

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung von
Serin Protease Inhibitor of Kazal-type (SPINK) 7
in der menschlichen Haut

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Clemens Georg Ewald Weber
Kiel, 2019

Referenten

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. med. habil. Meyer-Hoffert, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Laudien, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf und Halschirurgie

Datum der mündlichen Prüfung: 29.01.2020

Inhaltsverzeichnis

Referenten	I
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	IV
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1. Die Haut.....	1
1.2. Aufbau der menschlichen Haut	1
1.3. Proteasen der Haut	3
1.4. Zielsetzung der Arbeit	5
2 Material und Methoden.....	6
2.1. Zellkultur.....	6
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	6
2.2.1. RNA-Isolierung	6
2.2.2. cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase.....	7
2.2.3. Polymerase Kettenreaktion	8
2.2.3.1. Standard-PCR	9
2.2.4. Gelelektrophorese	11
2.2.5. Real-Time PCR.....	12
2.2.5.1. Real-Time PCR der Keratinozyten-Differenzierungsreihe	13
2.2.5.2. Real-Time PCR von zytokin-stimulierten Keratinozyten.....	16
2.3. Immunologische Methoden	16
2.3.1. Immunhistochemie	16
2.3.1.1. Herkunft der Hautschnitte	17
2.3.1.2. Anfertigung der Schnittpräparate	17
2.3.1.3. Ablauf der immunhistochemischen Färbung	18
3 Ergebnisse.....	21
3.1. SPINK7 Expression Körpergeweben	21
3.2. Expression von <i>SPINK7</i> in differenzierten Keratinozyten.....	22
3.3. Immunhistochemie	24
3.3.1. Hautschnitte	24

3.4. Real-Time PCR stimulierter Keratinozyten	29
4 Diskussion.....	32
4.1. Ausblick	35
5 Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis.....	37
Anhang.....	40
Veröffentlichungen	43
Danksagung.....	44
Eidesstattliche Erklärung	45

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 3.1: <i>SPINK7</i> -mRNA Expression wird in verschiedenen menschlichen Geweben unterschiedlich exprimiert.	21
Abb. 3.2.1: Zunahme der <i>SPINK7</i> -mRNA Expression in menschlichen Keratinozyten mit zunehmender Differenzierungsdauer	22
Abb. 3.2.2: Zunahme der <i>SPINK7</i> -mRNA Expression mit steigender Differenzierungsdauer in menschlichen Keratinozyten	23
Abb. 3.3.6: Immunhistochemische Darstellung eines <i>SPINK7</i> -positiven 3D-Epidermis-Modells.....	24
Abb. 3.3.1: Immunhistochemische Darstellung <i>SPINK7</i> negativer, gesunder Haut des Oberschenkels.....	25
Abb. 3.3.2: Immunhistochemische Darstellung <i>SPINK7</i> -positiver Haut, beim Basalzellkarzinom.....	26
Abb. 3.3.3: Immunhistochemische Darstellung <i>SPINK7</i> -positiver Haut beim spinozellulären Karzinom	27
Abb. 3.3.4: Immunhistochemische Darstellung <i>SPINK7</i> -positiver Haut bei Ekzem.....	28
Abb. 3.3.5: Immunhistochemische Darstellung <i>SPINK7</i> -positiver Haut bei Psoriasis,	29
Abb. 3.3.1. Zunahme der relativen <i>SPINK7</i> -mRNA Expression in mit Interferon- γ und Interleukin-17A stimulierten Keratinozyten.....	31

Tabellen

Tab. 3.3: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung verschiedener Hautpräparate	40
---	----

Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	A.dest.
Abb.	Abbildung
cDNA	"complementary DNA"
DNA	engl. Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
L	Liter

M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	"messenger RNA"
µm	Mikrometer
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SPINK7	"Serine protease inhibitor of Kazal-type 7" identisch mit "Esophagus cancer related gene 2"
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Units

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidi

1 Einleitung

1.1. Die Haut

Die Haut ist mit circa. 2 m² eines der größten Organe des menschlichen Organismus. Sie dient als mechanische Schutzschicht, als Barriere gegen schädigende Sonneneinstrahlung, schützt den Körper vor Austrocknung und trägt entscheidend zur Thermoregulation des Menschen bei. Nicht zuletzt spielt sie mithilfe spezialisierter Zellen, sowie einer Reihe von Botenstoffen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr (Lüllmann-Rauch, 2006).

Die Haut ist somit essentiell für viele Körperfunktionen, sowie dem Schutz und der Interaktion mit unserer Umwelt.

1.2. Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut lässt sich grob in drei Schichten einteilen. Am tiefsten liegt die von Bindegewebssepten und Fett durchzogene Subkutis. Ihr schließt sich die vorwiegend bindegewebige Dermis an. Hierin liegen bis auf die sogenannten Merkel-Zellen, alle Sinneszellen der Haut. Sie beinhaltet auch die für die Thermoregulation wichtigen Blutgefäße. Über die Basallamina ist die Dermis mit der Epidermis, der äußersten Hautschicht verbunden. Die Epidermis selbst besteht neben wenigen anderen Zellen, vor allem aus Keratinozyten, die ein verhornendes Plattenepithel ausbilden. Diese wiederum ist in mehreren Schichten, die sich histologisch, sowie funktionell unterscheiden, angeordnet. Der Basallamina anliegend findet sich das *Stratum basale*, oberhalb davon *das Stratum spinosum*, gefolgt vom *Stratum granulosum*. Den Abschluss und somit die Oberfläche bildet das *Stratum corneum*. Im Bereich der Leistenhaut findet sich zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* noch das *Stratum lucidum*.

Das *Stratum basale* besteht aus einer Reihe prismatischer Zellen, mit direktem Kontakt zur Basallamina. Außerdem liegen in jener Schicht epidermale Stammzellen, welche für immer

neuen Nachschub an Keratinozyten sorgen. Intrazellulär findet man Zytokeratinfilamente, welche mechanische Stabilität vermitteln. Das *Stratum spinosum* besteht aus 2-5 Lagen polygonaler Zellen. Auffällig sind hier die Zell-Zell-Kontakte, welche über Desmosomen vermittelt werden.

Das *Stratum granulosum* besteht aus etwa 3 Lagen von Zellen, in denen die sogenannte Keratohyalin granula erkennbar ist. Diese ist zytoplasmatischen Ursprungs und Ausdruck der Differenzierung der Keratinozyten. Sie entsteht unter anderem durch das Profilagrin, welches für eine teilweise Aggregation von Zytokeratinfilamenten im Zytoplasma sorgt. In der äußersten Schicht, dem *Stratum corneum*, lassen sich lichtmikroskopisch kaum noch einzelne Zellen ausmachen. Vielmehr stellt es sich als homogene Schicht dar. Ihre Dicke variiert stark in Abhängigkeit von der Lokalisation. Palmar und plantar finden sich bis zu 100 Zelllagen, wohingegen am restlichen Körper circa 20 Lagen die Regel sind. In dieser Schicht besitzen die nun auch Korneozyten genannten Zellen, weder einen Zellkern, noch irgendwelche anderen Zellorganellen. Dafür hat sich zwischen den Zellen eine versiegelnde Ceramid-Lipidschicht gebildet, die als physikalische Barriere dient. Die Zellen selbst sind von einem sogenannten „Cornified Envelope“ umgeben. Dieser besteht aus Proteinen, wie z.B. dem Loricrin, welche sich innen an der Plasmamembran ablagern und durch membranständige Transaminasen kovalent mit dem Keratingerüst, sowie den Desmosomen vernetzt werden. Die Plasmamembran selbst, wird durch eine einschichtige Lage polarer Lipide ersetzt, welche die Verbindung zwischen dem Cornified Envelope und den interzellulären Ceramiden herstellt. Somit entsteht eine widerstandsfähige Barriere gegenüber der Außenwelt. Die Korneozyten lösen sich schließlich einzeln aus dem Zellverband am Rahmen der Abschuppung (Desquamation). Hierbei spielen Proteasen eine gewisse Rolle, da sie in der Lage sind, unter anderem die Zell-Zell-Kontakte zu spalten. Die Zeit die eine Zelle von der Entstehung bis zur Desquamation benötigt beträgt in etwa 4 Wochen (Lüllmann-Rauch, 2009).

1.3. Proteasen der Haut

Wie oben erwähnt, gibt es in der Haut Proteasen, also Enzyme, die andere Proteine bzw. Peptide spalten und sie somit aktivieren, deaktivieren oder ihre Funktion regulieren können. Eingeteilt werden die Proteasen dabei nach ihrer proteolytischen Domäne im aktiven Zentrum. Man unterscheidet Threonin-, Serin-, Aspartat-, Metallo-, Cystein- und Glutamatproteasen.

In der Haut gibt es eine Vielzahl solcher Proteasen, die zum Teil exogenen, also von der Mikroflora der Haut gebildet werden und zum anderen Teil endogenen Ursprungs sind, also von körpereigenen Zellen gebildet werden. Hierzu gehören unter anderem Kallikreine (KLK), Matriptase, Cathepsin D und Caspase-14 (Meyer-Hoffert, 2009). Eine besondere Rolle spielen die Kallikreine. Sie gehören zu einer Familie von mehreren Trypsin- bzw. Chymotrypsin-artigen Serinproteasen, deren Erbinformation in 15 Genen auf dem Chromosom 19.q13.4 in einem Gencluster kodiert ist (Avgeris et al. 2010). Sie kommen in vielen Organen vor und besitzen eine hohe Gewebsspezifität (Avgeris et al. 2010). Diesem Umstand ist es zu verdanken, dass sie zum Teil als Tumormarker fungieren, wie zum Beispiel KLK 3, das sogenannte Prostata-spezifische Antigen (Avgeris et al. 2010).

Es hat sich gezeigt, dass in der Haut vor allem die Aktivität der Serinproteasen, also auch der Kallikreine, für den Desquamationsprozess, sowie für die Barrierefunktion der Haut von entscheidender Bedeutung sind (Hachem et al. 2006). So weiß man, dass KLKs hauptsächlich für die Spaltung der Corneodesmosomen verantwortlich sind (Ekholm et al. 2000), einem entscheidenden Schritt bei der Desquamation. Die Aktivität der KLKs scheint also eine entscheidende Rolle für die Intaktheit der Haut zu spielen.

Reguliert werden die KLKs auf verschiedene Art und Weise. Dazu gehört der pH-Wert in dem sie sich befinden. Der physiologische pH-Wert der Haut von circa 5,5 reduziert die Aktivität der KLKs um mehr als 90% im Vergleich zu in vitro Bedingungen (Voegeli et al. 2009; Voegeli et al. 2011) Ebenso scheint der Zn^{2+} -Gehalt eine regulierende Wirkung auf die KLKs zu haben (Goettig et al. 2010). Neben den Einflüssen des Milieus, gibt es auch noch gezielte Regulationsmechanismen. Hierbei handelt es sich um andere Proteine, welche direkt Einfluss auf die Aktivität der KLKs nehmen. Hier gibt es zum einen eine irreversible Hemmung durch sogenannte SERPINE (Serineproteaseinhibitoren) (Goettig et al. 2010) und

zum anderen eine reversible durch sogenannte Serinprotease Inhibitoren vom Kazal Typ (SPINKs) (Mitsudo et al. 2003). Diese gehören zu einer Familie von Protease Inhibitoren, deren Erbinformation auf dem Chromosom 5q32 kodiert ist (Fischer & Meyer-Hoffert, 2013).

Der am besten untersuchte Vertreter der SPINK-Familie ist SPINK5 oder auch Lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor (LEKTI). Es konnte gezeigt werden, dass LEKTI neben einer ganzen Reihe von Kallikreinen (Egelrud et al. 2005) auch andere Proteasen, wie Trypsin, Cathepsin und Plasmin inhibiert (Mitsudo et al. 2003). Des Weiteren zeigten Untersuchungen, dass eine "Loss of function" Mutation im Gen, welches für dieses Protein kodiert, ursächlich für das autosomal-rezessiv vererbte Netherton Syndrom ist (Chavanas et al. 2000). Das Netherton Syndrom ist eine ichthyosiforme Dermatose, welche mit Haarschaftdefekten, Erythrodermie, atopischen Symptomen und einem Proliferationsdefizit einhergeht (Chavanas et al. 2000). Anhand von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die fehlende Expression von LEKTI zu einer gesteigerten Aktivität von KLKs in der Epidermis führt. Dies bewirkt eine Aktivierung von Entzündungswegen, wie die Aktivierung von Protease-activated receptor-(PAR)-2 und Stimulation von Thymic stromal lymphopoietin in der Haut (Briot et al. 2010) Es besteht in diesem Fall also ein direkter Zusammenhang zwischen der Unterfunktion eines Inhibitors, bzw. einer daraus resultierenden Überfunktion des Proteins, welches inhibiert werden soll und einer Erkrankung.

Ein weiteres Beispiel ist das KLK7. Es hat sich gezeigt, dass ein erhöhtes Aufkommen von KLK7 in der Haut zu Hyperkeratose, dermalen Entzündung, sowie Pruritus führt (Hansson et al. 2002). Außerdem wurde eine erhöhte Expression von KLK7 bei der atopischen Dermatitis (Voegeli et al. 2009; Voegeli et al. 2011) sowie bei dem Sjögren Syndrom gefunden (Kawasaki et al. 2003).

Andere, bereits näher untersuchte, Serinprotease Inhibitoren sind SPINK6 und SPINK9. SPINK6 konnte zum einen in der menschlichen Haut nachgewiesen werden und zum anderen konnte gezeigt werden, dass es inhibitorisch auf KLK5, KLK7 und KLK14 wirkt (Kantyka et al. 2011). Man geht daher davon aus, dass SPINK6 eine regulatorische Funktion im Prozess der Desquamation besitzt. Ähnlich verhält es sich mit SPINK9, dessen mRNA ebenfalls in menschlicher Haut nachgewiesen wurde. Das Gen *SPINK9* codiert für ein Peptid namens LEKTI-2, welches große Ähnlichkeit zu LEKTI aufweist (Meyer-Hoffert et al. 2009). LEKTI-2 inhibiert ausschließlich KLK5, spielt aber dennoch eine wichtige Rolle bei der Desquamation,

auch deshalb, weil SPINK9 in Hautproben von Erkrankungen wie dem Lichen simplex chronicus, der aktinischen Keratose, sowie des spinzellulären Karzinoms nachgewiesen werden konnte (Redelfs et al. 2016).

Ein weiterer Vertreter der Serinprotease Inhibitoren ist das SPINK7. Das Gen welches für SPINK7 kodiert, ist auch unter dem Namen *esophageal cancer related gene (ECRG2)* bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *ECRG2* in vitro den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, also eine Peptidase, bindet und dessen Aktivität inhibiert (Geng et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *ECRG2*-Expression nach DNA-Schädigung zunahm und das Zellwachstum hemmte (Lucchesi et al. 2016). Im Gegenzug fand man heraus, dass die Aktivität von *ECRG2* in Gewebeproben von Ösophaguskarzinomen herunterreguliert war (Cui et al. 2010). Daher spricht man *ECRG2* eine tumorsuppressive Wirkung zu.

SPINK7 wurde bislang in der menschlichen Haut nicht untersucht.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Expressionsanalysen von *SPINK7* auf Gen-Ebene in menschlichem Gewebe durchzuführen. Es sollte untersucht werden in welchen menschlichen Geweben *SPINK7-mRNA* exprimiert wird. Zudem sollte analysiert werden, ob das Vorkommen von *SPINK7-mRNA* in menschlichen Keratinozyten ähnlich der der anderen SPINK-Familienmitglieder differenzierungsabhängig sei und ob sich nach Stimulation mit körpereigenen Zytokinen, die Expression von *SPINK7-mRNA* verändert. Von weiterem Interesse war es zu untersuchen, ob sich die Expression in verschiedenen Hauterkrankungen unterscheidet. Hierfür sollten immunhistochemische Methoden verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Eine Zellkultur dient dem Wachstum und der Vermehrung von Zellen. Hierzu werden Zellen isoliert und anschließend auf Platten, welche mehrere sogenannte Wells besitzen, transferiert. Diese Wells sind mit Typ 1-Kollagen beschichtet, um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu verschaffen und sie am Boden der Wells zu fixieren. Das Wachstum der Zellen wird durch die Hinzugabe von flüssigem Nährmedium erreicht, welches in bestimmten Intervallen gewechselt werden muss. Um das Wachstum zu beenden, werden die Zellen bei -80 °C eingefroren. Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden an sterilen Arbeitsplätzen, die eine sterile Luftzufuhr besitzen, sowie vor und nach jeder Tätigkeit desinfiziert werden, vorgenommen.

Bei einer Differenzierungsreihe handelt es sich um mehrere Zellkulturen einer Zelllinie, die jeweils unterschiedlich weit differenziert sind. Hierzu wurden neonatale Vorhaut-Keratinozyten gewonnen und anschließend in Wells überführt. Insgesamt wurden fünf Platten zu je zwölf Wells von der Arbeitsgruppe Prof. Harder erworben. Pro Platte waren nur drei Wells mit einer Zellkultur angesetzt, woraus sich für jeden Differenzierungszeitpunkt drei Zellkulturen ergaben. Das Zellkulturschema sah demnach wie folgt aus:

Jedes Well wurde mit $500\text{ }\mu\text{l}$ Nährlösung mit einer Konzentration von 1 mM Ca^{2+} und bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Ernte erfolgte durch Schnellgefrierung, hierzu wurden die Platten nach dem Absaugen des Mediums in einen -80 °C kalten Gefrierschrank überführt. Dort wurden sie auch bis zur RNA-Isolierung gelagert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. RNA-Isolierung

Bei der RNA-Isolierung wird, mithilfe von selektiv bindenden Säulen, RNA aus intakten Zellen isoliert. , die von der Zelle transkribierten Gene lassen sich so bestimmen.

Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des EURx GeneMATRIX Universal RNA Purification KIT® der Firma Roboklon®. Die RNA-Isolierung wurde an den Zellen der Differenzierungsreihe, sowie mit zwei Gewebeproben der menschlichen Haut durchgeführt. Die Gewebeproben entstammten zum einen der Plantarseite des Fußes und zum anderen der Schläfe. Um die Gewebeproben in Lyse zu bringen, wurden Sie mit 400 µl RL-Puffer/10% β-Mercaptoethanol versetzt und anschließend zusammen mit 4 Eisenkugeln in die SpeedMill® überführt, wo sie acht Mal für je 30 Sekunden gepottert wurden. Im Anschluss lief die Isolierung, wie auch bei den Zellen der Differenzierungsreihe, nach Protokoll ab. Nach der Isolierung wurde der jeweilige RNA-Gehalt, der Proben, mittels des NanoDrops (Thermo Scientific®) bestimmt.

2.2.2. cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Bei der cDNA-Synthese handelt es sich um die Umschreibung von RNA in DNA, welche dann cDNA ("complementary DNA") genannt wird. Erreicht wird dies mithilfe eines Enzyms, der Reversen Transkriptase. Dieses Enzym synthetisiert entlang des vorliegenden RNA-Stranges, den komplementären DNA-Strang. Die entstandene cDNA ist weitaus stabiler, also haltbarer als RNA und kann zudem im Folgenden einer PCR unterzogen werden.

Es wurde nach dem Protokoll des Maxima Reverse Transcriptase® Kit der Firma Thermo Scientific vorgegangen.

Folgender Ansatz wurde pro Reaktionsgefäß für die cDNA-Synthese verwendet:

5x RT-Puffer	1x
Maxima Reverse Transcriptase®, Thermo Scientific® (200 U/µl)	200 U Mastermix
Ribolock RNase-Inhibitor (40 U/µl)	20 U
Gewebe	1 mg (Volumen richtete sich nach RNA-Konzentration)
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Die Reaktionsgefäße wurden in den T3 Thermocycler® von Biometra® überführt und unterliefen folgendem Programm:

65 °C	5 min
4 °C	∞
Mastermix hinzufügen	
60 °C	30 min
4 °C	∞

Nach der Umschreibung, wurden die Proben mit Entionisiertem-Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/100 µL gebracht und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.3. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung von DNA-Fragmenten *in vitro*. Hierzu wird neben Wasser, Puffer und der Proben-DNA, eine DNA-Polymerase, sowie Oligonukleotide, sogenannte Primer (siehe 2.7) und schließlich Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's) der Firma Thermo Scientific®, welche als Grundbausteine für das neu entstehende DNA-Fragment dienen, benötigt.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei unterschiedlichen Phasen. Bei der Denaturierung, werden die Wasserstoffbrückenbindungen bei einer Temperatur von >90 °C innerhalb des DNA-Doppelstranges gelöst. In der zweiten Phase, der Oligonukleotidanlagerung, lagern sich nukleotidspezifische Primer bei einer für sie spezifischen Temperatur an die so entstandenen DNA-Einzelstränge an. Nachdem die DNA-Polymerase an das doppelsträngige Teilstück aus Primer und Einzelstrang gebunden hat, komplementiert diese in der dritten Phase, der so genannten Elongation, den Einzelstrang ihrer optimalen Arbeitstemperatur.

2.2.3.1. Standard-PCR

Die Standard-PCR wird in erster Linie zur Amplifikation und dadurch zum Nachweis von Genfragmenten verwendet. Das Genfragment wird anhand seiner spezifischen Größe erkannt, es können aber keine genaueren Aussagen über dessen Konzentration im untersuchten Ansatz gemacht werden. Eine Standard-PCR dient somit dem Nachweis des gesuchten Fragments. Um zu sehen, ob die PCR-Reaktion abgelaufen ist, werden die Proben meist auch auf ein Fragment der *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* hin untersucht. Da diese in allen menschlichen Zellen konstitutiv exprimiert wird und somit immer nachweisbar sein sollte. Die *GAPDH*-Untersuchung fungiert also als Positivkontrolle für den PCR-Versuch selbst.

Zum einen diente die Standard-PCR der Kontrolle ob die cDNA-Synthese erfolgreich war und zum anderen der Untersuchung verschiedener menschlicher Gewebe daraufhin, ob sie SPINK7 exprimieren oder nicht. Die cDNA der verschiedenen Gewebe wurde von Frau Dr. Yulia Koblyakova hergestellt. Verwendet wurden Primer für das SPINK7-Gen (for 5'-GCA GCT CAG AAG CTG CTA GTC T-3'; rev 5'-GCA ACT TCC ATC GTG AAG AAA C-3'). Aus der Wahl der Primer ergab sich somit die erwartete Amplikongröße von 203 Basenpaaren.

Zur Kontrolle wurden Primer für das GAPDH-Gen verwendet (for 5'-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC-3'; rev 5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'). Aus der Wahl der Primer ergab sich die erwartete Amplikongröße von 360 Basenpaaren.

Für die Gewebeuntersuchung wurde ursprünglich folgender Ansatz pro Gewebeprobe hergestellt:

Genaxxon® 10x Puffer	
670 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Chlorwasserstoff,	
160 mM Ammoniumsulfat, 25 mM MgCl ₂ ,	
0,1 % Polyethylen(20)-sorbitanmonolaurat	
mit Magnesiumsulfat	1x
dNTP's (10 mM)	0,2 µM
Genaxxon® taq Polymerase (5 U/µL) (Genaxxon bioscience®)	0,025 U

f-Primer (10µM)	0,2 µM
r-Primer (10µM)	0,2 µM
Template	2,5 µl
Wasser	ad 50 µl

Für jedes Gewebe gab es je zwei Ansätze, einen für das *SPINK7*-Gen und einen für das *GAPDH*-Gen. Dieses dient dem Nachweis, ob die PCR funktioniert hat, da es ein konstitutiv exprimiertes Gen ist und somit in allen Körperzellen, unabhängig ihrer Funktion vorkommt.

Die anschließende PCR selbst wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94 °C	3 min	
94 °C	45 s	
60 °C	45 s	35 Zyklen
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	

Magnesium (Mg^{2+}) ist ein unentbehrlicher Kofaktor für die DNA-Polymerase (Löffler, 2007). Ihre Produktivität lässt sich durch die Zugabe von Mg^{2+} steigern. Ist die Mg^{2+} -Konzentration jedoch zu hoch, können die Ionen den Zugang zum DNA-Strang blockieren und somit die Arbeit der Polymerase behindern.

Daher wurde bei den Proben die auf *SPINK7* hin untersucht wurden, 0,5 mM $MgCl_2$ hinzugefügt, sodass der Ansatz eine Konzentration von nun 3 mM $MgCl_2$ besaß. Desweiteren wurde auch die Template-Menge von 1 µl auf 2 µl erhöht, um die Amplifikation zu steigern.

Ein Ansatz:

Genaxxon® 10x Puffer mit Magnesiumsulfat	1x
dNTP's (10 mM)	0,2 µM
Genaxxon® taq Polymerase (5 U/µl)	0,025 U
f-Primer (10µM)	0,2 µM
r-Primer (10µM)	0,2 µM
Template	5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0,5 mM
Wasser (entionisiert)	ad 50 µl

Wird die Zyklenzahl bei einer PCR erhöht, entsteht mehr Reaktionsprodukt. Die Polymerase hat mehr Zeit das gesuchte Fragment zu amplifizieren. Sie ist aber auch länger beansprucht, was schließlich zum Funktionsverlust führen kann. Wird die Elongationszeit im Gegenzug verkürzt, kann man dieses Risiko verringern. Daher wurde die Zyklenzahl von 35 auf 40 erhöht und die Elongationszeit von 45 s auf 30 s verkürzt.

Das PCR-Programm sah nun wie folgt aus:

94 °C	3 min	
94 °C	45 s	
60 °C	45 s	40 Zyklen
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	

2.2.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Aufspaltung der PCR-Reaktionsprodukte anhand ihrer Größe. Hierbei werden die Proben im Anschluss an die PCR in präformierte Taschen eines Agarose-Gels (Biozym) gegeben. Dem Gel wurde zuvor Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA interkaliert. Somit können im Anschluss an die Gelelektrophorese, die EtBr-DNA-Komplexe mittels Ultraviolettlicht sichtbar gemacht werden. Dieses Gel selbst befindet sich in einer Kammer, die mit Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE) befüllt ist. Nun wird eine Spannung angeschlossen und die DNA-Fragmente, welche allesamt negativ geladen sind, wandern zur Anode. Auf die Fragmente wirken nun zum einen die Kraft des elektrischen Feldes und zum anderen die Adhäsionskräfte des Gels. Je kleiner die Fragmente, desto schneller wandern sie durch das Gel, da sie weniger stark durch dieses aufgehalten werden.

Es wurde ein 2 %iges Agarosegel verwendet. Das Agarose-Pulver wurde mit 1xTAE-Puffer (50x: 24,2 g Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Base (2M), 5,71 g Natriumacetat (1 M), 10 ml Ethylendiamintetraessigsäure (0,5M, pH 8)) versetzt, in der Mikrowelle erhitzt und das

Pulver somit in Lösung gebracht. Danach wurde das Gel abgekühlt und anschließend mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Es ergab sich eine EtBr-Endkonzentration von 0,15 µg/ml. Daraufhin wurde das Gel in eine horizontale Gelkammer (Horizon® 11-14, Invitrogen®) gegossen, wo es ausgehärtete.

Je 20 µl Probe, wurden mit 4 µl Ladepuffer LVI (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin, 10 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan/Chlorwasserstoff) versetzt. Als Größenstandard wurde der 100 Basenpaare Größenstandard von Fermentas® benutzt. Es wurde eine konstante Spannung von 60 V angelegt, bis die Proben in das Agarosegel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Spannung für 60 min auf 100 V erhöht. Die Detektion, der Fragmente erfolgte an einem Ultraviolettlicht-Tisch (Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator TM-20®, UVP®). Dokumentiert wurden die Gele mithilfe einer CCD ("Charged Coupled Device")-Kamera der Fotodokumentationsanlage "Bio Doc II®" (Biometra®).

2.2.5. Real-Time PCR

Die Real-Time PCR, oder auch quantitative PCR, dient der Echtzeitquantifizierung von Genfragmenten, die während des Prozesses entstehen. Hierzu sind zunächst die gewöhnlichen Bestandteile eines PCR-Ansatzes von Nöten (s. 2.9.3). Zusätzlich wird ein Fluoreszenzfarbstoff benötigt, welcher durch das System detektiert werden kann.

Dieser Farbstoff, genannt SYBR® greenER™, bindet spezifisch an doppelsträngige DNA und absorbiert in der Form eines Komplexes aus Farbstoff und DNA, Licht bei einer ganz bestimmten Wellenlänge. Er ermöglicht somit die Quantifizierung der Produkte.

Neben SYBR® greenER™ existieren auch noch andere Farbstoffe und Methoden der Quantifizierung.

Hinzukommt bei den meisten Ansätzen eine hitzelabile Uracil-DNA-Glykosylase, welche die Bindung zwischen einem Uracil und dem Phosphat hydrolysiert und absorbiert in der Form eines Komplexes aus Farbstoff und DNA Licht bei einer ganz bestimmten Wellenlänge absorbiert. Die so entstandene pyrimidinische Seite, verhindert die Replikation durch Polymerasen (Longo et al.,1990). Somit wird die Amplifikation von unerwünschten,

Uracil-haltigen DNA-Fragmenten, sogenannten "carry-over" PCR-Produkten (Longo et al.,1990).

Die Ansätze selber werden in sogenannte Plates, die verschieden viele Wells besitzen, pipettiert. In diesem Fall wurde ein 96 Wells pro Plate System verwendet. Die Plates selber besitzen keinen Verschluss, daher ist es notwendig, die Plates mit einer Klebefolie abzudichten. Hierbei muss sichergestellt werden, dass diese zum einen Dicht ist und zum anderen keine Blasen oder Verwerfungen aufweist, da etwaige Unebenheiten die photometrische Messung verfälschen könnten.

In der Auswertung zeigt sich dann bei erfolgreicher PCR ein zyklusabhängiger Anstieg der Fluoreszenz-Aktivität in Form eines Graphen. Es besteht eine Grundaktivität, die mit zunehmender Zykluszahl exponentiell zunimmt, um in einer gleichbleibenden Maximalaktivität zu enden.

Im Zuge der Auswertung wird ebenfalls eine sogenannte Schmelzkurve erstellt. Hierbei wird die Probe immer weiter erhitzt und die Abnahme der Fluoreszenz gemessen. An dem Punkt, an dem die Schmelztemperatur des zu amplifizierenden Fragments erreicht ist, dieses also nicht mehr doppel- sondern einzelsträngig vorliegt, nimmt die Fluoreszenz-Aktivität schlagartig ab, da der Farbstoff nun nicht mehr binden kann. Weicht diese Temperatur bei einer der Proben ab, kann man davon ausgehen, dass in dieser Probe keine korrekte Amplifikation stattgefunden hat.

2.2.5.1. Real-Time PCR der Keratinozyten-Differenzierungsreihe

Die mittels Zellkultur (s. 2.8) hergestellte Differenzierungsreihe humaner Keratinozyten wurde mittels Real-Time PCR auf die eventuelle Abhängigkeit der SPINK7-Expression hin untersucht. Von jeder Probe wurden zwei Ansätze hergestellt um bei der späteren Auswertung eventuelle Ausreißer, ohne Datenverlust eliminieren zu können.

Zum Einsatz kam das Step One Plus™-System von Applied Biosystems®.

Es wurden drei verschiedene Primer verwendet. Zum einen *hSPINK7* (s.o.) und *hGAPDH* (s.o.) und zum anderen *hINVOLUCRIN* (for 5'-CCT CCA GTC AAT ACC CAT CA-3';

rev 5'-TTC TTG CTC AGG CAG TCC-3'). Die Expression des daraus exprimierten Proteins ist differenzierungsabhängig und steigt, je weiter die Zellen entwickelt sind (Watt, 1983) Es diente bei der Real-Time PCR dazu, nachzuweisen, dass die untersuchten Zellen tatsächlich unterschiedlich weit differenziert sind.

Der verwendete SYBR® Select Master Mix der Firma Applied Biosystems® enthielt:

- SYBR® GreenER™
- AmpliTaq® DNA-Polymerase
- hitzelabile Uracil-DNA Glycosylase (UDG)
- ROX™ dye Passive Reference
- dNTP Mix
- optimierte Pufferkomponenten

Folgender Ansatz wurde für die einzelnen Proben verwendet:

SYBR® Select Master Mix (2x)	5 µl
f-Primer (10 µM)	200 nM
r-Primer (10 µM)	200 nM
Template	1,5 µl
DNase-freies Wasser	ad 10 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Standard Cycling Mode Primer $T_M < 60$ °C:

UDG Aktivierung	50 °C	2 min
AmpliTaq® Aktivierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	15 s Touchdown-
Annealing	64 °C-59 °C	15 s Cycle (6x)
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	58 °C	15 s 40 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min

Der Touchdown-Cycle dient der Spezifität. Hierbei werden sechs Zyklen durchgeführt, wobei jedes Mal die Temperatur um 1 °C gesenkt wird. Primer binden bei höheren Temperaturen

spezifischer an ihre komplementäre Sequenz, wohingegen es bei niedrigeren Temperaturen häufiger zu Fehlpaarungen kommt. Durch den Start bei hohen Temperaturen verschafft man den spezifischen Bindungen also einen Vorteil. Sie sind in der Replikationsmenge um einige Zyklen voraus was dazu führt, dass auch bei den anschließend niedrigeren Temperaturen, die Chance der richtigen Paarung größer ist, einfach weil die Konzentration der korrekten DNA-Fragmente bereits höher ist.

Um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Standard-PCR zu schaffen, wurden die *SPINK7*-Proben erneut einer Real-Time-PCR unterzogen. Es wurde neben dem Magnesium-Zusatz auch ein anderer Mastermix verwendet.

Der TaKaRa Mastermix enthält folgende Bestandteile:

- Taq-Polymerase (Genaxxon bioscience®)
- dNTP's
- Puffer

Folgender Ansatz wurde für die einzelnen Proben verwendet:

TaKaRa Mastermix	5,2 µl
f-Primer (10 µM)	400 nM
r-Primer (10 µM)	400 nM
MgCL (25 mM)	1 mM
Template	1,5µl
DNase-freies Wasser	ad 10 µl

Ein neues PCR-Programm wurde ebenfalls verwendet. Dieses sah wie folgt aus:

95 °C	30 s	
95 °C	5 s	Touchdown-
66 °C-61 °C	30 s	Cycle (6x)
95 °C	5 s	40 Zyklen
60 °C	30 s	
95 °C	15 s	
60 °C	1 min	
95 °C	15 s	

2.2.5.2. Real-Time PCR von zytokin-stimulierten Keratinozyten

Die Untersuchung der cDNA von zuvor, mittels verschiedener Zytokine, stimulierten, kultivierten Keratinozyten hinsichtlich ihrer *SPINK7*-mRNA Expression, erfolgte mit Hilfe der gleichen Methodik. Die cDNA-Proben von kultivierten Keratinozyten, die mit unterschiedlichen Zytokinen stimuliert worden wurden, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Jürgen Hader Hautklinik UKSH Kiel zur Verfügung gestellt. Es wurden insgesamt 6 cDNA-Proben untersucht. Fünf davon waren mittels Zytokinen stimuliert worden, eine Probe war unstimuliert und diente als Kontrolle. Als Stimulantien dienten Interleukin-17A (IL-17A), Interferon- γ (IFN γ), die Kombination aus IL-17A und IFN γ , Interleukin-1 β , sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).

2.3. Immunologische Methoden

2.3.1. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis von Proteinen in histologischen Schnitten, mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Bindung. Der Nachweis selbst stellt sich als eine im Lichtmikroskop erkennbare Färbung des Gewebes dar. Es gibt zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden, nämlich die direkte, sowie die indirekte Nachweismethode.

Bei der direkten Methode, bindet ein Antikörper an das nachzuweisende Antigen des Gewebes. Der Antikörper selbst ist direkt mit einem Fluorchrom, oder einem Marker-Enzym gekoppelt (Noll, Schraub-Kuhnen, 2000). Somit lässt sich direkt, oder nach Gabe eines Substrats, eine Färbung erzeugen.

Bei der indirekten Methode hingegen, bindet zunächst wiederum ein Primärantikörper an das Antigen, dieser ist aber nicht mit einer anderen Substanz gekoppelt. An diesen primären Antikörper bindet nun ein Sekundärantikörper. Dieser wiederum ist an eine Substanz gekoppelt, welche die anschließende Färbung ermöglicht. Die indirekte Methode besitzt im Vergleich zur direkten Methode eine weitaus höhere Sensitivität (Noll, Schraub-Kuhnen, 2000).

Bei dieser Arbeit wurde eine Sonderform der indirekten Methode verwandt. Die sogenannte ABC-Methode. Hierbei ist der Sekundärantikörper biotinyliert. Im nächsten Schritt, wird eine Lösung aus Avidin, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein, und einem mit dem Vitamin Biotin gekoppeltem Enzym, in diesem Fall einer Meerrettich-Peroxidase, auf die Schnitte gegeben (Noll, Schraub-Kuhnen, 2000). Avidin und Biotin, besitzen eine sehr hohe Bindungsaffinität, wobei jedes Avidin maximal 4 Biotin-Moleküle binden kann. Jedes an den biotinylierten Sekundärantikörper gebundene Avidin, kann also maximal 3 biotinylierte Peroxidase binden (Noll, Schraub-Kuhnen, 2000). Somit resultiert eine weitere Amplifikation des Signals, die Sensitivität steigt. Verwendet wurde das Vectastain® Elite ABC Kit (Standard) (10 µl Avidin DH-Lösung, 10 µl biotinylierte Meerrettich-Peroxidase, 1000 µl Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline) der Firma Vector® Laboratories.

2.3.1.1. Herkunft der Hautschnitte

Die untersuchten Hautschnitte entstammen allesamt Patienten des der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universitätsklinik Kiel. Neben Präparaten gesunder Haut, welche von erkrankungsfreien Randschnitten stammen, wurden entzündliche, sowie neoplastische Erkrankungen untersucht. Bei den entzündlichen wurden Psoriasis, chronische und akute Ekzeme sowie das atopische Ekzem untersucht. Bei den neoplastischen Erkrankungen wurde das Basalzellkarzinom, sowie das spinozelluläre Karzinom untersucht.

Die Präparate wurden nach Exzisionsstelle, also Lokalisation, dem Alter und dem Geschlecht der Patienten kategorisiert.

2.3.1.2. Anfertigung der Schnittpräparate

Direkt nach Entnahme werden die Resektate für 12-48h in einer 4%ige Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend durchlaufen sie eine aufsteigende Alkoholreihe, wodurch ihnen Wasser entzogen wird, um sie schließlich in Paraffin einzubetten. Die Resektate, jetzt auch Blöcke genannt, sind nun archivierfähig. Um histologische Schnitte anzufertigen werden die Paraffin-Blöcke auf -20°C heruntergekühlt und anschließend in ein Mikrotom gespannt.

Mithilfe des Mikrotoms, lassen sich nun 6 µm dünne Schnitte anfertigen. Die Paraffinschnitte werden zunächst in ein 45°C warmes Wasserbad gelegt, welches der Streckung, also der Elimination von eventuellen Falten im Präparat dient. Anschließend wurden je nach Größe der Schnitte, ein bis drei von ihnen auf speziell beschichtete Objektträger überführt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur mindestens 24h abgedeckt getrocknet, bevor mit der Färbung begonnen wurde.

2.3.1.3. Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Die luftgetrockneten Schnitte werden bei 63°C für 1h in einem Trockenschrank deparaffinisiert. Anschließend werden sie 2x 10 min in ein Xylolersatz-Bad gestellt. Der Xylolersatz (Biozym) dient als aromatischer Kohlenwasserstoff dazu, die, durch das Formaldehyd hydrophobierten Schnitte wieder hydrophil zu machen. Im Anschluss daran durchlaufen sie eine absteigende Alkoholreihe mit folgenden Konzentrationen. 2x 100%, 2x 90%, 1x 80%, 1x 70%. Die Schnitte verbleiben für je 2 min in jedem Bad. Danach werden sie für 10 min in A.dest. gestellt.

Nachdem die Schnitte nun wieder hydrophil sind, werden sie für 25 min in Citratpuffer (27 ml 0,1 M Citronensäure, 123 ml 0,1 M Natrium-Citrat, 1350 ml A.dest.) mit Hilfe eines Dampfgarers erhitzt. Das Kochen im Citratpuffer dient der Demaskierung der Antigene im Gewebe. Diese sind durch die zuvor vorgenommene Fixierung mittels Formaldehyd, teils in ihrer Tertiärstruktur verändert, also maskiert. Dies hat zur Folge, dass der Antikörper das Epitop unter Umständen nicht binden kann. Das Kochen im Citratpuffer dient also der Wiederherstellung der ursprünglichen Tertiärstruktur, somit also der Demaskierung (Praxis der Immunhistochemie, Urban und Fischer 2000). Die Schnitte verbleiben eine weitere Stunde zwecks Abkühlung im Puffer. Danach werden die Schnitte für 10 min in einen 3%igen Peroxidase-Block-Lösung (10 ml Wasserstoffperoxid (30%), 90 ml A.dest.) gestellt. Diese ist für die Blockierung der im Gewebe endogen vorhandenen Peroxidase notwendig, um bei der Peroxidase-Reaktion am zweiten Antikörper keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten. Im Anschluss werden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült. Danach werden die Schnitte für 5 min in Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline/Polyethylen(20)-sorbitanmonolaurat-Puffer (100 ml Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline (10x), 900 ml A.dest., 0,5 ml Polyethylen(20)-

sorbitanmonolaurat) gewaschen. Nun werden die Objektträger vorsichtig abgetrocknet und die einzelnen Schnitte mit einem lipophilen Dako-Pen umkreist. Diese Umrandung verhindert ein Verlaufen und somit einen Verlust der im Folgenden aufgetragenen Lösungen. Auf jeden Schnitt wird nun, in Abhängigkeit von seiner Größe, 70-100µl Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline/12% Bovines Serumalbumin -Lösung (50 ml Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline (1x), 6 g Bovines Serumalbumin) pipettiert. Die Lösung verbleibt für 20 min auf den Schnitten. Anschließend wird die überschüssige Lösung von den Objektträgern entfernt und Anschluss der 1:10 mit A.dest. verdünnte Roti ImmunoBlock auf die Schnitte pipettiert. Die Lösung verbleibt wiederum 20 min auf den Schnitten. Im Anschluss wird wiederum der Überschuss verworfen. Nicht jedoch bei der Negativkontrolle. Diese wird mit dem Roti ImmunoBlock belassen.

Als nächstes wird der 1. Antikörper (Kaninchen-anti-SPINK7 (0,1 mg/ml, Atlas Antibodies®, Bromma, Schweden) in der entsprechenden Verdünnung (in diesem Fall 1:75) auf alle Schnitte, exklusive der Negativkontrolle pipettiert. Die Verdünnung erfolgt mit einer Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline/1% Bovines Serumalbumin -Lösung (100 ml Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline (1x), 1 g Bovines Serumalbumin).

Um die optimale Verdünnung des verwendeten Antikörpers herauszufinden, wurde zuvor eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Konzentration des Antikörpers betrug 0,1 mg/ml. Es wurden folgende Verdünnungen hergestellt: 1:800, 1:400, 1:200, 1:100, 1:50, 1:25. Es wurden 2 verschiedene Rückenhautpräparate für die Färbung verwendet. Die vom Hersteller empfohlene Verdünnung lag bei 1:50 bis 1:200. Da die Färbung insgesamt sehr schwach ausfiel und um Fehler während des Färbeprozesses auszuschließen, wurde eine zweite Färbung diesmal mit anderen Präparaten, sowie einem zusätzlichen Antikörper (Anti-SPINK9), dessen Funktionsfähigkeit bekannt war, durchgeführt. Es zeigte sich, dass das mit Anti-SPINK9 inkubierte Präparat seine übliche Färbintensität aufwies und die mit Anti-SPINK7 inkubierten wiederum eine schwache Anfärbung. Aufgrund der Ergebnisse, haben wir uns für eine Verdünnung von 1:75 bei den weiteren Färbungen entschieden.

Die Schnitte werden nun in einer speziellen Histo-Kammer, deren Boden mit A.dest. benetzt wird, für mindestens 12h bei 8°C inkubiert. Das destillierte Wasser verhindert eine Austrocknung der Schnitte. Nach der Inkubationszeit wird wiederum der Überschuss

verworfen und anschließend die Schnitte zwei Mal für je 3 min in Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline/Polyethylen(20)-sorbitanmonolaurat-Puffer gewaschen. Hierbei ist zu beachten, dass die Negativkontrollen getrennt von den übrigen Schnitten gewaschen werden, da es sonst zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Im Anschluss wird der 2. Antikörper Schwein-anti-Kaninchen (biotinyliert; F(ab')₂, Dako®) in seiner spezifischen Verdünnung (in unserem Fall 1:300) auf die Schnitte pipettiert. Wiederum wird für die Verdünnung eine Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline/1% Bovines Serumalbumin -Lösung verwendet. Auch die Negativkontrolle wird mit dem 2. Antikörper benetzt. Die Inkubationszeit des 2. Antikörpers beträgt 30 min bei Raumtemperatur. Es folgt ein erneuter getrennter Waschvorgang. Als nächstes wird der AB-Komplex (10 µl Avidin DH-Lösung, 10 µl biotinylierte Merrettich-Peroxidase, 1000 µl Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline) auf die Schnitte gegeben. Der entstehende Molekülkomplex amplifiziert das später entstehende Färbesignal. Die Lösung muss mindestens 30 min vor Benutzung angesetzt worden sein. Die Inkubationszeit des AB-Komplexes beträgt ebenfalls 30 min. Anschließend werden die Schnitte drei Mal für je 5 min gemeinsam gewaschen.

Im Anschluss wird das Vector® NovaRED™-Substrat (SK-4800) (2500 µl A.dest., 37,5 µl Substrat 1, 25 µl Substrat 2, 25 µl Substrat 3, 25 µl Substrat 4) der Firma Vector® Laboratories, also das Substrat für die zuvor dazugegebene Peroxidase, für 4 min auf die Schnitte gegeben. Das Substrat darf erst unmittelbar vor Benutzung angesetzt werden und muss lichtgeschützt gelagert werden. Die Inkubation selbst muss ebenfalls lichtgeschützt erfolgen, da sonst wiederum falsch positive Ergebnisse drohen. Danach werden die Schnitte für 10 min in Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Buffered Saline/Polyethylen(20)-sorbitanmonolaurat gewaschen und anschließend kurz mit A.dest. gespült.

Als nächstes folgt die Kernfärbung mit Hämalaun. Hierzu werden die Objektträger für je 30 s in das Hämalaun-Bad gegeben und anschließend in A.dest. überführt. Die Objektträger werden nun für 7 min in einer Küvette unter fließendes Leitungswasser gestellt, um überschüssiges Hämalaun zu entfernen.

Als nächstes werden die Schnitte wieder entwässert, hierzu durchlaufen sie die zu Anfang erwähnte Alkoholreihe in umgekehrter, also aufsteigender Reihenfolge. Hierbei werden die Objektträger nur kurz in die Alkohol-Bäder getaucht. Im Anschluss werden die Objektträger

noch zwei Mal für je 3 min in Xylolersatz gestellt. Danach werden die Objektträger vorsichtig getrocknet und anschließend mit Eukitt (Kindler), sowie einem Deckglas eingedeckt. Die Schnitte sind nun bereit mikroskopiert und beurteilt zu werden.

3 Ergebnisse

3.1. SPINK7 Expression Körpergeweben

Die Expression von *SPINK7* und *GAPDH* in verschiedenen menschlichen Geweben auf mRNA Ebene (cDNA bereitgestellt von Dr. Yulia Koblyakova, Hautklinik UKSH Kiel) wurden qualitativ mittels einer PCR-Reaktion ermittelt und in einem Agarosegel visualisiert (Abb. 3.1).

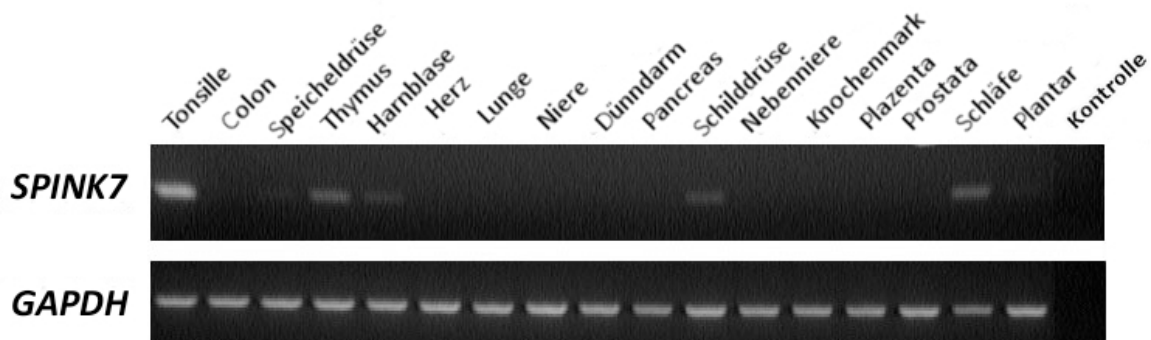


Abb. 3.1: *SPINK7*-mRNA Expression wird in verschiedenen menschlichen Geweben unterschiedlich exprimiert.

Verschiedene menschliche Gewebe wurden auf ihre *SPINK7* mRNA Expression hin untersucht. Hierbei diente *GAPDH* als Positivkontrolle. Die Kontrolle enthielt keine cDNA und diente als negativ Kontrolle.

Das Signal im Bereich der zu erwartenden Größe der Positivkontrolle *GAPDH*-mRNA ist in allen untersuchten Geweben gleichmäßig. Im Bereich der erwarteten Größe des *SPINK7*-mRNA-Replikationsproduktes findet sich ein Signal bei den Geweben der Tonsille, des Thymus, der Harnblase, der Schilddrüse, der Schläfen-, sowie der Plantarhaut.

3.2. Expression von *SPINK7* in differenzierten Keratinozyten

Um die Expression von *SPINK7* in menschlichen Keratinozyten genauer zu untersuchen, wurden Zellkulturen von unterschiedlich weit differenzierten Keratinozyten angelegt. Die *SPINK7*-Expression auf mRNA Ebene sollte in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad menschlicher Keratinozyten dargestellt werden um die Lokalisation und damit auch die mögliche Funktion näher eingrenzen zu können. Dazu wurden Keratinozyten unterschiedlich lange in einem Medium mit 1 mM Ca^{2+} inkubiert, welches die Keratinozyten zur Differenzierung anregt. Zusätzlich wurden die cDNA von menschlicher Schläfen-, sowie Plantarhaut untersucht. Nach RNA-Isolierung und RT-PCR wurde zunächst die cDNA von *SPINK7* und *GAPDH* mittels einer PCR amplifiziert und deren Expression in einem Agarosegel dargestellt (Abb. 3.2.1).

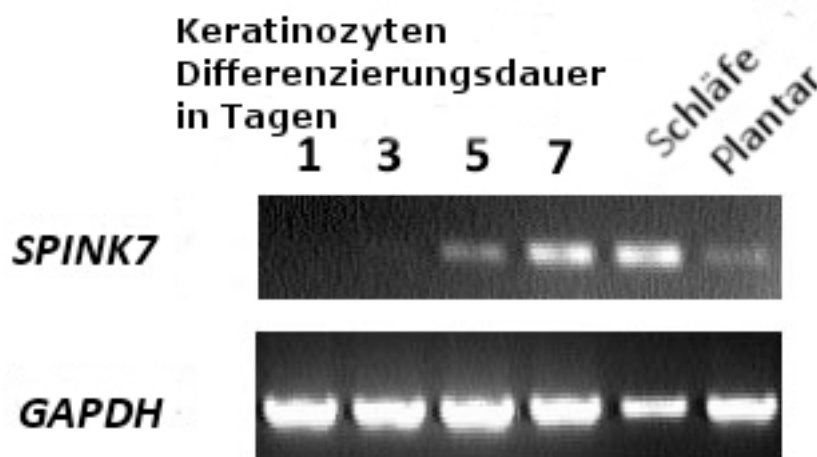


Abb. 3.2.1: Zunahme der *SPINK7*-mRNA Expression in menschlichen Keratinozyten mit zunehmender Differenzierungsdauer

Es wurden verschieden weit differenzierte Keratinozyten (in Tagen 1, 3, 5, 7) auf ihre *SPINK7*-mRNA Expression untersucht. Als Positivkontrolle diente die Expression von *GAPDH*-mRNA. Zudem wurden noch Gewebeprouben menschlicher Schläfen- und Plantarhaut auf ihre *SPINK7*-mRNA Expression hin untersucht.

Die Signalintensität nimmt in Abhängigkeit zur Differenzierungsdauer der Keratinozyten zu. Auffällig ist, dass die Probe von der Schläfe trotz niedriger *GAPDH*-Intensität eine vergleichbare Signalintensität wie die Probe von den 7 Tage differenzierten Keratinozyten aufweist. Die Probe von der Fußsohle – mit größtenteils ausdifferenzierten Keratinozyten –

zeigt hingegen eine niedrigere *SPINK7*-Expression als die Probe mit 7 differenzierten Keratinozyten.

Eine genauere Quantifizierung der *SPINK7*-mRNA Expression wurde mit der real-time-PCR durchgeführt. Dabei wurde neben *SPINK7* und *GAPDH* noch die cDNA von *INVOLUCRIN*, einem bekannten Differenzierungsmarker, untersucht (Abb. 3.2.2).

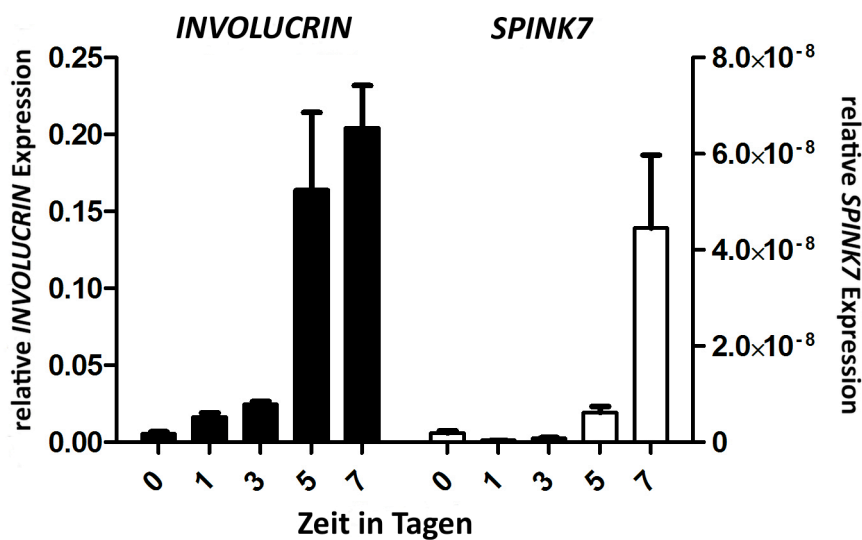


Abb. 3.2.2: Zunahme der *SPINK7*-mRNA Expression mit steigender Differenzierungsdauer in menschlichen Keratinozyten

Es wurde die relative Expression der *SPINK7*-mRNA in Abhängigkeit zur Differenzierungsdauer der Zellkultur-Keratinozyten mittels Real-Time-PCR untersucht. Als Positivkontrolle diente die Expression von *INVOLUCRIN*-mRNA.

Die Real-Time PCR ergab sowohl bei der Untersuchung mit dem *INVOLUCRIN*-Primer, als auch bei dem *SPINK7*-Primer einen Anstieg des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Differenzierungsdauer. Auffällig ist, dass *INVOLUCRIN* um einen Faktor von 10^7 stärker exprimiert wird, als *SPINK7* und somit die *SPINK7* Expression im Vergleich dazu deutlich geringer ist.

3.3. Immunhistochemie

3.3.1. Hautschnitte

Im Zuge der immunhistochemischen Untersuchung wurden zuerst 2 Schnitte eines 3D-Epidermis-Modells mittels eines Anti-SPINK7-Antikörpers angefärbt. Einer davon wurde zuvor mit polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) stimuliert. Beide Hautschnitte wiesen eine Färbereaktion auf.

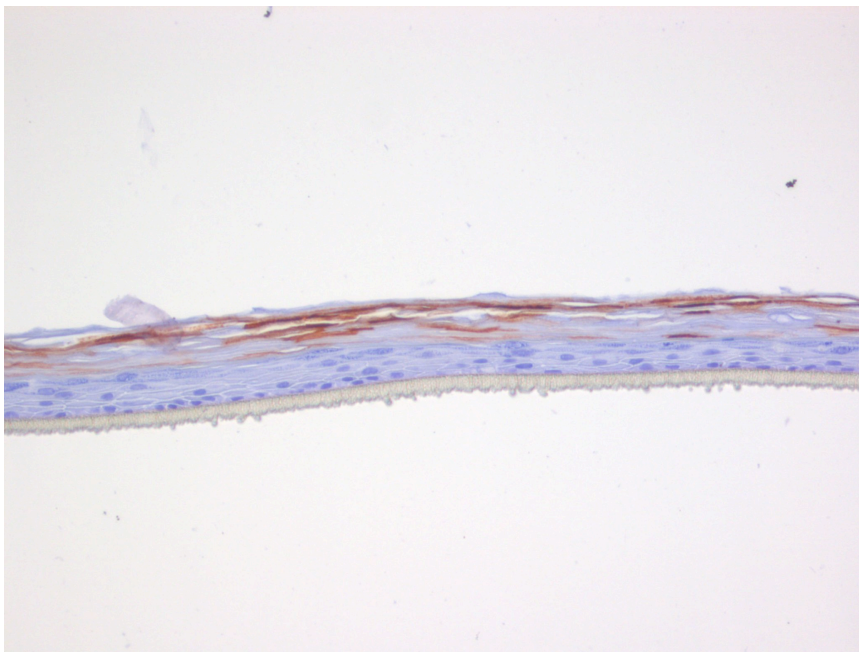


Abb. 3.3.6: Immunhistochemische Darstellung eines SPINK7-positiven 3D-Epidermis-Modells

Es wurden 2 Präparate untersucht. Eines wurde zuvor mit polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen stimuliert. Beide wiesen eine Färbereaktion auf. Hier gezeigt ist das unstimulierte Modell. SPINK7 ist braun gefärbt. Konzentration des SPINK7-Antikörpers: 1,3 µg/ml. 200fache Vergrößerung.

Als nächstes wurden gesunde menschliche Hautschnitte mittels Antikörper gefärbt. Solche Hautpräparate also, die nach ärztlicher Begutachtung, keine Hauterkrankungen aufwiesen. Insgesamt wurden, abzüglich der Verdünnungsreihen, 21 Hautschnitte, verschiedenster Lokalisationen mit dem Antikörper gefärbt. Eine Färbung konnte bei keinem der Präparate erreicht werden.

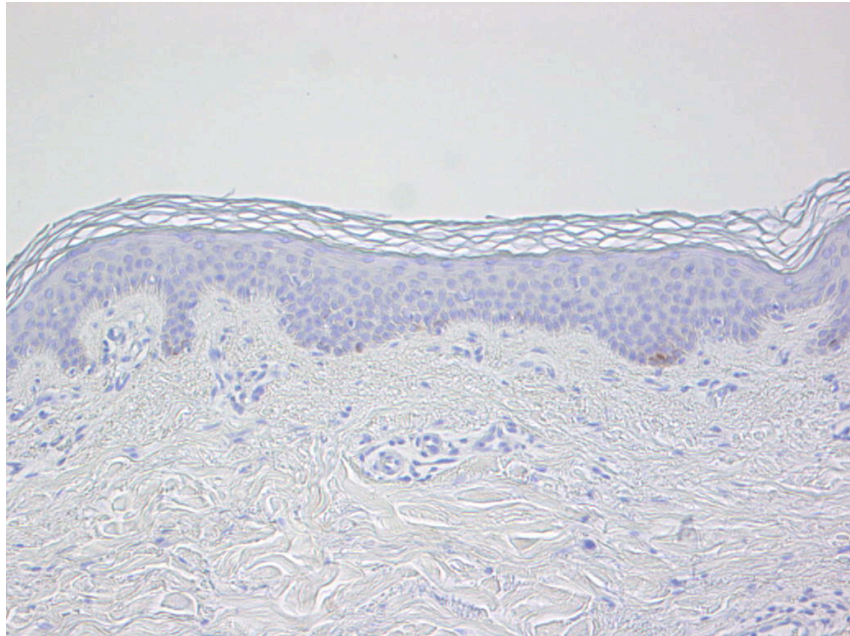


Abb. 3.3.1: Immunhistochemische Darstellung SPINK7negativer, gesunder Haut des Oberschenkels

21 von 21 Präparaten gesunder Haut, verschiedener Lokalisationen, wiesen keine Färbereaktion auf. Konzentration des SPINK7-Antikörpers: 1,3 µg/ml. 200fache Vergrößerung.

Im Anschluss wurden Präparate verschiedener Hauterkrankungen sowohl neoplastischer, als auch entzündlicher Art, untersucht.

Als erstes wurden 5 Präparate von Basalzellkarzinomen untersucht. Ein Basalzellkarzinom, oder auch Basaliom, ist der häufigste Hauttumor des höheren Lebensalters, welcher vorwiegend hellhäutige Menschen betrifft und vermehrt an sonnenexponierten Arealen auftritt. Es wächst vornehmlich lokal destruierend und neigt zu einer geringen Metastasierungsrate. Von den 5 Präparaten wiesen 2 eine Färbereaktion auf. Die Färbung zeigte sich jedoch nicht im Bereich der pallisadenförmigen Zellen des Basalzellkarzinoms, sondern in der darüberliegenden Epidermis (Abb. 3.3.2.).

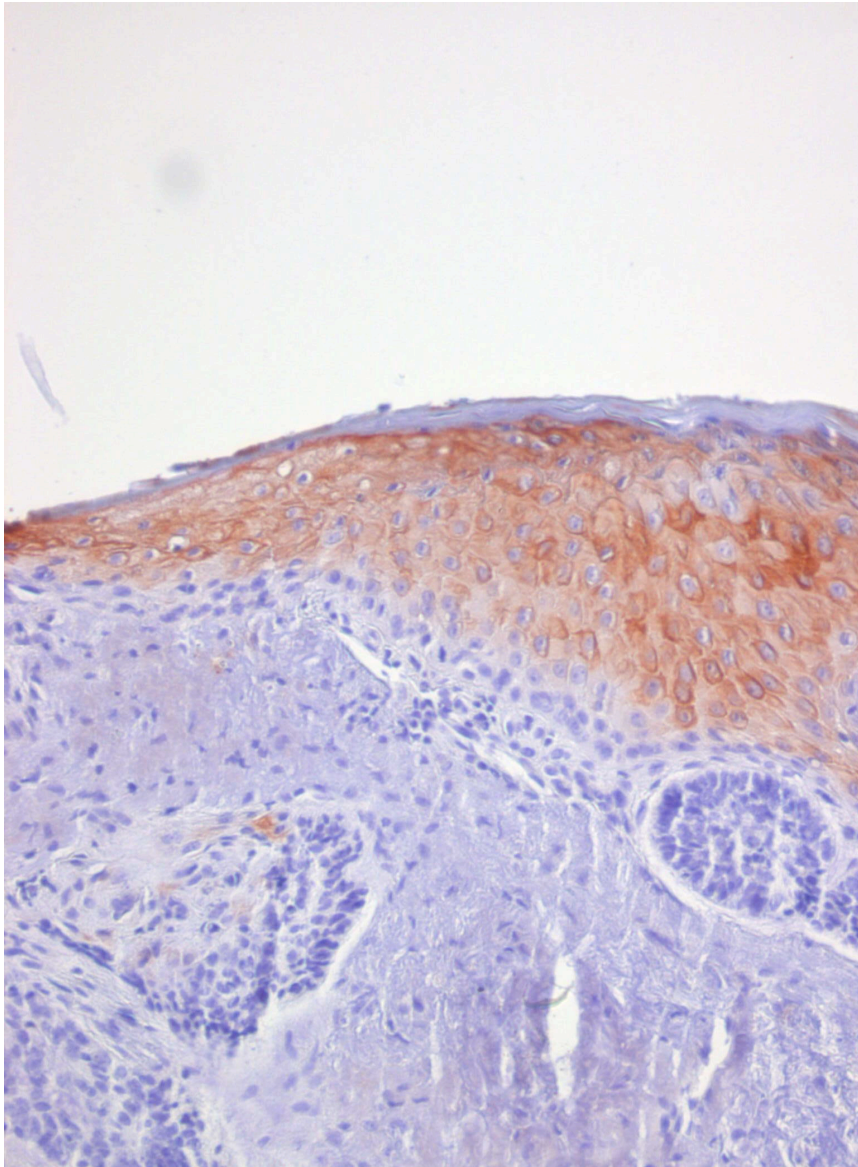


Abb. 3.3.2: Immunhistochemische Darstellung SPINK7-positiver Haut, beim Basalzellkarzinom

SPINK7 ist braun gefärbt. 2 von 5 Präparaten wiesen eine Färbereaktion auf. Hier gezeigt ist ein Präparat vom Nasenflügel. Konzentration des SPINK7-Antikörpers: 1,3 µg/ml. 200fache Vergrößerung.

Im Anschluss wurden 2 Präparate von spinozellulären Karzinomen untersucht. Das spinozelluläre Karzinom, oder auch Spinaliom entsteht meist an durch Ultraviolettstrahlung vorgeschädigter Haut. Die Vorstufe des Spinalioms nennt man Aktinische Keratosen. Von den 2 Präparaten wies eines eine Färbereaktion auf.

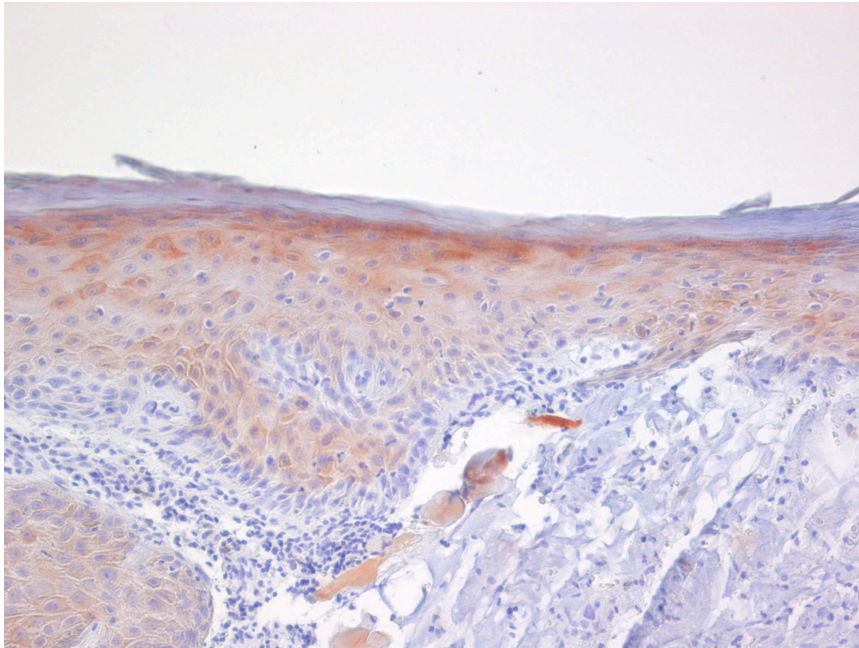


Abb. 3.3.3: Immunhistochemische Darstellung SPINK7-positiver Haut beim spinozellulären Karzinom

SPINK7 ist braun gefärbt. Eines von 2 Präparaten wies eine Färbereaktion auf. Hier gezeigt ist ein Präparat der Kieferhaut. Konzentration des SPINK7-Antikörpers: 1,3 µg/ml. 200fache Vergrößerung.

Als nächstes wurden 7 Präparate verschiedener Ekzemarten untersucht. Unter einem Ekzem versteht man gemeinhin eine nicht kontagiöse Dermatitis der Haut. Es bestehen verschiedene Ekzemarten unterschiedlicher Ätiologie. Von den 7 untersuchten Präparaten wiesen 6 eine Färbereaktion auf.

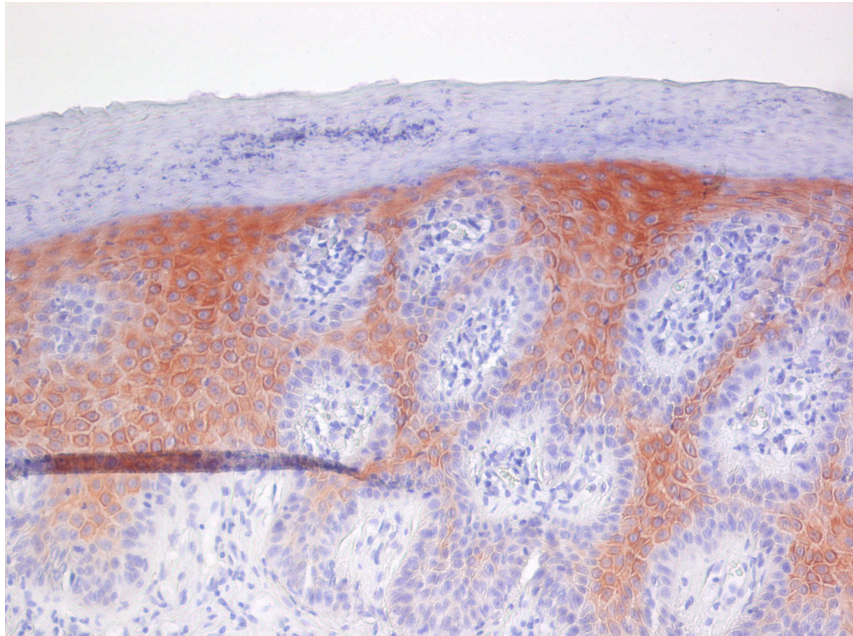


Abb. 3.3.4: Immunhistochemische Darstellung SPINK7-positiver Haut bei Ekzem
SPINK7 ist braun gefärbt. 6 von 7 Präparaten wiesen eine Färbereaktion auf.
Hier gezeigt ein Präparat der Wade. Es lag ein chronisches Ekzem bei Ichthyosis vulgaris und
Fillagrinmangel vor. Konzentration des SPINK7-Antikörpers: 1,3 µg/ml. 200fache Vergrößerung.

Im Anschluss wurden 7 Psoriasis-Hautschnitte untersucht. Die Psoriasis oder auch Schuppenflechte, ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung mit rötlich, schuppigen, oft juckenden Plaques. Klassischerweise treten diese an den Streckseiten der Extremitäten, sowie der behaarten Kopfhaut auf. Ätiologisch weist die Erkrankung eine starke genetische Komponente auf. Alle 7 untersuchten Präparate wiesen eine Färbereaktion auf.

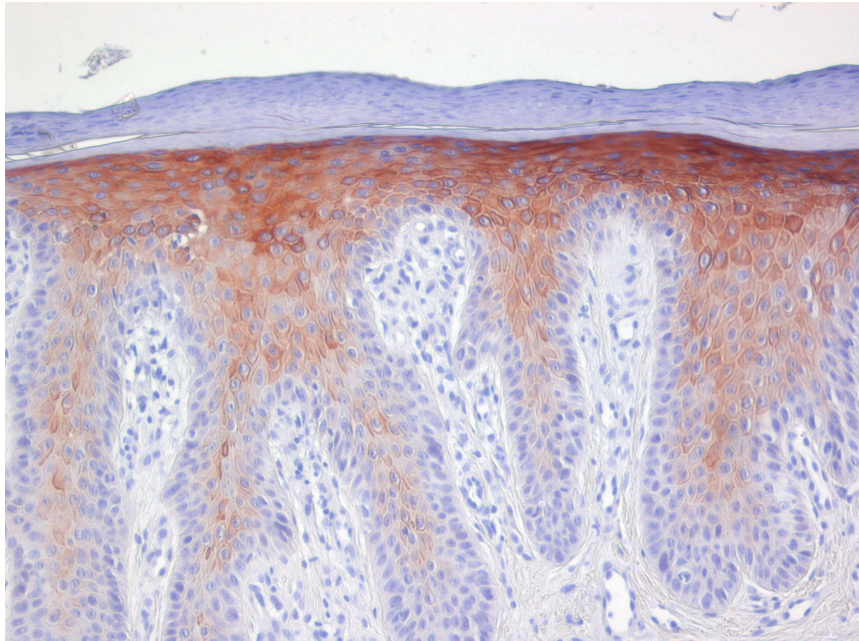


Abb. 3.3.5: Immunhistochemische Darstellung SPINK7-positiver Haut bei Psoriasis,
7 von 7 Präparaten wiesen ein Färbereaktion auf. Hier gezeigt ein Präparat des Oberschenkels.
Konzentration des SPINK7-Antikörpers: 1,3 µg/ml. 200fache Vergrößerung.

Insgesamt ist auffällig, dass es bei den Schnitten gesunder Haut zu keiner Färbung gekommen ist. Dahingegen war die Färbung der Psoriasis-Hautschnitte, im Vergleich zu ihren negativ Kontrollen, sehr ausgeprägt. Auch die Hautschnitte der neoplastischen Erkrankungen und der Ekzeme wiesen gehäuft eine Färbung auf. Ebenso verhielt es sich bei den Schnitten des 3D-Epidermis-Modells.

Eine vollständige Auflistung aller untersuchten Hautschnitte ist im Anhang zu finden.

3.4. Real-Time PCR stimulierter Keratinozyten

Da in den histologischen Untersuchungen inflammatorischer Hauterkrankungen und insbesondere in den Psoriasis-Hautschnitten eine deutliche Färbereaktion beobachtet werden konnte, kann man vermuten, dass SPINK7 einer Regulation durch Zytokine unterliegt. In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss von inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-17A, Interferon- γ , Interleukin-1 β , sowie Tumornekrosefaktor- α auf die SPINK7-mRNA Expression in kultivierten Keratinozyten untersucht. Die cDNA der stimulierten Keratinozyten wurde freundlicherweise von der Forschungsgruppe um

Prof. Dr. Jürgen Harder bereitgestellt. Es wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. Ziel war es die *SPINK7*-mRNA-Expression stimulierter Keratinozyten, im Vergleich zu der von unstimulierten Keratinozyten zu bestimmen.

Die Psoriasis selbst beruht auf einem Defekt der zellulären Immunabwehr, bei der man annimmt, dass unter anderem die Zytokine Interleukin-17A (IL-17A), Interferon- γ (IFN- γ), sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen (Jaller Char et al. 2018; Chiricozzi et al. 2018).

In der Real-Time PCR zeigte sich eine deutliche Erhöhung der relativen *SPINK7*-Expression bei den mittels IL-17A und IFN- γ stimulierten Keratinozyten im Vergleich zu anderweitig stimulierten Keratinozyten, sowie zur Negativkontrolle. Auffällig ist auch, dass die relative *SPINK7*-mRNA-Expression bei nur mit Interleukin-17A stimulierten Zellen, unter der der Negativkontrolle liegt. Des Weiteren findet sich auch bei den mit TNF- α stimulierten Zellen ein deutlicher Anstieg.

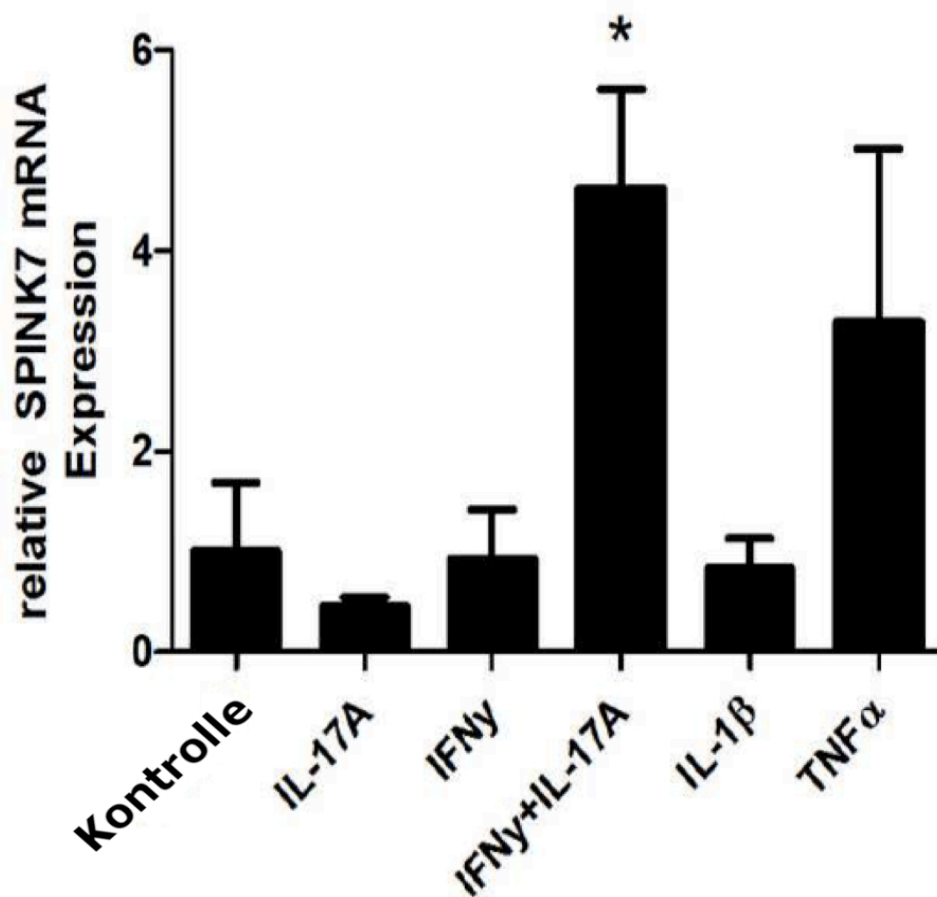


Abb. 3.3.1. Zunahme der relativen SPINK7-mRNA Expression in mit Interferon- γ und Interleukin-17A stimulierten Keratinozyten

Es wurde, mit Hilfe der Real-Time-PCR, die relative *SPINK7*-mRNA Expression in zuvor mittels Zytokinen stimulierten Keratinozyten untersucht. Als Stimulantien dienten Interleukin-17A (IL-17A), Interferon- γ (IFN γ), die Kombination aus IL-17A und IFN γ , Interleukin-1 β , sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).

4 Diskussion

Die menschliche Haut bildet, neben anderen Funktionen, eine Schutzschicht gegenüber äußeren Einflüssen. An diesem System sind verschiedenste Zellen und Botenstoffe beteiligt. Es handelt sich um viele einzelne Prozesse, welche zusammen für die einwandfreie Funktion dieser Barriere verantwortlich sind. An der Regulation dieser Prozesse sind auch nachweislich die sogenannten Kallikrein-verwandten Peptidasen beteiligt (KLKs) (Meyer-Hoffert 2009). So kommt zum Beispiel KLK 5 eine besondere Rolle bei der Desquamation, also der Schuppung der Haut zu (Egelrud 2000). KLKs wiederum können durch andere Stoffe in ihrer Aktivität reguliert werden. Hierzu zählen auch die sogenannten serine protease inhibitors of Kazal-type, oder kurz SPINK. Diese Proteasen können die KLKs in ihrer Aktivität hemmen und haben somit indirekt einen Einfluss auf die verschiedenen Prozesse innerhalb der Haut (Goettig et al. 2010). Einige Mitglieder der SPINK-Familie wurden bereits weitergehend untersucht. Hierzu zählen unter anderem SPINK5, SPINK6 und SPINK9. Somit konnten bereits wichtige Erkenntnisse über deren Funktion und Bedeutung erlangt werden. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Vorkommen von SPINK9 eine vermehrte Inhibition von KLK5 nach sich zieht. Dies wiederum führt zu einer verminderten Desquamation und somit zu einer Hyperkeratose (Brattstrand et al. 2009; Meyer-Hoffert et al. 2009; Brattstrand & Egelrud 1999). Auch konnte für SPINK9 eine Lokalisationsspezifität und zwar im Bereich der Leistenhaut nachgewiesen werden (Meyer-Hoffert et al. 2009). Hier führt es, vermutlich durch die Inhibition von KLK5, zu einer verminderten Desquamation und somit zu einer vermehrten Verhornung, was wiederum einen besseren Schutz an den mechanisch stärker belasteten Hand- und Fußinnenflächen bedeutet.

Solche weitgehenden Charakterisierungen bezüglich der Rolle des SPINK7s in der Haut liegen noch nicht vor. Es gibt aber Untersuchungen die Anzeigen, dass das *SPINK7*-Gen, welches auch esophageal cancer-related gene 2 genannt wird, eine tumorsuppressive Wirkung über die Regulation der Zellmigration beim Ösophaguskarzinom hat (Cheng et al. 2008).

Aufgrund der Zugehörigkeit zur SPINK-Familie, deren Vertreter entscheidende Rollen in der Funktion der Haut spielen, tat sich nun die Frage nach der Bedeutung von SPINK7 in der Haut auf. In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob SPINK7 in der menschlichen Haut

vorkommt und wenn ja, ob es eine Lokalisationsspezifität gibt, wie dies beispielsweise für das SPINK9 beschrieben ist. Verlässliche Aussagen zu letzterem waren schon aufgrund der geringen Probenzahl nicht zu erwarten. Es konnte aber gezeigt werden, dass SPINK7-mRNA, neben anderen Organen (Tonsille, Thymus, Harnblase Schilddrüse), auch in der menschlichen Haut exprimiert wird. Zudem konnte eine zunehmende Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten gezeigt werden. Das bedeutet aber nicht, dass in all diesen Geweben auch wirklich das Protein SPINK7 vorhanden sein muss. Die mRNA unterliegt nämlich noch mehreren regulatorischen Prozessen, die zu einer Modulation, bis hin zu einer Verhinderung der Transkription in ein Polypeptid führen können (Day & Tuite 1998). Leider gelang in den histologischen Untersuchungen gesunder, menschlicher Haut der Nachweis von SPINK7 nicht, was unter anderem an der Auswahl Proben liegen könnte. Dafür gelang es allerdings, SPINK7 in histologischen Präparaten von erkrankter Haut nachzuweisen. Hier ist insbesondere die Psoriasis zu nennen, wo in jeder der untersuchten Hautproben der Nachweis gelang.

Wahrscheinlich ist also, dass SPINK7 in gesunder Haut sehr viel weniger exprimiert wird als in erkrankter und somit immunhistochemisch nicht nachweisbar war. Hierzu würde ebenfalls passen, dass gezeigt werden konnte, dass die *SPINK7*-mRNA Expression in Keratinozyten, welche mit den inflammatorischen Zytokinen Interferon- γ und Interleukin-17A stimuliert wurden, deutlich höher lag, als in unstimulierten Keratinozyten. Gerade das Interleukin-17A spielt bei der Psoriasis eine gewisse Rolle in der Pathogenese (Schon 2014). Es wäre daher denkbar, dass auch SPINK7 Einfluss auf die Krankheitsentstehung beziehungsweise den Krankheitsverlauf hat. Hierzu würde auch die Tatsache passen, dass gezeigt werden konnte, dass ECRG2 nach DNA-Schädigung vermehrt exprimiert wird und in der Folge eine wachstumshemmende Wirkung hat. Somit hat es vermutlich eine tumorsuppressive Wirkung. Dazu passen auch in vitro Versuche die zeigen konnten, dass die Wirksamkeit einer Cisplatin-Therapie beim Ösophaguskarzinom gesteigert werden konnte, wenn sie gemeinsam mit ECRG2 angewandt wurde. Dieser Effekt beruhte zum einen auf einer Hochregulierung des p53, welches DNA-Reparaturen fördern, oder die Apoptose einleiten kann. Zum anderen auf einer Herunterregulierung von proliferative cell nuclear antigen (PCNA), welches eine schnelle DNA-Replikation ermöglicht (Hou et al. 2017). Analog dazu zeigt sich, dass die Expression von ECRG2 in Zellen

des primären Ösophaguskarzinoms vermindert war. Dies wäre möglicherweise dadurch zu erklären, dass bestimmte Krebszellen gezielt die Expression von ECRG2 hemmen, um somit der tumorsuppressiven Wirkung von ECRG2 zu entgehen.

Eine solch klare Regulation, sowohl bezüglich einer vermehrten, als auch einer verminderten Expression, konnte für andere Vertreter der SPINK-Familie bislang noch nicht gezeigt werden. Gleichwohl konnte für LEKTI, welches durch SPINK5 codiert wird, nachgewiesen werden, dass es in humanen Keratinozyten nach Stimulation verschiedener toll-like-Rezeptoren vermehrt exprimiert wird (Sugimoto et al. 2018).

Für SPINK6 in der Haut von Mäusen zeigte sich nach Stimulation mit TNF- α , sowie INF- γ und All-trans-Retinsäure eine Mindereexpression. Ebenso bei mechanischer oder metabolischer Schädigung der Hautbarriere (Fischer et al. 2014).

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SPINK7 gerade in erkrankter Haut vermehrt vorkommt. Dies ist allerdings als reaktives Zeichen auf die Erkrankung zu werten und nicht als, krankheitsauslösendes. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass eine experimentell herbeigeführte Reduktion von SPINK7 in Ösophagus-Progenitor-Zellen, eine Störung der epithelialen Barrierefunktion, sowie der Zelldifferenzierung zur Folge hatte. Dies wiederum begünstigte allergische Reaktionen. Darüber hinaus hatte die Reduktion von SPINK7 einen begünstigenden Einfluss auf die Entwicklung der sogenannten eosinophilen Ösophagitis, einer teils schmerzhaften Schleimhautentzündung der Speiseröhre (Azouz et al. 2018). Insgesamt scheint SPINK7 somit einen protektiven Einfluss auf epitheliale Zellverbände zu haben. Es sollte nun noch genauer untersucht werden, welche Funktion und Wirkung SPINK7 in der menschlichen Haut hat und bei welchen Erkrankungen dies zum Tragen kommt.

Da auch in Proben von Ekzemen SPINK7 auffällig häufig nachgewiesen wurde, wäre es denkbar, dass es neben der Psoriasis auch in anderen inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle spielt. Hierzu müssten weitergehende histologische Untersuchungen mit einer deutlich größeren Stückzahl durchgeführt werden. Anschließend müssten ebenfalls wieder molekularbiologische Untersuchungen, ähnlich den in dieser Arbeit beschriebenen durchgeführt werden, um zu klären ob sich auch dort eine abweichende SPINK7-Expression findet. Im Verlauf könnte man auch durch artifizielle Verringerung von SPINK7 in

Keratinocyten dessen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Barrierefunktion ähnlich wie für die Ösophagusschleimhaut geschehen untersuchen.

Schließlich bliebe zu klären, ob eine therapeutische Beeinflussung von SPINK7 möglich, und wenn ja, ob sie erfolgreich wäre. Anhand der oben beschriebenen Versuche mit Ösophaguskarzinomzellen und der Cisplatin-Therapie wäre dies durchaus denkbar. Sollte sich zudem herausstellen, dass SPINK7 auch bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen mit Barrierefunktionsstörungen eine Rolle spielt, hätte man einen einzelnen therapeutischen Ansatz für verschiedene Erkrankungen.

4.1. Ausblick

Es bedarf bei der genauen Charakterisierung von SPINK7 weiterer Funktionsanalysen, um genauer zu definieren, was seine physiologische Funktion ist. Insbesondere bleibt es offen, welche Protease von SPINK7, wenn überhaupt, gehemmt wird. Mit Hilfe dieser ließe sich auch besser das erhöhte Vorkommen bei der Psoriasis, beziehungsweise bei den Ekzemen erklären.

5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Serinprotease-Inhibitoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dermatologischer Krankheiten spielen. Ein Vertreter aus dieser Familie ist das SPINK7. Dem Gen welches für SPINK7 kodiert, das *ECRG2*, wird beim epithelialen Ösophagus-Karzinom eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben.

Ziel der Arbeit war es nun, die Expression von SPINK7 auf Gen-Ebene und auf Protein-Ebene, in menschlichen Geweben genauer zu untersuchen. Hierzu wurden auf Gen-Ebene Expressionsanalysen mittels PCR und Real-Time-PCR durchgeführt. Diese zeigten, dass *SPINK7*-mRNA neben der Haut auch in den Tonsillen, der Speicheldrüse, dem Thymus und der Schilddrüse nachweisbar war. Zudem konnte eine differenzierungsabhängige Zunahme der *SPINK7*-mRNA Expression in menschlichen Keratinocyten festgestellt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es, genauere Aussagen darüber zu treffen, wo überall in der menschlichen Haut SPINK7, nun als Protein, vorkommt. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen von menschlichen Hautschnitten, verschiedener Lokalisationen angefertigt. Die Versuche erbrachten in keinem der gesunden Hautschnitte einen eindeutigen Nachweis einer SPINK7-Expression mittels immunhistochemischer Färbung, sodass auch keine Aussage über eine Lokalisationsspezifität getroffen werden kann.

Darüber hinaus wurden Gewebeschnitte von Patienten mit verschiedenen Hauterkrankungen untersucht. Darunter die Psoriasis, Ekzeme, Basalzellkarzinome und spinocellulärer Karzinome. Hierbei konnte eine deutlich stärkere Expression gegenüber den gesunden Hautschnitten, vor allem bei der Psoriasis, aber auch bei den Ekzemen gezeigt werden. Des Weiteren wurde die *SPINK7*-mRNA Expression in Keratinozyten, welche zuvor mit inflammatorischen Zytokinen stimuliert wurden untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression bei Keratinozyten die zuvor mit Interleukin-17A und Interferon- γ stimuliert wurden im Vergleich zu unstimulierten Keratinozyten. Da bekannt ist, dass gerade Interleukin-17A bedeutend für die Pathogenese der Psoriasis ist, liegt somit die Vermutung nahe, dass SPINK7 eine Entscheidende Rolle bei der Psoriasis, sowie anderen ekzematösen Erkrankungen spielt.

Literaturverzeichnis

- Avgeris, M., Mavridis, K. & Scorilas, A., 2010. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biological chemistry*, 391(5), pp.505–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20302518> [Accessed May 24, 2014].
- Azouz, N.P. et al., 2018. The antiprotease SPINK7 serves as an inhibitory checkpoint for esophageal epithelial inflammatory responses. *Science translational medicine*, 10(444).
- Brattsand, M. et al., 2009. SPINK9: a selective, skin-specific Kazal-type serine protease inhibitor. *The Journal of investigative dermatology*, 129(7), pp.1656–1665.
- Brattstrand, M. & Egelrud, T., 1999. Expression of a Human Stratum Corneum Trypsin-like Serine Protease with Possible Function in Desquamation Maria Brattsand and Torbjörn Egelrud Purification , Molecular Cloning , and Expression of a Human Stratum Corneum Trypsin-like Serine Protease with P. *Journal of Biological Chemistry*.
- Briot, A. et al., 2010. Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in Netherton syndrome adult mouse model. *J Invest Dermatol*, 130(12), pp.2736–2742.
- Chavanas, S. et al., 2000. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature genetics*, 25(2), pp.141–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835624>.
- Cheng, X. et al., 2008. ECRG2 disruption leads to centrosome amplification and spindle checkpoint defects contributing chromosome instability. *The Journal of biological chemistry*, 283(9), pp.5888–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162463> [Accessed March 25, 2014].
- Chiricozzi, A. et al., 2018. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *International journal of molecular sciences*, 19(1).
- Cui, Y. et al., 2010. Molecular cloning and characterization of a novel esophageal cancer related gene. *International journal of oncology*, 37(6), pp.1521–1528.
- Day, D. a & Tuite, M.F., 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *The Journal of endocrinology*, 157(3), pp.361–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9691970>.
- Egelrud, T., 2000. Desquamation in the stratum corneum. *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 208, pp.44–45.
- Egelrud, T. et al., 2005. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *The British journal of dermatology*, 153(6), pp.1200–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16307658>.
- Elisabeth Ekholm, I., Brattsand, M. & Egelrud, T., 2000. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: A missing link in the desquamation process? *Journal of Investigative Dermatology*, 114(1), pp.56–63.
- Fischer, J. et al., 2014. Characterization of Spink6 in mouse skin: the conserved inhibitor of kallikrein-related peptidases is reduced by barrier injury. *The Journal of investigative*

dermatology, 134(5), pp.1305–1312.

- Fischer, J. & Meyer-Hoffert, U., 2013. Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - from physiology to diseases to therapeutic options. *Thrombosis and haemostasis*, 110(3), pp.442–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446429> [Accessed March 25, 2014].
- Geng, Y. et al., 2008. Mapping the putative binding site for uPA protein in Esophageal Cancer-Related Gene 2 by heteronuclear NMR method. *Archives of biochemistry and biophysics*, 479(2), pp.153–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824154> [Accessed May 24, 2014].
- Goettig, P., Magdolen, V. & Brandstetter, H., 2010. Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie*, 92(11), pp.1546–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3014083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2014].
- Hachem, J.-P. et al., 2006. Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. *The Journal of investigative dermatology*, 126(9), pp.2074–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16691196> [Accessed March 25, 2014].
- Hansson, L. et al., 2002. Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 118(3), pp.444–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874483>.
- Hou, X.-F. et al., 2017. ECRG2 enhances the anti-cancer effects of cisplatin in cisplatin-resistant esophageal cancer cells via upregulation of p53 and downregulation of PCNA. *World journal of gastroenterology*, 23(10), pp.1796–1803.
- Jaller Char, J.J. et al., 2018. The Role of IL-17 in the Human Immune System and Its Blockage as a Treatment of Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 17(5), pp.539–542.
- Kantyka, T. et al., 2011. Inhibition of kallikrein-related peptidases by the serine protease inhibitor of Kazal-type 6. *Peptides*, 32(6), pp.1187–1192. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978111001148>.
- Kawasaki, S. et al., 2003. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Experimental Eye Research*, 77(1), pp.17–26. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483503000873> [Accessed May 24, 2014].
- Lucchesi, C., Sheikh, M.S. & Huang, Y., 2016. Negative regulation of RNA-binding protein HuR by tumor-suppressor ECRG2. *Oncogene*, 35(20), pp.2565–2573.
- Meyer-Hoffert, U., 2009. Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 57(5), pp.345–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19688185> [Accessed March 25, 2014].
- Meyer-Hoffert, U., Wu, Z. & Schroder, J.M., 2009. Identification of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor. *PLoS One*, 4(2), p.e4372. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190773>.
- Mitsudo, K. et al., 2003. Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A,

- cathepsin G, and elastase by LEKTI: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 42(13), pp.3874–81.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667078>.
- Redelfs, L. et al., 2016. The serine protease inhibitor of Kazal-type 9 (SPINK9) is expressed in lichen simplex chronicus, actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Archives of dermatological research*, 308(2), pp.133–137.
- Schon, M.P., 2014. The plot thickens while the scope broadens: a holistic view on IL-17 in psoriasis and other inflammatory disorders. *Experimental dermatology*, 23(11), pp.804–806.
- Sugimoto, S. et al., 2018. Toll-like receptor signaling induces the expression of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor in epidermal keratinocytes. *Journal of dermatological science*, 92(2), pp.181–187.
- Voegeli, R. et al., 2011. Increased mass levels of certain serine proteases in the stratum corneum in acute eczematous atopic skin. *International journal of cosmetic science*, 33(6), pp.560–565.
- Voegeli, R. et al., 2009. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *The British journal of dermatology*, 161(1), pp.70–77.

Anhang

Histologische Proben

Alle hier aufgelisteten Proben entstammen dem histologischen Archiv der Universitäts-Hautklinik der Christian-Albrechts Universität zu Kiel. Die Proben wurden zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken nach schriftlicher Aufklärung der Patienten entnommen.

Tab. 3.3: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung verschiedener Hautpräparate

Präparat-Nr.	Lokalisation	Diagnose	Geschlecht	Alter	Färbungsgrad
Gesunde Haut					
340/05	Großzehe	gesund	m	77	-
1137/13	Zeigefinger	gesund	w	84	-
1463/13	kl. Finger	gesund	w	17	-
1706/13	Fußsohle	gesund	w	51	-
2203/13	Fußsohle	gesund	m	62	-
2357/06	Achsel	gesund	m	67	-
4037/05	Wade	gesund	m	43	-
8312/05	LWS	gesund	w	50	-
G149/06	LWS	gesund	-	-	-
833/13	LWS	gesund	m	76	-
873/13	Wade	gesund	w	86	-
267/13	Rücken	gesund	w	90	-
577/13	Brust	gesund	w	69	-
802/13	Schulter	gesund	m	74	-
394/13	OS	gesund	m	71	-
219/13	Knöchel	gesund	w	37	-
826/13	Nasenwurzel	gesund	w	63	-
399/13	Wange	gesund	m	70	-

2458/13	Kopfhaut	gesund	m	64	-
2210/13	Kopfhaut	gesund	m	84	
Basaliom					
7/10	Wange	zystisches Basaliom	m	82	+
351/13	Nasenflügel	Basalzellkarzinom	w	76	-
361/13	Nase	Basalzellkarzinom	m	72	+
386/13	Stirn	sklerodermiformes Basaliom	w	94	-
633/13	Schulter	Basalzellkarzinom	w	72	-
Spinozelluläres Karzinom					
71/13	Kiefer	Plattenepithelkarzinom	w	78	+
17/13	-	Plattenepithelkarzinom	-	-	-
Ekzem					
408/09	Flanke	subakutes Ekzem	m	75	-
519/09	Wade	chron. Ekzem bei Ichthyosis vulgaris + Fillagrinmangel	m	52	++
719/09	Achsel	subakutes Ekzem	m	70	+
2621/07	Bauch	chron. atypisches Ekzem	m	50	++
12254/09	Wade	impetiginisiertes psoriasiformes Ezem	m	12	++
12926/09	Hals	subakutes Ekzem	w	61	+
13348/09	Rücken	subakutes Ekzem	w	58	+
Psoriasis					
4593/09	Bauch	Psoriasis pustulosa	m	68	+
4606/09	Brustbein	Psoriasis vulgaris	m	29	++
5619/09	OS	Psoriasis pustulosa	w	63	++
6072/09	OS	Psoriasis vulgaris	m	55	+

6409/09	-	Psoriasis pustulosa	w	36	++
6941/09	US	Psoriasis vulgaris	m	50	++
7091/09	OS	Psoriasis vulgaris	-	-	++
3D-Epidermis- model					
3DH-31	-	-	-	-	++
3DH-31 PAK stimuliert	-	-	-	-	++

Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

The serine protease inhibitor of Kazal-type 7 (SPINK7) is expressed in human skin.

Weber C, Fischer J, Redelfs L, Rademacher F, Harder J, Weidinger S, Wu Z, Meyer-Hoffert U.

Arch Dermatol Res. 2017 Nov;309(9):767-771. doi: 10.1007/s00403-017-1773-9. Epub 2017 Aug 29.

The serine protease inhibitor of Kazal-type 9 (SPINK9) is expressed in lichen simplex chronicus, actinic keratosis and squamous cell carcinoma

Redels L., Fischer J., **Weber C.**, Wu Z, Meyer-Hoffert U.

Arch Dermatol Res. 2016 Mar;308(2):133-7.doi: 10.1007/s00403-015-1616-5. Epub 2016 Jan 8

Zitierbare Abstracts

Characterization of the protease inhibitor SPINK7 in human skin

Weber, C.; Fischer, J.; Redelfs, L.; Meyer-Hoffert, U.

Exp. Dermatol. Volume: 23. Pages: E4-E4 Published : MAR 2014

Expression of the serine protease inhibitor of Kazal-type-9 in squamous cell carcinoma an actinic keratosis

Redelfs, L.; Fischer, J.; Weber, C.; Meyer-Hoffert, U.

Exp. Dermatol. Volume: 23. Pages: E18-E18 Published: MAR 2014

Danksagung

Zu allererst möchte ich natürlich meinem Doktorvater PD Dr. Dr. med. Ulf Meyer-Hoffert danken. Dafür, dass er mir die Chance gegeben hat einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten zu erlangen und für all die Unterstützung auf dem Weg. Vor allem aber für eine wahrlich engelsgleiche Geduld, die mich ein ums andere Mal verblüfft hat.

Des Weiteren gilt ein großer Dank meinem anfänglichen Betreuer Dr. rer. nat. Jan Fischer. Ohne ihn hätte ich im Labor noch verlorener gewirkt als ich es ohnehin schon getan habe. Obwohl er selbst mitten in der Endphase seiner Arbeit steckte, hatte er immer ein offenes Ohr für meine Anliegen. Danke Jan.

Danke auch Sandra und Christel, die nicht nur mit fachlichem Rat stets zur Stelle waren sondern auch für ein mehr als angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Natürlich bedanke ich mich auch bei allen anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Harder und seiner Arbeitsgruppe.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Dafür mir ein ums andere Mal in den Hintern getreten zu haben und mich auch sonst immer vollends unterstützt zu haben.

Euch allen vielen herzlichen Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Clemens Georg Ewald Weber, dass die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, nach Inhalt und Form selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst wurde. Diese Arbeit oder Teile daraus wurde bisher noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht (siehe Veröffentlichungen).

Kiel, den 09.03.2019

Clemens Weber