **116**(2): p. 201-6.
38. Bennett, H.P., et al., *Reinvestigation of the disulfide bridge arrangement in human pro-opiomelanocortin N-terminal segment (hNT 1-76)*. Int J Pept Protein Res, 1986. **27**(3): p. 306-13.
39. Seger, M.A. and H.P. Bennett, *Structure and bioactivity of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin*. J Steroid Biochem, 1986. **25**(5B): p. 703-10.
40. Schulte, H., *Hypercortisolismus - Cushing Syndrom*, in *Praktische Endokrinologie*, S.H. Allolio B., Editor. 1996, Urban u. Schwarzenberg. p. 219- 27.
41. Reincke M., A.B., *Das Nebenniereninzidentalom*. Dt. Ärzteblatt 1995, 1995. **92**: p. 764- 70.
42. Copeland, P.M., *The incidentally discovered adrenal mass*. Ann Intern Med, 1983. **98**(6): p. 940-5.
43. Mansmann, G., et al., *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. Endocr Rev, 2004. **25**(2): p. 309-40.
44. Grumbach, M.M., et al., *Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. Ann Intern Med, 2003. **138**(5): p. 424-9.
45. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
46. Fassnacht, M. and B. Allolio, *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(2): p. 273-89.
47. Fassnacht M, H.S., Banfelder N, Weismann D, Allolio B, *Diagnostik und Therapie des Nebennierenrinden-Karzinoms*. Dtsch Ärzteblatt, 2005. **102**(23): p. 1670-1675.
48. Bicknell, A.B., *Identification of the adrenal protease that cleaves pro-gamma-MSH: the dawning of a new era in adrenal physiology?* J Endocrinol, 2002. **172**(3): p. 405-10.
49. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
50. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
51. Yasuoka, S., et al., *Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(3): p. 300-8.
52. Hartmann, E., T.A. Rapoport, and H.F. Lodish, *Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5786-90.

53. Parks, G.D. and R.A. Lamb, *Topology of eukaryotic type II membrane proteins: importance of N-terminal positively charged residues flanking the hydrophobic domain*. Cell, 1991. **64**(4): p. 777-87.
54. Hopp, T.P. and K.R. Woods, *A computer program for predicting protein antigenic determinants*. Mol Immunol, 1983. **20**(4): p. 483-9.
55. Kozak, M., *At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells*. J Mol Biol, 1987. **196**(4): p. 947-50.
56. Schultz, J., et al., *SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 231-4.
57. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
58. Zavolan, M., E. Van Nimwegen, and T. Gaasterland, *Splice Variation in Mouse Full-Length cDNAs Identified by Mapping to the Mouse Genome*. Genome Res, 2002. **12**(9): p. 1377-85.
59. Takeuchi, T., et al., *Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26333-42.
60. Kim, D.R., et al., *Cloning and expression of novel mosaic serine proteases with and without a transmembrane domain from human lung*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1518**(1-2): p. 204-9.
61. Hooper, J.D., et al., *Mouse matriptase-2: identification, characterization and comparative mRNA expression analysis with mouse hepsin in adult and embryonic tissues*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 3): p. 689-702.
62. LaVallie, E.R., et al., *Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(31): p. 23311-7.
63. Tsuji, A., et al., *Hepsin, a cell membrane-associated protease. Characterization, tissue distribution, and gene localization*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16948-53.
64. Yamaoka, K., et al., *Cloning and characterization of the cDNA for human airway trypsin-like protease*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11895-901.
65. Yan, W., et al., *Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14926-35.
66. Kim, M.G., et al., *Cloning and chromosomal mapping of a gene isolated from thymic stromal cells encoding a new mouse type II membrane serine protease, epithin, containing four LDL receptor modules and two CUB domains*. Immunogenetics, 1999. **49**(5): p. 420-8.
67. Lang, J.C. and D.E. Schuller, *Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Br J Cancer, 2001. **84**(2): p. 237-43.
68. Netzel-Arnett, S., et al., *Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 237-58.
69. Kitamoto, Y., et al., *Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7588-92.
70. Hooper, J.D., et al., *Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 857-60.
71. Abe, J., T. Fukuzawa, and S. Hirose, *Cleavage of Ig-Hepta at a "SEA" module and at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23391-8.
72. Bork, P. and L. Patthy, *The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation*. Protein Sci, 1995. **4**(7): p. 1421-5.
73. Wreschner, D.H., et al., *Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins*. Protein Sci, 2002. **11**(3): p. 698-706.
74. Takahashi, M., et al., *Localization of human airway trypsin-like protease in the airway: an immunohistochemical study*. Histochem Cell Biol, 2001. **115**(3): p. 181-7.
75. Yoshinaga, S., Y. Nakahori, and S. Yasuoka, *Fibrinogenolytic activity of a novel trypsin-like enzyme found in human airway*. J Med Invest, 1998. **45**(1-4): p. 77-86.
76. Kido, H., et al., *Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13573-9.
77. Lehninger, A.L., *Biochemistry*. 2nd Edition ed. 1981, New York: Worth Publisher Inc. 106.
78. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **27**(2): p. 157-62.

## 7. Literaturverzeichnis

---

79. Beyerle, M.H., *Klonierung der Human Airway Trypsin-like Protease und Untersuchungen zu ihrer Fähigkeit der Aktivierung des Influenza A-Virus Hämagglutinins*. 2008: Marburg (Promotionsarbeit).
80. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(2): p. 245-82.
81. Miki, M., et al., *Effect of human airway trypsin-like protease on intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration in human bronchial epithelial cells*. *J Med Invest*, 2003. **50**(1-2): p. 95-107.
82. O'Brien, P.J., et al., *Protease activated receptors: theme and variations*. *Oncogene*, 2001. **20**(13): p. 1570-81.
83. Chokki, M., et al., *Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **30**(4): p. 470-8.
84. Iwakiri, K., et al., *Human airway trypsin-like protease induces PAR-2-mediated IL-8 release in psoriasis vulgaris*. *J Invest Dermatol*, 2004. **122**(4): p. 937-44.
85. Wormington, M., *Zero tolerance for nonsense: nonsense-mediated mRNA decay uses multiple degradation pathways*. *Mol Cell*, 2003. **12**(3): p. 536-8.
86. Lowry, P.J., et al., *Pars intermedia pro-gamma-melanotropin and a cleft protease, a mitogenic conspiracy in the pituitary?* Proc 192nd Meeting of the Society for Endocrinology, London, UK, 2001, 2001. **Abstract 2 OC18**.
87. Hansen, I.A., et al., *The adrenal secretory serine protease AsP is a short secretory isoform of the transmembrane airway trypsin-like protease*. *Endocrinology*, 2004. **145**(4): p. 1898-905.
88. Schulte, D.M., M. Reincke, and F. Beuschlein, *Expression and distribution of differentiation and proliferation markers during mouse adrenal development*. Program and Abstract of the 86th Endocrine Society meeting New Orleans, 2004: p. P3-253.
89. van der Kraan, M., et al., *Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands*. *Endocrinology*, 1998. **139**(5): p. 2348-55.
90. Labbe, O., et al., *Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues*. *Biochemistry*, 1994. **33**(15): p. 4543-9.
91. Hahner, S., et al., *Evidence against a role of human airway trypsin-like protease--the human analogue of the growth-promoting rat adrenal secretory protease--in adrenal tumorigenesis*. *Eur J Endocrinol*, 2005. **152**(1): p. 143-53.
92. Thorne, B.A., O.H. Viveros, and G. Thomas, *Expression and processing of mouse proopiomelanocortin in bovine adrenal chromaffin cells. A model system to study tissue-specific prohormone processing*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(21): p. 13607-15.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Nebenniere.....	1
Abbildung 1.2: Das humane Pro-Opiomelanocortin (POMC). .....	7
Abbildung 1.3: 1-28-N-POMC („Adrenoproliferin“). .....	10
Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf einer PCR. ....	22
Abbildung 2.2: Vergleich von fünf verschiedenen kommerziell erhältlichen RT-PCR-Systemen. ....	27
Abbildung 2.3: RACE: Mechanismus der SMART™-cDNA-Synthese .....	28
Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des pCR®II-TOPO®-Vektors. ....	33
Abbildung 3.1: Ergebnis der 5'-RACE von humaner Trachea mit 3 verschiedenen Primern und einem Kontrollprimer. ....	35
Abbildung 3.2: Gegenüberstellung zweier Southern Blots.....	36
Abbildung 3.3: Spezies-spezifische Expression der AT-mRNAs in Mensch und Ratte. ....	37
Abbildung 3.4: Lage von RAT im Rattengenom.....	38
Abbildung 3.5: Lage von MAT im Mausgenom. ....	39
Abbildung 3.6: Lage von HAT im menschlichen Genom. ....	40
Abbildung 3.7: Gegenüberstellung der AS-Sequenzen der AT-Isoformen. ....	40
Abbildung 3.8: Der alternative Transkriptionsstartpunkt bei Mensch und Ratte. ....	43
Abbildung 3.9: Hydropathy blots der AS-Sequenzen von RAT1 (oben) und RAT2 (unten). ....	45
Abbildung 3.10: Struktureller Aufbau der AT-Isoformen. ....	46
Abbildung 3.11: 3D-Modelle der langen und kurzen Isoform im Vergleich.....	48
Abbildung 3.12: Gesamtüberblick: Relative Expression AT-mRNAs in den getesteten Geweben. ....	49
Abbildung 3.13: Expression der MAT- und RAT- Isoformen in verschiedenen Geweben von Maus und Ratte. ....	51
Abbildung 3.14: Expression der HAT-mRNA in verschiedenen humanen Geweben. ....	52
Abbildung 3.15: Immunhistochemische Lokalisation von MAT in verschiedenen Mausgeweben.....	54
Abbildung 3.16: Ergebnisse einer Q-PCR-Analyse der HAT-mRNA-Expression in humanen Nebennierengeweben. ....	56
Abbildung 3.17: RT-PCR-Analyse der HAT-mRNA-Expression in verschiedenen Nebennierengeweben. .....	57

Abbildung 4.1: Modell der Interaktion von POMC und NN-Wachstum.....	69
Abbildung 6.1: Lage der Primer.....	73
Abbildung 6.2: Der Bereich des HAT-Gens in der menschlichen DNA.....	75
Abbildung 6.3: Der Bereich des RAT-Gens in der DNA der Ratte.....	76
Abbildung 6.4: Der Bereich des MAT-Gens in der DNA der Maus. ....	77

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Reaktionsschritte einer PCR bzw. RT-PCR. ....	20
Tabelle 2.2: Ansatz zur ethanolischen Fällung.....	33
Tabelle 3.1: Primer der 5'-RACE-Analyse von humaner Trachea.....	35
Tabelle 3.2: Charakteristika der einzelnen Isoformen. ....	40
Tabelle 3.3: Prozentuale Ähnlichkeit der AT-Isoformen .....	42
Tabelle 6.1: Patientendaten. ....	72
Tabelle 6.2: Datenbanknummern der AT-Isoformen in NCBI-Entrez.....	73
Tabelle 6.3: Primerübersicht. ....	74

## Danksagung

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Bruno Allolio, dass er mir die Gelegenheit gab, in seinem Team mitzuarbeiten und diese Promotionsarbeit im Endokrinologischen Labor zu erstellen. Seine Begeisterung für die Innere Medizin und die Endokrinologie, seine große Erfahrung, bisweilen aber auch Intuition werden mir stets vorbildhaft in Erinnerung bleiben.

Ganz besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Fassnacht. Mit seiner schier unerschöpflichen Energie und Motivation, seinem Einsatz und vielen konstruktiven Ideen gab er immer wieder wichtige Impulse zum Fortgang der Arbeit. Er war von Anfang an ein verlässlicher und vorbildlicher Betreuer. Vielen Dank für alles!

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. (Ph.D.) Immo Hansen. Er stieß zum rechten Zeitpunkt zu unserer Arbeitsgruppe und hatte maßgeblichen Anteil am Fortgang des Projekts und dieser Promotion. Er gab sein Wissen und seine Erfahrung gerne weiter, und ich konnte viel von ihm lernen. Seine freundliche, aufgeschlossene Art trug sehr zum guten Arbeitsklima bei.

Herzlichen Dank an Frau Dr. rer. nat. Ulla Kehl, die mir während der gesamten Zeit im Endokrinologischen Labor so oft mit ihrem Rat und ihrer Erfahrung, Motivation und Gesprächen zur Seite stand. Ganz herzlichen Dank auch für die mittlerweile langjährige Freundschaft!

Vielen Dank an Frau Dr. med. Stefanie Hahner für die gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe.

Vielen Dank Frau Martina Zink, Frau Susanne Meyer und den übrigen MTAs des Endokrinologischen Labors für die Unterstützung bei der Laborarbeit und das freundliche Arbeitsklima!

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem leider viel zu früh verstorbenen Vater, meiner Mutter und meinem Bruder Andreas, auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

# Lebenslauf

## ***Persönliche Daten:***

Name: Markus Schammann  
Geburtsdatum/ -ort: 7. November 1975 in Schwäbisch Hall  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Kehrhüttenstr. 79  
74078 Heilbronn

## ***Schulbildung:***

1982- 1986 Grundschole in Michelfeld  
1986- 1995 Gymnasium bei St. Michael, Schwäbisch Hall  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## ***Wehrdienst:***

1995- 1996 Wehrdienst in der Sanitätsschule der Luftwaffe in Giebelstadt sowie in der Sanitätsstaffel des Luftwaffenversorgungsregiments 4 in Mosbach/ Baden

## ***Hochschulstudium:***

November 1996- Mai 2003 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
August 1998 Ärztliche Vorprüfung  
August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
März 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
April 2002- März 2003 Praktisches Jahr:  
1. Terial: Innere Medizin an der Medizinischen Uniklinik Würzburg  
2. Terial: Chirurgie an der Chirurgischen Uniklinik Würzburg  
3. Terial: Radiologie am Radiologischen Institut der Medizinischen Uniklinik Würzburg  
Mai 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### ***Berufliche Laufbahn:***

August 2003- Januar 2005	AiP/ Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II des Städtischen Klinikums Pforzheim
Oktober 2004	Approbation
März 2005- Dezember 2005	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II der Klinik am Eichert in Göppingen
Seit Januar 2006	Assistenzarzt am Klinikum „Am Gesundbrunnen“ Heilbronn in der Klinik für Radiologie, Minimal-invasive Therapien und Nuklearmedizin

### ***Publikationen:***

1. Hansen, I. A., Fassnacht, M., Hahner, S., Hammer, F., Schammann, M., Meyer, S. R., Bicknell, A. B., Allolio, B., *The adrenal secretory serine protease AsP is a short secretory isoform of the transmembrane airway trypsin-like protease*. Endocrinology, 2004. 145(4): p. 1898-905.
2. Hahner, S., Fassnacht, M., Hammer, F., Schammann, M., Weismann, D., Hansen, I. A., Allolio, B., *Evidence against a role of human airway trypsin-like protease--the human analogue of the growth-promoting rat adrenal secretory protease--in adrenal tumourigenesis*. Eur J Endocrinol, 2005. 152(1): p. 143-53.

Heilbronn, den 20. Juni 2010