

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

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Peter Neth

aus Marktoberdorf

2001

Erklärung:

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

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 31. Juli 2001

Peter Neth

Dissertation eingereicht am 08. August 2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolf Gutensohn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Schartau

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. Edwin Fink

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2002

Für Nicole und Sophia

Prolog

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

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

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

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

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**A**

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

B

BK	Bradykinin
bp	Basenpaar(e)

C

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

D

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

E

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

F

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

G

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

H

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

I

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

K

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

L

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

M

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

N

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

O

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

P

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

R

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

S

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

T

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

U

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

V

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

W

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

Z

z.A.	zur Analyse
ZKÜ	Zellkulturüberstand

A ZUSAMMENFASSUNG

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B EINLEITUNG

B.1 Plasma Kallikrein (Fletcher-Faktor)

B.1.1 Gen- und Molekülstruktur

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

B.1.2 Vorkommen

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

B.1.3 Syntheseort

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

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

B.1.4 Aktivierung

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

B.2 Physiologische Funktionen

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

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

B.2.1 Kontaktaktivierung

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

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

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

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

B.2.2 Fibrinolyse-System

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

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

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

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

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

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

B.2.3 Kallikrein-Kinin-System

Kininliberierung

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

Kinine und Kininrezeptoren

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

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

Kinin-bedingte Effekte

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

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

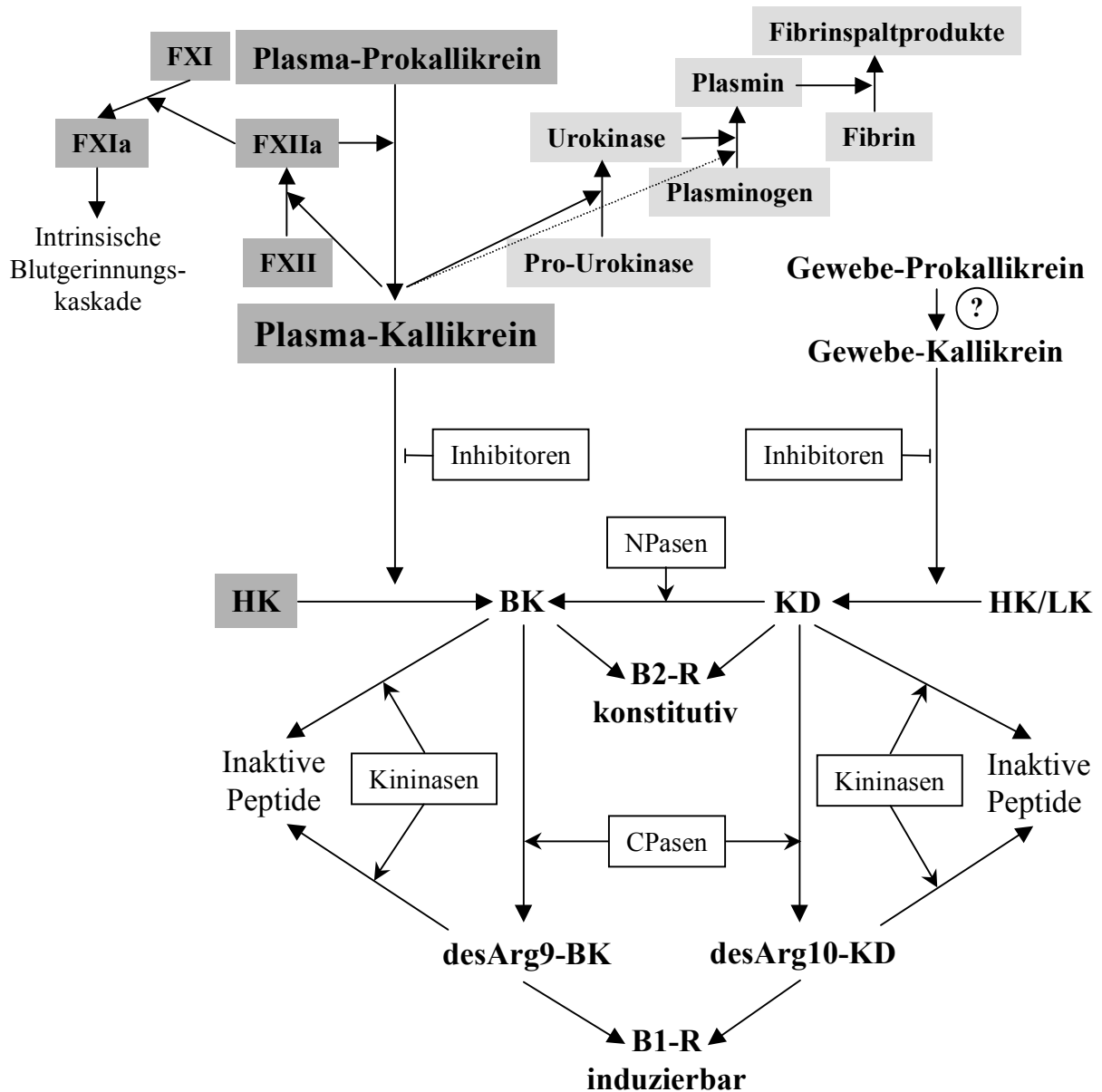


Abb. B 1 Stellung von Plasma-Kallikrein im Kontakt-System (grau), im Fibrinolyse-System (hellgrau) und im Kallikrein-Kinin-System. FXII(a), FXI(a): Zymogenform bzw. aktivierte Form der Blutgerinnungsfaktoren XII, XI; HK und LK, hochmolekulares und niedermolekulares Kininogen; BK, Bradykinin; KD, Kallidin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

Inaktivierung der Kinine

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

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

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

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

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

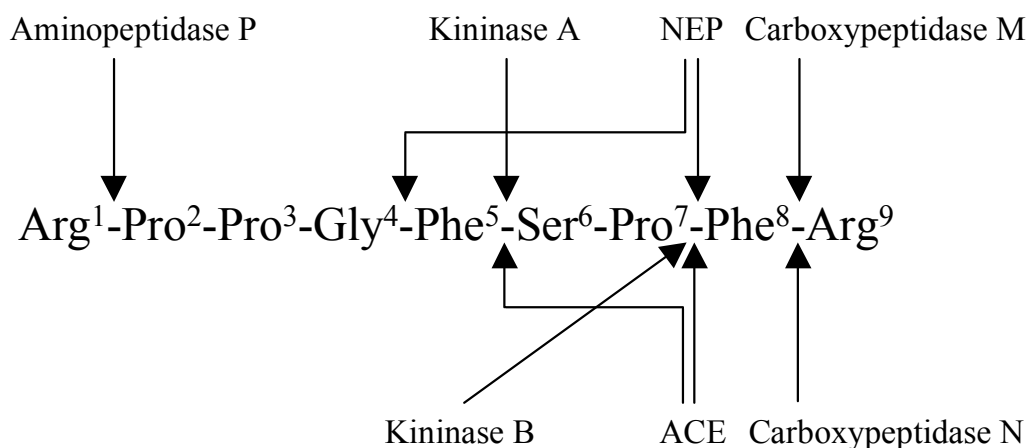


Abb. B 2 Abbau von Bradykinin durch Kininasen.

B.3 Pathophysiologische Bedeutung des Plasma Kallikreins

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

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

B.4 Aufgabenstellung

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

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

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

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

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

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