

# Translationale Untersuchungen der Proteinase 3 – induzierten Entdifferenzierung von Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Von  
Bernd Föhr  
geb. am 08.07.1987  
in Speyer

Mainz, den 10.08.2016

Aus der  
Universitätsmedizin Mainz  
I. Medizinische Klinik und Poliklinik  
AG Schwarting

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Unterschrift \_\_\_\_\_

## **Eigene Publikationen:**

Teile dieser Arbeit wurden:

zur Veröffentlichung eingereicht:

**Genetics and pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis (GPA) and its main autoantigen proteinase 3,**

Relle M., Foehr B., Fasola F., Schwarting A.; Review

**Proteinase-3 Protein polymorphisms are not associated with Granulomatosis with polyangiitis**

Relle M., Foehr B., Scorletti E., Cavagna L., Weinmann-Menke J., Schwarting A.

**Expression of a cytosolic proteinase 3 isoform involved in ANCA-associated vasculitis leads to growth arrest and anti-apoptosis in primary human cells**

Relle M., Foehr B., Weinmann-Menke J., Schwarting A.

## **weitere Publikationen:**

**Epigenetic aspects of systemic lupus erythematosus**

M. Relle, B. Foehr, A. Schwarting  
Review, Rheumatology and Therapy, 2015

zur Veröffentlichung eingereicht:

**Intra-renal BAFF heralds the autoimmune cascade in lupus nephritis / autokriner loop alternativ**

Schwarting A., Relle M., Foehr B., Triantafyllias K., J. Weinmann-Menke.

## **Zusammenfassung:**

Proteinase 3 (PR3) ist eine Serinprotease, die in azurophilen Granula in polymorphonuklearen Leukozyten, wie Neutrophilen, Mastzellen und Monozyten eingelagert ist. Sie wirkt antimikrobiell und spielt daher eine wichtige Rolle in der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort bei Wirbeltieren. Die PR3 ist das Hauptautoantigen der Autoimmunkrankheit Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), welche auch als Wegener Granulomatose (WG) bekannt ist und zu den antineutrophile cytoplasmatische Antikörpern (ANCA) assoziierten Vaskulitiden (AAV), eine Art von entzündlicher Gefäßerkrankung, gehört.

Dieses Projekt setzte sich zum Ziel, die pathophysiologische Rolle der humanen PR3 Isoformen im Rahmen der myeloiden Leukämie und nicht-myeloiden Krebserkrankungen zu untersuchen und einen Ansatz zur Entwicklung neuer Krebstherapeutika zu finden. Des Weiteren sollte dieses Projekt bei der Erforschung der komplexen Autoimmunkrankheit GPA helfen.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine alternative PR3-mRNA, PRTN3-002, die für eine cytosolische Variante der PR3 kodiert, existiert. Im Rahmen meiner Dissertation konnten wir eine weitere RNA-Variante PRTN3-003, charakterisieren, die identisch zu PRTN3-002 ist, außer, dass das Intron 2 des PRTN3 Genes nicht herausgespliced wird. Beide mRNAs werden pathophysiologisch in myeloiden Leukämiezellen und nicht myeloiden Tumorzellen exprimiert. Die Expression der normalen PR3 mRNA, PRTN3-001, kann im Knochenmark, im fötalem Gewebe und in CD34+ Zellen sowie in myeloiden Leukämiezellen detektiert werden und spielt bei der Differenzierung von Zellen, besonders bei der Hämatopoese, eine Rolle. In Primärzellen, die mit diesen mRNAs transfiziert wurden, führt PRTN3-001 zu erhöhter Proliferation sowie erhöhter Apoptose und PRTN3-002 führt zu Zellzyklusarrest und geringerer Apoptose.

Bei der Untersuchung des PRTN3 Gens bei GPA Patienten stellten wir fest, dass kein Proteinpolyorphismus, bzw. PR3-Protein epitope mit der Krankheit assoziiert sind. Allerdings fanden wir Einzelbasenaustausche (SNPs) im nicht kodierenden Bereich, die intragenetische Haplotypen, bestehend aus rs62132295, rs62132296 und rs2301879 sowie rs2074639, bildeten und mit der Krankheit assoziiert sind.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG .....</b>                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1. PROTEINASE 3 .....                                                    | 1         |
| 1.2. GRANULOMATÖSE POLYANGIITIS .....                                      | 4         |
| 1.3. GENETISCHE GRUNDLAGEN DER PR3 UND DER GPA .....                       | 6         |
| 1.4. ZIEL DER ARBEIT .....                                                 | 10        |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                      | <b>11</b> |
| 2.1. PLASTIKWAREN .....                                                    | 11        |
| 2.2. CHEMIKALIEN .....                                                     | 11        |
| 2.3. PUFFER UND KULTURMEDIENTEN .....                                      | 11        |
| 2.3.1. PUFFER .....                                                        | 11        |
| 2.3.2. KULTURMEDIENTEN .....                                               | 12        |
| 2.4. MOLEKULARGEWICHTSMARKER FÜR DIE AGAROSE GELELEKTROPHORESE .....       | 13        |
| 2.5. PLASMIDE .....                                                        | 15        |
| 2.6. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN .....                                    | 20        |
| 2.6.1. PRÄPARATION VON DNA .....                                           | 20        |
| 2.6.2. PRÄPARATION VON RNA .....                                           | 20        |
| 2.6.3. PHOTOMETRISCHE MESSUNG DER DNA BZW. RNA KONZENTRATION .....         | 21        |
| 2.6.4. DNASE VERDAU .....                                                  | 21        |
| 2.6.5. REVERSE TRANSKRIPTION .....                                         | 21        |
| 2.6.6. KONVENTIONELLE PCR .....                                            | 22        |
| 2.6.7. DIFFERENZIERENDE HUPR3- RT-PCR .....                                | 28        |
| 2.6.8. QUANTITATIVE REAL TIME PCR .....                                    | 30        |
| 2.6.9. AGAROSE GELELEKTROPHORESE .....                                     | 32        |
| 2.6.10. VERDAU VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN .....                 | 33        |
| 2.6.11. REINIGUNG VON DNA FRAGMENTEN AUS AGAROSE GELEN .....               | 33        |
| 2.6.12. LIGATION VON DNA FRAGMENTEN .....                                  | 33        |
| 2.6.13. OLIGO ANNEALING .....                                              | 34        |
| 2.6.14. TRANSFORMATION .....                                               | 34        |
| 2.6.15. GLYCERINKULTUREN .....                                             | 35        |
| 2.6.16. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS E.COLI .....                        | 35        |
| 2.6.17. SEQUENZIERUNG .....                                                | 35        |
| 2.6.18. GATEWAY KOLONIERUNG .....                                          | 36        |
| 2.7. METHODEN DER ZELLKULTUR .....                                         | 38        |
| 2.7.1. BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL .....                                 | 39        |
| 2.7.2. PASSAGIEREN VON ZELLEN .....                                        | 39        |
| 2.7.3. EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN .....                            | 39        |
| 2.7.4. ISOLIERUNG VON BLUTZELLFRAKTIONEN .....                             | 40        |
| 2.7.5. ISOLIERUNG HUMANER NIEREN TUBULUS EPITHELZELLEN .....               | 42        |
| 2.7.6. TRANSIENTE TRANSFEKTION VON ZELLEN .....                            | 43        |
| 2.7.7. STABILE TRANSDUKTION VON ZELLEN MIT EINEM LENTIVIRALEN VEKTOR ..... | 43        |
| 2.7.8. PROLIFERATIONSTEST .....                                            | 44        |
| 2.7.9. ZYTOTOXIZITÄTSTEST .....                                            | 44        |
| 2.7.10. LUCIFERASE REPORTERGENASSAY .....                                  | 44        |
| 2.7.11. EX VIVO DIFFERENZIERUNG VON MYELOIDEN ZELLINIEN .....              | 45        |
| 2.7.12. DIFF QUICK FÄRBUNG .....                                           | 46        |

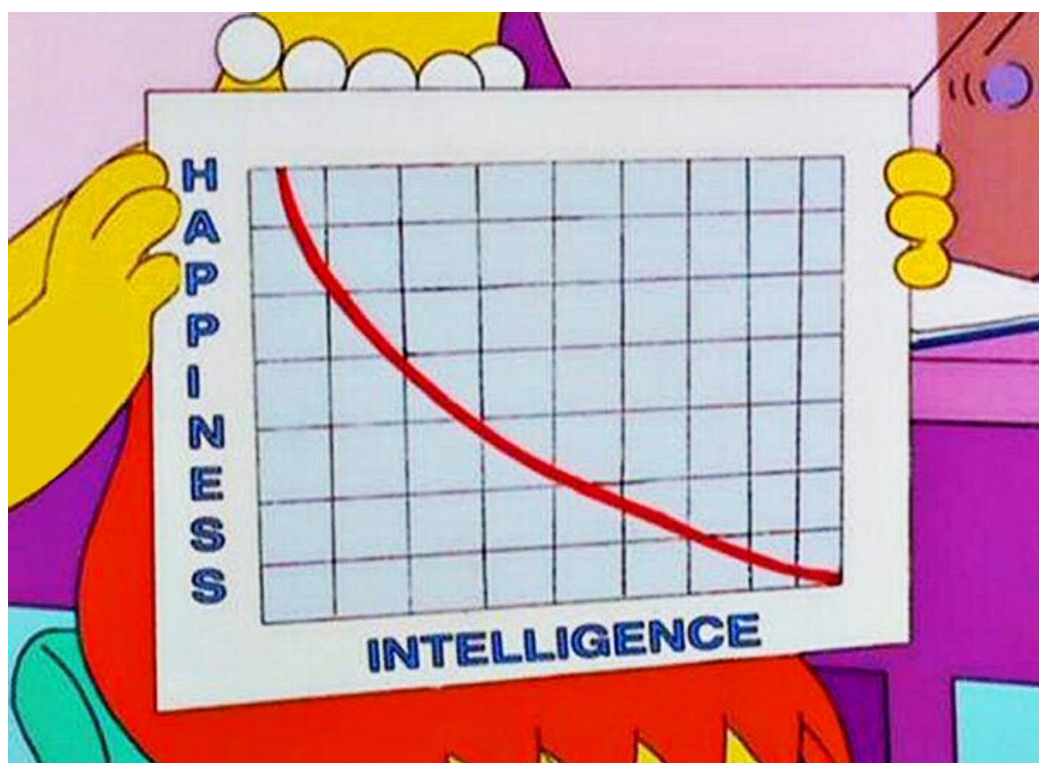
|        |                                                                                                                            |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.8.   | STUDIENKOHORTE .....                                                                                                       | 46  |
| 2.9.   | SOFTWARE .....                                                                                                             | 46  |
| 3.     | ERGEBNISSE.....                                                                                                            | 48  |
| 3.1.   | EXPRESSION DER PROTEINASE 3 UND DER ALTERNATIVEN PROTEINASE 3.....                                                         | 48  |
| 3.1.1. | <i>QUALITATIVE EXPRESSION IN HUMANEN TUMOR- UND LEUKÄMIEZELLINIEN</i> ...                                                  | 48  |
| 3.1.2. | <i>QUANTITATIVE EXPRESSION IN CD34-POSITIVEN ZELLEN</i> .....                                                              | 51  |
| 3.1.3. | <i>QUALITATIVE EXPRESSION BEI DER DIFFERENZIERUNG</i> .....                                                                | 54  |
| 3.2.   | WIRKUNG DER NORMALEN UND DER ALTERNATIVEN PR3 .....                                                                        | 60  |
| 3.3.   | CHARAKTERISIERUNG DES ALTERNATIVEN PROMOTORS .....                                                                         | 66  |
| 3.4.   | TRANSFEKTION DES C-TERMINALEN PR3-PROTEINS .....                                                                           | 70  |
| 3.5.   | UNTERSUCHUNGEN AM PRTN3- GEN .....                                                                                         | 72  |
| 3.5.1. | <i>COMPARATIVE GENOMICS</i> .....                                                                                          | 72  |
| 3.5.2. | <i>INTRA-GENETISCHE HAPLOTYPEN BEI GPA PATIENTEN</i> .....                                                                 | 75  |
| 4.     | DISKUSSION.....                                                                                                            | 85  |
| 4.1.   | BEDEUTUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN PR3-TRANSKRIPTE .....                                                                      | 85  |
| 4.2.   | DIE ROLLE VON PR3 - PROTEINEPITOPEN, SNPs UND INTRAGENETISCHEN<br>HAPLOTYPEN IM PRTN3 GEN BEI DER ENTSTEHUNG VON GPA ..... | 89  |
| 5.     | LITERATURVERZEICHNIS .....                                                                                                 | 92  |
| 6.     | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....                                                                                                | 98  |
| 7.     | DANKSAGUNG .....                                                                                                           | 102 |
| 8.     | LEBENS LAUF .....                                                                                                          | 103 |
| 9.     | ANHANG .....                                                                                                               | 104 |
| 9.1.   | SEQUENZEN.....                                                                                                             | 104 |
| 9.1.1. | <i>PRIMER</i> .....                                                                                                        | 104 |
| 9.1.2. | <i>GENSEQUENZ</i> .....                                                                                                    | 105 |
| 9.1.3. | <i>ENZYM PRIMÄRSTRUKTUR</i> .....                                                                                          | 109 |
| 9.2.   | STAMMBÄUME .....                                                                                                           | 110 |
| 9.2.1. | <i>KLADOGRAM DER SÄUGETIERE BASIEREND AUF GENETISCHEN BEFUNDEN</i> ..                                                      | 110 |
| 9.2.2. | <i>Verwandtschaft der APEA Gene innerhalb der Vertebraten</i> .....                                                        | 111 |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Prozessierung der Proteinase 3 .....                                                                                        | 1  |
| Abb. 2: Das Protein Proteinase 3 .....                                                                                              | 3  |
| Abb. 3: Klassifikation der Vaskulitiden.....                                                                                        | 4  |
| Abb. 4: Lokalisation und Struktur des PRTN3 Gens im humanen Genom .....                                                             | 7  |
| Abb. 5: Referenzbanden der Molekulargewichtsmarker für doppelsträngige DNA .....                                                    | 14 |
| Abb. 6: Der Vektor pEF1 $\alpha$ -AcGFP1-C1 .....                                                                                   | 15 |
| Abb. 7: Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit (Clontech) .....                                                                     | 17 |
| Abb. 8: Der Vektor pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO .....                                                                                | 18 |
| Abb. 9: pLenti/V5-DEST Gateway Vector Kit (Invitrogen) .....                                                                        | 19 |
| Abb. 10: SNP Erkennung am Beispiel von rs351111 .....                                                                               | 36 |
| Abb. 11: Schematische Darstellung der BP Reaktion.....                                                                              | 37 |
| Abb. 12: Schematische Darstellung der LR Reaktion.....                                                                              | 38 |
| Abb. 13: Dichtegradient nach der Zentrifugation .....                                                                               | 41 |
| Abb. 14: Expression der normalen PR3 Transkriptes (PRTN3-001) und der alternativen PR3 Transkripte (PRTN3-002, bzw. PRTN3-003)..... | 50 |
| Abb. 15: Fluoreszenzhistorie bei der Real Time PCR von CD34 <sup>+</sup> Zellen.....                                                | 51 |
| Abb. 16: Relative Expression der PR3 in humanen Zellen im Vergleich zur Expression in der Milz.....                                 | 53 |
| Abb. 17: Schematische Darstellung der ex vivo Differenzierung.....                                                                  | 55 |
| Abb. 18: Morphologische Veränderung bei der ex vivo Differenzierung von NB4-Zellen .....                                            | 56 |
| Abb. 19: Proliferation der Zellen während der Differenzierung.....                                                                  | 57 |
| Abb. 20: Expression der PR3 bei der induzierten Differenzierung von NB4 und U937. ....                                              | 59 |
| Abb. 21: Transduktion verschiedener PR3 Konstrukte .....                                                                            | 61 |
| Abb. 22: Proliferations- (blau) und Cytotoxizitätsassay (rot) von h-TEZ transduziert mit verschiedenen h-PR3-mRNA .....             | 62 |
| Abb. 23: Relative Expressionsstärke (Fold Change) von Genen bei der Real-Time PCR in h-TEZ, die PR3-001 überexprimieren .....       | 64 |
| Abb. 24: Relative Expressionsstärke (Fold Change) von Genen bei der Real-Time PCR in h-TEZ, die PR3-002 überexprimieren .....       | 65 |
| Abb. 25: Aktivität des alternativen Promotors im Exon1 der PRTN3.....                                                               | 67 |
| Abb. 26: Luciferase Reporter Assay des alternativen PR3 Promoters mit weiter umspannenden Bereichen.....                            | 68 |
| Abb. 27: RNA Faltungen von PRTN3-Introns.....                                                                                       | 69 |
| Abb. 28: Positiv- und Negativkontrolle der Transfektion.....                                                                        | 70 |
| Abb. 29: Expression des C-Terminus der PR3 .....                                                                                    | 71 |
| Abb. 30: Genomische Umgebung des APEA Gene Clusters verschiedener Tierarten..                                                       | 73 |
| Abb 31: Amplifizierung des PRTN3 Gens. ....                                                                                         | 76 |
| Abbildung 32: Totale Allelverteilung sowie Verteilung der Homo- bzw. Heterozygotität bei rs 351111.....                             | 79 |
| Abbildung 33: Kopplungen der SNP im PRTN3 Gen.....                                                                                  | 81 |
| Abbildung 34: Erklärung der Haplotypen .....                                                                                        | 83 |
| Abbildung 35: Allelverschiebung .....                                                                                               | 84 |

## **Tabellenverzeichnis**

|                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabelle 1: Pairwise Alignment Scores des humanen PRTN3 Gens mit den Genen anderer Spezies .....</b>                           | <b>74</b> |
| <b>Tabelle 2: Alter und Geschlechtsverteilung der untersuchten GPA Patienten und Kontrollen .....</b>                            | <b>76</b> |
| <b>Tabelle 3: Gefundene SNPs im Gen PRTN3 .....</b>                                                                              | <b>77</b> |
| <b>Tabelle 4: Vorkommen seltener Mutationen in der eigenen Kohorte.....</b>                                                      | <b>78</b> |
| <b>Tabelle 5: Genotyp Verteilung von rs351111 in einer unabhängigen Kohorte des Klinkums der Ruhr Universität Bochum. ....</b>   | <b>80</b> |
| <b>Tabelle 6: Genotyp Verteilung von rs62132295 in einer unabhängigen Kohorte des Klinkums der Ruhr Universität Bochum. ....</b> | <b>80</b> |
| <b>Tabelle 7: Allelfrequenzen der SNP im nicht kodierenden Bereich des PRTN3 Gens ...</b>                                        | <b>82</b> |
| <b>Tabelle 8: Haplotypverteilung der Kontrollen und Patienten .....</b>                                                          | <b>84</b> |

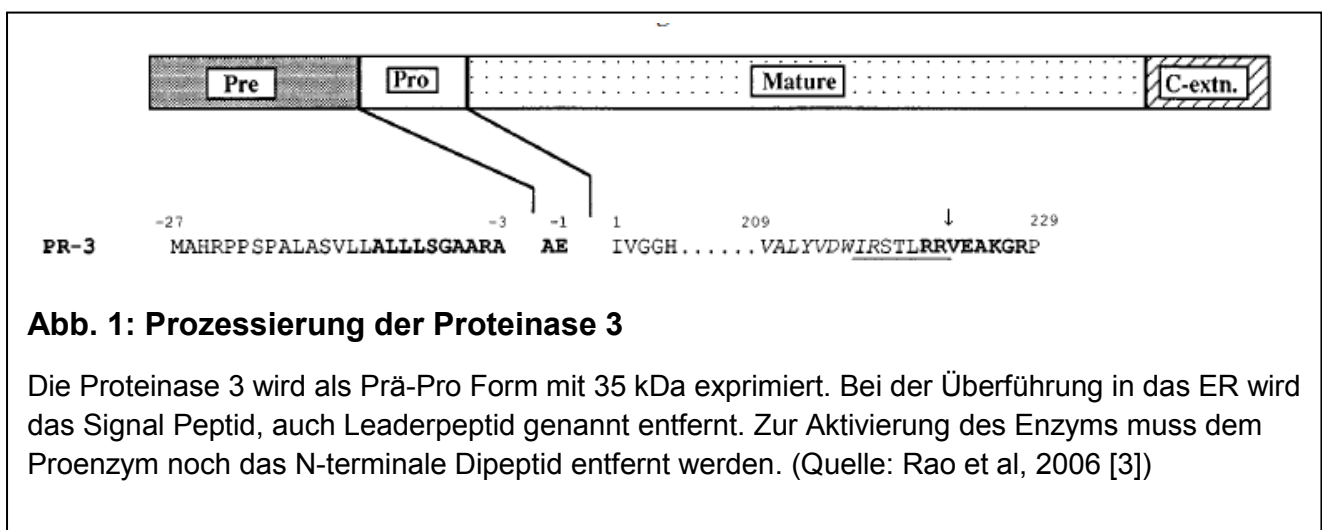


# 1. Einleitung

## 1.1. PROTEINASE 3

Proteinase 3 (PR3) ist eine Serinprotease, die in azurophilen Granula in polymorphonuklearen Leukozyten, wie Neutrophilen, Mastzellen und Monozyten eingelagert ist [1]. Neutrophile machen 50 – 70% der Leukozyten des menschlichen Blutes aus und gehören zu den ersten Zellen bei der Immunabwehr. Bei einer Entzündung wird die Proteinase 3, die auch als Myeloblastin bekannt ist [2], zusammen mit anderen antimikrobiell wirkenden Proteinen aus den Vesikeln freigesetzt und spielt daher eine wichtige Rolle in der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort bei Wirbeltieren.

Die PR3 wird anfänglich als prä- pro Form exprimiert (Abb.1), welche 35 kDa schwer ist [3]. Das Signalpeptid, auch Leader Peptid genannt, wird nach der Überführung in das endoplasmatische Retikulum (ER) abgeschnitten [4]. Dort wird sie an den Stellen Asn 102 und Asn-147 glykosyliert [5]. Zur vollen Aktivierung muss dem Proenzym das N-terminale Dipeptid entfernt werden. In einer verwandten Serinprotease namens Granzym A wird dieser Schritt von der lysomalen Cysteinprotease Dipeptidyl Peptidase I (DPPI) katalysiert [6], jedoch scheint dies bei der PR3 von einem anderen Enzym in einer post-golgi Organelle katalysiert zu werden [3]. Dort wird ebenfalls am C-terminalen Ende eine sieben Aminosäure-lange Sequenz abgespalten. Die Funktion dieser Prozession ist ebenfalls unbekannt. Das native Protein hat ein Gewicht von 29 kDa bei 227 Aminosäuren (aa) (siehe 9.1.3).

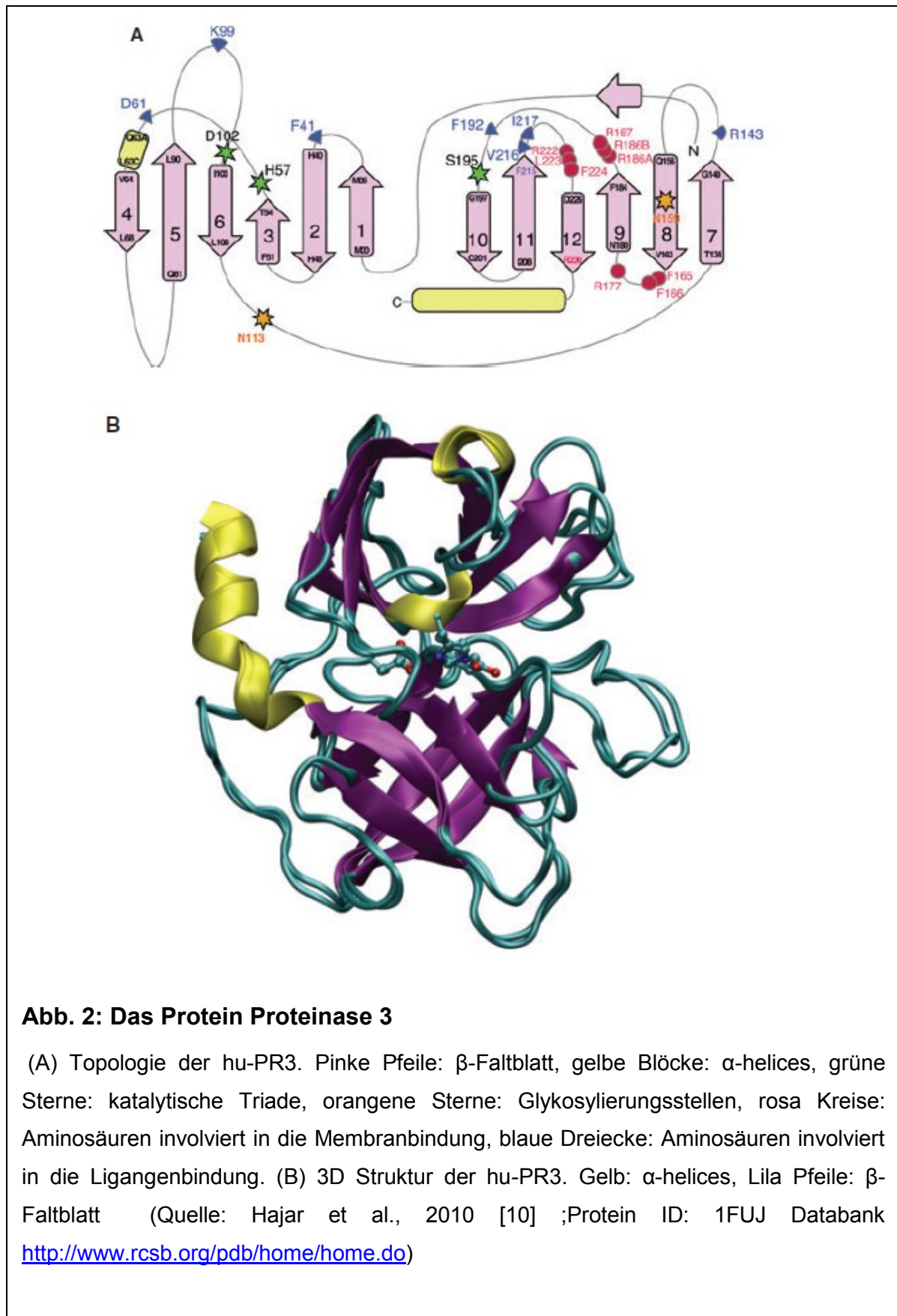


Die PR3 hydrolysiert unter anderem Elastin, Laminin, Fibronectin und Collagenase IV an der Erkennungssequenz -Ala-+-Xaa- oder -Val-+-Xaa- [7-9]. Das aktive Zentrum wird hierbei, wie bei allen Serinproteasen durch 3 Aminosäuren, eine davon Serin, gebildet und katalytische Triade genannt [10]. Bei der Proteinase 3 bilden His 96, Asp143 und Ser176 (Nummerierungen ändern sich, falls sie auf die prä-pro-Form bezogen werden), die katalytische Triade (siehe Abb.2).

Neben der antimikrobiellen Wirkung ist die PR3 noch an dem Wachstum und der Reifung myeloider Stammzellen beteiligt. Darüber hinaus spielt sie eine Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von Leukämiezellen [11]. In Primärzellen, wie humanen Tubulusepithelzellen (h-TEZ), wurde sie als Wachstumsfaktor identifiziert [12].

Zwei weitere wichtige Enzyme in den Granula der Neutrophilen sind Cathepsin G (CG) und die neutrophile Elastase (NE), die mit der PR3 als neutrophile Serinproteasen (NSP) bekannt sind. Sie sind Teil der S1 Peptidasen Superfamilie (Chymotrypsin-like Clan) und eng miteinander verwandt.

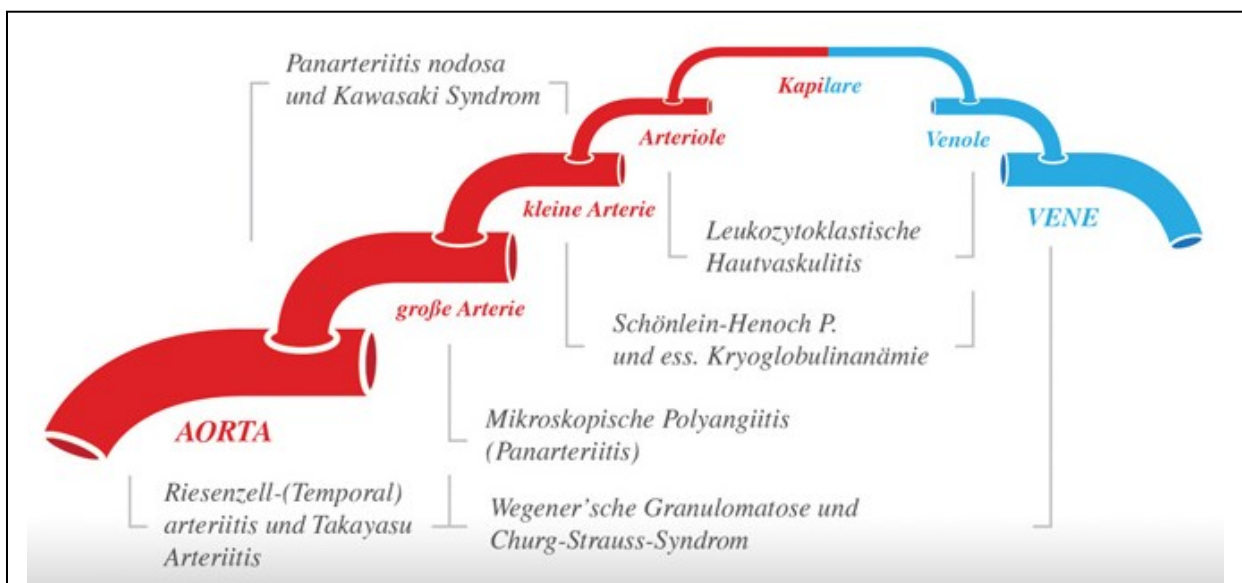
Peptidasen spielen eine wichtige Rolle bei der Metastasierung maligner Tumoren. Hier ist es notwendig, dass Tumorzellen die Basalmembran, bestehend u.a. aus Kollagen und Laminin, durchwandern, für deren Überwindung sie Peptidasen benötigen.



## 1.2.GRANULOMATÖSE POLYANGIITIS

Die Granulomatöse Polyangiitis (GPA) gehört zu den entzündlichen Gefäßerkrankungen (Vaskulitiden, siehe Abb.3). Sie ist gekennzeichnet durch granulomatöse Veränderungen (Granulome), vorwiegend in den oberen und unteren Luftwegen und einer systemischen, mangelhaften Blutversorgung aller Organe und Gewebe. Sie betrifft besonders Nieren, Lungen und Nasennebenhöhlen [13].

Die GPA hat eine Prävalenz von ca. 3/100 000 und eine Inzidenz von ungefähr 1/100000 pro Jahr. Es gibt keine geschlechtsspezifische Ausprägung und prinzipiell kann jede Altersgruppe davon betroffen sein. Der Erkrankungsgipfel liegt jedoch zwischen 40 und 65 Jahren und selten sind Kinder betroffen. Als Risikofaktoren gelten Medikamente [14], Infektionen[15], Umwelteinflüsse [16] und eine genetische Prädisposition (siehe 1.3).



**Abb. 3: Klassifikation der Vaskulitiden**

Verschiedene Formen einer Vaskulitis geordnet nach der Größe der betroffenen Gefäßen.  
(Quelle: Vaskulitiszentrum Dresden-Friedrichstadt )

Gemeinsam mit der mikroskopischen Polyangiitis (MPA) und der Eosinophilische Granulomatosis mit Polyangiitis (EGPA), auch bekannt als Churg-Strauss Syndrom, gehört die Autoimmunkrankheit GPA, welche auch als Wegener Granulomatose (WG) bekannt ist, zu den ANCA assoziierten Vaskulitiden (AAV) [17].

Diese Kleingefäßvaskulitiden zeichnen sich durch die Ausbildung sogenannter antineutrophiler cytoplasmatischer Antikörper (ANCA) aus [18], die sich durch indirekte Immunofluoreszenz (IF) oder einem enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) nachweisen lassen [19-23]. Während sich bei der MPA perinukleäre ANCA (p-ANCA) bilden, die sich besonders gegen die Myeloperoxidase (MPO), aber auch andere Proteine richten, bilden sich bei der GPA cytoplasmatische ANCAs (c-ANCAs) aus, die sich gegen die Proteinase 3 richten [24-26]. Die PR3 ist also das Hauptautoantigen der GPA [27].

Die Klassifikation der AAVs bleibt jedoch kontrovers, da GPA, MPA und EGPA klinische und histologische Ähnlichkeiten aufweisen. Es gibt momentan keine validen diagnostischen Kriterien für AAV, aber es existieren Systeme zur Einteilung, die eine bedingte Einteilung zulassen [13, 28, 29]. Patienten, die mit ANCA-negativer AAV diagnostiziert werden, könnten trotzdem ANCAs besitzen, die mit den aktuellen Methoden nicht detektiert werden können oder ANCAs von bisher nicht gekannter Spezifität besitzen, auf welche nicht geprüft wird. In 70 – 80 % der GPA Patienten werden PR3-ANCAs detektiert und in 10% MPO-ANCAs [30]. Diese geteilte ANCA-Involvierung machte es schwierig die Krankheiten separat zu untersuchen.

Die Epitope für die PR3-ANCA Erkennung wurden nachgewiesen [31, 32] und der Glycolisierungsstatus kann sich auf die ANCA Erkennung auswirken [5], aber Modifizierungen des C-terminalen Endes haben keinen Effekt [33]. Die ANCA-Titer wurden als spezifischer Marker angesehen, jedoch zeigt eine Metastudie, dass sie wohl nicht mit der Krankheitsaktivität korrelieren [34]. Doch konnte gezeigt werden, dass die Krankheitsaktivität einen Zyklus von 7,6 Jahren durchläuft [35], welches wiederum auf Umweltfaktoren hindeutet. Diese Periodizität konnte bei MPA nicht nachgewiesen werden und beides gilt für das Auftreten der jeweiligen ANCAs ebenfalls.

Weiterhin wurde festgestellt, dass AAV Patienten ein erhöhtes Level von zirkulierender PR3 im Plasma aufweisen [36]. Bei Leukozyten wurde ebenfalls festgestellt, dass ihre Transkription von PR3 hochreguliert ist [37, 38]. Regulatorische B-Zellen sind dagegen numerisch, aber nicht funktionell defizient [39]. Ebenfalls wurde eine membranständige PR3 auf der Plasmamembran von Neutrophilen gefunden, die bei AAV Patienten ein erhöhtes Level aufweist [40].

PR3-ANCAs binden ebenfalls an Neutrophile [41]. Auch die Balance zwischen der Proteinase 3 und seines natürlichen Inhibitors  $\alpha$ 1-Antitrypsin (A1AT) spielt eine Rolle. PR3-ANCAs inhibieren die PR3/1AT Komplexbildung, welche mit der Krankheitsaktivität korreliert [42]. Abnorme A1AT Allelvarianten treten bei GPA Patienten gehäuft auf [43].

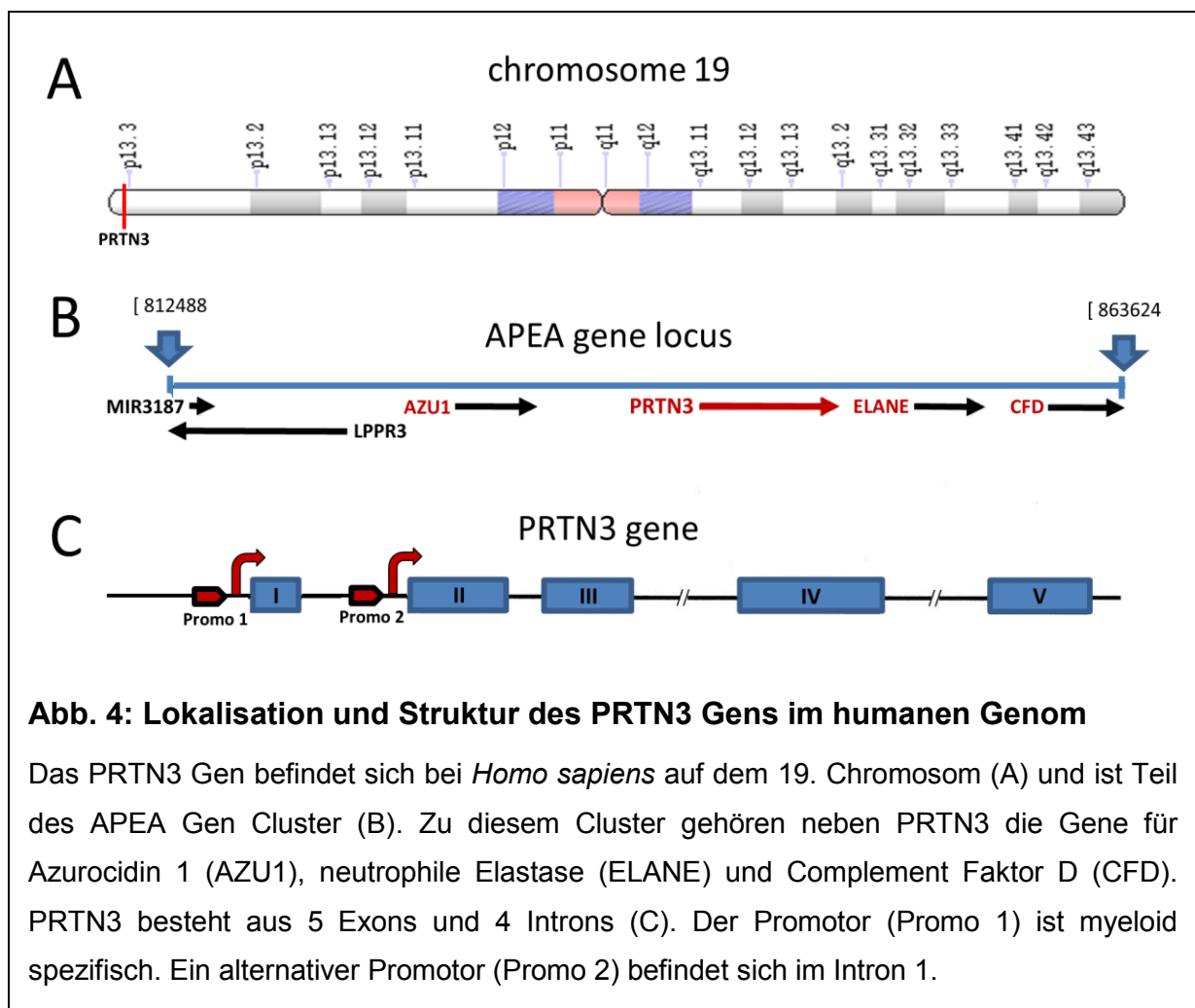
Auch bei anderen Krankheiten, wie einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) [44], Polyarteritis nodosa (PAN), Systemischer lupus erythematosus (SLE) [45], Myelodisplasie [46], Cystische Fibrose, auch Muskovizidose genannt, [47] und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [48] spielen die Proteinase 3 und ANCAs eine Rolle.

### **1.3. GENETISCHE GRUNDLAGEN DER PR3 UND DER GPA**

Das Gen PRTN3 kodiert für die Proteinase 3 und befindet sich bei *Homo sapiens* auf dem kurzen Arm des 19. Chromosoms (19p13.3). Es ist eng verwandt mit dem AZU1 Gen, welches für Azurozidin kodiert, und dem ELANE Gen, welches für die neutrophile Elastase (NE) kodiert, und wohl durch Duplikation aus diesem entstanden ist. Diese 3 Gene befinden sich mit dem Gen für den Complement Factor D (CFD), auch Azurozidin genannt, auf dem Genom direkt nebeneinander und kodieren für unterschiedliche Proteinasen. Man bezeichnet diesen Genabschnitt auch als APEA Gen Cluster (siehe Abb.4).

PRTN3 spannt sich über ungefähr 7000 Bp und ist in 5 Exons, unterbrochen von 4 Introns, aufgeteilt [49] (siehe 9.1.2). Der Promotor (Promo 1, Abb. 4C) ist myeloid spezifisch und wird durch ein PU1 und ein Cytidin-reiches CG-Element reguliert, welche beide wichtig für die Expression sind [50]. Das erste Exon ist das kürzeste von allen. Im ersten Intron befinden sich repetitive (sich wiederholende) DNA Sequenzen, sogenannte short interspersed nucleotide elements (SINE, zu Deutsch kurze verteilte Nukleotidelemente), darunter Tandem-Repeats und Alu-Sequenzen, welche primatenspezifisch sind. Das zweite Intron ist dagegen sehr klein. Exon 2 und 3 liegen somit sehr nah beieinander. Das Polyadenylierungssignal findet sich verdoppelt vor. Der GC-Gehalt nimmt von Exon 1 bis Exon 5 ab.

Ein SNP (single nucleotide polymorphism, zu deutsch: Einzelbasenaustausch) ist eine Variation einer einzelnen DNA-Base in einem Genom. Sie stellen eine Punktmutation dar, die sich mittels Vererbung in einem Genpool angereichert hat. Diese SNP können, müssen aber nicht, Auswirkungen haben auf die Aminosäuresequenz direkt, wenn sie sich in einem Exon befinden, auf die Transkription, wenn sie sich im nicht kodierenden Bereich im Promotor, den Introns oder regulatorischen Sequenzen (Enhancer /Silencer) befinden und die Bindung von beispielsweise Transkriptionsfaktoren beeinflussen sowie auch Auswirkungen auf das Splicing haben, wenn sie sich in den Exon-Intron Grenzen befinden. Im PRTN3 Promotor (Promo1) befindet sich ein bereits untersuchter SNP (rs62132295), der keine Auswirkungen auf die Expression der PR3 hat [51].



**Abb. 4: Lokalisation und Struktur des PRTN3 Gens im humanen Genom**

Das PRTN3 Gen befindet sich bei *Homo sapiens* auf dem 19. Chromosom (A) und ist Teil des APEA Gen Cluster (B). Zu diesem Cluster gehören neben PRTN3 die Gene für Azurocidin 1 (AZU1), neutrophile Elastase (ELANE) und Complement Faktor D (CFD). PRTN3 besteht aus 5 Exons und 4 Introns (C). Der Promotor (Promo 1) ist myeloid spezifisch. Ein alternativer Promotor (Promo 2) befindet sich im Intron 1.

Alternative Promotoren befinden sich in ca. 40 % aller Säugetiergenomen [52] und sind ubiquitärer vorhanden, als früher angenommen [53]. Diese alternativen Promotoren sind oft auch mit Krankheiten, einschließlich Krebs, assoziiert. Im PRTN3-Gen befindet sich ebenfalls ein alternativer Promotor (Promo 2, Abb.4C). Dieser alternative Promotor führt zur Expression einer alternativen mRNA, die für ein 24 kDa großes Protein kodieren würde, der jedoch das Leader-Peptid fehlt.

Ein alternatives Transkript wurde von unserer Arbeitsgruppe zunächst in der Maus gefunden [54]. Dort befindet sich der alternative Promotor jedoch in Exon 2 des Prtn3-Gens, nicht wie im humanen System, in Exon 1. Eine Expression im murinen System konnte im Knochenmark, embryonalen Stammzellen, der rudimentäre männlichen Milchdrüse, Leukämie- und anderen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. In der Milz wurde das Transkript exklusiv von Gr-1<sup>int</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen gebildet, welche man als myeloid derived supressor cells (MDSCs) bezeichnet. Im humanen System wurde das alternative Transkript ebenfalls im Knochenmark und in Krebszelllinien, wie MCF-7, aber nicht in primären Leukämiezellen gefunden [54].

Die Vermutung liegt nahe, dass das alternative Transkript eine spezieübergreifende Funktion hat, jedoch weisen muPR3 und huPR3 deutliche Unterschiede auf. Diese Unterschiede zeigen sich in Substratspezifität und Enzymkinetik zu Peptidsubstraten [55], aber auch im Expressionsprofil [56]. PR3-ANCAs erkennen das murine Homolog nicht [57], da sie an andere Epitope binden [58] und die Oberfläche der muPR3 ist elektronegativer als huPR3 [10].

So gab es erste Schritte ein murines Vaskulitis Modell mit einem humanisierten Immunsystem zu erzeugen [59]. Auch verschiedene Knockout-Mäuse wurden bereits erzeugt, bisher gelang es jedoch nicht eine reine PR3 Knockout-Maus zu erzeugen. Es existiert eine PR3/NE Knockout-Maus [60, 61], die bisher als Modell gilt. Ebenso existiert eine MPO- Knockout-Maus, bei der die Induktion einer Vaskulitis ein Modell der Erkrankung darstellt [62]. Doch bis heute gibt es keine guten Modelle für die granulomatösen Läsionen, die man in GPA Patienten beobachten kann [63].

Die Suche einer genetischen Disposition für GPA beim Menschen beschäftigte viele Wissenschaftler. So könnte die Präsentation von PR3 Epitopen von der MHC Klasse II einen Einfluss zu haben, ähnlich, wie bei anderen Autoimmunkrankheiten, wie Lupus erythematoses [64, 65]. Diese Prädispositionen würden sich im kodierenden

Bereich des PRTN3 Gens sowie in den HLA Genen, die für den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) kodieren, widerspiegeln. Die Balance zwischen der Proteinase 3 und seines natürlichen Inhibitors  $\alpha$ 1-Antitrypsin spielt ebenfalls eine Rolle. Gäbe es zu viel Proteinase 3 im Blut, welche durch regulatorische Unterschiede im Gen für  $\alpha$ 1-Antitrypsin (SERPINA) und im PRTN3 Gen entstehen kann, könnte der Körper mit der Bildung der ANCAs darauf reagieren und GPA entstehen.

Epidemiologische Daten zeigen geographische Unterschiede. In japanischen [66] und afrikanisch-amerikanischen Populationen [67] ist GPA seltener als in europäischen Populationen, umgekehrt ist es für MPA. In Europa kommt GPA im Norden häufiger vor als im Süden, für MPA gilt das Gegenteil [68]. Bei der Afroamerikanischen Population wurde dafür das MHCII-Allel HLA-DRB1\*15 assoziiert [67], andere Studien finden dagegen eine starke Assoziation mit dem HLA-DPB1\*0401 Allel [69-71].

Eine frühe Studie untersuchte bereits das PRTN3 Gen und identifizierte sieben SNPs, von denen einer mit der GPA assoziiert war. Dieser SNP im Bereich des PR3-Promoters wurde -564A/G genannt [51] und wird heute als rs62132295 bezeichnet. Eine Veränderung der Promotoraktivität konnte allerdings für diesen SNP nicht nachgewiesen werden [72]. Auch das erhöhte PR3 Plasma Level bei GPA Patienten ist keine Konsequenz dieses SNPs [73].

Eine „Genome wide association study“ (GWAS) zeigte Assoziationen zu diesen Genen auf und konnte das erste Mal einen genetischen Unterschied zwischen GPA und MPA identifizieren [74], was auf der Basis rein klinischer Methoden vorher nicht möglich war (siehe 1.2). Sie besagt, dass die größte genetische Assoziation mit der Antigenspezifität zusammenhängt. Anti-PR3 ANCAs sind assoziiert mit HLA-DP, SERPINA und PRTN3, der gefundene SNP in PRTN3 ist rs62132295. Anti-MPO ANCAs sind assoziiert mit HLA-DQ. Eine weitere GWAS bestätigte die Ergebnisse zum Teil, indem sie GPA mit dem HLA-DP1\*04 Allel und einigen SEMA6A Genvarianten assoziieren konnte [75].

Eine kürzlich erschienene Studie besagt, dass das alternative PR3 Transkript in ein Protein translatiert wird und bei GPA Patienten nachzuweisen ist [76].

#### **1.4.ZIEL DER ARBEIT**

Die Themenstellung basiert auf der Entdeckung eines alternativen humanen PR3-Transkriptes durch unsere Arbeitsgruppe, das sowohl physiologisch im gesunden Knochenmark als auch pathophysiologisch in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von Krebszellen hat einen erheblichen Einfluss auf die Diagnose, Therapie und Nachsorge und der Bedarf an spezifischen und zuverlässigen Tumormarkern ist groß. Dieses Projekt setzte sich zum Ziel, die pathophysiologische Rolle der humanen PR3 Isoformen im Rahmen der myeloiden Leukämie und nicht-myeloiden Krebserkrankungen zu untersuchen. Die neuentdeckte Proteinase 3 RNA-Variante erlaubt den Nachweis von Tumorstammzellen aus Vollblut- und Gewebeproben. Der wissenschaftliche Erkenntnisgewinn soll in Zukunft eine einfache und schnelle Diagnose einzelner Tumorerkrankungen mittels PCR Techniken ermöglichen und die Suche nach neuen Arzneimitteln und diagnostischen Optionen erleichtern. Die Untersuchung alternativer Promotoren, die mit Krebs assoziiert sind, bietet ebenfalls einen Ansatz zur Entwicklung neuer Krebstherapeutika.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit die Rolle der humanen PR3 bei der Hämatopoese, also der Blutbildung, zu untersuchen. Bei diesem komplexen biologischen Prozess, der sich hauptsächlich im Knochenmark abspielt, ist es von großer Bedeutung, dass wir ein größeres Verständnis der Vorgänge bekommen. Abnormitäten bei dem Prozess der Hämatopoese führen zu einer Vielzahl von Krankheiten, deren Behandlung man neue Ansätze bieten kann.

Des Weiteren sollte dieses Projekt bei der Erforschung der komplexen Autoimmunkrankheit GPA helfen. Sind die komplexen Zusammenhänge bei solch einer Autoimmunkrankheit erst einmal verstanden, kann Menschen mit einer genetischen Prädisposition für diese Krankheit schneller und einfacher geholfen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. PLASTIKWAREN**

Alle Plastikwaren wurden steril und, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland) bezogen.

### **2.2. CHEMIKALIEN**

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### **2.3. PUFFER UND KULTURMEDIENTEN**

#### **2.3.1. PUFFER**

Zur Herstellung aller Puffer wurde vollentsalztes (VE) Wasser verwendet. Vor Gebrauch wurden alle Flüssigkeiten autoklaviert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

ACK-Puffer

in VE-Wasser, 8,02 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 g/l  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA, pH 7,3

TAE Puffer

in VE-Wasser, 0.04 M Tris, 0.04 M Essigsäure, 0.1 mM EDTA, pH 8,3

LB-Medium

10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, pH 7,0

Flüssiges LB-Medium, welches Antibiotika (Ampicillin oder Kanamycin) enthielt sowie auch LB basiertes Agar Medium mit Antibiotika, wurde von Invivogen (Toulouse, Frankreich) bezogen.

Die Trypanblaulösung ist ein Vitalfarbstoff, der nur von toten Zellen aufgenommen wird und zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet werden kann.

Trypanblau-Lösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS

### **2.3.2. KULTURMEDIENTEN**

Die für die Zellkultur verwendeten Kulturmedien und Zusätze wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Gibco (by ThermoFischer Scientific), Sigma-Aldrich (Deutschland) und Merck-Milipore (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Fötale Kälberserum (FCS)

Das verwendete FCS wurde zunächst zur Inaktivierung von Komplementkomponenten eine Stunde bei 56°C im Wasserbad erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Einfriermedium

RPMI, 20% FCS, 10% DMSO

HeLa (American Type Culture Collection [ATCC] CCL2), MCF7 (ATCC HTB22), HI-60 (ATCC CCL240), KG1A (ATCC CCL-246.1), THP1(ATCC TIB-202), NB4 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [DSMZ] ACC 207), U937 (ATCC CRL1593.2) und K562 (ATCC CCL243) Zellen wurden in folgenden Kulturmedien gehalten:

## Material und Methoden

### Kulturmedium für HeLa Zellen

RPMI Medium 1640 (Gibco), 10% FCS, 1% Amphotericin, 1% Pen/Strep

### Kulturmedium für MCF7 Zellen

DMEM (Gibco), 10% FCS, 1% Amphotericin, 1% Pen/Strep

### Kulturmedium für myeloide AML Zelllinien (HL60, KG1A, THP1, NB4, U937, K562) Zellen

RPMI Medium 1640 (Gibco), 20% FCS, 1% Amphotericin, 1% Pen/Strep

### Kulturmedium für HEK293-FT Zellen (Invitrogen)

DMEM, high Glucose (Gibco), 10% FCS, 0,1 mM Non-Essential Amino Acids, 6mM L-Glutamin, 1mM Sodium Pyruvat, 1% Pen/Strep

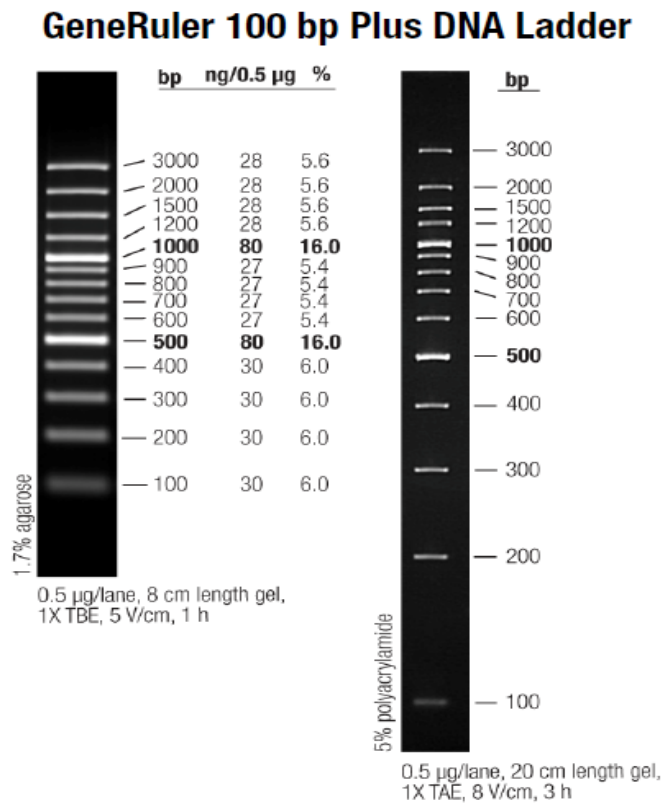
### Kulturmedium für h-TEZ

DMEM/Ham's F12 (1:1) (Milipore, with stable glutamin, low endotoxin), 10 % FCS, 1% Amphotericin, 1% Pen/Strep, Hepes, Hormonzusätze: h-EGF, Sigma, Endkonzentration 10 ng/ml; L-Epinephrin, Sigma, Endkonzentration 500 ng/ml; Hydrocortison, Sigma, Endkonzentration 500 ng/ml; Prostaglandin E2, Sigma, Endkonzentration 1 ng/ml, Trijod-Thyronin, Sigma, Endkonzentration 20 ng/ml.

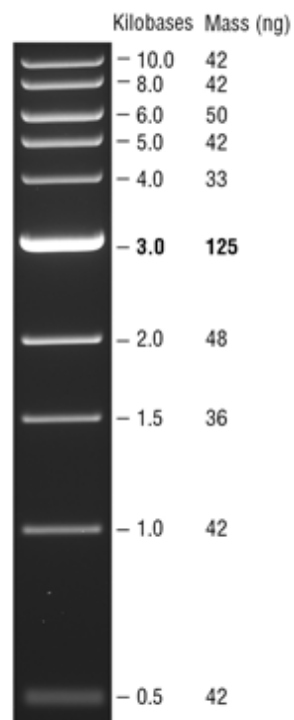
## **2.4.MOLEKULARGEWICHTSMARKER FÜR DIE AGAROSE GELELEKTROPHORESE**

Zur Größenbestimmung von doppelsträngiger DNA auf Agarose Gelen (siehe 2.6.9) wurden Molekulargewichtsmarker mit Referenzbanden eingesetzt. Für DNA zwischen 100 und 2000 Bp wurde der Gene Ruler 100 Bp Plus DNA Ladder (Thermo Fischer) genutzt, für größere DNA (z.B. Plasmide) wurde die 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs) genutzt (siehe Abb.5).

**A**



**B**

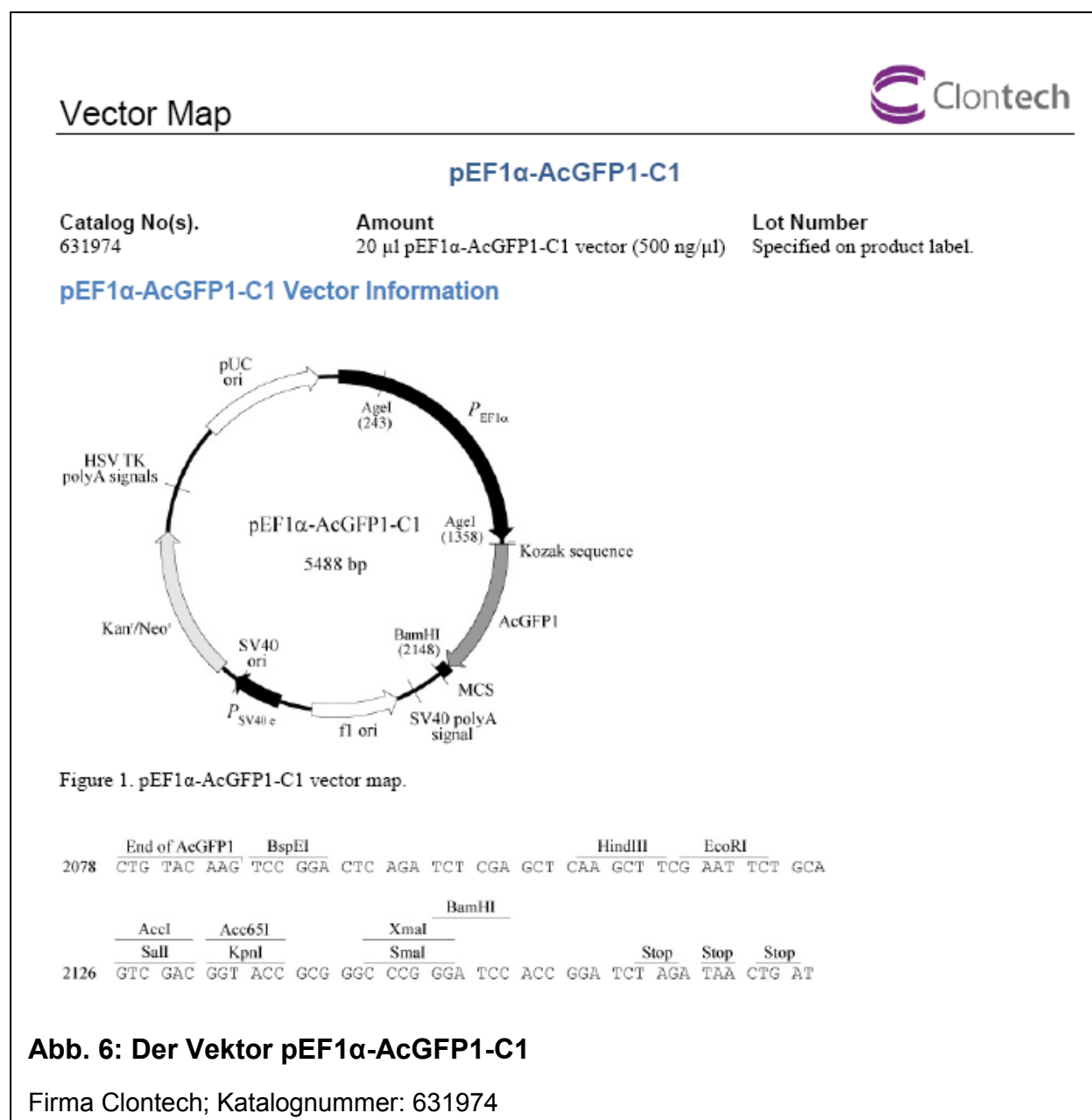


**Abb. 5: Referenzbanden der Molekulargewichtsmarker für doppelsträngige DNA**

(A) Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fischer). (B) 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs). Massenangaben sind für 0.5 µg pro Bahn.

## 2.5. PLASMIDE

Der humane Elongation Factor 1 alpha (EF1 $\alpha$ ) ist ein konstitutiver Promotor, der für eine ektopische Genexpression in *in vitro* und *in vivo* Experimenten eingesetzt werden kann. Der Vektor pEF1 $\alpha$  –AcGFP1-C1 (Clontech, Abb.6) ist ein säugetierspezifischer Expressionsvektor, der diesen Promotor besitzt. Weiterhin besitzt er ein Kanamycin-Resistenzgen für die positive Selektion. Er kann benutzt werden, um ein gewünschtes Protein an den C-Terminus des „green fluorescent protein“ (GFP) zu fusionieren. Nach stabiler Transfektion in das Genom (siehe 2.7.6), kann man durch das bicistronische Transkript verschiedene Zellprozesse überwachen.



Das Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit (Clontech) enthält zwei Vektoren; einen Reporter Vektor und einen Kontroll Vektor (siehe Abb. 7)

Der Vektor pMetLuc2-Reporter ist ein Promotor Reportervektor, der die Analyse von Promotorfunktionen in zellbasierten Assays erlaubt. Der Vektor kodiert für eine kodon-optimierte sekretierte Luciferase des marinen Ruderfußkrebses *Metridia longa*. Wenn ein funktioneller Promotor in die multiple cloning site (MCS) des Vektors upstream des MetLuc Reporter Gens kloniert wird, wird die Luciferase exprimiert und in das umgebende Medium sekretiert. Der Vektor enthält ein SV40 Origin für die Replikation in Säugetierzellen sowie dessen Promotor und ein Kanamycin/Neomycin Resistenzgen, welches für die positive Selektion genutzt wird. Es enthält weiterhin einen synthetischen Transkriptionsblocker (TB), um den Hintergrund bei der Messung zu reduzieren.

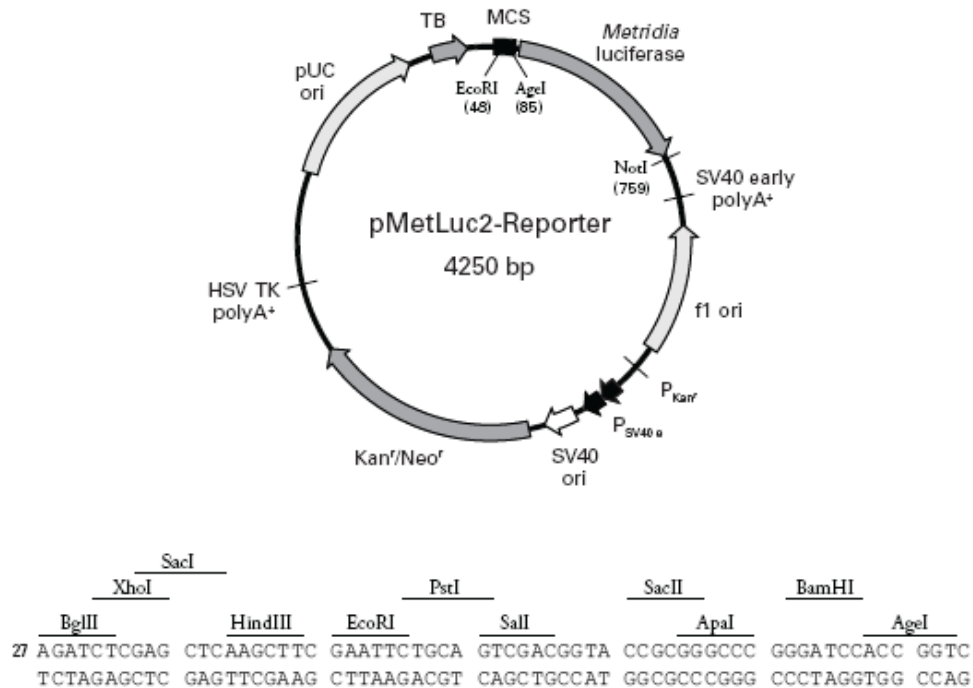
Der Vektor pMetLuc2-Control enthält die gleichen funktionellen Einheiten, wie der Reporter Vektor. Statt der MCS zur Einklonierung eines funktionellen Promotors, enthält er jedoch den CMV Promotor, ein hochaktiver, konstitutiver Promotor des Cytomegalovirus.

## A

### pMetLuc2-Reporter Vector Information

PT4059-5

Cat. No. 631729 & 631735



## B

### pMetLuc2-Control Vector Information

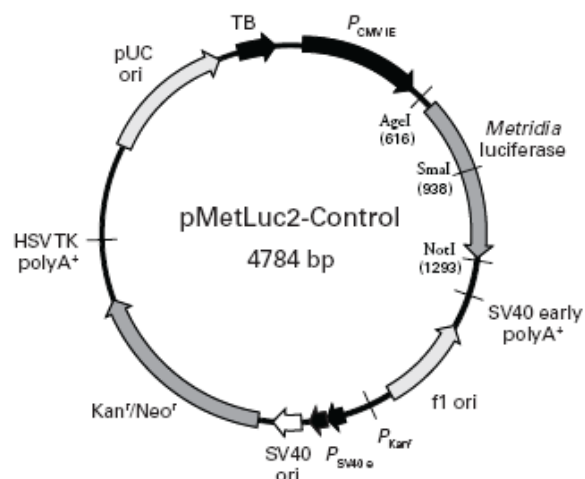
PT4060-5

Cat. Nos. 631729

631735

631743

631745



### Abb. 7: Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit (Clontech)

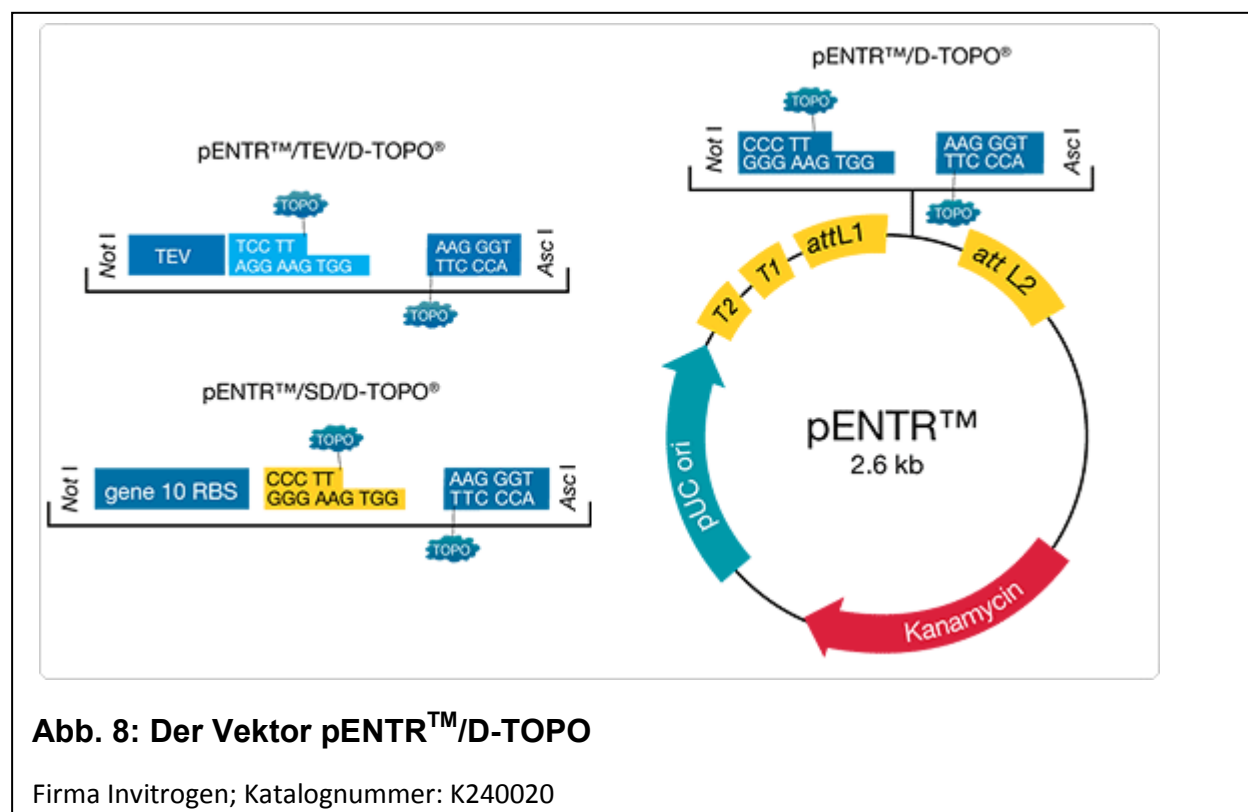
(A) Reporter Vektor pMetLuc2-Reporter

(B) Kontroll Vektor pMetLuc2-Control

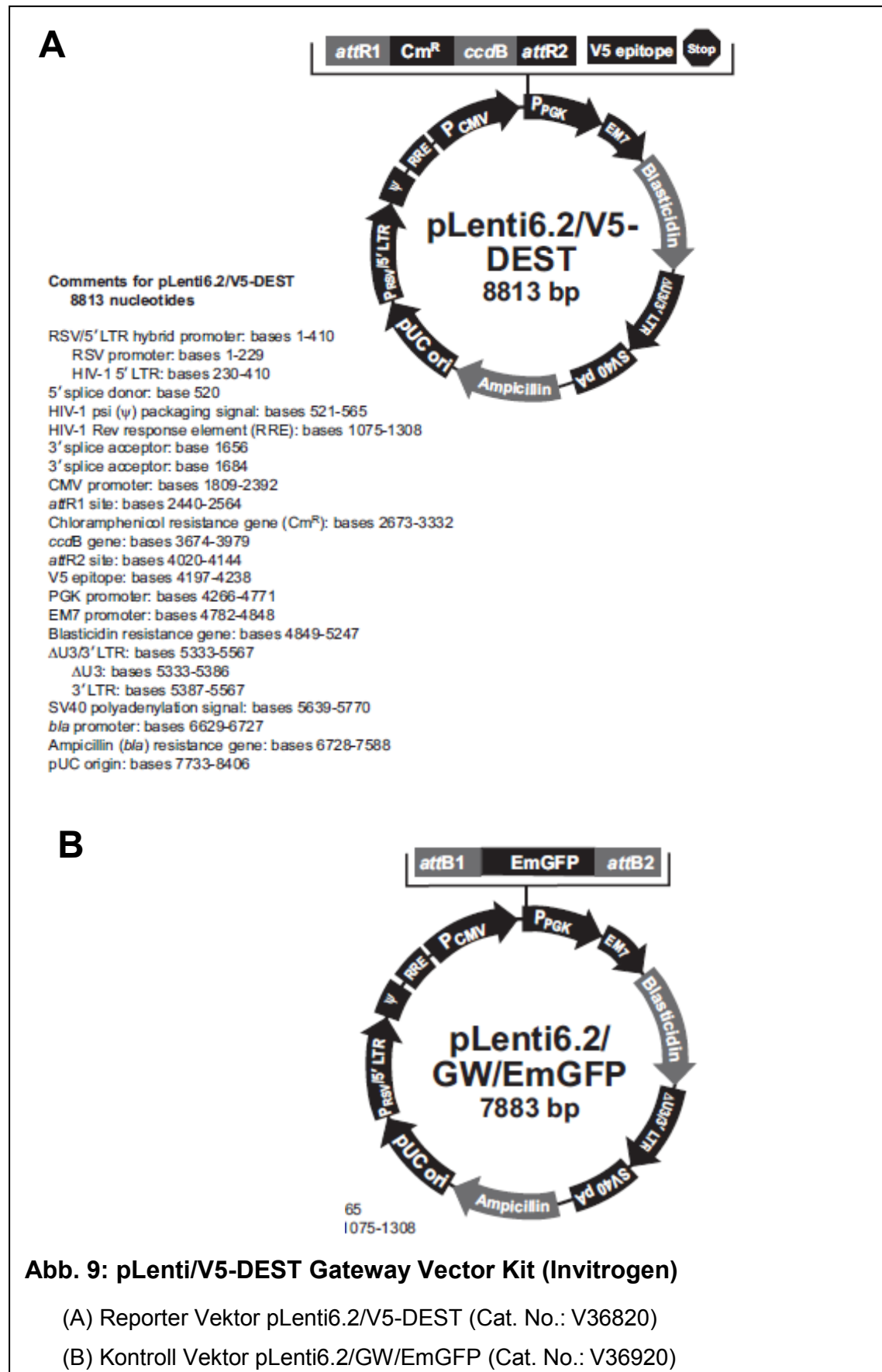
Fa. Clontech (PR093643; published 3 September 2010)

Das Gateway Cloning System (Invitrogen) ist dazu geeignet, Vektoren für mehrere Expressionssysteme zu generieren und multidisziplinäre Analysen durchzuführen. Hierzu liefert es einen ersten Vektor zur Generierung eines Entry Clones sowie einen Destination Vector zur Generierung eines Expressionsklons (siehe 2.6.18).

Der Entry-Vector pENTR<sup>TM</sup> (Abb. 8) enthält M13 und T7 Primer Sequencing sites zur Überprüfung, attL recombination sites zur Insertion eines gewünschten PCR Produktes, ein Kanamycin Resistenzgen zur positiven Selektionierung und ein pUC Origin für ein high-copy Wachstum in *E.coli*.



Der Destination-Vector pLenti6.2/V5-DEST (Abb. 9 A) ist ein lentiviraler Vektor, der eine konstitutiv hohe Expression eines gewünschten Gens durch den CMV Promotor, mit einem C-terminal angehängtem V5 Epitop zur Detektierung, gewährleistet. Es enthält ein Ampicillin Resistenzgen für die Selektion in *E.coli* und ein Blasticidin Resistenzgen für die Selektion in Säugetierzellen. Darüber hinaus verhindert das lethale ccdB Gen zwischen den Rekombinationsstellen eine Selektion nicht rekombinanter Vektoren.



Als Kontrolle diente der Vektor pLenti6.2/GW/EmGFP (Abb. 9 B), der die gleichen Funktionen besitzt, wie pLenti6.2/V5-DEST und zwischen den Rekombinationssequenzen das Gen zur Expression des Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP) zur Überprüfung der erfolgreichen Transduktion (siehe 2.7.7) besitzt.

## **2.6. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN**

Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Zentrifuge 5417R (Eppendorf) durchgeführt. Inkubationsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) durchgeführt.

### **2.6.1. PRÄPARATION VON DNA**

Zur Extraktion der DNA aus Zellen wurden zunächst die Zellen in ein DNase-freies Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt und lysiert. Die Lyse sowie die RNA Isolierung erfolgten mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll. Die Elution erfolgte mit 100µl Elutionspuffer.

### **2.6.2. PRÄPARATION VON RNA**

Zur Extraktion der RNA aus Zellen wurden zunächst die Zellen in ein RNasefreies Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt und lysiert. Die Lyse sowie die RNA Isolierung erfolgten mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll. Die Elution erfolgte mit 100 µl RNase-freiem Wasser.

RNA Proben von humanem Knochenmark, der Milz, dem Herz und totale RNA von PBLs wurde von der Firma Biochain (Eureka, CA, USA) bezogen, totale RNA von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden von Miltenyi Biotech (Auburn, CA, USA) bezogen.

### **2.6.3. PHOTOMETRISCHE MESSUNG DER DNA BZW. RNA KONZENTRATION**

Um eine vergleichbare Menge DNA bzw. RNA zu verwenden, ist es notwendig die Konzentration der Lösungen zu bestimmen. Hierfür wurden 2 µl der Lösung benutzt. Die Messung erfolgte mit einem Spectrophotometer Nano-Drop ND-1000 (PeqLab) und der dazugehörigen Software ND1000 V3.5.2. Durch die Berücksichtigung der optischen Dichte (OP) bei 260 nm Lichtwellenlänge, im Vergleich zur Referenz, konnte die DNA bzw. RNA Konzentration ermittelt werden. Die Reinheit der Probe oder evtl. Verunreinigungen mit anderen Substanzen, z.B. Proteinen, zeigten die Verhältnisse der Lichtwellenlängen 260/230 und 260/280 an.

### **2.6.4. DNASE VERDAU**

Um zu gewährleisten, dass die isolierte RNA (siehe 2.6.2) frei von genomischer DNA ist, wurde 1 µg RNA mit der DNase I (New England BioLabs) nach Protokoll für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl EDTA (10 mM) hinzugefügt und die DNase bei 85°C für 10 min inaktiviert.

### **2.6.5. REVERSE TRANSKRIPTION**

Bei der Reversen Transkription wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkription wurde in einem TGradient Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit dem Transcritpor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Protokoll durchgeführt. Hierbei wurde folgender Ansatz benutzt:

1 µg (X µl) RNA  
2 µl Random Hexamere (600 pmol/ µl)  
1 µl anchored Oligo dt18 -Primer (50 pmol/ µl)  
ad 11,4 µl mit aqua dest.

Der Ansatz wurde bei 65°C im Thermoblock für 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit folgenden Reagenzien gemischt:

4,0 µl 5xReverse-Transkriptase-Puffer

0,5 µl RNase-Inhibitor (40 u/ µl)

2,0 µl dNTP Mix (je 10 mM)

1,0 µl DTT (1 M)

1 µl Reverse Trankriptase (10 u)

Der Ansatz (20 µl) wurde zunächst für 1 h bei 55 °C inkubiert, anschließend für 10 min bei 65 °C. Danach wurde die reverse Transkriptase für 5 min bei 85 °C inaktiviert. Je 3 µl der cDNA wurden pro PCR-Ansatz eingesetzt.

Es wurden Oligo-(dT)-Primer und Random Hexamer Primer zur cDNA Synthese benutzt. Die Oligo-(dT)-Primer binden an den Poly-A Schwanz der mRNAs, wodurch die cDNA Synthese am 3'-Ende beginnt. Das Gemisch an Hexanukleotid- Primern dagegen kann an jede mögliche Basenabfolge binden, wodurch gewährleistet wird, dass jede mRNA umgeschrieben wird, aber auch der Anteil an unvollständigen cDNAs steigt.

#### **2.6.6. KONVENTIONELLE PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA. Vervielfältigt werden hier DNA Abschnitte von einer Original DNA (Template) beginnend an Oligonukleotiden, sogenannten Primer, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen und somit den Bereich begrenzen. Die DNA-Polymerase, welche das katalysierende Enzym ist, ist darauf ausgelegt, bei hohen Temperaturen zu funktionieren und entstammt ursprünglich aus Organismen, die in solchen extremen Umgebungen leben (z.B. Taq-Polymerase aus dem thermophilen Archeabakterium *Thermus aquaticus*).

Im ersten Schritt der PCR wird die doppelsträngige DNA durch Hitzebehandlung voneinander gelöst (Denaturierung). Im nächsten Schritt lagern sich die Primer an die DNA an (Annealing). Die Temperatur, bei der dieser Schritt ausgeführt werden muss, richtet sich nach den Schmelztemperaturen der Primer und sollte sich ca. 5 °C unter diesen befinden. Im letzten Schritt synthetisiert die DNA Polymerase den komplementären DNA Strang (Elongation). Die Länge dieses Schrittes hängt von der Größe des zu erwartenden PCR Produktes ab und sollte ungefähr 1 min pro 1 kb des DNA Fragmentes sein.

Konventionelle PCRs wurden in einem TGradient bzw. TPersonal Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Einfache PCRs wurden mit dem REDTaq ReadyMix (Sigma), schwierige PCRs, z.B. wenn der GC Gehalt des PCR Produktes hoch ist oder ein langes PCR Produkt entsteht, wurden mit dem FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack (Roche) durchgeführt. Primer wurden von der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) in einer Konzentration von 100 pmol/ml bezogen und in einer Konzentration von 10 pmol/ml in die PCR eingesetzt.

Folgende Primer und Programme wurden benutzt (gesamte Auflistung unter 9.1.1):

Alternativer Promotor:

huPR3-Intr1-s3-Hind: 5'-TTT AAG CTT AGG TCC CTA TCC TGA GGG TGA-3'

huPR3-altProm-Hind-L: 5'-TTT AAG CTT CTG CGT CTT AAA AGC CTT CC-3'

huPr3-Prom1c-s 5'-TTT TAA GCT TGG GAT TAC AGG CGT GAG-3'

huPR3-Prom2-s 5'-TTT TAA GCT TCC ACC TGG TCT GCG TCT TAA-3'

huPR3-Prom3b-s 5'-TTT TAA GCT TGC CTG GGC GCT GAG TCC TTC C-3'

huPR3-Prom4-s 5'-TTT TAA GCT TGA GAC GGA GGC TCG GAG AG-3'

huPR3-Prom-as 5'-TTT TGG ATC CTG TAG GGC CGG GAG TGT G-3'

huPR3-altProm-Hind-L: 5'-TTT TGG ATC CAG AAA CAC CTG AGC CAC CGA-3'

Die Ansätze für Prom 1- 4 wurden mit dem RED Taq Ready Mix durchgeführt:

|              |                                              |
|--------------|----------------------------------------------|
| 25 µl        | REDTaq ReadyMix PCR Reaction-Kit (Fa. Sigma) |
| 2 µl         | Sense-Primer (10 pmol/µl)                    |
| 2 µl         | Antisense-Primer (10 pmol/µl)                |
| 1 µl         | genomische DNA human (Biochain)              |
| <u>20 µl</u> | H <sub>2</sub> O                             |
| 50 µl        |                                              |

Die Ansätze für altProm-Intr und AltPromL wurden mit dem „Fast Start Kit“ and „GC-rich Resolution Solution“ (Roche) durchgeführt:

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| 5 µl         | 10xBuffer without MgCl <sub>2</sub> |
| 5 µl         | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)           |
| 2 µl         | dNTP-Mix (each 10 mM)               |
| 10 µl        | GC-rich Resolution Solution (5 M)   |
| 2 µl         | Sense-Primer (10 pmol/µl)           |
| 2 µl         | Antisense-Primer (10 pmol/µl)       |
| 1 µl         | Fast Start Taq-Polymerase (5u/ µl)  |
| 1 µl         | genomische DNA human (Biochain)     |
| <u>22 µl</u> | H <sub>2</sub> O                    |
| 50 µl        |                                     |

Programme:

Prom 1

|                |      |        |           |
|----------------|------|--------|-----------|
| Start:         | 95°C | 5 min  |           |
| Denaturierung: | 95°C | 1 min  |           |
| Annealing:     | 65°C | 90 sec | 35 Zyklen |
| Extension:     | 72°C | 90 sec |           |
| Ende:          | 72°C | 5 min  |           |

## Material und Methoden

### Prom 2+ 4

|                |      |        |           |
|----------------|------|--------|-----------|
| Start:         | 95°C | 5 min  |           |
| Denaturierung: | 95°C | 30 sec |           |
| Annealing:     | 65°C | 30 sec | 35 Zyklen |
| Extension:     | 72°C | 30 sec |           |
| Ende:          | 72°C | 5 min  |           |

### Prom 3

|                |      |        |           |
|----------------|------|--------|-----------|
| Start:         | 95°C | 5 min  |           |
| Denaturierung: | 95°C | 30 sec |           |
| Annealing:     | 55°C | 30 sec | 35 Zyklen |
| Extension:     | 72°C | 30 sec |           |
| Ende:          | 72°C | 5 min  |           |

### altPromL:

|                |      |        |           |
|----------------|------|--------|-----------|
| Start:         | 95°C | 5 min  |           |
| Denaturierung: | 95°C | 1 min  |           |
| Annealing:     | 69°C | 90 sec | 35 Zyklen |
| Extension:     | 72°C | 90 sec |           |
| Ende:          | 72°C | 5 min  |           |

### altPromIntr:

|                |      |        |           |
|----------------|------|--------|-----------|
| Start:         | 95°C | 5 min  |           |
| Denaturierung: | 95°C | 1 min  |           |
| Annealing:     | 70°C | 90 sec | 35 Zyklen |
| Extension:     | 72°C | 90 sec |           |
| Ende:          | 72°C | 5 min  |           |

PR3-mRNA Konstrukte zur GatewayKlonierung und Transduktion:

|                |                                       |
|----------------|---------------------------------------|
| PR3-Gate-L-s   | 5'-CAC CAT GGC TCA CCG GCC CCC CAG-3' |
| PR3-Gate-K-s   | 5'-CAC CAT GGC CTC CCT GCA GAT GCG-3' |
| PR3-Gate-Mut-s | 5'-CAC CAT CGC CTC CCT GCA GAT CCG-3' |
| PR3-Gate-LK-as | 5'-TCA GGG GCG GCC CTT GC CTC CAC-3'  |

Programm:

|                      |       |                          |
|----------------------|-------|--------------------------|
| Start:               | 95°C  | 5 min                    |
| Denaturierung:       | 95°C  | 30 sec                   |
| Annealing/Extension: | 72 °C | 1 min 30 sec (35 Zyklen) |
| Final Extension:     | 72 °C | 5 min                    |

Amplifikation des PRTN3 Gens:

Primer:

huPR3- Prom s 5'-AGG GTG CTA GGC ATC ATC C-3'

huPR3- Prom as 5'-TGG ACC TCG TGG TGG ATA TT-3' ( 783 Bp-PCR-Produkt)

huPR3- Intron s3 5'-AGG TCC CTA TCC TGA GGG TGA T-3'

huPR3- Intron as3 5'-AAG GTG CCT CCG CAG AAG TG-3' (1883 Bp-PCR-Produkt)

huPR3-PolyA s 5'-CCG CCT TTT CCC TGA CTT CT -3'

huPR3-PolyA as 5'-GTT AGA ACC CAC AGC CAC GA -3' (546 Bp-PCR-Produkt)

huPR3- Exon 2/3 s 5'-GCT GAG TCC TTC CCA CCA G-3'

huPR3- Exon 2/3 as 5'-CAG TGG GTG CTC AAT GAA TG-3' ( 811 Bp-PCR-Produkt)

huPR3- Exon 4 s 5'-GTT TTG AGG TGG TGG GTG TG-3'

huPR3- Exon 4 as 5'-GCA TGA AGC CAC ACA GCT AA-3 ( 430 Bp-PCR-Produkt)

huPR3- Exon 5 s 5'-TCT GAA ACA GCT GTG GCT ACC-3'

huPR3- Exon 5 as 5'-GGA AGA GCT GCT TCT GTC CA-3' (434 Bp-PCR-Produkt)

huPR3- Prom, huPR3- Intron, huPR3-PolyA und huPR3- Exon 2/3 wurden mit dem „Fast Start Kit“ and „GC-rich Resolution Solution“ (Roche) durchgeführt:

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| 5 µl  | 10xBuffer without MgCl <sub>2</sub> |
| 5 µl  | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)           |
| 2 µl  | dNTP-Mix (each 10 mM)               |
| 10 µl | GC-rich Resolution Solution (5 M)   |
| 2 µl  | Sense-Primer (10 pmol/µl)           |
| 2 µl  | Antisense-Primer (10 pmol/µl)       |
| 1 µl  | Fast Start Taq-Polymerase (5u/ µl)  |
| x µl  | DNA (between 100 and 120 ng)        |
| x µl  | H <sub>2</sub> O (up to 50 µl)      |

Exon 4 und Exon 5 wurden mit dem RED Taq Ready Mix durchgeführt:

|       |                                              |
|-------|----------------------------------------------|
| 25 µl | REDTaq ReadyMix PCR Reaction-Kit (Fa. Sigma) |
| 2 µl  | Sense-Primer (10 pmol/µl)                    |
| 2 µl  | Antisense-Primer (10 pmol/µl)                |
| x µl  | DNA (between 100 and 120 ng)                 |
| x µl  | H <sub>2</sub> O (up to 50 µl)               |

Eine zusätzliche PCR für alle Primer Varianten wurde mit den Primern, aber ohne DNA als Negativ Kontrolle durchgeführt.

Die PCR für alle Primer-Varianten außer huPR3- Intron wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

|               |      |                    |
|---------------|------|--------------------|
| Start:        | 95°C | 10 min             |
| Denaturation: | 95°C | 45 sec             |
| Annealing:    | 60°C | 45 sec (30 Cycles) |
| Extension:    | 72°C | 1 min              |

Die PCR für huPR3- Intron wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

|               |      |                          |
|---------------|------|--------------------------|
| Start:        | 95°C | 10 min                   |
| Denaturation: | 95°C | 1 min                    |
| Annealing:    | 63°C | 1 min 30 sec (30 Cycles) |
| Extension:    | 72°C | 1 min 30 sec             |

Zur Kontrolle der PCR wurde eine 1,5 %ige Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.6.9).

Zur Aufreinigung von PCR Produkten zur weiteren Verwendung (z.B. Ligation, siehe 2.6.10), wurde ein DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) nach den Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte mit 10-30 µl Elutionspuffer. Sollte das PCR Produkt sequenziert werden, wurde das GeneReadSize Selection Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer.

#### **2.6.7. DIFFERENZIERENDE HU<sub>PR3</sub>- RT-PCR**

Um eine Unterscheidung der bekannten Proteinase 3-mRNA und der alternativen Variante zu ermöglichen, wurde eine differenzierende RT-PCR durchgeführt. Nach der RNA Extraktion (siehe 2.6.2), dem DNase Verdau (siehe 2.6.4) und der Reversen Transkription (2.6.5), wurden drei konventionelle PCRs mit unterschiedlichen Primern durchgeführt.

huPR3-norm (PRTN3-001)

Sense: 5'-TGC TGC TGG CCT TGC TGC TGA G-3',

Antisense: 5'-CCG AGAAGTGCTGCTGGGTGGG-3'; 267 Bp-PCR-Produkt

huPR3-kurz (PRTN3-002, PRTN3-003)

Sense: 5'-GGG AGA CGG AGG CTC GGA GAG G-3',

Antisense: 5'-AGA AGT GCT GCT GGG TGG GCT C-3'; 337 Bp-PCR-Produkt

Des Weiteren wurden ein Primerpaar generiert, mit dessen Hilfe beide mRNA-Varianten gleichzeitig amplifiziert werden können (Maß für die absolute PR3-mRNA-Expression):

huPR3-total

Sense: 5'-ATC CAG CTG AGC AGC CCA GCC AA-3',

Antisense: 5'-CGT GGA ACG GATCCA GTC CAC GTA-3'; 375 Bp-PCR-Produkt

Die Ansätze für die PCRs wurden folgendermaßen zusammenpipettiert:

huPR3-norm-PCR und huPR3-total-PCR:

12,5 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction-Kit (Fa. Sigma)

7,5 µl H<sub>2</sub>O

1 µl Sense-Primer (10 pmol/µl)

1 µl Antisense-Primer (10 pmol/µl)

3,0 µl cDNA (aus Reverser Transkription)

25 µl

huPR3-kurz (mittels „Fast Start Kit“ und „GC-rich Resolution Solution“ von Roche):

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
| 2,5 µl  | 10xPuffer ohne MgCl <sub>2</sub>   |
| 2,5 µl  | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)          |
| 1,0 µl  | dNTP-Mix (10 mM)                   |
| 5 µl    | GC-rich Resolution Solution (5 M)  |
| 1,25 µl | Sense- Primer (10 pmol/µl)         |
| 1,25 µl | Antisense-Primer (10 pmol/µl)      |
| 1,25 µl | Fast Start Taq-Polymerase (5u/ µl) |
| 3,0 µl  | cDNA                               |

ad 25 µl mit H<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

Die PCR für alle drei Primer-Varianten wurde im Thermocycler (Fa. Biometra) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

|                |      |                   |
|----------------|------|-------------------|
| Start:         | 95°C | 10 min            |
| Denaturierung: | 95°C | 1 min             |
| Annealing:     | 68°C | 1 min (10 Zyklen) |
|                | 61°C | 1 min (24 Zyklen) |
| Extension:     | 72°C | 1 min 30 s        |

Zur Kontrolle der PCR wurde eine 1,5 %ige Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.6.9).

### **2.6.8. QUANTITATIVE REALTIME PCR**

Diese PCR Methode beruht auf den gleichen Prinzipien, wie die konventionelle PCR (siehe 2.6.6). Zusätzlich besteht hier jedoch die Möglichkeit zur Quantifizierung. Die Quantifizierung erfolgt in Echtzeit mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung während der exponentiellen Phase der PCR von einem interkalierendem Fluoreszenzfarbstoffes, in dem Falle SYBR Green I.

Die RT-PCR (mit Reverser Transkription, siehe 2.6.5) wurde mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen), die konventionelle PCR mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurden speziellen QuantiTect Primer (Hs\_PRTN3\_1\_SG, Qiagen, Cat No.: QT00000595), die für eine RealTime PCR optimiert wurden, verwendet. Als Housekeeping Gene wurde  $\beta$ -Actin (Hs\_ACTB\_1\_SG, Qiagen, Cat. QT00095431) benutzt. Alle Experimente wurden in einem LightCycler II 480 (Roche) durchgeführt.

Für die RT-PCR wurde folgender Ansatz genutzt:

|                                            |                              |
|--------------------------------------------|------------------------------|
| 2x Quantitect SYBR Green RT-PCR Master Mix | 10 $\mu$ l                   |
| Primer (sense und antisense)               | (Endkonzentration 1 $\mu$ M) |
| Quantitect RT Mix                          | 0.2 $\mu$ l                  |
| Template RNA                               | $\leq$ 500 ng / Reaktion     |
| RNase freies Wasser                        | variabel                     |
| <hr/>                                      |                              |
| Total                                      | 20 $\mu$ l                   |

Für die RT-PCR mit QuantiTect Primern wurde folgendes Programm genutzt:

|                          |      |        |
|--------------------------|------|--------|
| Reverse Transkription    | 50°C | 20 min |
| PCR Aktivierungsschritt: | 95°C | 15 min |

40 Zyklen:

|                |      |        |
|----------------|------|--------|
| Denaturierung: | 94°C | 15 sec |
| Annealing:     | 55°C | 30 sec |
| Extension:     | 72°C | 30 sec |

|               |          |                          |
|---------------|----------|--------------------------|
| Schmelzkurve: | 95°C     | 1 sec                    |
|               | 60°C     | 1 min                    |
|               | 60 -95°C | kontinuierliche Steigung |
| Cooling:      | 40°C     | 30 sec                   |

Man kann ebenfalls eine Aussage über die relative Expression einer mRNA treffen, indem man die Expression des Zielgens gegen die Expression eines sogenannten „housekeeping genes“, ein konstitutiv exprimierendes Gen, normalisiert. Hierbei müssen die Amplifikationsraten der Primer des Targets und der Referenz ungefähr gleich sein. Mit Hilfe der komparativen Methode wird die relative Genexpression mit der Formel  $2^{\Delta\Delta CT}$  quantifiziert.)

Zur Quantifizierung verschiedener Zellzyklus und Apoptose Gene wurde das RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen; PCR Array Human Apoptosis: PAHS-012Z; PCR Array Human Cell Cycle: PAHS-020Z) und das RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) benutzt. Die Berechnung wurde mit Hilfe des auf der Website befindlichen Qiagen Data Analysis Center (<https://www.qiagen.com/us/products/genes%20and%20pathways/data-analysis-center-overview-page/>) durchgeführt, die Expressionsstärke anhand des „threshold cycle“ ( $C_T$ ) gemessen und mit der Expression nicht transduzierter Zellen relativiert.

#### **2.6.9. AGAROSE GELELEKTROPHORESE**

Die DNA-Gelelektrophorese trennt lineare DNA-Segmente nach ihrer Größe über ein Agarosegel mit einem angelegten elektrischen Feld auf. Die Agarose ist ein langkettiges Polysaccharid, welches sich, nachdem es in einem Puffer aufgekocht wurde, beim Abkühlen zu dicken Fäden zusammenlagert und eine Gelmasse ausbildet. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren im Gel. Durch die negativ geladenen Phosphatgruppen wandern DNA oder RNA Moleküle bei der Anlegung eines elektrischen Feldes zum positiven Pol. Es kommt zu einem Siebeffekt, bei dem die kleineren Moleküle schneller durch die Poren wandern und sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Zum Größenvergleich wird ein Marker (siehe 2.4) mit definierten DNA Molekülen mitlaufen gelassen. Zur Visualisierung der DNA Banden unter UV-Licht, wurde das Fluoreszenzreagent F-BLUE (Biomol) in der Verdünnung 1:6 benutzt.

Die Aufnahmen wurden mit dem ChemiDoc XRS System und der dazugehörigen Software Quantity One (Version 4.6.9) (beides Bio-Rad, München, Deutschland) gemacht.

#### **2.6.10. VERDAU VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN**

Restriktionsenzyme katalysieren eine sequenzspezifische, endonukleolytische Spaltung des Desoxyribose-Phosphat-Rückrats der DNA. TypII Endonukleasen erkennen spezifische DNA Sequenzen aus 4-8 Nukleotiden und schneiden in Gegenwart von MgCl die DNA innerhalb dieser Sequenz. Dabei entstehen in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder einzelsträngige, überstehende (sticky end) oder glatte (blunt end) Enden.

Zum Restriktionsverdau wurden die FastDigest™ Enzyme (Thermo Fischer) nach Protokoll benutzt.

#### **2.6.11. REINIGUNG VON DNA FRAGMENTEN AUS AGAROSE GELEN**

Um DNA aus dem Agarose Gel (siehe 2.6.9) zu isolieren, wurde die Bande unter ultraviolettem Licht mit einem Skalpell so klein wie möglich, also mit wenig überflüssiger Agarose, herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit Hilfe einer Analyse Waage (Ohaus Analytical Plus, Sigma) gewogen. Die Aufreinigung wurde mit einem Gel Extraktion Kit (Zymo Research) nach Protokoll durchgeführt. Die Elution erfolgte je nach Bandenintensität unter UV-Licht mit 6 – 20 µl Elutionspuffer.

#### **2.6.12. LIGATION VON DNA FRAGMENTEN**

Bei der Ligation wird das gewünschte restringierte PCR Produkt mit einem restringierten Plasmid fusioniert. Zur Ligation wurde der Sticky End Ligase Master Mix (New England BioLabs) nach Protokoll benutzt.

### **2.6.13. OLIGO ANNEALING**

Ist das Insert, welches man in einen Vektor ligieren möchte, klein genug, so lässt sich dies auch durch Oligo Annealing herstellen. Der Vektor wird wie gewohnt mit einem Restriktionsenzym geschnitten (2.6.10) und aufgereinigt. Die Oligonukleotide (wenige Nukleotide/ kurz Oligos) wurden von der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) hergestellt. Beide Oligos sind revers komplement (sense und antisense) und die überhängende Restriktionsschnittstelle befindet sich an einem jeweiligen Ende, um Sticky ends zu produzieren. Die Oligonukleotide werden in equimolaren Konzentrationen zusammengegeben. Für 5 min werden sie dann bei 95°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung bei RT für ca. 45 – 60 min stehen gelassen, damit sie sich langsam abkühlen kann. Anschließend kann die Ligation (2.6.12) durchgeführt werden.

### **2.6.14. TRANSFORMATION**

Als Transformation bezeichnet man den Vorgang, bei dem DNA-Fragmente mittels eines Vektors in kompetente Bakterienzellen übertragen werden. Der Vektor mit dem entsprechenden DNA-Fragment ist ein Plasmid, welcher in Zellen des *E. coli* – Stammes One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) übertragen wird. Der Transformation wurde nach Protokoll durchgeführt. Die transformierten Bakterien wurden auf Petrischalen mit LB-Agar, welches das geeignete Antibiotikum beinhaltet, ausplattiert und ü.N. in einem Brutschrank (Heraeus T12, Thermo Fischer) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am darauffolgenden Tag konnten einzeln gewachsene Kolonien von den Platten mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze gepickt werden und ü.N. in ca. 5 ml flüssigem LB Medium mit dem geeigneten Antibiotikum kultiviert werden. Diese Kulturen wurden bei 37°C in einem Schüttelinkubator (MaxQ 4000, Thermo Fischer) bei 175 rpm inkubiert.

#### **2.6.15. GLYCERINKULTUREN**

Um die Bakterienkulturen dauerhaft zu lagern, wurden 850 µl der Kultur mit 150 µl Glycerin in einem Cryo-Tube gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingetaucht und gefroren. Anschließend konnten die Tubes in einem -80°C Gefrierschrank gelagert werden.

#### **2.6.16. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS E.COLI**

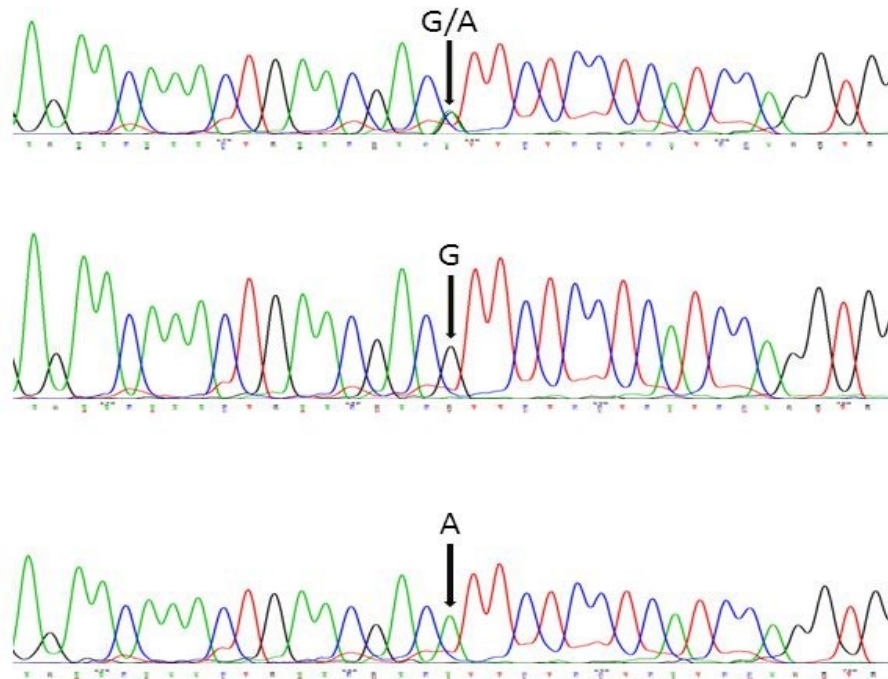
Um die Plasmid DNA aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurden 3- 4 ml der Bakterienkultur (siehe 2.6.14) bei 6800 g für 3 min bei RT abzentrifugiert. Die DNA Isolierung erfolgte mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer.

#### **2.6.17. SEQUENZIERUNG**

Die aufgereinigten PCR Produkte wurden mit einem automatisierten DNA Sequenzierungssystem (Fa. Illumina) von der Firma Starseq (Mainz, Deutschland) sequenziert. Um Ungenauigkeiten auszuschließen erfolgte die Sequenzierung des sense und des antisense Stranges unabhängig voneinander.

Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Software Chromas Lite (Version 2.1.1) analysiert und die Alignments wurden mit der Software Geneious (Version 6.1.7) durchgeführt.

SNPs konnten im Chromatogramm von Chromas Lite erkannt werden, indem an einer Stelle ein Signal für zwei unterschiedliche Basen mit einer halb so großen Intensität vorhanden war (siehe Abb.10).



**Abb. 10: SNP Erkennung am Beispiel von rs351111**

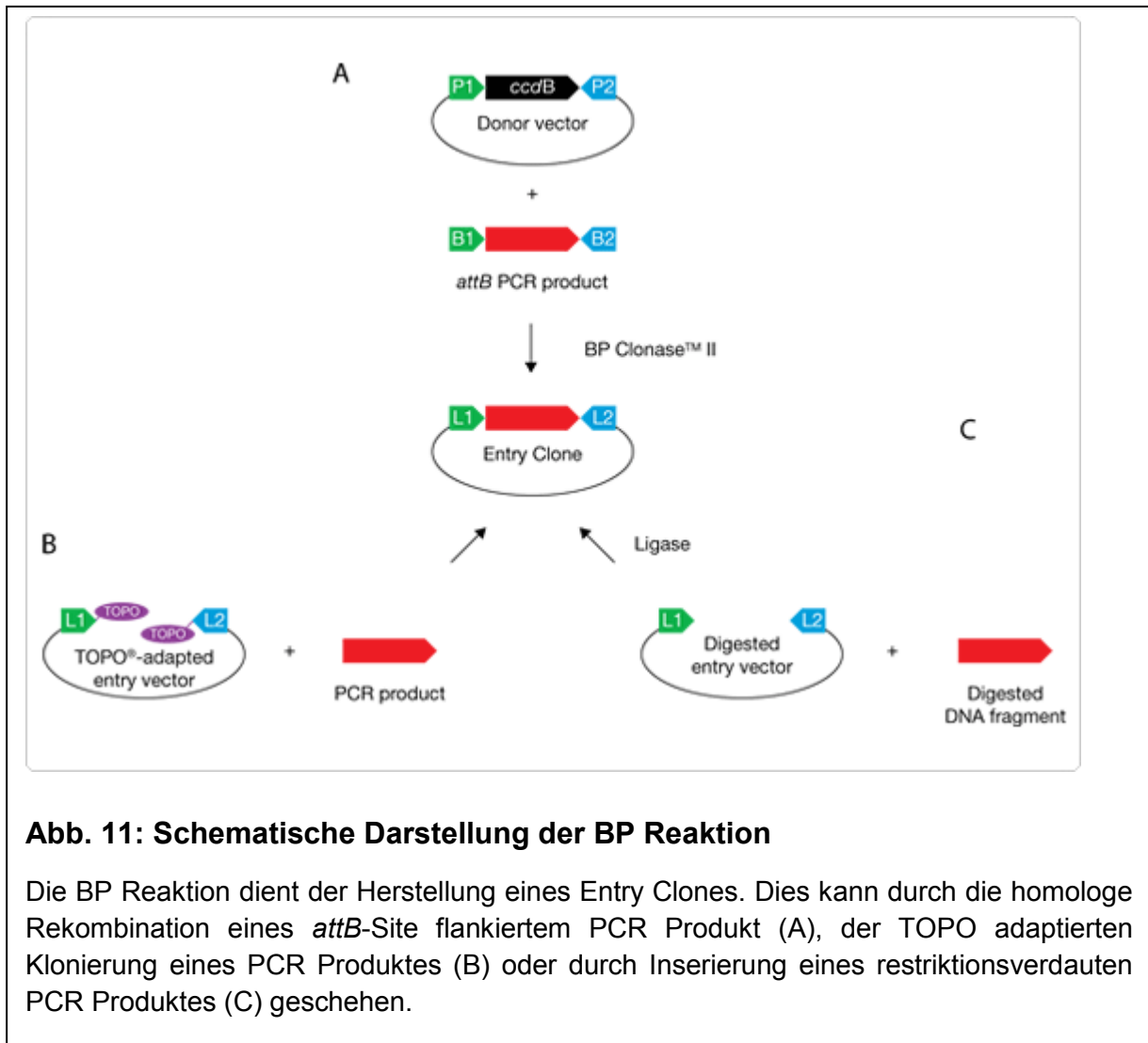
G/A: heterozygot; G: monozygot, major allele; A: monozygot, minor allele. An einer Stelle im Chromatogramm finden sich bei einem Polymorphismus zwei Signale unterschiedlicher Basen mit halb so großer Intensität.

### 2.6.18. GATEWAY KOLONIERUNG

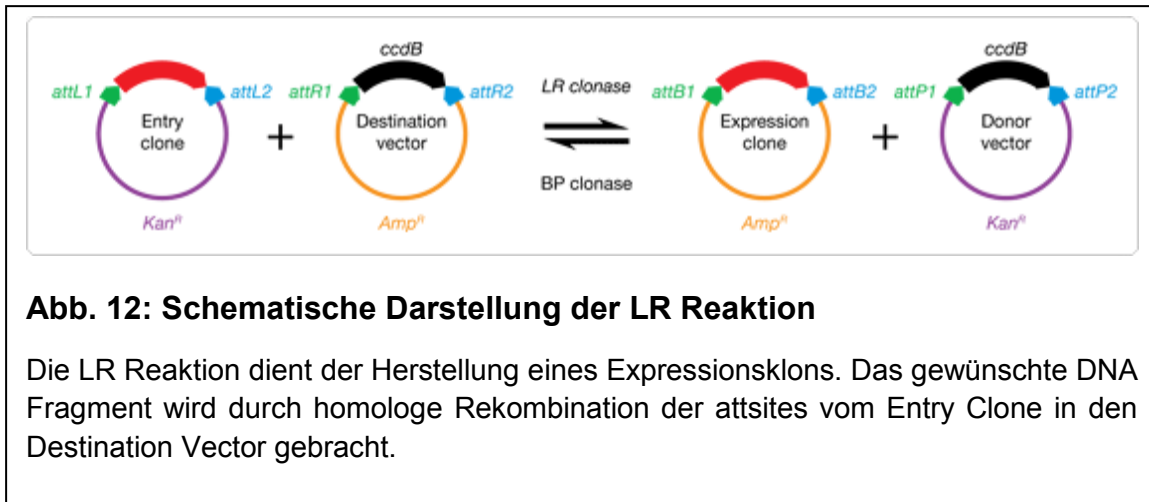
Unter Klonierung versteht man die Insertion eines PCR Produktes in einem Vektor mittels Ligation (siehe 2.6.12), welcher wiederum durch Transformation (siehe 2.6.14) oder Transfektion (2.7.6 und 2.7.7) in einen geeigneten Organismus gebracht wird.

Die Gateway Klonierung ist eine Klonierungsmethode der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und basiert auf dem Expressionssystem der Bakteriophage  $\lambda$  [77]. Dabei findet eine homologe Rekombination zwischen spezifischen Sequenzen, den sogenannten Attachment-sites (*att-sites*) statt und ein mit den *att-sites* flankiertes PCR Produkt kann so in den Vektor eingebaut werden. Es wird gewährleistet, dass dieses Produkt in der richtigen Orientierung und im Leserahmen in den Vektor gelangt [78] und durch das Herausfallen eines lethalen Genes (*ccdB*), wird ebenfalls gewährleistet, dass kein nicht rekombinanter Vektor wachsen kann.

Bei der Gateway Technologie finden zwei aufeinanderfolgende homologe Rekombinationen statt. Die BP-Reaktion entspricht dem lysogenen und die LR Reaktion dem lytischen Zyklus der Bakteriophage. Die notwendigen att-Sites B,P,L und R dienen als Bindestellen für die Reaktionsenzyme. Die BP Reaktion wird von der BP-Clonase II katalysiert und ein Entry Clone wird produziert (Fig. 11).



Bei der LR Reaktion wird von der LR Clonase II katalysiert und das gewünschte DNA Fragment wird in einen geeigneten, abhängig vom gewünschten Zielorganismus und Expressionssystem, Destination Vektor kloniert, um den gewünschten Expressionsklon zu erzeugen (Fig.12). Beide Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.



Für die Klonierung verschiedener PR3 mRNA Konstrukte wurden PCR Produkte mit Hilfe einer klonierten full-length PR3-cDNA (für L, K und Mut), bzw. eine PR3-cDNA mit eingefügter Mutation (für S176A), als Template, hergestellt (PCR Programm und Primer siehe 2.6.6). Sie wurden in den Entry Vektor pENTR™/D-TOPO und anschließend in den Destination Vektor pLenti6.2/V5-DEST (siehe 2.5) kloniert. Die rekombinanten Vektoren konnten nun zur Transduktion (siehe 2.7.7) verwendet werden.

## 2.7.METHODEN DER ZELLKULTUR

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank mit sterilen Glas- bzw. Plastikmaterialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus Inkubator Typ B 5060 EK-CO<sub>2</sub>; Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

Die Zentrifugationen wurden in einer Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge in einem Roundbucket Rotor 75003608 durchgeführt.

Mikroskopische Bildaufnahmen wurden mit dem Fluoreszenz Mikroskop BZ-X700 von Keyence (Osaka, Japan) durchgeführt.

### **2.7.1. BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurde die Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung (siehe 2.3.1) im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Farbstoff kann in lebende Zellen mit einer intakten Membran nicht eindringen, färbt jedoch tote Zellen blau. Es wurden in der Zählkammer vier Großquadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten ausgezählt, wobei tote Zellen nicht berücksichtigt wurden. Die Zellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

$$ZZ = \text{Zellen/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

### **2.7.2. PASSAGIEREN VON ZELLEN**

Um ein dauerhaftes Wachstum von Zellen gewähren zu können, mussten die Zellen passagiert werden, also von einem Gefäß entnommen und in mehrere Gefäße umgesetzt werden. Adherente Zellen wurden mit einer angemessenen Menge Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) für 5-10 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, in ein 15 ml Falcon überführt, mit PBS versetzt und bei 1500 rpm ( $\cong$  500 g) bei RT für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden sie je nach Zelllinie in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:8 auf mehrere Gefäße gesplittet.

### **2.7.3. EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN**

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in Einfriermedium (siehe 2.3.2) bei -70 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfrieren von Zellen:

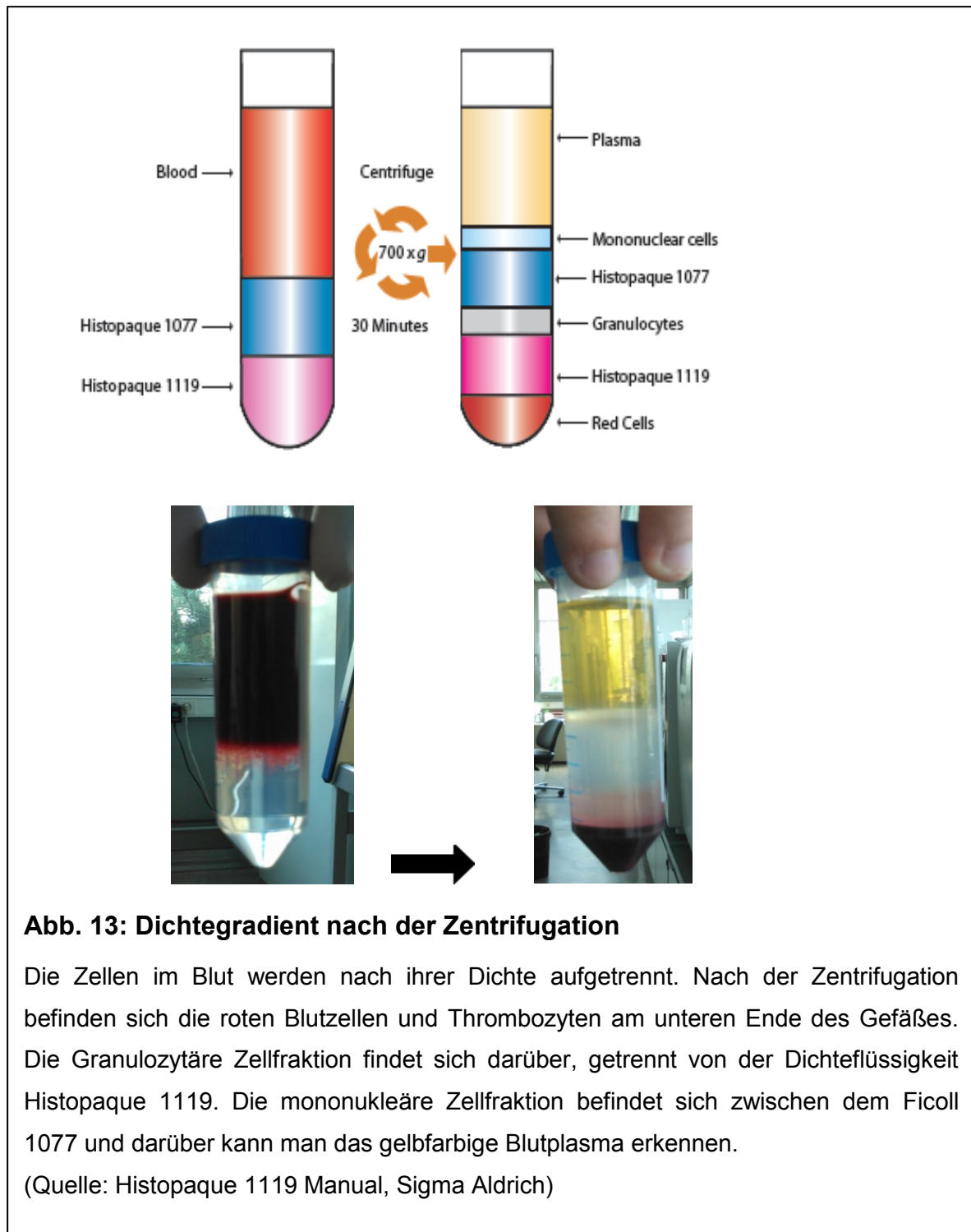
Bei adhärennten Zellen wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden sie mit Trypsin EDTA (1x) für 5-10 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, bis sie von der Zellkulturflasche gelöst waren. Die Zellen wurden dann bei 1500 rpm ( $\cong$  500 g) bei RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in 1,5 ml Cryotubes überführt und anschließend sofort in einen Stickstofflagertank überführt.

#### Auftauen von Zellen:

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das CryoTube schnell wieder angetaut und sofort mit 10 – 15 ml PBS gemischt. Die Zellen wurden dann bei 1500 rpm ( $\cong$  500 g) bei RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im geeigneten Zellmedium (siehe 2.3.2) resuspendiert und in eine geeignete Kulturschale überführt.

#### **2.7.4. ISOLIERUNG VON BLUTZELLFRAKTIONEN**

Ungefähr 15 ml peripheren Blutes wurde von Testpersonen in einem EDTA-antikoagulierendem Röhrchen abgenommen. Anschließend wurden die Blutproben in einem 50 ml Falcon im Verhältnis 1:1 mit PBS (Gibco) gemischt. In einem weiteren 50 ml Falcon wurden 10 ml Histopaque 1119 (Sigma) vorgelegt und vorsichtig Ficoll (Histopaque 1077, Sigma) darüber geschichtet, ohne die Flüssigkeiten zu vermischen. Das Blut-PBS Gemisch wurde dann ebenfalls darüber geschichtet. Das Falcon wurde nun bei 700 g ohne Bremse und bei RT zentrifugiert. Die Zellpopulationen im Blut wurden daraufhin anhand ihrer Dichte aufgetrennt (siehe Abb. 13).



Das oben schwimmende Plasma wurde entfernt und die mononukleäre Zellfraktion (PBMCs) wurde in ein gesondertes Falcon überführt. Anschließend wurden die PBMCs zwei Mal mit PBS gewaschen.

Die knapp über den Erythrozyten schwimmende granulozytäre Zellfraktion wurde ebenfalls in ein gesondertes Falcon überführt, während die Erythrozyten verworfen wurden. Um die Granulozyten Fraktion von eventuell mitgeführten restlichen Erythrozyten zu entfernen, wurden sie mit 10 – 20 ml ACK Puffer für 10 – 30 min bei RT inkubiert, bis die Erythrozyten lysiert waren. Anschließend wurde mit PBS aufgefüllt und bei 2000 g für 10 min zentrifugiert.

#### **2.7.5. ISOLIERUNG HUMANER NIEREN TUBULUS EPITHELZELLEN**

Die frischen Nierenstücke wurden von der Urologie der Universitätsmedizin Mainz bezogen. Nur die Nierenrinde wurde benutzt und überflüssiges Material abgetrennt. Das Nierenstück wurde in einer Petrischale unter sterilen Bedingungen mit Skalpellschere und Pinzette manuell zerkleinert. Anschließend wurde sie mit Collagenase-Medium (15 mg Collagenase in 10 ml HBSS, sterilfiltriert, beides von Sigma) für 1 h bei 37°C in einer O<sub>2</sub>-gesättigten Box inkubiert. Die Nierenstücke wurden dann in einen sterilen 250 µm Sieb überführt und durch den Sieb gedrückt und mit PBS nachgespült. Dieser Vorgang wurde mit einem 150 µm und 75 µm Sieb wiederholt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und bei 1500 rpm ( $\cong$  500 g) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde gelöst. Um eventuelle Erythrozyten zu entfernen, wurden 5 ml ACK Puffer (siehe 2.3.1) zugegeben, bei RT 5 – 10 min inkubiert, anschließend wurde das Falcon mit PBS aufgefüllt und die Zellen bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde h-TEZ Medium (siehe 2.3.2) aufgenommen und in Petrischalen kultiviert. Nach einigen Tagen konnten die Zellen entweder benutzt oder zur späteren Verwendung eingefroren werden (siehe 2.7.3).

### **2.7.6. TRANSIENTE TRANSFEKTION VON ZELLEN**

Für die Transiente Transfektion von Zellen wurde das X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Protokoll benutzt. Pro Well einer 6-Well Platte wurde 2 µg DNA mit 6 µl Transfections Reagent (Reagent:DNA Ratio 3:1) bei einfach zu tranfizierenden Zellen bzw. 8 µl Transfections Reagent (Reagent:DNA Ratio 4:1) bei schwieriger zu tranfizierenden Zellen, wie myeloide Zelllinien, benutzt. Als Serumfreies Medium wurde OPTI MEM (Gibco) benutzt. Die Inkubationszeit des Transfektions Reagent:DNA Komplex war 30 min und die Zellen wurden für mindestens 24 h inkubiert.

### **2.7.7. STABILE TRANSDUKTION VON ZELLEN MIT EINEM LENTIVIRALEN VEKTOR**

Nach der Konstruktion eines lentiviralen Expressionsvektors (siehe 2.6.) wurde die Produktionszelllinie HEK293-FT in Petrischalen in Kultur genommen (siehe 2.3.2) und mit dem Vektor transfiziert. Für die stabile Transfektion von Zellen wurden 9 µg ViraPower Packaging Mix (Roche) mit 3 µg des lentiviralen Expressionsvektors und 36 µl Lipofectamine 2000 (Roche) in 1,5 ml OPTI MEM (Gibco) nach Protokoll benutzt. Nach 48- 72 h wurde der Virushaltige Medium-Überstand entnommen, bei 3000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und durch einen PVDF-HV Filter (0,45 µm, Millex) steril filtriert. Bis zur Verwendung konnte das Virushaltige Medium bei -80°C eingefroren werden. Die Transduktion der h-TEZ (Isolierung siehe 2.7.5) funktionierte nur in Anwesenheit von Polybrene (Roche) und erfolgte in einer Konzentration von 6 µg/ml nach den Herstellerangaben. Die Integration des Lentivirus in das Genom ist zufällig. Nach erfolgreicher Transduction wurde für 10 Tage mit Blasticidin S (Invitrogen) in einer Konzentration von 10 µg/ml selektiert.

### **2.7.8. PROLIFERATIONSTEST**

Proliferation bezeichnet die Neubildung von Zellen durch Zellteilung. Die Messung wurde mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) nach Protokoll an einem Appliskan (Thermo Scientific) durchgeführt. WST-1 ist ein Tetrazolium Salz, welches von zellulären Enzymen in Formazan umgewandelt wird und einen Farbumschlag verursacht. Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto mehr Substrat kann umgewandelt und im Zellüberstand nachgewiesen werden.

### **2.7.9. ZYTOTOXIZITÄTSTEST**

Die Zytotoxizität ist das Gegenteil zur Zellviabilität und zeigt an, wie viele Zellen absterben. Die Messung wurde mit dem ToxiLight™ Bioassay Kit von Lonza (Nottingham, UK) nach Protokoll an einem Appliskan (Thermo Scientific) durchgeführt. Das Kit basiert auf der Biolumineszenzmessung der Adenylatkinase (AK), welche in allen Zellen vorhanden ist. Sterben Zellen ab und die Plasmamembran ist zerstört, wird die AK in das umliegende Medium frei gelassen. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. ADP wird hinzugegeben und von der AK in ATP (und AMP) umgewandelt. Dieses ATP kann dann von der zugegebenen Luciferase zur Lichterzeugung benutzt werden. Diese Biolumineszenz wird daraufhin gemessen.

### **2.7.10. LUCIFERASE REPORTERGENASSAY**

Reporter-gen-Assays dienen der funktionellen Analyse von Promotoren. Durch Transfektion eukaryontischer Zellen mit Reporter-gen-Konstrukten kann man die Genexpression auf der transkriptionellen Ebene untersuchen.

Die Messung wurde mit dem Ready-to-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Assay (Clontech) nach Protokoll durchgeführt. Dieses System nutzt die eine sekretierte Form der *Metridia* Luciferase, sodass die Messung ohne Zelllyse und nur mit dem Zellüberstand durchgeführt werden kann. Die Luciferase ist ein oxidatives Enzym, welches das zugegebene Substrat Luciferin unter Energieverbrauch (in Form von ATP) und der Emission von Licht in Oxyluciferin umwandelt.

Nach der erfolgreichen Transfektion (siehe 2.7.6) des Reportervektors pMetLuc2-Reporter (siehe 2.5), welches den zu untersuchenden Promotor enthält, wird jeweils nach 24, 48 und 72 h etwas Medium zur Messung entnommen. Pro Promotorkonstrukt wird eine vierfache Messung durchgeführt und 50  $\mu$  Zellüberstand werden pro Well benötigt. Als Kontrolle werden die Zellen ohne Vektorkonstrukt, der Reportervektor ohne eingefügten Promotor und der Kontrollvektor pMetLuc2-Control (siehe 2.5) mit einem CMV Promotor genutzt. Die Messung wird in nach Protokoll an einem Appliskan (Thermo Scientific) durchgeführt. Je stärker ein Promotor in der Zelle aktiv ist, desto mehr Luciferase wird produziert und desto größer ist die produzierte und gemessene Lichtmenge.

#### **2.7.11. EX VIVO DIFFERENZIERUNG VON MYELOIDEN ZELLINIEN**

Die ex vivo Differenzierung myeloider Zellen stellt ein Modell für die Myelopoese dar. Die beiden humanen Leukämiezelllinien NB-4 und U937 reifen morphologisch unter Einfluss von all-trans Retinsäure (ATRA) zu Neutrophilen, unter Einfluss von Vitamin D3 differenzieren sich die Zellen in die Makrophagen-Richtung. G-CSF ist ebenfalls bekannt dafür, einen proliferativen Einfluss auf myeloide Zelllinien zu haben.

All-trans retinoic acid (ATRA), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), 1 $\alpha$ ,25Dihydroxy-Vitamin D3(1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten), Granulocyte Colony stimulating factor (G-CSF) von Pepro Tech (Rocky Hill, NJ 08553, Vereinigte Staaten) bezogen.

Die Zellen wurden nach dem Protokoll von Gupta D. et al. (2014) mit 5 $\mu$ M/L ATRA für die neutrophile Differenzierung und mit 100nM 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und 16nM PMA für die Makrophagen Differenzierung für 5 Tage inkubiert [79]. Weiterhin wurde ein Ansatz mit 20 ng/ml G-CSF inkubiert und ein weiterer Ansatz mit einer Kombination aus G-CSF und ATRA.

### **2.7.12. DIFF QUICK FÄRBUNG**

Die Diff-Quick Färbung (Medion Diagnostics, Miami, Vereinigte Staaten) ist eine Schnelfärbemethode, die mit der Giemsa-May Grünwald Färbung vergleichbar ist. Die Fixierlösung enthält Fast Green in Methanol, die erste Färbelösung Eosin Y und die zweite Färbelösung Thiazin-Farbstoff. Die Zellen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **2.8. STUDIENKOHORTE**

Zur Untersuchung der genetischen Prädisposition von GPA, wurden Patienten in der Universitätsmedizin Mainz rekrutiert. Alle Studienteilnehmer waren europäischen Ursprungs. Die klinische Diagnose wurde anhand der Nomenklatur der Chapel Hill Consensus Conference festgelegt [13] und sie wurden alle auf cANCA positiv getestet.

Eine unabhängige Kohorte, ebenfalls europäischen Ursprungs, wurde im Klinikum der Ruhr Universität Bochum rekrutiert.

### **2.9. SOFTWARE**

Die Balkendiagramme der Mittelwerte mit Fehlerindikatoren wurden mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) und mit GraphPad Prism 6.1 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) erstellt.

RNA Faltungsvorhersagen (siehe 3.2) wurden auf dem Webserver der Universität Rochester mit der Software RNAstructure durchgeführt (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/> [80])

Alignements wurden mit Geneious 4.8 und HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>) durchgeführt.

Allel und Genotyp Frequenzen wurden mit dem Hardy-Weinberg Equilibrium berechnet. Um die Signifikanz der Allel- und Genotypfrequenzen zwischen den Gesunden und den GPA Patienten festzustellen, wurde der  $\chi^2$  Test und der exakte Test nach Fischer durchgeführt.

Die Odds Ratio (OR) bezeichnet das Quotenverhältnis und wird mit dem Kreuzprodukt berechnet. Im hier verwendeten medizinischen Sinne wird es benutzt, um den Zusammenhang eines vermuteten Risikofaktors für eine Erkrankung zu beschreiben. Das Quotenverhältnis kann in einer Kreuztabelle berechnet werden und stellt sich folgendermaßen dar:

| Anzahl der Personen ... |                  |                   |
|-------------------------|------------------|-------------------|
|                         | mit Risikofaktor | ohne Risikofaktor |
| erkrankt                | a                | b                 |
| nicht erkrankt          | c                | d                 |

Es gilt dann:  $OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{a*d}{b*c}$

Die OR ist ein Maß dafür, um wie viel größer die Chance der Gruppe mit Risikofaktor ist zu erkranken, verglichen mit der Gruppe ohne Risikofaktor. Die Berechnung wurde mit der „MedCalc statistical software“ vorgenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. EXPRESSION DER PROTEINASE 3 UND DER ALTERNATIVEN PROTEINASE 3

##### 3.1.1. QUALITATIVE EXPRESSION IN HUMANEN TUMOR- UND LEUKÄMIEZELLINIEN

Die Expression der alternativen PR3-mRNA (PRTN3-002) wird mit einer differenzierenden RT-PCR festgestellt (siehe 2.6.7). Hierzu wird RNA aus bestimmten Geweben oder Zelllinien in cDNA umgeschrieben. Durch unterschiedliche Primer können wir zwischen der normalen PR3 und der alternativen PR3 mRNA unterscheiden. Die alternative PR3 hat einen hohen GC-Gehalt, wodurch die Amplifikation erschwert wird. Es ist identisch zum normalen Konstrukt (PRTN3-001), jedoch fehlt ihm das Exon 1 (und somit das Leader Peptid) und hat dafür einen Teil des Intron 1 als Beginn. Ein ATG-Basencodon im Exon 2, welches sich im gleichen Leseraster (Open reading frame, ORF) befindet, würde als Startcodon für ein Protein dienen (Met-42 im ursprünglichen Protein).

In der Maus wird die alternative PR3 im Knochenmark, im embryonalen Gewebe, der rudimentären männlichen Milchdrüse und in MDSCs in der Milz exprimiert [54]. Beim Menschen konnte die alternative PR3 auch im Knochenmark gefunden werden [54]. Ebenso wird sie in Tumorzelllinien und Leukämiezelllinien exprimiert. Um einen genaueren Überblick über die Expression der alternativen PR3 zu bekommen, wurden weitere Zelllinien und Gewebe untersucht (Abb.14).

Hierbei entdeckten wir eine weitere mRNA, PRTN-003. Diese ist identisch zur PRTN3-002, außer, dass das Intron 2 des PRTN3-Gens nicht heraus geschnitten (splicing) wurde. Beide Transkripte stammen also vom gleichen alternativen Promotor ab. Jedoch konnten wir die Expression beider alternativen Transkripte nicht unabhängig voneinander untersuchen und konzentrierten uns auf die ursprünglich gefundene Variante PRTN3-002.

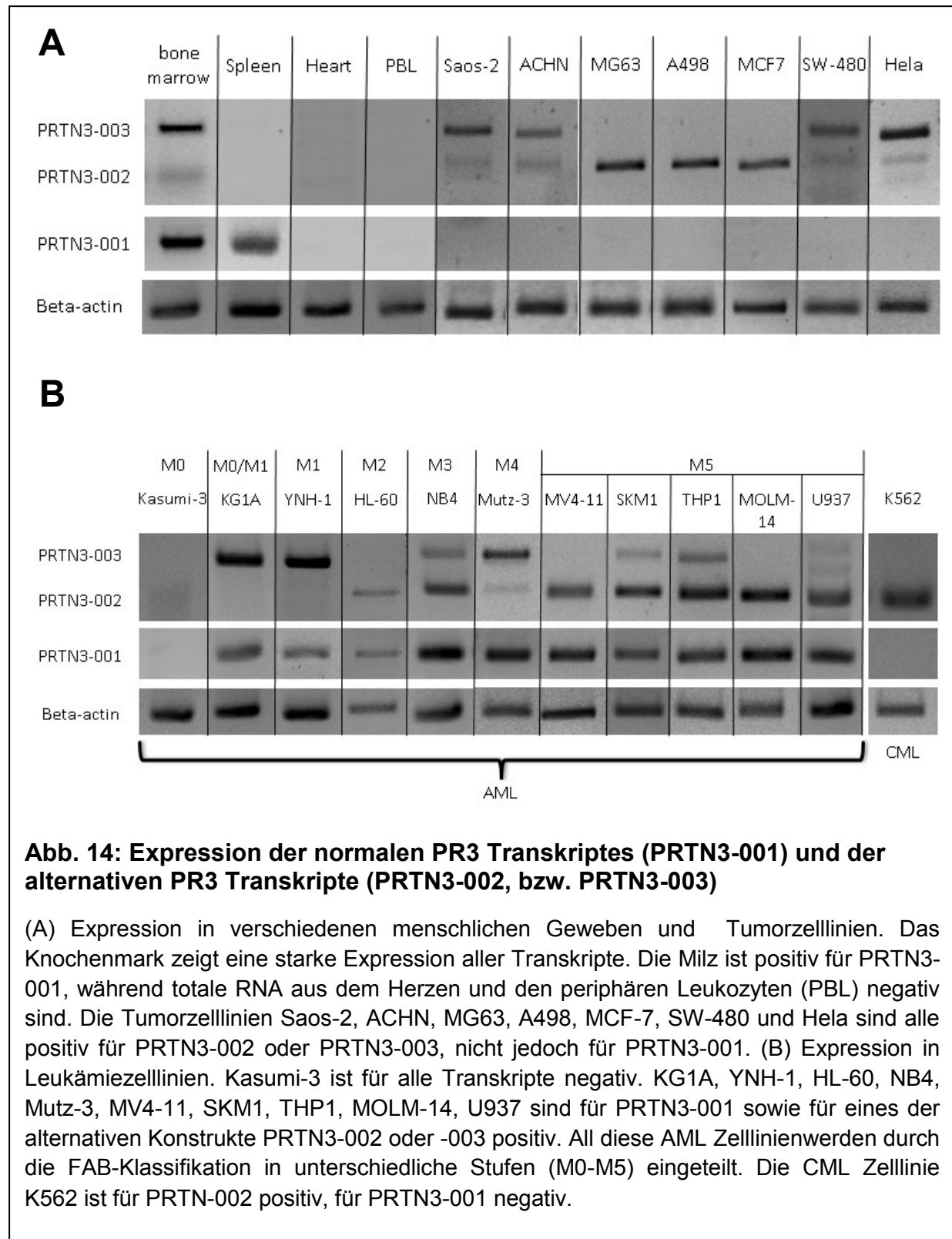
Da das Knochenmark für die PR3 sowie auch die alternative PR3 positiv ist, konnte dies immer als Positivkontrolle genutzt werden. Wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits publiziert, sind in HL-60 Zellen beide Formen exprimiert, in HeLa und MCF-7 Zellen dagegen nur die kurze Form [81, 82]. In der Milz findet man nur die normale Form, da dort alte Blutzellen, also auch die Neutrophilen abgebaut werden.

Dort erwartet man zwar auch menschliche MDSCs, welche analog zur Maus ebenfalls die alternative Form exprimieren könnten, jedoch sind diese beim gesunden Menschen in solch einer geringen Anzahl vorhanden, dass sie nicht detektierbar sind. Tatsächlich wurde ebenfalls versucht, aus menschlichem Blut MDSCs mittels Durchflusszytometrie zu isolieren, jedoch konnte man nur wenige hundert Zellen aus mehreren Milliarden extrahieren und mit diesen geringen Mengen nicht weiterarbeiten (Daten nicht gezeigt).

Totale RNA aus dem menschlichen Herzen war erwartungsgemäß negativ (Abb. 14 A). Totale RNA aus humanen peripheren Leukozyten (PBL) ist PR3 negativ, was daran liegt, dass die PR3-exprimierenden Zellen nur einen geringen Anteil ausmachen, welche nicht für ein positives Signal ausreichen. Nimmt man jedoch nur die Granulozytenfraktion der Zellen (Isolierung siehe 2.7.4), so kann man ein Signal entdecken. Einige Tumorzelllinien, wie MG63 und A498, zeigten analog zu MCF-7 eine Expression der alternativen PR3 PRTN3-002. ACHN, Saos-2 und SW-480 zeigen ähnlich zu HeLa eine Kombination aus PRTN3-002 und PRTN3-003. Alle sind jedoch für PRTN3-001 negativ.

Die verschiedensten Zelllinien einer akuten myeloischen Leukämie (AML) können anhand der sogenannten FAB Klassifikation in verschiedene Stadien eingeteilt werden [83]. Die Subtypen unterscheiden sich in myelodysplastischen Syndromen, wie zum Beispiel der Anteil der Monoblasten, Promyelozyten oder die Granulation der Zellen.

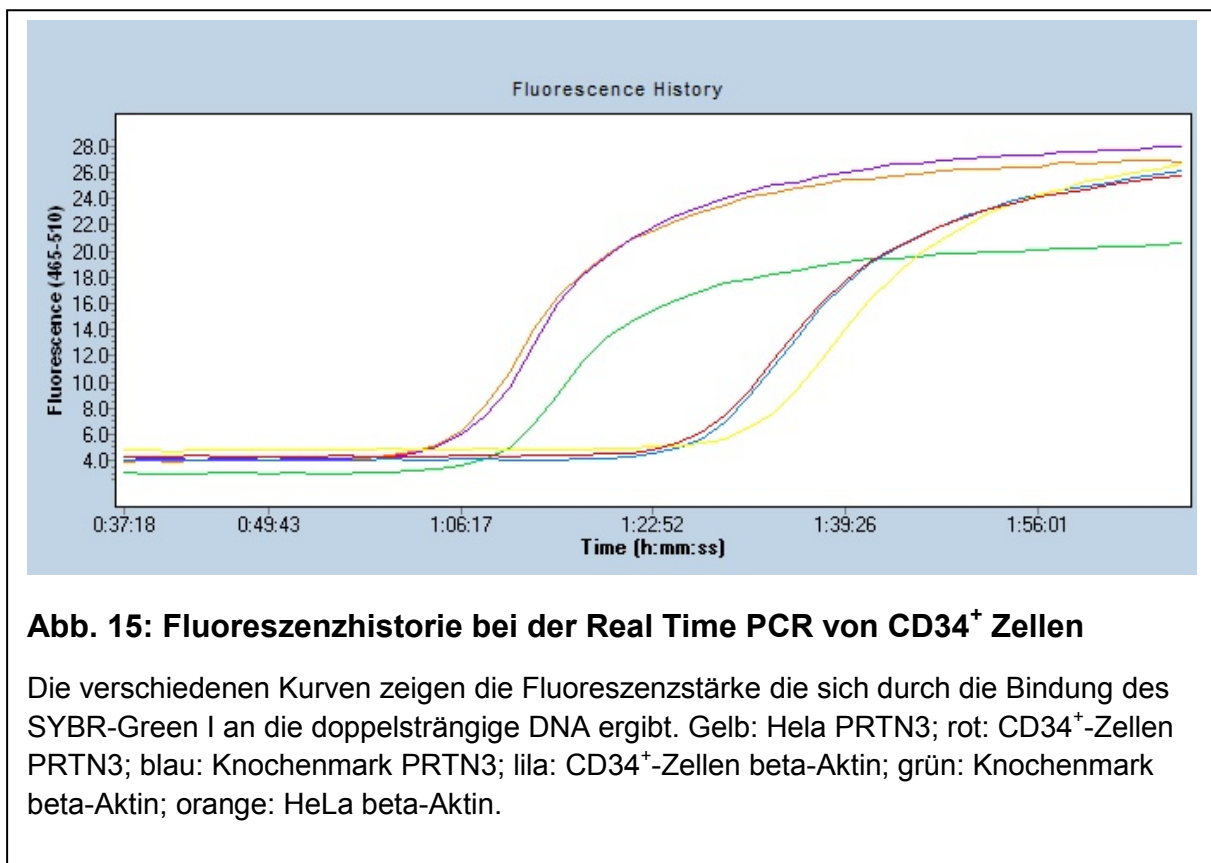
Analog zur Leukamiezelllinie HL60 zeigen andere AML Zelllinien eine Expression der normalen PR3-mRNA sowie mindestens eine Form der alternativen PR3, PRTN3-002 oder PRTN3-003. Dies zeigte sich bei Mutz-3, YNH-1, MOLM-14, THP-1, KG1A, SKM1, K562 und MV4-11 (Abb.17 B), Bei Kasumi-3 jedoch, welche nach der FAB Klassifikation die früheste Stufe der untersuchten Zelllinien hat, zeigte sich keine Expression der normalen PR3. Die chronisch myeloide Leukamiezelllinie (CML) K562 zeigt dagegen eine Expression der PRTN3-002, nicht jedoch der PRTN3-001.



### 3.1.2. QUANTITATIVE EXPRESSION IN CD34-POSITIVEN ZELLEN

Es ist bekannt, dass die PR3 in Primärzellen zur Proliferation führt [12]. Die hohe Expression im Knochenmark lässt die Hypothese zu, dass sie auch dort als Proliferationsmarker fungiert und bei myeloiden Vorläuferzellen zur Differenzierung beiträgt. Das CD34-Antigen ist ein Membranprotein, das von solchen unreifen Vorläuferzellen exprimiert wird. Diese Zellen finden sich zu einem geringen Anteil im Blut, vor allem aber im Knochenmark.

Um die Hypothese zu bestätigen, wurde eine Real-Time PCR (siehe 2.6.8) mit RNA von CD34<sup>+</sup>-Zellen (Miltenyi), also hematopoetischen Vorläuferzellen, durchgeführt (Abb. 15).

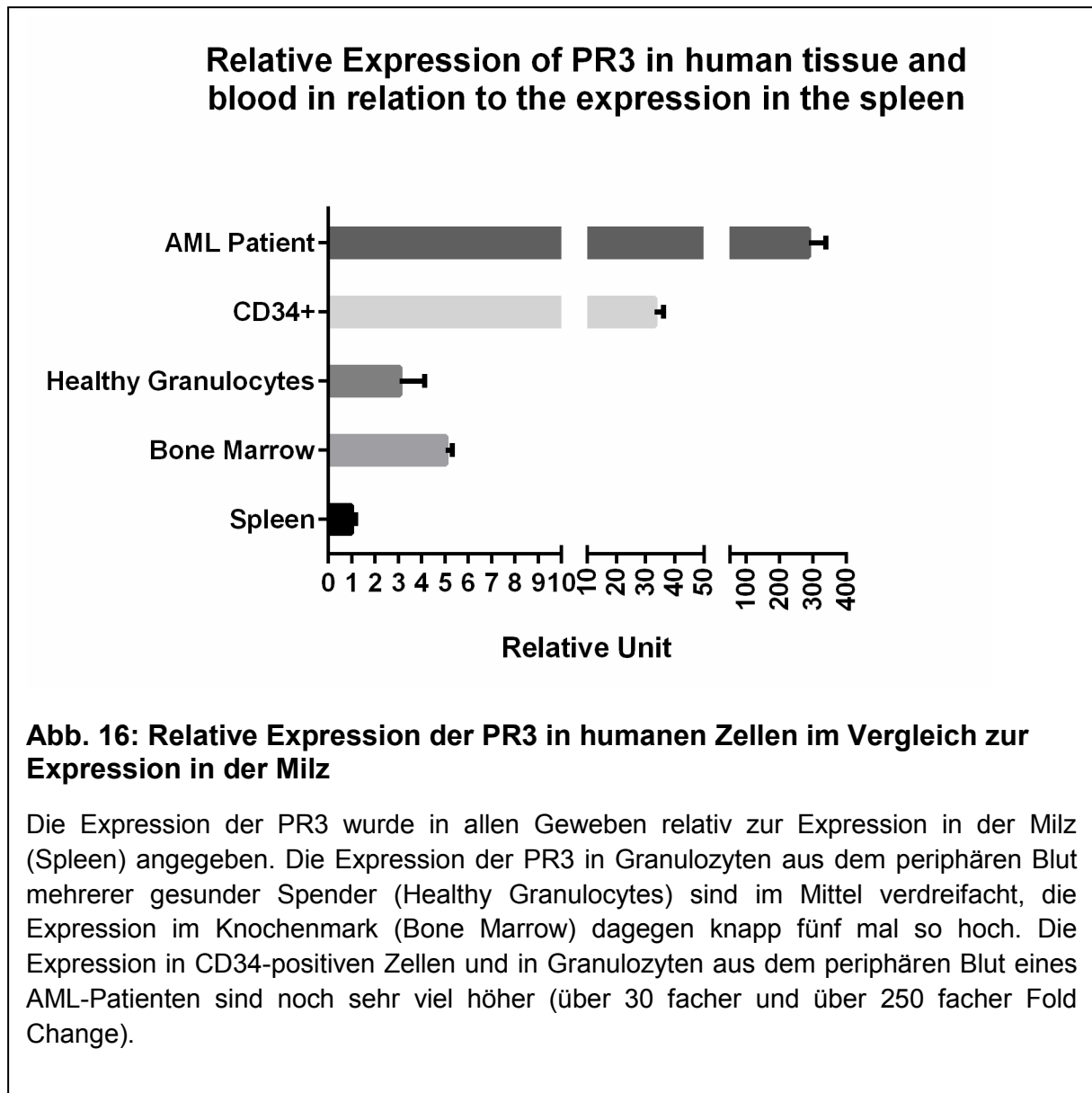


Die PRTN3 Expression wurde mit Hilfe bestimmter Real-Time-Primer (QuantiTect, Qiagen) gemessen. Da die alternativen mRNA Transkripte PRTN3-002 und PRTN3-003 nur mit bestimmten Primern und dem richtigen PCR-Programm erfasst werden können, kann mit Hilfe dieser Primer nur die mRNA gemessen werden, die mit PRTN3-001 identisch ist. Aus statistischen Gründen wurden mindestens 3 Proben gemessen.

Die relative Expressionsstärke wurde ermittelt, indem die PRTN3 Expression mit der des Housekeeping Genes Beta-Aktin normalisiert wurde. Die geringe Expression in der Milz wurde daraufhin als Wert 1 gesetzt und die Expressionsstärke der anderen Proben zu diesem Wert relativiert.

Im Knochenmark (Bone marrow) ist die PR3 Expression deutlich stärker, als die in der Milz (Spleen) oder in den Granulozyten verschiedener gesunder Spender (Healthy granulocytes) (siehe Abb. 16). CD34<sup>+</sup>-Zellen, welche eine Subpopulation der Zellen im Knochenmark darstellen, weisen eine noch viel höhere relative PR3-Expression, was deutlich zeigt, dass das Signal im Knochenmark aus diesen Zellen stammt. Dies bestätigt unsere Hypothese.

Da einige AML Zelllinien eine starke Expression der PR3 aufweisen, wurde auch Patientenmaterial auf ihre PRTN3 Expression hin untersucht. Die relative Expression der PR3 in den peripheren Blutzellen einer AML Patienten, die auch auf PR3-ANCAs positiv getestet wurde, zeigt eine deutlich stärkere Expression als die Granulozyten eines gesunden Spenders. Sie weist sogar die höchste relative Expression auf. Dies beweist, dass die PR3 Expression ein starker Marker für AML ist und als frühe diagnostische Erkennung für diese Krankheit nutzbar ist.



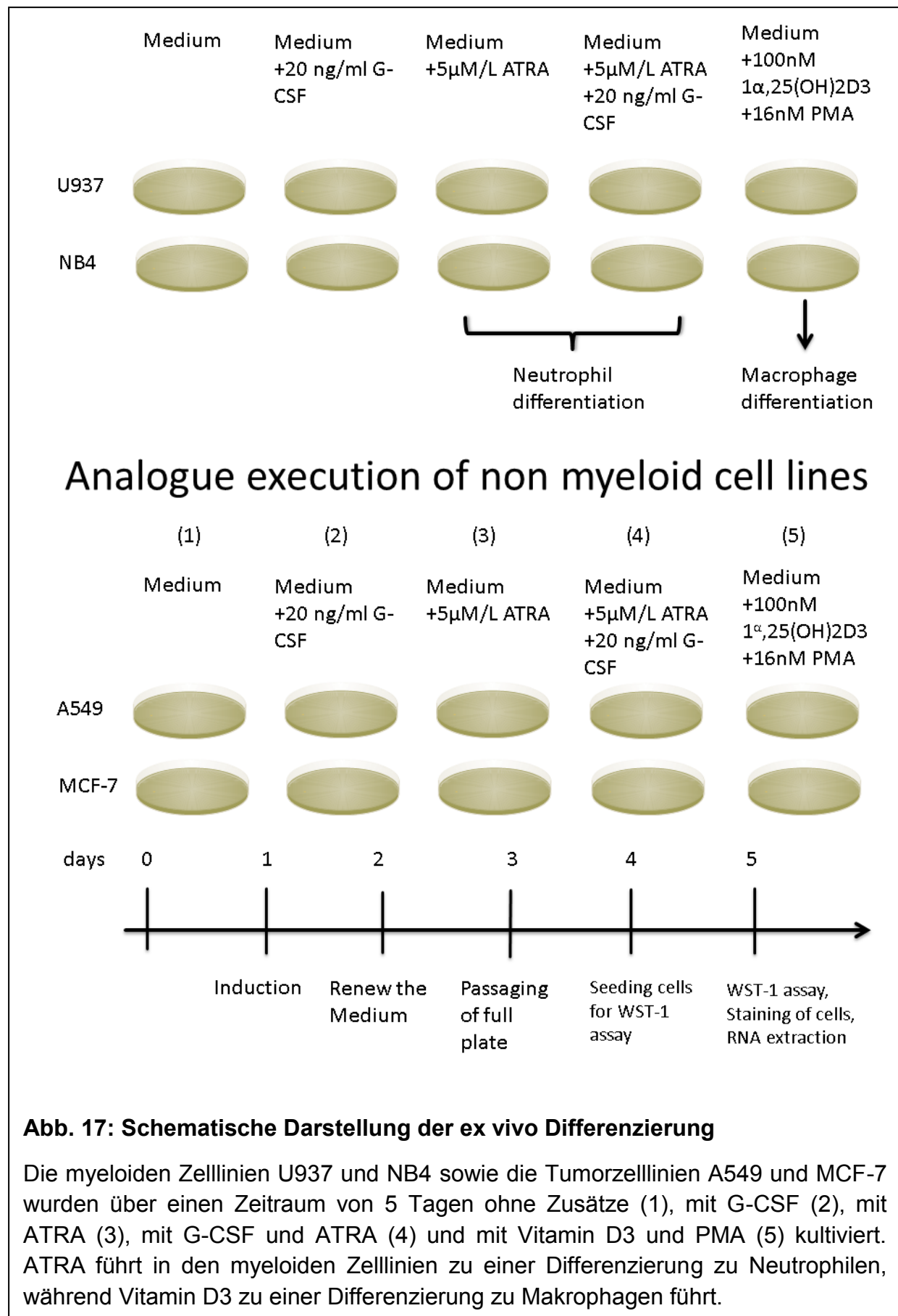
### **3.1.3. QUALITATIVE EXPRESSION BEI DER DIFFERENZIERUNG**

Eine Vielzahl von murinen und humanen myeloiden Zelllinien haben die Fähigkeit zur neutrophil-spezifischen myeloiden Differenzierung und wurden dahingehend etabliert und charakterisiert. Die ex vivo Differenzierung (siehe 2.7.11) myeloider Zellen stellt ein Modell für die Myelopoese dar. Die Myelopoese stellt den Teil der Hämatopoese dar, die ausschließlich im Knochenmark stattfindet. Sie wird von der Lymphopoese abgegrenzt und führt zur Bildung von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten.

Für unseren Versuch nutzen wir die myeloiden Zelllinien NB4 und U937, um sie mit ATRA in eine neutrophile Richtung zu differenzieren und mit Vitamin D3 und PMA in eine Makrophagen Richtung zu differenzieren (Abb. 17). Als Kontrolle nutzen wir die nicht myeloiden Tumorzelllinien A549 und MCF-7. Weiterhin inkubierten wir die Zellen mit G-CSF, welches ein hematopoetischer Wachstumsfaktor ist. Zu guter Letzt untersuchten wir die Wirkung auf die Zellen, wenn G-CSF und ATRA gleichzeitig wirken.

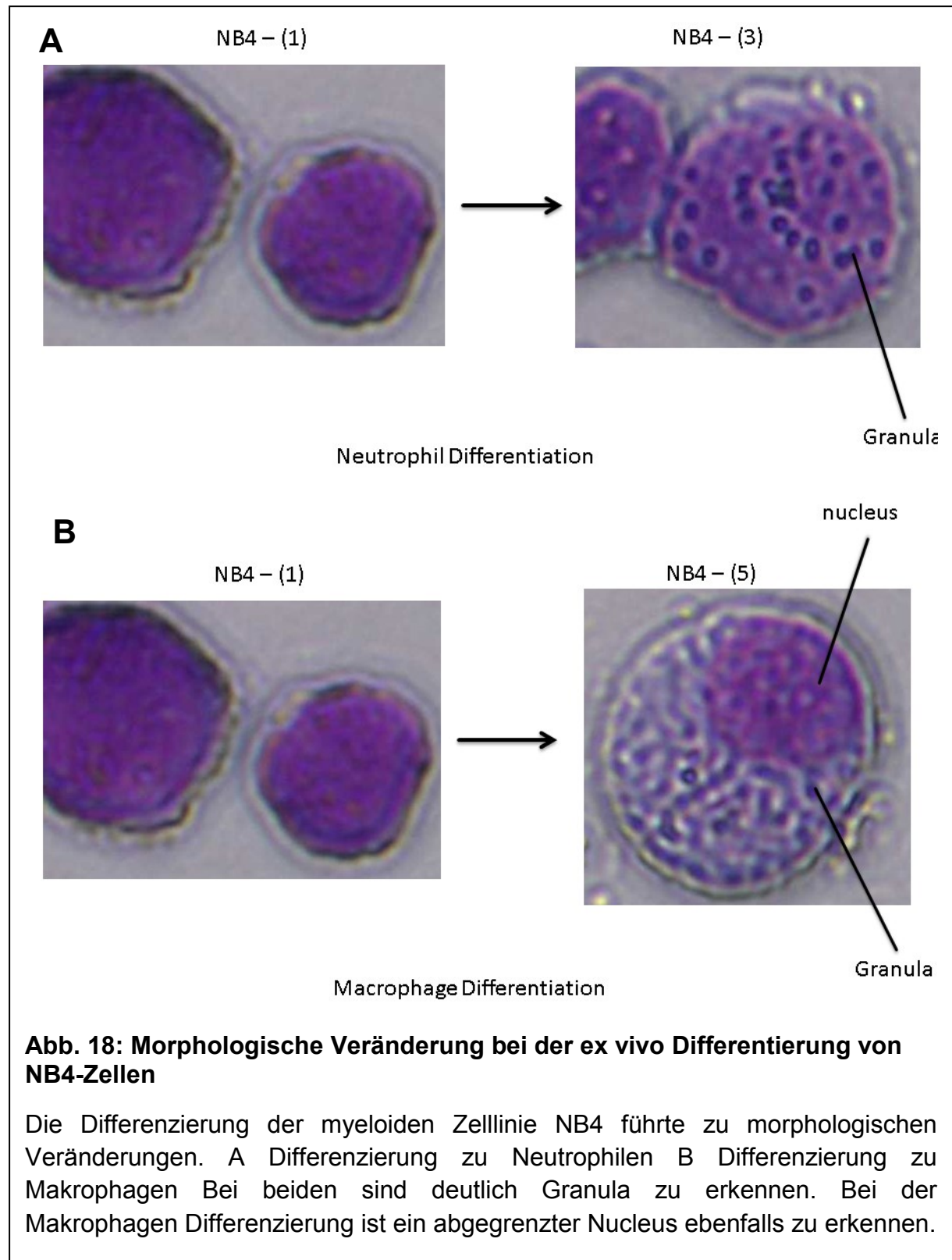
Wir bestätigten die erfolgreiche Differenzierung durch Anfärbung (siehe 2.7.12) morphologisch (Abb. 18). Die Zellen, die mit G-CSF inkubiert wurden, zeigten keine morphologischen Veränderungen und sahen so aus, wie die Zellen, denen man keine Zusätze gab. Gab man ATRA, ATRA in Verbindung mit G-CSF oder Vitamin D3 in Verbindung mit PMA hinzu, so konnte man bei allen Zellen eine Bildung von Granula beobachten. Die Tumorzelllinien A549 und MCF-7 veränderten sich dagegen nicht, ganz gleich, welchen Zusatz sie bekamen.

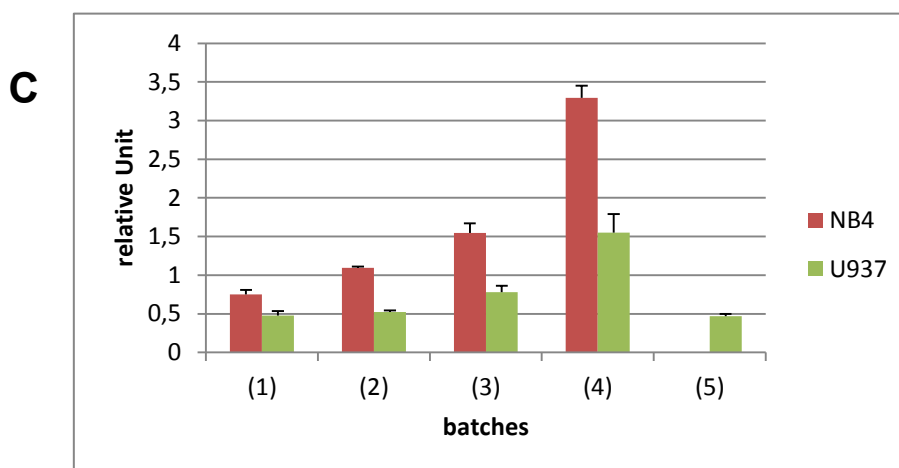
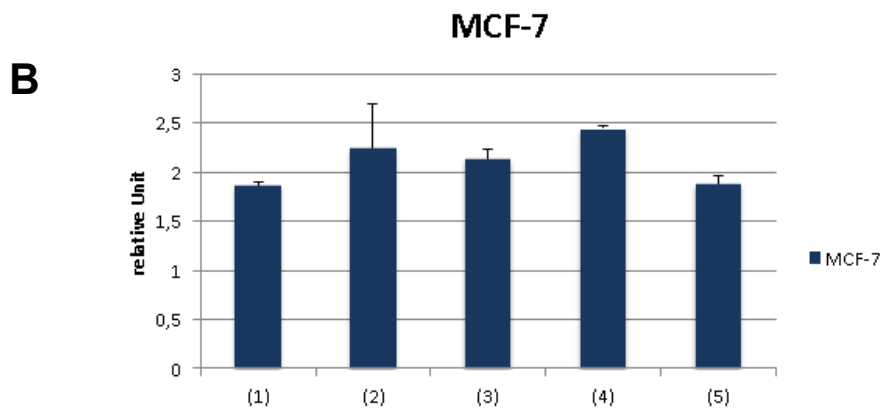
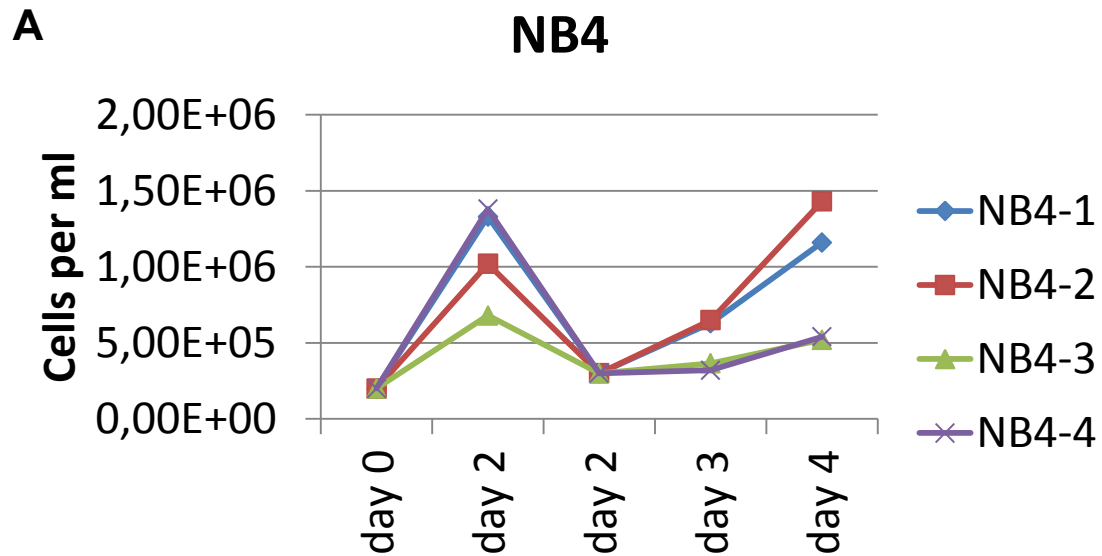
Da die Differenzierung auch dazu führt, dass sich die Zellen nicht mehr teilen und ein Teil der differenzierten Zellen adhärent werden und aus der Suspension verschwinden, konnten wir die Differenzierung auch indirekt durch manuelle Zellzählung (siehe 2.7.1) der in der Suspension verbliebenen Zellen feststellen (Abb. 19 A) sowie mit Hilfe von WST-1 Assays (siehe 2.7.8), der durch die Zellviabilität die Proliferation misst (Abb.19 B,C). Die NB4 und U937 Zellen, die mit G-CSF inkubiert wurden, zeigten bei der manuellen Auszählung eine erhöhte Proliferation, wohingegen ATRA, mit oder ohne G-CSF, und Vitamin D3 zu einer geringeren Proliferation führten.



**Abb. 17: Schematische Darstellung der ex vivo Differenzierung**

Die myeloiden Zelllinien U937 und NB4 sowie die Tumorzelllinien A549 und MCF-7 wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen ohne Zusätze (1), mit G-CSF (2), mit ATRA (3), mit G-CSF und ATRA (4) und mit Vitamin D3 und PMA (5) kultiviert. ATRA führt in den myeloiden Zelllinien zu einer Differenzierung zu Neutrophilen, während Vitamin D3 zu einer Differenzierung zu Makrophagen führt.





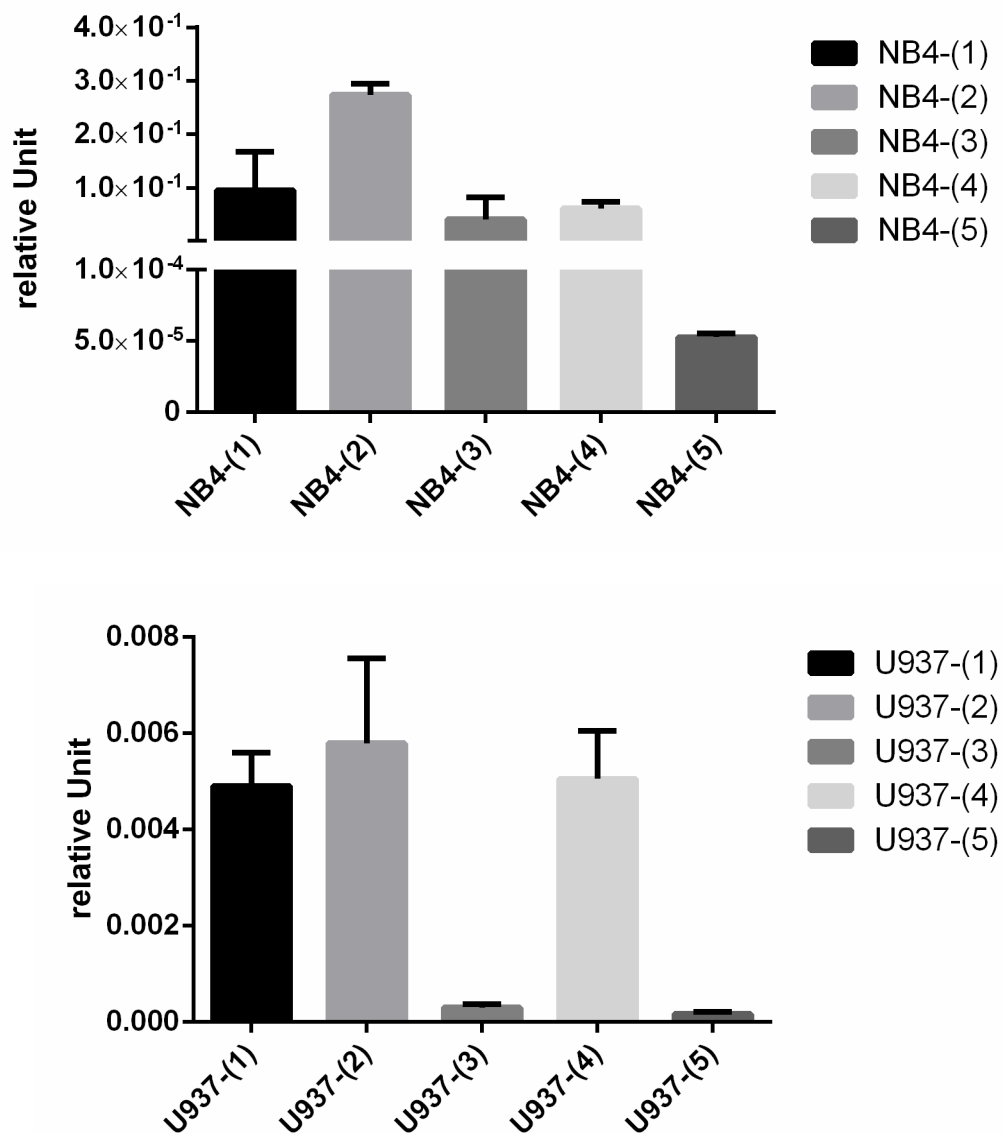
**Abb. 19: Proliferation der Zellen während der Differenzierung**

Die Differenzierung wurde indirekt durch die Proliferation der Zellen bewiesen. **A** Manuelle Auszählung der NB4 Zellen in Suspension. **B** Messung der Zellviabilität in MCF7 Zellen **C** Messung der Zellviabilität in NB4 und U937 Zellen.

Die NB4 Zellen, die mit Vitamin D3 zu Makrophagen differenziert wurden, differenzierten sich nach zwei Tagen schneller als die anderen Ansätze, weshalb es keine Zellen mehr in Suspension zur manuellen Auszählung gab. Der WST1-Assay dagegen misst die Zellviabilität, die auch im differenzierten Zustand hoch sein kann. So führt ATRA in beiden myeloiden Zelllinien zu einer erhöhten Zellviabilität (Abb. 19 B). Die MCF7 und A549 Zellen hatten jeweils keine erhöhte Proliferationsrate oder Zellviabilität (Abb. 19 C). Diese Kontrolle zeigte, dass in diesen nicht myeloiden Zelllinien keine Differenzierung herbeigeführt werden kann.

Nach erfolgreicher Differenzierung wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe 2.6.2) und mittels Real-Time PCR (siehe 2.6.8) die Expression der PR3 untersucht. G-CSF führte zu einem Anstieg der PR3- Expression (Abb. 20). Ansätze mit ATRA und Vitamin D3, deren Zellen differenziert wurden, führten zu einer Verminderung der PR3- Expression. Der Ansatz mit ATRA und G-CSF erzeugte eine intermediäre PR3-Expression, die zwischen der der Einzelansätze lag.

Da die Zelllinien A549 und MCF7 für PRTN3-001 negativ sind (siehe 3.1.1) zeigte sich auch hier keine PR3 Expression (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 20: Expression der PR3 bei der induzierten Differenzierung von NB4 und U937.**

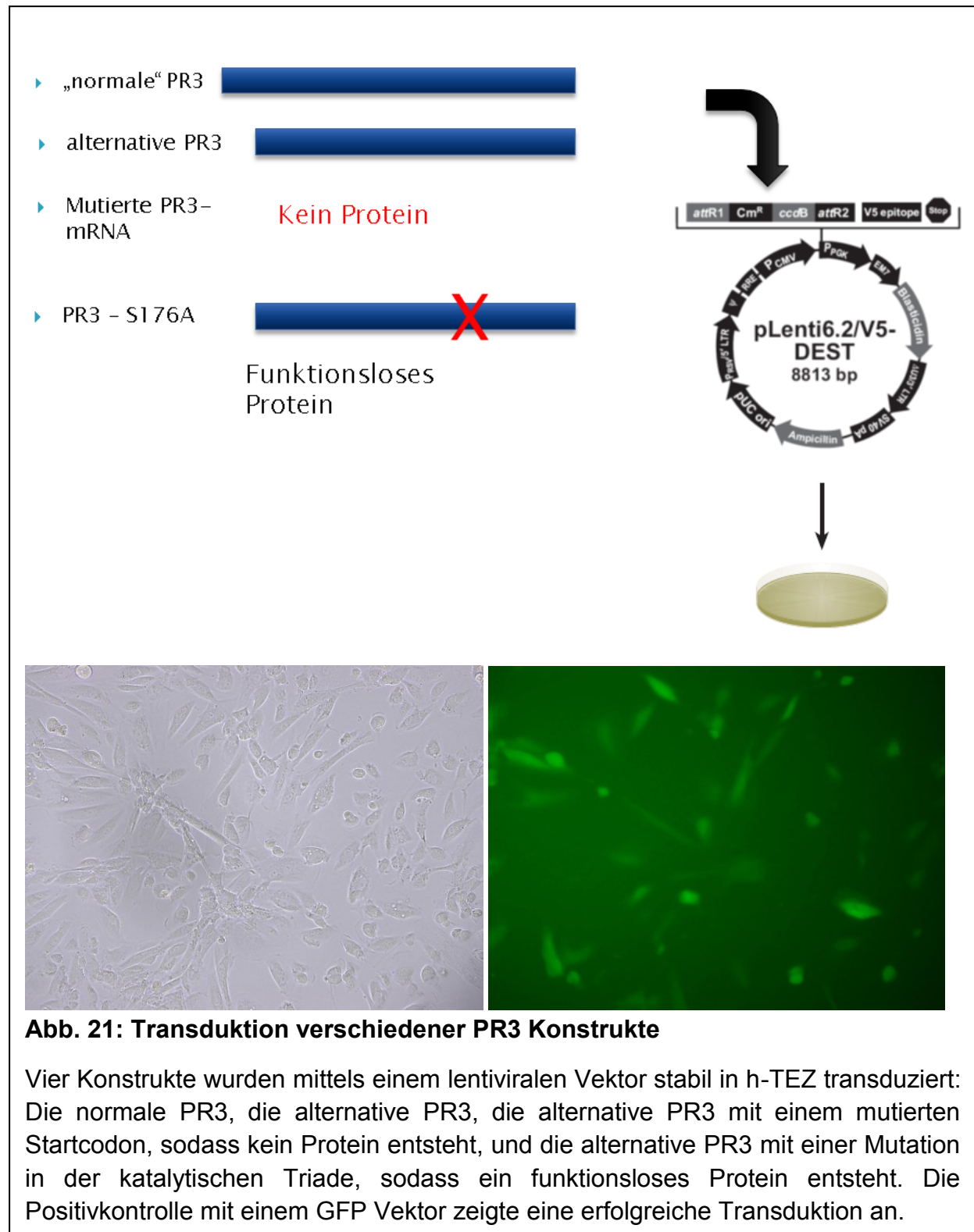
Die Expression der PR3 wurde bei allen Ansätzen der Zellen NB4 und U937 untersucht. G-CSF führte zu einem Anstieg der PR3- Expression. Die Ansätze mit ATRA und Vitamin D3, deren Zellen differenziert wurden, führten zu einer Verminderung der PR3- Expression.

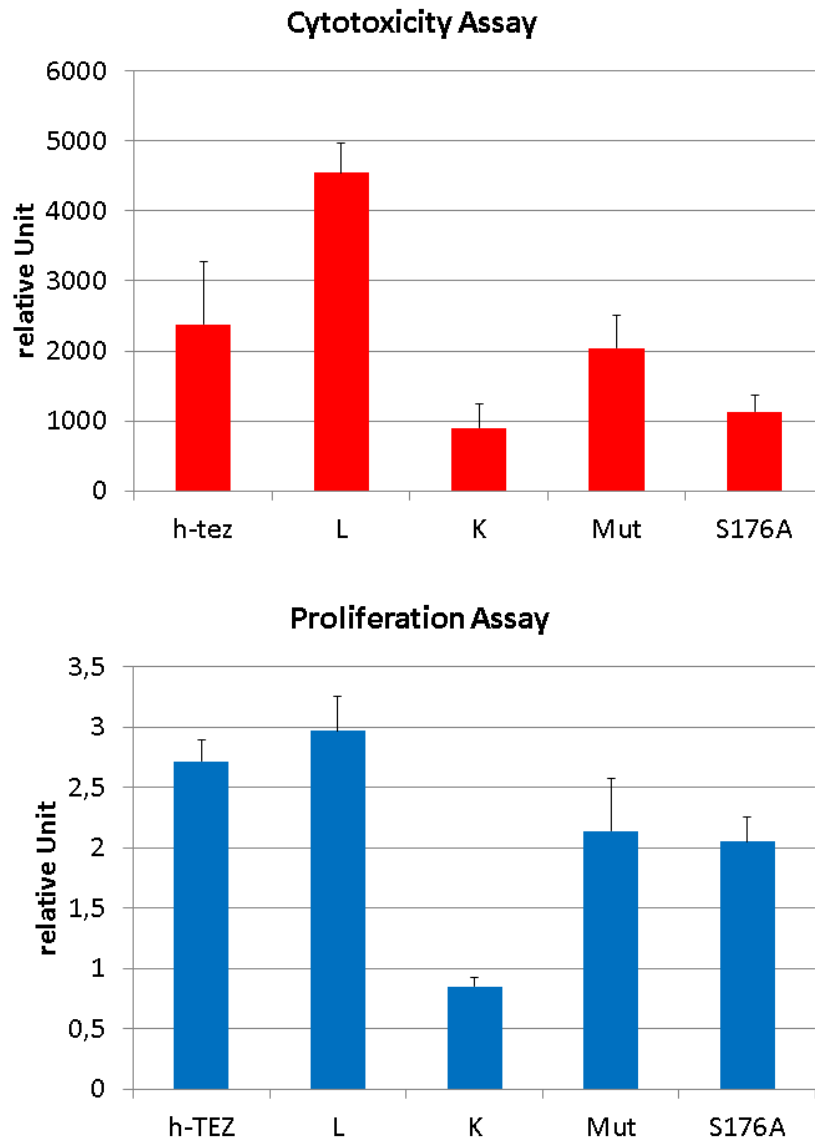
### **3.2. WIRKUNG DER NORMALEN UND DER ALTERNATIVEN PR3**

Um die Funktion der alternativen PR3 mRNA, PRTN3-002 oder auch als kurze Form bezeichnet (K), zu klären, transduzierten wir sie in humane Tubulus-Epithelzellen (h-TEZ), Primärzellen aus der Niere (siehe 2.7.7). Um die Ebene der Funktion zu klären, wurden ebenfalls zwei weitere Formen der alternativen mRNA transduziert. Eine Form hatte beide in frame ATG Startcodons zu ATC mutiert, sodass kein Protein entstehen würde und eine noncoding RNA entsteht (Mut). Die zweite Form besaß ein mutiertes Codon im katalytischen Zentrum, sodass ein mögliches Protein zwar entstehen würde, es aber funktionsunfähig wäre (S176A) (Abb. 21). Als Positivkontrolle diente der Vektor pLenti6.2/EmGFP (siehe 2.5). Die erfolgreiche Transduktion konnte durch die Fluoreszenz bestätigt werden.

Die Transfektion mit der normalen Form der PR3, PRTN3-001 oder als lange Form (L) bezeichnet, führt bei diesen Zellen zu erhöhter Proliferation, aber auch zu einer Erhöhung der Cytotoxizität. Dies war bereits aus vorherigen Arbeiten bekannt [12]. Es stellt sich heraus, dass die alternative Form das Gegenteil bewirkt. Die Zellen arretieren und teilen sich nicht weiter. Jedoch blieb ihre Stoffwechselaktivität hoch und die Absterberate ist gering (Abb.22).

Diese Beobachtungen konnten wir bei der mRNA mit dem mutierten StartCodon nicht feststellen, jedoch verhielten sich diese Zellen auch nicht komplett wie untransfizierte Zellen. Die kurze Form mit der Mutation im katalytischen Zentrum verhielt sich ebenfalls nur zum Teil wie die nicht mutierte kurze Form.





**Abb. 22: Proliferations- (blau) und Cytotoxizitätsassay (rot) von h-TEZ transduziert mit verschiedenen h-PR3-mRNA**

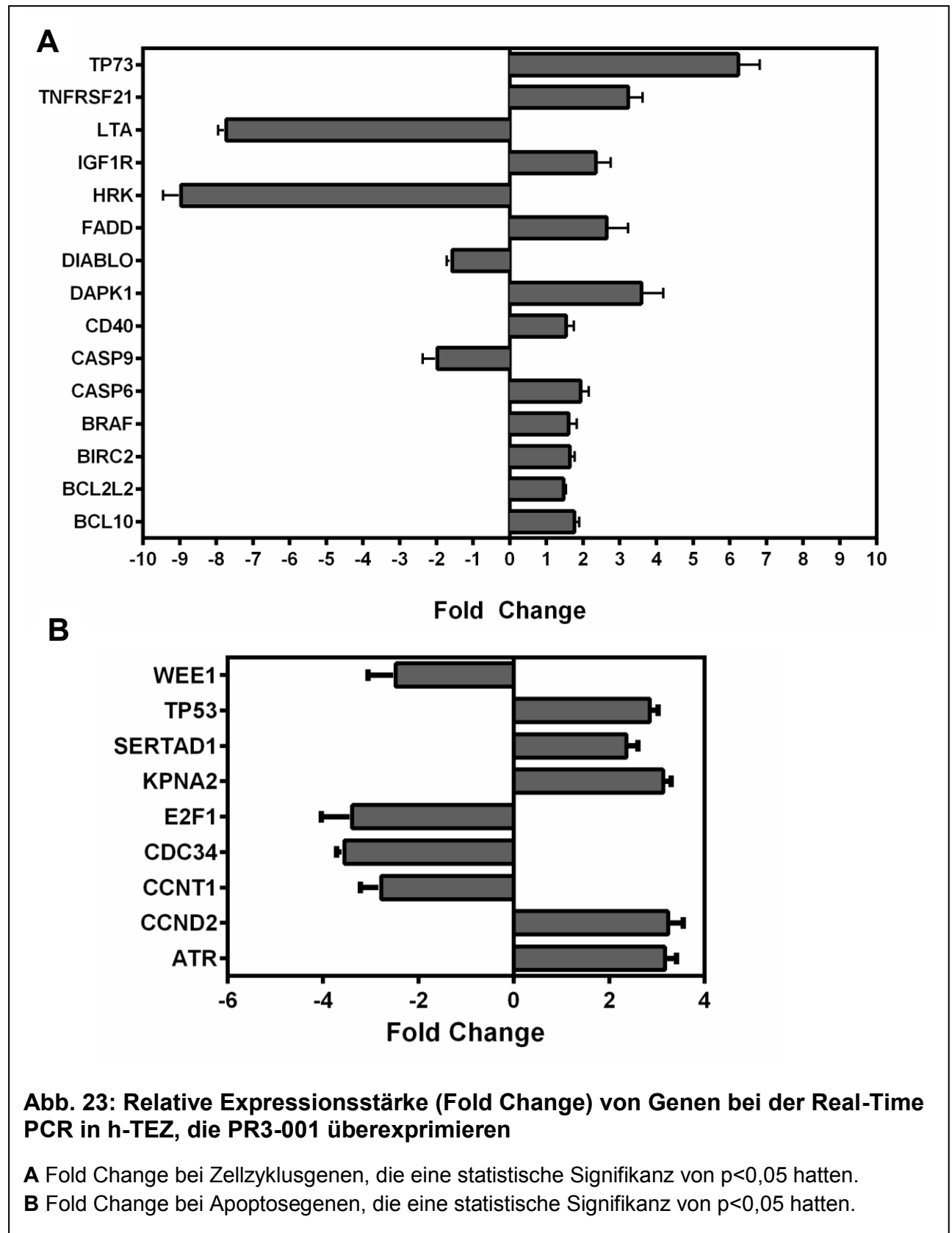
Untransduzierte h-TEZ werden verglichen mit Zellen, die die normale PR3 (L), die kurze, alternative PR3 (K), die kurze Form mit einem mutierten StartCodon (Mut) oder die kurze Form mit einer Mutation im katalytischen Zentrum (S176A) exprimieren.

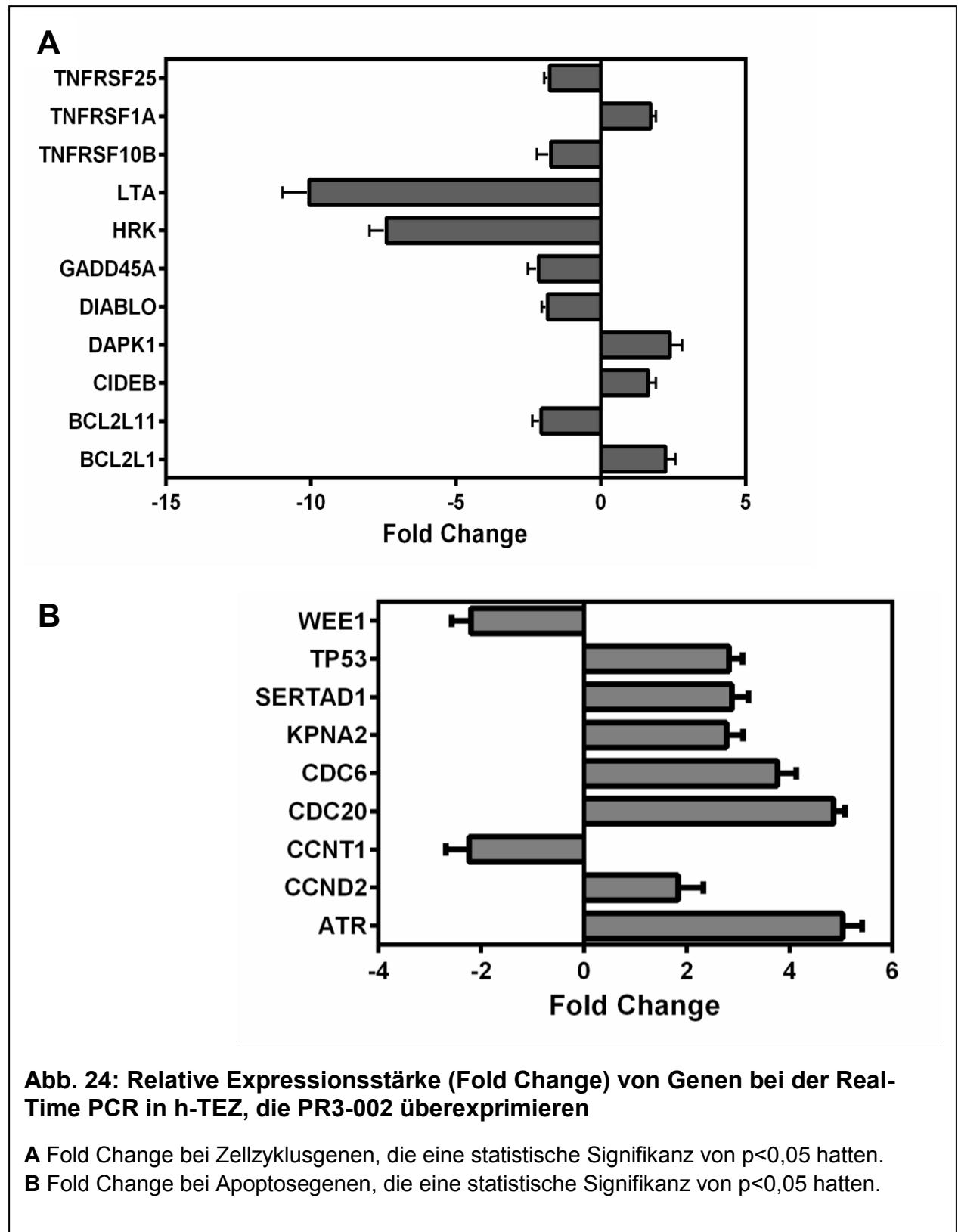
Die verschiedenen PR3-Formen haben eindeutig einen Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose. Dies muss eine Wirkung auf die Expression verschiedener Gene zur Ursache haben. Um dies zu bestätigen, führten wir eine One-Step RT Real-Time PCR mit der RNA aus diesen verschiedenen transduzierten Zellen durch. Wir nutzten den RT-Profiler (Qiagen), um die Expression verschiedener Zellzyklusgene sowie Apoptosegene zu untersuchen.

Die relative Veränderung der Expressionsstärke bestätigt die Ergebnisse aus den Proliferations- und Zytotoxizitätsassays. Die normale PR3 exprimiert Gene, die an der Induktion der Apoptose beteiligt sind, wie TP73 und einige Caspasegene (Abb.23 A), aber auch Gene, wie TP53, welche bei entarteten Zellen oft erhöht ist, oder verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie E2F1 (Abb.23 B).

Die alternative PR3 zeigt eine Herunterregulierung verschiedener in der Apoptose beteiligten Cytokine, wie TNFRSF10B und TNFRSF25 (Abb.24 A) und ebenfalls eine Hochregulierung mehrerer Transkriptionsfaktoren, wie CDC20 (Abb.24 B).

Da die unterschiedlichen Signaltransduktionswege sehr komplex sind, lässt sich durch die einzelnen Genexpressionen keine genaue Aussage treffen. Doch die Ansammlung verschiedener Hoch- und Runterregulierungen zeigt das zu erwartete Bild.





### **3.3.CHARAKTERISIERUNG DES ALTERNATIVEN PROMOTORS**

Alternative Promotoren befinden sich in einer Vielzahl von Genen in den Genomen von Vertebraten. Auch im PRTN3 Gen befindet sich ein alternativer Promotor, der für eine alternative mRNA kodiert [54]. Analog zu der Untersuchung des alternativen Promotors im murinen Prtn3 Gens, sollte auch der humane alternative Promotor charakterisiert werden.

Ein Luciferase Reporter Assay (siehe 2.7.10) wurde durchgeführt, indem verschiedene Teilabschnitte des alternativen Core-Promotors (P1-P4, Abb.25) in die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII der multiple cloning site (MCS) des Vektors pMetLuc2-Reporter (siehe 2.5) kloniert wurden. Als Positiv- Kontrolle wurde der Vektor pMetLuc2-Control mit einem starken CMV-Promotor genutzt. HeLa Zellen, welche PR3-K positiv sind, dienten als die geeignete Zelllinie für den Versuch.

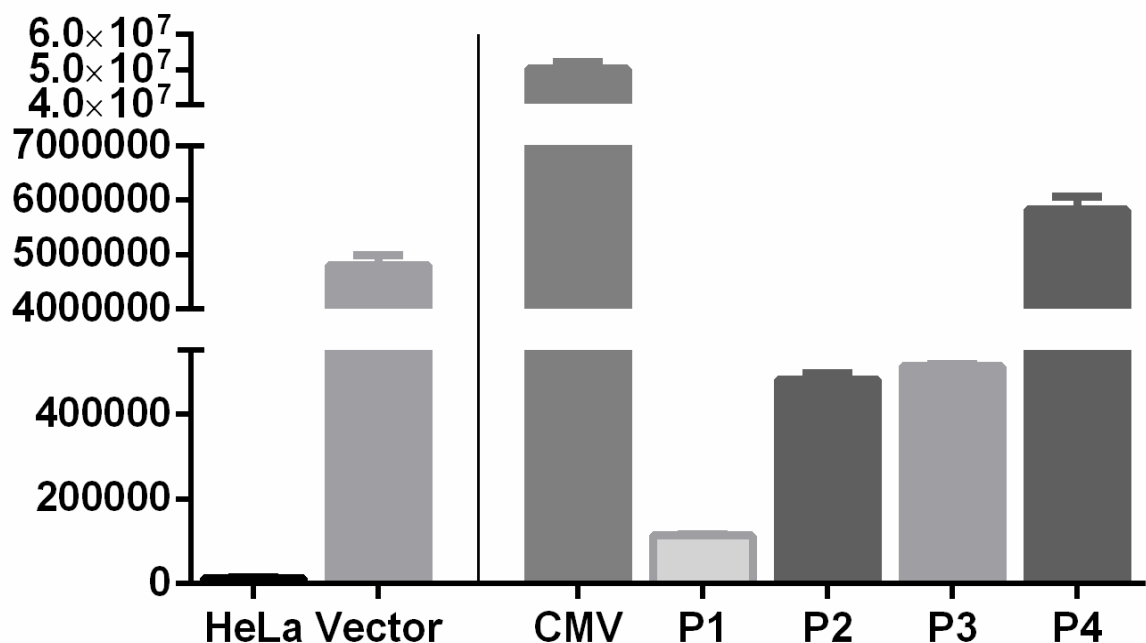
Während das Ende des Promotorkonstruktes immer gleich blieb und am Startcodon endet, begann das größte Konstrukt (P1) noch am Ende der Alu-Repeats, welche sich im Intron 1 befinden. Das zweite Konstrukt (P2) beinhaltete den SNP rs67520578, aber grenzte nur noch an den Alu-Repeats an. Das dritte Konstrukt (P3) schloss bereits die TATA-Box aus und das Kleinste (P4) sogar den Transkriptionsstart (TSS). Die Ergebnisse zeigten jedoch nicht das erwartete Ergebnis (Abb.25 B). Die Bereiche 1-3 zeigten eine geringere Aktivität als der Vektor ohne Promotor. Es war also eine repressive Wirkung zu erkennen. Lediglich der letzte Bereich 4, welcher ungefähr 200 Bp umspannt, zeigte eine leicht höhere Aktivität als der Vektor ohne Promotor.

Daher testeten wir einen noch größeren Bereich um den alternativen Promotor. Der Bereich Intr beinhaltet am 3'-Ende das komplette zweite Exon und das zweite Intron. Mit PromL fügten wir den Bereich am 5'-Ende inklusive den Alu-Repeats hinzu (Abb.26 A). Dies führte ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis (Abb.26 B). Auch in anderen PR3-K positiven Zellen, wie MCF-7, konnten wir die Promotoraktivität nicht finden (Abb.26 C).

## A Core Promotor der alternativen PR3

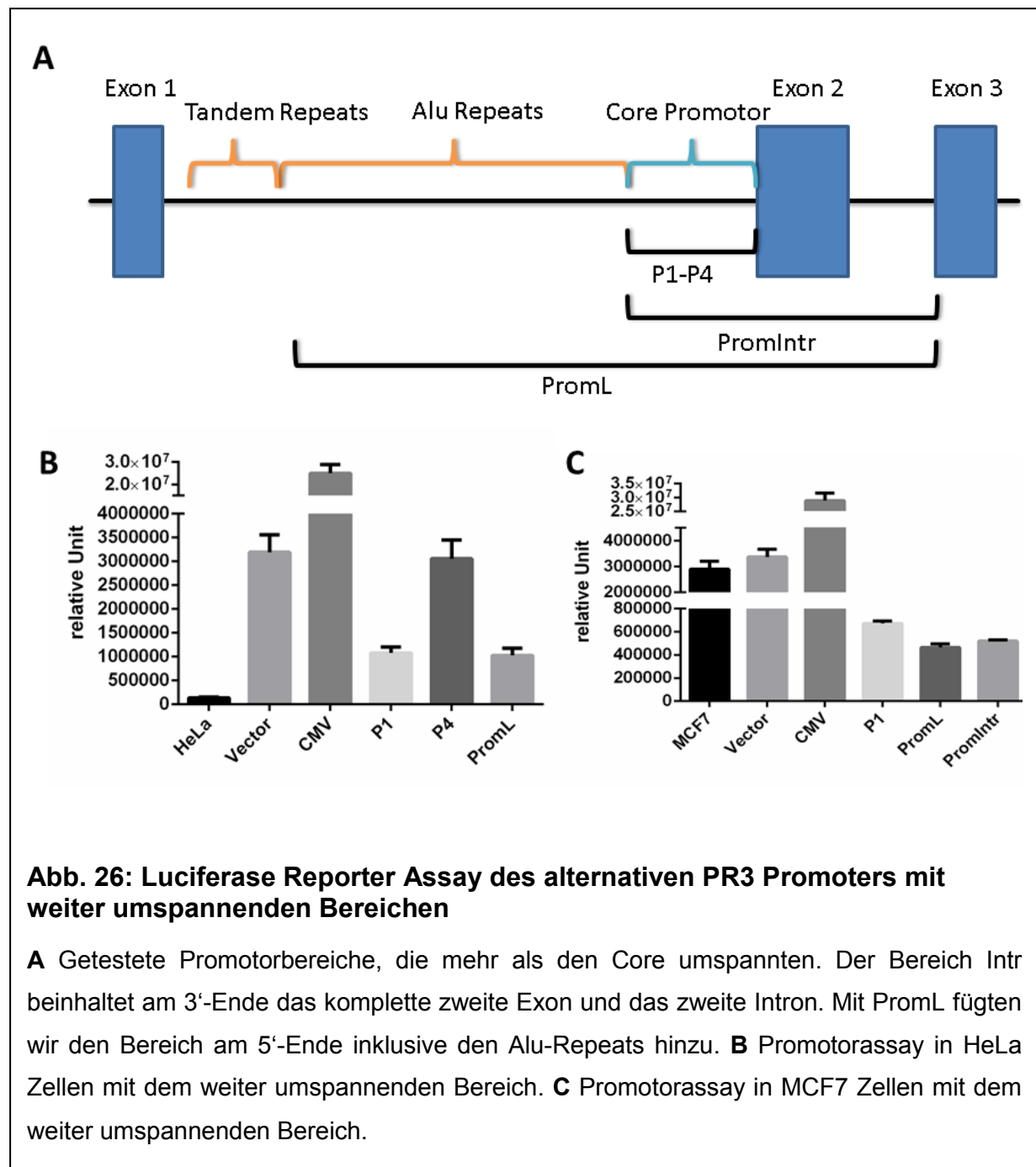


## B



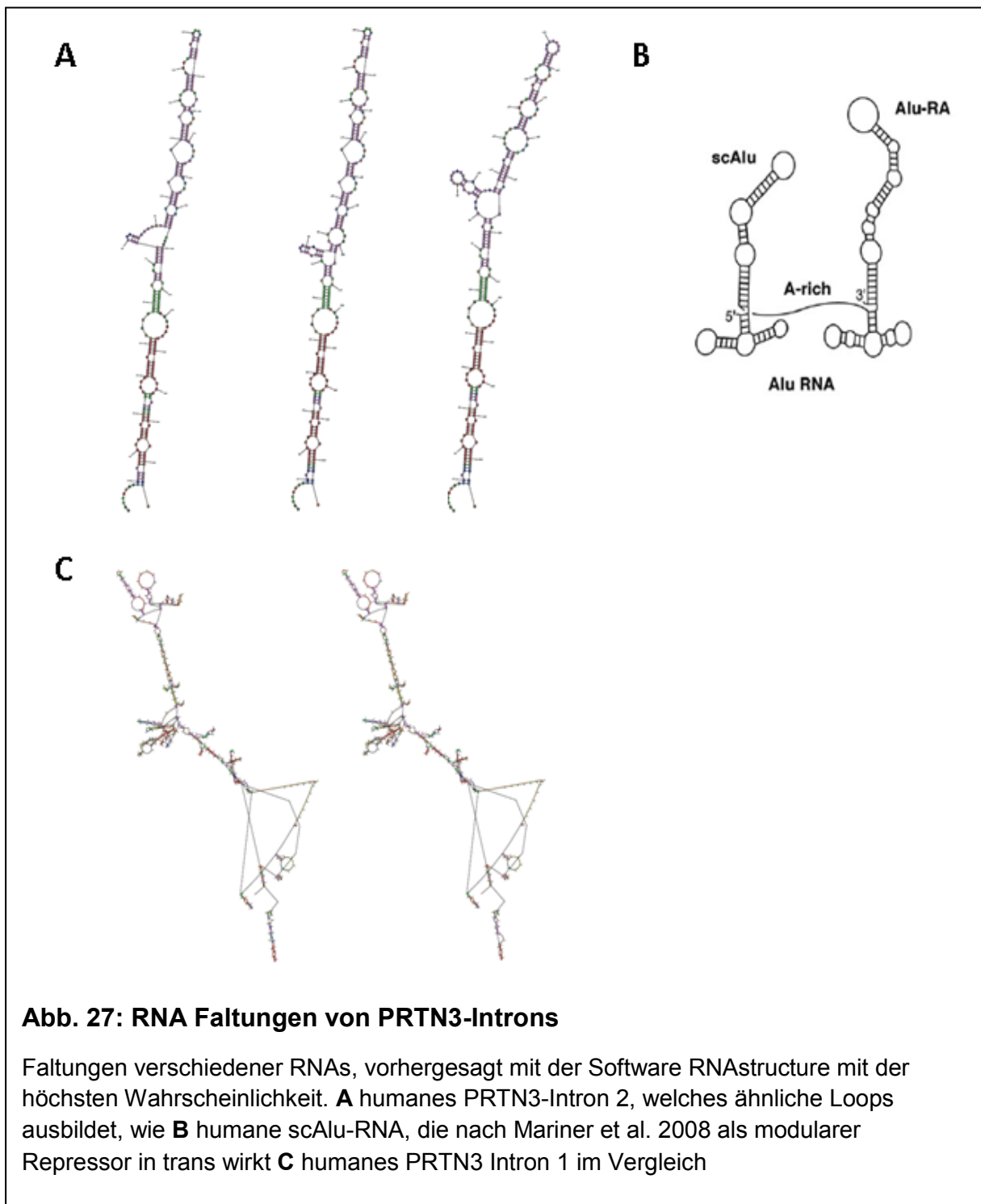
**Abb. 25: Aktivität des alternativen Promotors im Exon1 der PRTN3**

(A) Darstellung des Core Promotors der alternativen PR3. Verschiedene Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind in rot hervorgehoben. Der Beginn der unterschiedlichen Vektorkonstrukte sind eingezeichnet (P1-P4). Das Ende des Promotors blieb gleich (Primer-as). (B) Aktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte P1-P4. Die Bereiche P1-P3 zeigen eine repressive Wirkung. P4 zeigt eine ähnliche Hintergrundaktivität, wie der leere Vektor.



Da das Transkript vorhanden ist und per RACE-PCR gefunden wurde sowie auch per differenzierender RT-PCR auffindbar ist (siehe 3.2), können wir sicher sein, dass sich hier der Promotor befindet. Deshalb betrachteten wir das Intron 2 genauer und stellten fest, dass es das Potential besitzt, sich in einer langgestreckten Form mit kleinen Loops zu falten (Abb.27 A). Dies zeigt Ähnlichkeiten zu anderen funktionellen ncRNA Strukturen auf. Humane Alu Sequenzen können zum Beispiel in trans als modulare Repressoren wirken und haben eine ähnliche Struktur (Abb. 27 B; [84]).

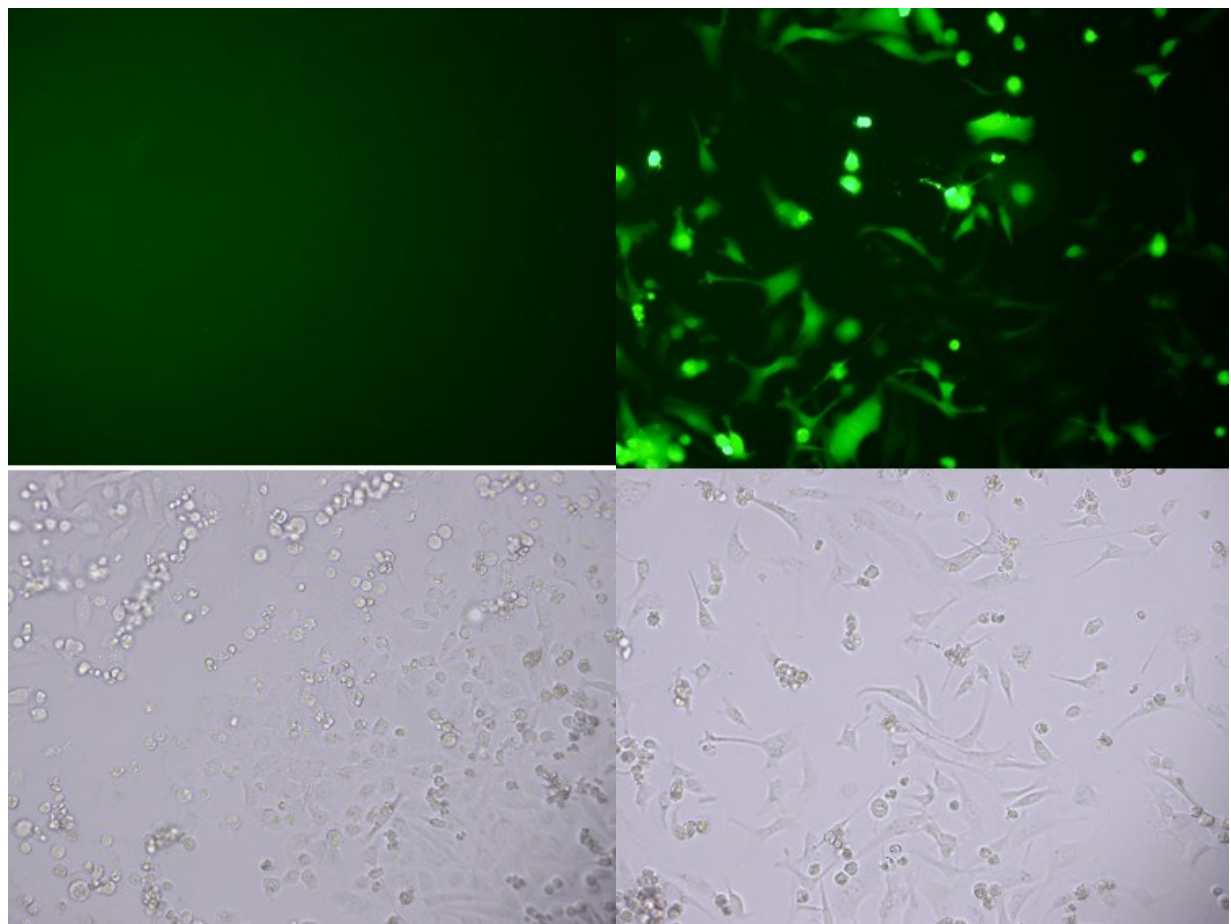
Die Alu Sequenzen im Intron 1 des PRTN3 Gens könnten eine ähnliche Struktur erzeugen, jedoch faltet sich das komplette Intron 1 nicht nach diesem Schema (Abb. 27 C). Auch das murine Intron 2 des Prtn3 Gens zeigt keine solche Faltung, was auch damit zusammenhängen könnte, dass sich hier der alternative Promotor befindet.



### 3.4. TRANSFEKTION DES C-TERMINALEN PR3-PROTEINS

Anhand der PR3-DNA vermuteten wir, dass im C-Terminus der DNA ein Kerntranslokationssignal (NLS= *nuclear localization signal*) vorhanden sein könnte. Um die zu überprüfen, wollten wir einen Klon herstellen, bei dem das fluoreszierende GFP mit einem C-terminal angehängten C-Terminus der PR3 exprimiert wird. Anhand der Fluoreszenzfärbung ließ sich dann herausstellen, an welchen Punkt in der Zelle das Protein gebracht wird.

Das C-terminale Ende bestand anfangs aus 200 Bp und wurde mit einer konventionellen PCR (2.6.6) hergestellt. Anschließend wurde ein noch kürzerer C-terminaler Bereich versucht, der nur aus ca. 60 Bp bestand und mittels Oligo Annealing (2.6.13) hergestellt wurde. Zur Transfektion wurden HeLa Zellen benutzt. Als Positivkontrolle wurde nur der Vektor transfiziert, die untransfizierten Zellen dienten als Negativkontrolle (Abb.28).

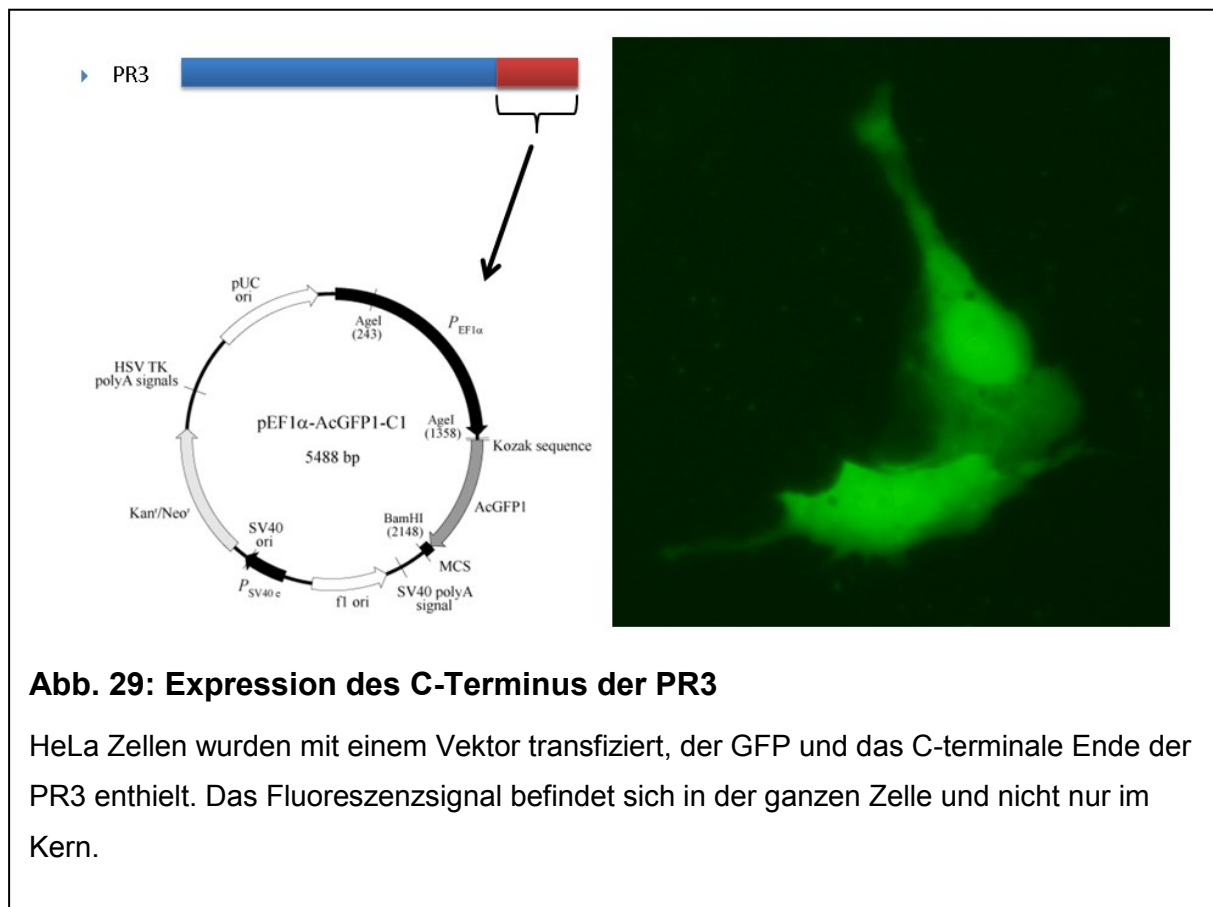


**Abb. 28: Positiv- und Negativkontrolle der Transfektion**

Links: HeLa Zellen untransfiziert geben keine Fluoreszenz ab. Rechts: HeLa Zellen mit dem GFP Vektor transfiziert.

Die Zellen wurden nach erfolgreicher Transfektion über 10 Tage mit G418 (Invitrogen) selektiert.

Das Fluoreszenzsignal des GFPs mit dem C-terminalen Ende der PR3 zeigt deutlich, dass die Expression im ganzen Cytoplasma zu sehen ist und nicht nur im Kern (Abb.29). Über das Cytoplasma hinweg kann man einige granulomatöse Punkte erkennen, welche ein stärkeres Signal zeigen, als der Rest des Cytoplasmas.



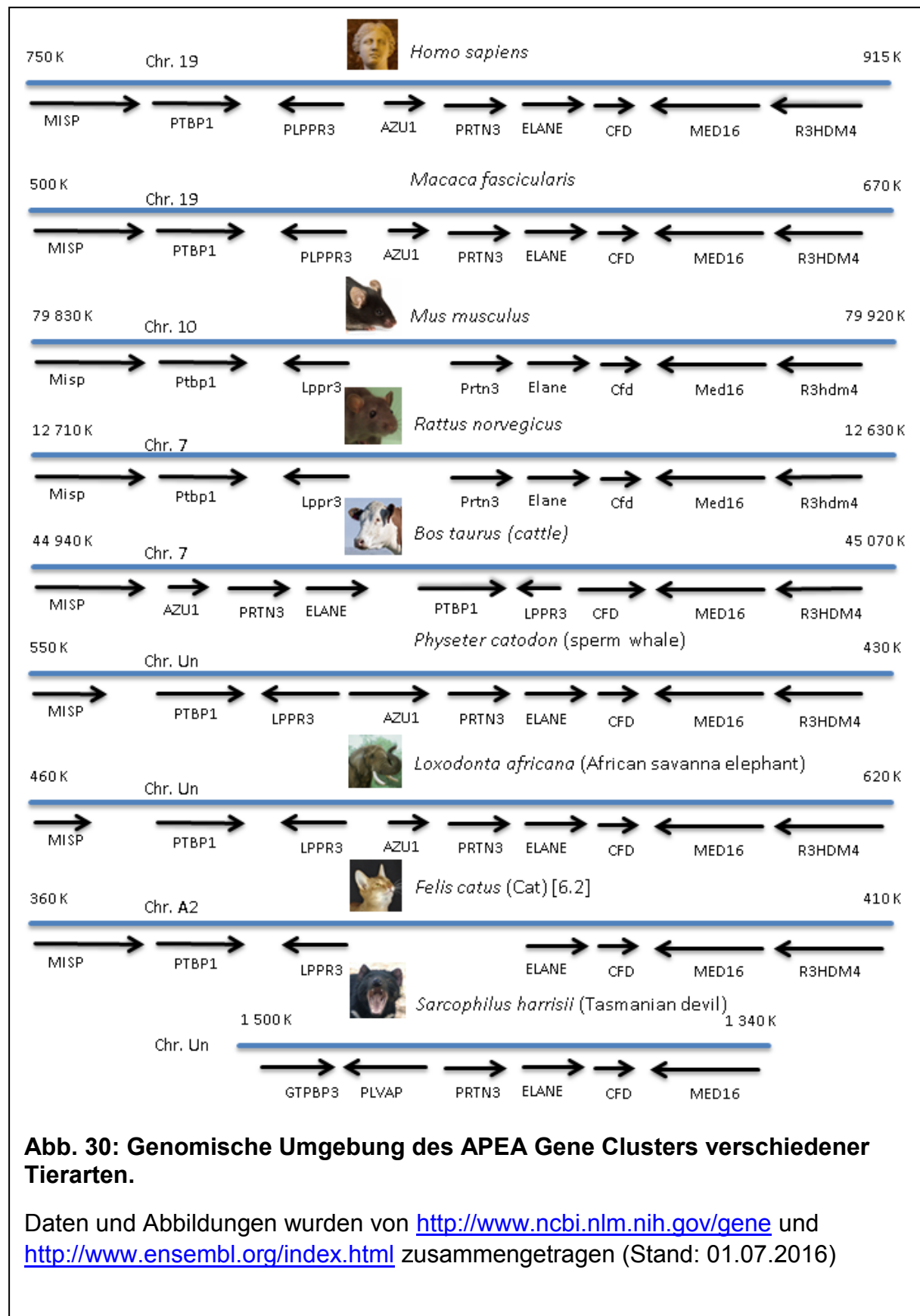
### **3.5. UNTERSUCHUNGEN AM PRTN3- GEN**

#### **3.5.1. COMPARATIVE GENOMICS**

Betrachtet man alle bisher veröffentlichten Genome unterschiedlicher Tierarten fällt auf, dass zwar alle Wirbeltiere ähnliche Gene zu einem der vier Gene im APEA Cluster besitzen, diese jedoch stark abweichen. Die genomische Umgebung grenzt die Verwandtschaft bereits innerhalb der Wirbeltiere ein (siehe 9.2.1), aber auch hier lässt sich kein eindeutiges Muster feststellen. Entlang des Stammbaumes besitzen verschiedene Tierarten eine unterschiedliche Anzahl der Gene aus dem APEA Gencluster sowie auch immer unterschiedliche Gene davon (Abb. 30). Bei den meisten Tieren befindet sich das APEA Gencluster zwischen den Genen MED16 in 5'-Richtung und PTBP1 in 3'-Richtung.

Da ein Muster nicht zu erkennen ist, lässt sich nur schwer bestimmen, ob und wann eine Genduplikation stattgefunden hat und wann ein Genverlust in der Entwicklungsgeschichte vorkam. Dennoch zeigt eine Analyse der Genverwandtschaft ein dem echten Stammbaum ähnliches Bild (siehe 9.2.2 für einen umfassenden Genvergleich).

Die Alignement Scores des PRTN3 Gens (Tabelle 1) zeigen ebenfalls ein klares Bild bezüglich des Stammbaums, beziehen sich jedoch nur auf den kodierenden Bereich. Große Veränderungen bezüglich dieses Genabschnittes, des APEA Genclusters und besonders des PRTN3-Gens haben also nicht nur im kodierenden Bereich stattgefunden, sondern auch innerhalb des nicht kodierenden Bereiches. Dies belegt auch die unterschiedliche Lage des alternativen Promotors bei der Maus und beim Mensch (siehe 1.3) sowie die unterschiedliche Faltungen des Introns (siehe 3.2, Abb. 19). Es ist also wichtig, ebenfalls die Auswirkungen des nicht kodierenden Bereiches in Betracht zu ziehen.



**Abb. 30: Genomische Umgebung des APEA Gene Clusters verschiedener Tierarten.**

Daten und Abbildungen wurden von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> und <http://www.ensembl.org/index.html> zusammengetragen (Stand: 01.07.2016)

| Species          | Symbol          | Identity (%) |      |
|------------------|-----------------|--------------|------|
|                  |                 | Protein      | DNA  |
| H.sapiens        | PRTN3           |              |      |
| vs. M.mulatta    | LOC721131       | 86.5         | 91.3 |
| vs. B.taurus     | PRTN3           | 69.3         | 75.3 |
| vs. M.musculus   | Prtn3           | 68.0         | 73.2 |
| vs. R.norvegicus | Prtn3           | 68.0         | 71.0 |
| vs. X.tropicalis | prtn3           | 52.8         | 55.6 |
| vs. A.gambiae    | AgaP_AGAP006707 | 37.1         | 46.5 |

**Tabelle 1: Pairwise Alignment Scores des humanen PRTN3 Gens mit den Genen anderer Spezies**

Nach Homologene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>)

### **3.5.2. INTRA-GENETISCHE HAPLOTYPEN BEI GPA PATIENTEN**

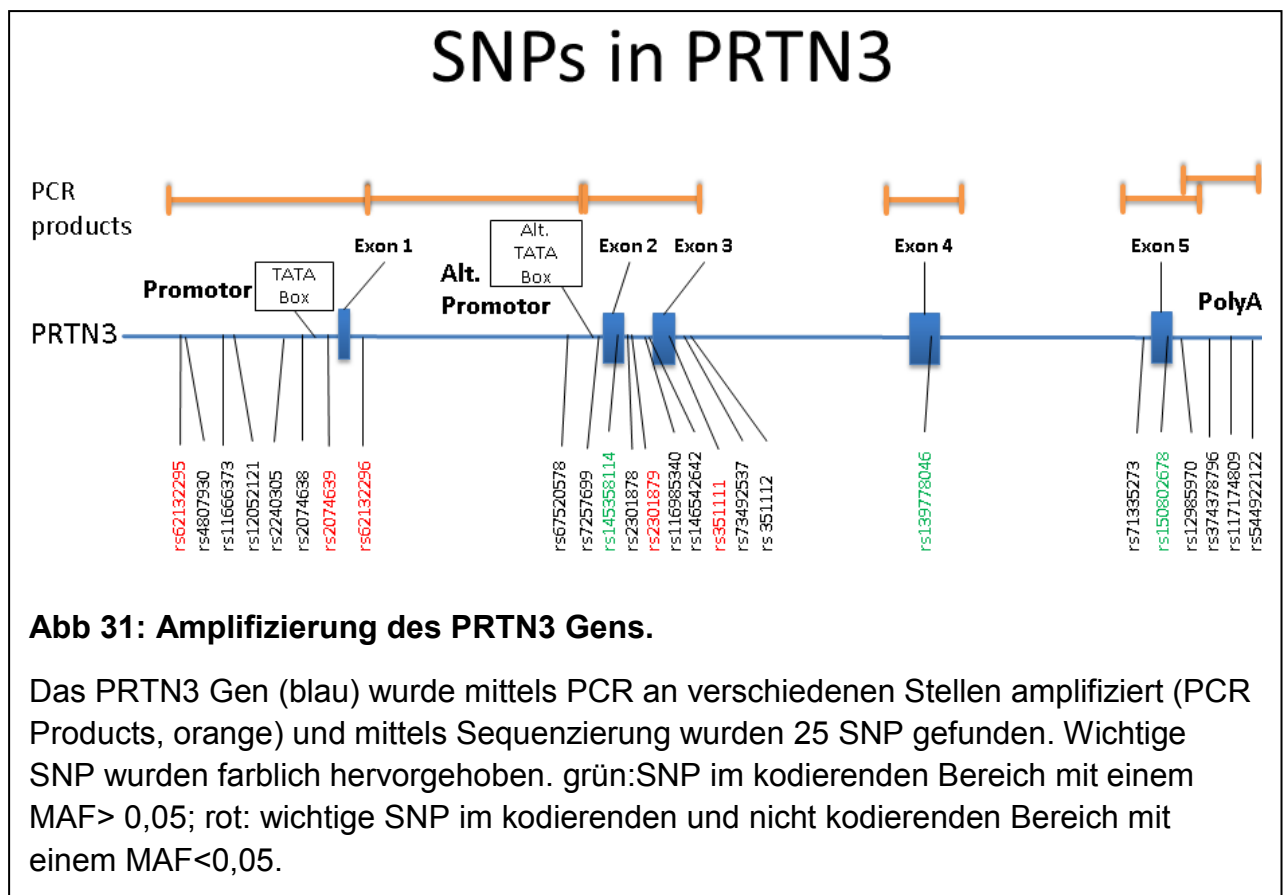
48 Patienten, bei denen GPA diagnostiziert wurden (siehe 2.8) und auf PR3-ANCA positiv getestet wurden, wurden in der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz rekrutiert (Tabelle 2). 45 Gesunde dienten als Kontrollgruppe. Alle untersuchten Testpersonen waren europäischen Ursprungs. Aus den Blutproben wurden die Blutzellfraktionen isoliert (2.7.4) und DNA bzw. RNA isoliert (2.6.1 bzw. 2.6.2). Die genomische DNA diente als Template und das PRTN3 Gen wurde bei jedem per konventioneller PCR (2.6.6) amplifiziert und per Sequenzierung (2.6.17) auf SNP untersucht (Abb. 31).

Über das Gen verteilt fanden wir 26 SNPs (siehe Tabelle 3), welche bereits annotiert waren. Die Häufigkeit aller SNP wurde mit den Daten des „1000 Genomes Project“ verglichen [85-87]. Von diesen SNP waren 10 sehr selten (Minor Allel Frequency:  $MAF > 0,05$ ). Diese Stellen sind als Mutationen anzusehen. Keine dieser Mutationen lag homozygot vor, sondern konnte immer nur in heterozygoter Form gefunden werden. Ihre Häufigkeit ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Vier SNP, namentlich rs351111, rs145358114, rs139778046 und rs150802678, befanden sich im kodierenden Bereich (Abb.31, farblich hervorgehoben). Drei dieser Basenaustausche (rs145358114, rs139778046 und rs150802678) sind selten vorhanden, also Mutationen (Tabelle 4). rs145358114 befindet sich im Exon 2, führt zu einer Transition von Cytosin zu Thymin und ist eine stille Mutation für die AS Valin. rs139778046 befindet sich in Exon 4 und führt zu einer Transversion von Adenin zu Thymin (A/T) und zu einem AS Austausch von Histidin zu Leucin (H/L). rs150802678 befindet sich in Exon 5 und führt zu einer Transition von Guanin zu Adenin und zu einem AS-Austausch von Arginin zu Histidin (R/H). Da ihr Vorkommen in der eigenen Kohorte zu gering war, wurden sie als nicht relevant erachtet.

|             | GPA (48) | Control (45) |
|-------------|----------|--------------|
| Age (media) | 58,02    | 35,60        |
| Male/Female | 35/13    | 16/29        |
| cANCA/pANCA | 48/1     | -/-          |

**Tabelle 2: Alter und Geschlechtsverteilung der untersuchten GPA Patienten und Kontrollen**



| SNP         | Austausch               | Bereich                                           | globaler MAF |
|-------------|-------------------------|---------------------------------------------------|--------------|
| rs62132295  | G/A                     | Promotorbereich ~560 Bp vor Exon 1                | A=0,199      |
| rs4807930   | C/T                     | Promotorbereich ~530 Bp vor Exon 1                | T=0,208      |
| rs189978532 | C/G                     | Promotorbereich ~500 Bp vor Exon 1                | C=0,0006     |
| rs11666373  | G/C                     | Promotorbereich ~400 Bp vor Exon 1                | C=0,438      |
| rs12052121  | C/T                     | Promotorbereich ~350 Bp vor Exon 1                | T=0,079      |
| rs2240305   | C/T                     | Promotorbereich ~150 Bp vor Exon 1                | T=0,157      |
| rs2074638   | C/T                     | Promotorbereich ~100 Bp vor Exon 1                | T=0,313      |
| rs2074639   | C/T                     | Promotorbereich vor Exon 1, kurz nach<br>TATA Box | T = 0,1919   |
| rs62132296  | C/T                     | Intron 1, kurz nach Exon 1                        | T=0,2039     |
| rs67520578  | G/T                     | Intron 1, kurz vor alternativer<br>Promotorregion | T=0,4298     |
| rs7257699   | eig C/A<br>gefunden C/G | Intron 1, kurz vor Exon 2                         | A= 0,0666    |
| rs145358114 | G/T                     | Exon 2                                            | T= 0,0005    |
| rs2301878   | C/G                     | Intron 2, kurz nach Exon 2                        | G=0,1304     |
| rs2301879   | A/G                     | Intron 2, kurz nach Exon 2                        | G=0,1965     |
| rs116985340 | C/T                     | Intron 2                                          | T=0,1322     |
| rs146542642 | G/A                     | Intron 2, 20 Bp vor Exon 3                        | A= 0,006     |
| rs351111    | G/A                     | Exon 3                                            | A=0,441      |
| rs73492537  | G/A                     | Intron 3, kurz nach Exon 3                        | A=0,232      |
| rs 351112   | A/C                     | Intron 3, kurz nach Exon 3                        | A=0,4123     |
| rs139778046 | A/T                     | Exon 4                                            | T=0,0005     |
| rs71335273  | G/A                     | Intron 4, vor Exon 5                              | A=0,3393     |
| rs150802678 | G/A                     | Exon 5                                            | A=0,006      |
| rs12985970  | C/T                     | Poly-A Schwanz (kurz nach Exon 5)                 | T= 0,001     |
| rs117174809 | G/A                     | Poly-A Schwanz                                    | A=0.0066     |
| rs374378796 | T/-                     | Poly-A Schwanz                                    | --=0.0028    |
| rs544922122 | G/T                     | nach Poly-A Schwanz                               | T=0,002      |

**Tabelle 3: Gefundene SNPs im Gen PRTN3**

| SNP         | globaler MAF | Vorkommen eigene Kohorte                    |
|-------------|--------------|---------------------------------------------|
| rs189978532 | C=0,0006     | 1x bei den Kontrollen                       |
| rs145358114 | T= 0,0005    | 1x bei den Kontrollen                       |
| rs146542642 | A= 0,006     | 1x bei den Kontrollen, 3x bei den Patienten |
| rs139778046 | T=0,0005     | 1x bei den Kontrollen, 1x bei den Patienten |
| rs150802678 | A=0,006      | 2x bei den Kontrollen, 1x bei den Patienten |
| rs12985970  | T= 0,001     | 1x bei den Patienten                        |
| rs117174809 | A=0.0066     | 1x bei den Kontrollen, 1x bei den Patienten |
| rs374378796 | --=0.0028    | 1x bei den Kontrollen                       |
| rs544922122 | T=0,002      | 1x bei den Patienten                        |

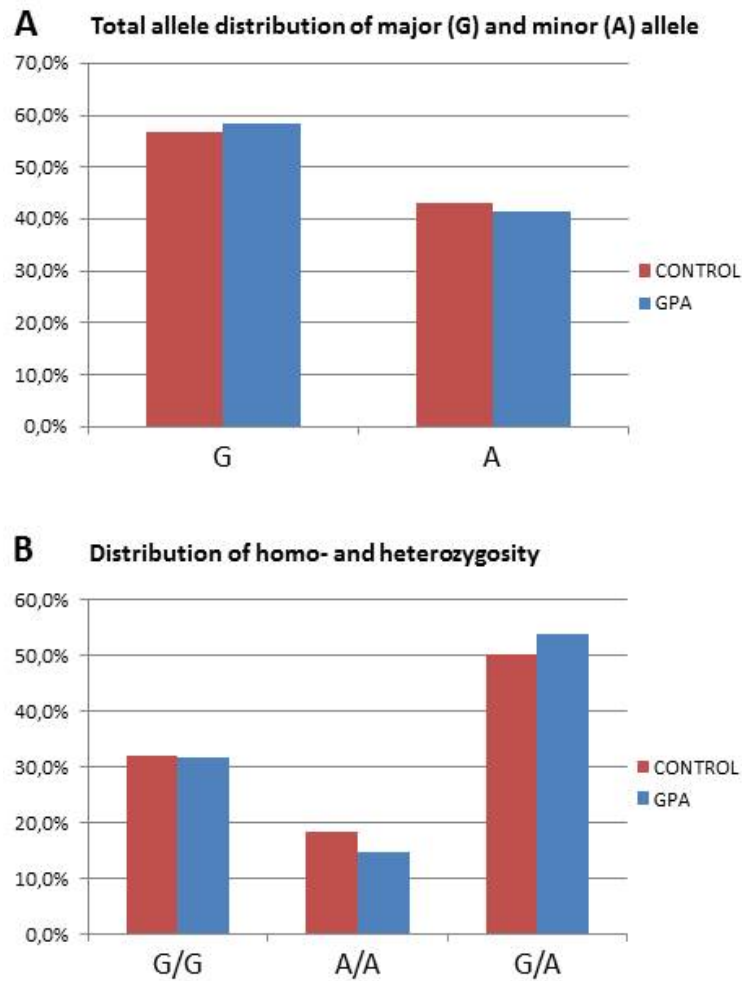
**Tabelle 4: Vorkommen seltener Mutationen in der eigenen Kohorte.**

Mutationen wurden in der Kohorte nur in heterozygoter Form bei wenigen Studienteilnehmern gefunden.

Nur rs351111 ist durch seine Häufigkeit von über 5% keine Mutation, sondern relevant in einer Population. Dieser befindet sich in Exon 3, führt zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Valin (I/V) und ist in der europäischen Population verbreitet. Daher wurde untersucht, ob die Allelhäufigkeit sich zwischen der Kontrollgruppe und Patienten unterscheidet. Doch weder die totale Allelverteilung, noch die Homo- bzw. Heterozygotität zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 32). Das Allel befand sich im Hardy-Weinberg Equilibrium.

Eine unabhängige Kohorte wurde im Klinikum der Ruhr Universität Bochum rekrutiert und dort mit Hilfe des Restriktionslängen-Polymorphismus (RFLP) untersucht. 279 Patienten und 357 Gesundkontrollen zeigten im rs 351111 bei der Genotyp- und Allelfrequenz ebenfalls keine Signifikanz (Tabelle 5). Der als bereits signifikant beschriebene SNP rs62132295 dagegen zeigte sich auch in der unabhängigen Kohorte signifikant (Tabelle 6).

Eine Assoziation des SNP und somit auch aller gefundenen SNP in den kodierenden Bereichen, die zu Proteinpolymorphismen führen, zu GPA konnte also definitiv ausgeschlossen werden.



**Abbildung 32: Totale Allelverteilung sowie Verteilung der Homo- bzw. Heterozygosität bei rs 351111**

A: Prozentsatz des Major (G) und des Minor (A) Allele Frequency für den SNP rs351111 in GPA Patienten und Kontrollen. Es wurde keine statistische Signifikanz ( $p > 0.05$ ) für einen Allele shift in GPA Patienten gefunden. B: Verteilung der Homozygosität und Heterozygosität für SNP rs351111 in GPA Patienten und Kontrollen. Es gab keine Unterschiede zwischen den GPA Patienten und den Kontrollen, bis auf eine kleine Unterrepräsentation des Minor alleles in GPA Patienten bzgl. des Hardy-Weinberg Equilibriums.

| genotype | WG ges. | Kontrollen |                                  |
|----------|---------|------------|----------------------------------|
| AA       | 35      | 53         | p genotype= <b>0,939561505</b>   |
| AB       | 123     | 181        |                                  |
| BB       | 88      | 123        | p alleles= <b>0,735614874</b>    |
| sum      | 246     | 357        | Verteilung ist nicht signifikant |

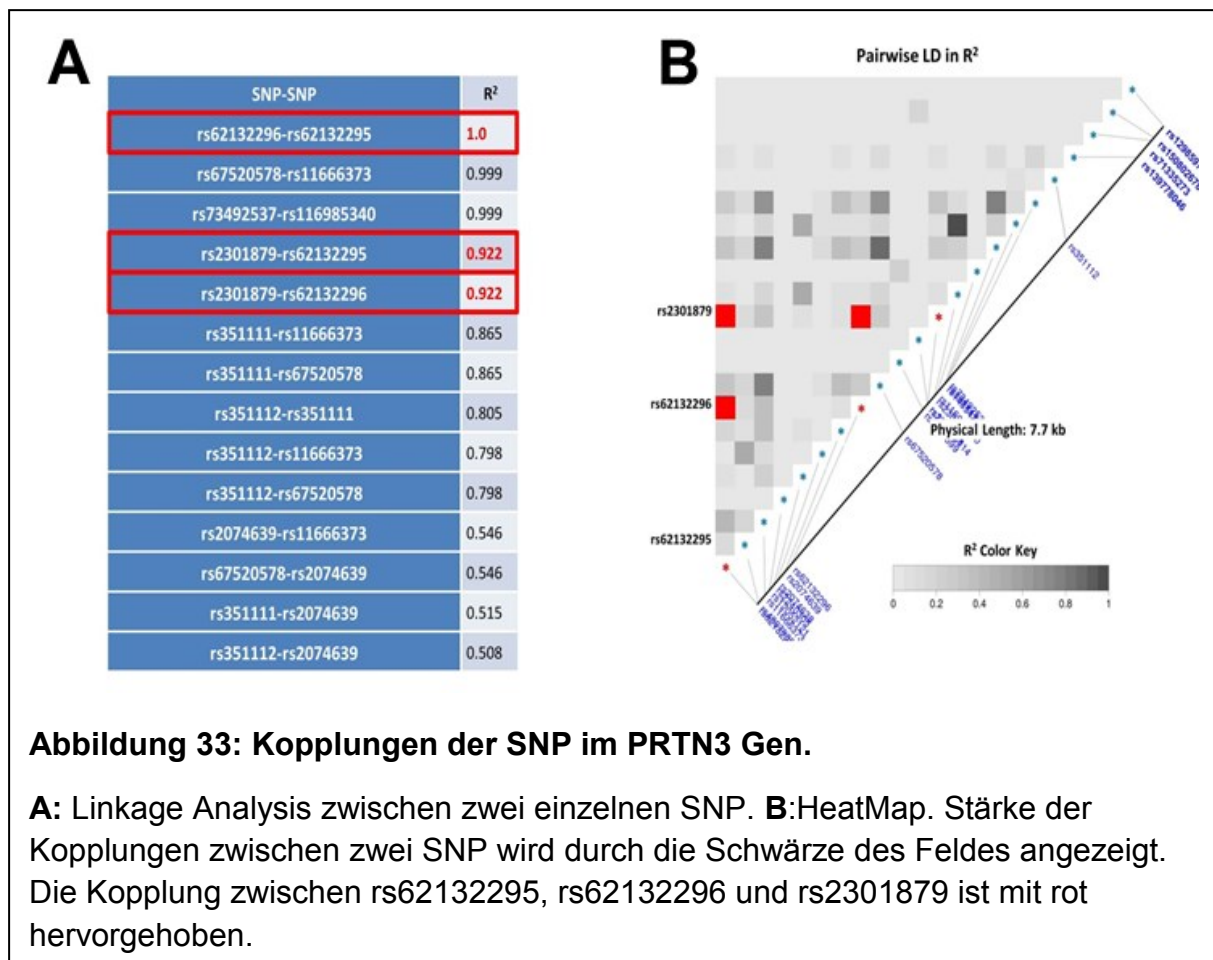
**Tabelle 5: Genotyp Verteilung von rs351111 in einer unabhängigen Kohorte des Klinkums der Ruhr Universität Bochum.**

| genotype | WG ges. | Kontrollen |                                   |
|----------|---------|------------|-----------------------------------|
| AA       | 37      | 32         | p genotype= <b>0,025721873</b>    |
| AB       | 125     | 168        |                                   |
| BB       | 93      | 164        | p alleles= <b>0,009329203</b>     |
| sum      | 255     | 364        | Verteilung ist <b>signifikant</b> |

**Tabelle 6: Genotyp Verteilung von rs62132295 in einer unabhängigen Kohorte des Klinkums der Ruhr Universität Bochum.**

Während man früher dachte, dass die DNA außerhalb der kodierenden Bereiche nicht wichtig wäre, und man sie als „junk DNA“ bezeichnete, weiß man heute, dass diese DNA sehr wohl Auswirkungen haben kann. Die häufigsten SNP im Bereich des PRTN3 Gens befinden sich im nicht kodierenden Bereich. 22 Basenaustausche haben wir dort gefunden, wobei sechs seltene Mutationen waren und 16 SNP mit einem globalen MAF>0,05. Besonders im Promotorbereich und im Bereich um Exon 2 und 3, welche sehr nah beieinander liegen, häufen sich die gefundenen SNP an (Abb. 31).

Es zeigte sich, dass einige SNP untereinander mehr oder weniger stark gekoppelt sind (Abb. 33). Ihre Genotypverteilung ist nahezu gleich und weichen nur in seltenen Fällen ab. Eine Linkage Analyse (Abb. 33 A) und die dazugehörige HeatMap (Abb. 33 B) verdeutlichen dies. Die Kopplungen zeigen sich folgendermaßen auf: rs62132295 ist stark gekoppelt mit rs62132296 und rs2301879; rs11666373 ist gekoppelt mit rs67520578, rs351111 und teilweise sind diese drei gekoppelt mit rs351112, rs73492537 ist gekoppelt mit rs116985340, rs4807930 ist teilweise gekoppelt mit rs2074638.



**Abbildung 33: Kopplungen der SNP im PRTN3 Gen.**

**A:** Linkage Analysis zwischen zwei einzelnen SNP. **B:** HeatMap. Stärke der Kopplungen zwischen zwei SNP wird durch die Schwärze des Feldes angezeigt. Die Kopplung zwischen rs62132295, rs62132296 und rs2301879 ist mit rot hervorgehoben.

Die Allelverteilung der Kontrollen und der Patienten wurden miteinander verglichen und zum Vergleich wurden die MAF der europäischen und afrikanischen Populationen aus dem „1000 Genomes Project“ hinzugezogen (Tabelle 7). Hier fiel besonders stark rs2074639 auf (Tabelle 7, rot). Das major Allel fand sich hier häufiger, als bei Patienten oder im 1000 genomes project. Nicht ganz so stark, aber ebenfalls assoziiert, zeigten sich der SNP rs62132295 (Tabelle 7, blau), welcher bereits viel untersucht ist (siehe 1.3), und seine beiden mit ihm gekoppelten SNP rs62132296 und rs2301879 (siehe Abb. 33). Eine ähnliche kleine Verschiebung findet sich bei den teilweise gekoppelten SNP rs4807930 und rs2074638 (Tabelle 7, grün). Diese SNP befinden sich im Promotorbereich. Ebenfalls eine starke Verschiebung zeigt der SNP rs351112 (Tabelle 7, orange), welcher sich kurz nach Exon 3 befindet (siehe Tabelle 3).

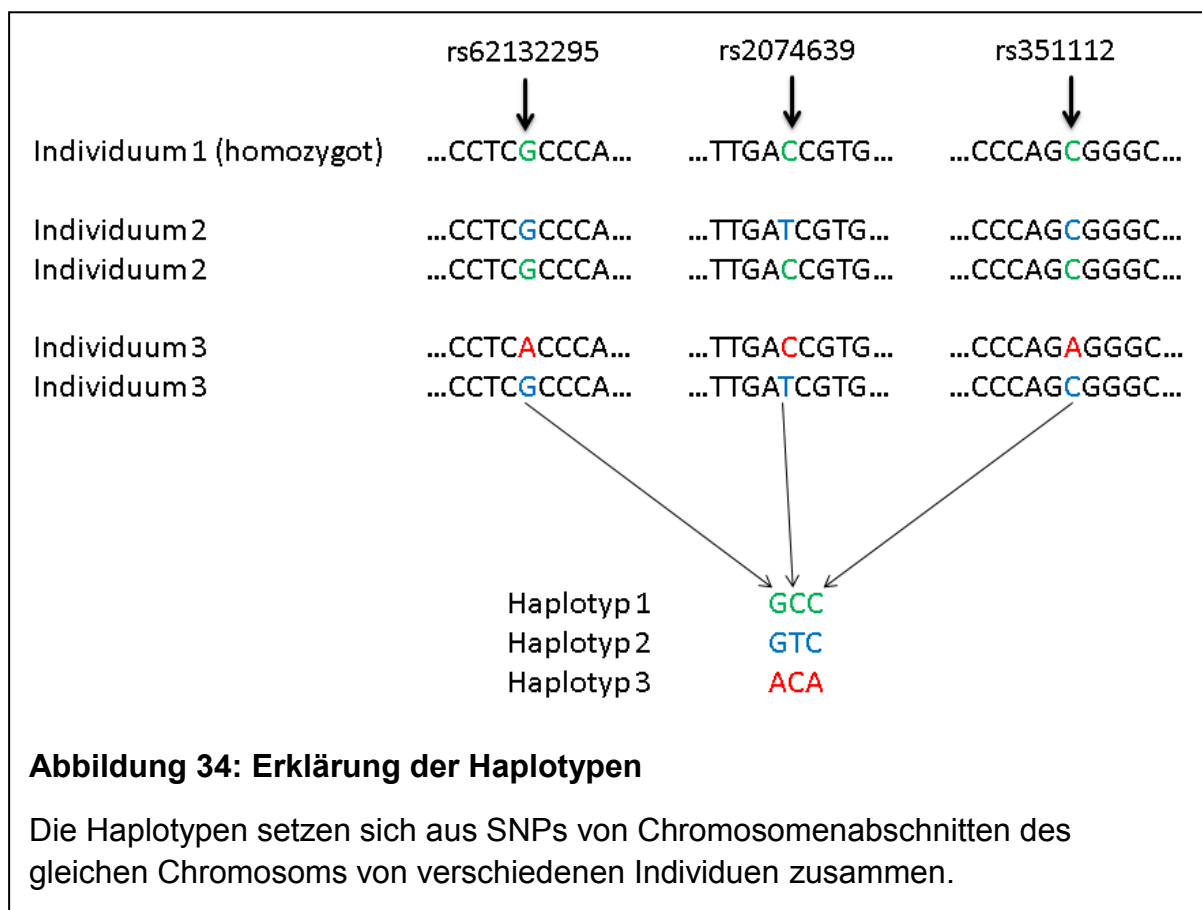
| SNP         | globaler MAF | Afrikanischer MAF | Europäischer MAF | MAF Kontrollen | MAF Patienten | Odds Ratio (OR) |
|-------------|--------------|-------------------|------------------|----------------|---------------|-----------------|
| rs62132295  | A=0,199      | A= 0.073400       | A= 0.323100      | A=0,289        | A=0,323       | 1,212           |
| rs4807930   | T=0,208      | T=0.122500        | T=0.225600       | T=0,211        | T=0,177       | 0,804           |
| rs11666373  | C=0,438      | C=0.476599        | C=0.439400       | C=0,467        | C=0,469       | 0,992           |
| rs12052121  | T=0,079      | T=0.028700        | T=0.007000       | T=0,011        | T=0,000       | -               |
| rs2240305   | T=0,157      | T=0.081700        | T=0.201800       | T=0,156        | T=0,167       | 1,086           |
| rs2074638   | T=0,313      | T=0.266999        | T=0.232600       | T=0,233        | T=0,208       | 0,865           |
| rs2074639   | T = 0,1919   | T=0.046100        | T=0.211699       | T=0,278        | T=0,208       | 0,684           |
| rs62132296  | T=0,2039     | T=0.105900        | T=0.320100       | T=0,300        | T=0,344       | 1,222           |
| rs67520578  | T=0,4298     | T=0.477299        | T=0.408499       | T=0,422        | T=0,405       | 0,931           |
| rs7257699   | A= 0,0666    | A=0.295800        | A=0.000000       | A=0,000        | A=0,000       | -               |
| rs2301878   | G=0,1304     | G=0.226900        | G=0.050700       | G=0,033        | G=0,042       | 1,261           |
| rs2301879   | G=0,1965     | G=0.057500        | G=0.315100       | G=0,289        | G=0,313       | 1,119           |
| rs116985340 | T=0,1322     | T=0.031000        | T=0.160000       | T=0,156        | T=0,156       | 1,005           |
| rs73492537  | A=0,232      | A=0.465199        | A=0.163999       | A=0,156        | A=0,177       | 1,168           |
| rs351112    | A=0,4123     | A=0.254900        | A=0.530799       | A=0,556        | A=0,479       | 1,359           |
| rs71335273  | A=0,3393     | A=0.403200        | A=0.215700       | A=0,170        | A=0,174       | 1,028           |

**Tabelle 7:** Allelfrequenzen der SNP im nicht kodierenden Bereich des PRTN3 Gens

Betrachtet man nun die diese fünf SNP, die die stärkste Verschiebung zeigen, rs62132295 (welcher zusätzlich für die anderen beiden SNP steht, mit denen er gekoppelt ist), rs4807930, rs2074638, rs2074639 und rs351112 zeigt sich, dass sie zusammen ein Allel bilden. Theoretisch könnten durch die Kombinatorik der SNP  $2^5 = 32$  Kombinationsmöglichkeiten entstehen, jedoch findet man nur 13 und davon sind bereits sechs selten vertreten. Homozygot findet man nur bestimmte Kombinationen dieser Genloci und auch wenn man die sich heterozygoten Genloci ansieht, so setzen sie sich aus zwei ganz bestimmten Haplotypen zusammen. Als Haplotyp bezeichnet man einen haploiden Genotyp, eine Varianz auf der Nukleotidsequenz desselben Chromosoms.

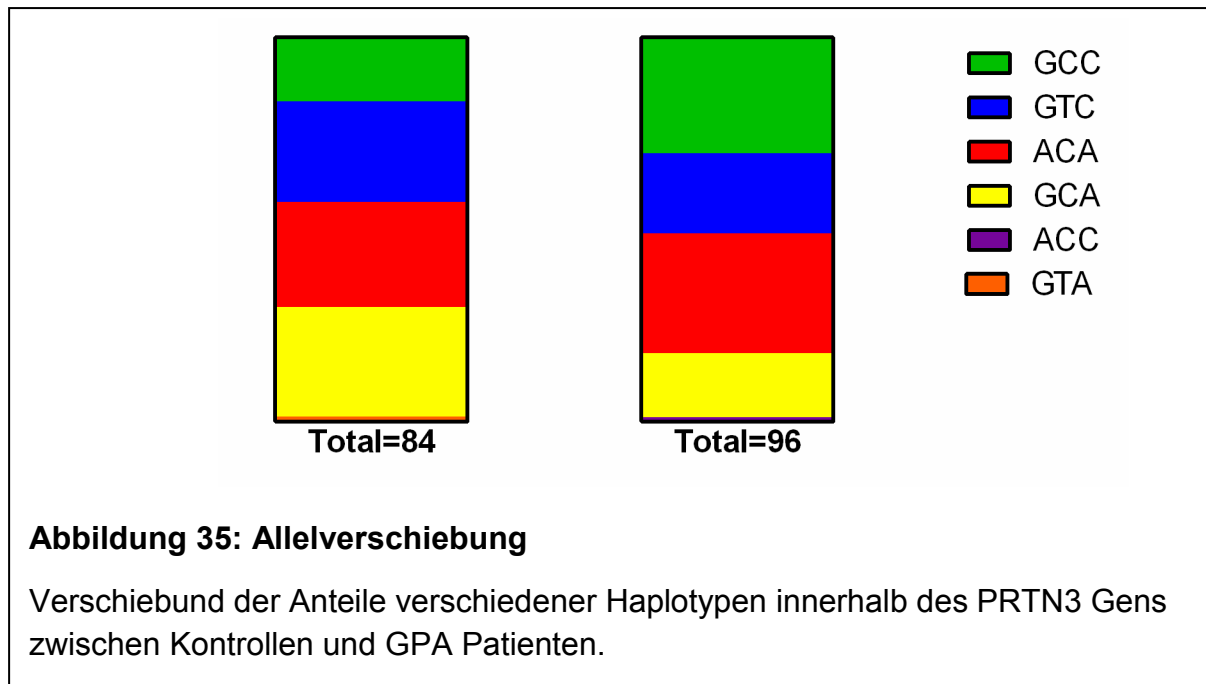
Beschränkt man sich nun auf die drei stark assoziierten Genloci, rs62132295, rs2074639 und rs351112 wird das Bild deutlicher. Die Kombinatorik der SNP der verschiedenen Chromosomenabschnitte verschiedener Individuen bilden Haplotypen aus (Abb. 34). Das Major Allel aller SNP bildet einen Haplotyp GCC. Die Haplotypen ATC und ATA kommen natürlicherweise nicht vor.

Es zeigt sich beim Vergleich zwischen Kontrollen und GPA Patienten hier ein Unterschied zwischen der Allelverteilung (Abb. 35, Tabelle 8). Dieser ist aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nicht signifikant. Anhand einer größeren Kohorte können diese preliminären Ergebnisse untersucht werden.



| Haplotyp | Kontrollen | GPA |
|----------|------------|-----|
| GCC      | 14         | 29  |
| GTC      | 22         | 20  |
| ACA      | 23         | 30  |
| GCA      | 24         | 16  |
| ACC      | 0          | 1   |
| GTA      | 1          | 0   |
| sum      | 84         | 96  |

**Tabelle 8: Haplotypverteilung der Kontrollen und Patienten**



## 4. Diskussion

### 4.1. BEDEUTUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN PR3-TRANSKRIPTE

Die vorliegende Arbeit nahm es sich zum Ziel, die pathophysiologische Rolle der verschiedenen PR3-Transkripte zu untersuchen. Die Existenz eines alternativen PR3 Konstruktes (PRTN3-002) wurde mittels RACE-PCR von unserer Arbeitsgruppe und McInnes et al. nachgewiesen [54, 76]. Auch das Vorhandensein einer weiteren Isoform, welche ein ungesplizetes Intron enthält, wurde von beiden Gruppen gefunden und nicht weiter spezifiziert. Es kann ausgeschlossen werden, dass diese Form auch auf eine genomische Kontamination zurückzuführen ist, da ein DNase-Verdau durchgeführt wurde (siehe 2.6.4) und eine PCR als Negativ Kontrolle durchgeführt wurde mit einem Teil der untranskribierten RNA, von dem der Rest in cDNA umgeschrieben wurde. Jedoch ist die Expression der alternativen mRNAs PRTN3-002 und PRTN3-003 schwer zu entdecken und auch in den gleichen Zelllinien nicht immer in gleicher Stärke, manchmal auch gar nicht, vorhanden. Deswegen konnte die Expression nur qualitativ festgestellt werden, wodurch sich aber ein deutliches Bild ergibt (siehe 3.1.1).

Die Expression der alternativen mRNAs ist eindeutig mit Krebs assoziiert, während die Expression der normalen PR3 mRNA PRTN3-001 in der Differenzierung von Zellen eine Rolle spielt. Dies zeigen die hohen Expressionen im Knochenmark, in CD34+ Zellen und die erhöhte Expression in myeloiden Zelllinien nach der induzierten Differenzierung (siehe 3.1).

Die induzierte Differenzierung bestätigte ebenfalls, dass G-CSF die Expression der PR3 hochreguliert [88]. Dies geschieht hauptsächlich über PU.1, welches als Transkriptionsfaktor für die PR3 bereits bekannt ist [50].

Das bekannteste Modell zur induzierten Differenzierung ist HL-60 [89]. Hier war bereits bekannt, dass die PR3-mRNA gemeinsam mit anderen Genen, wie z.B. der AZU1-mRNA herunterreguliert ist [11, 90]. Jedoch nutzen wir zur Differenzierung NB4 und U937, da wir für diese Zelllinien ein gut getestetes Protokoll hatten [79], welches nicht nur in die Differenzierung in die neutrophile Richtung erlaubte, sondern zusätzlich auch in Richtung von Makrophagen. In beiden Fällen wurde auch hier PRTN3-001 herunterreguliert.

Ein weiteres Modell zur induzierten Differenzierung ist Mutz-3, eine myeloide Zelllinie, welche sich zu dendritischen Zellen differenzieren lässt [91]. Da Mutz-3 im normalen Zustand PR3 mRNAs exprimiert, ist es möglich, dass die PR3 auch hier zur Differenzierung beiträgt.

Besonders wichtig ist die PR3 Expression bei der akuten myeloiden Leukämie (AML). Es zeigt sich, dass PR3 Expression ein starker Marker für AML ist. Eine schnelle Erkennung ist bei dieser Krankheit wichtig und die PR3 Expression kann als diagnostischer Marker genau hierfür dienen.

Wie die Transfektion in Primärzellen zeigt, hat die alternative PR3 eine gegensätzliche Wirkung zur normalen PR3 (siehe 3.3). Während die PRTN3-001 mRNA zur Proliferation führt, bei der auch die Apoptoserate hoch ist, bringt die Transfektion mit der PRTN3-002 mRNA einen Proliferationsstopp und Zellzyklusarrest mit sich, während die Apoptoserate gleich bleibt und die Zellen trotzdem vital bleiben. Möglicherweise stammt diese Wirkung von der Proteinebene, jedoch ist dies nicht sicher. Die PRTN3-003 mRNA dagegen würde direkt nach Exon 2 ein Stopp-Codon enthalten. Bei dieser mRNA besteht die Möglichkeit, dass es sich hierbei um eine long noncoding RNA (lncRNA) handelt. Auch für PRTN3-002 konnten wir, im Gegensatz zu McInnes et al. [76] kein Protein im Western Blot nachweisen.

LncRNA können auf unterschiedlichste Art und Weise wirken (reviewed in [92]) und können unter anderem auch Enhancer Funktionen besitzen [93]. Im humanen Genom wurden viele lncRNAs beschrieben [94] und in der Maus wurden sechs unterschiedliche Transkripte, zwei proteinkodierende und vier lncRNAs, im Prtn3-Gen vom HAVANA/GENCODE Projekt [95] beschrieben.

Die Überexpression einer PR3-mRNA wirkt sich auf die Expression anderer Gene aus (siehe 3.3). Wir haben den Einfluss auf Apoptose und Zellzyklus relevante Gene untersucht und beschränkten uns bei der Präsentation auf die Werte, die einen statistisch relevanten Wert von  $p > 0,05$  ergaben. Jedoch gab es auch Werte, bei denen die p-Werte knapp darüber waren oder bei denen die Abweichung der Rohwerte zu groß war. Somit kann es sein, dass nicht alle relevanten Veränderungen entdeckt wurden. Die Signaltransduktionsketten vieler dieser Gene sind sehr verwoben und die einzelnen Proteine wirken in mehreren Wegen aufeinander ein, wodurch sich Wirkungen gegenseitig aufheben können oder

Veränderungen in gleichen Genen zu unterschiedlichen Wirkungen führen können. Es ist daher wichtig, dass die Gesamtheit der im Assay gefundenen Veränderungen auch mit denen in der Zellkultur zu beobachteten Wirkung übereinstimmen, um die gefundenen Befunde zu erklären.

Bei beiden Genen finden sich ähnliche Veränderungen in denselben Genen. DAPK1 kann als anti- oder als pro-apoptotischer Regulator wirken, weil es unterschiedliche Pathways anschaltet [96]. Bcl2 Proteine formen Homo- oder Heterodimere, die ebenfalls pro- oder antiapoptotisch wirken können [97]. Darunter fallen BCL2L1, BCL2L11, welche bei PRTN3-002 hoch- bzw. heruntergefahren sind und BCL2L2, welches bei PRTN3-001 hochgefahren ist. Harakiri, vom HRK Gen kodiert, kann die Apoptose einleiten, interagiert aber auch mit diesen Bcl2-Proteinen [98]. Dadurch erklärt sich die geringe Apoptose bei PRTN3-002. Die zu beobachtete erhöhte Apoptose bei RPTN3-001 muss wohl durch einen anderen Signalweg entstehen, da HRK auch hier herunterreguliert ist. Ähnlich verhält es sich zu Lymphotoxin-alpha, kodiert von LTA, welches die Apoptose durch die Bindung an den TNFR1 einleitet.

Das Tumorrepressorprotein P53, kodiert von TP53, wirkt auf hunderte anderer downstream Gene und kann so entweder zu einem Zellzyklusarrest [99] oder zu Apoptose führen [100]. Eins dieser Gene ist zum Beispiel ATR, welches beim Zellzyklus eine Rolle spielt [101]. Was für P53 gilt, ist ähnlich für WEE1 [102, 103]. Es ist allerdings nicht komplett auszuschließen, dass Effekte, die bei beiden mRNAs zu beobachten sind, durch methodische Fehler, wie Nebeneffekte des Vektors, entstehen können.

P73 ist nur bei PRTN3-001 stark erhöht. Dieses Gen hält das Zellwachstum durch transkriptionale Aktivierung von Zellzyklus Progressionsgenen aufrecht [104, 105]. IGF1R ist ebenfalls in sich schnell teilenden Krebszellen erhöht [106]. Die erhöhte Expression von TNFRSF21 könnte die Apoptoserate erklären, da sie sie über einen unabhängigen Signalweg induziert [107]. Auch eine Rolle über das überexprimierte, Apoptose induzierende FADD, welches aber auch die Proliferation induzieren könnte, wäre denkbar [108].

BCL2L1 nur bei PRTN3-002 stark erhöht und hat eine antiapoptotische Wirkung [109]. Eine Defizienz des Death Receptor 5, kodiert von TNFRSF10B, kann mit einer geringeren Apoptoserate korrelieren [110]. CDC20 scheint in Tumorzellen zu einem Zellzyklusarrest zu führen und der Tumorgenese zu opponieren, weshalb es als therapeutischer Ansatz gegen Krebs erforscht wird [111].

Die Überexpression von CDC20 bei PRTN3-002 könnte denselben Effekt haben im Gegensatz zu PRTN3-001. Eine Studie fand Assoziationen der genomischen DNA von GPA Patienten mit 202 Apoptose Genen [69]. Diese Gene überschneiden sich teilweise mit unseren untersuchten Genen.

Die Wirkung der PR3 kann also in gegensätzliche Richtungen laufen. Während man in Primärzellen eine Erhöhung der Proliferation sieht, führt sie in Vorläuferzellen zur Ausdifferenzierung. Die alternative PR3 mRNA führt dagegen in Primärzellen zu einem Zellzyklusarrest, lässt jedoch auch in sich schnell teilenden, entarteten Tumor- und Leukämiezellen nachweisen. Dies schließt sich jedoch nicht gegenseitig aus, sondern bedeutet nur, dass die Art und Weise auf welche die Transkripte wirken noch nicht völlig geklärt ist. Weitere Untersuchungen müssen dies in Zukunft klären.

Die Charakterisierung des alternativen Promotors ist fehlgeschlagen (siehe 3.2). Dies kann mehrere Gründe haben. Es könnte zur Aktivierung ein spezieller Enhancer von Nöten sein, der für die Expression wichtig ist. In der Maus findet man im Bereich des *Prtn3* Gens ein Enhancer Element, der für die Expression der NE und möglicherweise auch für die PR3 wichtig ist [112]. Jedoch unterscheiden sich das Intron 2 zwischen der Maus und dem Menschen stark.

Auch spezielle epigenetische Veränderungen, welche durch die Transfektion mit einem Plasmid nicht vorhanden sind, könnten von Nöten sein, um den Promotor zu aktivieren. Wie bei der SLE (reviewed in [113]) könnte der Methylierungs- und Acetylierungsstatus zur Krankheit beitragen. Auch sollte man nach den typischen Chromatinsignaturen schauen, die Promotoren markieren, nämlich Histone-3 Lys-4 Trimethylation und H3K4me3. Auch Chromatinstrukturen können sich darauf auswirken. So gibt es im APEA Locus 8 myeloid spezifische DNase I hypersensitive sites (DHS), die auf Chromatinstrukturen mit funktioneller Signifikanz, wie regulatorische Elemente und Replikationsursprünge, hindeuten [114]. Einer dieser DHS befindet sich im PRTN3 Gen in der Nähe des alternativen Promotors.

Die Faltung des humanen Intron 2 des PRTN3 Gens könnte Einfluss auf den Splicing Prozess haben sowie auch auf die Fähigkeit des Promotor zu aktivieren. Weiterhin könnte es ebenfalls als modulatorischer Repressor wirken.

#### **4.2.DIE ROLLE VON PR3 - PROTEINEPITOPEN, SNPs UND INTRAGENETISCHEN HAPLOTYPEN IM PRTN3 GEN BEI DER ENTSTEHUNG VON GPA**

PR3-ANCAs von Patienten mit GPA erkennen Epitope der PR3. Während der Reifung der Neutrophilen, wird die PR3 N-terminal sowie C-terminal prozessiert. Im Unterschied zur N-terminalen Prozessierung, weiß man noch nicht viel über die C-terminale Prozessierung. Capizzi et al. stellten ein rekombinantes PR3 Protein mit C-terminalen Modifikationen her, welches der C-terminalen Prozessierung entging, aber von PR3-ANCAs weiterhin erkannte wurde [33]. Um weitere Aufschlüsse über das C-terminale Ende der PR3 zu bekommen, versuchten wir es zu klonieren und in h-TEZ zu exprimieren. Auch vermuteten wir im C-terminalen Ende ein Kerntranslokationssignal, welches dazu führen könnte, dass dieser C-terminus alleine in den Kern einer Zelle transloziert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass man das Protein im ganzen Cytosol finden kann und somit auch kein funktionierendes Kerntranslokationssignal vorhanden ist. Weiterhin fanden wir oft die Expression des C-terminale Proteins in toten Zellen. Die Möglichkeit besteht, dass das c-terminale Ende zytotoxisch wirkt und deshalb oft in toten Zellen vorhanden ist, oder aber die Zellen sich gar nicht erst gut transfizieren lassen.

Ein Vergleich des APEA Genclusters und insbesondere des PRTN3-Gens unterschiedlicher Tierarten zeigt, dass es nicht nur im kodierenden Bereich, sondern auch im nicht kodierenden Bereich starke Veränderungen in der Evolution gegeben hat. Dies zeigt die unterschiedliche Lage des alternativen Promotors bei der Maus und des Menschen (siehe 1.3) sowie die unterschiedliche Faltungen des Introns (siehe 3.2, Abb. 19). Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich ein alternativer Promotor auch in den Genomen anderer Tierarten finden lässt. Dass Unterschiede in nicht kodierenden Bereichen krankheitsrelevant sein können, konnten wir anhand des PRTN3 Gens ebenfalls zeigen.

Die Sequenzierung des PRTN3-Gens zeigt dagegen eindeutige Assoziationen zu GPA. Diese Assoziationen finden sich nicht im Protein-kodierenden Bereich. Die Hypothese, dass ein Proteinpolymorphismus zu einem anderen PR3-Epitop und einer veränderten Erkennung der MHCII Moleküle führt, konnten wir widerlegen.

Der V/I Polymorphismus (rs351111) ist gleich verteilt bei GPA Patienten sowie bei Kontrollen, welches durch die unabhängige Kohorte bestätigt wurde. Clave et al. fanden zu diesem Polymorphismus ebenfalls keine klinische Relevanz im Bezug auf myeloide Leukämie [115]. Die Polymorphismen rs145358114, rs139778046 und rs150802678 sind selten und ergeben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den getesteten Gruppen.

Der SNP rs62132295, auch -564 A/G promotor Polymorphism genannt, wurde bereits eingehend untersucht und die Ergebnisse sind nicht eindeutig. Viele Studien bekräftigen eine Assoziation [51, 74, 75], es fanden sich aber andererseits keine Auswirkungen auf die Promotoraktivität und die PR3-Expression [72, 73] und auch Cooley et al. verneinen eine Assoziation [116]. Unsere gefundenen Allelfrequenzen stimmen mit früheren Arbeiten, die sich oft um die Promotorregion drehten, überein [74, 116]. Wir fanden jedoch, dass rs62132295 stark gekoppelt ist mit rs62132296 und rs2301879. So besteht die Möglichkeit, dass dieser SNP zwar mit GPA assoziiert ist, aber der funktionelle Aspekt, der zur Krankheit führt, nicht direkt mit rs62132295 zusammenhängt, sondern eher mit rs62132296 oder rs2301879.

Der Vergleich zwischen den Populationen könnte ebenfalls Aufschluss bringen. So ist in afrikanischen Populationen GPA seltener und manche SNPs finden sich auch viel seltener in dieser Population. Zum Beispiel stellt das minor Allel bei rs12052121 möglicherweise einen Schutz dar. rs7257699 findet sich bei keinem Europäer, weder in der Kontrollgruppe, noch bei GPA-Patienten und könnte ebenfalls von Vorteil sein. Dagegen stellen die minor Allele bei rs2240305, rs62132295, rs62132296 und die major Allele bei rs67520578, rs2074638 eher eine Prädisposition dar.

Für rs2074639 gilt dieser Vergleich jedoch nicht. Afrikaner haben fast ausschließlich das major Allel, welches aber auch unseren Ergebnissen zufolge die stärkste Assoziation mit GPA zeigt. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass sich der Effekt nicht direkt zeigt, sondern erst anhand der Assoziationen und bestehenden Haplotypen. Für diese Hypothese spricht, dass bei den SNP rs62132295 und rs2074639 gerade ein theoretisch möglicher Haplotyp natürlicherweise nicht vorkommt und auch die Verschiebung der Haplotypen zwischen Kontrollen und Patienten.

Die Ethnologie und Pathophysiologie der GPA sind weiterhin weitgehend unbekannt. Die überschüssige Proteinase 3 könnte von Mutationen im PRTN3 Gen stammen, die die Expression der PR3 beeinflusst. Dies schließt jedoch nicht aus, dass Mutationen in anderen Genen, die die Proteinase 3 regulieren, ebenfalls einen Einfluss haben können. Auch das Vorhandensein einer membranständigen PR3 ist nicht geklärt. So ist es auch möglich, dass sie nur die Proform des Enzyms darstellt [117]. Die meisten Hinweise unterstützen eine direkte Rolle der ANCAs im inflammatorischen Prozess. Doch auch hier sind weitere Studien von Nöten, um die klinische Signifikanz der ANCAs im Detail zu erkennen. Doch hat man die komplexen Zusammenhänge dieser multifaktoriellen Autoimmunkrankheit erst einmal verstanden, lässt sich eine schnellere und zielgerichtete Therapie finden, die das Leiden der Menschen verringert.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Gabay, J.E., et al., *Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(14): p. 5610-4.
2. Labbaye, C., P. Musette, and Y.E. Cayre, *Wegener autoantigen and myeloblastin are encoded by a single mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9253-6.
3. Rao, N.V., et al., *Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of cathepsin G*. J Biol Chem, 1996. **271**(6): p. 2972-8.
4. Gullberg, U., et al., *Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils*. J Immunol Methods, 1999. **232**(1-2): p. 201-10.
5. Specks, U., et al., *Functional significance of Asn-linked glycosylation of proteinase 3 for enzymatic activity, processing, targeting, and recognition by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*. J Biochem, 2007. **141**(1): p. 101-12.
6. Pham, C.T. and T.J. Ley, *Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8627-32.
7. Rao, N.V., et al., *Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties*. J Biol Chem, 1991. **266**(15): p. 9540-8.
8. Korkmaz, B., T. Moreau, and F. Gauthier, *Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions*. Biochimie, 2008. **90**(2): p. 227-42.
9. Dolman, K.M., et al., *Proteinase 3: substrate specificity and possible pathogenetic effect of Wegener's granulomatosis autoantibodies (c-ANCA) by dysregulation of the enzyme*. Adv Exp Med Biol, 1993. **336**: p. 55-60.
10. Hajjar, E., et al., *Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase--so similar yet so different*. FEBS J, 2010. **277**(10): p. 2238-54.
11. Dominique Bories, M.-C.R., David H. Solomon, Zbigniew Darzynkiewicz†, Yvon E. Cayre, *Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells*. Cell, 1989. **59**(6): p. 959-968.
12. Relle, M., et al., *Proteinase 3/myeloblastin as a growth factor in human kidney cells*. J Nephrol, 2003. **16**(6): p. 831-40.
13. Jennette, J.C., *Overview of the 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides*. Clin Exp Nephrol, 2013. **17**(5): p. 603-6.
14. ten Holder, S.M., M.S. Joy, and R.J. Falk, *Cutaneous and systemic manifestations of drug-induced vasculitis*. Ann Pharmacother, 2002. **36**(1): p. 130-47.
15. Stegeman, C.A., et al., *Association of chronic nasal carriage of Staphylococcus aureus and higher relapse rates in Wegener granulomatosis*. Ann Intern Med, 1994. **120**(1): p. 12-7.
16. Chen, M. and C.G. Kallenberg, *The environment, geoepidemiology and ANCA-associated vasculitides*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A293-8.
17. Jennette, J.C. and R.J. Falk, *Small-vessel vasculitis*. N Engl J Med, 1997. **337**(21): p. 1512-23.
18. F.J. van der Woude, N.R., S. Lobatto, A. Wiik, H. Permin, L.A. van Es, M. van der Giessen, G.K. van der Hem and T.H. The, *Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis*. Lancet, 1985. **1**: p. 425-9.
19. J.C. Jennette, J.R.H.a.R.J.F., *Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3*. Blood, 1990(75): p. 2263-4.
20. Ludemann, J., et al., *Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis: immunodiagnostic value, monoclonal antibodies and characterization of the target antigen*. Neth J Med, 1990. **36**(3-4): p. 157-62.
21. Ludemann, J., B. Utecht, and W.L. Gross, *Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme*. J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 357-62.

22. Braun, M.G., et al., *Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues.* Am J Pathol, 1991. **139**(4): p. 831-8.
23. Braun, M.G., et al., *[Distribution pattern of proteinase 3 in Wegener's granulomatosis and other vasculitic diseases].* Immun Infekt, 1991. **19**(1): p. 23-4.
24. Savige, J.A., et al., *Diverse target antigens recognized by circulating antibodies in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated renal vasculitides.* Clin Exp Immunol, 1990. **82**(2): p. 238-43.
25. Csernok, E., A. Muller, and W.L. Gross, *Immunopathology of ANCA-associated vasculitis.* Intern Med, 1999. **38**(10): p. 759-65.
26. Gross, W.L., E. Csernok, and B.K. Flesch, *'Classic' anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (cANCA), 'Wegener's autoantigen' and their immunopathogenic role in Wegener's granulomatosis.* J Autoimmun, 1993. **6**(2): p. 171-84.
27. D.E. Jenne, J.T., J. Ludemann, B. Utecht and W.L. Gross, *Wegener's autoantigen decoded.* Nature, 1990. **346**: p. 520.
28. Fries, J.F., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Summary.* Arthritis Rheum, 1990. **33**(8): p. 1135-6.
29. Jennette, J.C., et al., *Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference.* Arthritis Rheum, 1994. **37**(2): p. 187-92.
30. Wiik, A., *Rational use of ANCA in the diagnosis of vasculitis.* Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(5): p. 481-3.
31. Williams, R.C., Jr., et al., *Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's granulomatosis.* J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4722-37.
32. Kuhl, A., et al., *Mapping of conformational epitopes on human proteinase 3, the autoantigen of Wegener's granulomatosis.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 387-99.
33. Capizzi, S.A., et al., *Effects of carboxy-terminal modifications of proteinase 3 (PR3) on the recognition by PR3-ANCA.* Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 756-60.
34. Birck, R., et al., *Serial ANCA determinations for monitoring disease activity in patients with ANCA-associated vasculitis: systematic review.* Am J Kidney Dis, 2006. **47**(1): p. 15-23.
35. Watts, R.A., et al., *The contrasting epidemiology of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) and microscopic polyangiitis.* Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(5): p. 926-31.
36. Ohlsson, S., J. Wieslander, and M. Segelmark, *Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission.* Clin Exp Immunol, 2003. **131**(3): p. 528-35.
37. Yang, J.J., et al., *Circumvention of normal constraints on granule protein gene expression in peripheral blood neutrophils and monocytes of patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 2103-14.
38. Ohlsson, S., et al., *Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis.* Clin Exp Immunol, 2005. **141**(1): p. 174-82.
39. Todd, S.K., et al., *Regulatory B cells are numerically but not functionally deficient in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis.* Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(9): p. 1693-703.
40. Witko-Sarsat, V., et al., *A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis.* J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(6): p. 1224-33.
41. Van Rossum, A.P., et al., *Human anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies to proteinase 3 (PR3-ANCA) bind to neutrophils.* Kidney Int, 2005. **68**(2): p. 537-41.
42. Dolman, K.M., et al., *Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (C-ANCA)-mediated inhibition of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granulomatosis.* Clin Exp Immunol, 1993. **93**(3): p. 405-10.
43. Pervakova, M.Y., et al., *The Diagnostic Value of Alpha-1-Antitrypsin Phenotype in Patients with Granulomatosis with Polyangiitis.* Int J Rheumatol, 2016. **2016**: p. 7831410.

44. Guyot, N., et al., *Unopposed cathepsin G, neutrophil elastase, and proteinase 3 cause severe lung damage and emphysema*. Am J Pathol, 2014. **184**(8): p. 2197-210.
45. Henshaw, T.J., et al., *Elevations of neutrophil proteinase 3 in serum of patients with Wegener's granulomatosis and polyarteritis nodosa*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(1): p. 104-12.
46. Savige, J.A., et al., *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in myelodysplasia and other haematological disorders*. Aust N Z J Med, 1994. **24**(3): p. 282-7.
47. Witko-Sarsat, V., et al., *Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 729-36.
48. Terjung, B., et al., *Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(1): p. 37-46.
49. Sturrock, A.B., et al., *Structure, chromosomal assignment, and expression of the gene for proteinase-3. The Wegener's granulomatosis autoantigen*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 21193-9.
50. Sturrock, A., K.F. Franklin, and J.R. Hoidal, *Human proteinase-3 expression is regulated by PU.1 in conjunction with a cytidine-rich element*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32392-402.
51. Gencik, M., et al., *Proteinase 3 gene polymorphisms and Wegener's granulomatosis*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2473-7.
52. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
53. Jacox, E., et al., *Tissue-specific and ubiquitous expression patterns from alternative promoters of human genes*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12274.
54. Relle, M., et al., *Intronic promoters and their noncoding transcripts: a new source of cancer-associated genes*. Mol Carcinog, 2014. **53**(2): p. 117-24.
55. Wiesner, O., et al., *Differences between human proteinase 3 and neutrophil elastase and their murine homologues are relevant for murine model experiments*. FEBS Lett, 2005. **579**(24): p. 5305-12.
56. Relle, M., et al., *Comparative aspects of murine proteinase 3*. Rheumatol Int, 2011. **31**(8): p. 1105-11.
57. Jenne, D.E., et al., *Cloning and functional expression of the murine homologue of proteinase 3: implications for the design of murine models of vasculitis*. FEBS Letters, 1997. **408**(2): p. 187-190.
58. Selga, D., et al., *Epitope mapping of anti-PR3 antibodies using chimeric human/mouse PR3 recombinant proteins*. Clin Exp Immunol, 2004. **135**(1): p. 164-72.
59. Little, M.A., et al., *Anti-proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies recapitulate systemic vasculitis in mice with a humanized immune system*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e28626.
60. Pfister, H., et al., *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1411-8.
61. Kessenbrock, K., et al., *Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2438-47.
62. Xiao, H., et al., *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 955-63.
63. Salama, A.D. and M.A. Little, *Animal models of antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(1): p. 1-7.
64. Bernatchez, L. and C. Landry, *MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?* J Evol Biol, 2003. **16**(3): p. 363-77.
65. Relle, M. and A. Schwarting, *Role of MHC-linked susceptibility genes in the pathogenesis of human and murine lupus*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 584374.
66. Fujimoto, S., et al., *Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K.* Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(10): p. 1916-20.

67. Cao, Y., et al., *DRB1\*15 allele is a risk factor for PR3-ANCA disease in African Americans*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(6): p. 1161-7.
68. Watts, R.A., et al., *Epidemiology of vasculitis in Europe*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(12): p. 1156-7.
69. Jagiello, P., et al., *New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes*. Hum Genet, 2004. **114**(5): p. 468-77.
70. Hilhorst, M., et al., *HLA-DPB1 as a risk factor for relapse in ANCA-associated vasculitis - a cohort study*. Arthritis Rheumatol, 2016.
71. Heckmann, M., et al., *The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(7): p. 972-9.
72. Pieters, K., et al., *The - 564 A/G polymorphism in the promoter region of the proteinase 3 gene associated with Wegener's granulomatosis does not increase the promoter activity*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 266-70.
73. Abdgawad, M., et al., *Increased neutrophil membrane expression and plasma level of proteinase 3 in systemic vasculitis are not a consequence of the - 564 A/G promotor polymorphism*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(1): p. 63-70.
74. P.A. Lyons, T.F.R., S. Trivedi, J.U. Holle, R.A. Watts, D.R. Jayne, B. Baslund, P. Brenchley, A. Bruchfeld, A.N. Chaudhry, J.W. Cohen Tervaert, P. Deloukas, C. Feighery, W.L. Gross, L. Guillevin, I. Gunnarsson, L. Harper, Z. Hruskova, M.A. Little, D. Martorana, T. Neumann, S. Ohlsson, S. Padmanabhan, C.D. Pusey, A.D. Salama, J.S. Sanders, C.O. Savage, M. Segelmark, C.A. Stegeman, V. Tesar, A. Vaglio, S. Wiczorek, B. Wilde, J. Zwerina, A.J. Rees, D.G. Clayton and K.G. Smith, *Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis*. The New England journal of medicine 2012(367): p. 214-23.
75. Xie, G., et al., *Association of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) with HLA-DPB1\*04 and SEMA6A gene variants: evidence from genome-wide analysis*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(9): p. 2457-68.
76. McInnis, E.A., et al., *Dysregulation of autoantigen genes in ANCA-associated vasculitis involves alternative transcripts and new protein synthesis*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(2): p. 390-9.
77. Landy, A., *Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 913-49.
78. Hartley, J.L., G.F. Temple, and M.A. Brasch, *DNA cloning using in vitro site-specific recombination*. Genome Res, 2000. **10**(11): p. 1788-95.
79. Gupta, D., et al., *Differentiation and characterization of myeloid cells*. Curr Protoc Immunol, 2014. **104**: p. Unit 22F 5.
80. Mathews, D.H., *RNA Secondary Structure Analysis Using RNAstructure*. Curr Protoc Bioinformatics, 2014. **46**: p. 12 6 1-25.
81. Relle M., B.M., Foehr B., Schwarting A., *Translational Studies on the (patho)physiological role of an alternative human Proteinase 3 Variant in Hematopoiesis and Carcinogenesis*. Internist, 2013(54): p. 39.
82. Relle M., F.B., Becker M., Menke J., Schwarting A., *Investigations on the physiological and pathological Role of an alternative Transcript of the Wegener-Autoantigen-Proteinase 3*. Z Rheumatol, 2013(72).
83. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
84. Mariner, P.D., et al., *Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock*. Mol Cell, 2008. **29**(4): p. 499-509.
85. Genomes Project, C., et al., *A map of human genome variation from population-scale sequencing*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1061-73.
86. Genomes Project, C., et al., *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 56-65.

87. Genomes Project, C., et al., *A global reference for human genetic variation*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 68-74.
88. Lutz, P.G., et al., *Myeloblastin is a granulocyte colony-stimulating factor-responsive gene conferring factor-independent growth to hematopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1601-6.
89. Collins, S.J., K.A. Robertson, and L. Mueller, *Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR-alpha)*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2154-63.
90. Sumi, D., K. Suzukawa, and S. Himeno, *Arsenic trioxide augments all-trans retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells*. Life Sci, 2016. **149**: p. 42-50.
91. Larsson, K., M. Lindstedt, and C.A. Borrebaeck, *Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells*. Immunology, 2006. **117**(2): p. 156-66.
92. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-41.
93. Orom, U.A., et al., *Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells*. Cell, 2010. **143**(1): p. 46-58.
94. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
95. Wilming, L.G., et al., *The vertebrate genome annotation (Vega) database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D753-60.
96. Qin, Y., et al., *Effect of DAPK1 gene on proliferation, migration, and invasion of carcinoma of pancreas BxPC-3 cell line*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(11): p. 7536-44.
97. Chen, L., et al., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 393-403.
98. Inohara, N., et al., *harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L)*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1686-94.
99. Dolezalova, D., et al., *MicroRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2012. **30**(7): p. 1362-72.
100. Ventura, A., et al., *Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 661-5.
101. Fabbro, M., et al., *BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31251-8.
102. Kellogg, D.R., *Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 24): p. 4883-90.
103. Wang, F., et al., *Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis*. Oncogene, 2005. **24**(24): p. 3875-85.
104. Lefkimmatis, K., et al., *p73 and p63 sustain cellular growth by transcriptional activation of cell cycle progression genes*. Cancer Res, 2009. **69**(22): p. 8563-71.
105. Allocati, N., C. Di Ilio, and V. De Laurenzi, *p63/p73 in the control of cell cycle and cell death*. Exp Cell Res, 2012. **318**(11): p. 1285-90.
106. Hellawell, G.O., et al., *Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease*. Cancer Res, 2002. **62**(10): p. 2942-50.
107. Zeng, L., et al., *Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein*. J Biol Chem, 2012. **287**(34): p. 29125-33.
108. Imtiyaz, H.Z., et al., *The Fas-associated death domain protein is required in apoptosis and TLR-induced proliferative responses in B cells*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6852-61.

109. Hagenbuchner, J., et al., *The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 6904-12.
110. Barblu, L., et al., *Reduction of death receptor 5 expression and apoptosis of CD4+ T cells from HIV controllers*. Clin Immunol, 2014. **155**(1): p. 17-26.
111. Wang, L., et al., *Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy*. Pharmacol Ther, 2015. **151**: p. 141-51.
112. Nuchprayoon, I., et al., *An enhancer located between the neutrophil elastase and proteinase 3 promoters is activated by Sp1 and an Ets factor*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1085-91.
113. A., R.M.F.B.S., *Epigenetic Aspects of Systemic Lupus Erythematosus*. Rheumatol Ther, 2015(2): p. 33-46.
114. Wong, E.T., et al., *Changes in chromatin organization at the neutrophil elastase locus associated with myeloid cell differentiation*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3730-6.
115. Clave, E., et al., *Donor-recipient polymorphism of the proteinase 3 gene: a potential target for T-cell alloresponses to myeloid leukemia*. J Immunother, 1999. **22**(1): p. 1-6.
116. Cooley, P., et al., *Analysis of a biomarker for Wegener's granulomatosis*. Int J Immunogenet, 2005. **32**(4): p. 237-43.
117. Hasilik, A., *The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation*. Experientia, 1992. **48**(2): p. 130-51.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

|                                                |                                                           |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 1 $\alpha$ ,25Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>            |
| A1AT                                           | alpha ( $\alpha$ )-1 Antitrypsin                          |
| Aa                                             | Aminosäure (amino acid)                                   |
| AAV                                            | ANCA assoziierte Vaskulitiden                             |
| ACK                                            | Ammoniumchlorid                                           |
| ADP                                            | Adenosindiphosphat                                        |
| AK                                             | Adenylat-Kinase                                           |
| AMP                                            | Adenosinmonophosphat                                      |
| AML                                            | akute myeloische Leukämie (acute myeloid leucemia)        |
| ANCA                                           | antineutrophiler cytoplasmatischer Antikörper             |
| as                                             | antisense                                                 |
| ATCC                                           | American Type Culture Collection                          |
| ATP                                            | Adenosintriphosphat                                       |
| ATRA                                           | all-trans Retinsäure (all-trans retinoic acid)            |
| Bp                                             | Basenpaare                                                |
| bzgl.                                          | Bezüglich                                                 |
| bzw.                                           | beziehungsweise                                           |
| ca.                                            | circa                                                     |
| c-ANCA                                         | cytoplasmatische ANCA                                     |
| cDNA                                           | complementary DNA                                         |
| CG                                             | Cathepsin G                                               |
| CML                                            | chronische myeloische Leukämie (chronic myeloid leucemia) |
| CO <sub>2</sub>                                | Kohlenstoffdioxid                                         |
| DHS                                            | DNase I hypersensitive sites                              |
| DNA                                            | Desoxyribonukleinsäure                                    |
| DNase                                          | Desoxyribonuklease                                        |
| dNTP                                           | 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat                         |
| DMEM                                           | Dulbecco's Minimum Essential Medium                       |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |                                                                                   |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| DMSO   | Dimethylsulfoxid                                                                  |
| DPPI   | Dipeptidyl Peptidase I                                                            |
| DSMZ   | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen                            |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure                                                      |
| EGPA   | Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis                                        |
| ELISA  | enzyme linked immunosorbent assay                                                 |
| ER     | Endoplasmatische Retikulum                                                        |
| et al. | et alia (und andere)                                                              |
| EtOH   | Ethanol                                                                           |
| evtl.  | eventuell                                                                         |
| FCS    | fötales Kälberserum                                                               |
| g      | Erdbeschleunigung                                                                 |
| G-CSF  | Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (Granulocyte Colony stimulating factor) |
| GFP    | green fluorescent Protein                                                         |
| GPA    | Granulomatose Polyangiitis                                                        |
| GWAS   | Genomweite Assoziationsstudie (Genome wide association study)                     |
| h      | Stunde                                                                            |
| HBSS   | Hanks' Balanced Salt Solution                                                     |
| h-TEZ  | humane Tubulus Epithelzellen                                                      |
| hu     | human                                                                             |
| kb     | Kilobasen                                                                         |
| kb     | Kilobasenpaare                                                                    |
| kDa    | Kilodalton                                                                        |
| μ      | Mikro                                                                             |
| M      | Molar                                                                             |
| MAF    | Minor allele frequency                                                            |
| MDSC   | Myeloid derived supressor cells                                                   |
| mg     | Miligramm                                                                         |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |                                                                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------|
| MHC    | Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex) |
| min    | Minuten                                                             |
| ml     | Mililiter                                                           |
| MPA    | Mikroskopische Polyangiitis                                         |
| MPO    | Myeloperoxidase                                                     |
| mRNA   | messenger RNA                                                       |
| n      | nano                                                                |
| NE     | neutrophile Elastase                                                |
| NSP    | neutrophile Serinproteasen                                          |
| OD     | Optische Dichte                                                     |
| OR     | Odds Ratio (Quotenverhältnis)                                       |
| p      | Signifikanzwert                                                     |
| p-ANCA | perinukleäre ANCA                                                   |
| PBMC   | peripheral blood mononuclear cells                                  |
| PBS    | phosphate buffered saline                                           |
| PCR    | Polymerase-Kettenreaktion                                           |
| PMA    | Phorbol-12-myristat-13-acetat                                       |
| PR3    | Proteinase 3                                                        |
| PRTN3  | Gen, welches für die Proteinase 3 kodiert                           |
| RFLP   | Restriktionslängen Polymorphismus                                   |
| RNA    | Ribonukleinsäure                                                    |
| rpm    | rounds per minute                                                   |
| RT     | Raumtemperatur                                                      |
| RU     | relative Unit                                                       |
| s      | sense                                                               |
| SNP    | single nucleotide polymorphism, Einzelbasenaustausch                |
| SLE    | systematischer Lupus erythematodes                                  |
| TAE    | Tris-Acetat-EDTA                                                    |
| TEZ    | Tubulus-Epithelzellen                                               |

## Abkürzungsverzeichnis

|      |               |
|------|---------------|
| u.a. | unter anderem |
| ü.N. | über Nacht    |
| V    | Volt          |
| VE   | voll entsalzt |

## 7. Danksagung

Ich danke [REDACTED] für die freundliche Betreuung der Experimente und die Bereitstellung des Themas. Die Zusammenarbeit hat mir viel Spaß gemacht. Auch wenn die Zeit mal knapp war, war er immer bereit mir zu helfen. Durch ihn habe ich die Welt der Wissenschaft mit allen Vor- und Nachteilen erfassen können und auch die Gespräche abseits des Doktorarbeitsthemas waren immer interessant. Ich danke ihm ebenfalls für die kritische Durchsicht und Kommentierung des Manuskripts.

Ebenfalls danke ich [REDACTED] für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Durch die interessanten Einblicke in dieses Feld und andere medizinische Felder der Rheumatologie, habe ich vieles gelernt. Auch für ein Gespräch war er immer bereit.

Der ganzen AG danke ich für die Freundlichkeit, die mir entgegen gebracht wurde. Es war eine schöne Zeit für mich in diesem Institut. [REDACTED] danke ich besonders für die Unterstützung im Laboralltag und der Organisation des Labors vor Ort.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die mentale Unterstützung und die schöne Zeit, in der ich mich von der Arbeit entspannen konnte. [REDACTED] danke ich für die Durchsicht und Kommentierung des Manuskripts.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Familienname: Föhr  
Vorname: Bernd  
Geburtsdatum/-ort: 08.07.1987/Speyer  
Familienstand: ledig  
Nationalität: Deutsch

### Schulische Bildung

08/1994 – 07/1997 Grundschohle Schwegenheim  
08/1997 – 03/2006 Friedrich-Magnus-Schwerd-Gymnasium, Speyer  
**Abschluss: Abitur**  
Note gut (2,2)

### Weiteres

03/2006 – 12/2006

### Wehrpflicht

### Hochschulbildung

04/2007 – 09/2012 **Studium der Biologie,**  
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
Studienschwerpunkte: Zoologie, Genetik, Biochemie,  
Anthropologie  
**Diplom:** Note sehr gut  
Thema: „Isolierung des Achetylcholinbindeproteins von  
biomphalaria glabrata“

### Berufliche Bildung

12/2012 – heute

### Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Promotion

Universitätsmedizin Mainz, I.Medizinische Klinik und Poliklinik,  
AG Prof. Schwarting  
Thema: „Translationale Untersuchungen der Proteinase 3  
induzierten Entdifferenzierung von Zellen“

## 9. Anhang

### 9.1. SEQUENZEN

#### 9.1.1. PRIMER

| Primer               | Sequenz                                                        | Temp. °C |
|----------------------|----------------------------------------------------------------|----------|
| huPR3-altProm-Hind-L | 5'-TTT <b>AAG CTT</b> CTG CGT CTT AAA AGC CTT CC-3'<br>HindIII | 68       |
| huPr3-Prom1c-s       | 5'-TTT <b>TAA GCT T</b> GGG GAT TAC AGG CGT GAG-3'<br>HindIII  | 67       |
| huPR3-Prom2-s        | 5'-TTT <b>TAA GCT T</b> CCG ACC TGG TCT GCG TCT TAA-3'         | 69       |
| huPR3-Prom3b-s       | 5'-TTT <b>TAA GCT T</b> GCG CTG GGC GCT GAG TCC TTC C-3'       | 65       |
| huPR3-Prom4-s        | 5'-TTT <b>TAA GCT T</b> GGA GAC GGA GGC TCG GAG AG-3'          | 72       |
| huPR3-Prom-as        | 5'-TTT <b>TGG ATC</b> CTG TAG GGC CGG GAG TGT G-3'<br>BamHI    | 73       |
| huPR3-altProm-BamH-L | 5'-TTT <b>TGG ATC</b> CAG AAA CAC CTG AGC CAC CGA-3'<br>BamHI  | 72       |
| PR3-Gate-L-s         | 5'-CAC CAT GGC TCA CCG GCC CCC CAG-3'                          | 75       |
| PR3-Gate-K-s         | 5'-CAC CAT GGC CTC CCT GCA GAT GCG-3'                          | 72       |
| PR3-Gate-Mut-s       | 5'-CAC CAT CGC CTC CCT GCA GAT CCG-3'                          | 72       |
| PR3-Gate-LK-as       | 5'-TCA GGG GCG GCC CTT GC CTC CAC-3'                           | 75       |
| huPR3- Prom s        | 5'-AGG GTG CTA GGC ATC ATC C-3'                                | 59       |
| huPR3- Prom as       | 5'-TGG ACC TCG TGG TGG ATA TT-3'                               | 58       |
| huPR3- Intr s3       | 5'-AGG TCC CTA TCC TGA GGG TGA T-3'                            | 64       |
| huPR3- Intr as3      | 5'-AAG GTG CCT CCG CAG AAG TG-3'                               | 63       |
| huPR3- PolyA s       | 5'-CCG CCT TTT CCC TGA CTT CT -3'                              | 60       |
| huPR3- PolyA as      | 5'-GTT AGA ACC CAC AGC CAC GA -3'                              | 60       |
| huPR3- Exon 2/3 s    | 5'-GCT GAG TCC TTC CCA CCA G-3'                                | 62       |
| huPR3- Exon 2/3 as   | 5'-CAG TGG GTG CTC AAT GAA TG-3'                               | 58       |
| huPR3- Exon 4 s      | 5'-GTT TTG AGG TGG TGG GTG TG-3'                               | 60       |
| huPR3- Exon 4 as     | 5'-GCA TGA AGC CAC ACA GCT AA-3'                               | 58       |
| huPR3- Exon 5 s      | 5'-TCT GAA ACA GCT GTG GCT ACC-3'                              | 61       |
| huPR3- Exon 5 as     | 5'-GGA AGA GCT GCT TCT GTC CA-3'                               | 60       |
| huPR3-norm-s         | 5'-TGC TGC TGG CCT TGC TGC TGA G-3'                            | 64,4     |
| huPR3-norm-as        | 5'-CCG AGAAGTGCTGCTGGGTGGG-3'                                  | 64,5     |
| huPR3-kurz-s         | 5'-GGG AGA CGG AGG CTC GGA GAG G-3'                            | 71       |

|                 |                                                                                                                 |      |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| huPR3-kurz-as   | 5'-AGA AGT GCT GCT GGG TGG GCT C-3'                                                                             | 68   |
| huPR3-total-s   | 5'-ATC CAG CTG AGC AGC CCA GCC AA-3'                                                                            | 65,7 |
| huPR3-total-as  | 5'-CGT GGA ACG GATCCA GTC CAC GTA-3'                                                                            | 63,6 |
| huPR3-CTerm s2  | 5'-TTT <b>TTC CGG ATT</b> CGT CCC TCG CCG CAA G -3'<br>Kpn2I                                                    | 73   |
| huPR3-CTerm as2 | 5'-TTT T <b>AA GCT TTC</b> AGG GGC GGC CCT TGG C-3'<br>HindIII                                                  | 73   |
| huPR3-CTerm s3  | <b>Kpn2I</b><br>5'- <b>CCG GAG</b> ACT GGA TCC GTT CCA CGC TGC GCC<br>GTG TGG AGG CCA AGG GCC GCC CCT GAA -3'   | 95   |
| huPR3-CTerm as3 | <b>HindIII</b><br>5'- <b>AGC TTT</b> CAG GGG CGG CCC TTG GCC TCC ACA<br>CGG CGC AGC GTG GAA CGG ATC CAG TCT -3' | 94   |

Tab 3: Alle für diese Arbeit benutzten Primer für eine PCR

### 9.1.2. GENSEQUENZ

NCBI Reference Sequence: NC\_000019.9

7191 Bp DNA

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..7191
                        /organism="Homo sapiens"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /db_xref="taxon:9606"
                        /chromosome="19"
     gene              1..7191
                        /gene="PRTN3"
                        /gene_synonym="ACPA; AGP7; C-ANCA; CANCA; MBN; MBT;
                        NP-4; NP4; P29; PR-3; PR3"
                        /note="proteinase 3;
     mRNA
join(1..85,2477..2642,2909..3050,5163..5393,6815..7191)

     CDS
join(25..85,2477..2642,2909..3050,5163..5393,6815..6985)
ORIGIN
      1 cgtgggtgca ccctggaccc caccatggct caccggcccc ccagccctgc cctggcgctcc

```

```

61  gtgctgctgg ccttgctgct gagcgggtgag tgagccacgt gcccatccat ccagcctcca
121  ggccccgggtg gattgtgggg aatatatccac cagcaggtcc atccaaagcc cttctggcac
181  agctgggggaa actgaggcag ggtcagggga gactccactc actgctcggg accaacgctt
241  gcaggggttg ggaggacaag ggcaaggggg agccctggcc atttgactca gttgcctatc
301  tgtaaaacgg gcaaaaccca gcccttcctt cctgaggagc tgttttggga attagctagt
361  aacaggcgaa ttcctggaca gcaccagcc ttcagcaaat gctcagtga tatgcatgaa
421  tgaatgaatg agtgaatgaa tgagtgaagt agtgaatgag tgaacaaatg aatgagtga
481  tgaatcaatg agtgaatgaa tgaatgaagt aatgagtga tgaatgaacg aatgaatgag
541  tgaatgaatc aatgagtga tgaatgaatg agtgaatgag tgaatgaatg agtgaatgag
601  tgaatgaatg aacgaatgaa tgagtgaatg aatgaatgag tgagtgaatg aaagggtcga
661  ggagttagtg atgctggaat caggggaaga agagagcatg ggccccctca ggtccctatc
721  ctgaggggtga ttttcttttt cttttctttt tttttttttt tgagacggag tctcgccctg
781  tcgcccaggc tggagtgcag tggcgcgatc tcggctcact gcaagctcag cctcccggtt
841  tcacgccttt ctctgcctc agcctcccg gtagctggga ctacaggcgc ccaccaccat
901  gcctggataa ttttttgtaa tttttgtaga gacgggggtt caagggtgta gccaggatgg
961  tctcgatctc ctgacttcgt gatccgcctg cctcagcctc ccaaagtgtt gggattacag
1021 gcgtagacca ccgcgcctgg cccttttttt ttcttttttt aaacggaatc ttgctctgtc
1081 gccagggctg gagtgcagtg gtgcaatctc agtttactgc agcctcagcc tctgggggtc
1141 aatgattctt cctgcctccg cctcttgagt agctgggatt acaagcacac accaccacac
1201 ctggctagtt tttgtatttt tagtagagat ggggtttcac cacgttggtc aggctggtct
1261 cgaactcctg acctgagggg gattttcaat gcctcagttt gttcatctgc aaaatgggtc
1321 tctttgttgg ctgatttttt tttttttttt tgcttctttt tttttatttt gttttgtttt
1381 gtttttttga gatgggggtc cactcaggca tgagccactg cgcccaggat tttttttttt
1441 tttttttttt tttgagacag aatctcactc tgttgcccag gctggagtgc agtgggtgta
1501 tctcggtca ctgcaacctg tgccctcctg gttcaagcga ttctcctgcc tcagcctccc
1561 aggcagctga gattacaggt gogaaccacc acacctggct aatttttttt tttttttttt
1621 ttgagacgga gtgtcattct gttgccaggc tggagtgcag tggggcgatc ttggctcacc
1681 acaacctccg ctctcctgggt tcaagcgatt ctctgcgtc aacctccgga gtagctggga
1741 ctacaggcac gtgccaccac gccagctaa tgtttgtatt ttttagtagag acagggtttc
1801 accatgttgg ccaggatggt ctccatctct tgacctcagg tgatccaccc acctcggcct
1861 ccaaagtat tgggattaca ggcgtggggc aaccgcaccc gaccaatttt tctgcttctt
1921 taaaaacatt tttttaaatt ttgttttaga gacagggtct tgctctgttg ccagggtg
1981 agtgcagtgg tgtgatctca gttcactgca gccttgacct cctggggtca agcgatcctc
2041 cctcctcagc ctcccaagta gctgggacga cagggtgcaca ccaccatgcc tggctaattt
2101 taaaattttt tgtagagatg gggctctcac aattttgccc aggctgggtc tgaactcctg
2161 agctcaaggg agcctcctgc ctcggcctcc caaagtgttg ggattacagg cgtgagccac
2221 tgcaccagc cacctggtct gcgctctaaa agccttcctg actctcagga ctgaaagctg
2281 ccaccagggc gcctttggaa atcgctgtaa ttataacccc ccggcctgg gcgctgagtc
2341 cttcccacca gccagcaggc actgaccggg ttgcagatcg ggagacggag gctcggagag
2401 gccaggggc tgctctgcca tccccctttt ccctgcagcc tgggggctcc ctgacgcctg
2461 gactcccccc ctgcagggtg tgcccgagct gcggagatcg tgggcgggca cgaggcgag
2521 ccacactccc ggccctacat ggccctcctg cagatgcggg ggaacccggg cagccacttc
2581 tgcgagggca ccttgatcca cccagcttc gtgctgacgg ccgcgcactg cctgcgggac
2641 atgtgagcgg ccgcctccac acccctgtcc gcccgcccgc cctcttcct ccagccctgg
2701 cccggccact gtccctctgc ccggggagga ccagctaag ccccgctctg agacccag

```

2761 ccccgcgcgcg gtggggcagtt ctgggggggag gcccgggggca gggtcgcccga gggagggggtc  
 2821 tgggggctgca ccgcggcctc ggggaagggcc ggctgtgggc ggcggcgagt gtccagggcg  
 2881 ccgaggagtg accacccac ccccgcgagac ccagcgccct ggtgaacgtg gtgctcggag  
 2941 cccacaacgt gcggacgcag gagccccacc agcagcactt ctcggtggct caggtgtttc  
 3001 tgaacaacta cgacgcggag aacaaactga acgacgttct cctcatccag gtgggcgggc  
 3061 agggccgcga gggctcggag gggcacggcc agaggggtcc gggaccccca ttctgcagc  
 3121 cagcattcat tgagcaccca ctgtataacc ggccacgacc gagggcgctg cagcctgggt  
 3181 ccagtggcac tggccggggg agaccgtcc ttggacacca ggccactcct cctccccgcc  
 3241 tctccccgcg ccgcgctct ccccgccccg cgctctctcc ctgcgcgct ccccccgcc  
 3301 cgcgctctc ccccgccccg gctctctccc cgcccgcgcc tctcccttgc ccgccccctc  
 3361 cccctgcccc cgctctctcc ctgcatgcct tcccttggc cgccccctc cctgccccg  
 3421 gctctctccc tgcgcgctc tccctgccc gcgctctcc ccggcgct cctctcccc  
 3481 gcccgcgct ccccccgcc cgcgctctc cctgcgcgc ctctccctg cctgccccctc  
 3541 tccctgctt gcgctctc cggtgtgtg gttccccag aaagccaggt gccctgcct  
 3601 cctccggcg cctccctgac ctactggaa gtggcgagga cagccacagc cctccccgat  
 3661 tctactgtt cactgaacc gctgtctc ctacttcat gggccctcct agcctcctcc  
 3721 caccagaaa gatcagctcc ccagggcaga ggattttgt ctgtgttgt cgttattgga  
 3781 ctcatgtgg ttagaacggg actgggcata caggtggtgc tcagtaagt cttgggggtg  
 3841 ggcactgtg ctacgcctg tactccag actttgggag gctgggatg gaggatcact  
 3901 tgaggccagg agtttgggag cagcctgacc aacctagtga gacccatct ctataaaaga  
 3961 cattttttt tttttttt ttagacagag tctactcag tcatccaggc tggagtgcag  
 4021 tgggtgcaatc tcggctcact gccacctctg ccttccaggt tcaagtaatt ctctgcctc  
 4081 agcctcctga gtagctggga ttacaggcat gcaccaacac gcttggtctaa ttttgtatt  
 4141 tttagtagag acggtgttt gccacgttgg ccaggctgg ctcgaactcc tgacctcaag  
 4201 tgatctgctc tctcagcct cccaaagtgc tgggattata ggagagagcc accgctcca  
 4261 gcctacaaaa gaaaaattta aaaatcaacc gggcatggta gcacacgcca agccactcat  
 4321 gagctgagat gggaggatca cttgagccca ggaggttgag gctgcagtga gctgtgatca  
 4381 tgccaccaca ctccagcctc ggcgacagag caagacccca tctcaaaaaa aaagtgttt  
 4441 gaagatgaat gaatgggcca gggcggtg ctgtaatccc agcactttgg gaggccgagg  
 4501 cgggcggatc gcctgaggtc aggagtttga gaccagcctg atcgatatg caaacccgt  
 4561 gtctactaaa aatacaaaaa ttagctgggc gtgacggcag gtgtctgtag tcccagctac  
 4621 ttgggaggct gaggcagcag aattgcttga acccaggagg cagaggttgc agtgagccga  
 4681 gattgtgcca ctgcactcta gcctgggcaa caagagcgaa actccatctc aaaaaaaaaa  
 4741 aaaagaaaag aaagaaagaa agaaaacatg aatgaatggc cgggcactat ggctcacact  
 4801 tgtaatcca gcactttcgg aggtgagga aggcagatca cttgaggttg ggagtttgag  
 4861 accaggctgg ccacctcacc caatgggatg gctccgggag gttccagtga gccgagatca  
 4921 cgccactgca ttccagcctg ggtggcagag caagactcca tctcaaaaga aagaaagaag  
 4981 gaaagaaaat gaatgaatac aatagtaca aatgggacaa agggggtcgt ggggcccagg  
 5041 cggagggagc ggcacccgcg gcgttttgag gtggtgggtg tgggtgggtg ggtgggagg  
 5101 cggccccggc ggccaccgtg acctggaagc agcgtctcac cgccgctgc cttctgcccc  
 5161 agctgagcag ccagccaac ctcagtgcct ccgtcgccac agtccagctg ccacagcagg  
 5221 accagccagt gccccacggc acccagtgc tggccatggg ctggggccgc gtgggtgccc  
 5281 acgaccccc agcccaggtc ctgcaggagc tcaatgtcac cgtggtcacc ttcttctgcc  
 5341 ggccacataa catttgact ttcgtccctc gccgaaggc cgcatctgc ttcgtaagta  
 5401 accgtgcccc cccccgggc accgggctgc catgagggga ggaggcggc ggccagggtt

## Anhang

5461 ccacgccacc tcttagctgt gtggcttcat gctgtgcctc agtctcccca cctggaaggt  
5521 gggcacaccc aacacccaac gggcaggctc agcggggtgg gggcgctcac attgcacctg  
5581 gctgcttggg tgggtctggg ggttccctgc cccccactcc cctctaggac cacaggaagg  
5641 tgtgggagac ccatccgcc tcaccggcgg ccccttccag aatccaggac tccaggatc  
5701 cagcgggagg ccataaatg cccagttcct acgaaagacc tcagcccctc cctgctcaca  
5761 ctttttgttt gtttttgaga cggagtgtcg ctctgttgtc caggctggag tgcagtgggtg  
5821 agatctcagc tcaactgcaac ctccacctcc caggttcaag gtattctcct gcctcagcct  
5881 cctgagtaac taggtgcaca ggtacctgcc accgtgcctg gctaattttt ttggtatttt  
5941 tagtagagat gaggtttctc catgttgacc aggtggtct tgaactcctg gcatcaagtg  
6001 atgcctggct ggtgctcaca ctttttaaag aaaattccag gccagcagtg gtggctcacg  
6061 cctgtaatct cagcactttg ggaggccaaa gcggaaggat cttttgagtc caggagtcca  
6121 agaccagcct gggcaacata gcagggtggc atctctacaa ataattttaa tattagctgg  
6181 gcatggtgat gtgagcctgt agggccagct actcaggagg ctaaggcagg aggatcactt  
6241 gagcctgggg agttcgagg tgcagtgagc tatgattgtg ccactgcact ccagcctgga  
6301 gaacagagcg agaccctgtc tcgagagaaa gacagccagc tactcgggag gccgaggcag  
6361 gagaatcact tgaaccggg aggcagaggt tgcagtgagc cgagatcacg gcaactgcact  
6421 ccagcctggg tgacagagcg agactctgtc gcaaacaaaa caaaaacaaa aaaaaacaaa  
6481 aaaaaaggag aaagaaagaa agagatagag agagaaagaa agaagaaaga aagaaaaaga  
6541 gagaaagaaa gaaagaaaga aagaaaaaga aagagagaga gagagagaga gagagagaaa  
6601 gaaagaaaga aagttccata ttggaagcat ttattctga aacagctgtg gctaccccag  
6661 ccccttccct ggctgcctgg ggccagcccg ggtgactggc tgtccccatc ctcccgggag  
6721 actcagggtg cccctgatgg gtgactggcc gtccccatcc tccagggaga ctcagggtggc  
6781 ccctgatggg tgactggccg tccctgtcct ccaggggagac tcagggtggcc ccctgatctg  
6841 tgatggcatc atccaaggaa tagactcctt cgtgatctgg ggatgtgcca ccgcctttt  
6901 ccctgacttc ttcacgcggg tagccctcta cgtggactgg atccgttcca cgctgcgccg  
6961 tgtggaggcc aaggggccgc cctgaaccgc ccctcccaca gcgctggccg ggaccccag  
7021 cctggctcca aaccctcgag gcggatcttt ggacagaagc agctcttccc cgaacactgt  
7081 ggcgtccggg acggccccac ccgtccccc acactccctc ccacggggct ccgggagaca  
7141 ggccggccct gcacctcacc ccaccgtgac ctcaataaac gttgaaactc c

//

Quelle:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000019.9?report=genbank&from=840985&to=848175](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000019.9?report=genbank&from=840985&to=848175)

(Stand: 01.02.16)

**9.1.3. ENZYM PRIMÄRSTRUKTUR**

LOCUS CAA39203 254 aa linear PRI 14-NOV-2006

DEFINITION proteinase 3 [Homo sapiens].

ACCESSION CAA39203

VERSION CAA39203.1 GI:1335280

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (residues 1 to 254)

| FEATURES    | Location/Qualifiers                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Protein     | 1..254<br>/product="proteinase 3"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| sig_peptide | 1..24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| mat_peptide | 27..254<br>/product="proteinase 3"                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Region      | 27..245<br>/region_name="Tryp_SPc"<br>/note="Trypsin-like serine protease; Many of these are synthesized as inactive precursor zymogens that are cleaved during limited proteolysis to generate their active forms. Alignment contains also inactive enzymes that have substitutions of the catalytic triad...; cd00190"<br>/db_xref="CDD:29152" |
| Site        | 27<br>/site_type="cleavage"<br>/db_xref="CDD:29152"                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Site        | order(70,117,202)<br>/site_type="active"<br>/db_xref="CDD:29152"                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Site        | order(196,217,219)<br>/site_type="other"<br>/note="substrate binding sites [chemical binding]"<br>/db_xref="CDD:29152"                                                                                                                                                                                                                           |
| CDS         | 1..254<br>/gene="HUMPR-3"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

ORIGIN

```
1 rhrppspala svllallllsg aaraaeivgg heaqphsrpy maslqmrngp gshfcggtli
61 hpsfvltaah clrdipqrlv nvvlgahnvr tqeptqqhfs vaqvflnnyd aenklndvll
121 iqlsspanls asvatvqlpq qdqpvphtg clamgwgrvg ahdppaqvlq elnvtvvtff
181 crphnictfv prrkagicfg dsggplicdg iiqgidsfvi wgcattrlfpd fftrvalyvd
241 wirstlrrve akgp
```

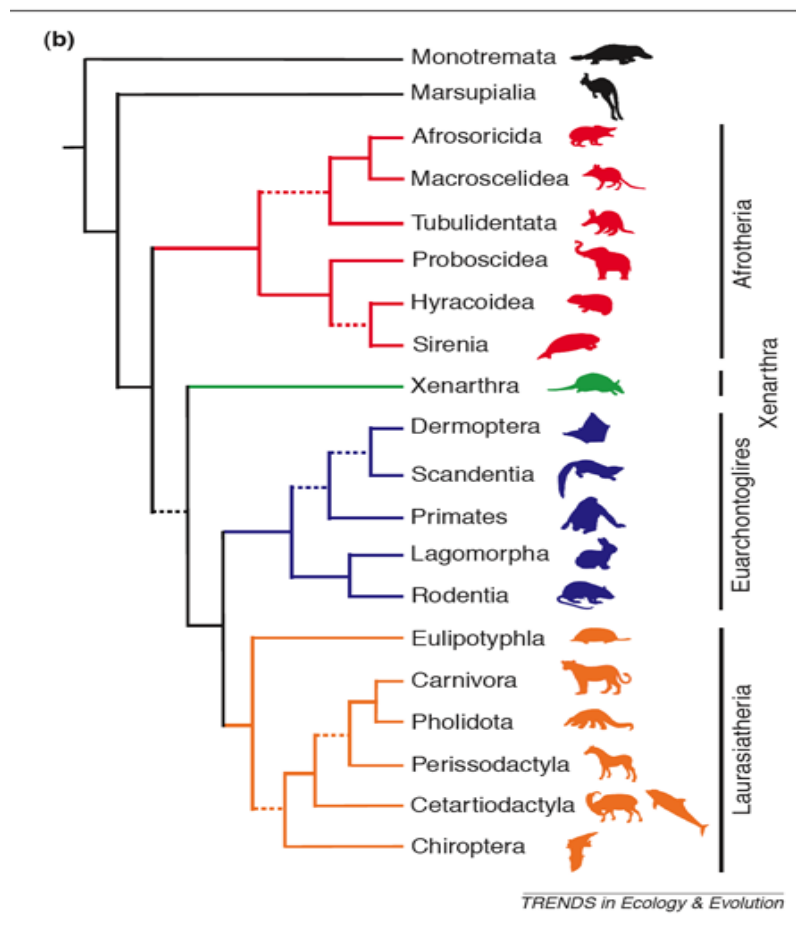
Quelle:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA39203.1>

(Stand: 01.02.16)

## 9.2. STAMMBÄUME

### 9.2.1. KLADOGRAM DER SÄUGETIERE BASIEREND AUF GENETISCHEN BEFUNDEN



Quelle: Trends in Ecology and Evolution. 19: 430-438.

## 9.2.2. Verwandtschaft der APEA Gene innerhalb der Vertebraten

| Nodes              | Genes                      | Collapsed nodes         | Collapsed Alignments    | Expanded Alignments |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| ○ gene node        | Gene ID gene of interest   | ◀ collapsed sub-tree    | □ 0 - 33% aligned seq   | □ gap               |
| ■ speciation node  | Gene ID within-sp. paralog | ◀ collapsed (this gene) | ■ 33 - 66% aligned seq  | ■ aligned seq       |
| ■ duplication node |                            | ◀ collapsed (paralog)   | ■ 66 - 100% aligned seq |                     |
| ■ ambiguous node   |                            | ◀ (x10 branch length)   |                         |                     |
| ■ gene split event |                            | ◀ (x100 branch length)  |                         |                     |

Daten und Berechnung wurden mit Hilfe von <http://www.ensembl.org> erstellt (Stand: 01.07.2016).

