

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie

Rekonstitution des Netherton Syndroms nach Gentransfer von rAAV2-LEKTI-Vektoren

Daniela Rödl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Chr. F. W. Becker

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
2. apl. Prof. Dr. J. T. M. Buters

Die Dissertation wurde am 21.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.04.2010 angenommen.

Der experimentelle Teil dieser Doktorarbeit wurde im Zentrum für Allergie und Umwelt an der Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München unter der Leitung von Frau Professor Heidrun Behrendt durchgeführt.

Meiner Familie in großer Dankbarkeit

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Markus Braun-Falco, Medizinische Fakultät der LMU München, von dem ich das Thema für meine Dissertation erhalten habe.

Vielmals danke ich der AG von Herrn Prof. Dr. Jeroen Titus Maria Buters für die freundliche Adoption und Unterstützung und hierbei vor allem Gudrun und Sebastian.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner, Leiter des Lehrstuhls für Biotechnologie an der Technischen Universität München, für die freundliche Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Ring, Leiter der Poliklinik für Dermatologie am Biederstein der Technischen Universität München, danke ich sehr für die konstruktive Hilfe bei der Diskussion.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. Heidrun Behrendt, Leiterin des Zentrums für Allergie und Umwelt, an der Poliklinik für Dermatologie am Biederstein der Technischen Universität München, in deren Laborräumen ich arbeiten und von der ich viel über das Erstellen und Halten von Vorträgen lernen durfte.

Großen Dank schulde ich der AG von Prof. Dr. Heiko Traupe und dabei vor allem Dr. Vinzenz Oji, Universitätsklinikum Münster, für die Überlassung von Patienten-Material, die Sequenzierung der Patienten-DNA und die freundliche und moralische Unterstützung. Weiterhin geht mein Dank an Frau Dr. Marie-Luise Preil, Tomesa-Fachklinik, Herrn Dr. Christian Andres und Frau Dr. Claudia Traidl-Hoffmann, Biedersteiner Hautklinik, Herrn Dr. Dr. Thomas Angerpoitner, Kinderchirurgische Praxis München für die freundliche Überlassung von Patienten-Material.

Danken möchte ich Frau Kerstin Holtz für die Unterstützung bei Blot-Analysen, Frau Alexandra Seißenberger, für die Einführung in Virusherstellung und Erstellung von Cryostatschnitten und Frau Gaby Pleyl-Wisgickl für zahlreiche Hilfestellungen in der Zellkultur. Frau Dr. Ingrid Weichenmeier danke ich für die schönen EM-Aufnahmen.

Überaus danken möchte ich allen Mitarbeitern des Zentrums für Allergie und Umwelt für die moralische Unterstützung und zahlreiche Hilfestellungen während meiner gesamten experimentellen Arbeit.

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1. Einleitung	1
1.1 Haut	1
1.1.1 Aufbau der Epidermis	1
1.1.1.1 <i>Stratum basale</i>	2
1.1.1.2 <i>Stratum spinosum</i>	3
1.1.1.3 <i>Stratum granulosum</i>	3
1.1.1.4 <i>Stratum corneum</i>	4
1.1.1.5 <i>Zellverbindungen</i>	5
1.1.2 Differenzierung der Keratinozyten	5
1.1.2.1 <i>Synthese von Keratinfilamentproteinen (Cytokeratinen)</i>	6
1.1.2.2 <i>Synthese von Filaggrin</i>	6
1.1.2.3 <i>Synthese des „Cornified Envelope“</i>	7
1.1.2.4 <i>Synthese des Barrierelipids</i>	7
1.2 Netherton Syndrom	8
1.2.1 Klinische Merkmale des Netherton Syndroms	9
1.2.2 Genetik	11
1.2.3 LEKTI	12
1.2.3.1 <i>Vorkommen von LEKTI</i>	12
1.2.3.2 <i>Funktionelle Eigenschaften von LEKTI</i>	13
1.2.3.3 <i>Genotyp-Phänotyp-Korrelation</i>	16
1.2.4 Derzeitige Behandlung des Netherton Syndroms	17
1.3 Gentherapie	18
1.3.1 Überblick	18
1.3.2 Strategien des Gentransfers	19
1.3.3 Die Entwicklung der Gentherapie	20
1.3.4 Hautgentherapie	23

1.4. Adeno-assoziierte Viren (AAV)	24
1.4.1 Biologie von AAV-2	25
1.4.2 Infektionsweg von AAV-2	27
1.4.3 AAV Serotypen	29
1.4.4 Integrationsverhalten von rAAV Vektoren	30
1.4.5 rAAV Vektoren in der Dermatologie	31
1.4.6 Rekombinante AAV-2 Vektoren	32
1.5 Ziel der Arbeit	35
2. Material	36
2.1 Bakterienstämme	36
2.2 Plasmide	36
2.3 Enzyme	37
2.4 Eukaryotische Zellen	38
2.4.1 HeLa-Zellen	38
2.4.2 293-Zellen	38
2.4.3 NIH3T3 Fibroblasten	38
2.4.4 Primäre humane Keratinozyten	38
2.4.4.1 <i>Primäre humane Keratinozyten von gesunden Spendern</i>	38
2.4.4.2 <i>Primäre, humane Keratinozyten von homozygoten Netherton-Patienten</i>	38
2.4.4.3 <i>Primäre, humane Keratinozyten von Patienten mit atopischem Ekzem</i>	39
2.5 Zellkulturmedien und Supplemente	39
2.6 Antikörper	40
2.7 Primer	40
2.8 Chemikalien, Lösungen und „Kits“	41
2.9 Geräte und sonstige Materialien	43
2.10 Zusammensetzung von Puffer und Medien	46
3 Methoden	52

3.1	Arbeiten mit Bakterien	52
3.1.1	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten	52
3.1.2	Anzucht von Bakterien in Schüttelkulturen	52
3.1.3	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock	53
3.1.3.1	<i>Ligation von PCR-Produkten in pCRII-TOPO und Blau-Weiß-Selektion</i>	53
3.2	DNA-Analysemethoden	53
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli-Zellen	53
3.2.1.1	<i>DNA-Extraktion mittels alkalischer Bakterienlyse</i>	54
3.2.1.2	<i>Reinigung der isolierten Plasmid-DNA</i>	54
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	55
3.2.2.1	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung</i>	55
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	55
3.2.3.1	<i>Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	56
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
3.2.4.1	<i>Gradienten-PCR</i>	58
3.2.4.2	<i>Screening-PCR</i>	58
3.2.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	59
3.2.6	Klonierung von Restriktionsfragmenten	59
3.3	RNA-Methoden	60
3.3.1	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	60
3.3.1.1	<i>RNA-Konzentrationsbestimmung</i>	61
3.3.1.2	<i>Qualitätskontrolle der RNA im Agarosegel</i>	61
3.3.2	cDNA-Synthese	61
3.3.3	RT-PCR	62
3.3.4	„realtime“ PCR	62
3.4	Protein-Methoden	63
3.4.1	FACS-Analyse	63
3.4.1.1	<i>Fixierung, Permeabilisierung und Färbung des Antigens</i>	64
3.4.1.2	<i>Detektion des gebundenen Primärantikörpers</i>	65
3.4.1.3	<i>Bestimmung des Anteils an toten Zellen mittels FACS-Analyse</i>	66

3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	66
3.4.3	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	66
3.4.3.1	<i>Westernblot</i>	66
3.4.3.2	<i>DotBlot-Verfahren</i>	67
3.4.3.3	<i>Reversible Ponceau S-Färbung transferierter Proteine</i>	68
3.4.3.4	<i>Detektion transferierter Proteine mit spezifischen Antikörpern</i>	68
3.4.4	Herstellung von Zellhomogenaten	69
3.4.4.1	<i>Proteinbestimmung</i>	69
3.5	Aktivitätstest mit Protease-Substraten	70
3.6	Histologische Methoden	71
3.6.1	Herstellung von Kryostatschnitten	71
3.6.2	Nachweis von Proteinen in Kryostatschnitten	72
3.6.3	Zymographie in Kryostatschnitten	73
3.7	Zytochemische Methoden	72
3.7.1	Nachweis von Proteinen in Keratinozyten durch Zytochemie	72
3.7.2	Nachweis viraler AAV-2 Partikel	73
3.8.	Herstellung von rAAV-2 Vektoren (rAAV-2 Verpackung)	73
3.8.1	Trippeltransduktion in 293-Zellen	74
3.8.2	Aufreinigung von rAAV-2 Partikel über Ammoniumsulfat-präzipitation und Iodixonal-Zentrifugation	75
3.8.3	Bestimmung des rAAV-2 Partikeltiters mittels AAV-ELISA	76
3.9	Kultivierung eukaryotischer Zellen	77
3.9.1	Bestimmung der Zellzahl	77
3.9.2	Einfrieren von Zellen	77
3.9.3	Auftauen von Zellen	78
3.9.4	Kultivierung von 293 Zellen	78
3.9.5	Kultivierung von 3T3 Zellen	79
3.9.5.1	<i>Mitomycin C-Behandlung von 3T3-Zellen</i>	79
3.9.6	Kultivierung von Keratinozyten	80

3.9.6.1	<i>Keratinocytenisolierung aus Hautproben</i>	80
3.9.6.2	<i>Kultivierung von Keratinocyten auf 3T3-Fibroblasten</i>	80
3.9.6.3	<i>Keratinocytenkultur ohne Feederzellen</i>	81
3.9.6.4	<i>Passagieren von Keratinocyten</i>	81
3.9.6.5	<i>Transfektion von Keratinocyten</i>	81
4.	Ergebnisse	82
4.1.	Klonierung der LEKTI-cDNA in pTRUF/C	82
4.1.1	Darstellung der Klonierungsstrategie	82
4.1.2	Schnittstellenkontrolle in pTRE2hyg-LEKTI	83
4.1.3	Ligation der LEKTI-cDNA in pTRUF/C zur Bildung von pTR-UF/C-LEKTI	85
4.1.4	Kontrolle der erfolgreichen Ligation der LEKTI-cDNA in pTR-UF/C	85
4.1.4.1	<i>PCR-Analyse von pTR-UF/C-LEKTI</i>	85
4.1.4.2	<i>Restriktionsanalyse in pTR-UF/C-LEKTI</i>	86
4.2.	Verpackung von pTR-UF/C-LEKTI-Klon11 zu rAAV-2-LEKTI	89
4.2.1	Identitätsnachweis von pRC und pXX6 und pTR-UF/C-GFP	89
4.2.2	Bestimmung der viralen Partikelmenge	91
4.2.3	Cytochemischer Nachweis der Transfektion	92
4.3.	Charakterisierung der verwendeten NS-Patienten	93
4.3.1.	Klinische Beobachtungen	93
4.3.1.1	<i>NS-Patient 1</i>	93
4.3.1.2	<i>NS-Patient 2</i>	93
4.3.1.3	<i>NS-Patient 3</i>	94
4.3.1.4	<i>NS-Patient 4</i>	94
4.3.1.5	<i>NS-Patient 5</i>	95
4.3.1.6	<i>NS-Patient 6</i>	95
4.3.1.7	<i>Klinisches Bild des Netherton Syndroms</i>	95
4.3.2	Genetische Analyse der NS-Patienten	96
4.3.3	Kultivierung von NS-Keratinocyten auf 3T3-Feederzellen	98

4.3.4	Transfektion von NS-Keratinocyten mit rAAV-2-Vektoren	99
4.4.	Induktion der Differenzierung in Keratinocyten	100
4.4.1	Lichtmikroskopischer Nachweis der Differenzierung in Keratinocyten	100
4.4.2	Zytochemischer Nachweis der Differenzierung in Keratinocyten	102
4.4.2.1	<i>Immuncytochemischer Nachweis von Involukrin</i>	102
4.4.2.2	<i>Immuncytochemischer Nachweis von LEKTI</i>	103
4.4.2.3	<i>Immuncytochemischer Nachweis von SCTE</i>	104
4.4.2.4	<i>Immuncytochemischer Nachweis von Desmoglein-1</i>	105
4.4.2.5	<i>Immuncytochemischer Nachweis von Corneodesmosin</i>	106
4.5.	Nachweis von LEKTI-mRNA in gesunden Keratinocyten	107
4.5.1	Nachweis von LEKTI -mRNA über Reverse Transkriptase PCR	108
4.5.1.1	<i>Nachweis von LEKTI-mRNA in gesunden humanen Keratinocyten</i>	108
4.5.1.2	<i>Nachweis von LEKTI-mRNA nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI</i>	109
4.5.1.3	<i>Nachweis von LEKTI-mRNA in Keratinocyten von NS-Patienten</i>	111
4.5.2	Quantitativer Nachweis der LEKTI –mRNA über „realtime“ PCR	112
4.5.2.1	<i>Vergleich der „realtime“ PCR zwischen gesunden und NS-Keratinocyten</i>	112
4.5.2.2	<i>„realtime“ PCR-Nachweis der LEKTI-Expression nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI</i>	114
4.6.	FACS-Analyse	117
4.6.1	LEKTI-Proteinmenge in Keratinocyten	117
4.6.1.1	<i>Vergleich der LEKTI-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten</i>	117
4.6.1.2	<i>LEKTI-Proteinmenge in rAAV2-transfizierten NS-Keratinocyten</i>	119
4.6.2	Desmoglein-1 (Dsg1) Proteinmenge in Keratinocyten	121

4.6.2.1	<i>Vergleich der Dsg1-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten</i>	121
4.6.2.2	<i>Dsg1-Proteinmenge in rAAV2-transfizierten NS-Keratinocyten</i>	123
4.6.3	Corneodesmosin-Menge in Keratinocyten	125
4.6.3.1	<i>Vergleich der CDSN-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten</i>	125
4.6.3.2	<i>CDSN-Proteinmenge in rAAV-2 transfizierten NS-Keratinocyten</i>	127
4.6.4	Dsc1-Proteinmenge in Keratinocyten	129
4.6.4.1	<i>Vergleich der Dsc1-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten</i>	129
4.6.4.2	<i>Dsc1-Proteinmenge in rAAV-2 transfizierten NS-Keratinocyten</i>	131
4.6.5	Intrazelluläre FACS-Messung von Proteasen in Keratinocyten	132
4.6.5.1	<i>Vergleich der SCTE-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten</i>	132
4.6.5.2	<i>SCTE-Proteinmenge in transfizierten NS-Keratinocyten</i>	134
4.6.5.3	<i>Vergleich der SCCE-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten</i>	135
4.6.5.4	<i>SCCE-Proteinmenge in transfizierten NS-Keratinocyten</i>	137
4.7.	Funktionelle Untersuchungen	139
4.7.1	Vergleich der Trypsin-Aktivität in gesunden und NS Keratinocyten	139
4.7.2	Trypsin-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion	142
4.7.2.1	<i>SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 1</i>	142
4.7.2.2	<i>SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 2</i>	143
4.7.2.3	<i>SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 3</i>	145
4.7.2.4	<i>SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 4</i>	146
4.7.3	Vergleich der SCCE-Aktivität in gesunden und NS-Keratinocyten	148

4.7.3.1	<i>SCCE-Aktivität nach Transfektion mit rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 3</i>	149
4.8	Dotplot- und Westernblot-Analysen	151
4.8.1	Dotplot-Analysen in Keratinozyten	151
4.8.2	Vergleichender Dotplot zwischen gesunden und NS-Keratinozyten	153
4.8.3	Westernblot-Untersuchungen in Keratinozyten	153
4.8.4	Vergleichender Westernblot zwischen gesunden und NS-Keratinozyten	154
4.9.	Hautäquivalente und Histochemie	155
4.9.1	Histochemische Färbung in normaler Haut	155
4.9.2	Hautäquivalente auf Basis von dermaler Vorhaut	156
4.9.3	Hautäquivalente auf Collagen-Gelen	158
4.10	Zytochemie in transfizierten NS-Keratinozyten	159
4.11	Vergleich von gesunden und NS-Keratinozyten mit denen aus AD-Patienten	161
5.	Diskussion	165
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	167
5.2.	Vergleich von Netherton-Keratinozyten mit gesunden Kontrollen	169
5.2.1	Kultivierung von Keratinozyten im Differenzierungsmedium	169
5.2.2	LEKTI-Expression auf mRNA-Ebene	169
5.2.3	Untersuchungen auf Proteinebene	170
5.2.3.1	<i>LEKTI</i>	170
5.2.3.2	<i>SCTE und SCCE</i>	171
5.2.3.3	<i>Untersuchung der Proteasesubstrate CDSN, Dsg1 und Dsc1</i>	174
5.2.4	Hydrolytische Aktivität in Keratinozyten	175
5.1.5.1	<i>Hydrolytische SCTE-Aktivität in Keratinozyten</i>	176
5.1.5.2	<i>Hydrolytische SCCE-Aktivität</i>	176

5.3	Transfektion mit rAAV-2 Vektoren	176
5.3.1	Untersuchung der LEKTI-mRNA-Expression in transfizierten Zellen	177
5.3.2	Untersuchung der LEKTI-Proteinmenge in transfizierten Zellen	177
5.3.3	Untersuchung von Protease-Substraten in transfizierten Zellen	178
5.3.4	Cytochemische Färbungen	179
5.3.5	Untersuchung der LEKTI-Funktion	180
5.4	Genkorrektur als neue Therapieoption für das NS	181
5.5	Gentherapie von autosomal-rezessiven Genodermatosen	182
5.6	Vorraussetzungen für einen langfristigen Gentransfer	185
5.7	Vergleich von rAAV-2 basierten Vektoren mit anderen viralen Vektoren	185
5.8.	Mausmodelle für das Netherton Syndrom	186
5.9.	Zielgerichtete Lieferung von rAAV-Partikeln	188
5.10	Ausblick	190
6.	Zusammenfassung der Arbeit	191
6.1	Zusammenfassung deutsch	192
6.2	Summary	193
7.	Literatur	194
8.	Lebenslauf	209
9.	Veröffentlichungen	210

Tabelle 1:	Inhibitoraktivität von rekombinantem LEKTI	14
Tabelle 2:	Verwendete Plasmide	36
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper	40
Tabelle 4:	Primersequenzen und erwartete Fragmentgrößen	40
Tabelle 5:	Zusammensetzung von Puffer und Medien	46
Tabelle 6:	PCR-Bedingungen für die verwendeten Oligonucleotid-Paare	58
Tabelle 7:	PCR-Bedingungen für LEKTI-Primer	58
Tabelle 8:	PCR-Bedingungen für M13-Primer	59
Tabelle 9:	Bedingungen der cDNA-Synthese-Reaktion	62
Tabelle 10:	In der FACS-Analyse verwendete Primärantikörper	64
Tabelle 11:	In der FACS-Analyse verwendete Sekundärantikörper	65
Tabelle 12:	Verwendete Proteasesubstrate und Puffer	71
Tabelle 13:	Erwartete Fragmentgrößen bei Restriktionsverdau von pTRE2hyg-LEKTI	84
Tabelle 14:	Erwartete Fragmentgrößen in pTRUF/C-LEKTI	87
Tabelle 15:	Erwartete Fragmentgrößen	88
Tabelle 16:	Erwartete Fragmente bei Verdau von pRC, pXX6 und pTR-UF/C-GFP	90
Tabelle 17:	Bestimmung der viralen Partikelmengen durch AAV-ELISA	91
Tabelle 18:	Daten zu den Netherton Syndrom Patienten	97
Tabelle 19:	Primersequenzen in RT-PCR und Real Time PCR	108
Tabelle 20:	Vergleich der LEKTI-Expression von gesunden und NS-Keratinocyten	114
Tabelle 21:	LEKTI-Expression in transfizierten NS-Keratinocyten	115
Tabelle 22:	Vergleich der dCT-Werte in transfizierten und untransfizierten Zellen	116
Tabelle 23:	LEKTI-Menge in gesunden und kranken Keratinocyten	118
Tabelle 24:	LEKTI-Proteinmenge in Abhängigkeit von Calcium	119
Tabelle 25:	Vergleich der LEKTI-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten	120
Tabelle 26:	Calcium-abhängige LEKTI-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten	121
Tabelle 27:	Vergleich der Dsg1-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten	122
Tabelle 28:	Desmoglein-1 (Dsg-1) Menge in Abhängigkeit von Calcium	123

Tabelle 29: Dsg1- Proteinmenge in rAAV-2 transfizierten NS-Keratinocyten	124
Tabelle 30: Calcium-abhängige Dsg-1 Menge in rAAV-2 transfizierten NS-Zellen	125
Tabelle 31: Vergleich der CDSN-Menge in gesunden und NS-Keratinocyten	126
Tabelle 32: CDSN-Menge in Abhängigkeit von Calcium	127
Tabelle 33: Vergleich der CDSN-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten	128
Tabelle 34: Vergleich der Dsc1-Menge in gesunden und NS-Keratinocyten	130
Tabelle 35: Dsc1-Menge in Abhängigkeit von Calcium	130
Tabelle 36: Dsc1-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten	132
Tabelle 37: Vergleich der SCTE-Menge in gesunden und NS-Keratinocyten	133
Tabelle 38: SCTE-Proteinmenge in Abhängigkeit von Calcium	134
Tabelle 39: SCTE-Menge in transfizierten Netherton-Keratinocyten	135
Tabelle 40: Vergleich der SCCE-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten	136
Tabelle 41: SCCE-Menge in Abhängigkeit von Calcium	137
Tabelle 42: SCCE-Menge in transfizierten Netherton-Keratinocyten	138
Tabelle 43: Vergleich der Trypsin-Aktivität zwischen gesunden und NS Keratinocyten	140
Tabelle 44: Trypsin-Aktivität in Abhängigkeit von Calcium	141
Tabelle 45: Vergleich der Aktivität von Patient 1 mit gesunden Zellen	143
Tabelle 46: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von Patient 1	143
Tabelle 47: Vergleich der Aktivität von Patient 2 mit gesunden Zellen	144
Tabelle 48: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von NS-Patient 2	145
Tabelle 49: Vergleich der Aktivität von NS-Patient 3 mit gesunden Zellen	146
Tabelle 50: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von NS-Patient 3	146
Tabelle 51: Vergleich der Aktivität von Patient 4 mit gesunden Zellen	147
Tabelle 52: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von NS-Patient 4	148
Tabelle 53: Vergleich der SCCE-Aktivität in gesunden und NS Keratinocyten	149
Tabelle 54: SCCE-Aktivität nach Transfektion von NS-Patient 3	151
Tabelle 55: Vergleich der LEKTI-Expression von gesunden, AD und NS-Keratinocyten	162
Tabelle 56: Vergleich der Trypsinaktivität von gesunden, AD- und NS-Keratinocyten	164

Abbildung 1:	Schematischer Aufbau der Epidermis	2
Abbildung 2:	Aminosäuresequenz der häufigsten Isoform von humanem LEKTI (NM_006846)	13
Abbildung 3:	Verteilung verwendeter Vektoren in der Gentherapie	23
Abbildung 4:	Lebenszyklus von AAV-2	28
Abbildung 5:	Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie	33
Abbildung 6:	Herstellung von rekombinanten Adeno-assoziierten Vektoren	34
Abbildung 7:	Aufbau eines Westernblots	67
Abbildung 8:	Ablauf der Chemolumineszenz-Reaktion	68
Abbildung 9:	Prinzip des AMC-Aktivitätstests	71
Abbildung 10:	Ernte von rekombinanten AAV-2 Partikeln	76
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie	83
Abbildung 12:	Restriktionsverdau von pTRE2hyg-LEKTI	84
Abbildung 13:	Screening-PCR in 30 Klonen mit LEKTI- <i>Nhe</i> I-1s und LEKTI- <i>Sac</i> I-2 as	86
Abbildung 14:	Restriktionsverdau von pTR-UF/C-LEKTI mit <i>Kpn</i> I/ <i>Not</i> I, <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI	87
Abbildung 15:	Restriktionsverdau von Klon 11, 16, 28 und 1 zur weiteren Charakterisierung von pTR-UF/C-LEKTI	88
Abbildung 16:	Identitätsnachweis von pRC, pXX6 und pTR-UF/C-GFP	89
Abbildung 17:	Dreifach-Calcium-Phosphattransfektion in 293-Zellen am Beispiel von pTR-UF/C-GFP	90
Abbildung 18:	Immuncytochemischer Nachweis der rAAV-2-Transfektion von gesunden humanen Keratinozyten	92
Abbildung 19:	Klinisches Bild in NS-Patient 2 und NS-Patient 4	96
Abbildung 20:	Kultivierung von NS-Keratinozyten auf 3T3-Fibroblasten	98
Abbildung 21:	Immuncytochemischer Nachweis der rAAV-2-Transfektion von Netherton-Keratinozyten	99
Abbildung 22:	Keratinozyten-Phänotyp im Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium	102
Abbildung 23:	Immuncytochemischer Nachweis von Involukrin	103
Abbildung 24:	Immuncytochemischer Nachweis von LEKTI	104
Abbildung 25:	Immuncytochemischer Nachweis von SCTE	105

Abbildung 26:	Immuncytochemischer Nachweis von Dsg1	106
Abbildung 27:	Immuncytochemischer Nachweis von CDSN	107
Abbildung 28:	Nachweis von LEKTI-mRNA in gesunden Keratinozyten	109
Abbildung 29:	Nachweis der Calcium-abhängigen bzw. rAAV-2 LEKTI-induzierten LEKTI-Bildung in gesunden humanen Keratinozyten auf RNA-Ebene durch RT-PCR	110
Abbildung 30:	Nachweis von LEKTI-mRNA in Keratinozyten von NS-Patient 1	111
Abbildung 31:	Nachweis von LEKTI-mRNA in Keratinozyten von NS-Patient 2, 4 und 3	112
Abbildung 32:	Vergleich der dCT-Werte der LEKTI-Expression in gesunden und NS-Keratinozyten	114
Abbildung 33:	LEKTI-Expression in NS-Keratinozyten nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP im direkten Vergleich	115
Abbildung 34:	Vergleich der dCT-Werte in transfizierten und untransfizierten Zellen	116
Abbildung 35:	Vergleich der LEKTI-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten versus NS-Keratinozyten	118
Abbildung 36:	LEKTI-Proteinmenge in rAAV-2-GFP bzw. rAAV-2-LEKTI transfizierten NS-Keratinozyten	120
Abbildung 37:	Dsg1-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten	122
Abbildung 38:	Dsg1-Proteinmenge in rAAV2-GFP (GFP) und rAAV2-LEKTI (LEKTI) transfizierten NS-Keratinozyten von n=4 Netherton-Patienten	124
Abbildung 39:	CDSN-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten	126
Abbildung 40:	CDSN-Menge in rAAV2-GFP und rAAV2-LEKTI transfizierten NS-Keratinozyten von n=4 NS-Patienten	128
Abbildung 41:	Dsc1-Menge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS- Keratinozyten	129
Abbildung 42:	Dsc1-Menge in rAAV2-GFP und rAAV2-LEKTI transfizierten NS-Keratinozyten	131

Abbildung 43:	SCTE-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten	133
Abbildung 44:	SCTE-Menge in transfizierten NS-Keratinozyten	135
Abbildung 45:	SCCE-Menge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten	136
Abbildung 46:	SCCE-Menge in transfizierten Netherton- Keratinozyten	138
Abbildung 47:	Trypsin-Aktivität in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten	140
Abbildung 48:	Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten (n=3) bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 1	142
Abbildung 49:	Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 2 (n=3)	144
Abbildung 50:	Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 3 (n=3)	145
Abbildung 51:	Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten (n=3) bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 4 (n=2)	147
Abbildung 52:	Vergleich der SCCE-Aktivität in n=3 gesunden (NHK) und NS-Keratinozyten von Patient 2, Patient 3 und Patient 4	149
Abbildung 53:	Vergleich der SCCE-Aktivität in n=3 gesunden (NHK) Keratinozyten von NS-Patient 3	150
Abbildung 54:	Dot blot in gesunden Keratinozyten	152
Abbildung 55:	Dot blot in gesunden Keratinozyten und denen von NS-Patient 2	153
Abbildung 56:	Westernblot in gesunden Keratinozyten	154
Abbildung 57:	Westernblot in gesunden und NS-Keratinozyten	155
Abbildung 58:	Histochemische Färbung in gesunder Haut	156
Abbildung 59:	Histochemische Färbung in Hautäquivalenten	157
Abbildung 60:	Hämalaun-Eosin-Färbung in Hautäquivalenten	158

Abbildung 61:	Hämalaun-Eosin-Färbung in Hautäquivalenten auf Collagengelen	159
Abbildung 62:	Cytochemische Färbung in transfizierten NS-Keratinocyten	161
Abbildung 63:	Vergleich der dCT-Werte der LEKTI-Expression in gesunden Keratinocyten (n=5) und in Keratinocyten von Patienten mit AD (n=3) und NS (n=3)	162
Abbildung 64:	Trypsin-Aktivität in gesunden Keratinocyten (n=5) im Vergleich zu AD- und NS-Keratinocyten	163
Abbildung 65:	Modellhafte Darstellung der Funktionsweise von LEKTI und seiner Zielproteasen	166

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAV-2	Adeno-assoziiertes Virus vom Typ 2
AD	Adenovirus
ADA-Mangel	Adenosin-Desaminasemangel
AG1478	EGF-RTK Inhibitor
ALA (A)	Alanin
Amp	Ampicillin
AMC	Amino-Methyl-Coumarin
ARG (R)	Arginin
ASN (N)	Asparagin
ASP (D)	Asparaginsäure
bp	Basenpaare
°C	Grad in Celsius
CDSN	Corneodesmosin
CIE	Congenitale ichthyosiforme erythrodermie
CMV	Cytomegalovirus
Co-R	Corezeptor
CYS (C)	Cystein
DNA	deoxyribonucleic acid
Dsc1	Desmocollin-1
dsDNA	double-stranded DNA
Dsg1	Desmoglein-1
E1A	adenovirales E1A-Protein
EGF	epidermal growth factor
EtBr	Ethidiumbromid
FALDH	Fettaldehyddehydrogenase
FCS	Fetal calf serum
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FKBP52	FK506-binding protein 52 (ssD-BP)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
HPSG	Heparan Sulfat Proteoglykan
ILC	Ichthyosis linearis circumflexa
Inv	Involukrin
K1	Cytokeratin 1
K5	Cytokeratin 5
K10/11	Cytokeratine 10 und 11
K14	Cytokeratin 14
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLK5	humanes Kallikrein 5, SCTE
KLK7	humanes Kallikrein 7, SCCE
L	Liter
LBamp	Luria Bruth-Medium mit Ampicillin

LEKTI	Lympho-epithelial-kazal-type-related inhibitor
M	Mol
mg	Milligramm
MG132	Proteasominhibitor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NPC	nuclear pore complex
NS	Netherton Syndrom
OD	optische Dichte
P	Phosphat
p	Promotor (z.B. p5 = Promotor an Position 5), kurzer Arm eines Chromosoms
pH	negativer Logarithmus von H ⁺ -Ionen in einer Lösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
q	langer Arm eines Chromosoms
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
rAAV	rekombinanter AAV
rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCID	Schweres Immundefiziente Krankheit
SCCE	Stratum corneum chymotrypsin-like enzyme, Kallikrein 7 (KLK7)
SCTE	Stratum corneum trypsin-like enzyme, Kallikrein 5 (KLK5)
Sec	Sekunde
SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
SLS	Sjögren-Larsson Syndrom
SPINK5	serine protease inhibitor kazal type 5
ssD-BP	single-stranded D-sequence binding protein (FKBP52)
ssDNA	single-stranded DNA
SV	simian virus
rpm	rounds per minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Haut

Die Haut ist, mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 1,6 – 2 m² und einem Gewicht von ca. 3 kg beim Erwachsenen, das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie erfüllt mehrere wichtige Aufgaben, zu denen Schutz vor mechanischen, thermischen, chemischen Schäden, Absorption von UV-Strahlen, Barriere für Bakterien und Viren, Mitregulation des Wasserhaushalts und der Körpertemperatur, Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur und Vibration gehören. Die so genannte Barrierefunktion, das heißt die weitgehende physische Abgrenzung zwischen Organismus und Umwelt, wird von der Hornschicht, der äußersten Schicht der Epidermis, vermittelt. Die Hornschicht wirkt auch als mechanische Barriere gegenüber Mikroorganismen; das trockene und saure Milieu der Hautoberfläche ist keimfeindlich gegenüber schädlichen Mikroorganismen, erlaubt aber die Besiedlung mit einer symbiotischen Hautflora, die ihrerseits die Ansiedlung schädlicher Keime behindert [Fritsch, 2004]. Anhand ihres Aufbaus kann man die Haut in drei Schichten unterteilen: die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Fettgewebe).

1.1.1 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis ist ein verhornendes, mehrschichtiges Plattenepithel ektodermaler Herkunft, das zu 90 % aus Keratinozyten besteht. Die restlichen 10 % machen spezialisierte Zellen aus: Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans-Zellen (Hautspezifische dendritische Zellen des Immunsystems) und Merkel-Zellen (dienen als Druckrezeptoren). Die Epidermis unterliegt einer lebenslangen Selbsterneuerung aufgrund von Keratinozytenstammzellen, welche entlang des Stratum basale residieren und über ein koordiniertes Teilungsverfahren die Regeneration erhalten. Während des epidermalen Differenzierungsprozesses, der insgesamt 28-30 Tage dauert, wandeln sich die mitotisch aktiven Zellen des Stratum basale zu kernlosen, verhornten Corneozyten um, die an der Oberfläche abgeschuppt werden (siehe Abbildung 1).

Durch die Differenzierungsstadien der Keratinozyten während ihrer Wanderung von der Basalschicht zur Oberfläche kann man folgende Schichten der Epidermis unterscheiden: Stratum basale (Basalzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum lucidum (Glanzschicht, nur in dicker Epidermis erkennbar) und Stratum corneum (Hornschicht). In diesen Stadien unterscheiden sich die Keratinozyten immunhistochemisch, physiologisch und in der Anzahl und Funktion ihrer Organellen [Fritsch, 2004; Braun-Falco et al., 2005].

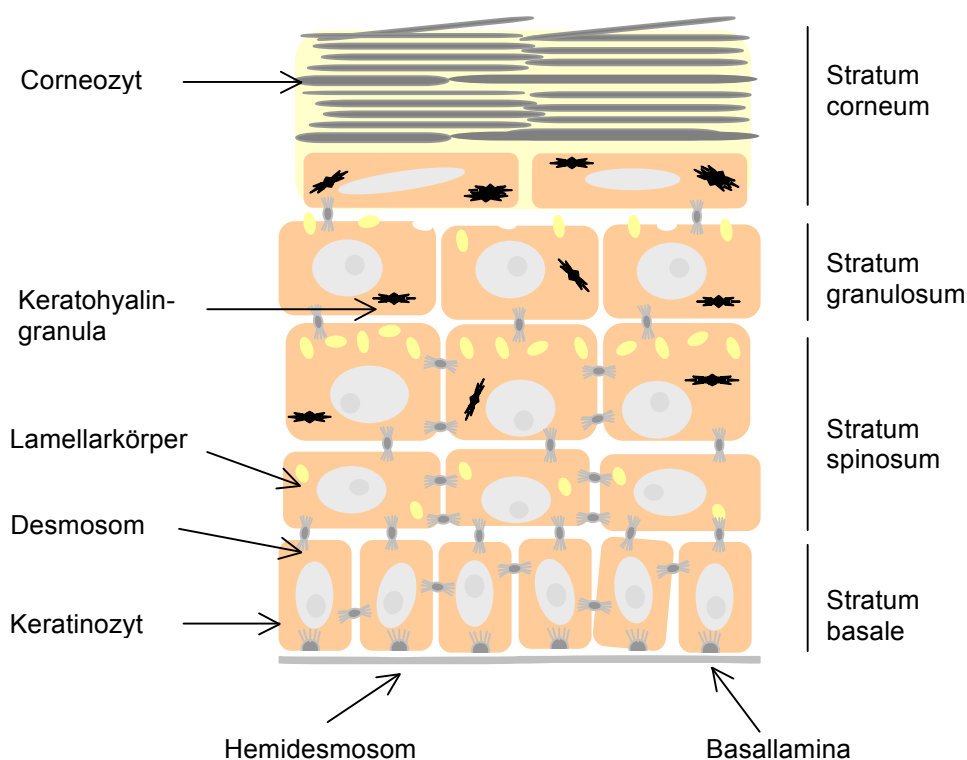


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Epidermis (siehe Text). Die Tonofilamente sind nur an ihrem Insertionspunkt eingezeichnet.

1.1.1.1 Stratum basale

Die Basalzellen bilden die unterste Schicht der Epidermis aus, das Stratum basale. Es sind längliche Zellen, die hochkant stehen und über Hemidesmosomen wie $\alpha_6\beta_4$ -Integrin mit der darunter liegenden Basalmembran verbunden sind. Die Basalzellen haben zahlreiche fingerförmige Ausläufer und sind über Desmosomen miteinander

und mit darüberliegenden Zellen verbunden. Sie haben einen länglich ovalen Zellkern und relativ wenig Cytoplasma. Die Zellen enthalten viele Ribosomen und bilden saure und basische Keratine als fibröse Proteine, die sich zu heterodimeren Keratinfilamenten, einer Sorte von Intermediärfilamenten, zusammenlagern. Diese bündeln sich wiederum zu 7,5 nm dicken Tonofibrillen, die an den Desmosomen mit der Zellmembran verankert sind. Immunhistochemisch lassen sich die Basalzellen durch die Expression der Keratine K5/K14 und spezieller Integrine charakterisieren ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ und $\alpha_9\beta_1$).

Die Hauptaufgabe des Stratum basale liegt in der ständigen Nachlieferung von Tochterzellen. Die direkt aus den Basalzellen hervorgehenden Keratinozyten (transient amplifizierende Zellen) können sich noch vier bis fünf Mal teilen. Die Tochterzellen dieser transient amplifizierenden Zellen, die Übergangszellen, exprimieren kein $\alpha_6\beta_4$ -Integrin mehr und verlieren den Kontakt mit der Basalmembran [Fritsch, 2004; Moll et al., 1982; Steinert et al., 1985].

1.1.1.2 Stratum spinosum

Direkt auf das Stratum basale folgt das vielschichtige, den Großteil der Epidermis ausmachende, Stratum spinosum (Stachelzellschicht). Hier flachen die Keratinozyten zunehmend ab. Die Zellen haben sehr viele zackenartige Fortsätze mit unzähligen Desmosomen, wodurch die Zellen fest miteinander verbunden sind. Die Zahl der Tonofibrillen nimmt hier und in Richtung der Epitheloberfläche immer mehr zu. Im Stratum spinosum tritt eine Zunahme des Zellvolumens und eine allmähliche horizontale Umorientierung der Zellachse ein. Die Tonofilamente sind in dieser Schicht breit und durch die neu-synthetisierten Keratine K1/K10 ergänzt bzw. ersetzt [Fritsch, 2004; Braun-Falco et al., 2005; Garrod et al., 2002]. Auch die Expression der membranständigen Transglutaminase und des Hüllproteins Involukrin beginnen hier.

1.1.1.3 Stratum granulosum

Auf dem Stratum spinosum liegt das zwei bis drei Zelllagen umfassende Stratum granulosum (Körnerschicht), das durch die hier gebildeten basophilen Keratohyalin granula (Vorläufer der Keratinmatrix) gekennzeichnet ist. Das Stratum

granulosum gilt als die physiologisch aktivste Schicht der Epidermis. Die Keratohyalin granula enthalten zunächst pro-Filaggrin, das sich um die Keratinfibrillen (Tonofibrillen) verteilt und als Filaggrin eine irreversible Aggregation und Polymerisation der Keratinfibrillen bewirkt. Im Stratum lucidum verflüssigen sich die Keratohyalin granula und durchdringen als sog. Eleidin die Zellen. Zusammen mit den Tonofibrillen verursacht dies die Verhornung der Zellen.

Im oberen Stratum granulosum erfolgen rapide ablaufende Differenzierungsvorgänge: Abplattung der Zellen, Abbau sämtlicher Zellorganellen und des Zellkerns, Dehydratation, Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum und des „cornified envelope“ an der Plasmamembran und schließlich die Verhornung. Die Zellen werden starr, immobil und in einer streng geometrischen Anordnung aneinander fixiert [Fritsch, 2004].

1.1.1.4 Stratum corneum

Das Stratum granulosum geht abrupt in die äußerste Zellschicht über, dem Stratum corneum (Hornschicht). Dieses besteht aus 10-20 Zellschichten fest kohärenter, plättchenartiger, kernloser, hexagonaler Corneozyten. Die Barrierenfunktion des Stratum corneum ergibt sich daraus, dass die Corneozyten (die vorwiegend aus Eleidin, Keratinfibrillen und Membran bestehen) in eine wasserundurchlässige Lipidmatrix eingebettet sind.

Die Bildung dieser Lipide beginnt im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum mit dem Auftreten von Lamellarkörpern. Diese enthalten neben proteolytischen Enzymen (z.B. pro-SCCE) und Glykoproteinen (z.B. CDSN) hauptsächlich übereinandergestapelte, abgeflachte unilamellare Lipidvesikel. Kurz vor der terminalen Differenzierung verschmilzt in normaler Haut die Membran dieser Lamellarkörper mit der Zellmembran und die Lipidvesikel werden von den granulären Zellen in den Interzellularraum der Grenzschicht zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum abgegeben. Dort ordnen sie sich parallel zur Zellmembran der vorhornten Zellen an, wobei sie durch Schrumpfung der Corneozyten während der Verhornung näher aneinanderrücken und verschmelzen.

1.1.1.5 Zellverbindungen

Die Keratinozyten sind miteinander durch Desmosomen und die Adhärenzkontakte (focal adhesion) verbunden. Beide dienen der interzellulären Adhäsion und der Insertion von Filamenten. Die Adhärenz des Stratum basale an die Basallamina wird durch die Hemidesmosomen vermittelt. Eine andere Verbindungsart, die nicht der Adhärenz, sondern als Kommunikationskanäle zwischen den Keratinozyten dienen, sind die „gap junctions“. Desmosomen, Hemidesmosomen und Adhärenzkontakte sind Spezialisierungen der Zellmembran, die aus plattenartigen Verdickungen an deren Innenseite (Plaques) gebildet werden. Je zwei solcher Platten liegen einander auf verschiedenen Zellen durch den Interzellularraum getrennt gegenüber; die Hemidesmosomen bestehen nur aus einem halben Plaque. Die cytoplasmatischen Seiten der Plaques tragen die Verankerungsstrukturen für die Filamente (Aktinfilamente binden an Adhärenzkontakte; Keratinfilamente binden an Hemidesmosomen und Desmosomen). Für die interzelluläre Adhärenz sind hauptsächlich die Desmosomen zuständig. Die transmembranen Adhäsionsmoleküle der Desmosomen sind Cadherine (Calcium-abhängige Adhäsionsmoleküle) der Familien der Desmocolline (Dsc1-3) und Desmogleine (Dsg1-3). Ihre extrazellulären Domänen binden homolog an entsprechende Moleküle auf der Nachbarzelle; ihre intrazellulären Anteile sind im Plaque-Polypeptid Plakoglobin verankert [Fritsch, 2004].

1.1.2 Differenzierung der Keratinozyten

Die Umwandlung lebender Keratinozyten in die schützende Hornschicht ist ein sich in Stunden abspielender Prozess. In ihm werden synchron Syntheseprodukte zur wechselseitigen Interaktion freigesetzt, die während der zweiwöchigen Wanderung der Keratinozyten in das Stratum granulosum langsam auf vier getrennten, aber parallel ablaufenden Reaktionswegen vorbereitet wurden.

1.1.2.1 Synthese von Keratinfilamentproteinen (Cytokeratinen)

Keratinfilamente werden aus den hochstabilen, unlöslichen Cytokeratinen (Polypeptidketten von 40-70 kDa, bestehend aus helikalen und nicht-helikalen Domänen), den hauptsächlich epidermalen Strukturproteinen, aufgebaut. 30 verschiedene Cytokeratine sind bekannt, die zwei Familien bilden: Familie I umfasst die sauren, Familie II die neutralen bis alkalischen Polypeptide. Typ-I-Gene sind auf Chromosom 17q, Typ-II-Gene auf Chromosom 12q lokalisiert. Während der Differenzierung der Keratinozyten werden die niedermolekularen „basalen“ (K5/K14) zugunsten der hochmolekularen (K1/K10,11 – Keratinisationsmarker) verdrängt. Anstelle von Keratin 10 ist für Palmoplantarhaut Cytokeratin 9 spezifisch. Für verhornende Mukosa und hyperproliferative Zustände der Epidermis (z.B. Psoriasis) ist das Paar K6/K16 typisch.

1.1.2.2 Synthese von Filaggrin

Filaggrine sind eine Gruppe stark basischer (Histidin-reicher) Proteine (35 kDa), die aus dem phosphorylierten Vorläuferprotein Profilaggrin (ca. 400 kDa) durch posttranslationale Modifikation hervorgehen. Das Profilaggrin/Filaggrin-Gen liegt auf Chromosom 1q21. Profilaggrin wird im obersten Stratum spinosum synthetisiert und bildet mit Keratinfilamenten klumpige Aggregate (Keratohyalingranula). Im Stratum granulosum kommt es zur Dephosphorylierung und zum schrittweisen proteolytischen Abbau von Profilaggrin, das dabei freigesetzte, monomere Filaggrin führt zur Aggregation von Keratinfilamenten und deren Vernetzung durch Disulfidbrücken. Damit ist die Bildung des Keratins abgeschlossen, das nun als unlöslicher Komplex filamentärer und interfilamentärer Proteine vorliegt. Die Filaggrine zerfallen in der Hornschicht noch weiter zu Aminosäuren (zu Gunsten der Wasserretention) und Urokaninsäure (natürliche photoprotektive Substanz der Hornschicht).

Profilaggrin, Loricrin, Involukrin u.a. sind Proteine, die zusammen mit den Keratinen die Struktur der Hornzellen bilden. Sie sind Produkte einer Gruppe strukturell, funktionell und evolutionär verwandter Gene, die im epidermalen Differenzierungskomplex auf Chromosom 1q21 lokalisiert sind [Fritsch, 2004; Hohl et al., 1991].

1.1.2.3 Synthese des „Cornified Envelope“

Im oberen Stratum spinosum erscheint das Cystin-reiche, unlösliche Protein Involukrin (80 kDa). Es lagert sich am Übergang des Stratum granulosum zur Hornschicht an die Innenseite der Zellmembran an und wird dort, gemeinsam mit anderen Proteinen (Loricrin, Keratolinin, Pancornuline) durch eine Calcium-abhängige membrangebundene Transglutaminase (Typ 1 und 3) in hohem Maße quervernetzt. Diese Quervernetzung führt zu hoher Rigidität der Hornzelle, aber auch zu beträchtlicher chemischer Resistenz gegen Alkalien, Detergenzien, reduzierende Substanzen und organische Lösungsmittel, nicht aber gegen proteolytische Enzyme. Das „cornified envelope“ ist eine für das Stratum corneum typische Struktur und in tieferen Zellschichten nicht nachweisbar. Unmittelbar außen angelagert und durch Wirkung der Transglutaminase gebunden, findet sich eine membranartige Ceramid-reiche Lipidschicht, die als Verbindung zwischen Corneozyten und der Barrierelipid-haltigen Interzellulärsubstanz dient [Fritsch, 2004; Steinert et al., 1981; Lonsdale-Eccles et al., 1984; Magaldi et al., 1990; Hohl et al., 1991].

1.1.2.4 Synthese des Barrierelipids

In der Haut finden 20-25 % der körpereigenen Lipidsynthese statt, deren Regulation weitgehend unabhängig von systemischen Einflüssen ist. Die Keratinozyten in den unteren Schichten der Epidermis besitzen, wie die meisten Gewebe, überwiegend membrangebundene Phospholipide. Im oberen Stratum spinosum erfolgt die Synthese der Lamellarkörper, die neben verschiedenen hydrolytischen Enzymen, reichlich Glykosylceramide, Sterolester und Phospholipide enthalten. Diese Lipide liegen innerhalb der Organellen in Form von parallelen Plättchen vor und werden am Übergang des Stratum granulosum in das Stratum corneum in koordinierter Weise gemeinsam mit den Enzymen durch Exocytose in den Interzellulärraum ausgeschüttet. Gleichzeitig kommt es zu einem pH-Abfall, der das Milieu zu Enzymaktivierung bietet. Hier werden die Lipide enzymatisch vorwiegend in hydrophobe Metaboliten (Ceramide, Cholesterin, freie Fettsäuren), das eigentliche „Barrierelipid“, umgewandelt und gleichzeitig zu breiten, parallel gerichteten Lipidlamellen remodelliert, die den Interzellulärraum wasserdicht abschließen. Der Volumenanteil des Interzellulärraums nimmt hierbei beträchtlich zu. Die Fette sind

zusammen mit den bis in das Stratum disjunctum der Hornschicht noch erhaltenen, Desmosomen für die Kohärenz der Hornschicht verantwortlich. Die enzymatische Umwandlung der polaren Phospho- und Glykolipide in eine weniger polare Lipidmischung besitzt neben der rein physikalischen Funktion eine Bedeutung für die Regulation der epidermalen Kinetik tieferer Zellschichten („second messenger“-Funktion von Sphingomyelin auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge [Fritsch, 2004].

Gleichzeitig mit diesen vier metabolischen Vorgängen baut der Keratinozyt des Stratum granulosum vor seinem Übergang ins Stratum corneum sämtliche Zellorganellen ab. Am Ende des epidermalen Differenzierungsvorgangs liegt die fertige Hornschicht vor, die mit einer Ziegelmauer verglichen wird: regelmäßig angeordnete, durch das „cornified envelope“ starre, kompakte, mit hochmolekularem Keratin in einer elektronendichten Matrix (Filaggrin) gefüllte Bausteine, die mit einem undurchlässigen Lipid „Zement“ zu einer Lamelle verbunden sind [Fritsch, 2004; Elias, 1983; Williams et al., 1993; Burge, 1994].

1.2 Netherton Syndrom

Das Netherton Syndrom (NS, MIM 256500) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Genodermatose, deren Ursache in dem für den Serinprotease-Inhibitor LEKTI (*Lympho-epithelial kazal-type related inhibitor*) codierenden Gen *SPINK5* (*serine protease inhibitor, Kazal type 5*) liegt. Die Häufigkeit wird auf 1:50.000 geschätzt [Traupe, 1989].

Durch Mutationen im *SPINK5*- Gen kommt es zu einer fehlenden oder verminderten Inhibition und dadurch gesteigerten Aktivität der beiden im Stratum corneum vorkommenden Serinproteasen SCTE (*Stratum corneum tryptic-like enzyme*, hK5) und SCCE (*Stratum corneum chymotrypsin-like enzyme*, hK7). Das führt zu einem erhöhten und verfrühten Abbau von Desmosomen-Bestandteilen und dadurch zu einer vorzeitigen Desquamation oberer epidermaler Schichten (siehe später).

1.2.1 Klinische Merkmale des Netherton Syndroms

Das Netherton Syndrom ist durch die klinische Trias variable angeborene Erythrodermie, Haarschaftanomalien (Trichorrhexis nodosa, Trichorrhexis invaginata, Pili torti) und atopische Diathese charakterisiert. Das Auftreten von Trichorrhexis invaginata (Bambushaaren) wurde als pathognomisch angesehen. Diese und andere Haaranomalien (Pili torti, Trichorrhexis nodosa), kommen aber nicht immer vor und auch wiederholte Haarproben können negativ sein.

Die Erythrodermie tritt in zwei Hapterscheinungsformen auf: der mildere Phänotyp, die Ichthyosis linearis circumflexa (ILC) wurde 1949 von Comèl beschrieben [Comèl, 1949] und der schwere Phänotyp, die congenitale ichthyosiforme Erythrodermie (CIE), wurde 1958 von Netherton beschrieben, der in diesem Zusammenhang auch das erste Mal das Bambushaar erwähnte [Netherton, 1958]. Die CIE verläuft häufig letal, wandelt sich aber gelegentlich im Laufe der Jahre auch zu dem milderen Typ um. Das Netherton Syndrom kann sowohl Männer als auch Frauen betreffen, Männer scheinen jedoch schwerere Hauterscheinungen zu zeigen [Traupe, 1989].

Assoziierte Merkmale - in manchen aber nicht allen Netherton-Patienten - sind Aminoazidurie, mentale Retardierung, Wachstumsverzögerung, wiederkehrende bakterielle Infektionen, hypernaträmische Dehydration, Gedeihstörung aufgrund einer Saugschwäche, Hypereosinophilie, erhöhte IgE-Level, allergische Reaktionen (Heuschnupfen, Asthma bronchiale, atopische Dermatitis, Nahrungsmittelallergien), Juckreiz, Bronchopneumonie und Sepsis [Greene and Muller, 1985; Sprecher et al., 2001; Bitoun et al., 2002; Descargues et al., 2006].

Die Heterogenität dieses Krankheitsbildes führte in der Vergangenheit oft dazu, dass erythroderme Kinder mit Netherton Syndrom nicht korrekt diagnostiziert, sondern ihr Krankheitsbild als atopische Dermatitis, Leiner Erkrankung, erythroderme Psoriasis vulgaris, Erythrokeratoderma variabilis oder Akrodermatitis enteropathica angesehen wurde [Greene and Muller, 1985; Hausser and Anton-Lamprecht, 1996]. Dies ist einer der Gründe, warum die Inzidenz dieser Erkrankung mit 1:50.000 nur geschätzt werden kann.

Die defekte Hautbarriere in den NS-Patienten könnte ein leichteres Eindringen von Bakterien und Allergenen bewirken, in vielen Fällen wurden wiederkehrende bakterielle Infektionen und Sepsis beschrieben, die ihrerseits den Krankheitsphänotyp beeinflussen und in einigen Fällen auch zum Tode führen können. Bei NS-Patienten wird häufig eine Besiedlung mit *Staphylococcus aureus* und anderen Bakterien beschrieben [Gysel et al., 2001; Beljan et al., 2003]. Untersuchungen an einem bosnischen NS-Patienten mit bakterieller Superinfektion zeigte neben erhöhtem Gesamt-IgE-Leveln auch erhöhte spezifische IgE-Level gegen *S.aureus* Enterotoxin B und C, nicht aber gegen Enterotoxin A und D [Beljan et al., 2003].

Untersuchungen an einer NS-Patientin, die im Alter von 3 Jahren aufgrund von schwerer Leber- und Nierendefizienz verstorben war, zeigten die Anwesenheit von Hefen in der Lunge, im Gehirn und im Blut sowie von *Staphylococcus epidermidis* in der Lunge, in der Leber und im Gehirn und von Cytomegalovirus in der Lunge und Leber [Gysel et al., 2001]. Seit ihrer Geburt litt das Mädchen an wiederkehrenden Infektionen und Sepsis (ausgelöst durch *S. aureus*, *Klebsiella oxitoca*, *β -haemolytic streptococcus*, *Enterobacter aerogenes*). Ein anderer NS-Patient dieser Studie, der im Alter von 13 Monaten verstarb, zeigte wiederkehrende schwere Infektionen mit 8 dokumentierten Fällen von Sepsis, die durch *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. oxitoca* und *Candida* ausgelöst worden waren [Gysel et al., 2001].

1.2.1.1 Strukturelle Merkmale des Netherton Syndroms

Histologische Untersuchungen an der Haut von Netherton Patienten zeigten, dass diese eine epidermale Hyperplasie (Acanthose) mit kernhaltigen Corneozyten im Stratum corneum (Parakeratose) aufweisen, was auf eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten hinweist [Hartschuh et al., 1989; Blaschke et al., 1998; Fartasch et al., 1999; Müller et al., 2002; Beljan et al., 2003; Descargues et al., 2006]. Das Stratum corneum ist durch die im Netherton Patienten auftretende, erhöhte Desquamation gewöhnlich dünn [Blaschke et al., 1998; Müller et al., 2002], wurde aber im Gegensatz dazu auch als hyperkeratotisch beschrieben (erhöhte Dicke des SC) [Hausser et al., 1989; Fartasch et al., 1999; Descargues et al., 2006]. Die granuläre Schicht ist vermindert oder fehlt ganz [Blaschke et al., 1998; Müller et al., 2002; Sárdy et al., 2002; Beljan et al., 2003; Descargues et al., 2006].

Lamellarkörper, die normalerweise hauptsächlich für die Anhäufung und Umwandlung von epidermalen Barrierelipiden im Zwischenraum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum verantwortlich sind, sind in Netherton Patienten vermindert und schlecht strukturiert [Fartasch et al., 1999; Hachem et al., 2006]. Ihre Inhalte werden vorzeitig in den Interzellularraum sezerniert und ihre Transformation in lamellare Lipid-Doppelschichten ist gestört [Fartasch et al., 1999; Müller et al., 2002; Hachem et al., 2006]. Die Epidermis von Netherton Patienten weist eine veränderte Permeabilitätsbarriere auf, die für einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) verantwortlich sein könnte [Fartasch et al., 1999; Hachem et al., 2006]. Der erhöhte TEWL in Netherton Patienten könnte seinerseits verantwortlich für die beobachtete hypernaträmische Dehydratation sein.

1.2.2 Genetik

Genetisch resultiert das Netherton Syndrom aus Mutationen im *SPINK5*-Gen auf Chromosom 5q32 [Chavanas et al., 2000].

Bisher wurden mehr als 50 verschiedene Mutationen in dem 61 kb großen *SPINK5*-Gen beschrieben, die Spleiß-Mutationen, Leserastermutationen und Stoppmutationen umfassen [Chavanas et al., 2000; Sprecher et al., 2001; Bitoun et al., 2002; Komatsu et al., 2002; Raghunath et al., 2004; Geyer et al., 2005; Chao et al., 2005; Descargues et al., 2006; Kilic et al., 2006; Hachem et al., 2006].

Einige Mutationen scheinen nur in bestimmten Völkergruppen aufzutreten, was auf einen Gründereffekt schließen lässt. Die Mutation 153delT, die in Domäne 1 liegt und in Familien türkischen Ursprungs häufiger vorkommt, führte im homozygoten Vorliegen in mehreren Fällen zu einem frühen Tod des betroffenen Kindes [Bitoun et al., 2002; Bitoun et al., 2002; Müller et al., 2002; Descargues et al., 2006].

Durch die Entdeckung der genetischen Ursache wurden auch eine Pränataldiagnose möglich [Sprecher et al., 2001; Bitoun et al., 2002; Müller et al., 2002]. Es wurde ein SNP (*single nucleotide polymorphism*) - im *SPINK5*-Gen gefunden, durch das an Position 420 die Aminosäure Glutamat durch Lysin ausgetauscht wird (E420K), die eine Assoziation mit atopischer Dermatitis und Atopie zeigt [Walley et al., 2001].

1.2.3 LEKTI

1.2.3.1 Vorkommen von LEKTI

Das vom *SPINK5*-Gen codierte Protein erhielt den Namen LEKTI (*lympho-epithelial-kazal-type related inhibitor*) durch seine Expression im lymphoepithelialen Gewebe und durch seine Struktur. Es handelt sich hier um einen Serinprotease-Inhibitor, von dem in den ersten Jahren nur die häufigste Isoform (siehe Abbildung 2) aus 15 Domänen (145 kDa) beschrieben wurde [Mägert et al., 1999; Mägert et al., 2002; Mägert et al., 2002]. Neben dieser Form existieren zwei weitere Isoformen des Proteins: eine 13 Domänen umfassende Isoform (125 kDa), die durch Verwendung eines alternativen Poly-adenylierungssignals entsteht und eine größere Isoform (148 kDa), die durch die Insertion von 30 Aminosäureresten zwischen Domäne 13 und 14 entsteht [Tartaglia-Polcini et al., 2006].

In der Haut von gesunden Menschen wird LEKTI im obersten Stratum spinosum und im Stratum granulosum, in Haarfollikeln und Talgdrüsen exprimiert [Bitoun et al., 2003]. In der Haut von Netherton Syndrom Patienten kann LEKTI, je nach Schweregrad der Erkrankung gar nicht [Bitoun et al., 2003; Raghunath et al., 2004; Hachem et al., 2006; Descargues et al., 2006] bzw. beim milden Phänotyp vermindert [Hachem et al., 2006; Descargues et al., 2006] nachgewiesen werden. Außer in der Haut wird LEKTI im Thymus, vaginalem Epithel [Mägert et al., 1999; Bitoun et al., 2003], Bartholin'scher Drüse, parathyroider Drüse, Mundschleimhaut, Mandeln [Mägert et al., 1999] sowie im Ösophagus, Gingiva, und Uterine ectocervix exprimiert [Bitoun et al., 2003].

LEKTI wird in gesunden Keratinozyten im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat in einzelne Domänen prozessiert [Mägert et al., 2002; Mägert et al., 2002; Bitoun et al., 2003], in Lamellarkörpern gespeichert und in den extrazellulären Raum des superfiziellen Stratum granulosum sezerniert [Ishida-Yamamoto et al., 2004].

Signalpeptid:	<u>MKIATVSVLLPLALCLIQDAAS</u>	22
Domäne 1:	KNEDQEMCHEFQAFMKNGLFCPQDKKFFQSLDGMIFINKCATCKMILEKAQSQR	79
Domäne 2:	ARHLARAPKATAPTELNCDDFKKGERDGFICPDYIEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVSEGECKSSN	155
Domäne 3:	PEQDVCSAFRPFVRDGRGLCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRN	219
Domäne 4:	AEKDFCKEYEQVRNGRLFCITRESDPVRGPDGRMHGNKCALCAEIFKRRFSEENSKTDQNLGKAEKTKVQR	291
Domäne 5:	EIVKLCSEQYQNAKNGILFCTRENDPIRGPDKGMHGNLCSMCQAYFQAENEKKAARARNKR	355
Domäne 6:	ESGKATSYAELCNEYRKLVRNGKLACTRENDPIQGPDKGVHGNTCSMCEVFFQAEEEEKKEGESRNKR	425
Domäne 7:	QSKSTASFEELCSEYRKSRLNGRLFCITRENDPIQGPDKGMHGNNTCSMCEAFFQQEERARAKKR	489
Domäne 8:	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEEEKKNDEEKGVAEKVKR	560
Domäne 9:	EAVQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQAEEKERAEPRAKVKR	625
Domäne10:	EAEKETCDEFRRLLQNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRN	689
Domäne11:	AAGHGSSGGGGNTQDECAEYQEQMKNGRSLCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLERAERKNEYSRSDSN	763
Domäne12:	GTGSESGKDTCDEFRSQMKNGLICTRESDPVRGPDGKTHGNKCTMCKEKLERAEEKKEDEDRSN	831
Domäne13:	TGERSNTGERSNDKEDLCREFRSMQRNGKLICTRENPNVRGPGYKMHINKCAMCQSIFDREANERKKKDEEKSSSKPSN	910
Domäne14:	NAKDECSSEFRNYIRNNELICPRENDPVHGADGKGYTNKCYMCRVFLTEALERAKLQEKPSHVRASQ	977
Domäne15:	EEDSPDSFSSLDSEMCKDYRVLPRIQYL-CPKDLKPKVCGDDGQTYNNPCLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPSPDS	1064

Abbildung 2: Aminosäuresequenz der häufigsten Isoform von humanem LEKTI (NM_006846).

Ein typisches sekretorisches Signalpeptid (grün) sowie dibasische KR-Motive, die in den gereinigten Peptiden fehlen sind unterstrichen. Cysteinreste sind rot. Die Domänen 1, 5 und 6 wurden aus dem Blutfiltrat gereinigt und sind hier blau dargestellt. Domäne 2 und 15 entsprechen exakt dem Muster von Kazal-type Inhibitoren mit 6 Cysteinen (abgewandelt aus [Mägert et al., 2002]).

1.2.3.2 Funktionelle Eigenschaften von LEKTI

Erste biochemische Untersuchungen mit den aus dem Hämofiltrat isolierten Domänen 1 und 6 von LEKTI ergaben eine Trypsin-inhibitorische Aktivität von Domäne 6 [Mägert et al., 1999], nicht aber von Domäne 1. Auch die ebenfalls aus dem Hämofiltrat isolierte Domäne 5 sowie eine rekombinante Domäne 15 sollen Trypsin-inhibitorische Aktivität haben [Mägert et al., 2002]. Zwischen den von Mägert vorhergesagten Domänen befinden sich mehrere dibasische Spaltstellen (KR), die vermuten lassen, dass das LEKTI-Vorläuferprotein durch post-translationale Entfernung dieser Motive in funktionelle Domänen gespalten wird und so viele Inhibitoren aus einem Molekül entstehen könnten [Mägert et al., 2002]. Tabelle 1 fasst die Ergebnisse zusammen, die aus Untersuchungen mit rekombinant über ein Baculovirus/Insektenzell-Expressionssystem hergestelltem LEKTI-Protein stammen. Rekombinantes LEKTI-Protein aus allen 15 Domänen (rD1-D15) inhibierte die Serinproteasen Plasmin, Trypsin, Subtilisin A, Cathepsin G und Elastase über einen nicht-kompetitiven Mechanismus, während die Serinprotease Chymotrypsin, sowie die Cysteinproteasen Papain, Cathepsin K, L und S nicht inhibiert wurden. LEKTI könnte also ein Inhibitor vieler Serinproteasen sein [Mitsudo et al., 2003]. Das

rekombinante LEKTI-Protein aus den Domänen 7 und 8, sowie Teilen der Domänen 6 und 9 (rLEKTI 6-9') konnte von denselben untersuchten Proteasen nur Trypsin und Subtilisin A hemmen. Überdies konnte die rekombinant hergestellte LEKTI-Domäne 6 (rLEKTI 6) zwar Trypsin nicht aber Subtilisin A hemmen.

Tabelle 1: Inhibitoraktivität von rekombinatem LEKTI

Domäne	getestete Proteasen	Inhibierte Protease	Ref.
rD1-D15	Papain, Plasmin, Cathepsin K,L,S,G, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Subtilisin A	Plasmin > Subtilisin A > Cathepsin G > Elastase > Trypsin	[Mitsudo et al., 2003]
rD6-D9 (D9 nur partiell)	Papain, Plasmin, Cathepsin K,L,S,G, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Subtilisin A	Subtilisin > Trypsin >>>> Elastase > Cathepsin G > Plasmin	[Jayakumar et al., 2005]
rD6	Chymotrypsin, Elastase, Plasmin, Chymase, Thrombin, Tissue Plasminogen Aktivator (TPA), Tryptase, Urokinase, Trypsin, Gewebekallikrein	Trypsin (IC ₅₀ = 100 nM)	[Kreutzmann et al., 2004]
D6 (aus Hämofiltrat)	Thrombin, Faktor Xa, TPA, Urokinase, Plasmin, Gewebe- und Plasmakallikrein, Chymotrypsin, Trypsin, Tryptase, Elastase	Trypsin (IC ₅₀ = 150 nM)	[Mägert et al., 2002]

Diese Ergebnisse deuten auf eine natürlich vorkommende Zielprotease von LEKTI oder seinen Domänen hin [Jayakumar et al., 2005]. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass Netherton-Patienten eine erhöhte hydrolytische Trypsin-ähnliche Aktivität in ihrem Stratum corneum zeigen, die mit erhöhter Abschilferung von Corneozyten assoziiert ist [Komatsu et al., 2002]. Komatsu untersuchte dabei ein Geschwisterpaar mit einem schweren Phänotyp, ausgelöst durch 2 Stoppmutationen in Domäne 2 und Domäne 8 von LEKTI (Mutation Y126X und E541X) sowie einen milden Phänotyp, mit einer homozygoten Stoppmutation in Domäne 12 (Mutation R790X). Der milde Phänotyp zeigt eine 2 x höhere Trypsin-ähnliche Aktivität als die Kontrolle. Beim schweren Phänotyp lag diese in beiden Fällen 5 x höher als die Kontrolle [Komatsu et al., 2002]. Studien mit demselben Trypsin-Substrat (Boc-Phe-Ser-Arg-AMC) zeigten eine verminderte Trypsin-ähnliche Aktivität in Stratum

corneum-Homogenaten von Patienten mit Ichthyosis vulgaris [Suzuki et al., 1996], einer Krankheit, in der eine verminderte Desquamation vorliegt.

Wer die natürliche Zielprotease von LEKTI in der Epidermis sein könnte, ist noch nicht vollständig geklärt. Es könnte sich hier aber um die Protease SCTE und/oder SCCE handeln [Caubet et al., 2004]. Die Proteolyse in gesunder Epidermis ist ein regulierter und notwendiger Prozess, in dem mehrere Proteasen und Protease-Inhibitoren eine Rolle spielen [Caubet et al., 2004]. Bei Corneodesmosin (CDSN) handelt es sich um einen Marker für die terminale Differenzierung von Keratinozyten. Die Bildung erfolgt laut Simon bereits im oberen Stratum spinosum, also dem Bereich, in dem Involukrin, LEKTI und die beiden Proteasen SCTE und SCCE erstmalig auftreten [Simon et al., 2001]. CDSN wird in Lamellarkörpern zur Zellaußenseite transportiert und lagert sich bei der Bildung von Corneodesmosomen an die Zell-Adhäsionsproteine Desmoglein-1 und Desmocollin-1 an. *In vitro* kann die Proteolyse von CDSN sowohl durch die Zugabe von rekombinantem SCTE (Stratum corneum trypsin-like enzyme, humanes Kallikrein 5, KLK5) als auch durch rekombinantes SCCE (Stratum corneum chymotrypsin-like enzyme, humanes Kallikrein 7, KLK7) zu einem Extrakt humaner Proteine der Epidermis induziert werden [Simon et al., 2001]. Aktives SCTE induzierte direkt oder auf indirektem Wege die Proteolyse von CDSN, Dsc1 und Dsg1 [Caubet et al., 2004].

Bitoun vermutete 2003, dass LEKTI aufgrund seiner Konzentration auf der apikalen Seite von granulären Zellen mit Lamellarkörpern assoziiert sein könnte [Bitoun et al., 2003]. Über „Laserscanning“ Mikroskopie und Immun-Elektronenmikroskopie wurde 2005 bestätigt, dass sich LEKTI und auch SCTE (KLK5) innerhalb von Lamellarkörpern befinden [Ishida-Yamamoto et al., 2005]. Das Vorhandensein der Protease SCCE (KLK7) in Lamellarkörpern war bereits aus früheren Studien bekannt. SCCE wird als inaktives Proenzym (pro-SCCE) in hohen suprabasalen epidermalen Keratinozyten gebildet und in lipid-reichen Lamellarkörpern gespeichert [Sondell et al., 1995; Ishida-Yamamoto et al., 2004]. Außerdem scheint pro-SCCE durch SCTE aktiviert zu werden [Caubet et al., 2004]. Eine Colokalisation von LEKTI mit SCTE und SCCE innerhalb des Lamellarkörper-Systems wurde von den Autoren nicht gefunden. Vielmehr wurde LEKTI sowohl intra- als auch extrazellulär in tieferen epidermalen Schichten detektiert als SCCE, was die Autoren zu der Vermutung führte, dass LEKTI früher als seine Zielproteasen exprimiert und sezerniert wird.

Dagegen wurde eine Colokalisation der Moleküle LEKTI, SCTE und SCCE im Zwischenraum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum gefunden [Ishida-Yamamoto et al., 2005]. In der ersten Stratum corneum Schicht wurde LEKTI aber nicht mehr detektiert, SCCE und SCTE konnten dort und auch noch in den superfizialen Schichten detektiert werden. In NS-Haut scheint die fehlende Inhibition beider oder einer der beiden Proteasen durch LEKTI zu der ständigen Abschilferung der Corneozyten zu führen. Eine weitere Ziel-Proteinase stellt die Membran-Typ Serinproteinase 1 dar [Takeuchi et al., 2000]. Dies ist ein Typ II Transmembranprotein mit extrazellulärer Proteasedomäne, die über die Aktivierung des auf der Keratinozytenoberfläche lokalisierten Proteinase-aktivierten Rezeptors PAR-2 eine Inhibierung der Keratinisierung vermittelt [Derian et al., 1997]. Die PAR-Familie ist an Abwehr- und Entzündungsprozessen beteiligt und kann mittels proteolytischer Spaltung durch Trypsin, Thrombin und Tryptase aktiviert werden [Vitzithium et al., 2004]. Durch die Aktivierung des PAR-2 Rezeptors werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, an denen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT-3 und NFAT beteiligt sind. In der Promotorregion des *SPINK5*-Gens befinden sich Bindungsmotive für diese drei Transkriptionsfaktoren, so dass bei entzündlichen Prozessen in gesunder Haut vermehrt LEKTI zur Verfügung gestellt werden kann [Drögemüller, 2004].

1.2.3.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Bei Netherton Syndrom Patienten scheinen immer noch verkürzte LEKTI-Proteine mit einer geringeren Anzahl an inhibitorischen Domänen gebildet zu werden [Sprecher et al., 2001; Bitoun et al., 2002; Komatsu et al., 2002], während ihnen immer die Domänen fehlen, die abwärts der Stoppmutation liegen. Da verschiedene Mutationen verschiedene verkürzte LEKTI-Varianten bilden, sollte jeder NS-Patient ein anderes verkürztes Rest-LEKTI-Protein besitzen. Das Erstellen von eindeutigen Genotyp-Phänotyp-Relationen ist aber bisher nicht gelungen. Dieselben Mutationen können verschiedene Schweregrade bewirken, z.B. die Mutation 1888-1G-A, die in Domäne 10 liegt, wurde in einem Fall als milder NS-Phänotyp und in einem anderen als schwerer Typ klassifiziert. Mutationen im vorderen Teil des LEKTI-Proteins resultieren nicht zwingend in einem schwereren Phänotyp als welche im hinteren Anteil. Selbst eineiige Zwillinge mit identischen Mutationen im LEKTI-Protein zeigen unterschiedliche klinische Ausprägungen (CIE versus ILC), sodass zusätzliche

genetische und/oder epigenetische Faktoren existieren könnten, die den Phänotyp determinieren [Traupe, 1989].

1.2.4 Derzeitige Behandlung des Netherton Syndroms

Das Netherton Syndrom kann derzeit nur symptomatisch behandelt werden, eine ursächliche Behandlung ist bisher leider nicht möglich. Von behandelnden Ärzten wird eine symptomatische Therapie mit antientzündlichen Salben verschrieben, welche entweder Glukokortikosteroide oder Calcineurin-Inhibitoren enthalten. Glukokortikosteroide sind Steroidhormone (z.B. Cortisol) und dienen der Unterdrückung von Immunantworten und Entzündungsreaktionen. [Reuter, 2004]. Der Hautbefund kann in einigen Fällen durch eine Lokalthherapie mit Tacrolimus in Form von Protopic® verbessert werden. Tacrolimus bewirkt eine Blockierung der T-Zell-Aktivierung, indem es die Phosphatase Calcineurin und damit auch die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-AT in den Zellkern hemmt. Dadurch hat es inhibierende Wirkung auf T-Zell-vermittelte Hauterkrankungen und auf die Entzündungsreaktion. Zudem vermindert Tacrolimus trotz seiner immunsupprimierenden Wirkung die Kolonisationsdichte der Haut mit *S.aureus* [Beljan et al., 2003; Suga et al., 2000]. Allerdings besteht, vor allem beim Phänotyp CIE, die Gefahr einer zu starken Resorption der Salbe durch die Haut und damit erhöhten Serumspiegeln, was systemische Nebenwirkungen auslösen kann [Beljan et al., 2003], sodass auch diese Therapie vorsichtig angewandt werden sollte.

Systemisch können Retinoide versucht werden jedoch mit unterschiedlichem Resultat [Hartschuh et al., 1989; Haußer et al., 1996; Traupe, 1989]. Retinoide sind synthetische oder natürliche Vitamin A-Derivate, die zur Therapie verschiedener Dermatosen verwendet werden. Durch Retinoide soll die Differenzierungsstörung in der Haut reguliert werden [Beljan et al., 2003]. Hartschuh beschrieb eine erfolgreiche Langzeit-Therapie mit dem aromatischen Retinoid Acitrenin bei einer Dosis von 5 mg/Tag, durch die es zu einer deutlichen Besserung des Haut- und Haarstatus einer NS-Patientin mit ILC kam. Eine vorher getestete höhere Dosis (10 bzw. 35 mg/Tag) bewirkte dagegen eine Verschlimmerung des Hautzustandes, was die Notwendigkeit einer individuell dem Krankheitsverlauf angepassten Retinoidtherapie beim NS zeigt [Hartschuh et al., 1989].

Der starke Juckreiz sollte mit klassischen Antihistaminika behandelt werden, das sind Arzneimittel, die die Wirkung von Histamin durch Blockade der Histamin1-Rezeptoren abschwächen oder aufheben und allgemein bei Hautallergien, Insektenstichen, Juckreiz und allergischer Rhinitis angewendet werden [Reuter, 2004].

Zudem werden von behandelnden Ärzten Hautpflegeprodukte, antiseptische Bäder und Expositions-Prophylaxe gegenüber Hausstaub (Bettwäsche) und gegenüber Nahrungsmittel-Allergenen (Meidung von Fisch, Erdnüssen und Zitrusfrüchten) empfohlen.

Besser als eine symptomatische Behandlung, die ständig erfolgen und angepasst werden muss, wäre die Beseitigung der Ursache. Da es sich beim NS um eine monogene (nur ein Gen ist betroffen) rezessive Erkrankung handelt, bei der heterozygote Träger gesund sind, wäre es hier sinnvoll zu versuchen, den Gendefekt auf dem Wege einer Gentherapie zu beheben. Der Gentransfer einer intakten *Spink5*-cDNA in die Hautstammzellen von NS-Patienten könnte zu einer Wiederherstellung der Regulation der Epidermis-Proteasen führen, wodurch die Abschilferung wie in gesunden Zellen reguliert ablaufen würde. Dadurch könnte die Permeabilitätsbarriere wieder entstehen und damit bakterielle Infektionen sowie die Allergen-Exposition vermindert werden. Auch wenn noch unklar ist, ob dieser Ansatz auch andere systemischen Wirkungen des LEKTI-Verlustes beheben kann (z.B. Nahrungsmittelallergien; Wirkung auf das Immunsystem), wäre den Patienten doch sehr geholfen.

1.3 Gentherapie

1.3.1 Überblick

Unter einer somatischen Gentherapie versteht man per Definition das Einbringen eines funktionsfähigen Gens in Körperzellen mit therapeutischer Zielsetzung [Morgan and Anderson, 1993; Leiden, 1995; Dranoff and Mulligan, 1995]. Im Gegensatz zur Arzneimitteltherapie, bei der ein von außen zugeführter Wirkstoff zur Linderung von Beschwerden eingesetzt wird, sie aber nicht beheben kann, wird bei der

therapeutischen Gentherapie eines oder mehrere bestimmte Gene direkt in die Zielzelle eingebracht, um dieser die Eigenproduktion der fehlenden oder defekten Proteine wieder zu ermöglichen (Substitutionstherapie). Durch die Gentherapie stehen für zahlreiche Krankheiten, vor allem bei genetisch vererbten Krankheiten, neue Therapiekonzepte zur Verfügung. Diese Krankheiten konnten bisher nur symptomatisch behandelt werden. Dadurch sind theoretisch kausale Therapien möglich, die den Betroffenen eine deutliche Verbesserung ihrer Lebensqualität und -erwartung bieten können. Eine Gentherapie von rezessiv vererbten Krankheiten ist theoretisch Erfolg versprechend, da heterozygote Träger nicht an der Krankheit leiden. Somit sollte hier das Einbringen eines intakten Allels ausreichen, um den intakten Phänotyp wiederherzustellen. Bei der somatischen Gentherapie soll das Gen nur in bestimmte Körperzellen eingeschleust werden, bei der Keimbahntherapie gelangt das Gen direkt in die Keimzellen. Da auch ungewollte Veränderungen in den Keimzellen an die Nachkommen weiter vererbt werden, ist die Keimbahntherapie derzeit verboten.

Auch wenn bei einer somatischen Gentherapie nicht gewährleistet werden kann, dass jede Körperzelle therapiert wird, könnte sie den betroffenen Patienten dennoch eine deutliche Verbesserung ihrer Lebensqualität und – erwartung liefern.

Dass das Zielorgan Haut ein attraktives Gewebe für die Gentherapie ist, da sowohl dermatologische als auch systemische Erkrankungen behandelt werden können, wurde bereits mehrfach diskutiert [Greenhalgh et al., 1994; Fenjves, 1994; Braun-Falco and Hallek, 1998].

Als günstig für einen Langzeitgentransfer erscheinen virale Vektoren, insbesondere adeno-assoziierten-Virusvektoren (AAV), die gegenüber anderen viralen und nicht viralen Methoden Vorteile bieten (siehe 1.4).

1.3.2 Strategien des Gentransfers

Um therapeutische Gene bei der somatischen Therapie in ausreichender Menge in die Zielzellen zu transportieren werden unterschiedliche Gentransferstrategien verfolgt. Der Gentransfer kann *ex vivo* oder *in vivo* erfolgen. Bei der *ex vivo* Gentherapie werden dem Körper eigene defekte Zellen entnommen, diese *in vitro* (in

der Zellkultur) genetisch verändert und dann durch Transplantation oder Infusion dem Patienten die korrigierten Zellen wieder zugeführt. Man hat dieses Verfahren bei einzelnen Immunerkrankungen und der Hämophilie mit Erfolg durchgeführt. Bei der *in vivo* Gentherapie werden in den Organismus dagegen direkt rekombinant veränderte Vektoren eingebracht.

Um ein therapeutisches Gen in eine Zelle zu transportieren gibt es verschiedene Methoden: Bei der chemischen Transfektion werden die therapeutischen Gene und eine elektrisch geladene Verbindung (z.B. Calciumphosphat) zu den Zellen gegeben. Die elektrisch geladene Verbindung stört die Struktur der Zellmembran, wodurch die neue DNA ins Zellinnere gelangen kann. Als physikalische Transfektionsmethoden gelten die Mikroinjektion, die Elektroporation (bei der die Zellmembran durch einen Stromstoß vorübergehend permeabilisiert wird) und die Genpistole (bei der kleine Goldkügelchen in die Zelle geschossen werden, auf deren Oberfläche die therapeutischen Gene haften).

Bei der als Transduktion bezeichneten Methode werden Viren verwendet, die das therapeutische Gen in eine Zelle bringen.

1.3.3 Die Entwicklung der Gentherapie

Die erste Gentherapie am Menschen wurde im Jahre 1990 an einem 4-jährigen Mädchen durchgeführt. Die Patientin Ashanti DeSilva litt unter einer äußerst seltenen rezessiven Erbkrankheit, einem Mangel an Adenosin-Desaminase (ADA). ADA dient der Purinrückgewinnung beim Abbau von Nucleinsäuren. Ein ererbter Mangel an diesem Enzym hat besonders gravierende Konsequenzen für die T-Lymphozyten, wodurch die Patienten an einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) erkranken. Das Immunsystem von Patienten mit diesem Defekt ist in seiner Funktion erheblich bis vollständig beeinträchtigt, wodurch z.B. bereits eine Erkältungskrankheit bei Kindern den Tod bedeuten kann. Die Patienten haben wegen ihrer Anfälligkeit für Infektionskrankheiten eine sehr kurze Lebenserwartung mit einer stark eingeschränkten Lebensqualität. Der Patientin wurden per Infusion autologe T-Lymphozyten zugeführt, in welche durch *ex vivo* Gentransfer mittels retroviraler Vektoren ein intaktes ADA-Gen eingebracht worden war [Blaese, 1993]. Durch diesen *ex vivo* Gentransfer konnte die ADA-Genexpression in den T-Zellen

wiederhergestellt werden. Die herkömmliche Enzyersatztherapie, bei der wöchentlich intramuskulär Polyethylenglykol-(PEG)-konjugiertes ADA gespritzt wird, konnte dadurch deutlich reduziert werden. Auch wenn eine effektive Standardtherapie erst nach einer Weiterentwicklung der Technik zu erwarten sein wird, war mit dieser Gentherapie ein erster Behandlungserfolg verbunden.

Neben diesem ersten Erfolg der Gentherapie, waren aber auch Rückschläge zu beobachten. Ein durch die Presse bekannter Fall ist der des 18-jährigen Jesse Gelsingers, der an einer angeborenen Leberfunktionsstörung litt. Aufgrund eines angeborenen Ornithin-Transcarbamylase (OTC) -Gendefekts konnte sein Körper das bei der Verdauung von Proteinen anfallende Ammoniak nicht abbauen. Unbehandelt führt diese Krankheit zu einer langsamen Vergiftung des Körpers und zum Tod. 1999 erhielt Jesse im Rahmen einer Studie genetisch veränderte Adenoviren direkt in die Leber, um dort gesunde Kopien des OTC-Gens zu generieren. Aber anstatt sich positiv auszuwirken, begann sein Immunsystem sich gegen die Viren zu wehren. Jesse bekam hohes Fieber, Schmerzen, sein Blut verklumpte und seine Organe versagten. Vier Tage nach der Infusion starb der Patient, was zu großen Diskussionen und verstärkter Kontrolle durch nationale und internationale Kontrollgremien führte [Stephenson, 2001].

Im Jahre 2002 ereigneten sich zwei weitere tragische Zwischenfälle während einer Phase-II-Studie zur Therapie von X-SCID (X-chromosomal gebundenes schweres kombiniertes Immundefizienz-Syndrom) in Frankreich, bei der 3 von 11 Kindern im Laufe der Therapie mit retroviralen Vektoren eine schwere Leukämie entwickelten [Check, 2003; Fox, 2003; Kaiser, 2003; Kohn et al., 2003; Marshall, 2002; Marshall, 2003].

Neben den oben genannten Rückschlägen konnte die Gentherapie doch auch substanzielle Erfolge aufweisen, wodurch die Entwicklung an diesem Therapiekonzept nach wie vor anhält. Es konnten gute Fortschritte durch die somatische Gentherapie vor allem bei rezessiv bedingten Erbkrankheiten, wie ADA-Mangel, angeborener Hypercholesterinämie, Cystischer Fibrose und Hämophilie erzielt werden [High, 2004; Onodera et al., 1998; Driskell and Engelhardt, 2003; Grossman et al., 1994].

In den vergangenen 20 Jahren wurden etwa 1537 klinische Studien zur Gentherapie am Menschen genehmigt (Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website, Stand März 2009). Davon wurde der Großteil (63,4%) in den USA, etwa 12,0% in Großbritannien, 4,9% in Deutschland und 3,0% in der Schweiz initiiert, während sich die restlichen 16,7% auf Australien, Frankreich, Belgien, Kanada, Japan, die Niederlande und andere verteilen. Als Gentransfervehikel werden in mehr als der Hälfte der Fälle Viren verwendet: Die verwendeten Vektoren basieren zu 25% auf Adenoviren, 22,6% auf Retroviren, 4,9% auf Vaccinia-Viren, 4,5% auf Poxviren, 4% auf Adeno-assoziierten Viren und 3,2% auf Herpes simplex Viren. In den restlichen Ansätzen wird Nackte/Plasmid-DNA (18,1%), Lipofektion (7,6%), RNA-Transfer (1,4%) und andere Vehikel (5,7%) angewendet (Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website, Stand März 2009, siehe Abbildung 3).

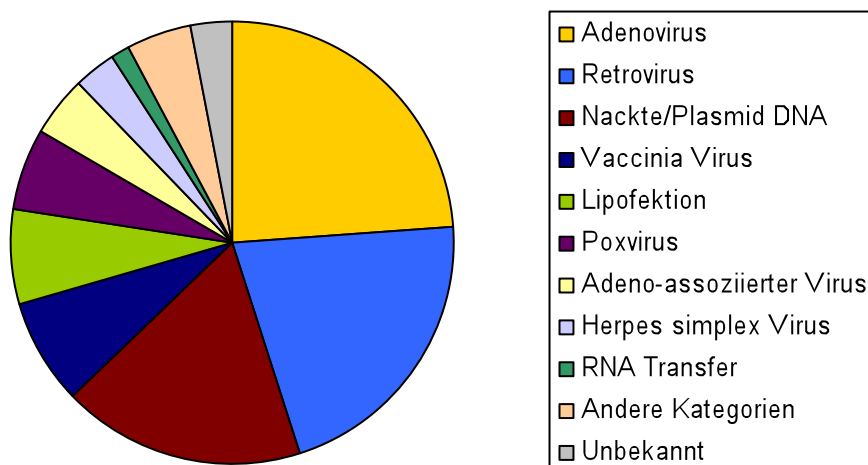


Abbildung 3: Verteilung verwendeter Vektoren in der Gentherapie

(Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website, Stand März 2009)

Die Gentherapie-Ansätze betreffen Krebserkrankungen (64,6%), Cardiovasculäre Erkrankungen (8,9%), Monogene Erkrankungen (8,1%), Infektionskrankheiten (7,9%), Neurologische Erkrankungen (1,8%), Augenkrankheiten (1,1%) und andere Krankheiten.

1.3.4 Hautgentherapie

Durch die Anwesenheit von Keratinozytenstammzellen in der Epidermis (Basalschicht) und den Haarfollikeln erfüllt die Haut eines der wichtigsten Kriterien für eine Langzeitgentherapie [Jensen, 2004]. Die Haut kann bei einem *in vivo* Gentransfer gut erreicht werden und für einen *ex vivo* Gentransfer ist die nötige Gewebegewinnung leicht möglich. Bei der *in vivo* Gentherapie findet die Therapie direkt an der Haut des Patienten statt. Vektoren, die das zu exprimierende Gen tragen, können direkt in die Epidermis injiziert werden. Bei der *ex vivo* Gentherapie werden Keratinozyten von Patienten entnommen und auf Zellkulturschalen expandiert. Das gewünschte Gen kann durch unterschiedliche Gentransfermethoden in die Zellen eingebracht werden. Hier ist von Vorteil, dass die Kultivierung primärer Keratinozyten auf Zellkulturschalen seit 1975 bekannt ist [Rheinwald und Green, 1975].

Die Haut bietet im Vergleich zu anderen Geweben ein hohes Maß an Sicherheit, weil veränderte Bereiche leicht zu kontrollieren sind und im Falle auftretender Nebenwirkungen wieder entfernt werden können. Gerade im Hinblick auf die oben beschriebenen tödlichen Zwischenfälle nach systemischer adenoviraler-Vektorgabe und der Entstehung zweier Leukämie-Erkrankungen nach systemischer retroviraler Vektorapplikation ist dieser Sicherheitsaspekt nicht zu vernachlässigen [Stephenson et al., 2001; Kohn et al., 2003].

Klinisch sind neben den Zellkulturmethoden auch Transplantationsmethoden gut etabliert und auch zelleigene Promotoren können verwendet werden. Aus transfizierten Keratinozyten kann ein Epidermisäquivalent gezüchtet werden, welches dem Patienten transplantiert werden kann. Diese Methode ist mittlerweile so verfeinert, dass es unter optimalen Bedingungen möglich ist, aus 1 cm² Haut in 3-4 Wochen ein Zellkulturepithel von 1 m² zu erhalten [Navsaria et al., 1995; Holzmann et al., 1994]. Nachdem das Häutchen auf der Transplantationsstelle des Patienten angewachsen ist, können rekombinante Keratinozyten gewünschte Proteine sezernieren und in die Blutbahn abgeben [Khavari et al., 2002; Cao et al., 2000]. Somit könnte die Haut auch zur Therapie von systemischen Krankheiten eingesetzt werden [Agrawal et al., 2004].

Viele Genodermatosen werden durch das Fehlen einzelner Proteine oder Enzyme verursacht und könnten, zumindest im Falle autosomal-rezessiv vererbter Defekte, durch das Einbringen einer funktionellen cDNA in Keratinozyten gentherapeutisch korrigiert werden [Uitto und Pulkkinen, 2000; Khavari 1998; Khavari, 2000; Irvine und McLean, 2003]. Für eine Korrektur autosomal-dominanter Defekte müsste dagegen das mutierte Allel inaktiviert oder korrigiert werden. Dies wurde bisher durch die Entwicklung von DNA-RNA-Oligonukleotid-Chimären, Antisense-Oligonukleotiden und RNA-Interferenz (RNAi) erreicht [Kren et al., 1998; Alexeev et al., 2000; Waight et al., 2000; Xia et al., 2004].

1.4. Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Rekombinante Vektoren, die auf Adeno-assoziierten Viren (AAV) basieren, werden seit 1995 in klinischen Untersuchungen eingesetzt. rAAV Vektoren besitzen gegenüber Vektoren, die auf anderen Viren basieren, viele bevorzugte Eigenschaften, inklusive eines exzellenten Sicherheitsprofils, fehlender Pathogenität, eines breiten Wirtsspektrums, das sowohl ruhende als auch proliferierende Zelltypen umfasst, der Fähigkeit Gene *in vitro* und *in vivo* zu liefern, der Kompetenz auch in Abwesenheit einer Integration Langzeit-Transgen-Expression zu errichten, und der relativ geringen Immunogenität. Im Gegensatz zu Retroviren und Adenoviren können AAV sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen mit hoher Effizienz infizieren. Außerdem zeichnen sich AAV gegenüber anderen Gentransfervektoren vor allem dadurch aus, dass sie nicht human-pathogen sind und der überwiegende Teil der Bevölkerung bereits mit ihnen in Berührung gekommen ist. Bisher werden AAV als nicht-pathogene Viren betrachtet. Obwohl 80-90 % der Erwachsenen seropositiv für Antikörper gegen AAV sind, wurde eine Infektion bisher weder mit Symptomen noch mit Krankheiten assoziiert [Berns und Linden, 1995]. Ein anderer Vorteil von AAV-2 ist seine Fähigkeit zur spezifischen Integration in die AAVS1-Stelle auf Chromosom 19. Da der Virus keine Krankheit auslöst, scheint diese Insertionsstelle eine sichere Region im Genom zu sein. Obwohl rekombinante AAV-Vektoren die Fähigkeit zur spezifischen Integration verlieren, kann ihr Genom in Organen, deren Zellen keiner ständigen Erneuerung unterworfen sind (u.a. Leber, Gehirn, Herz, Lunge und Retina) persistieren [O'Connor und Crystal, 2006].

1.4.1 Biologie von AAV2

Das adeno-assoziierte Virus (AAV) ist ein kleines, nicht-umhülltes, einzelsträngiges DNA-Virus, das zur Familie der Parvoviridae gehört. AAV wird weiter in den Genus Dependovirus eingeteilt, weil AAV zur Replikation auf die Anwesenheit von Helferfunktionen anderer Viren, wie Adenovirus oder Herpesviren (Herpes Simplex Virus Typ I und II, Cytomegalovirus und Epstein-Barr-Virus) angewiesen ist [Muzyczka, 1992; Buller et al., 1981; McPherson et al., 1985; Braun-Falco und Rödl, 2007]. Die einzelsträngige AAV-DNA ist etwa 4,7 kb groß und besteht nur aus den beiden Genen rep und cap, die von ITR (inverted terminal repeat) Sequenzen eingerahmt werden. Das rep-Gen codiert hauptsächlich vier virale nicht-Strukturproteine (Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40) [Trempe et al., 1987; Mendelson et al., 1986]. Das cap-Gen codiert drei für den Virusmantel erforderliche Strukturproteine (VP1, VP2 and VP3). Das Virion hat eine ikosaedrische Struktur mit einem Durchmesser von 20-30 nm [Berns and Linden, 1995]. Die ITRs von AAV haben vielfältige Funktionen. Sie sind 145 Basenpaare lang und die ersten 125 bp von ihnen bilden eine Haarnadelstruktur aus. Es wird vermutet, dass die ITRs als Replikationsursprung dienen, indem sie als Primersequenz für die DNA-Synthese fungieren [Muzyczka, 1992]. Sie enthalten außerdem die für die Integration erforderliche trs (terminal resolution site) Sequenz und es wurde gezeigt, dass das ITR als Enhancer fungieren kann. Die Genexpression wird im Wildtyp AAV durch drei virale Promotoren kontrolliert (p5, p19 und p40). p5 reguliert die Transkription von Rep78/68, p19 von Rep52/40 und p40 reguliert die Transkription der Capsidproteine [Muzyczka, 1992]. Rep78/68 ist ein Transaktivator für die Transkription von allen drei AAV Promotoren. In Abwesenheit früher adenoviraler Funktionen, besonders des E1A Genproduktes, ist Rep68/78 ein negativer Regulator der AAV Genexpression. Rep78/68 haben DNA-Helicase Aktivität, Sequenz-spezifische DNA-Bindungsaktivität und Endonuclease Aktivität [Im and Muzyczka, 1990; Chiorini et al., 1994; Weitzman et al., 1994]. Die Funktion von Rep52 und Rep40 während der viralen Infektion ist nicht klar. Sie scheinen nicht für die virale DNA-Replikation nötig zu sein [Chejanovsky and Carter, 1989; Snyder et al., 1990], könnten aber benötigt werden, um einzelsträngige Nachkommen zu bilden [Chejanovsky and Carter, 1989]. Zudem könnten sie für die Repression der Expression von heterologen Promotoren aus verantwortlich sein [Labow et al., 1987; Mendelson et al., 1988].

Die Infektion mit AAV alleine führt hauptsächlich zu einer Integration des AAV Genoms als Provirus in das Wirtszellchromosom und deshalb zu einer minimalen viralen Transkription und Produktion von Nachkommen. Es wird vermutet, dass ohne Helfervirus das AAV-Partikel in die Zelle eintritt und in den Zellkern vordringt, wo die DNA entmantelt wird. Dort wird eine kleine Menge des Rep-Proteins synthetisiert (von p5 reguliert), die die weitere AAV Genexpression unterdrückt, wodurch das Wildtyp AAV an eine spezifische Stelle im Chromosom 19 (AAVS1 liegt in 19q13.3-qtter) integriert (Übersicht in [Berns und Linden, 1995]). Drei potentielle Signalsequenzen im linken Teil des AAV-Genoms sind für diese spezifische Integration verantwortlich: eine Bindestelle für Rep68/78 (RPB), die trs (terminal resolution site), die durch Rep gespalten wird, und ein Rekombinations-Enhancer, das M26 Motiv (Übersicht in [Berns and Linden, 1995]).

Im Falle des Adenovirus als Helfervirus sind fünf Genregionen für eine voll permissive AAV Infektion erforderlich: das E1A-Gen führt zur Transaktivierung von AAV p5 und p19 Promotoren [Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1982]. Das E1B-55k transformierende Protein und das E4-34k ORF6 Genprodukt vermitteln eine effiziente Akkumulation von AAV mRNAs, möglicherweise durch Stabilisierung der mRNA oder durch deren Transport im Cytoplasma. Das von E2A codierte adenovirale DNA Bindeprotein (DBP) und adenovirale VA-RNAs sind hauptsächlich verantwortlich für die effiziente Translation der AAV p40 Capsid-mRNAs. Das DBP scheint dabei für ein effizientes Spleißen der AAV mRNA nötig zu sein, und hat keinen Effekt auf die Replikation. Zusätzlich zur Erleichterung der Translation von AAV Transkripten erhöht die Gegenwart von VA- RNA deren Grundmengen (Übersicht in [Muzyczka, 1992]). Für die Herstellung von rekombinanten AAV-Vektoren (siehe 1.4.3) ohne die Verwendung von Adenoviren, werden diese benötigten Gene (VA-RNA, E2A und E4) *in trans* durch Zugabe des Helferplasmides pXX6 geliefert. Die verwendeten 293 Verpackungszellen sind bereits mit dem E1A-Gen transformiert, wodurch auch dieses Genprodukt bei der Verpackung vorliegt. [Grimm et al., 1998; Xiao et al., 1998]. Dies verhindert nicht nur die Ad Helfervirus Kontamination, sondern erhöhte auch die Titer als Ergebnis einer höheren Zellviabilität [Zolotukhin, 2005].

Die oben beschriebenen Helferfunktionen können in der Zellkultur aber auch durch Induktion von genotoxischem Stress in AAV oder rAAV infizierten Zellen umgangen werden (z.B. durch UV-, Gamma-, Röntgen-Bestrahlung, Harnstoff oder Hitzeschock

oder durch die Zugabe von chemischen Karzinogenen) [Yalkinoglu et al., 1988; Yakobson et al., 1987; Yakobson et al., 1989; Ferrari et al., 1996].

1.4.2 Infektionsweg von AAV-2

Der erste Schritt im Lebenszyklus von AAV ist seine Anheftung an die Plasmamembran der Wirtszelle (siehe Abb. 4). 1998 wurde Membran-assoziiertes Heparan Sulfat Proteoglykan (HSPG) als der primäre Rezeptor für AAV-2 Virionen erkannt [Summerford and Samulski, 1998]. Obwohl HSPG ubiquitär exprimiert wird, gibt es große Unterschiede in der Transduktionseffizienz innerhalb verschiedener Zellen und Gewebe *in vivo* und *in vitro*, die zum Teil am Fehlen eines geeigneten Co-Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen liegen. Zu den AAV-2 Co-Rezeptoren, gehören FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*, [Qing et al., 1999]) oder HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*, [Kashiwakura et al., 2005]) und der Integrin $\alpha_v\beta_5$ Rezeptor [Summerford et al., 1999]. HSPG ist verantwortlich für die AAV-2 Bindung, der Co-Rezeptor für die effiziente Bindung und Internalisierung des AAV-2 Virus. Die AAV-2 Internalisierung erfordert Dynamin, was die Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose als Hauptweg für den Eintritt von AAV-2 in die Zelle vermuten lässt [Duan et al., 1999].

Im Falle von $\alpha_v\beta_5$ Integrin als Co-Rezeptor ist die Endozytose von AAV-2 vom kleinen GTP-bindenden Protein Rac1 abhängig, während der weitere Transport des Virus zum Kern eine Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) Aktivierung erfordert [Sanlioglu et al., 2000]. Durch Verwendung von Substanzen, die mit der Endosom-Ansäuerung und dem Übergang vom frühen zum späten Endosom interferierten, wurde gezeigt, dass AAV-Partikel das späte endosomale Kompartiment erreichen und einen niedrigen pH benötigen, um diesem zu entkommen. Durch Verwendung des Proteasom-Inhibitors MG132 kann die Transduktionseffizienz mit rAAV bis zu 60 Mal erhöht werden, was deutlich macht, dass ein signifikanter Anteil von AAV-Partikeln abgebaut wird, nachdem er aus dem Endosom entkommen ist [Douar et al., 2001]. Durch Einzelmolekül-Detektionstechnik wurde gezeigt, dass nach der Entlassung aus dem Endosom, ein Mikrotubuli-abhängiger aktiver Transport von AAV über Motorproteine wie Dynein oder Kinesin zum Kern hin erfolgt. Darüber hinaus wurde eine unidirektionale Bewegung von AAV Partikeln in der nuklearen

Zone entdeckt, die wahrscheinlich ebenfalls von Motorproteinen vermittelt wird [Seisenberger et al., 2001], weil beide Bewegungen durch die Substanz Nocodazol inhibiert werden konnten.

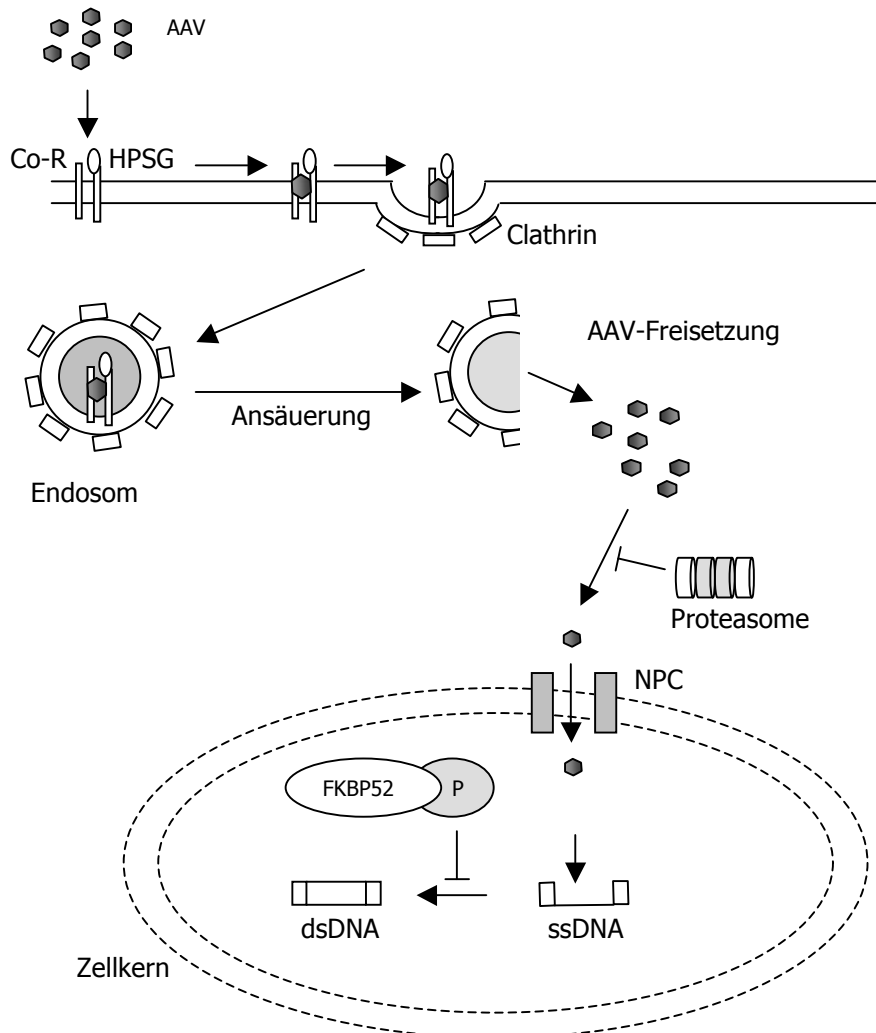


Abbildung 4: Lebenszyklus von AAV-2 (Erläuterung siehe Text).

Der letzte wichtige Schritt im AAV-2 Infektionszyklus ist (nach der Enthüllung) eine doppelsträngige DNA als Grundlage für die RNA-Transkription und Protein Translation von rep und cap zu bilden sowie eine einzelsträngige DNA für die Verpackung in eine neue Hülle, um AAV-Nachkommen zu bilden. Die AAV Zweitstrangsynthese der DNA scheint abhängig vom Phosphorylierungszustand von FKBP52 zu sein (*FK506-binding protein 52*, früherer Name *single-stranded D-*

sequence binding protein (ssD-BP). Phosphoryliertes FKBP52 ist in der Lage an die D-Sequenz (der einzige Teil des inverted terminal repeats, das nach der Haarnadelbildung einzelsträngig bleibt) im ITR von AAV zu binden und diese Bindung verhindert die Zweitstrangsynthese der DNA [Qing et al., 1998; Qing et al., 2001].

1.4.3 AAV Serotypen

Seit der ursprünglichen Entdeckung vom AAV Serotyp 2 (AAV2) im Jahre 1965, wurden 11 verschiedene Serotypen und etwa 100 so genannte AAV Varianten aus mehreren Quellen isoliert [Wu et al., 2006; Gao et al., 2005]. Als intakte Viren wurden AAV-1 bis AAV-4 und AAV-6 als Kontaminationen von Adenoviralen Stocks im Labor detektiert, und AAV-5 in humanem penilem Condylomata. Alle anderen Serotypen (AAV-7 bis-11 und Varianten) wurden durch PCR-amplifizierte virale DNA Sequenzen aus vielen Geweben gefunden. Der Unterschied zwischen Serotypen und Varianten hängt von der Charakterisierung spezifischer, nicht-kreuzreaktiver, neutralisierender Antikörper ab, die einen Serotyp definieren, während Varianten diese Information fehlt. Aufgrund des Vorhandenseins von neutralisierenden Antikörpern in der menschlichen Population wird vermutet, dass AAV-2, -3 und -5 von humanem Ursprung sind. Dagegen stammen Serotyp 4, und 7-11 möglicherweise aus nicht-humanen Primaten. Der Ursprung von AAV-1 ist noch unklar, da sein virales Genom aus menschlichem Gewebe isoliert wurde und Antikörper in Affenserum gefunden wurde [Gao et al., 2004]. AAV-6 ist ein Hybridvirus aus AAV-1 und -2, mit 99,2% Capsid Aminosäuresequenz Homologie mit AAV-1. Trotz diesen hohen Grades an Homologie, führen die sechs AS die sich von AAV-1 unterscheiden, zu einer Änderung seiner Heparin-bindenden Fähigkeit und Tropismus [Wu et al., 2006-b]. AAV-10 und -11 erfüllen die strikte Definition eines Serotyps nicht, da ihre serologischen Profile noch nicht gut charakterisiert sind, und phylogenetische Studien fanden, dass AAV-10 stark AAV-8 und AAV-11 stark AAV-4 ähnelt [Mori et al., 2004]. Zusätzlich zu humanen und Primaten, wurden AAV Genome aus mehreren anderen Spezies, u.a. Pferd, Kuh, Ziege, Huhn, Schlange und Eidechse isoliert [Wu et al., 2006].

Im Allgemeinen können AAV-Vektoren ein breites Spektrum von proliferierendem und nicht-proliferierendem Gewebe *in vitro* und *in vivo* transduzieren, aber die verschiedenen Serotypen von AAV haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Hüllproteine auch unterschiedliche Gewebetropismen gezeigt [Braun-Falco und Rödl, 2007].

Zum Beispiel kann AAV-2 für die Transduktion von Muskel, Leber, Niere und Gehirn verwendet werden, während er nicht für eine Transduktion von Megakaryozyten oder vaskulären Endothelzellen geeignet ist [Sanlioglu et al., 2001; Doring et al., 1998; Herzog, 2004; Snyder et al., 1999]. AAV-9 hat einen ähnlichen Tropismus wie AAV-2, die Transduktionseffizienz scheint hier aber höher zu sein [Gao et al., 2004; Pacak et al., 2006]. Im ZNS, zeigen AAV-1 und -5 eine höhere Transduktionseffizienz als AAV-2, und AAV-4 Transduktion ist weniger verbreitet, aber spezifischer für Astrozyten und Ependyma [Burger et al., 2004; Davidson et al., 2000]. AAV-8 scheint der Serotypvektor der Wahl für die Transduktion von Leber und Herz zu sein, obwohl sein Spektrum im weiteren Skelettmuskel und glatten Muskel, Pankreas und Gehirnzellen umfasst, letztere aufgrund seiner Fähigkeit die Blutgehirnschranke zu überbrücken [Nakai et al., 2005b; Wang et al., 2005; Gregorevic et al., 2004; Grimm et al., 2006]. Für die Transduktion des Skelettmuskels sind AAV-1,-6 und -7 besonders effektiv [Gao et al., 2004; Gregorevic et al., 2004; Gao et al., 2002; Blankinship et al., 2004; Chao et al., 2000]. Außerdem könnte AAV-6 eine alternative zu AAV-8 bei der Lebertransduktion sein [Grimm et al., 2006].

1.4.4 Integrationsverhalten von rAAV Vektoren

Während der latenten Infektion, integriert der WT AAV2 meist in eine spezifische Region auf Chromosom 19 (19q13.3-pter), die AAVS1 heißt [McCarty et al., 2004].

Diese Stelle wird nur in Menschen und höheren Primaten gefunden und enthält Teile eines Gens, das als langsames Skeletales Troponin T Gen bekannt ist. Die sequenzspezifische Integration ist von der Interaktion des Rep Proteins mit einer der ITRs und AAVS1 abhängig. Im Allgemeinen ist die Integrationsfrequenz ziemlich gering und wird auf 0,1-0,5% geschätzt [Huser et al., 2002]. Im Falle des Fehlens von Rep, integriert AAV woanders, offensichtlich zufällig. Da rAAV Vektoren so konstruiert werden, dass sie kein Rep haben, verlieren sie die Fähigkeit einer

sequenzspezifischen Integration. Da die Integration ein wichtiger Sicherheitsaspekt ist, wurden Hybridsysteme entwickelt, die Rep während des Infektionsprozesses vorübergehend exprimieren und so zwar die sequenzspezifische Integration, nicht aber die Replikation fördern. Zwar war diese Methode für die Förderung der sequenzspezifischen Integration erfolgreich, aber das Rep Protein regulierte auch viele zelluläre und virale Gene hoch, die die Apoptose der transduzierten Zellen bewirkten. Nicht-integrierende Vektorgenome verbleiben episomal, zuerst als monomere lineare rAAV DNA, die mit der Zeit in zirkuläre Formen umgewandelt wird und danach in große Concatamere. Diese episomalen Vektorformen scheinen verantwortlich für die andauernde Genexpression in nicht-proliferierendem Gewebe zu sein, die für Jahre andauern kann [Nakai et al., 2001; Schnepf et al., 2003].

Es ist erwähnenswert, dass die meiste wenn nicht die gesamte, Transgenexpression aus episomalen Vektorgenomen stammt. Im Falle einer Integration, findet diese an Stellen mit vorherrschenden Doppelstrangbrüchen statt, innerhalb aktiv transkribierter chromosomaler Regionen durch Homologe Rekombination oder NHEJ [Nakai et al., 2003]. Außerdem kann die Integration innerhalb oder in der Nähe von genregulatorischen Sequenzen auftreten [Nakai et al., 2005a]. „Hot spots“ für die Integration wurden vor allem in rRNA Gen Repeats gefunden, die nicht nachteilig für die Wirtszelle sein sollten.

1.4.5 rAAV Vektoren in der Dermatologie

Bisher wurden rAAV Vektoren für das Ziel Haut, besonders der Keratinozyten, die die Epidermis aufbauen, noch wenig genutzt. Mögliche Gründe hierfür sind, dass retrovirale Vektoren beeindruckende Effizienz in humanen Keratinozyten zeigten [Ghazizadeh und Taichman, 2000], der Fokus auf *ex vivo* Konzepten liegt, der die Notwendigkeit für klassische *in vivo* Vektoren wie rAAV minimiert, die leichte Kontrollierbarkeit von transplantierten genetisch modifizierten epidermalen Äquivalenten, die die Risikobeurteilung von Retrovirus-induzierter Insertionsmutagenese reduziert und am wichtigsten, fehlende Erfahrung. Letzteres kann dadurch erklärt werden, dass die herkömmlichen Testmethoden für AAV-Vektoren im Tiermodell für die Applikation intramuskuläre, intrakraniale oder Intravaskuläre Wege nutzten und so die Haut umgingen und der Eindruck der relativ geringen Anfälligkeit der Haut für rAAV entstand. Dennoch ist diese fehlende Erfahrung bemerkenswert,

besonders weil AAV aus stratifizierendem und differenzierendem epitheliale Gewebe verschiedener Körperstellen isoliert wurde, wie dem Cervix, Nasopharynx und Anus, was andeutet, dass der Wildtyp-AAV eine natürliche Präferenz für squamöses Gewebe aufweist [Meyers et al., 2000].

1.4.6 Rekombinante AAV-2 Vektoren

Bisher wurden mehr als 200 Patienten mit einem Alter von 12 Jahren und mehr in wenigstens 20 klinische Studien einbezogen, in denen 15 verschiedene AAV Vektoren verwendet wurden, die alle auf AAV-2 basierten [Carter, 2005; Warrington und Herzog, 2006].

Adeno-assoziierte Virusvektoren (AAV) wurden bei der Therapie der Hämophilie durch Transduktion von Leber und Muskelzellen [Manno et al., 2003], der Mucoviszidose durch Transfektion bronchialer Epithelzellen [Flotte et al., 1993], und bei Morbus Parkinson durch Vektorinjektion in das Striatum [During et al., 2001] eingesetzt. Von den in den vergangenen 19 Jahren genehmigten AAV-basierten Gentherapie-Ansätzen beschäftigen sich etwa 45% mit monogenen Erkrankungen. Dazu zählt die Cystische Fibrose (26,7%), Augenkrankheiten (23,3%), Muskuläre Dystrophien (16,7%), Haemophilie B (13,3%), AAT-Defizienz (6,7%) und Neurologische Erkrankungen (13,3%). Die restlichen 55% der Ansätze mit AAV befassen sich mit erworbenen Krankheiten, wie Prostatakrebs (40,5%), Parkinson (18,9%), HIV (8,1%), Arthritis (5,4%), Alzheimer (5,4%), Herzerkrankung (5,4%) und anderen (16,2%) (Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website, Stand März 2009, siehe Abb. 5).

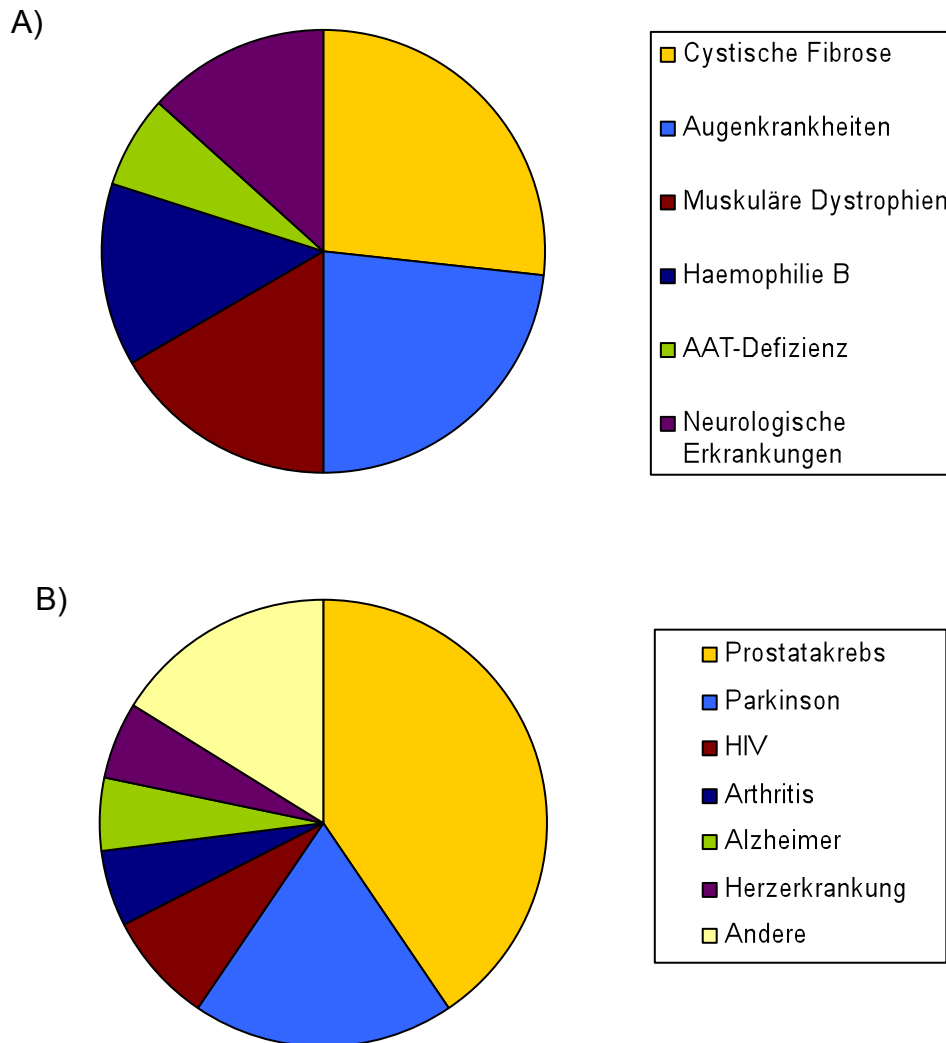


Abbildung 5: Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie. Genehmigte Ansätze für monogene Erkrankungen (A) und erworbene Erkrankungen (B) und ihre jeweilige prozentuale Verteilung. (Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website, Stand März 2009).

Gentechnisch hergestellte rAAV-2 Vektoren enthalten nur noch die ursprünglichen Gensequenzen für die ITR-Regionen von AAV-2. Anstelle des *rep* und *cap* Gens von AAV-2 wurde das therapeutische Gen (Transgen) unter Kontrolle eines CMV-Promotors und gefolgt von einer SV40-Poly-A-Sequenz eingebaut. Für die Verpackung dieser rekombinanten DNA in die virale Hülle von AAV-2 ist die Gabe des so genannten Helferplasmides pCR (enthält die Gene *rep* und *cap*) *in trans* nötig. Wie beim Wildtyp-AAV2 Virus ist zusätzlich ein Helfervirus mit adenoviralen Genen (pXX6) nötig (siehe Abb. 6). Über eine Calciumphosphat-Triple-Transfektion werden diese drei Plasmide (das mit ITRs und Transgen, pRC und Helferplasmid) nach einer Methode von Xiao in 293-Verpackungszellen eingebracht, die ihrerseits

mit dem adenoviralen Gen E1A transformiert sind [Xiao et al., 1998]. In den Verpackungszellen erfolgt der Zusammenbau des viralen Partikels: adenovirale Gene erlauben die Transkription von *rep* und *cap* über die Promotoren p5, p19 und p40. Die Transkription über den CMV-Promotor erfolgt konstitutiv. Durch Zellyse werden rekombinante virale Partikel frei, die das therapeutische Gen in einzelsträngiger Form enthalten. Diese Partikel sind aufgrund des Vorhandenseins der viralen AAV-2 Hülle in der Lage Ziel-Zellen über den oben beschriebenen Infektionsweg (siehe 1.4.2) zu infizieren, können dort aber aufgrund des Fehlens des *rep* und *cap*-Genes nicht mehr zu neuen Partikeln verpackt werden. Im Zellkern der Zielzelle wird die einzelsträngige DNA zum Doppelstrang umgewandelt und steht damit für die RNA- und Proteinsynthese des therapeutischen Proteins zur Verfügung.

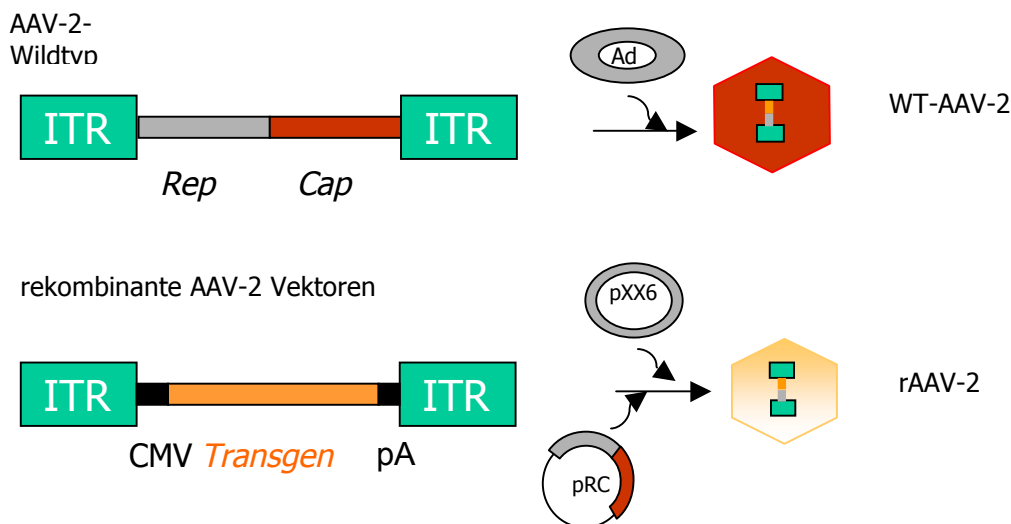


Abbildung 6: Herstellung von rekombinanten Adeno-assoziierten Vektoren

Anstelle der AAV-Gene *Rep* und *Cap* wird das Transgen eingebaut, flankiert von einem CMV-Promotor (CMV) und einer SV40-poly-Adenylierungssequenz (pA). Zur Herstellung infektiöser viraler Partikel in *E1A*-Gen transformierten 293 Verpackungszellen benötigt der AAV-2 Wildtyp Helferfunktionen, z.B. vom Adenovirus (Ad). Zur Herstellung infektiöser rAAV-2 Vektorpartikel muss sowohl ein Plasmid mit der Gensequenz für die Gene *Rep* und *Cap* (pRC) als auch ein Plasmid mit den adenoviralen Genen (pXX6) zugegeben werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu evaluieren, ob sich durch Verwendung von AAV-2 Vektoren der Gendefekt im Netherton Syndrom (NS) korrigieren lässt. Eine solche Korrektur ist nur dann möglich, wenn Keratinozyten-Stammzellen transduziert werden, weil nur diese in der Lage sind zu proliferieren und das Genmaterial auf lange Sicht weiterzugeben. Bei erfolgtem Gentransfer sollten die NS-Keratinozyten funktionsfähiges LEKTI-Protein bilden und der NS-Phänotyp sollte damit korrigierbar sein.

Zunächst sollten Nachweismethoden für LEKTI etabliert werden. Diese Etablierung und Transfektions-Vorversuche sollten in gesunden Keratinozyten erfolgen und überprüft werden. Dann sollten Unterschiede zwischen gesunden und Netherton Syndrom Keratinozyten aufgezeigt werden, die direkt oder indirekt aus den Mutationen im *SPINK5*-Gen resultierten. Als nächstes sollte untersucht werden, ob diese Unterschiede durch den Gentransfer intakter *SPINK5*-cDNA mittels rAAV-2 Vektoren in *SPINK5*-defekte Netherton Syndrom Keratinozyten aufgehoben werden können. Als Kontrolle sollten hier untransfizierte Zellen sowie rAAV-2 GFP transduzierte Zellen (MOCK-Transfektante) dienen.

Durch Wahl von geeigneten Primern sollte die Expression von LEKTI auf RNA-Ebene untersucht werden. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen LEKTI sollte der Nachweis von LEKTI-Protein in der Monokultur sowie in einem künstlichen Hautorganoid (DED) erfolgen. In dem DED könnte auch die Morphologie von transduzierten und nicht-transduzierten Keratinozyten verglichen werden.

Desweiteren sollte ein funktioneller Nachweis für die durch eine erfolgreiche LEKTI-Transfektion wiederhergestellte LEKTI-Funktion etabliert werden. Es sollte untersucht werden, ob die in Stratum corneum Proben von NS-Patienten beobachtete erhöhte hydrolytische Aktivität auch in kultivierten NS-Keratinozyten nachweisbar ist und diese durch den Gentransfer mit intakter *SPINK5*-cDNA gesenkt werden kann.

Des Weiteren sollten die involvierten Proteine Desmoglein-1 (Dsg-1), Desmocollin-1 (Dsc-1), Corneodesmosin (CDSN) sowie Stratum corneum trypsin-like enzyme (SCTE) und Stratum corneum chymotrypsin-like enzyme (SCCE) auf Veränderungen durch den Gentransfer betrachtet werden.

Das endgültige Ziel der Arbeit bestand in der *in vitro* Rekonstitution primärer, defekter NS-Keratinozyten mittels rekombinanten-Adeno-assoziierten Virusvektoren.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10

One Shot Top10 competent cells von Invitrogen Cor., Carlsbad, CA, USA
Eigenschaften: F-mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15DlacX74 deoR recA1 araD139 D (ara-leu) 7679 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.

Escherichia coli TOP10F'

One Shot Top10F' competent cells von Invitrogen Cor., Carlsbad, CA, USA
Eigenschaften: F'_{lac I^q Tn10 (Tet^R)} mcrAΔ (mrr-hsaRMS-mcrBC), φ80 lacZΔM15Δ (lacX74), recA1, deoR, araD139Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str^R), end A1, nupG.

2.2 Plasmide

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Name	Resistenzgen	Firma/Quelle ; Besonderheiten
pCR® II-TOPO® (4,0 kb)	Kanamycin Ampicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Vektor zur Klonierung von Restriktionsfragmenten; Möglichkeit zur Blau/Weiß-Selektion bei Verwendung von <i>E.coli</i> TOP10F' enthält M13-Sequenzen für Sequenzierung des klonierten Fragmentes
pTR-UF/C (4735 bp)	Ampicillin	Glatte Enden Ligation des 1308 bp großen <i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I-Fragmentes mit der Expressionskassette aus pCEP4 in die <i>Kpn</i> I - <i>Bam</i> H I Stelle von pTR-UF2 [Promotionsarbeit Stefanie Haug, 2006]
pCEP4 (10,4 kb)	Ampicillin	Invitrogen Cor, Carlsbad, CA, USA; Expressionskassette aus CMV-Promotor, Multipler Klonierungsstelle und SV40-Poly-A-Sequenz

pTR-UF2 (6253 bp)	Ampicillin	geschenkt von R. Samulski [Xiao et al., 1998].
pTR-UF/C-GFP (5470 bp)	Ampicillin	Glatte Enden Ligation des 753 bp großen <i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I-Fragmentes von <i>phrGFP</i> in die <i>Hind</i> III- <i>Xho</i> I Stelle von pTR-UF/C. [Braun-Falco et al., 2005]
<i>phrGFP</i> (3,7 kb)	Ampicillin	Stratagene, La Jolla, CA, USA; ursprünglich aus <i>Renilla reniformis</i> isoliertes GFP mit besonders geringer Toxizität
pXX6-80 (18930 bp)	Ampicillin	geschenkt von A. Girod [Braun-Falco et al., 1999], Helferplasmid mit adenoviralen Gensequenzen
pRC (7578 bp)	Ampicillin	geschenkt von A. Girod [Braun-Falco et al., 1999], Helferplasmid mit Rep und Cap-Gensequenz
pTRE2hyg- LEKTI (8534 bp)	Hygromycin Ampicillin	geschenkt von Gary L. Clayman, Houston, Texas; enthält 3,2 kb große LEKTI-cDNA als <i>Bam</i> H I- <i>Not</i> I-Fragment
pcDNA3.1-LEKTI (8649 bp)	Neomycin Ampicillin	geschenkt von Gary L. Clayman, Houston, Texas enthält 3,2 kb große LEKTI-cDNA als <i>Bam</i> H I- <i>Kpn</i> I-Fragment

2.3 Enzyme

New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

T4 DNA Polymerase, T4 DNA Ligase

Restriktionsenzyme: *Bam*H I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Not* I, *Pst* I, *Xba* I, *Xho* I

MP Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA

RNase A

Merck, E. AG, Darmstadt, Deutschland

Benzonase 25 U/μl

2.4 Eukaryotische Zellen

2.4.1 HeLa-Zellen

Humane Cervix-Karzinomzelllinie eines epithelialen Cervixkarzinom einer 31 jährigen Frau.

Kultiviert seit 1951 [Scherer et al., 1953], von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 57), Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Braunschweig, Deutschland, erworben.

2.4.2 293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 [Graham et al., 1977]. Von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 305), Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Braunschweig, Deutschland, erworben.

2.4.3 NIH3T3

Kontakt-inhibierte embryonale Maus-Fibroblasten Zelllinie [Todaro et al., 1963; Todaro et al., 1965]. Von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 173), Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Braunschweig, Deutschland, erworben.

2.4.4 Primäre humane Keratinozyten

2.4.4.1 Primäre humane Keratinozyten von gesunden Spendern

Primäre, humane Keratinozyten wurden aus der Haut von Zirkumzisionen von Kindern erhalten, die freundlicherweise von Dr.med Dr.med habil. Thomas Angerpointner, Kinderchirurgische Praxis, München, zur Verfügung gestellt wurden.

2.4.4.2 Primäre, humane Keratinozyten von homozygoten Netherton-Patienten

Aus den Gewebeproben von sechs NS-Patienten, die einen Durchmesser von ca. Ø 4-6 mm besaßen wurden die Keratinozyten isoliert.

Die Gewebeprobe von Patient 1 wurde freundlicherweise von der Sanitas Klinik zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeprobe von Patient 2 wurde freundlicherweise von Dr. Christian Andres aus der Biedersteiner Hautklinik zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeprobe von Patient 3 wurde freundlicherweise von Dr. Marie-Luise Preil aus der Tomesa-Fachklinik zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeproben von Patient 4-6 wurden freundlicherweise von Dr. Vinzenz Oji aus der AG Heiko Traupe, Universitätsklinikum Münster, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Dort wurde auch die Sequenzierung der Patienten-DNA auf die vorliegende LEKTI-Mutation durchgeführt.

2.4.4.3 Primäre, humane Keratinozyten von Patienten mit atopischem Ekzem

Primäre, humane Keratinozyten von 3 Patienten mit atopischem Ekzem wurden durch die sog. suction-blister-Methode aus nicht-läsionalen Stellen gewonnen und freundlicherweise von PD Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann, Biedersteiner Hautklinik, München, zur Verfügung gestellt.

2.5 Zellkulturmedien und Supplemente

Biochrom KG, Seromed[®], Berlin, Deutschland

Fetales Kälber Serum (FCS), DMEM, Hams F12, EGF (Epidermal Growth Factor) (5 mg/ml), Hydrocortison (1,4 µM), L-Glutamin (200 mM), Insulin (10 mg/ml), Ethanolamin (0,1 mM), Phosphoethanolamin (0,1 mM), Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10 000 mg/ml)

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

KSFM, DMEM mit Glutamin, Hams F12, Rinderhypophysenextrakt (25 mg/Einheit), PBS-Puffer mit Calcium und Magnesium, PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium,

Sigma Chemie, München, Deutschland

Adenin Hydrochlorid, Choleratoxin

2.6 Antikörper

Tabelle 3 : Verwendete Antikörper

Name/Spezifität	Klon/Nr.	Spezies	Bezugsquelle
anti-human-LEKTI	1C6G11	Maus	Invitrogen
anti-human-LEKTI	L-15	Ziege	Santa Cruz
anti-human-Involukrin	SY5	Maus	Sigma
anti-human-Desmoglein-1	Dsg1-P23	Maus	Progen
anti-human-Desmocollin-1	Dsc1-U100	Maus	Progen
anti-human-beta Aktin	AC-15	Maus	Sigma
Maus-IgG1-Isotypkontrolle	MOPC-31C	Maus	BD Pharmingen
anti-human-SCTE	polyklonal	Kaninchen	abcam
anti-human-SCCE	polyklonal	Kaninchen	abcam
Kaninchen-IgG-Isotypkontrolle	polyklonal	Kaninchen	Dianova
anti-mouse-IgG1 (Cy3-konjugiert)	polyklonal	Kaninchen	Dianova
anti-mouse-IgG1 (Alexa488-konjugiert)	polyklonal	Esel	Invitrogen
anti-mouse-IgG1 (HRP-konjugiert)	polyklonal	Esel	Dianova
anti-rabbit-IgG (Alexa488-konjugiert)	polyklonal	Esel	Invitrogen
anti-rabbit-IgG (Alexa794-konjugiert)	polyklonal	Esel	Invitrogen
anti-rabbit-IgG (HRP-konjugiert)	polyklonal	Esel	Dianova

Der Antikörper anti-human Corneodesmosin (Klon: F28-27) wurde uns freundlicherweise von Dr. Guy Serre, Frankreich zur Verfügung gestellt.

2.7 Primer

Tabelle 4 : Primersequenzen und erwartete Fragmentgrößen

Primer	Sequenz	Fragmentgröße
LEKTI-1s	5'-CGCTAGCAACATGAAGATAG-3'	268 bp
LEKTI-2as	5'-GAGCTCTTGCTAAATGCCT-3'	

β -Aktin-1s	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	650 bp
β -Aktin-2as	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	
β -Aktin-1s#2	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'	353 bp
β -Aktin-2as#2	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	
M13-Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	(ohne
M13-(-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Insert) 202 bp

2.8 Chemikalien, Lösungen und „Kits“

Biochrom KG, Seromed®, Berlin, Deutschland

EDTA (1 %), Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %), Trypsin/EDTA (0,25 % /0,02 %)

Calbiochem®, La Jolla, CA, USA

MG 132, Tyrphostin AG 1478

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm, Deutschland

Isopropanol, Methanol

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Agarose, 1 kb DNA Leiter, RT-PCR Primer und Kontrollset (beta-Aktin), SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix, 4',6'-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride (DAPI)

Leica, Instruments GMBH, Nussloch, Deutschland

OTC-Einbettmedium für Gefrierschnitte

Merck, E. AG, Darmstadt, Deutschland

Borsäure, Calciumchlorid, EDTA, Glycin, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumphosphat, Natriumhydroxid Plätzchen, SDS, Triton X-100, Aceton, Chloroform, Dimethylsulfoxid (DMSO)

Millipore, Schwalbach, Deutschland

Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices

MP Biomedicals, Ohio, USA

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (Chymotrypsinsubstrat)

Boc-Phe-Ser-Arg-AMC (Trypsinsubstrat)

Pierce, Boston Technology Center, USA

Sodiumphosphat, BCA-Protein-Assay Kit, Western-Restore-Puffer, SuperSignal®
West Femto Maximum Sensitivity Substrate

Progen, Heidelberg, Deutschland

AAV Titration ELISA

Qiagen, Hilden, Deutschland

Plasmid-Kits (Mini, Maxi, Endofree-Maxi); Qiaquick-Gelextraktionskit

Riedl-de-Häen, Seelze, Deutschland

Essigsäure, Ethanol 98 %

Roche, Diagnostics, Mannheim, Deutschland

cDNA-Synthesis Kit

Roth, C., Karlsruhe, Deutschland

Ampicillin-Natriumsalz, Bacto Agar, Ethidiumbromid 1 %, Hefe-Extrakt; Hepes,
Trypton / Pepton aus Casein

Sigma Chemie, München, Deutschland

Adenin (6-Aminopurin) Hydrochlorid, Albumin aus bovinem Serum, Albumin Solution
7,5 % Fraktion 5, Ammoniumsulfat; L-Ascorbinsäure, BSA, Formamid, Optiprep,
Phenolrot, Protease X, Proteinase K, Sulforhodamin B, Trypanblau Solution 0,4 %,
endotoxinfreies Wasser, Iodixanol

Sigma Diagnostics, St.Louis, USA

Poly-L-Lysine-Lösung, RnaseZAP™

2.9 Geräte und sonstige MaterialienBeckmann, München, Deutschland

Festwinkelrotor Ti70, Ultrazentrifuge L80, Ultrazentrifugationsröhrchen Quick Seal Polyallomer 25 x 89 mm

Becton Dickinson and Company Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

Zellkultureinlagen (0,4 µm Porengröße), Zellkulturplatten (6 Vertiefungen), Falcon-Röhrchen, konische 15 ml, 50 ml (aus Polypropylen), Falcon-Röhrchen, konische 15 ml, 50 ml (aus Polystyren), Mikrolance 3-Injektionskanüle, Pipetten (Polystyren) 10 ml, 25 ml, Sterile Spritzen 30 ml, 10 ml Syringe-Spritzen, FACSCalibur

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Gel Doc Dokumentationssystem Quantity One Version 4.1, Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, Power Pac 300 System

Brand GMBH + Co KG, Wertheim, Deutschland

Transferpipette, 8-Kanal 30-300 µl

Corning Costar Cor., Cambridge, MA, USA

sterile Zellschaber

Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Deutschland

Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl; Pipettenspitzen weiß, gelb, blau, Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml und 2,2 ml; Thermomixer 5437

Gerhardt, Königswinter, Deutschland

Thermoshake TH05

Greiner GmbH, Nürtingen, Deutschland

Petrischalen 10 cm unbeschichtet, für Bakterienkultur, Pipettenspitzen 100 µl, 1000 µl Reagenzröhrchen 10 ml, 50 ml, Reaktionsgefäß 1,5 ml mit Deckel

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

SDS-Gele und Puffer für Gelelektrophorese und Westernblot

Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge Universal 32R Rotanta

H + P, Oberschleißheim, Deutschland

Dampfsterilisator Varioclav

Integra biosciences, Chur, Schweiz

Pipetboy acu

Julabo, Seelbach, Deutschland

Wasserbad Typ F12

Kendro, Hanau, Deutschland

CO₂-Begasungsbrutschrank Hera Cell; Heraeus Megafuge 1,0; Heraeus Megafuge 1,0 R; Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HSP 12;

Kern und Sohn Waagen, Balingen, Deutschland

770 Feinwaage

Menzel GmbH+CoKG, Braunschweig, Deutschland

Menzel Objektgläser, geschnitten mit Mattrand

Millipore, Schwalbach, Deutschland

PVDF-Transfermembran, Amicon-Ultra-Zentrifugenröhrchen

Moulinex, Solingen, Deutschland

Microchef FM 3915

Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland

Kryo-Gefäß 1,8 ml Innengewinde und U-Boden; Impfnadeln; Multidish Nunclon-SI Zellkulturbeschichtet mit 6, 12 und 96 Vertiefungen; Zellkulturpetrischalen 40 x 12 mm, 58 x 15 mm, 92 x 17 mm

peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland

Chemi Smart 5000 mit Auswerteprogramm Chemi Capt Version 11.10

Peske, Aindling, Deutschland

Zellkulturschalen (für 293-Zellen) 15 cm; Kanülen BD Mikrolance

Pfm, Köln, Deutschland

Skalpell Feather

Quiagen, Hilden, Deutschland

Endo free Plasmid Kit, Gel Extraction Kit (50), Plasmid Kit Mini und Maxi

Roth, C., Karlsruhe, Deutschland

Drigalski Spatel, sterile Kanülen 100 Sterican

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Minisart Sterilfilter; Porengröße 0,2 µm, Waage C 420 p

Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

Gel-Blotting-Papier

Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Vortex-Genie 2

Sigma, Osterode am Harz, Deutschland

Laborzentrifuge Typ 1-15

Thermo Labsystems, Egelsbach, Deutschland

ELISA-Reader, MRX Revelation

Wagner und Muntz, München, Deutschland

Deckgläschen, Dumont Pinzetten gebogen, Handzähler, Neubauer Zählkammer,
Wheaton Homogenisator nach Fenbroeck, Skalpelle Cutoff 22

Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25, Microm HM 500 O-Kryostat-Mikro

2.10 Zusammensetzung von Puffer und Medien**Tabelle 5:** Zusammensetzung von Puffer und Medien

Agarosegele	0,7 % w/v Agarose (RNA) 1,0 % w/v Agarose (DNA) 1,5 % w/v Agarose (DNA) in TBE-Puffer
Ampicillin-Stocklösung	80 mg/ml in Ethanol verwendete Endkonzentration: 80 µg/ml bzw. 50 µg/ml (pXX6)
BCA-Reagenz A	Na ₂ CO ₃ , Na(CO ₃) ₂ , Bicinchoninic Säure und Na-Tartrat in 0,1 M NaOH
BCA-Reagenz B	Kupfersulfatlösung
BCA-Arbeitslösung (WR) (Gesamtproteinbestimmung)	50 Teile BCA-Reagenz A 1 Teil BCA-Reagenz B
Blockingpuffer (Westernblot/Dotblot)	3 % BSA in TBS-Tween
Blockinglösung (Immunfärbung)	3 % BSA in PBS
EB-Puffer (Plasmidisolierung)	10 mM Tris-HCl (pH 8,5)
Ethidiumbromid	2 µl 1% Stocklösung pro 100 ml TBE-Puffer
HBS-Puffer (pH 7,0) (Calcium-Phosphat-Transfektion)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM NaPhosphat
Hypotonischer Lysepuffer (pH 7,9) (Westernblot/Dotblot)	10 mM HEPES 10 mM KCl 10 mM MgCl ₂

	0,5 mM EDTA 1x Proteinase-Inhibitorcocktail (Calbiochem) 1% Triton X-100
15%ige Iodixanol-Lösung (Viruspartikelaufreinigung)	12,5 ml Optiprep 5,0 ml 10 x PBS 10,0 ml 5,0 M NaCl 75 µl 0,5 % Phenolrot 50 µl 1,0 M MgCl ₂ 50 µl 2,5 M KCl ad 50 ml Sigma Wasser, steril filtriert
25%ige Iodixanol-Lösung (Viruspartikelaufreinigung)	20,0 ml Optiprep 5,0 ml 10x PBS 100 µl 0,5 % Phenolrot 50 µl 1,0 M MgCl ₂ 50 µl 2,5 M KCl ad 50 ml Sigma Wasser, steril filtriert
40%ige Iodixanol-Lösung (Viruspartikelaufreinigung)	33,3 ml Optiprep 5,0 ml 10x PBS 50 µl 1,0 M MgCl ₂ 50 µl 2,5 M KCl ad 50 ml Sigma Wasser, steril filtriert
60%ige Iodixanol-Lösung (Viruspartikelaufreinigung)	50,0 ml Optiprep 50 µl 0,5 % Phenolrot 50 µl 1,0 M MgCl ₂ 50 µl 2,5 M KCl ad 50 ml Sigma Wasser, steril filtriert
293 -Kulturmedium (allgemein)	DMEM 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
293 -Kulturmedium (nur Tag 3 der Virusverpackung)	DMEM 2 % FCS

	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
3T3 bzw. HeLa-Kulturmedium	DMEM 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM Glutamin
KGM (Medium für Kultivierung von Keratinocyten auf 3T3-Fibroblasten) (Medium für Kultivierung von Hautäquivalenten)	375 ml DMEM 125 ml Ham's F12 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5 µg/ml Insulin 2 mM Glutamin 0,18 mM Adenin 100 µM Ethanolamin 100 µM Phosphoethanolamin 100 µM Cholera toxin 10 ng/ml EGF 500 ng/ml Hydrocortison
Keratinocytenmedium (komplett)	KSFM 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5% v/v Rinderhypophysenextrakt 10 ng/ml EGF 2 mM Glutamin
Keratinocytenmedium (EGF-frei)	KSFM 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5% v/v Rinderhypophysenextrakt 2 mM Glutamin
Laufpuffer (SDS-Gele)	950ml destilliertes Wasser 50ml MOPS Buffer (20x) (Invitrogen)
LB-Agarplatten	1,5 % w/v Bacto-Agar in LB-Medium

LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Hefe Extrakt 5 g NaCl ad 1 Liter dest. Wasser
LB-Glycerin-Medium für Langzeitkulturen	50 % LB-Medium 50 % 87%iges Glycerin
Lysis-Puffer (Viruspartikelreinigung)	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl
Orange G-Auftragspuffer (6x) (Agarosegele)	10 mM Tris-HCl (pH 8) 2 mM EDTA (pH 8) 40,0 % w/v Sucrose 0,4 % w/v Orange G
PBS-MK-Puffer (Viruspartikelreinigung)	50 ml 10 x PBS 500 µl 1,0 M MgCl ₂ 500 µl 2,5 M KCl ad 500 ml Sigma Wasser
Ponceau-S-Färbelösung in TBST	2 % Trichloressigsäure 2 g/l Ponceau-S
Puffer 1 (Plasmidisolierung)	50 mM Tris-HCl (pH 8) 10 mM EDTA (pH 8) 100 µg/ml RNase A
Puffer 2 (Plasmidisolierung)	200 mM NaOH 1 % w/v SDS
Puffer 3 (Plasmidisolierung)	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer QBT (Plasmidisolierung)	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7) 15 % v/v Ethanol 0,15 % v/v Triton-X 100
Puffer QC (Plasmidisolierung)	1,0 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7) 15 % Ethanol

Puffer QF (Plasmidisolierung)	1,2 M NaCl 50 mM MOPS (pH 8,5) 15 % Ethanol
Puffer X (Proteasetest mit Trypsinsubstrat)	70 mM Tris-HCl, pH8 0,048% v/v Triton-X 100
1%ige Schwefelsäure (Sulforhodamin B-Test)	1% konz. Schwefelsäure in dest. Wasser
Sulforhodamin B-Lösung (Sulforhodamin B-Test)	0,4 % Sulforhodamin B in 1 % Essigsäure
SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix (2x)	hot start Taq-DNA-Polymerase SYBR®GreenER™ Fluoreszenzfarbstoff 1 µM ROX Referenzfarbstoff, MgCl ₂ , dNTPs (mit dUTP anstelle von dTTP), Uracil DNA Glycosylase und Stabilisatoren
25%ige TCA-Lösung (Sulforhodamin B-Test)	25% Trichloressigsäure in dest. Wasser
TBE-Puffer (Agarosegel-Laufpuffer)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
10x TBS-Puffer (Westernblot/Dotblot)	60,55 g Tris 87,66 g NaCl ad 1 Liter dH ₂ O
1x TBS-Tween	100 ml 10x TBS 900 ml dH ₂ O 500 µl Tween20
T4-DNA-Ligasepuffer (10x)	500 mM Tris-HCl (pH 7,6) 100 mM MgCl ₂ 10 mM ATP 10 mM DTT 25 % PEG 6000
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
Thermolysinpuffer (pH 7,4)	142 mM NaCl

(Keratinocytenisolierung)	10 mM HEPES 6,7 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 0,43 mM NaOH
Transferpuffer (Westernblot)	850 ml dH ₂ O 50 ml Transfer Puffer (Invitrogen) 100 ml Methanol 1 ml Antioxidant (Invitrogen)

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

E. coli TOP10F' wurden nach der Transformation mit Plasmiden (pCR®2.1-TOPO®-Vektor, pTRUF/C-GFP, pTRUF/C-LEKTI, pRC, pXX6) auf 1,5 %-igen Agarplatten mit LB-Medium und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und übernacht bei 37°C inkubiert.

Um 1,5 %ige Agarplatten herzustellen, wurden 1,5 g Bacto-Agar mit 100 ml LB-Flüssigmedium gemischt und durch Aufkochen gelöst. Die Zugabe des Selektionsantibiotikums Ampicillin zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml bzw. 80 µg/ml erfolgte bei einer Temperatur von etwa 55°C, da die Antibiotika bei einer höheren Temperatur inaktiviert werden würden. Etwa 15-20 ml des vorbereiteten Agars wurden möglichst luftblasenfrei in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen. Nach dem Erstarren des Agars konnten die Bakterien mit einem Drigalski-Spatel darauf ausgestrichen werden. Nachdem die Platten trocken waren, wurden sie umgedreht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.2 Anzucht von Bakterien in Schüttelkulturen

Um Bakterien für eine spätere Mini-Plasmidisolierung zu erhalten, schüttelte man eine steril überimpfte Kolonie oder 25-100 µl Bakteriensuspension in 5 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum übernacht bei 37°C und 200-225 Rpm. Für Maxi-Plasmidisolierungen wurden, um in der optimalen Wachstumsphase zu bleiben, die Bakterien-Übernachtkulturen 1:1000 in 1 Liter LB-Medium verdünnt und erneut übernacht bei 200-225 Rpm geschüttelt. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug auch hier 80 µg/ml bzw. im Falle von pXX6-Plasmiden 50 µg/ml.

3.1.3 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Hierzu wurden 1-50 ng der zu klonierenden Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.coli* TOP 10 Bakterien der Firma Invitrogen eingeschleust. Die Aufnahme der DNA-Fragmente in die bakterielle Zelle wurde durch einen Hitzeschock induziert.

Dazu wurden die chemisch kompetenten Zellen vor Versuchsbeginn zunächst langsam auf Eis aufgetaut, nach Zugabe der Plasmid-DNA für genau 30 Sekunden bei 42°C inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Danach bekamen die *E.coli* Zellen durch Inkubation ohne Antibiotika-Zugabe für 1 Stunde bei 37°C Zeit, die Resistenzgene für die auf den Plasmiden enthaltenen Antibiotika zu exprimieren. Erst danach erfolgte der Ausstrich der Bakterien auf Antibiotika-enhaltenden Agarplatten.

3.1.3.1 Ligation von PCR-Produkten in pCRII-TOPO und Blau-Weiß-Selektion

Hierzu wurde 1 µl eines frischen PCR-Produktes mit 1 µl 10xLigase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl vom pCRII-TOPO –Vektor in einem 10 µl Ansatz Übernacht bei 14°C inkubiert. LB-Amp-Platten wurden 30 Minuten bei 37°C angewärmt bevor darauf 40 µl 40 mg/ml X-Gal in DMF und 40 µl 100 mM IPTG ausgestrichen wurden und die Platten für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die Transformation von 2 µl der Ligation in *E.coli* TOP10F' Zellen erfolgte wie in *E.coli* TOP10 Zellen. Blaue Kolonien zeigen Bakterien an, die ein Plasmid ohne Insert aufgenommen haben. Weiße Kolonien dagegen Bakterien, die ein Plasmid mit Insert tragen, da hier der ORF durch das Insert zerstört wurde.

3.2 DNA-Analysemethoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden spezielle käuflich erhältliche Säulen der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Plasmid-DNA für die Virusverpackung wurde in speziellen LPS-freien (Lipopolysaccharid) Säulen aufgereinigt.

Prinzipiell handelt es sich hierbei um ein modifiziertes Standardverfahren nach der Originalarbeit von Birnboim und Doly [Birnboim und Doly, 1979]. Zunächst werden die Zellen durch NaOH und SDS aufgeschlossen. Chromosomale DNA und Proteine denaturiert, die bakterielle DNA dabei aber nicht geschert. Durch die zugegebene RNase A wird die enthaltene RNA abgebaut. Durch Neutralisation mit Kaliumacetat und Filtration bzw. Zentrifugation wird die enthaltene Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und Proteinen getrennt. Dazu wird die Plasmid-DNA an die Silicatmatrix der Anionenaustauscher-Säule gebunden. In den nachfolgenden Schritten werden vorhandene Verunreinigungen entfernt, die DNA gefällt und gewaschen.

3.2.1.1 DNA-Extraktion mittels alkalischer Bakterienlyse

Bakterien-Übernachtskulturen wurden zunächst 10 Minuten bei 5.000 Rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet einer 5 ml-Übernachtskultur wurde in 300 µl P1-Puffer + RNase A resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt. Das Pellet einer 1 Liter-Übernachtskultur in 10 ml P1-Puffer + RNase A resuspendiert und in 50 ml Falcons überführt. Die Lösungen wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Zugabe von 300 µl bzw. 10 ml P2-Puffer erfolgte. Es wurde vorsichtig geschüttelt und die Lösungen exakt für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, wodurch eine zähflüssige Lösung entstand. Nach Zugabe von 300 µl bzw. 10 ml kaltem P3-Puffer und vorsichtigem Mischen fallen Proteine als Kalium-SDS-Komplexe aus. Nach Angabe des Herstellers wurde diese Mischung in Filterspritzen überführt und 10 Minuten inkubiert. Danach wurde der lösliche Anteil, der die DNA enthielt vorsichtig in das Falcon gedrückt, während die im Niederschlag enthaltenen Proteine und die genomische DNA zurückgehalten wurden. Sollte die Plasmid-DNA für die Virusverpackung verwendet werden, wurde der Ansatz im nächsten Schritt mit einem speziellen Endotoxin-entfernenden Puffer (Puffer ER) für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert.

3.2.1.2 Reinigung der isolierten Plasmid-DNA

Die dem Kultivierungsvolumen entsprechenden Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen wurden zunächst mit QBT-Puffer äquilibriert. Erst dann wurde das in 3.2.1.1 erhaltene Filtrat bzw. der Überstand mit der Plasmid-DNA auf die Säule

geladen. Die Säule wurde dreimal durch Zugabe von QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit Puffer QF aus den Säulen eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens an Isopropanol gefällt durch Zentrifugation pelletiert. Die DNA wurde unter der sterilen Werkbank kurz luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer oder Endotoxin-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

3.2.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA mit Hilfe eines Photometers basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm. Jede Substanz absorbiert aufgrund ihrer Struktur Licht bestimmter Wellenlängen. Die Absorption bei 260 nm wird in Quarz-Küvetten gemessen, weil diese das UV-Licht nicht absorbieren. Für die Absorptionsmessung wurde ein Photometer der Firma Eppendorf verwendet. 1 OD 260 entspricht 50 ng/ μl DNA.

Verdünnungen der zu untersuchenden DNA wurden in TE-Puffer oder Wasser hergestellt und zunächst der entsprechende Blank gemessen. Nach Einbezug des Verdünnungsfaktors erhält man die Konzentration der DNA in der Ausgangslösung.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen benutzt man die Agarosegel-Elektrophorese. Sie beruht darauf, dass die negative DNA nach Anlegen eines elektrischen Feldes zum Pluspol wandert. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch das engmaschige Agarosegel als größere, wodurch eine Größenauftrennung möglich wird. Durch das Zufügen interkalierender Substanzen, wie dem Ethidiumbromid kann die DNA bei 366 nm unter dem UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe eines parallel in eine Tasche mit aufgetragenen Längenstandards kann man die Größe der DNA bestimmen und im Prinzip auch die ungefähre Menge. Der Längenstandard hat eine Konzentration von 20 ng/ μl . Bei einem Einsatz von 10 μl entspricht jede Bande etwa 10 ng DNA.

Die Prozentigkeit eines Agarosegels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente; je kleiner die Fragmente, desto höher sollte die Prozentigkeit gewählt werden.

0,7-1,5 g Agarose wurden in 100 ml 1 x TBE durch Aufkochen gelöst. Währenddessen wurde ein Gelträger vorbereitet, indem ein Kamm eingesetzt wurde und die Seiten mit einem Klebeband abgeklebt wurden. Erst bei einer Temperatur von etwa 60°C wurde das Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5-1 µg/ml in die Lösung gegeben und diese anschließend in den Gelträger gegossen. Nach Erstarrung des Gels wurde dieses in einen mit 1 x TBE befüllten Geltank gestellt und der Kamm vorsichtig unter Puffer herausgezogen. Die Proben und auch der 1kb-Marker wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6x Orange G-Auftragspuffer versetzt. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm Gel-Länge.

3.2.3.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um ein bestimmtes DNA-Fragment zu isolieren, wurde die gewünschte Bande mit einem sauberen Skalpell möglichst knapp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Die Reinigung des DNA-Fragmentes aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)* nach Anweisungen des Herstellers.

Im Prinzip wird die DNA zunächst an eine Säule gebunden, vom Agarosegel gereinigt und schließlich von der Säule eluiert.

Zunächst wurde das Netto-Gewicht des Gelstücks bestimmt werden und pro 100 mg Agarosegel 300 µl des Puffers QG zugegeben. Nur bei pH 7,5 ist die optimale Bindung der DNA an die im Kit enthaltene MinElute Säule gewährleistet. Der im Puffer QG enthaltene pH-Indikator färbt sich orange oder violett bei zu basischem pH und ist bei dem erforderlichen pH von kleiner oder gleich 7,5 gelblich gefärbt. Ein zu basischer pH sollte durch Zugabe einer 3 M Na-Acetat-Lösung mit pH 5 auf die erforderlichen pH 7,5 gebracht werden. Nach vollständiger Lösung des Agarosegelstückes und Prüfung des pH-Wertes erfolgte die Zugabe von 100 µl Isopropanol. Nach mehrmaligem Mischen des Eppendorfgefäßes wurde eine MinElute-Säule in ein 2-ml Auffanggefäß gestellt und für 1 Minute bei 10.000xg zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses wurden 500 µl Puffer OG auf die Säule pipettiert und erneut für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die DNA auf der Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen und erneut

zentrifugiert. Zur Elution der DNA von der Säule wurden 10 µl Puffer EB oder alternativ TE-Puffer zugegeben, die Säule 1 Minute inkubiert und schließlich erneut für 1 Minute zentrifugiert. Die Lagerung der gewonnenen DNA erfolgte bei -20°C.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1988) ist ein Verfahren, mit dem man *in vitro* bestimmte Nucleotidsequenzen enzymatisch amplifizieren kann. Dazu verwendet man synthetische DNA-Oligonucleotide, die an die Enden der Matrizensequenzen binden. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase einen neuen DNA-Doppelstrang. Dadurch kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden DNA-Oligonucleotiden vervielfältigt werden.

Die PCR basiert auf drei sich wiederholenden Schritten: der DNA-Denaturierung (Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges), der Anlagerung (Annealing) der Oligonucleotide und der Extension (Verlängerung) durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktions-schritte, wodurch die Matrize jeweils verdoppelt wird.

Für einen 20 µl-Standardansatz wurden in einem Reaktionsgefäß auf Eis 1-5 ng Plasmid-DNA, 50-100 ng genomische DNA, 2 ng PCR-Produkt, 1 µl Bakteriensuspension oder 1 µl cDNA eingesetzt. Dazu wurden je 2,0 µl 10 x Reaktionspuffer (ohne MgCl₂), 2 µl 10 x 2mM dNTP-Mischung, MgCl₂ (Endkonzentration von 1,5 – 2,5 mM), 7,5 pMol des 3'- und 5'- Oligonucleotids und 0,4 U Taq-Polymerase in das Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und die PCR in einem Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 6: PCR-Bedingungen für die verwendeten Oligonucleotid-Paare:

Oligonucleotidpaar	MgCl ₂ -Konzentration	T _A [°C]	Fragmentgröße ca.
LEKTI- 1s/- 268 as	2,5 mM	54	268 bp
LEKTI-1s/-1282 as	2,5 mM	54	420 bp
LEKTI-1s/-1794 as	2,5 mM	54	1200 bzw. 1800
5'AKTIN/3'AKTIN	2,5 mM	54	350 bp bzw. 650 bp
M13-rev/-20	1,5 mM	51	200 bp (ohne Insert)

3.2.4.1 Gradienten-PCR

Die jeweilige Annealing-Temperatur (T_A) hängt vom verwendeten Oligonucleotid-Paar ab (siehe Tabelle 3.2.5) und konnte mit Hilfe einer Gradienten-PCR bestimmt werden. Hierbei erfolgte die PCR-Reaktion in Parallelansätzen, wobei man im Thermocycler für 12 mögliche Positionen eine schrittweise Temperaturerhöhung einstellen konnte. Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur für die LEKTI-spezifischen Primer 1s und 268as wurde ein Temperaturgradient zwischen 49,1°C und 61,2°C gewählt. Bei jeder dieser Temperaturen wurde ein Fragment detektiert, die Stärke nahm aber mit zunehmender Temperatur ab und das Fragment schien bei den niedrigeren Temperaturen unreiner zu sein, weshalb im folgenden für dieses Primerpaar eine Temperatur von 54°C ausgewählt wurde.

Tabelle 7: PCR-Bedingungen für LEKTI-Primer

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Anfangsdenaturierung	5 Minuten	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 Sekunden	95°C	35 Zyklen
Annealing	45 Sekunden	54,1°C	
Extension	40 Sekunden	72°C	
Endextension	10 Minuten	72°C	1 Zyklus

3.2.4.2 Screening-PCR

Die PCR eignet sich zum Beispiel gut für die Analyse von Transformanden-Klonen. Dazu benutzt man Oligonucleotide, die spezifisch an die Sequenz des transformierten Plasmids oder an das in die multiple Klonierungsstelle des Vektors inserierte DNA-Fragment binden. Der pCRII-TOPO-Vektor enthält z.B. Anlagerungssequenzen für M13-Primer, die Länge des Amplifikats bei Verwendung der M13-Primer kann auch Aufschluss über die eingebrachte DNA geben. Bei erfolgreicher Transformation erhält man, nach Auftrag des PCR-Produkts auf ein Agarosegel, Amplifikate der gewünschten Größe.

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für M13-Primer

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Anfangsdenaturierung	5 Minuten	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 Sekunden	95°C	35 Zyklen
Annealing	30 Sekunden	58°C	
Extension	1 Minuten	72°C	
Endextension	2 Minuten	72°C	1 Zyklus

3.2.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen bakteriellen Ursprungs, die in der Lage sind, doppel-strängige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten. Die entstehenden Spaltfragmente haben eine definierte Länge und können durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden.

2 µg Plasmid wurden mit 1/10 Volumen des Gesamtansatzes 10 x Restriktionspuffer und 0,2 U/µl des entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und mit Wasser auf das Endvolumen des Ansatzes aufgefüllt. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarosegel auf Vollständigkeit des Verdau getestet. Wenn die DNA im Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten werden sollte, wurde ein Restriktionspuffer verwendet, in dem beide Enzyme optimale Aktivität hatten.

Zur Linearisierung eines Plasmids, in welchem die Restriktionsschnittstellen zweier verschiedener Restriktionsenzyme nahe nebeneinander liegen, wurde zunächst nur eines der Enzyme zum Ansatz gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Bei erfolgreichem Verdau, wird das erste Enzym inaktiviert und das zweite Enzym zugegeben und wieder eine Stunde bei 37°C inkubiert bzw. bei der jeweiligen Arbeitstemperatur für das Enzym.

3.2.6 Klonierung von Restriktionsfragmenten

Die Klonierung der Restriktionsfragmente in den Vektor erfolgt über die Ligasereaktion, hierbei werden die Enden zweier DNA-Fragmente mit Hilfe der DNA-

Ligase verknüpft. DNA-Ligasen sind Enzyme, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Moleküls und der freien 3'-OH-Gruppe eines anderen DNA-Moleküls katalysieren.

Zu 100 ng des linearisierten Vektors wurden 1 µl 10x Ligasepuffer, 0,5 µl Ligase und 20 ng vom zu ligierenden Fragment gegeben und der Ansatz auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis gestellt und dann Übernacht bei 14°C inkubiert.

3.3 RNA-Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Bei der RNA-Isolierung ist vorsichtig und schnell vorzugehen, weil Ribonucleasen (RNasen) ubiquitär vorkommende Enzyme sind, die RNA schnell abbauen würden. RNA-Präparationen wurden in RNase-freiem, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst.

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde peqGOLD RNAPure (peqLab) verwendet. Das Zellsediment wurde durch Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast zu 5-10x10⁶ Zellen durch pipettieren lysiert. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch eine vollständige Dissoziation von Nucleotidkomplexen erfolgte. Dann wurden 0,2 ml Chloroform pro ml peqGOLD RNA Pure zugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt und der Ansatz drei bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C für 5 Minuten führte zur Trennung in drei Phasen: eine untere Phenol-Chloroform-Phase und Interphase, die DNA und Proteine enthielt und eine obere farblose, wässrige Phase mit der RNA. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro ml peqGOLD RNAPure zur wässrigen Phase, Mischen des Ansatzes und fünf bis 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C für 10 Minuten führte zu einem RNA-Präzipitat von gelartiger Konsistenz. Der Isopropanol-Überstand wurde verworfen und die RNA zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol pro ml peqGOLD RNA Pure durch Mischen und Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C für 10 Minuten gewaschen.

Das RNA-Sediment wurde etwa 5 Minuten luftgetrocknet und je nach Pelletgröße in 20-50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA wurde durch Pipettieren und Inkubation bei 55 bis 60°C für 10 bis 15 Minuten gelöst. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80°C.

3.3.1.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von RNA basiert ebenfalls auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm und erfolgte ebenfalls am BioPhotometer der Firma Eppendorf.

Im Unterschied zur DNA entspricht hier aber eine OD₂₆₀ einer Konzentration von 40 ng/µl.

3.3.1.2 Qualitätskontrolle der RNA im Agarosegel

Eine Möglichkeit der optischen Qualitätskontrolle von RNA ist der Auftrag auf ein Agarosegel. Hierzu wurden 500 ng RNA auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Nicht-degradierte RNA zeigt hierbei 3 Banden, eine bei etwa 1600 bp, eine bei etwa 1000 bp und eine kleiner 300 bp.

3.3.2 cDNA-Synthese

Eine cDNA ist eine komplementär zur mRNA-Sequenz gebildete Desoxyribonucleinsäure. Um aus RNA eine cDNA herzustellen, wurde die AMV-Reverse Transkriptase verwendet. Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde ein 15 bp langes Oligo(dT)-Oligonucleotid eingesetzt. Da dieses im Bereich des poly-A-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA-Moleküle hybridisiert, werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle selektiv in cDNA umgeschrieben.

Für die cDNA-Synthese wurde der *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche)* verwendet. Es wurde auf Eis gearbeitet. Zu 1 µg RNA wurden 2 µl 10x Reaktionspuffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor und 0,8 µl AMV Reverse Transkriptase gegeben und der Ansatz auf 20 µl mit sterilem DEPC-Wasser aufgefüllt.

Die eigentliche cDNA-Synthese-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach den in folgender Tabelle aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 9: Bedingungen der cDNA-Synthese-Reaktion

Zeit	Temperatur
10 Minuten	25°C
60 Minuten	42°C
5 Minuten	99°C (inaktiviert AMV-Reverse Transkriptase)
5 Minuten	4°C (kühlt Ansatz herunter)

3.3.3 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine einfache Methode um auf RNA-Ebene festzustellen, ob eine bestimmte Zelllinie oder ein bestimmtes Gewebe ein bestimmtes Gen exprimiert.

Es handelt sich hierbei um eine Kombination aus cDNA-Synthese und PCR-Reaktion. Zuerst erfolgte die cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgte dann eine PCR-Reaktion, in der 50-100 ng der zuvor gebildeten cDNA als Matrize diente. In die PCR-Reaktion setzte man Oligonucleotide ein, die für das gesuchte Genprodukt spezifisch waren. Als Negativkontrolle wurde ein cDNA-Syntheseansatz ohne Reverse Transkriptase bzw. Wasser in die PCR-Reaktion eingesetzt. Als Positivkontrolle diente β -Aktin-mRNA, die von allen Zellen eines Gewebes gleichermaßen exprimiert werden sollte.

3.3.4 „realtime“ PCR

Zum quantitativen Vergleich der Expression bestimmter Gene unter bestimmten Bedingungen oder in Zellen aus verschiedenen Spendern, kann die „realtime“-PCR-Reaktion analog zur RT-PCR-Reaktion durchgeführt werden. Für die „realtime“ PCR-Reaktion nach der SYBRGreen-Methode wurde der SYBR[®]GreenER[™] qPCR SuperMix (Invitrogen) verwendet. Dieser enthält neben der hot start Taq-DNA-Polymerase und dem SYBR[®]GreenER[™] Fluoreszenzfarbstoff, 1 μ M ROX Referenzfarbstoff, MgCl₂, dNTPs (mit dUTP anstelle von dTTP), Uracil DNA

Glycosylase und Stabilisatoren. Bei der „realtime“-PCR wird das entstehende PCR-Produkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert und kann dadurch detektiert werden. Es gilt dabei einen bestimmten Schwellenwert zu erreichen. Je eher der bestimmte Schwellenwert vom Amplifikat erreicht wird, desto geringer ist sein so genannter CT-Wert (Anzahl Zyklen bis Amplifikat in ausreichender Menge für eine Detektion vorliegt). Durch Verwendung eines Haushaltsgens als Kontrolle der Reaktion (gleiche Qualität der cDNA in allen Ansätzen) wurden die Ansätze auf den so genannten deltaCT-Wert umgerechnet. Die erhaltenen CT-Werte für die PCR-Reaktion mit den LEKTI-spezifischen Primer wurden hier direkt um die CT-Werte für die PCR-Kontrollreaktion mit beta Aktin-spezifischen Primern der Firma Invitrogen (RT-PCR Primer und Control set) korrigiert (delta CT, dCT). Erst aus diesen dCT-Werten wurde der Mittelwert gebildet und der Calcium-abhängige Effekt der LEKTI-Expression durch Abzug des Mediumwerts (0) von jedem erhaltenen Calciumwert (1 = 1 Tag, 2 = 2 Tage, 3 = 3 Tage Inkubation mit 1,2 mM CaCl₂) ermittelt (deltadeltaCT, ddCT). Aus dem so erhaltenen ddCT-Wert wurde der ratio-Wert ermittelt (2^{-ddCT}), mit dem die fache Expression eines Gens in Abhängigkeit der Bedingungen dargestellt werden konnte.

3.4 Protein-Methoden

3.4.1 FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die FACS-Analyse beruht auf direkter oder auch indirekter Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen. Relative Zellgröße, Granularität sowie drei (bis vier) verschiedene Fluoreszenzfarben können gleichzeitig gemessen werden. Außer zum Sortieren von Zellen kann die Methode auch zur Untersuchung von bestimmten Oberflächenrezeptoren auf Zellen angewandt werden.

Mit dieser Methode ist es außerdem möglich intrazelluläre Proteine zu detektieren, wenn die Zellen zuvor permeabilisiert wurden.

3.4.1.1 Fixierung, Permeabilisierung und Färbung des Antigens

Für jedes zu testende Antigen wurden 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte (Nunc) ausgesät und zur Fixierung in 2% PFA/FACS-Puffer resuspendiert. Für jede untersuchte Probe wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, die ohne Primärantikörper bzw. mit einer Isotypkontrolle inkubiert wurde.

Der Fixierungsschritt erfolgte Übernacht oder für 15 Minuten bei 4°C (Kühlschrank). Nach der Fixierung erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 4 Minuten bei 2.000 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus). Nach Ausschlagen des Überstandes wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl 0,05% Triton X-100 in FACS-Puffer für 20 Minuten bei RT permeabilisiert und danach erneut zentrifugiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und die Zellsedimente mit 30-40 µl des ersten Antikörpers resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte in 0,05% Triton X-100 in FACS-Puffer. Darauf folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 150 µl FACS-Puffer, bei welchem wie oben zentrifugiert wurde.

Tabelle 10: In der FACS-Analyse verwendete Primärantikörper

1. Antikörper gegen	Klon	Verdünnung	Spezies
Maus IgG1	polyklonal	1:10-1:100	Maus
humanes LEKTI	1C11G6	1:2	Maus
humanes Desmoglein-1	Dsg1-P23	1:3	Maus
humanes Desmocollin-1	Dsc1-U100	1:3	Maus
humanes Involucrin	SY5	1:200	Maus
humanes Corneodesmosin	F28-27	1:100	Maus
humanes K10/11	K8.6	1:200	Maus
Maus IgG2a	polyklonal	1:50	Maus
humanes beta1-Integrin	K20	1:500	Maus
Kaninchen IgG	polyklonal	1:200	Kaninchen
humanes SCTE	polyklonal	1:200	Kaninchen
humanes SCCE	polyklonal	1:200	Kaninchen

3.4.1.2 Detektion des gebundenen Primärantikörpers

Der Nachweis der Bindung der Erstantikörper an die jeweiligen Keratinozytenproteine erfolgte durch Zugabe von Zweitantikörpern, die gegen die Spezies aus der die Erstantikörper stammten, gerichtet waren. Diese Antikörper, die eine Ausgangskonzentration von 2 mg/ml hatten, wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurden 30 µl vom zweiten Antikörper zugegeben, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war und den ersten Antikörper erkannte. Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal wie in 3.4.1.1 beschrieben gewaschen.

Zuletzt wurde jedes Zellsediment in 200-300 µl FACS-Puffer aufgenommen, in FACSRöhrchen überführt und im FACScalibur Durchflussscytometer die Färbung quantifiziert. Hierzu wurde zur Abgrenzung des FACSpuuffers mit den darin enthaltenem FCS ein gate um die Keratinozytenpopulation gelegt und die Anzahl positiver Zellen im Histogrammplot oder im Dotplot im FL-1 Kanal ausgewertet.

Tabelle 11: In der FACS-Analyse verwendete Sekundärantikörper

1.Antikörper	2.Antikörper	Fluorophor	ex/em	Verdünnung
aus Maus	Esel gegen Maus	Alexa-488	495/519	1:500
aus Kaninchen	Esel gegen Kaninchen	Alexa-488	495/519	1:500
aus Kaninchen	Esel gegen Kaninchen	Alexa-594	590/617	1:500

3.4.1.3 Bestimmung des Anteils an toten Zellen mittels FACS-Analyse

Eine Anfärbung von toten Zellen durch Zugabe von Propidium-Iodid war nur bei nicht-permeabilisierten Zellen möglich, da durch die Permeabilisierung die Membran durchlässiger gemacht wird. Hierzu wurden nach Messung der Zellen im FL3-Kanal ohne Propidium-Iodid, dem Ansatz 10 µl PI-Stocklösung pro 500 µl Volumen zugegeben und die Zellen erneut im FL3-Kanal aufgenommen.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. SDS lagert sich an das Protein an und umhüllt es mit negativen Ladungen ein, wodurch die Eigenladung des Proteins maskiert wird und es im elektrischen Feld zum Pluspol wandert.

Für die SDS-PAGE wurden 10% Bis-Tris-Fertiggel der Fa. Invitrogen verwendet. Das Fertiggel wurde nach Spülen mit dest. Wasser und Entfernen des Klebestreifens in die Gelkammer (BioRad) eingespannt. Nach Zugabe von 200 ml 1x MOPS SDS-Laufpuffer, dem 500 µl NuPage Running buffer Antioxidant zugemischt wurden, in die innere Kammer und etwa 600 ml 1x MOPS SDS-Laufpuffer in die äußere Kammer wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen. Pro Geltasche konnten etwa 30 µl Proteinlösung aufgetragen werden. Diese wurde zuvor mit 1/10-Volumen NuPage 10x Reducing Agent (500 mM DTT) und 1/4 Volumen 4x Auftragspuffer versetzt. Vor dem Auftrag wurden die Proben 10 Minuten lang bei 70°C erhitzt. Vom Proteinmarker wurden 10 µl pro Tasche aufgetragen. Nach Anschluss der Gelkammer an die Elektrophoreseeinheit wurden die Proben 60 Minuten bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.3 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

3.4.3.1 Westernblot

Die von Towbin et al. (1979) beschriebene Methode des Westernblots beruht darauf, dass ein Protein durch einen entsprechenden spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper, auf einer Membran nachgewiesen wird.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die Gelkammer geöffnet und die Taschen des Fertig-gels entfernt. Nun konnte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgen. Der Transfer erfolgte in einer Nassblot-Apparatur und dauert eine Stunde. Als Transferpuffer wurde der NuPage Transferpuffer der Firma Invitrogen verwendet, dem 0,1% v/v NuPage Sample Antioxidant zugemischt wurden.

Wichtig ist beim Zusammenbau der Blottingapparatur daran zu denken, dass Polypeptide im SDS-Gel negativ geladen sind und deshalb zum Pluspol wandern werden. Man muss also darauf achten, dass die Proteine vom Gel auf die Membran

wandern. In der Abb.3.4.3.1 ist der Aufbau des Westernblots dargestellt. PVDF-Membranen müssen vor der Verwendung für 30 Sekunden in Methanol gelegt werden, um ihre Hydrophobizität zu verringern. Danach wird sie in dest. Wasser gewaschen und erst anschließend im Transferpuffer äquilibriert. Auch die Blotting-Papiere, die Schwämme und das Gel werden vor dem Zusammenbau des Blots in Transferpuffer äquilibriert. Die Kathode wurde mit dem Minuspol verbunden, die Anode mit dem Pluspol. Der Transfer erfolgte bei 600 mA für eine Stunde in einer Nassblot-Apparatur der Firma BioRad.

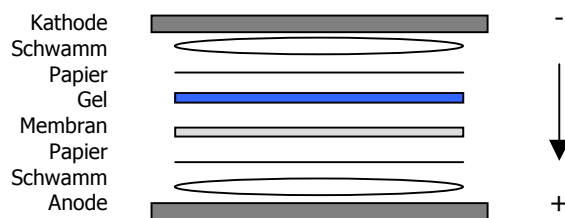


Abbildung 7: *Aufbau eines Westernblots*

Der Pfeil deutet die Laufrichtung der Proteine im elektrischen Feld an.

3.4.3.2 DotBlot-Verfahren

Eine andere Methode, mit der man Proteine mit wenig Zeitaufwand auf eine Membran bringen kann, ohne sie davor in einem SDS-Gel aufzutrennen, ist der DotBlot. Hierfür wurde ein Gerät der Firma Invitrogen verwendet, das mit Hilfe von Vakuum innerhalb weniger Sekunden Proteine in Lösung auf Membranen saugt.

3.4.3.3 Reversible Ponceau S-Färbung transferierter Proteine

Zum Nachweis des erfolgten Proteintransfers wurde die Membran nach dem Transfer einer reversiblen Ponceau-S-Färbung unterzogen, während das Gel mit einer irreversiblen Coomassie-Blaufärbung angefärbt wurde.

3.4.3.4 Detektion transferierter Proteine mit spezifischen Antikörpern

Die nicht mit Protein abgesättigten Bindestellen der Membran wurden nach dem Transfer für 30 Minuten mit 0,5% BSA in TBST-Puffer blockiert und die Membran mit dem ersten Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten in TBST-Puffer erfolgte die Detektion des gebundenen Primärantikörpers durch Zugabe eines Sekundärantikörpers für eine weitere Stunde. Die verwendeten Antikörperverdünnungen wurden in einem Volumen von 2 ml angesetzt und diese in eine Folie mit der Membran gegeben. Auch hier wurde überschüssige, ungebundene Antikörperlösung durch mehrere Waschschriffe entfernt.

An den Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, das nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und Luminol eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert, die detektiert werden kann. Genauer entsteht ein instabiles Zwischenprodukt, das bei Zerfall Licht abgibt, welches detektiert werden kann (Chemolumineszenz). Als Detektionsreagenz wurde der femto-Kit der Fa. Pierce verwendet, in dem Wasserstoffperoxid und Luminol enthalten waren (Prinzip der Detektion siehe Abbildung 8). Die beiden Lösungen wurden zu gleichen Teilen zusammengegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Mischung auf die Membran gegeben wurde. Nach einer Inkubation von einer Minute erfolgte die Exposition im Detektionsgerät.

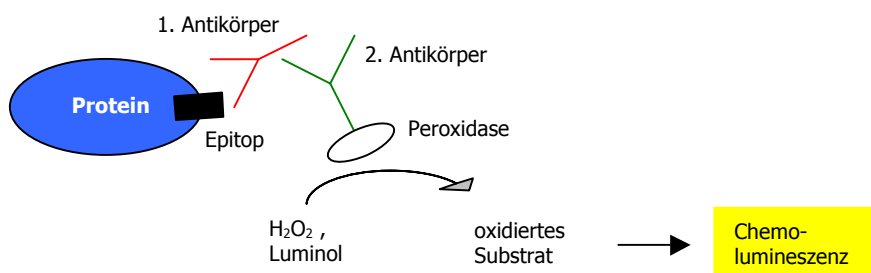


Abbildung 8: Ablauf der Chemolumineszenz-Reaktion

Das Epitop (schwarz) wird vom 1. Antikörper (rot) erkannt. Dieser wird seinerseits vom 2. Antikörper (grün) erkannt und gebunden. Durch die an den 2. Antikörper gekoppelte Peroxidase erfolgt die Umsetzung des zugegebenen Substrates, was die Chemolumineszenzreaktion bewirkt.

3.4.4 Herstellung von Zellhomogenaten

Zur Herstellung von Zellhomogenaten wurden kultivierte Keratinozyten von den Zellkulturschalen abgelöst und 10 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in einer geeigneten Menge eines Puffers resuspendiert, der sich für die nachfolgenden Untersuchungen anbot. Anschließend wurden die Zellen durch 3 Zyklen Einfrieren in Stickstoff und Auftauen bei 37°C (Wasserbad) aufgeschlossen.

3.4.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Überständen von Keratinozyten-Homogenaten wurde mit Hilfe eines käuflichen Kits von der Fa. Pierce nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Bestimmung des Proteingehaltes basiert auf einer modifizierten Methode nach Lowry [Lowry et al., 1951], die die kolorimetrische Bestimmung von Proteinen in alkalischer Lösung erlaubt. Durch eine Biuret-Reaktion entsteht im ersten Schritt des Testes Cu^{1+} , welches durch die im BCA-Reagenz A enthaltene Bicinchonin-Säure kolorimetrisch detektiert werden kann. Durch Chelatbildung zweier BCA Moleküle mit einem Kupferion entsteht ein violette Reaktionsprodukt, das bei 562 nm detektiert werden kann. Die Absorption nimmt linear mit steigender Proteinkonzentration zu. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde der ebenfalls im Kit enthaltene BSA-Standard verwendet. Er wurde im selben Puffer, in dem auch die Proben verdünnt wurden, nach Angaben des Herstellers verdünnt (20 µg/ml bis 2 mg/ml).

Homogenate wurden zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile vor der Messung 10 Minuten bei 1500 Rpm zentrifugiert und die daraus resultierenden Überstände für die Messung im selben Puffer 1:10 verdünnt. Je 25 µl Standardverdünnung, Blank (Verdünnungspuffer) und Probenverdünnung wurden in Doppelwerten auf eine 96-Lochplatte aufgetragen und 200 µl der BCA-Arbeitslösung zugegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und 30 Sekunden leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Platte mit einer Alufolie bedeckt für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurde die Platte erneut leicht geschüttelt und im ELISA-Reader bei 562 nm die Absorption gemessen. Anhand der Eichkurve, die aus

den BSA-Standardverdünnungen erstellt wurde, konnte der Proteingehalt für jede Probe ermittelt werden.

3.5 Aktivitätstest mit Protease-Substraten

Um die Funktionalität der in den Netherton-Patienten vorhandenen mutierten LEKTI-Proteine und der durch die Transfektion mit rAAV2-LEKTI neu gebildeten LEKTI-Proteine in Keratinozyten zu testen, wurde ein Test auf die Funktion von SCTE (stratum corneum trypsin-like enzyme) bzw. SCCE (stratum corneum chymotrypsin-like enzyme) durchgeführt. In der Literatur war der Test auf die SCTE-Funktion in ähnlicher Form mit Stratum corneum Proben von Netherton-Patienten [Komatsu et al., 2002] bzw. von Ichthyosis vulgaris Patienten [Suzuki et al., 1996] durchgeführt worden. Netherton-Patienten zeigten dabei eine höhere hydrolytische Aktivität (schwerer Phänotyp 5x höher, milder Phänotyp 2x höher) als gesunde Probanden [Komatsu et al., 2002].

Der AMC-Aktivitätstest mit dem Trypsinsubstrat wurde wie bei Komatsu beschrieben durchgeführt, mit der Abwandlung, dass anstelle von Stratum corneum Proben Keratinozyten-Homogenate eingesetzt wurden und diese vor der Ernte in Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Zu diesen Homogenaten wurde ein Amino-methyl-coumarin-gekoppeltes Substrat zugegeben und die Abspaltung des fluoreszierenden 7-Amino-Methyl-Coumarin AMC durch im Homogenat befindliche Proteasen bei 37°C im FluorstarOptima Fluoreszenzspektrophotometer (BMG Labtech) bei einer Excitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm über die Zeit verfolgt. Von den Homogenaten wurden jeweils Duplikate gemessen. Über eine Standardkurve, die durch Messung definierter Mengen von reinem AMC erhalten wurde (Triplikate), wurde die entstandene AMC-Menge in den Reaktionsansätzen bestimmt. Letztlich folgte eine Umrechnung der Ansätze auf 1 mg Protein und die Bestimmung der Aktivität im linearen Abschnitt der Reaktionskurven als nmol AMC/(mg Protein x min).

Um auf die Aktivität von SCTE zu testen, wurde das Trypsinsubstrat Boc-Phe-Ser-Arg-AMC verwendet, für die Aktivität von SCCE, das Chymotrypsinsubstrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC.

Tabelle 12: Verwendete Proteasesubstrate und Puffer

Protease	Puffer	Substrat	Substrat/mg Protein
SCTE	70 mM Tris-HCl, pH8 0,048% Triton X-100	Boc-Phe-Ser-Arg-AMC	100 nmol
SCCE	100 mM Tris-HCl, pH8 50 mM CaCl ₂ 0,048% Triton X-100	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	400 nmol

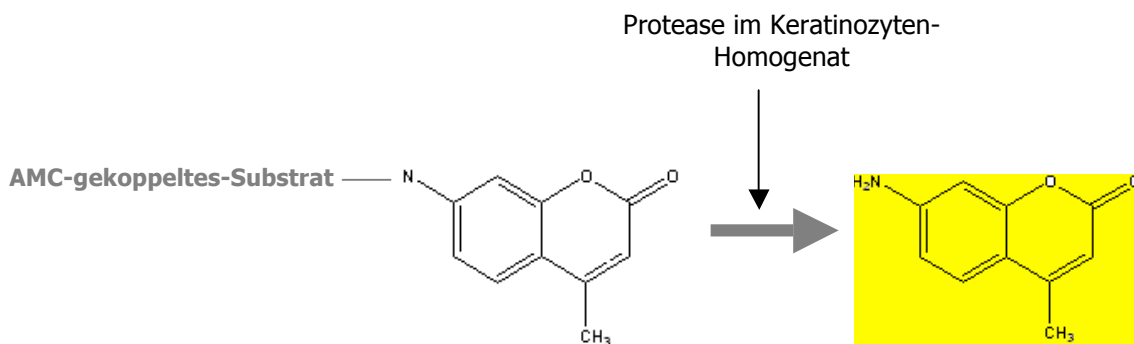


Abbildung 9: Prinzip des AMC-Aktivitätstests. Keratinozyten-Homogenate werden mit einem AMC-gekoppeltem Substrat kultiviert. Die in dem Homogenat enthaltene Protease, deren Spezifität der des Substrates entspricht, spaltet AMC ab. Abgespaltenes AMC fluoresziert und kann im Fluoreszenzspektrophotometer bei einer Excitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm detektiert werden. Die Reaktion wird bei 37°C verfolgt.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Herstellung von Kryostatschnitten

Die Gewebestücke bzw. die Hautäquivalente wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Einbetten in Tissue Tek O.C.T. Medium bei -25 °C in

einem Kryostat-Mikroton in 4-6 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden anschließend auf *Poly-L-Lysin*-beschichtete Objektträger gezogen, danach für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.6.2 Nachweis von Proteinen in Kryostatschnitten

Um spezifische Keratinozytenproteine in Kryostatschnitten nachzuweisen, wurden diese zunächst für 10 Minuten in Aceton fixiert. Danach folgte eine Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen durch eine Inkubation in 2%BSA/PBS für 20 Minuten sowie eine Permeabilisierung durch Inkubation in 0,05% Triton X-100 in 2%BSA/PBS für weitere 20 Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation in der 1. Antikörperverdünnung, die in 0,05% Triton X-100/2%BSA/PBS angesetzt wurde für 60 Minuten bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation in der 2. Antikörperverdünnung, die in PBS angesetzt wurde. Da es sich hier um Fluorophor-markierte Antikörper handelte, erfolgte die Inkubation im Dunkeln für weitere 60 Minuten. Nach dreimaligem Waschschrift wurde ein Eindeckmedium (PBS:Glycerin-Gemisch) auf die Deckgläser gegeben und diese vorsichtig auf die Objektträger mit den Schnitten gelegt. Bis zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger anschließend dunkel und bei -20°C gelagert.

3.7 Cytochemische Methoden

3.7.1 Nachweis von Proteinen in Keratinozyten durch Cytochemie

Die Färbung der Keratinozytenproteine Dsg1, CDSN, LEKTI, Involukrin, SCTE und SCCE erfolgte auf Kammerobjektträgern. Die Kammern wurden zunächst mit 0,12 mg/ml Collagen-Typ I (Ratte) für 1 Stunde bei Raumtemperatur beschichtet und danach 1x mit PBS gespült. 5×10^3 - 1×10^4 Keratinozyten wurden pro Kammer zugegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend unter den gewünschten Kulturbedingungen kultiviert. Für die eigentliche Färbung wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen für 15 Minuten mit 2% PFA/PBS/5%FCS fixiert. Danach erfolgte ein

Permeabilisierungsschritt mit 0,05% Triton/PBS/5%FCS für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Verdünnung des 1.Antikörpers erfolgte ebenfalls in 0,05% Triton/PBS/5%FCS und die Inkubation der Zellen für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, der 2.Antikörper in PBS verdünnt zugegeben und die Zellen für eine weitere Stunde dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten 2maligen Waschschrift wurden 50 µl deionisiertes Wasser in die Löcher bzw. Kammern gegeben und es erfolgte die Mikroskopie am Mikroskop Axiovert 25. Die Auswertung erfolgte mit dem zugehörigen Programm AxioVision Rel. 4.5 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Göttingen).

3.7.2 Nachweis viraler AAV-2 Partikel

Die erfolgreiche Transfektion von gesunden bzw. Netherton Syndrom Keratinozyten wurde durch Färbung der Zellen mit dem B1-Antikörper (Progen) detektiert. Die Zellen wurden hierzu in 96-Lochplatten ausgesät und 24 Stunden nach der Transfektion mit Aceton:Methanol (1:1) fixiert. Nach Abnahme des Aceton:Methanol-Gemisches wurden die Platten für 15 Minuten an der Luft getrocknet. Erst dann erfolgte die Zugabe des B1-Antikörpers und eine einstündige Temperatur bei Raumtemperatur. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe eines Cy3-markierten Sekundärantikörpers für 1 weitere Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach einem dreimaligen Waschschrift erfolgte die Mikroskopie am Axiovert 25.

3.8. Herstellung von rAAV-2 Vektoren (rAAV-2 Verpackung)

Die Herstellung von rAAV-2 Partikeln erfolgte nach einer Methode aus dem Labor von Professor Samulski [Xiao et al., 1998]. Die Virusverpackung erfolgte adenovirusfrei.

Durch eine 3-Fach-Calciumphosphat-Transfektion von äquimolaren Verhältnissen des Vektors pTR-UF/C-LEKTI bzw. pTR-UF/C-GFP, des Helferplasmids pRC- der die AAV-Gene rep und cap enthält- sowie des Helferplasmids pXX6- der nötige adenovirale Gensequenzen enthält- konnten in 293-Zellen Vektorpartikel hergestellt

werden. Nur die Tatsache, dass die 293-Zellen selbst mit dem Adenovirusgen E1 transformiert waren, ermöglicht die Verpackung der rAAV-2 Vektorpartikel. Nach der Virusverpackung in den 293-Zellen wurden die fertigen Viruspartikel geerntet und mittels Iodixonal-Zentrifugation aufgereinigt [Zolotukhin et al., 1999].

3.8.1 Trippeltransduktion in 293-Zellen

293-Zellen wurden in 15cm-TPP-Kulturschalen der Firma Peske kultiviert und bei 70-80 %-iger Konfluenz jeden zweiten Tag gesplittet, um eine optimale Proliferation der Zellen zu erreichen. Eine gleichmäßige Verteilung der 293-Zellen in einer optimalen Proliferationsphase war für eine erfolgreiche Virusverpackung absolut notwendig. Zwei bis drei Tage vor der eigentlichen Verpackung wurden 293-Zellen auf eine ausreichende Anzahl neuer 15cm-Kulturschalen ausgesät.

Am ersten Tag der Verpackung wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen in 15 frische 15cm-Platten ausgesät. Am zweiten Tag erfolgte 24 h nach der Aussaat zunächst ein Mediumwechsel und nach einer Regenerationsphase von drei Stunden erfolgte die 3-Fach-Calciumphosphat-Transfektion. Insgesamt wurden 112,5 µg von pTR-UF/C-LEKTI bzw. pTR-UF/C-GFP, 112,5 µg von pRC und 337,5 µg von pXX6 eingesetzt. Es wurden maximal fünf 15cm-Platten auf einmal transfiziert, da 293-Zellen semiadhärent sind und daher leicht zur Ablösung tendieren.

Der Reaktionspuffer für 5 Platten bestand aus 1 ml 250 mM CaCl_2 und 1 ml HBS-Puffer. Die Plasmide – 112,5 µg pXX6, 37,5 µg pRC und 37,5 µg pXX6- wurden mit dem Puffer gemischt und für 2 min inkubiert, bevor der Transfektionsansatz vorsichtig und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben wurde. Die Platten wurden sternförmig geschwenkt und anschließend wieder in den Brutschrank gegeben.

Am dritten Tag erfolgte ungefähr 20-22 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel, diesmal aber mit 2% FCS in DMEM-Medium, damit die Zellen weniger schnell weiterwachsen konnten.

Am vierten Tag wurden die Zellen mit den fertigen Vektorpartikeln geerntet, indem die Zellen mit sterilen Schabern von den Platten gelöst wurden. Die geernteten Zellen wurden in Zentrifugationsröhrchen gesammelt, auf Eis gekühlt und anschließend bei 3.000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -70°C eingefroren oder auf Eis gestellt und weiterverarbeitet.

3.8.2 Aufreinigung von rAAV-2 Partikel über Ammoniumsulfatpräzipitation und Iodixonal-Zentrifugation

Das Zellpellet wurde in 7,5-10 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen wurde durch die „Freeze-Thaw- Methode“ erreicht, bei der die Zellen dreimal hintereinander für 10 Minuten in flüssigem Stickstoff gefroren wurden und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut wurden. Durch diesen Zellaufschluss wurden virale Vektorpartikel und auch zelluläre Bestandteile aus den Zellen ausgeschüttet. Die Lösung wurde mit 50 U/ml *Benzonase* in SS34-Zentrifugationsröhrchen überführt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt diente dazu Nucleinsäuren – RNA, DNA- zu entfernen. Es folgte eine Zentrifugation in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 3.700 g, 4 °C für 20 Minuten, wodurch die Zellbestandteile der 293-Zellen pelletiert wurden. Der Überstand, der den Virus enthielt, wurde in frischen SS34-Röhrchen gesammelt, mit 35 % Ammoniumsulfat gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 7.650 g für 20 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Viruspartikel wurden mit 55 % Ammoniumsulfat versetzt und nach 20 minütiger Inkubation auf Eis bei 4 °C und 17.000 g zentrifugiert. Der im Überstand befindliche Virus wurde vorsichtig abgekippt und in 7,5 ml PBS/MK-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Für die Herstellung des Iodixonal-Gradienten wurden spezielle Ultrazentrifugationsröhrchen der Firma Beckman verwendet. Bei der Schichtung des Gradienten wurde als erstes die Vektor-enthaltende PBS/MK-Lösung in das Röhrchen einpipettiert. Diese wurde mit 7 ml 15 % Iodixanol unterschichtet. Die folgenden Lösungen wurden nacheinander vorsichtig unterschichtet: 5 ml 25 % Iodixanol, 5 ml 40 % Iodixanol und 6 ml 60 % Iodixanol. Zuletzt wurde das Röhrchen mit PBS/MK so überschichtet, dass das Röhrchen komplett mit Flüssigkeit, ohne Blasen, gefüllt war. Das Röhrchen wurde verschweißt und für eine Stunde bei 70.000 rpm und 20 °C in einem Ti 70-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Ultrazentrifugenröhrchen vorsichtig in einen Ständer unter der Sterilbank eingespannt und vorsichtig mit einer Kanüle in das Röhrchen hineingestoßen und die 40 % Iodixanolphase, in der sich der Virus befand, vorsichtig abgenommen. Durch Einstechen einer zweiten Kanüle im oberen Bereich des Röhrchens konnte der Fluss der Lösung gut reguliert werden. Die isolierten Viruspartikel wurden auf Eis gekühlt, und vor dem Aliquotieren gut

resuspendiert und möglichst zügig in Eppendorfgefäße zu 100-200 µl pipettiert. Die fertigen Aliquots wurden bei -70 °C gelagert.

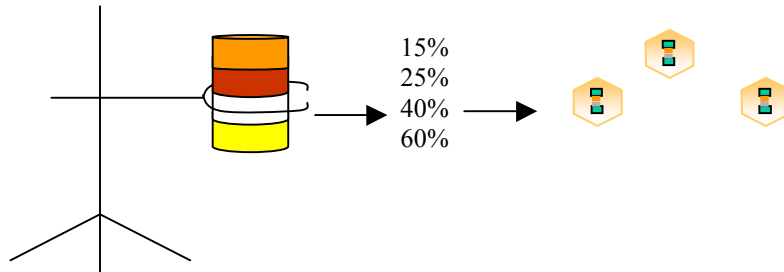


Abbildung 10: Ernte von rekombinanten AAV-2 Partikeln. Schematische Darstellung der Ernte von viralen Vektorpartikeln aus dem Iodixanol-Gradienten nach Ultrazentrifugation. Die viralen Partikel wurden aus der 40% Iodixanolphase gewonnen.

3.8.3 Bestimmung des rAAV-2 Partikeltiters mittels AAV-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung des rAAV-2 Partikeltiters der jeweiligen Viruspräparation wurde der AAV Titration ELISA der Firma Progen verwendet. Der Test basiert auf einem Sandwich-ELISA. Die im Kit enthaltenen 8-Loch-Mikrotiterstreifen sind mit einem Monoklonalen Antikörper vor-gecoatet, der spezifisch ein Konformationsepitop auf assemblierten AAV Capsiden bindet. Auf diese Platten wurden 100 µl Viruspräparation in 2-3 verschiedenen geeigneten Verdünnungen, einer im Kit enthaltenen Positivkontrolle (mit leeren AAV-Capsiden) pur und in sechs verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64, dient als Standard) sowie vom Probenpuffer (als Negativkontrolle) aufgetragen. Die Mikrotiterstreifen wurde zugedeckt 1 Stunde bei 37°C inkubiert, wodurch die Bindung der Partikel an den Antikörper ermöglicht wurde. Danach wurden die Streifen ausgeklopft und dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Die gebundenen AAV-Partikel wurden in zwei Schritten detektiert. In jedes Loch der Streifen wurden 100 µl eines Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen AAV gegeben und die Streifen zugedeckt eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ausklopfen und 3maligen Waschschrift, wurden 100 µl eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates (reagiert mit

Biotin) in jedes Loch des Streifens gegeben und die Streifen zugedeckt eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ausklopfen und 3maligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Peroxidase-Substrat und eine Inkubation für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung/Loch beendet und die Intensität der Farbreaktion innerhalb von 30 Minuten in einem Photometer bei 450 nm bestimmt. Über eine Standardkurve wurde die enthaltene Partikelmenge in der untersuchten Viruspräparation berechnet.

3.9 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Um bei der Anzucht von humanen Zellen Kontaminationen mit Bakterien, Hefen und anderen Pilzen zu vermeiden, wurden sämtliche Vorgänge an der Sterilbank mit Einmal-plastikmaterial durchgeführt bzw. mit autoklavierten Pipettenspitzen. Zur Sicherheit sprühte man auch Hände bzw. Handschuhe vorher mit 80 % Ethanol ein. Alle verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert.

3.9.1 Bestimmung der Zellzahl

10-50 µl der Zellsuspension wurden mit Trypanblau (0,5 % (w/v) in PBS) verdünnt und vorsichtig durchmischt. Nach kurzer Einwirkzeit haben tote Zellen den Farbstoff aufgenommen, der in lebende nicht eindringen kann. Von dieser Lösung wurden etwa 10 µl in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop die lebenden Zellen in den vier Großquadranten ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich aus dem gezählten Wert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10⁴ (Umrechnung auf ml), geteilt durch die Anzahl gezählter Großquadrate.

3.9.2 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Da es sich bei dem im Einfriermedium enthaltenen DMSO um ein Zellgift handelt, musste beim Einfrieren schnell vorgegangen werden. Dazu wurde das

Zellpellet in 1,8 ml gut vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und diese zunächst für 2-3 Tage bei -80°C zwischengelagert bevor sie in flüssigem Stickstoff dauerhaft eingefroren wurden.

3.9.3 Auftauen von Zellen

Auch beim Auftauen der Zellen sollte wegen der Toxizität des DMSO relativ schnell vorgegangen werden. Daher wurde vor dem Gang zum Stickstofftank sowohl ein Falconröhrchen mit 7 ml Medium für die Zellen sowie eine Styroporbox mit etwa 37°C -warmem Wasser vorbereitet. In die Styroporbox mit dem Wasser wurde unmittelbar nach dem Herausholen aus dem flüssigen Stickstoff das Kryoröhrchen mit den Zellen gelegt. Nachdem sich nur noch ein kleiner Eisklumpen in dem Kryoröhrchen befand wurde dieses, nach Sterilisierung mit EtOH, unter der Sterilwerkbank geöffnet und der Inhalt mit einer 5-ml-Pipette in das vorbereitete Mediumröhrchen überführt. Anschließend erfolgte sofort die Zentrifugation der Zellen und die Aufnahme in geeignetem Medium sowie die Aussaat in geeignete Kulturflaschen oder -platten.

3.9.4 Kultivierung von 293-Zellen

293-Zellen wurden in 15cm-TPP-Kulturschalen der Firma Peske mit DMEM/10%FCS kultiviert und bei 70-80 %-iger Konfluenz jeden zweiten Tag gesplittet, um eine optimale Proliferation der Zellen zu erreichen. Zum Passagieren dieser semi-adhären Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und zunächst einmal mit PBS gewaschen, um sämtliches FCS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch fünf Minuten Inkubation im Brutschrank mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung abgelöst. Nach Zugabe von 293-Kulturmedium konnte der Split in der gewünschten Weise erfolgen. Durch Aussaat von 2,5 ml der abgelösten Zellen mit 7,5 ml frischem Kulturmedium wurde ein 1:4 Split durchgeführt.

3.9.5 Kultivierung von 3T3-Zellen

3T3-Fibroblasten wurden in TC 75 Flaschen mit DMEM/10%FCS/1%Gln kultiviert. Zum Passagieren dieser adhärenen Zellen wurden der Zellkulturüberstand abgesaugt und zunächst einmal mit PBS gewaschen, um sämtliches FCS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten Inkubation im Brutschrank mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA abgelöst. Diese Zellen wurden alle 2-3 Tage zwischen 1:5 und 1:10 gesplittet.

3.9.5.1 Mitomycin C-Behandlung von 3T3-Zellen

3T3-Fibroblasten eignen sich besonders gut als Wachstumsunterlage für Keratinozyten. Die Kultivierung von Keratinozyten auf Feederzellen entspricht der klassischen Methode von Rheinwald und Green [Rheinwald und Green, 1975] mit der es 1975 erstmals möglich wurde, Keratinozyten seriell zu expandieren.

Als Feederzellen wurden NIH 3T3-Zellen eingesetzt, welche sich vor Versuchsbeginn in einer optimalen Proliferationsphase befanden. 24 h vor Beginn der Keratinozytenkultivierung wurden 80-90 % konfluent gewachsene Feederzellen durch Behandlung mit dem Spindelgift Mitomycin C (Sigma) in einen Wachstumsinhibierten Zustand gebracht. Hierzu wurde zunächst das Medium von den 3T3-Fibroblasten abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS mit Calcium und Magnesium gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für zwei Stunden im Brutschrank mit 15 ml 2% Mitomycin C-Lösung, die in Serum-freiem DMEM-Medium frisch angesetzt worden war. Nach dieser Zeit wurde die Lösung von den Zellen abgenommen und in einem Sonderabfall gesammelt. Die Zellen wurden einmal mit einem Isovolumen an FCS-haltigem DMEM gewaschen und diese Lösung dann ebenfalls in einem Sonderabfall gesammelt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS ohne Calcium und Magnesium wurden die Zellen wie gewohnt trypsiniert, zentrifugiert und gezählt. Die Mitomycin C-behandelten 3T3-Zellen wurden direkt im Anschluß in den vorgesehenen Kulturschalen in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² Kulturoberfläche im 3T3-Kulturmedium ausgesät.

3.9.6 Kultivierung von Keratinozyten

3.9.6.1 Keratinozytenisolierung aus Hautproben

Die Isolierung primärer humaner Keratinozyten aus Hautproben erfolgte nach der Methode von I. Leigh und F. Watt [Leigh, 1994] und erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Mit einer flachen Gewebeschere wurde von der Hautprobe das Fettgewebe entfernt. Zur Sterilisierung wurden die Hautprobe zunächst 5 Minuten in 20 ml Betaisodona:PBS (1:2, v/v) geschwenkt, dann zweimal je 5 Minuten in 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die im Falle von größeren Hautbiopsien diese in einer Schale mit PBS in 5x5 mm große Würfel geschnitten. Zur Trennung der epidermalen Schichten von der dermalen Schicht wurden die Hautstückchen über Nacht in einer Schale mit 10 ml Thermolysinpuffer, der 5 mg Protease Typ X enthielt, im Kühlschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die epidermalen Schichten durch Verwendung von zwei sterilen Dumont-Pinzetten von der Dermis abgezogen und zunächst mit der Stratum corneum-Seite nach oben in eine Schale mit PBS gelegt. Nach Abzug aller vorhandenen epidermalen Schichten wurden diese in eine Schale mit Trypsin/EDTA überführt und für 25 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 Rpm und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen für die Kultivierung auf 3T3-Fibroblasten in KGM-Medium bzw. für die Kultivierung ohne Feederzellen in KSFM-Medium resuspendiert.

3.9.6.2 Kultivierung von Keratinozyten auf 3T3-Fibroblasten

Einen Tag vor der geplanten Kokultivierung wurden 3T3-Fibroblasten Mitomycin C-behandelt (siehe Abschnitt 3.9.5.1) und in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 3T3-Kulturmedium ausgesät. Nach Absaugen des Mediums wurden Keratinozyten in KGM-Medium zugegeben. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Kultur bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 %, oder spätestens nach 12-14 Tagen passagiert. Nach 4-5 Tagen der Kultivierung waren bereits erste Keratinozytenklone deutlich erkennbar, am Ende der Kultivierungszeit war die Kulturschale in den meisten Fällen fast ausschließlich mit Keratinozyten bewachsen, während die 3T3-Fibroblasten immer spärlicher wurden.

3.9.6.3 Keratinozytenkultur ohne Feederzellen

Die Kultivierung von Keratinozyten ohne Feederzellen wurde 1983 durch die Entwicklung von Serum-freiem, speziell mit niedriger Calcium-Konzentration angepasstem Medium durch Boyce und Ham [Boyce und Ham, 1983] möglich. Das für die Kultivierung von Keratinozyten verwendete KSFM-Medium der Firma Invitrogen enthält nach Angaben des Herstellers eine Calcium-Konzentration kleiner 0,1 mM und wird nachfolgend auch als Proliferationsmedium bezeichnet. Die Keratinozyten wurden nach der Zentrifugation in KSFM aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellen wurden bei einer 70-80 %igen Konfluenz, spätestens aber nach 12-14 Tagen in einem 1:5 - 1:10-Split passagiert.

3.9.6.4 Passagieren von Keratinozyten

Grundsätzlich verhalten sich Keratinozyten beim Passagieren wie andere adhärente Zellen. Bei Keratinozyten, welche auf Feederzellen kultiviert wurden, mussten zunächst die verbliebenen Feederzellen durch 30 Sekunden Inkubation mit EDTA und Bespritzen mit PBS-Puffer entfernt werden. Bei Keratinozyten ohne Feederzellen, also in Serum-freiem-Medium, wurden die Zellen nach Deaktivierung von Trypsin/EDTA mit FCS-haltigem Medium zusätzlich zweimal in 10 ml PBS-Puffer gewaschen, um eventuell vorhandene Reste von FCS, Calcium und Trypsin/EDTA zu entfernen. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation der Zellen und nach völligem Entfernen des Überstandes die erneute Aussaat der Zellen mit oder ohne Feederzellen.

3.9.6.5 Transfektion von Keratinozyten

Die Transfektion von Keratinozyten mit rAAV2-Vektoren wurde bei einer Konfluenz von 70-80% durchgeführt. Davor wurden die Zellen für 1-2 Tage in EGF-freiem KSFM ohne Feederzellen kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37°C mit 100µM AG1478 in EGF-freiem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 10.000 Partikeln pro Zelle an rAAV2-Vektoren transfiziert. Nach 24h wurde die virale Lösung abgenommen, die Zellen gewaschen und in Vollmedium auf neue Schalen passagiert.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung der LEKTI-cDNA in pTRUF/C

Die verwendete LEKTI-cDNA lag im pTRE2hyg-LEKTI-Vektor als 3,2 kb großes *BamHI-NotI* Fragment und im pCDNA3.1-LEKTI-Vektor als *BamHI-KpnI*-Fragment vor. Diese rekombinante LEKTI-cDNA war über ein Baculovirus-Insektenzell-Expressionssystem hergestellt worden. Die Quelle der cDNA war RNA aus Biopsien von normaler humaner Mundschleimhaut [Mitsudo et al., 2003].

Die LEKTI-cDNA sollte im Folgenden in den Klonierungsvektor pTR-UF/C kloniert werden, um dadurch den für die Virusverpackung nötigen Vektor pTR-UF/C-LEKTI zu erhalten.

pTR-UF/C, eine Weiterentwicklung von psub201 als Transgen tragendes Verpackungsplasmid, enthält neben der Expressionskassette (C) aus dem Expressionsplasmid pCEP4 (multiple Klonierungsstelle, CMV-Promotor und SV40-Polyadenylierungssequenz), Sequenzen für die Vermehrung in *E.coli*-Bakterienzellen (Ampicillin-Resistenzgen, Replikationsursprung), und die für die spätere Verpackung der eingebrachten DNA nötigen *Inverted terminal repeats* (ITR) von AAV-2.

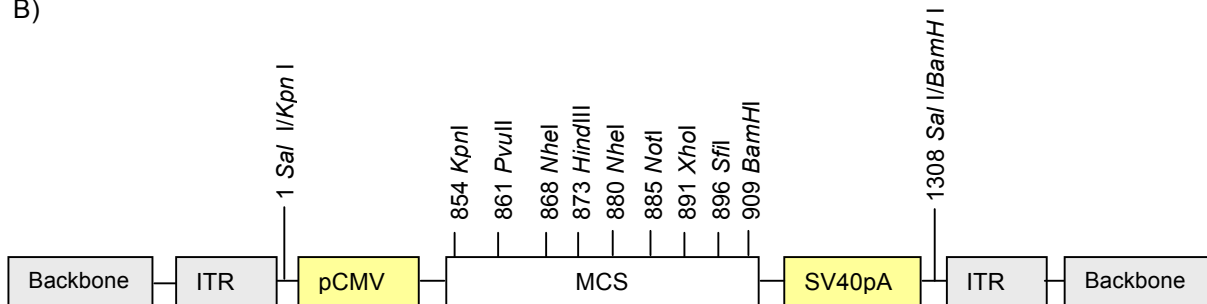
4.1.1 Darstellung der Klonierungsstrategie

Für die Klonierung von LEKTI in pTR-UF/C wurde pTRE2hyg-LEKTI ausgewählt, weil sich hier laut der mitgelieferten Sequenz 5 bp vor der *BamHI*-Schnittstelle eine für die Klonierung geeignete *KpnI*-Schnittstelle (an Position 8529) befindet. Die *BamHI*-Schnittstelle von pTR-UF/C eignet sich nicht für die Klonierung, weil sich sonst die LEKTI-cDNA in der falschen Orientierung wieder finden würde, da die *NotI*-Stelle vor der *BamHI*-Stelle liegt (siehe Abb. 11). Dies ist auch der Grund dafür, warum pCDNA3.1-LEKTI sich nicht für die Klonierung eignet. Abbildung 11 zeigt die Position von Restriktionsenzym-schnittstellen im für die Klonierung ausgewählten Ausgangsvektor pTRE2hyg-LEKTI (a), im Zielvektor pTR-UF/C (b) sowie im Produkt pTR-UF/C-LEKTI (c).

A)



B)



C)

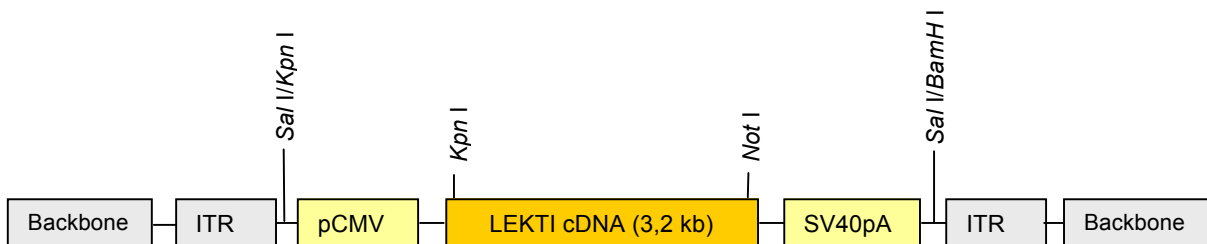


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. Klonierung der 3,2 kb großen LEKTI-cDNA aus pTRE2hyg-LEKTI (A) in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) von pTR-UF/C (B) mit dem Ziel den Vektor pTR-UF/C-LEKTI (C) zu bilden. Im Vektor pTRE2hyg-LEKTI (A) liegt die LEKTI-cDNA als 3247 bp großes *BamH* I-*Not* I-Fragment vor, 5 bp vor der *BamH* I-Schnittstelle befindet sich eine für die Klonierung günstige *Kpn* I-Schnittstelle. ITR *inverted terminal repeats* von AAV-2. pCMV Cytomegalovirus Promotor. SV40pA Polyadenylierungsstelle von SV40. backbone bezeichnet den jeweiligen Vektorrest.

4.1.2 Schnittstellenkontrolle in pTRE2hyg-LEKTI:

Nach Vermehrung des pTRE2hyg-Plasmides in *E.coli* –Zellen und Mini-Plasmid-isolierung aus 5 Klonen, wurden diese parallel mit *BamHI/NotI*, *KpnI/NotI* sowie *EcoRI* zur ersten Charakterisierung verdaut. Abbildung 12 zeigt den Verdau von drei der fünf

Klone und die Tabelle 13 zeigt die erwarteten und erhaltenen Fragmente dieses Verdaus.

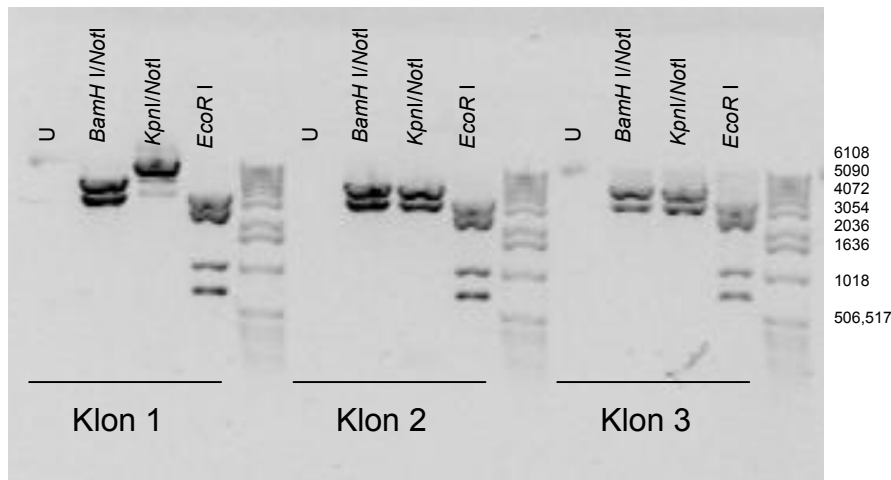


Abbildung 12: Restriktionsverdau von pTRE2hyg-LEKTI. Das ungeschnittene Plasmid ist als U dargestellt. Am Rand der Abbildung sind einige Banden der verwendeten 1kb-Leiter von Invitrogen dargestellt.

Tabelle 13: Erwartete Fragmentgrößen bei Restriktionsverdau von pTRE2hyg-LEKTI

pTRE2hyg-LEKTI	erwartet (bp)	erhalten
ungeschnitten	8534	Klon 1-3
<i>BamHI/NotI</i>	3246, 5288	Klon 1-3
<i>KpnI/NotI</i>	158, 3252, 5124	Klone 2,3 (nicht in Klon1)
<i>EcoRI</i>	674, 706,1028, 2561, 3565	Klon 1-3

Laut dem dargestellten Restriktionsverdau sind die Schnittstellen in allen pTRE2hyg-LEKTI-Klonen außer Klon 1, in welchem der *Kpn I/Not I*-Verdau nicht erfolgreich war, aktiv und die LEKTI-cDNA in Ordnung.

Da die Restriktionsanalysen die Identität von pTRE2hyg-LEKTI bestätigt haben, wurde eine Maxi-Plasmidisolierung von Klon 3 sowie von pTR-UF/C durchgeführt. Beide Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *Kpn I* und *Not I* gespalten, dadurch wurde der Vektor pTR-UF/C geöffnet und das Fragment mit der LEKTI-cDNA, an das nun die 5 bp mit der *Kpn I*-Schnittstelle angefügt waren, aus dem Vektor pTREhyg2-

LEKTI herausgeschnitten. Beide Fragmente wurden auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten, mit dem Qiaquick-Gelextraktionskit aufgereinigt und standen somit für eine Ligation zur Verfügung. Die DNA-Konzentration beider Fragmente wurde mit Hilfe des Eppendorf-Biophotometers bestimmt.

4.1.3 Ligation der LEKTI-cDNA in pTRUF/C zur Bildung von pTR-UF/C-LEKTI

Das *KpnI/NotI* –LEKTI-Fragment aus pTRE2hyg-LEKTI-Klon 3 sollte in die geöffnete *KpnI/NotI*-Stelle von pTR-UF/C mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase über klebrige Enden Ligation ligiert werden. Durch die somit gerichtete Ligation war keine Dephosphorylierung nötig. Vektor und Fragment wurden in verschiedenen Verhältnissen (1:1, 1:2, 1:3 und 1:6) zusammenpipettiert und mit der T4-DNA-Ligase und dem T4-DNA-Ligasepuffer über Nacht bei 14°C inkubiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne Fragment mitgeführt als Selbstligationskontrolle des Vektors (N).

4.1.4 Kontrolle der erfolgreichen Ligation der LEKTI-cDNA in pTR-UF/C

4.1.4.1 PCR-Analyse von pTR-UF/C-LEKTI

Die Ligationsansätze wurden als nächstes in *E.coli*-Zellen vermehrt. Von dieser Transformation wurden 30 Klone und 2 Klone der Selbstligationskontrolle abgenommen und in 100 µl Wasser aufgenommen. $\frac{1}{10}$ davon wurde in eine Screening-PCR mit den Primern LEKTI-1s und LEKTI-268as eingesetzt. Das in der PCR-Analyse zu erwartende Fragment sollte eine Größe von 268 bp haben (siehe Abbildung 13). In 14 der 30 untersuchten Klone wurde das gewünschte PCR-Produkt detektiert, wobei das Signal in Klon 3, 8, 11, 16, 27 und 28 stark und in den Klonen 1, 6, 7, 9, 18, 20, 23 und 24 schwächer war. Die nicht in die PCR-Reaktion eingesetzten $\frac{9}{10}$ der Bakteriensuspension aus diesen 14 Klonen wurden in LB-Medium mit 80 µg/ml Ampicillin aufgenommen und bei 37 °C geschüttelt.

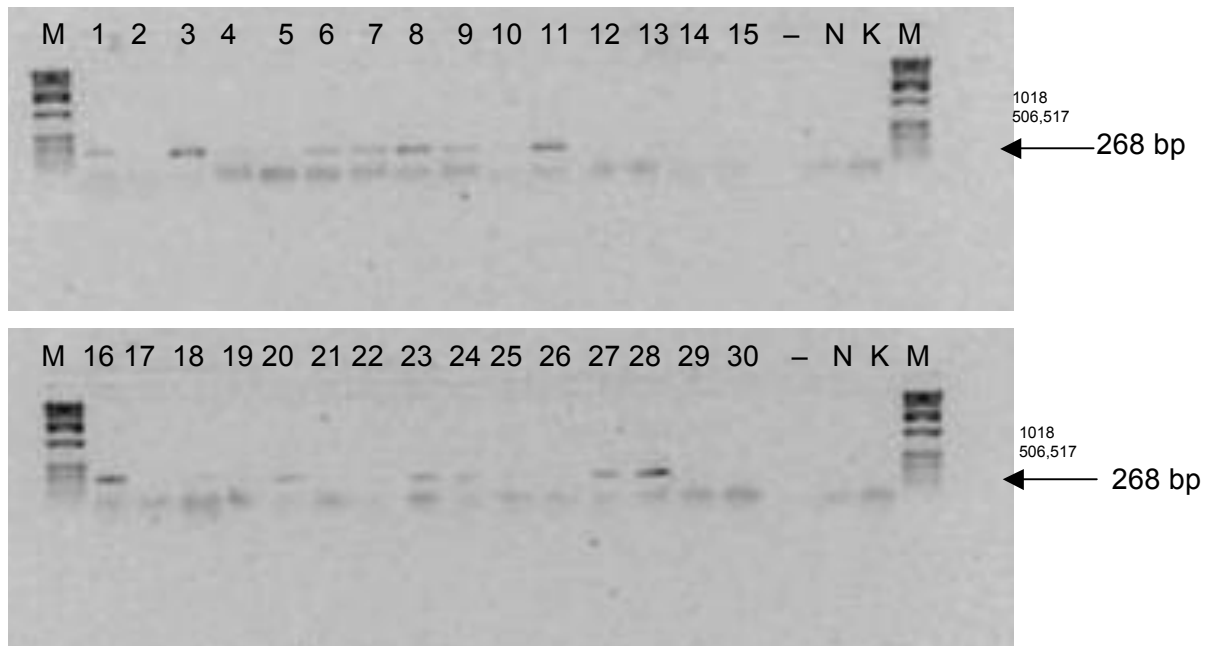


Abbildung 13: Screening-PCR in 30 Klonen mit LEKTI-*Nhe* I-1s und LEKTI-*Sac* I-2 as. N Selbstligationskontrolle; K PCR-Reaktion mit Wasser anstelle der Bakteriensuspension; M Marker (1kb-Leiter).

4.1.4.2 Restriktionsanalyse in pTR-UF/C-LEKTI

Nach einer Mini-Plasmidisolierung wurden die Klone 3, 8, 11, 16, 27, 28 und 1 über einen Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen *KpnI/NotI*, *BamHI* und *EcoRI* weiter charakterisiert. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde hier der Vektor pTR-UF/C-GFP (GFP) mitgeführt.

In Abbildung 14 sieht man zum einen, dass die gewählten Enzyme für pTR-UF/C-LEKTI spezifisch sind, da sich das gewünschte Fragmentmuster nicht im Verdau von pTR-UF/C-GFP wieder findet. Die Klone 3 und 8 zeigen ein falsches *EcoRI*-Muster. Die Klone 11, 16, 27, 28 und 1 zeigen mit allen Restriktionsenzymen das gewünschte Muster.

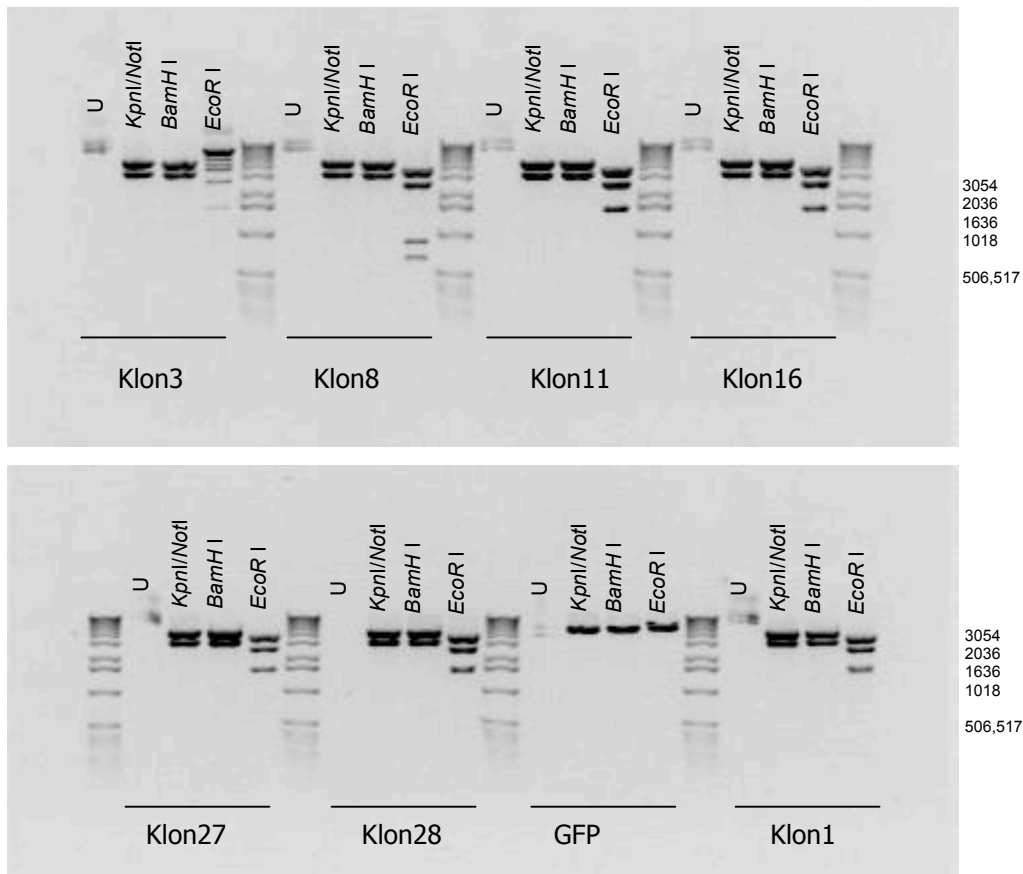


Abbildung 14: Restriktionsverdau von pTR-UF/C-LEKTI mit *KpnI/NotI*, *BamHI* und *EcoRI*. Die erwarteten Fragmentgrößen sind in der Tabelle angegeben. U ist das ungeschnittene Plasmid. Als Negativkontrolle wurde pTR-UF/C-GFP mitverdaut (GFP).

Tabelle 14: Erwartete Fragmentgrößen in pTRUF/C-LEKTI

pTRUF/C-LEKTI	erwartet (bp)	erhalten
ungeschnitten	7956	+
<i>KpnI/NotI</i>	3271, 4685	+
<i>BamHI</i>	3252, 4704	+
<i>EcoRI</i>	1522, 2561, 3873	falsches Muster in Klon 3 und 8

Um den Klon zu finden, der für die spätere Verpackung zu rAAV-2-LEKTI verwendet werden sollte, wurde zur weiteren Charakterisierung ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bgl* II, *Pst* I, *EcoR* I, *BamH* I, *Kpn* I /*Not* I, *Xba* I und *Xho* I in den Klonen 11, 16, 28 und 1 durchgeführt (siehe Abb. 15). Diese Enzyme sollten dazu dienen, die Identität der LEKTI-cDNA weiter zu bestätigen, da sich einige der Schnittstellen innerhalb der cDNA und einige im Vektor befanden.

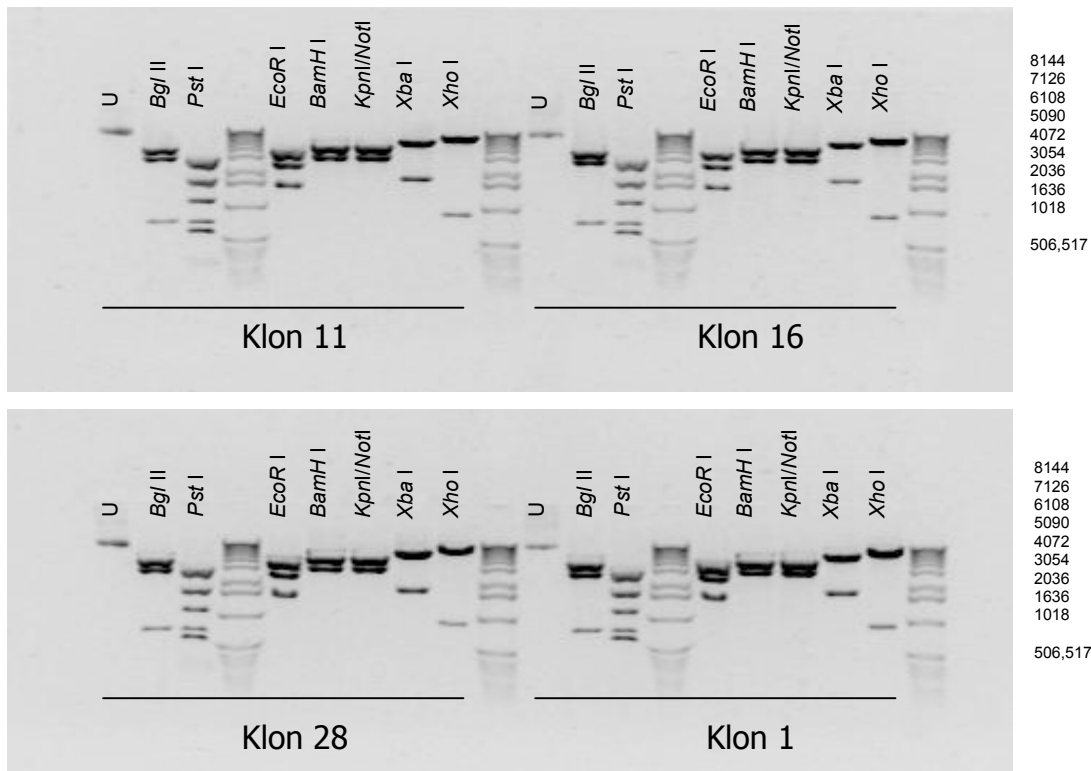


Abbildung 15: Restriktionsverdau von Klon 11, 16, 28 und 1 zur weiteren Charakterisierung von pTR-UF/C-LEKTI. Erwartete Fragmentgrößen stehen in nachfolgender Tabelle.

Tabelle 15: Erwartete Fragmentgrößen

pTRUF/C-LEKTI	erwartet (bp)	erhalten
ungeschnitten	7956	+
<i>BglII</i>	104, 753, 3168, 3924	+
<i>PstI</i>	237, 584, 597, 867, 1141, 1699, 2830	+
<i>EcoRI</i>	1522, 2561, 3873	+
<i>BamHI</i>	3271, 4685	+
<i>KpnI/NotI</i>	3252, 4704	+
<i>XbaI</i>	1791, 6165	+
<i>XhoI</i>	878, 7078	+

Alle verdauten Klone (Klon 11, 16, 28 und 1) zeigten die gewünschten Fragmentmuster. Für die weiteren Versuche wurde pTR-UF/C-LEKTI-Klon 11 verwendet.

4.2. Verpackung von pTR-UF/C-LEKTI-Klon11 zu rAAV-2-LEKTI

Die Herstellung infektiöser rAAV-2-LEKTI-Vektorpartikel bzw. der rAAV-2-GFP-Kontroll-Vektorpartikel erfolgte nach der Methode von Xiao und Samulski (Xiao, 1998, siehe Methodenteil). Diese Herstellung wird als Verpackung bezeichnet, weil in diesem Schritt die jeweilige cDNA (LEKTI oder GFP) in einzelsträngigem Zustand in die Virushülle von AAV-2 verpackt wird. Für diese Verpackung sind die beiden Helferplasmide pRC und pXX6 sowie im Falle der GFP Verpackung, der Vektor pTR-UF/C-GFP anstelle von pTR-UF/C-LEKTI nötig.

4.2.1 Identitätsnachweis von pRC und pXX6 und pTR-UF/C-GFP

Um eine erfolgreiche Verpackung zu gewährleisten musste zunächst die Identität der beiden Helferplasmide pRC und pXX6 sowie des Kontrollvektors pTR-UF/C-GFP durch Verdau mit bestimmten Restriktionsenzymen bestätigt werden. Hierzu wurde nach Transformation der Plasmid-DNA in *E.coli* und anschließender Plasmidisolierung ein Restriktionsverdau von pRC mit *Pst* I, von pXX6 mit *Hind* III und von pTR-UF/C-GFP mit *Pst* I durchgeführt. Abbildung 16 und Tabelle 16 zeigen die Ergebnisse dieser Restriktionsverdau sowie die erwarteten Fragmente. Die Fragmentgrößen stimmen mit der Erwartung überein.

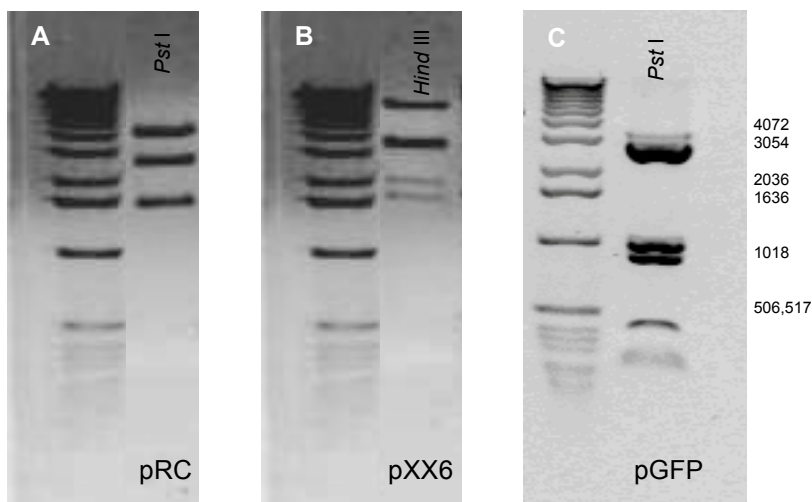


Abbildung 16: Identitätsnachweis von pRC (A), pXX6 (B) und pTR-UF/C-GFP (C, pGFP). Restriktionsverdau von pRC und pGFP erfolgte mit *Pst* I, von pXX6 mit *Hind* III. Die erwarteten Fragmentgrößen sind in der Tabelle angegeben. Am Rand sind einige Markergrößen angegeben.

Tabelle 16: Erwartete Fragmente bei Verdau von pRC, pXX6 und pTR-UF/C-GFP

	erwartet	erhalten
<i>Pst I</i> -Verdau von pRC	236, 1463, 2296, 3583	+
<i>Hind III</i> -Verdau von pXX6	1458,1722,2937,3012, 4618,5183	+
<i>Pst I</i> -Verdau von pTR-UF/C-GFP	238, 405, 979, 1018, 2830	+

Somit wurde in allen für die Verpackung erforderlichen Plasmiden die Identität bestätigt. Von pXX6 werden pro Verpackung 337,5 µg, von pRC bzw. pTR-UF/C-LEKTI bzw. pTR-UF/C-GFP jeweils 112,5 µg Vektormenge benötigt. Um diese Vektormengen zu erhalten wurden nach Transformation der Plasmide in *E.coli*-Zellen Endofree-Maxi-Plasmidisolierungen durchgeführt (siehe Methoden).

Die so erhaltenen Plasmide wurden über Dreifach-Calcium-Phosphattransfektion in exponentiell wachsende 293 Verpackungszellen gebracht. Abbildung 17 zeigt eine Lichtmikroskopische Aufnahme einer solchen Transfektion mit rAAV-2 GFP Vektoren 48 h später.

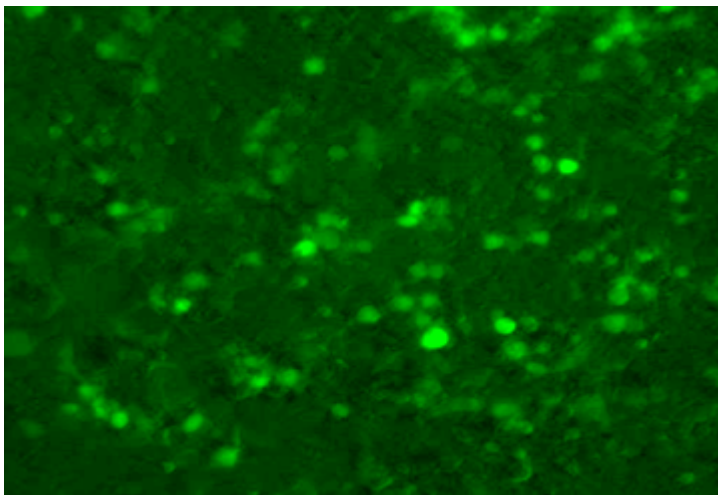


Abbildung 17: Dreifach-Calcium-Phosphattransfektion in 293-Zellen am Beispiel von pTR-UF/C-GFP. Vergrößerung 100x.

Nach 48 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe eines Lysispuffers und drei Einfrier-Auftau-Zyklen in flüssigem Stickstoff und 37°C-Wasserbad lysiert. Diese Prozedur

führte zu einem Aufplatzen der Zellen und somit der Freisetzung der viralen Partikel sowie zellulärer Bestandteile. Um die Proteine von Nucleinsäuren zu reinigen, wurde eine Benzonase Behandlung durchgeführt. Die weitere Reinigung der Proteine erfolgte durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Um die viralen Vektorpartikel rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP von den zellulären Proteinen abzutrennen, wurden die Proteine in einen Iodixanol-Gradienten unter-schichtet. Der Gradient bestand aus einer 15%, 25%, 40% und 60% Iodixanolphase. Nach einstündiger Ultrazentrifugation befanden sich die viralen Vektorpartikel in der 40% Iodixanolphase und waren somit von den zellulären Proteinen getrennt. Mit Hilfe einer Kanüle wurde diese 40% Phase aus dem Gradienten herausgeholt und die viralen Vektorpartikel anschließend bei -70°C gelagert.

4.2.2 Bestimmung der viralen Partikelmenge

Um in späteren Transfektionsexperimenten gleiche Partikelmengen einsetzen zu können, wurde die Partikelmenge pro ml über einen AAV-ELISA (Fa. Progen) ermittelt. Wie Tabelle 17 zeigt, konnten Partikelmengen von 10^{11} - 10^{12} /ml erreicht werden.

Tabelle 17: Bestimmung der viralen Partikelmengen durch AAV-ELISA

	Verpackung	Verdünnung	Partikel/ml	Mittelwert Partikel/ml
1.	rAAV-2-GFP	1:500	$1,41 \cdot 10^{12}$	$1,58 \cdot 10^{12}$
		1:1000	$1,26 \cdot 10^{12}$	
		1:2500	$2,07 \cdot 10^{12}$	
2.	rAAV-2-GFP	1:100	$3,17 \cdot 10^{11}$	$4,51 \cdot 10^{11}$
		1:500	$4,00 \cdot 10^{11}$	
		1:1000	$5,02 \cdot 10^{11}$	
3.	rAAV-2-GFP	1:100	$1,21 \cdot 10^{11}$	$1,37 \cdot 10^{11}$
		1:500	$1,29 \cdot 10^{11}$	
		1:1000	$1,60 \cdot 10^{11}$	
4.	rAAV-2-LEKTI	1:500	$7,18 \cdot 10^{11}$	$6,95 \cdot 10^{11}$
		1:1000	$6,71 \cdot 10^{11}$	
5.	rAAV-2-LEKTI	1:500	$6,50 \cdot 10^{11}$	$7,63 \cdot 10^{11}$
		1:1000	$8,77 \cdot 10^{11}$	

4.2.3 Cytochemischer Nachweis der Transfektion

Als nächstes musste geklärt werden, ob die hergestellten rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2-GFP Partikel in der Lage waren, Keratinozyten zu infizieren. Hierzu wurde nach der Transfektion von gesunden humanen Keratinozyten eine cytochemische Färbung mit einem Antikörper gegen die Hüllproteine (Klon B1) von AAV-2 durchgeführt.

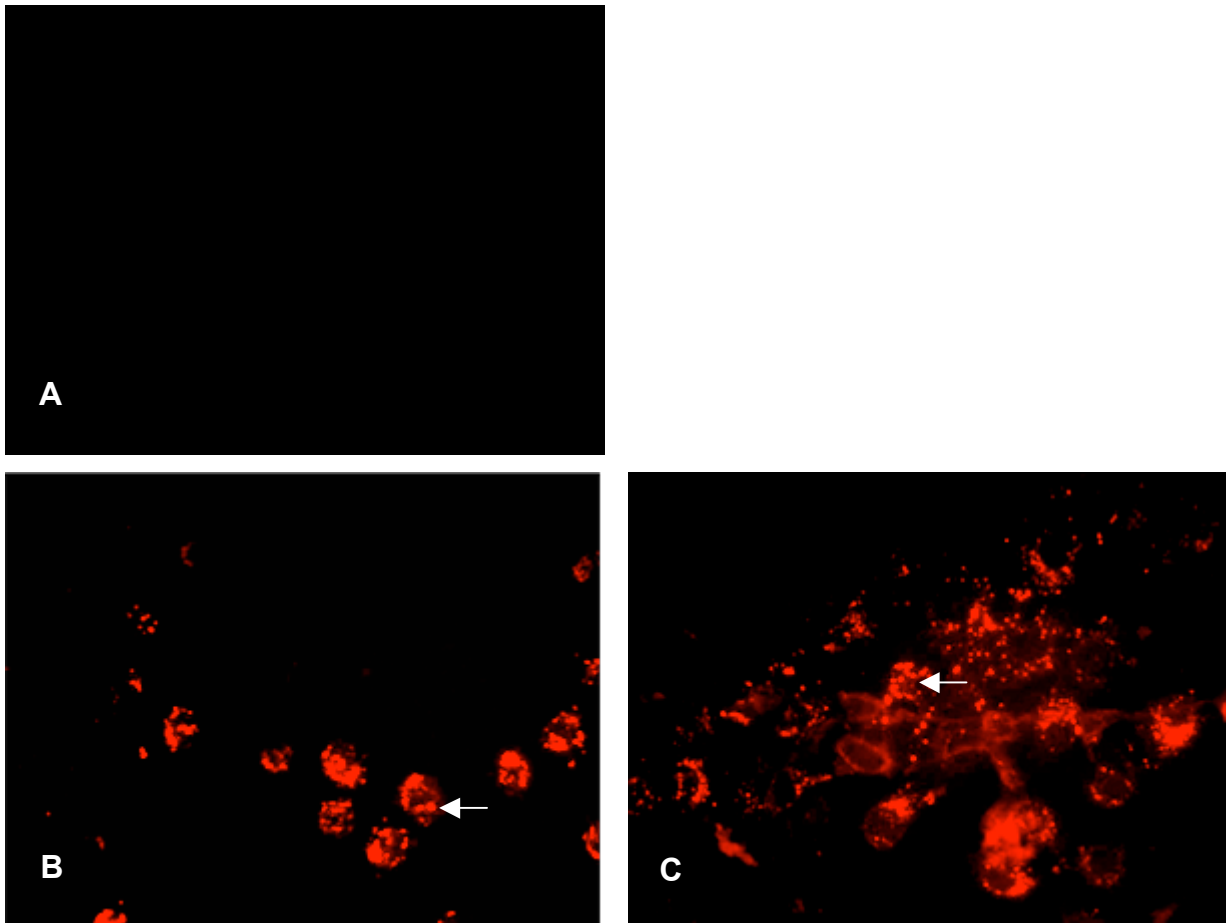


Abbildung 18: Immuncytochemischer Nachweis der rAAV-2-Transfektion von gesunden humanen Keratinozyten. A, untransfizierte Keratinozyten; B, rAAV-2-GFP-transfizierte Keratinozyten; C, rAAV-2-LEKTI-transfizierte Keratinozyten. Färbung erfolgte 24 h nach der Transfektion. Vergrößerung 320 x.

Wie die Abbildung 18 zeigt, ist dieser Antikörper sehr spezifisch. Er bindet nicht in untransfizierten Zellen (A), wohl aber in rAAV-2-GFP (B) bzw. rAAV-2-LEKTI (C)-transfizierten Zellen. Die Färbung erfolgte 24 h nach der Transfektion in 96-Lochplatten, zur Detektion der Bindung des Primärantikörpers wurde ein Cy3-markierter Sekundärantikörper verwendet. Nach 24 h befanden sich die meisten Viruspartikel im

Cytoplasma der Zellen, einige Partikel schienen sich perinuklear anzusammeln (Pfeil) und sehr wenige Partikel waren bereits in den Zellkern vorgedrungen.

4.3. Charakterisierung der verwendeten Netherton Syndrom (NS)-Patienten

Ziel dieser Doktorarbeit war die Rekonstitution des Gendefekts in NS Keratinozyten durch viralen Gentransfer einer LEKTI-codierenden cDNA mittels rAAV-2-LEKTI Vektoren. Hierfür wurden Gewebeproben von insgesamt sechs verschiedenen NS-Patienten genommen und daraus Keratinozyten isoliert.

4.3.1. Klinische Beobachtungen

Alle Netherton Syndrom Patienten wiesen klinisch einen schweren Phänotyp auf, bei Patient 2-4 lagen Bambushaare vor. Von einigen NS-Patienten wurden uns detaillierte klinische Informationen durch die behandelnden Ärzte zur Verfügung gestellt.

4.3.1.1 NS-Patient 1

Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 12 Jahre alt. Die Biopsie wurde freundlicherweise von der Sanitas Klinik, Inzell, zur Verfügung gestellt.

4.3.1.2 NS-Patient 2

Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 1,5 Jahre alt. Entsprechend der klinischen Angaben von Dr. Andres (Biedersteiner Hautklinik, München) zeigte diese Patientin einen schweren Phänotyp mit ausgeprägter Erythrodermie, deutlicher Abschilferung sowie erhöhtem Wasserverlust. Der Haarbefund war normal. Der Entwicklungsrückstand gegenüber gesunden Kindern betrug etwa 6 Monate. Die Krankheit nahm zweimal lebensbedrohliche Ausmaße an. Sie hat zwei gesunde Geschwister.

4.3.1.3 NS-Patient 3

Dieser Patient war zum Zeitpunkt der Biopsienahme 15 Jahre alt. Laut Angabe von Frau Dr. Preil (Tomesa-Fachklinik, Bad Salzschlirf) handelte es sich um den erythrodermen, schwerer Typ mit extrem empfindlicher, fein-bis mittellamellös schuppender Haut. Der Patient litt beidseitig an einem Ektropium und uhrglasartigen Fingernägeln. Er zeigte eine temporale Hypotrichose und Entwicklungsverzögerung. Bambushaare waren bei diesem Patienten bereits im Alter von knapp zwei Jahren nachgewiesen worden. Auch eine durchgeführte Elektronenmikroskopie war mit dem Netherton Syndrom vereinbar.

4.3.1.4 NS-Patient 4

Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 10 Jahre alt. Laut Angaben von Dr. Oji (Universitätshautklinik Münster) litt diese Patientin seit Geburt an einer schweren entzündlichen Hauterkrankung. Die Erythrodermie trat etwa 3 Wochen nach der Geburt beginnend am Kopf auf. Im 1. Lebensjahr wurde eine Wachstumsverzögerung beobachtet. Im Kindesalter hatte sie mehrmals Mandelentzündungen, zudem Entwicklung einer Hypotrichose und häufige Infektionen der Augenlider. Insgesamt zeigte sie einen stark wechselhaften Hautbefund und litt unter einem massiven Juckreiz. Die Patientin zeigte deutlich erhöhte IgE-Werte, sowohl absolute als auch spezifische auf Hausstaub und Nahrungsmittel wie Erdnüsse, Äpfel, Hühnereiweiß und Orange. Im Differentialblutbild war eine starke Eosinophilie erkennbar. Das gesamte Integument war erythroderm, schuppig und fokal lichenifiziert. Histologische Untersuchungen der Kopfhaut zeigten ein sehr breites Stratum corneum, fokal mit Parakeratose. Unter den parakeratotischen Arealen fehlte das Stratum granulosum. Die Epidermis war psoriasiform hyperplastisch. Im Papillarkörper um Gefäße zeigte sich ein diskretes lymphocytäres Infiltrat. Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden von Frau Dr. Haußer (Universitätshautklinik Heidelberg) durchgeführt. Nach ihren Angaben war bereits mit der Lupe an den Haarschäften eine Trichorrhexis invaginata erkennbar. Die Morphologie der Haut war typisch für ein Netherton Syndrom mit Akanthose, Papillomatose, regressiver/unterdrückter Verhornung (kaum Keratohyalin, wenige abschilfernde Hornlamellen mit zahlreichen variablen Einschlüssen, CE vorhanden, Keratinosomen mit „geblähten“ Lamellen) und deutlicher Entzündung.

4.3.1.5 NS-Patient 5

Dieser Patient war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 12 Jahre alt.

Laut Angaben von Dr. Oji (Universitätshautklinik Münster) hatte dieser Patient unmittelbar bei Geburt eine deutlich gerötete Haut mit erhöhter Abschilferung. In der Folge zeigte sich eine zunehmende Erythrodermie mit Beginn im Gesicht. Als Neugeborener sei eine leichte Anpassungsstörung vorhanden gewesen, in der Folge eine Gedeihstörung. Der Patient zeigte eine Erythrodermie mit Lichenifikationen und klagte über deutlichen Pruritus. Palma zeigte sich eine deutliche Exfoliation, Füße dagegen waren unauffällig. Es bestand eine leichte Nageldystrophie. Weitere Beobachtungen waren stark reduzierte Augenbrauen und roter Dermographismus. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Frau Dr. Haußer (Universitätshautklinik Heidelberg) zeigten typische Veränderungen eines Netherton Syndroms mit stark akanthotischer Epidermis, die nur von drei bis vier locker aufeinander sitzenden Hornlamellen bedeckt war. Die Verhornung zeigte sich unvollständig bzw. unterdrückt. Das Stratum granulosum zeigte deutliche Mengen an Keratohyalin. Keratinosomen waren ausgesprochen zahlreich und sahen unauffällig aus, ihre apikale Ausschleusung schien jedoch erheblich beeinträchtigt zu sein.

4.3.1.6 NS-Patient 6

Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 1 Jahr alt und zeigte laut Angaben von Dr. Oji den schweren NS Phänotyp.

4.3.1.7 Klinisches Bild des Netherton Syndroms

Abbildung 19 zeigt das klinische Bild der Hauterscheinungen am Beispiel von NS-Patient 2 sowie der Haarschaftanomalien, am Beispiel eines Bambushaares (Elektronenmikroskopische Aufnahme von Fr. Dr. Weichenmeier) von NS-Patient 4. Solche Bambushaare lagen nach Auskunft der Ärzte auch bei NS-Patient 2 und 3 vor.

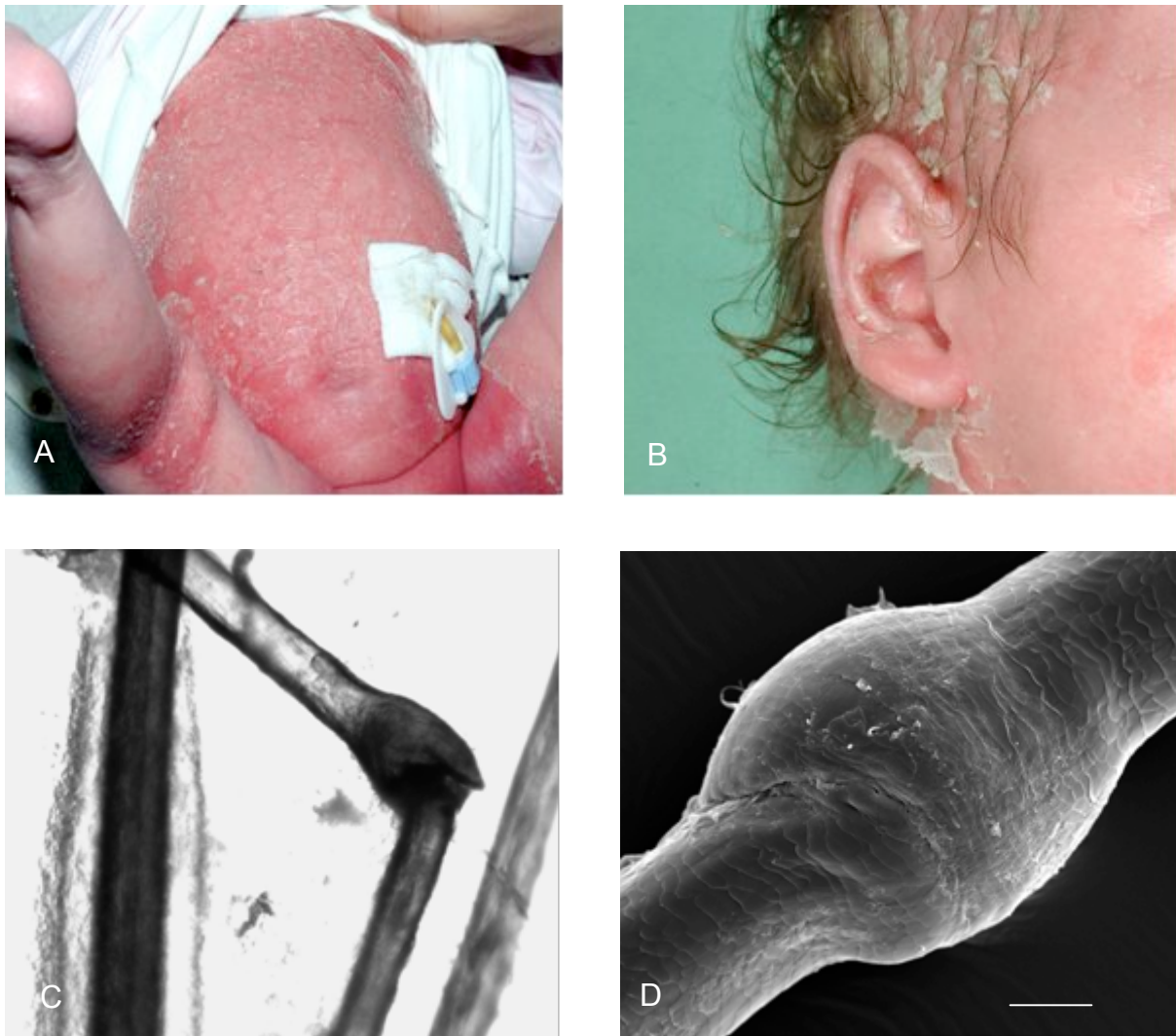


Abbildung 19: Klinisches Bild in NS-Patient 2 (A,B) und NS-Patient 4 (C,D). Ausgeprägte Erythrodermie (A, Bauch und Kniekehle) und Desquamation (A) und (B, Gesicht). In C und D Bambushaar (C, Lichtmikroskopische Aufnahme bzw. D, Elektronenmikroskopische Aufnahme: Bar = 30 µm)

4.3.2 Genetische Analyse der NS-Patienten

Die Sequenzierung der Patienten-DNA auf die vorliegenden LEKTI-Mutationen wurde freundlicherweise von der AG Traupe, Universitätsklinik Münster, durchgeführt. Für die Sequenzierung von NS-Patient 2-5 wurde den Patienten Blut abgenommen und daraus DNA isoliert. Für die Sequenzierung von NS-Patient 1 wurde DNA aus Keratinozytenkulturen isoliert.

Tabelle 18: Daten zu den Netherton Syndrom Patienten (siehe auch Anhang)

Nr.	Geschlecht Alter	Mutation	LEKTI- Domäne	Folge	Phänotyp
1	weiblich 12 Jahre	? 316delGA (Exon 5)	? 2	? PTC+6	schwer
2	weiblich 1,5 Jahre	354delTTGT (Exon 5) 1432-13G→A (Intron 15)	2 7	PTC+24 PTC+14	schwer
3	männlich 15 Jahre	1432-13G→A (Intron 15) 1432-13G→A (Intron 15)	7 7	PTC+14 PTC+14	schwer
4	weiblich 10 Jahre	? R268C (Exon 10)	? 4	? Missense	schwer
5	männlich 12 Jahre	? 1432-13G→A (Intron 15)	? 7	? PTC+14	schwer
6	weiblich 1 Jahr	Y300X (Exon 11) 1913 delT (Exon 21)	5 10	PTC PTC	schwer

Das Alter zeigt an, wie alt die Patienten zum Zeitpunkt der Gewebenahme waren.

?: fehlende Information. PTC : *premature termination codon*, also vorzeitiger Kettenabbruch.

In Tabelle 18 sind einige Eckdaten der NS-Patienten angegeben, die in dieser Doktorarbeit untersucht wurden. Bei NS-Patient 1 konnte nur eine heterozygote Mutation im Exon 5 des Spink5-Gens detektiert werden. Diese zwei Nukleotide umfassende Deletion führt zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einem vorzeitigen Kettenabbruch (PTC) bei der Translation des LEKTI-Proteins sechs Nukleotide nach der Mutationsstelle. Die 2. Mutation liegt bei diesem Patienten möglicherweise in einem nicht von den verwendeten Primern abgedeckten Bereich (5'UTR etc.). Bei NS-Patient 2 konnten beide Mutationen entdeckt werden. Eine vier Nukleotide umfassende Mutation liegt ebenfalls in Exon 5 und führt zu einem Kettenabbruch 24 Nukleotide nach der Mutationsstelle. Die zweite Mutation, die ebenfalls bei Patient 5 im heterozygoten und bei Patient 3 im homozygoten Zustand vorliegt, liegt in Intron 15, hier entsteht eine neue Spleißakzeptorstelle (AG). Dadurch ändert sich die Sequenz der mRNA ab dieser Stelle und es kommt nach 14 Nukleotiden zum Kettenabbruch. NS-Patient 6 zeigt eine Mutation in Exon 11 und die 2. Mutation in Exon 21. Beide Mutationen führen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und vor diesem zu einer veränderten Aminosäuresequenz.

4.3.3 Kultivierung von NS-Keratinocyten auf 3T3-Feederzellen

Die Keratinocyten von sechs NS-Patienten wurden aus vier bis sechs mm Hautproben isoliert. Nach der Isolierung der Keratinocyten wurden diese zunächst zwei Passagen auf 3T3-Feederzellen kultiviert, die durch Behandlung mit Mitomycin-C zwar in ihrer Eigen-Proliferation gehemmt waren, aber noch Wachstumsstoffe an die Keratinocyten abgeben konnten. Als Medium für die Cokultivierung diente hier KGM-Medium.

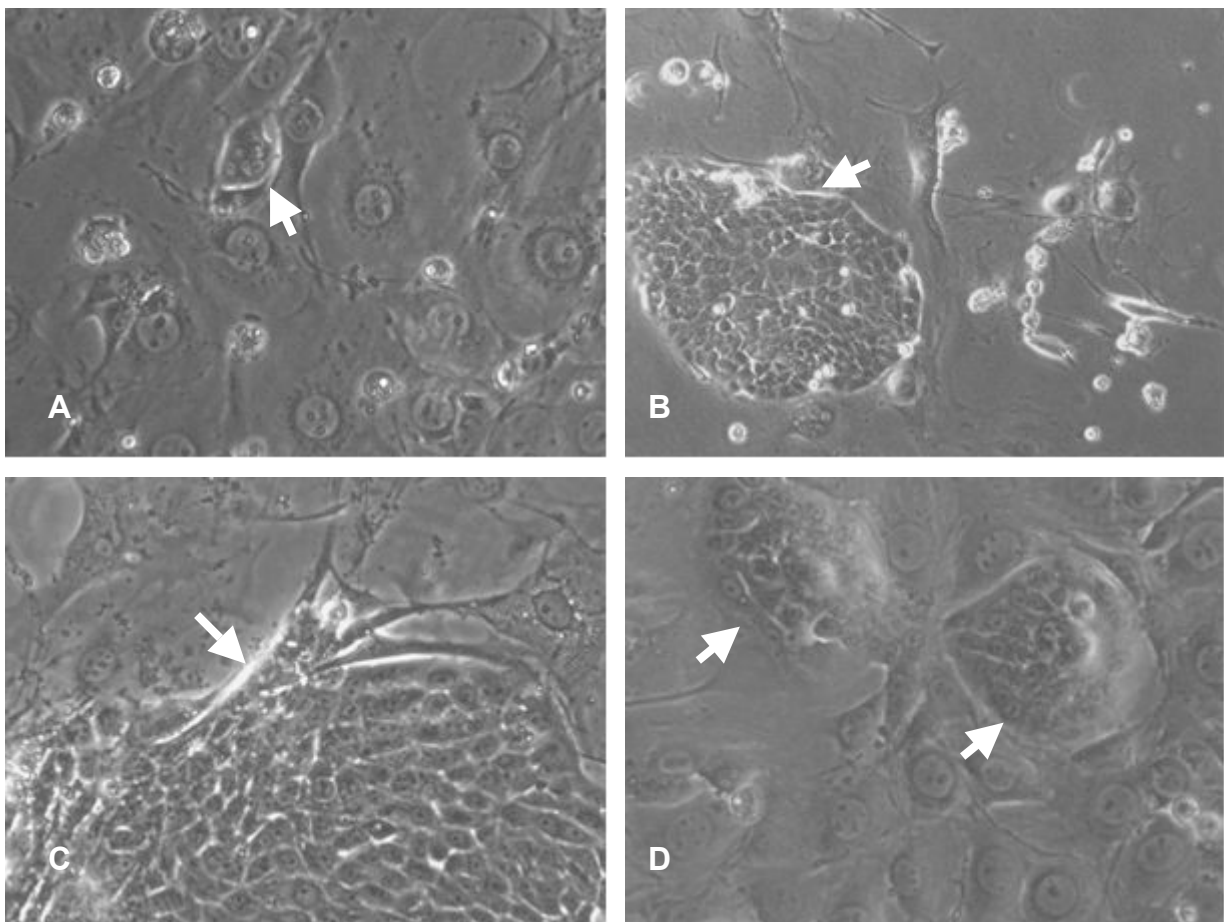


Abbildung 20: Kultivierung von NS-Keratinocyten auf 3T3-Fibroblasten. Pfeile deuten auf Keratinocytenklone innerhalb der Fibroblasten. A, Tag 2 der Cokultivierung, 200x; B, Tag 7 der Cokultivierung, 100 x; C, Tag 9 der Cokultivierung, 200 x; D, Tag 3 der Cokultivierung der nächsten Passage, 200 x. Pfeile markieren Keratinocytenklone.

Nach drei bis fünf Tagen der Cokultivierung frisch isolierter Keratinocyten auf 3T3-Fibroblasten wurden erste kleinere Keratinocytenklone erkennbar (siehe Abb. 20A). Diese Klone wuchsen weiter und füllten nach etwa 10 bis 12 Tagen die Kulturschale vollständig aus. Ein $1/_{10}$ Split dieser Klone ergab in der nächsten Passage ein sehr viel

schnelleres Wachstum der Keratinozyten, welches am Beispiel von NS-Patient 2 in einer Zellzahl von $2,2 \times 10^7$ Zellen nach 10 Tagen resultierte. Die restlichen $\frac{9}{10}$ wurden zur Langzeitkultivierung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Von den sechs zur Verfügung stehenden Patienten-Keratinozyten, zeigten nur die Keratinozyten von NS-Patient 5 bereits in der ersten Passage kein Wachstum mehr und wurden daher für die weitere Analyse nicht verwendet.

4.3.4 Transfektion von NS-Keratinozyten mit rAAV-2-Vektoren

Zur Überprüfung, ob auch NS-Zellen für AAV-2 aufnahmefähig sind, wurden Keratinozyten - nach zwei Passagen der Cokultivierung - ohne Feederzellen ausgesät und einen Tag später mit rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP transfiziert. 24 h später erfolgte die Färbung mit B1-Antikörper, um transfizierte Zellen sichtbar zu machen.

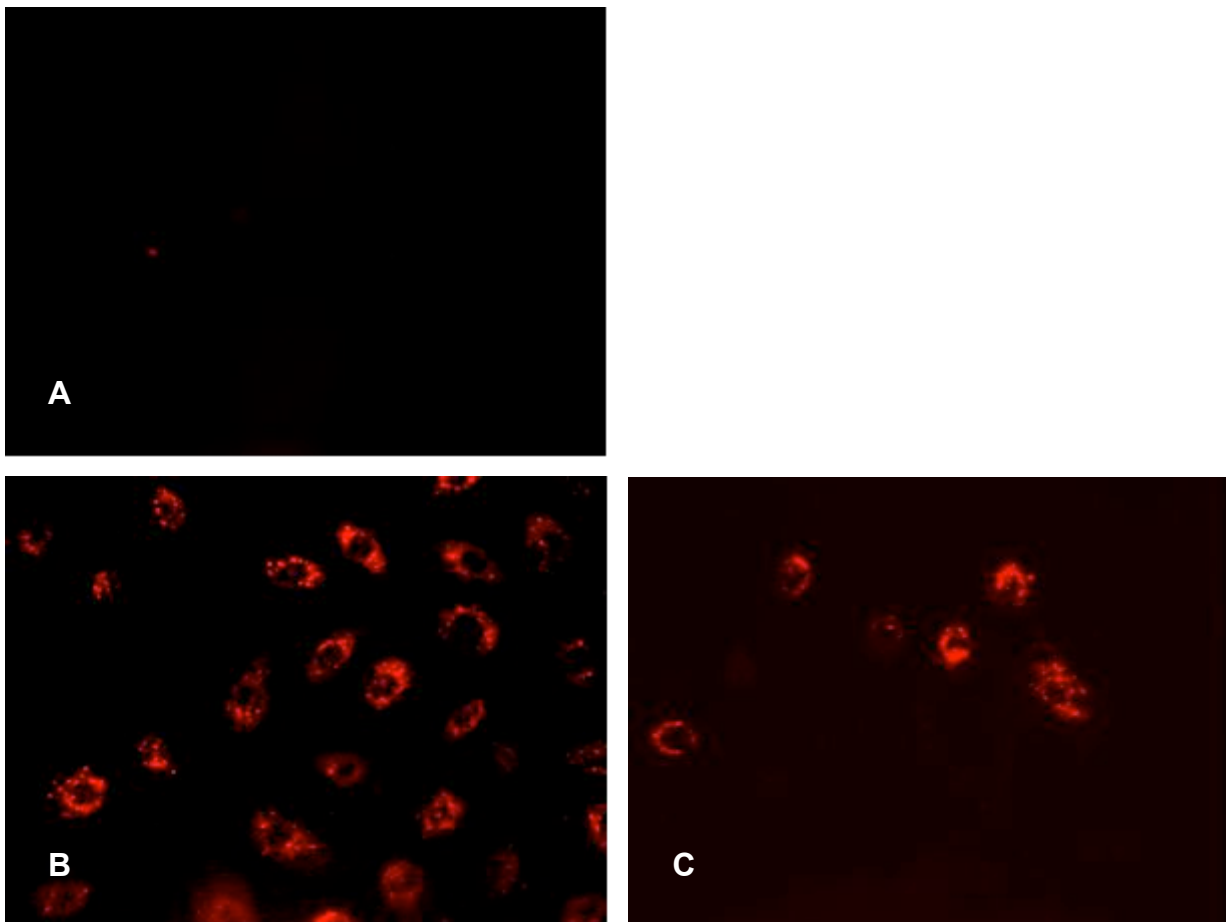


Abbildung 21: Immuncytochemischer Nachweis der rAAV-2-Transfektion von Netherton-Keratinozyten. A, untransfizierte Keratinozyten; B, rAAV-2-GFP-transfizierte Keratinozyten; C, rAAV-2-LEKTI-transfizierte Keratinozyten. Färbung erfolgte 24 h nach der Transfektion. Vergrößerung 320 x. Vom Antikörper B1 werden nur Viruspartikel gebunden.

Wie die Abbildung 21 zeigt, lassen sich Keratinozyten von Netherton-Patienten ebenso wie gesunde Keratinozyten mit rAAV-2-Vektoren transfizieren. Auch hier färbt der B1-Antikörper lediglich transfizierte Zellen an (B, C), nicht aber parallel in Medium kultivierte Netherton-Keratinozyten (A).

4.4. Induktion der Differenzierung in Keratinozyten

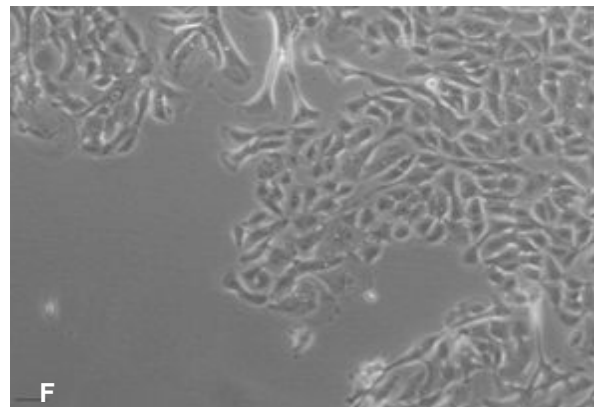
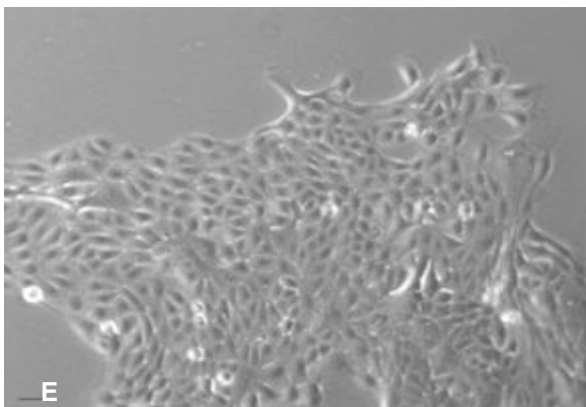
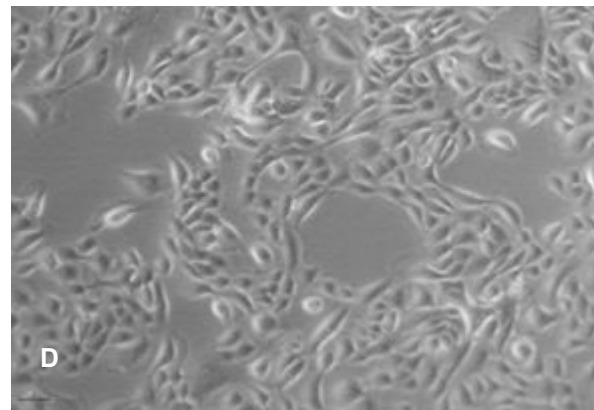
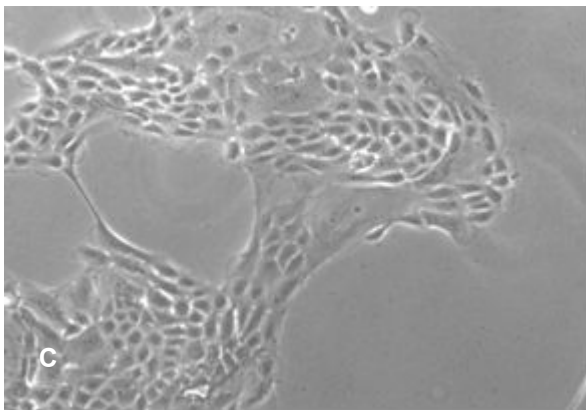
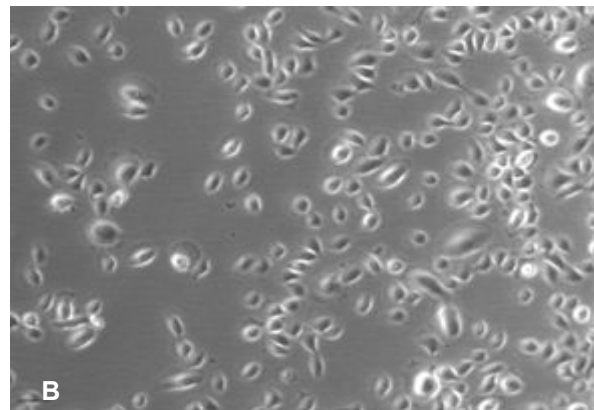
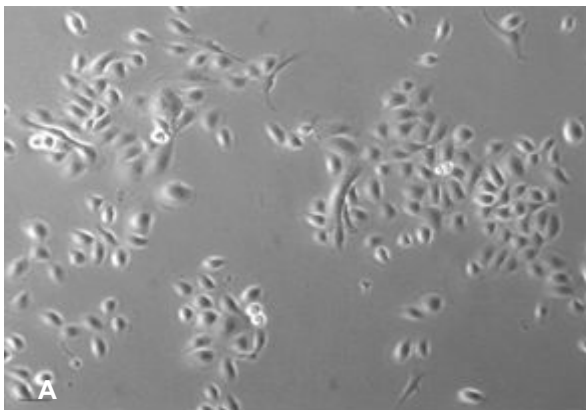
Der Differenzierungsprozess in Keratinozyten wird durch den Gehalt von extrazellulärem Calcium reguliert. *In vivo* Untersuchungen zeigten in humaner Epidermis einen intra- und extrazellulären Calciumgradient, mit geringen Konzentrationen in der Basalschicht und hohen Konzentrationen in der granulären Schicht [Menon et al., 1985].

Bei der Kultivierung von Keratinozyten wird daher zur Förderung der Proliferation und Unterdrückung einer Differenzierung ein Medium mit niedrigen Calciumkonzentrationen verwendet (KSFM mit weniger als 0,01 mM) [Quelle: Invitrogen]. Umgekehrt kann durch Zugabe von Calcium-Ionen eine Differenzierung von Keratinozyten gezielt gefördert werden. Da LEKTI und seine Zielproteasen im Differenzierungsprozeß von Bedeutung sind, war es im Folgenden notwendig, eine solche Differenzierung zu fördern. Für die Untersuchung von Proteinen, die Keratinozyten normalerweise nur im Differenzierungsstadium exprimieren, wie das LEKTI-Protein bzw. die von ihm inhibierten Proteasen, ist dieses Medium in der vorliegenden Form daher nicht geeignet. LEKTI-Proteine können *in vitro* 24 Stunden nach Zugabe von 1,2 mM CaCl_2 ins Kultivierungsmedium nachgewiesen werden [Bitoun et al., 2003]. Um Keratinozyten in der Kulturschale zu differenzieren, wurden daher 1,2 mM CaCl_2 ins Keratinozytenmedium KSFM gegeben, was einer Endkonzentration von etwa 1,21 mM Calcium entspricht.

4.4.1 Lichtmikroskopischer Nachweis der Differenzierung in Keratinozyten

Die Abbildung 22 zeigt die Calcium-abhängige Veränderung der Keratinozyten eines gesunden Spenders (A,C,E,G) im Vergleich zu Keratinozyten von NS-Patient 6 (B,D,F,H). Morphologisch kann hier kein Unterschied zwischen gesunden und kranken

Keratinocyten beobachtet werden. Im Proliferationsmedium zeigen sowohl gesunde als auch NS-Zellen eine kugelige Form, die Zellen liegen einzeln vor (Abb. 22 A und B). Bereits nach einem Tag im Differenzierungsmedium (Abb. 22 C und D) lagern sich die Zellen zu Zellkomplexen zusammen und vergrößern ihren Cytoplasma-Durchmesser. Im Laufe der Differenzierung erhalten die Keratinocyten eine abgeflachte, längliche Struktur, ähnlich einer Hornlamelle und lösen sich dann von der Petrischale. Zudem setzt eine Reduktion der Proliferation ein (Abb. 22 A).



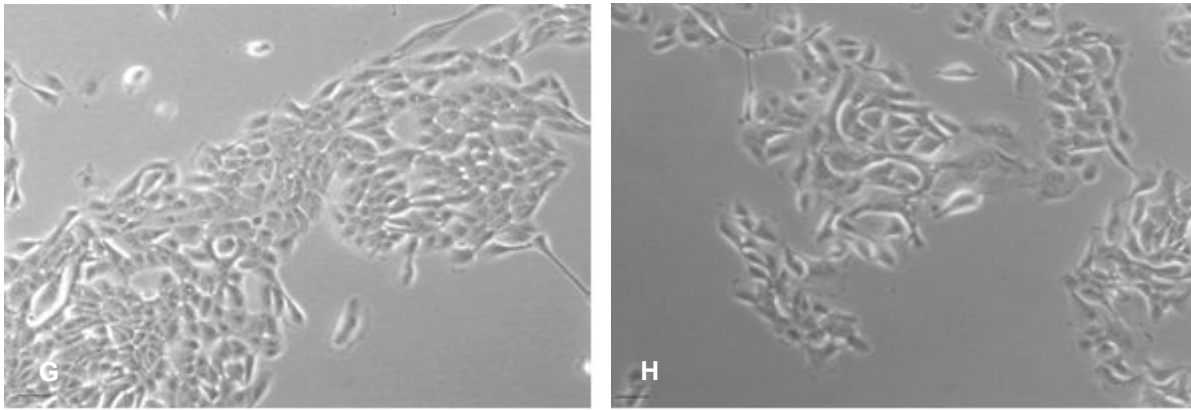


Abbildung 22: Keratinozyten-Phänotyp im Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium. Keratinozyten eines gesunden (A,C,E,G) und eines NS-Patienten (B,D,F,H) wurden parallel auf je vier Zellkulturschalen in Proliferationsmedium (A,B) bzw. Differenzierungsmedium für einen Tag (C,D), für zwei Tage (E,F) oder drei Tage (G,H) kultiviert und mikroskopiert. (Vergrößerung 100 x, Bar = 50 μ m). Die Keratinozyten verändern unter dem Einfluss von Calcium ihre Morphologie, von der anfangs kugelige, einzelliegende Form (A), zu Zellkomplexen mit einer abgeflachteren Form, größerem Cytoplasma und länglichen Ausläufern (C-H).

4.4.2 Cytochemischer Nachweis der Differenzierung in Keratinozyten

Um einen weiteren Nachweis für die erfolgte Differenzierung durch die Zugabe von 1,2 mM CaCl_2 ins Medium zu erhalten, wurde eine immunhistochemische Färbung der Keratinozyten mit dem Differenzierungsmarker Involukrin durchgeführt, der in gesunder Epidermis ab dem Stratum spinosum gebildet wird. Die Färbung wurde in gesunden und NS-Keratinozyten durchgeführt. Desweiteren wurde auf die Moleküle Desmoglein-1, Corneodesmosin, LEKTI und SCTE gefärbt, um eventuell auftretende Unterschiede zwischen gesunden und NS-Zellen aufzuzeigen.

4.4.2.1 Immuncytochemischer Nachweis von Involukrin

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, wird Involukrin in Keratinozyten, die im Proliferationsmedium kultiviert wurden (Abb. 23 A,C) nur sehr spärlich angefärbt, während Keratinozyten, die 24 h im Differenzierungsmedium kultiviert wurden (Abb.23 B,D), eine starke Expression von Involukrin zeigen. Man kann keinen Unterschied zwischen gesunden und NS-Keratinozyten hinsichtlich der Involukrin-Färbung beobachten.

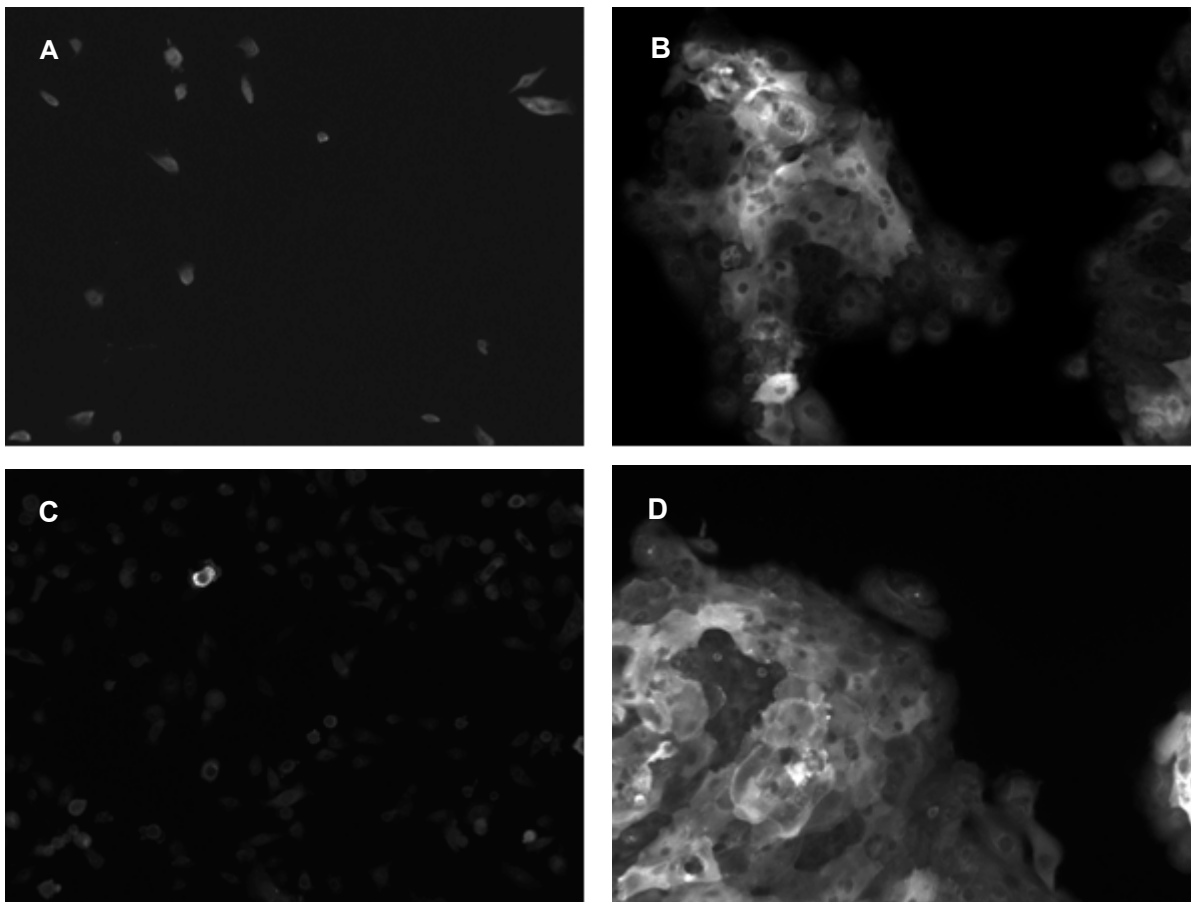


Abbildung 23: Immunocytochemischer Nachweis von Involukrin. Gesunde (A,B) und NS (C,D) Keratinozyten wurden nach Kultivierung im Proliferationsmedium (A,C) bzw. im Differenzierungsmedium für drei Tage (B,D) mit dem Antikörperklon SY5 gegen Involukrin gefärbt. (Vergrößerung 100 x).

4.4.2.2 Immunocytochemischer Nachweis von LEKTI

Ähnliches gilt für die Expression von LEKTI (siehe Abb. 24), das in gesunder Epidermis ebenfalls ab dem oberen Stratum spinosum gebildet wird. Auch hier zeigen Keratinozyten im Proliferationsmedium (A) eine geringere Expression des Proteins als im Differenzierungsmedium (B). Netherton Syndrom Keratinozyten zeigen sowohl im Proliferationsmedium (C) als auch im Differenzierungsmedium (D) wie erwartet im Vergleich zu gesunden Zellen eine geringere Menge bzw. gar kein LEKTI-Protein .

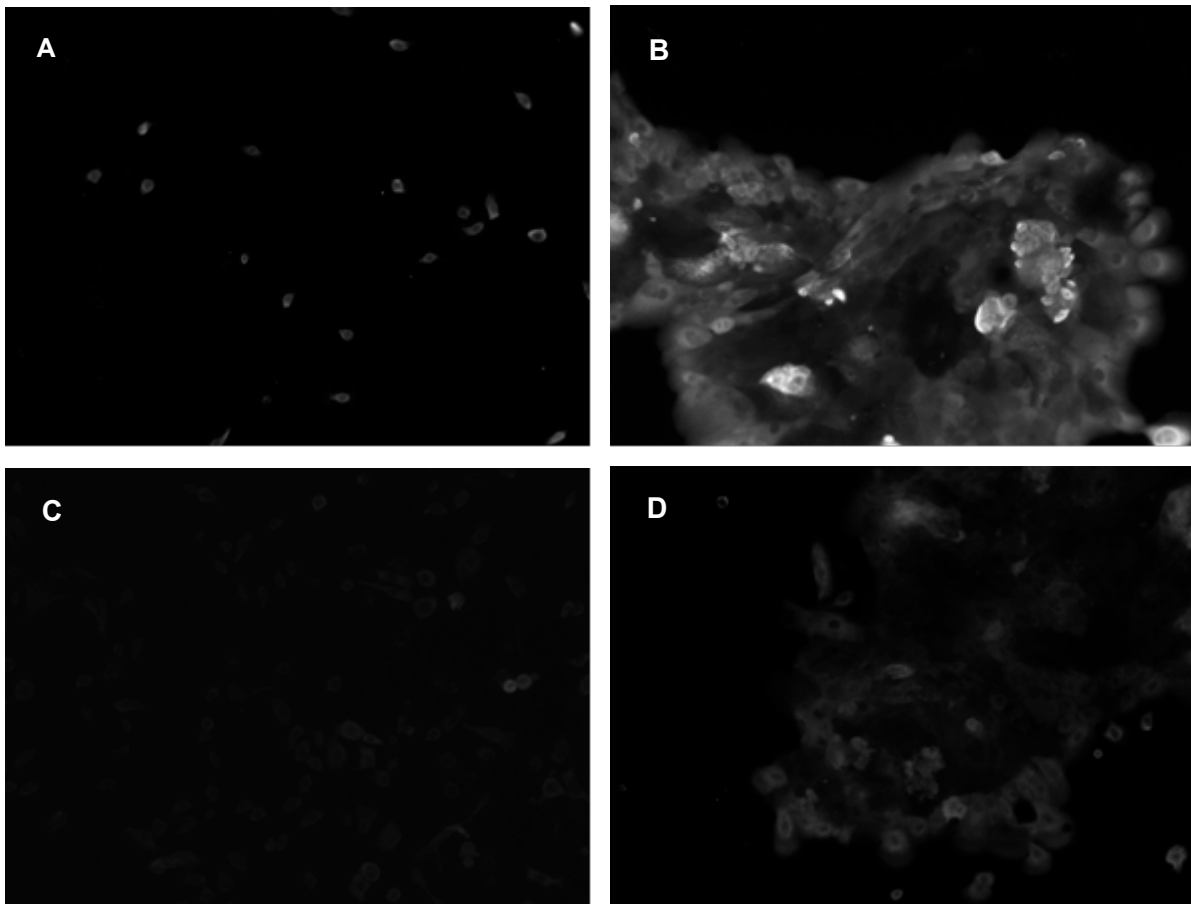


Abbildung 24: Immuncytochemischer Nachweis von LEKTI. Gesunde (A,B) und NS (C,D) Keratinozyten wurden nach Kultivierung im Proliferationsmedium (A,C) bzw. im Differenzierungsmedium für drei Tage (B,D) mit dem Antikörperklon 1C11G6 gegen LEKTI gefärbt. (Vergrößerung 100 x)

4.4.2.3 Immuncytochemischer Nachweis von SCTE

Abbildung 25 zeigt die Färbung von gesunden und NS-Keratinozyten mit einem Antikörper gegen die Serinprotease SCTE im Proliferationsmedium (A,C) bzw. nach Kultivierung für drei Tage im Differenzierungsmedium. SCTE kann sowohl in gesunden als auch in NS-Keratinozyten detektiert werden.

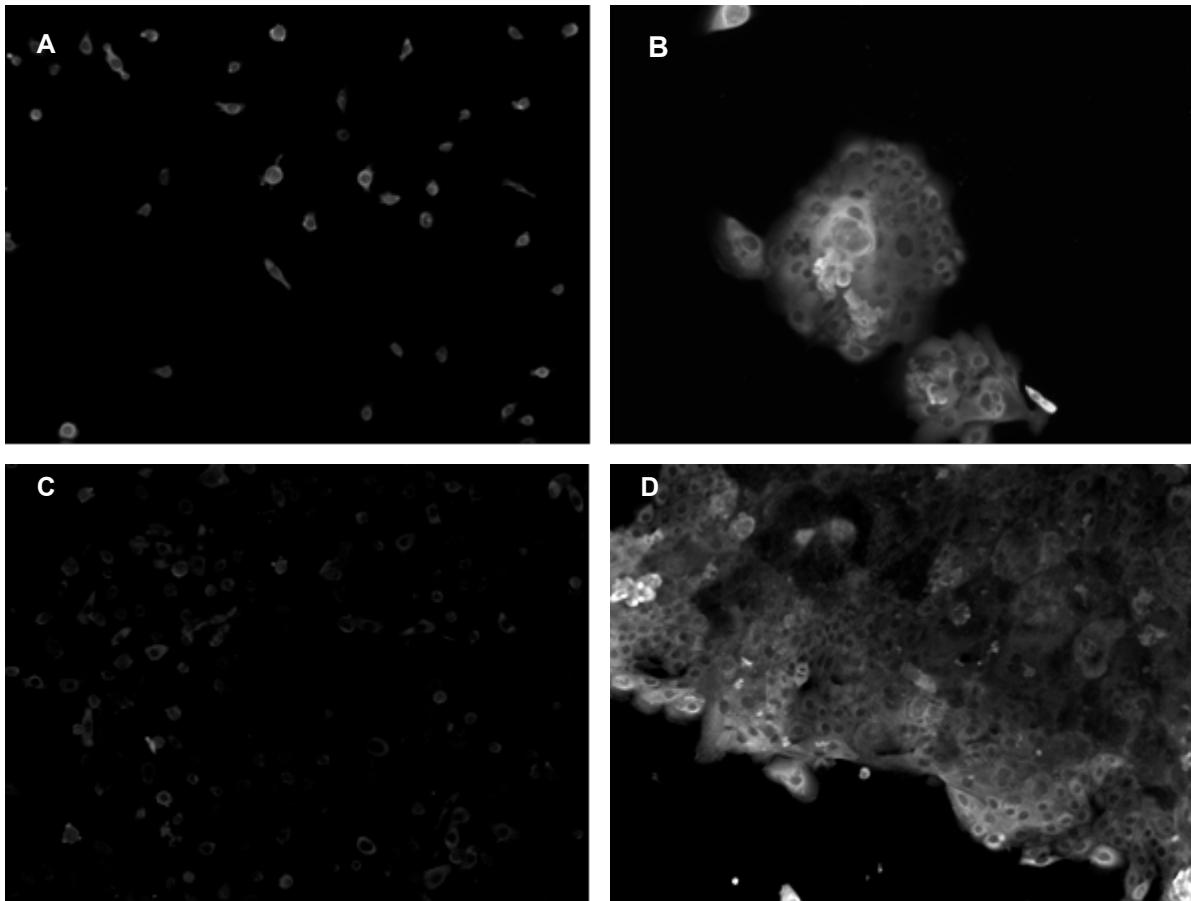


Abbildung 25: Immuncytochemischer Nachweis von SCTE. Gesunde (A,B) und NS (C,D) Keratinozyten wurden nach Kultivierung im Proliferationsmedium (A,C) bzw. im Differenzierungsmedium für drei Tage (B,D) mit einem polyklonalen Antikörper gegen SCTE gefärbt. (Vergrößerung 100 x)

4.4.2.4 Immuncytochemischer Nachweis von Desmoglein-1

Desmoglein-1 ist eines der möglichen Substrate für SCTE/SCCE in der Epidermis und könnte durch ein Fehlen von aktivem LEKTI-Protein vermehrt abgebaut werden. Abbildung 26 zeigt die immuncytochemische Färbung von Desmoglein-1 in gesunden bzw. NS-Keratinozyten im Proliferationsmedium (A,C) bzw. nach dreitägiger Kultivierung im Differenzierungsmedium (B,D). Im Proliferationsmedium werden die Zellen kaum angefärbt. Nach drei Tagen im Differenzierungsmedium zeigen nur gesunde Keratinozyten eine deutliche Färbung von Desmoglein-1.

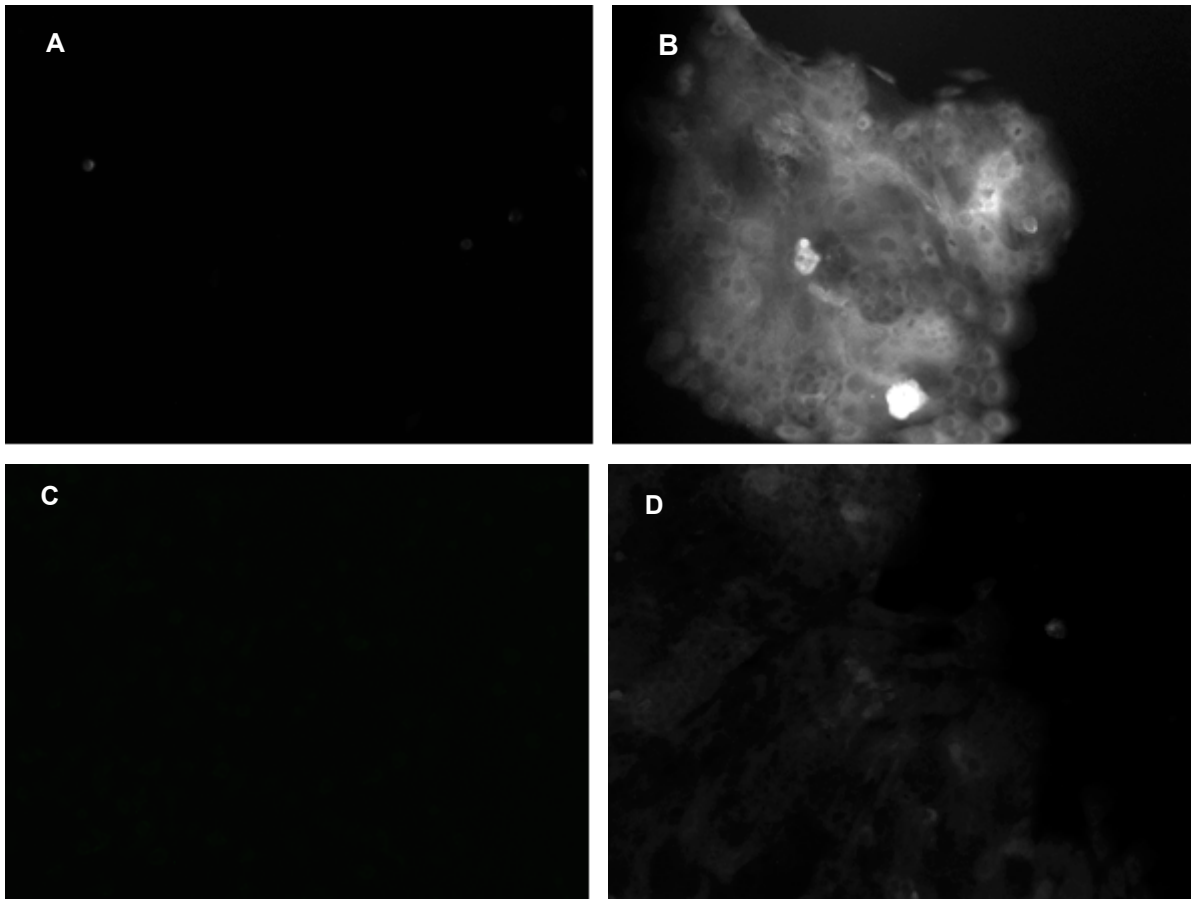


Abbildung 26: Immuncytochemischer Nachweis von Dsg1. Gesunde (A,B) und NS (C,D) Keratinozyten wurden nach Kultivierung im Proliferationsmedium (A,C) bzw. im Differenzierungsmedium für drei Tage (B,D) mit dem Antikörperklon Dsg1-P23 gegen Dsg1 gefärbt. (Vergrößerung 100 x)

4.4.2.5 Immuncytochemischer Nachweis von Corneodesmosin

Auch bei Corneodesmosin handelt es sich um ein mögliches Substrat von SCTE/SCCE, dessen Abbau durch inaktives LEKTI im NS vermehrt sein könnte. Abbildung 27 zeigt die immuncytochemische Färbung von Corneodesmosin in gesunden bzw. NS-Keratinozyten im Proliferationsmedium (A,C) bzw. nach dreitägiger Kultivierung im Differenzierungsmedium (B,D). Im Proliferationsmedium werden die Zellen kaum angefärbt. Nach drei Tagen im Differenzierungsmedium zeigen wie beim Molekül Desmoglein-1 nur gesunde Keratinozyten eine deutliche Färbung von Corneodesmosin. Im Gegensatz zu Desmoglein-1 ist hier aber die Färbung nicht völlig negativ.

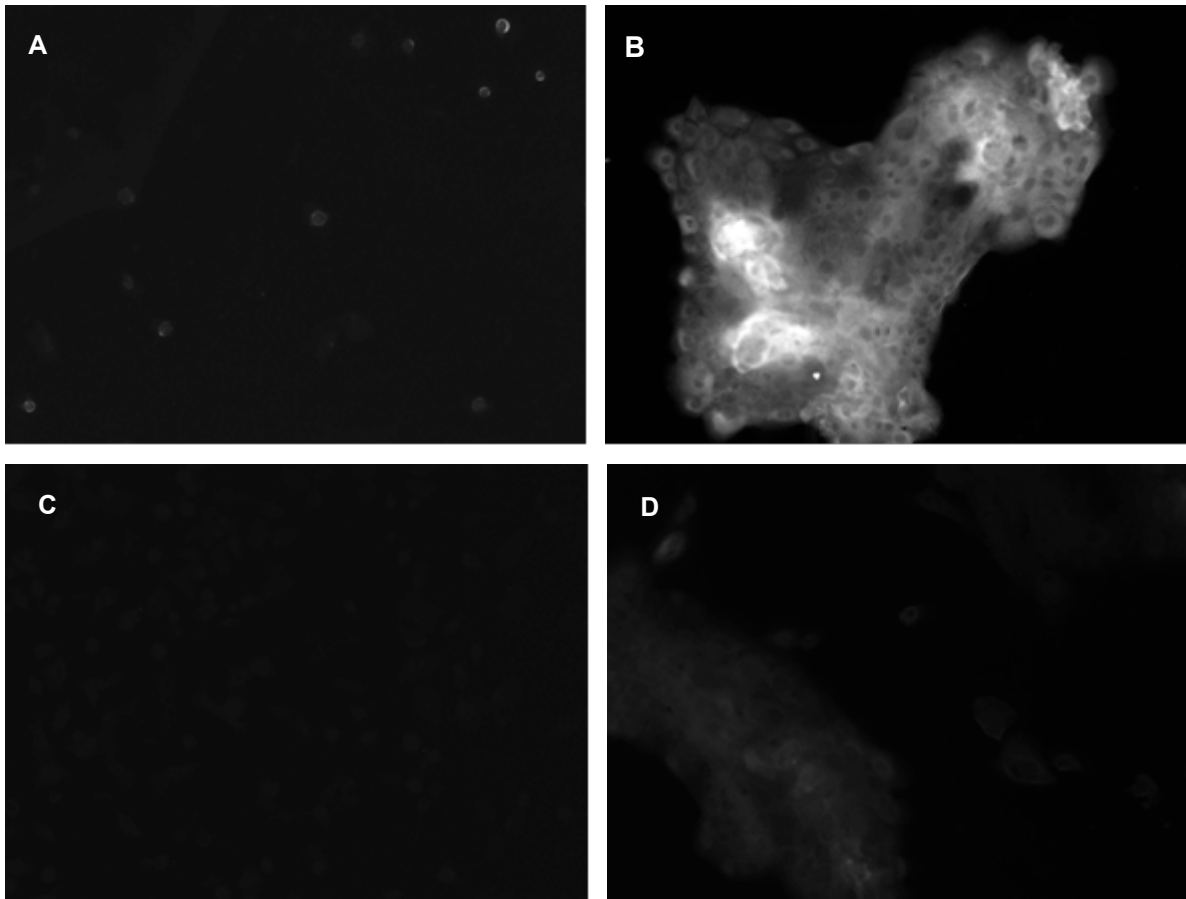


Abbildung 27: Immuncytochemischer Nachweis von CDSN. Gesunde (A,B) und NS (C,D) Keratinozyten wurden nach Kultivierung im Proliferationsmedium (A,C) bzw. im Differenzierungsmedium für drei Tage (B,D) mit dem Antikörperklon F28-F27 gegen CDSN gefärbt. (Vergrößerung 100 x)

4.5. Nachweis von LEKTI-mRNA in gesunden Keratinozyten

Um einen Nachweis für den erfolgten Gentransfer der LEKTI-cDNA in Keratinozyten von Netherton-Patienten erbringen zu können, wurden zunächst Nachweismöglichkeiten in gesunden Keratinozyten etabliert.

4.5.1 Nachweis von LEKTI -mRNA über Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR):

4.5.1.1 Nachweis von LEKTI-mRNA in gesunden humanen Keratinozyten

Um die LEKTI mRNA-Expression in Abhängigkeit von Calcium zu untersuchen, wurden gesunde Keratinozyten desselben Spenders auf verschiedene Kulturplatten ausgesät und bei 70-80 % Konfluenz parallel mit und ohne Zugabe von 1,2 mM CaCl₂ ins Medium einige Tage weiterkultiviert. Aus den so kultivierten Keratinozyten wurde Gesamt-RNA isoliert und davon 1 µg in cDNA umgeschrieben. Mit 1-2 µl dieser cDNA wurde anschließend eine RT-PCR durchgeführt.

Hierzu wurde ein für die ersten 268 bp von LEKTI spezifisches Primerpaar entworfen (siehe Tabelle 19). Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur für dieses Primerpaar wurde eine Temperatur-Gradienten-PCR durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Ermittelte PCR Konditionen waren 5 Minuten 95 °C, (1 Zyklus, Anfangsdenaturierung), gefolgt von 30 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden 95 °C (Denaturierung), 45 Sekunden 54 °C (Annealing) und 40 Sekunden 72 °C (Extension), gefolgt von 1 Zyklus 10 Minuten 72 °C zur Endextension.

Tabelle 19: Primersequenzen in RT-PCR und Real Time PCR

Primer	Sequenz	Fragmentgröße
LEKTI-1s	5'-CGCTAGCAACATGAAGATAG-3'	268 bp
LEKTI-268as	5'-GAGCTCTTGCTAAATGCCT-3'	
Aktin-1s	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	650 bp
Aktin-2as	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	

Wie in Abbildung 28 erkennbar ist, zeigen gesunde Keratinozyten eine Calcium-abhängige LEKTI-mRNA Expression. Die parallel durchgeführte PCR mit Beta-Aktin spezifischen Primern (B) zeigte keine Unterschiede in der Menge der eingesetzten cDNA. In Proliferationsmedium ist die LEKTI mRNA-Expression eher schwach, diese steigt aber mit zunehmender Dauer der Kultivierung in Differenzierungsmedium an.

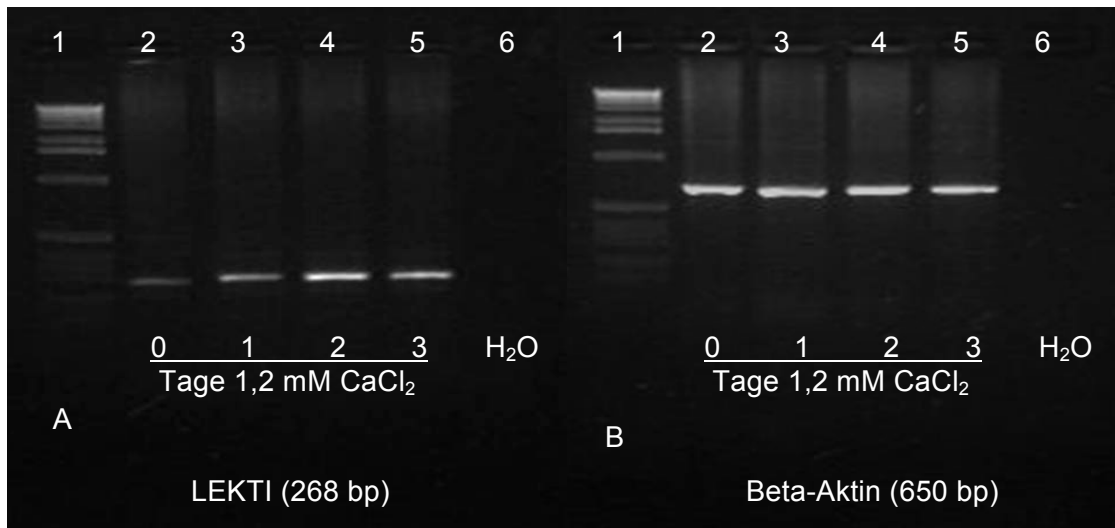


Abbildung 28: Nachweis von LEKTI-mRNA in gesunden Keratinozyten. RT-PCR mit LEKTI-spezifischen Primern (A) und bAktin-spezifischen Primern (B) in cDNA aus gesunden Keratinozyten, die ohne CaCl₂ Zugabe (Spur 2) bzw. nach Zugabe von 1,2 mM CaCl₂ ins Medium für 24 h (Spur 3), 48 h (Spur 4) oder 72 h (Spur 5) kultiviert worden waren. Spur 1 zeigt eine 1kb-DNA Leiter, Spur 6 die jeweilige H₂O-Kontrolle der PCR-Reaktionen. Fragmentgrößen: LEKTI 268 bp, bAktin 650 bp.

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem oben abgebildeten Fragment tatsächlich um LEKTI-cDNA handelt, wurde das aus differenzierten Keratinozyten erhaltene PCR-Produkt in den pCRII-TOPO Vektor kloniert und zur Sequenzanalyse an die Fa. Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) gegeben. Die Sequenz wurde anschließend über die PubMed Blast-Methode mit der Sequenz für LEKTI-mRNA (NM_006846) verglichen und war mit dieser zu 100% homolog (Daten nicht gezeigt).

4.5.1.2 Nachweis von LEKTI-mRNA nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI

Um zu testen, ob die in Keratinozyten eingebrachten rAAV-2 LEKTI Viruspartikel den Zellkern erreichen und dort die Doppelstrangsynthese und eine Transkription von LEKTI-mRNA erfolgen, wurden zunächst Vorversuche in gesunden Keratinozyten durchgeführt. 24 h nach der Transfektion mit rAAV-2 LEKTI in EGF-freiem KFSM-Medium erfolgte ein Mediumwechsel mit KFSM. Parallel dazu wurden die Zellen ohne bzw. für einen, zwei oder drei Tage mit Calcium-haltigem KFSM kultiviert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und diese über eine RT-PCR mit LEKTI-1s und LEKTI-2as auf das

Vorhandensein von LEKTI-mRNA überprüft. Als Kontrolle der gleichen Ladung von cDNA in den Ansätzen wurde parallel dazu eine RT-PCR mit Primern durchgeführt, die spezifisch für das Haushaltsgen Beta-Aktin sind.

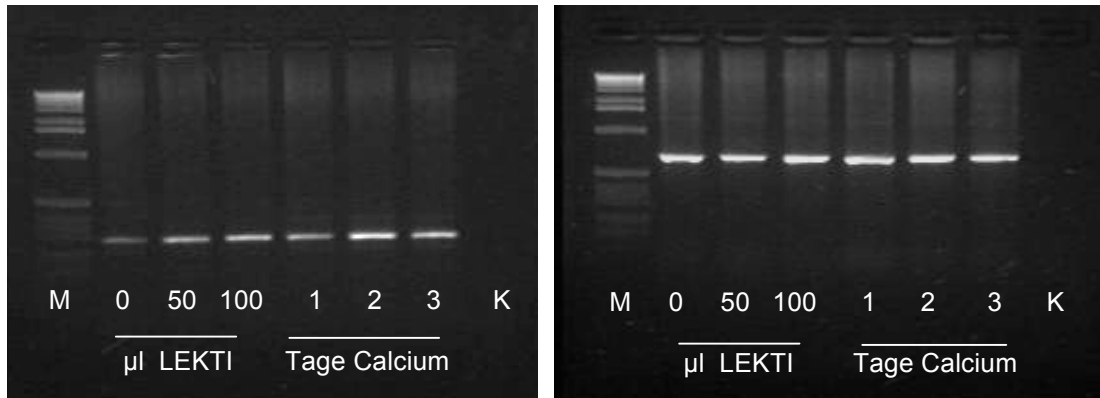


Abbildung 29: Nachweis der Calcium-abhängigen bzw. rAAV-2 LEKTI-induzierten LEKTI-Bildung in gesunden humanen Keratinozyten auf RNA-Ebene durch RT-PCR: Auftrag auf 1,5 % Agarosegel; links PCR mit LEKTI-Primern 1s und 268as (Fragmentgröße 268 bp); rechts PCR mit Aktinprimern. Spur 1: 1kb-Leiter, Spur 2: Medium (0); Spur3: 50 µl rAAV-2 LEKTI (50); Spur 4: 100 µl rAAV-2 LEKTI (100); Spur 5: einem Tag Ca (1); Spur 6: zwei Tage Ca (2); Spur 7: drei Tage Ca (3). Spur 8: Wasserkontrolle (K)

Wie Abbildung 29 zeigt, führt die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI zur Bildung von LEKTI-mRNA unabhängig zur Calcium-induzierten LEKTI-mRNA-Bildung. Die Zellen waren alle gleich lange auf der 6-Lochplatte, auf der die rAAV-2 LEKTI-Transfektion bzw. Differenzierung mit Calcium für einen bis drei Tage erfolgte. Die Mediumkontrolle (0) bildete deutlich weniger LEKTI-mRNA als dieselben Zellen nach rAAV-2 LEKTI-Transfektion (Spur 3 und Spur 4) bzw. nach Calciumzugabe (Spur 5, Spur 6 und Spur 7). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Menge der LEKTI-mRNA sich nach Transfektion mit 15 µl rAAV-2 LEKTI nicht von der nach 50 µl unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurden in die nachfolgenden Transfektionen nicht mehr als 15 µl rAAV-2 LEKTI Viruspartikel pro Loch einer 6-Lochplatte eingesetzt. Diese Virusmenge entspricht 10.000 Partikeln pro Zelle.

4.5.1.3 Nachweis von LEKTI-mRNA in Keratinozyten von NS-Patienten

Wie Abbildung 30 zeigt, bilden Keratinozyten von NS-Patient 1 ohne Calcium-Zugabe gar keine detektierbare LEKTI-mRNA (Spur 2) und nach Calcium-Zugabe für drei Tage nur eine sehr geringe Menge an LEKTI-mRNA (Spur 3). Die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI führte dagegen zu einer deutlichen Erhöhung der gebildeten mRNA in den Keratinozyten dieses Patienten.

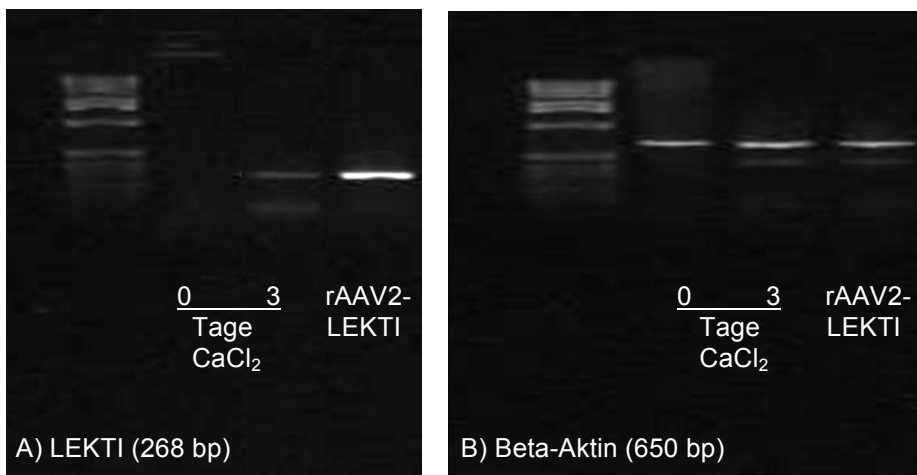


Abbildung 30: Nachweis von LEKTI-mRNA in Keratinozyten von NS-Patient 1. RT-PCR mit LEKTI-spezifischen Primern (A) und bAktin-spezifischen Primern (B) in cDNA aus Keratinozyten, die ohne CaCl₂ Zugabe (Spur 2) bzw. nach Zugabe von 1,2 mM CaCl₂ ins Medium für 72 h (Spur 3) bzw. nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI (Spur 4) kultiviert worden waren.

Abbildung 31 zeigt die erhaltene LEKTI-mRNA nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI (L) bzw. rAAV-2 GFP (G) in Keratinozyten von NS-Patient 2, 3 und 4. Auch hier ergibt sich ein analoges Bild. rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen (Spur 2, Spur 4 und Spur 6) bilden deutlich mehr LEKTI-mRNA als untherapierte rAAV-2 GFP transfizierte Zellen (Spur 3, Spur 5 und Spur 7).

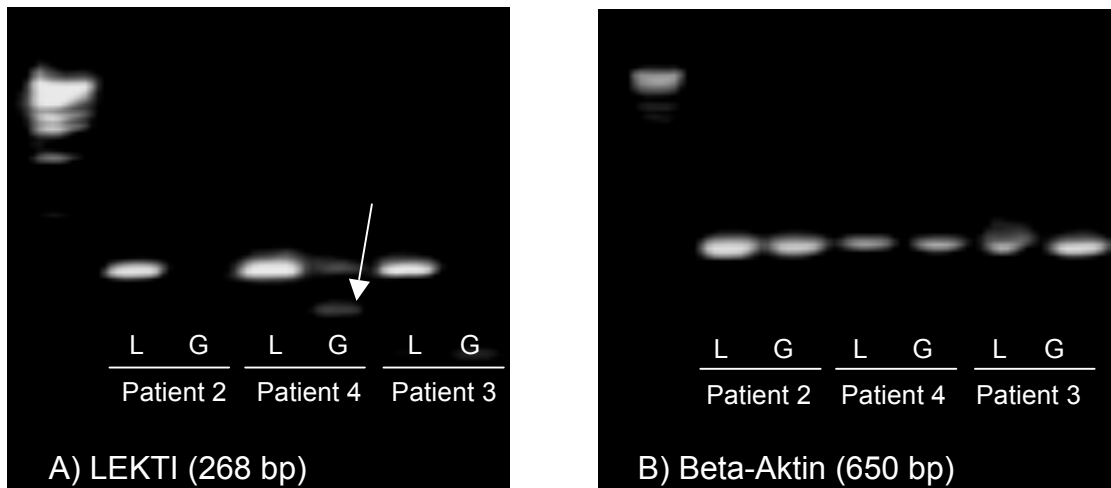


Abbildung 31: Nachweis von LEKTI-mRNA in Keratinozyten von NS-Patient 2, 4 und 3. RT-PCR mit LEKTI-spezifischen Primern (A) und beta-Aktin-spezifischen Primern (B) in cDNA aus Keratinozyten, die mit rAAV-2 LEKTI (L) bzw. rAAV-2 GFP (G) transfiziert worden waren.

rAAV-2 GFP transfizierte (Spur 5) und untransfizierte Zellen (nicht gezeigt) von NS-Patient 4 zeigen eine zweite deutlich kleinere Bande (etwa 120 bp) mit den verwendeten LEKTI-Primern (Pfeil). Eine zweite kleinere Bande tritt ebenfalls mit dem LEKTI-Primerpaar LEKTI-1s und LEKTI-1282as auf, aus welchem eine Fragmentlänge von 420 bp resultiert (Daten nicht gezeigt). In den anderen Patientenproben wurde diese Bande nicht beobachtet. Ein Versuch der Klonierung dieses Fragmentes scheiterte an der geringen Menge des Transkripts.

4.5.2 Quantitativer Nachweis der LEKTI –mRNA über Real Time PCR:

Zur Quantifizierung der LEKTI-mRNA Expression in Keratinozyten wurde eine Real Time PCR auf SYBRgreen-Basis mit der isolierten RNA durchgeführt, nachdem diese in cDNA umgeschrieben wurde. Für jede Probe wurde ein Doppelansatz mit je 50 ng cDNA eingesetzt.

4.5.2.1 Vergleich der Real Time PCR zwischen gesunden und NS-Keratinozyten

Folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von Real Time PCR-Reaktionen mit cDNA aus Keratinozyten von fünf verschiedenen gesunden Spendern

bzw. drei verschiedenen Netherton Syndrom Patienten. Die erhaltenen CT-Werte für die PCR-Reaktion mit den LEKTI-spezifischen Primer wurden hier direkt um die CT-Werte für die PCR-Kontrollreaktion mit beta Aktin-spezifischen Primern der Firma Invitrogen (RT-PCR Primer und Control set) korrigiert (delta CT, dCT). Erst aus diesen dCT-Werten wurde der Mittelwert gebildet und der Calcium-abhängige Effekt durch Abzug des Mediumwerts (0) von jedem erhaltenen Calciumwert (1 = einem Tag, 2 = zwei Tage, 3 = drei Tage Inkubation mit 1,2 mM CaCl₂) ermittelt (deltadeltaCT, ddCT). Aus dem so erhaltenen ddCT-Wert wurde der ratio-Wert ermittelt (2^{-ddCT}).

Wie die Abbildung 32 zeigt, ist in gesunden Keratinozyten ein Calcium-abhängiger Anstieg der LEKTI-mRNA Expression deutlich erkennbar. Somit bilden gesunde Keratinozyten nach einem Tag (1) Kultivierung in Differenzierungsmedium 4,7 x mehr, nach zwei Tagen (2) 7,9 x mehr und nach drei Tagen (3) etwa 18,8 x mehr LEKTI-mRNA als im Proliferationsmedium (0). Keratinozyten von Netherton Syndrom Patienten (n=3; SE, LK und DW) zeigen im Gegensatz zu gesunden Keratinozyten nur eine geringfügige Erhöhung (1,7 x) ihrer Calcium-abhängigen LEKTI-Expression nach drei Tagen Inkubation im Differenzierungsmedium. Nach 1 und zwei Tagen im Differenzierungsmedium scheint die LEKTI-Expression wie in der Literatur beschrieben vermindert zu sein (0,4 x bzw. 0,8 x).

Um zu vergleichen, inwieweit sich Keratinozyten von NS-Patienten von gesunden Probanden unterscheiden, wurde für diese Zellen der Ratio-Wert durch Bezug auf den Mediumwert der Kontrolle gebildet. Das Ergebnis dieses direkten Vergleichs ist in Abbildung 32 und Tabelle 20 dargestellt.

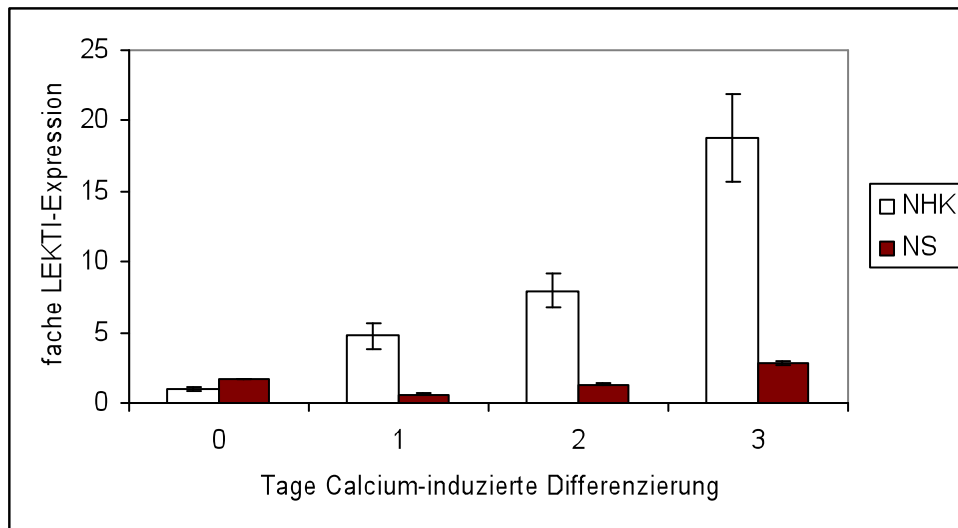


Abbildung 32: Vergleich der dCT-Werte der LEKTI-Expression in gesunden und NS-Keratinozyten. In dieser Darstellung zeigen Netherton Keratinozyten im Proliferationsmedium 0,7 x mehr LEKTI-mRNA als gesunde Keratinozyten, nach einem Tag Inkubation im Differenzierungsmedium 4,1 x weniger LEKTI-mRNA als gesunde Zellen zum selben Zeitpunkt, nach zwei Tagen 6,6 x weniger und nach drei Tagen 16,0 x weniger LEKTI-mRNA als gesunde Zellen. (Daten siehe Tabelle).

Tabelle 20: Vergleich der LEKTI-Expression von gesunden und NS-Keratinozyten

	dCT NHK	dCT NS	ddCT NHK	ddCT NS	Ratio NHK	Ratio NS	Ratio NHK -Ratio NS
ohne Ca ²⁺	20,08	19,31	0	-0,77	1,00	1,71	-0,71
sd	2,08	0,48			0,10	0,04	
1 Tag Ca ²⁺	17,83	20,84	-2,25	0,76	4,74	0,59	4,10
sd	3,43	2,18			0,91	0,06	
2 Tage Ca ²⁺	17,09	19,67	-2,99	-0,41	7,94	1,33	6,61
sd	2,58	0,43			1,20	0,03	
3 Tage Ca ²⁺	15,85	18,58	-4,23	-1,49	18,77	2,82	15,95
sd	2,64	0,87					

4.5.2.2 Real Time-Nachweis der LEKTI-Expression nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI

Abbildung 34 zeigt den direkten Vergleich der LEKTI-mRNA-Expression zwischen rAAV-2 GFP und rAAV-2 LEKTI transfizierten NS-Keratinozyten. Dabei wurde die

LEKTI-mRNA-Expression der jeweiligen rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP transfizierten Zellen von Patient 2,3 und 6 im Proliferationsmedium untersucht. Von Patient 1, 4 und 6 wurde die LEKTI-mRNA-Expression im Differenzierungsmedium untersucht.

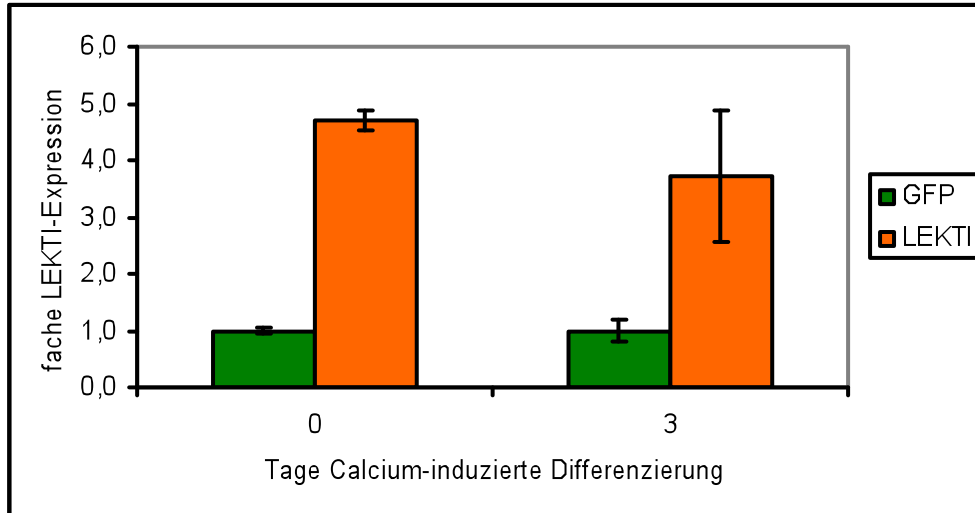


Abbildung 33: LEKTI-Expression in NS-Keratinocyten nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP im direkten Vergleich (siehe Text und Tabelle 21)

Im Schnitt liegt die mRNA-Expression in den rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen im Proliferationsmedium 4,7 x höher als in den rAAV-2 GFP-transfizierten und im Differenzierungsmedium 2,5 x höher.

Tabelle 21: LEKTI-Expression in transfizierten NS-Keratinocyten

	Proliferationsmedium			Differenzierungsmedium		
	dCT	ddCT	ratio	dCT	ddCT	ratio
rAAV-2 GFP	20,11	0,00	1,00	17,47	0,00	1,00
sd	0,84		0,04	4,74		0,27
%sd	4,15			27,14		
rAAV-2 LEKTI	17,88	-2,23	4,70	16,18	-1,29	2,45
sd	0,65		0,17	5,12		0,77
%sd	3,61			31,66		

Abbildung 34 und Tabelle 22 zeigen die LEKTI-mRNA-Expression in transfizierten NS-Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen bzw. gesunden Zellen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde der delta CT-Wert von gesunden Zellen nach Kultivierung im

Proliferationsmedium gleich 1 gesetzt und alle anderen delta CT-Werte darauf bezogen. Demnach zeigen rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen (n=3) wie erwartet bereits im Proliferationsmedium eine höhere LEKTI-Expression als untransfizierte und GFP-transfizierte Zellen. Im Vergleich zu gesunden Zellen liegt die LEKTI-Expression hier sogar 4,6 x höher. Auch im Differenzierungsmedium kann für rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen (n=3) eine höhere LEKTI-mRNA-Menge beobachtet werden, die nur noch geringfügig niedriger als in gesunden Keratinozyten ist (14 x versus 18,8 x).

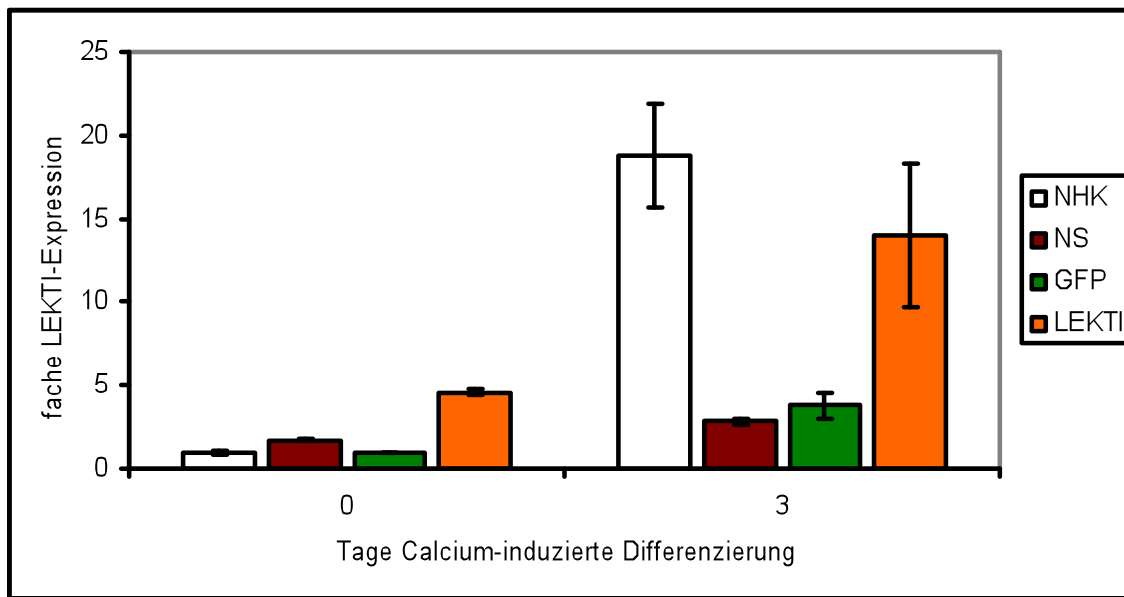


Abbildung 34: Vergleich der dCT-Werte in transfizierten und untransfizierten Zellen. LEKTI-Expression in NS-Keratinozyten nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP im Vergleich zur LEKTI-Expression in untransfizierten NS-Zellen und gesunden Keratinozyten.

Tabelle 22: Vergleich der dCT-Werte in transfizierten und untransfizierten Zellen.

Tage Ca ²⁺	NHK (n=5)			NS (n=3)			rAAV-2 GFP (n=3)			rAAV-2 LEKTI (n=3)		
	dCT	ddCT	ratio	dCT	ddCT	ratio	dCT	ddCT	ratio	dCT	ddCT	ratio
0	20,08	0,00	1,00	19,30	-0,77	1,71	20,11	0,03	0,98	17,88	-2,20	4,59
sd	2,08		0,10	0,48		0,04	0,84		0,04	0,64		0,17
%sd	10,34			2,46			4,15			3,61		
3	15,85	-4,23	18,77	18,58	-1,49	2,82	17,47	-2,61	6,11	16,18	-3,90	14,02
sd	2,64		3,12	0,87		0,13	4,74		1,66	5,12		4,31
%sd	16,64			4,70			27,14			31,66		

4.6. FACS-Analyse

Um Unterschiede auf Proteinebene zwischen gesunden Keratinozyten und untransfizierten bzw. rAAV-2 transfizierten NS-Keratinozyten zu untersuchen, wurden die Zellen ebenfalls ohne und mit 1,2 mM Calcium in KSFM-Medium inkubiert, geerntet und nach intrazellulärer Färbung mit den entsprechenden Antikörpern im FACS untersucht (siehe Methoden).

4.6.1 LEKTI-Proteinmenge in Keratinozyten

Bei LEKTI handelt es sich um ein sekretorisches Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum translatiert wird und über den Golgi-Apparat an sekretorische Vesikel (Lamellarkörper) weitergeleitet wird. Auf diesem sekretorischen Weg laufen alle Faltungsvorgänge und Prozessierungsschritte ab, die nötig sind, um ein funktionelles LEKTI-Protein herzustellen. In welche Domänen LEKTI genau gefaltet wird, ist bisher nicht bekannt [Mägert et al., 1999; Bitoun et al., 2003]. Die Färbung dieses Moleküls erfolgte mit dem Antikörper-Klon 1C11G6 (Invitrogen). Dieser murine Antikörper bindet an ein repetitives oder wiederkehrendes Epitop im LEKTI-Protein, da er sowohl das Vorläufermolekül (125 kDa) als auch rLEKTI-Domänen D1-6 (43 kDa), D6-9 (35,5 kDa) und D9-12 (35,2 kDa) stark und D13-15 (30,6 kDa) schwach erkennt [Raghunath et al., 2004]. Da zu Beginn dieser Doktorarbeit kein spezifischerer Antikörper gegen LEKTI kommerziell erhältlich war, wurden dieser Antikörper für die Untersuchungen gewählt.

4.6.1.1 Vergleich der LEKTI-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinozyten

Wie aus Abbildung 35 und Tabelle 23 ersichtlich, zeigen Keratinozyten von NS-Patienten (n=4) nach zwei und drei Tagen Inkubation im Differenzierungsmedium signifikant niedrigere LEKTI-Mengen als gesunde Keratinozyten (n=5). Im Proliferationsmedium sowie nach einem Tag im Differenzierungsmedium waren die Unterschiede dagegen nicht signifikant.

Gesunde Keratinozyten zeigen auch in der intrazellulären FACS-Analyse einen Calcium-abhängigen Anstieg in der LEKTI-Proteinmenge (Tabelle 24). Die LEKTI-

Menge nimmt in gesunden Zellen zunächst im Differenzierungsmedium deutlich zu und dann nach drei Tagen Inkubation im Differenzierungsmedium um 10% ab (siehe Tabelle 24). Dies könnte auf eine Sekretion des LEKTI-Proteins hindeuten, deren Quantität nicht über diese Methode bestimmt werden kann. NS-Keratinocyten zeigen dagegen keine Calcium-abhängige Änderung in der Menge ihres LEKTI-Proteins (Tabelle 24).

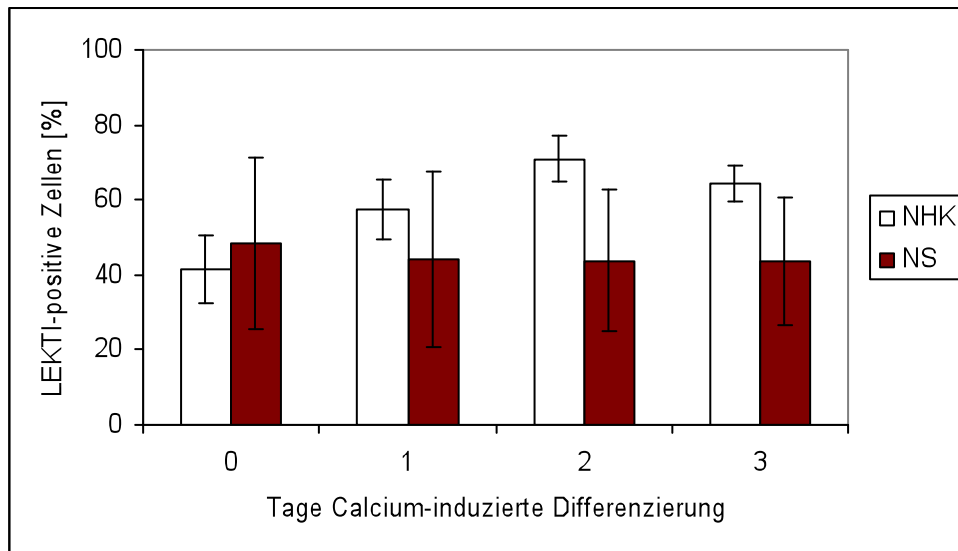


Abbildung 35: Vergleich der LEKTI-Proteinmenge in gesunden Keratinocyten versus NS-Keratinocyten. Bei NS-Keratinocyten ist die LEKTI-Menge im Proliferationsmedium (Tag 0) und nach einem Tag im Differenzierungsmedium (Tag1) nicht signifikant unterschiedlich zu gesunden Zellen. Nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium zeigen NS Keratinocyten dagegen deutlich geringere Mengen in der LEKTI-Menge als gesunde Zellen (siehe auch Tabelle 23).

Tabelle 23: LEKTI-Menge in gesunden und kranken Keratinocyten

LEKTI-Proteinmenge	gesunde Zellen		Patientenzellen		Statistik	
	Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	FTEST	p-Wert (1,2)
ohne Ca ²⁺	41,0	9,0	48,3	22,7	0,107	0,286
ein Tag Ca ²⁺	57,0	8,0	44,2	23,2	0,064	0,150
zwei Tage Ca ²⁺	71,0	6,0	43,8	19,0	0,051	0,011
drei Tage Ca ²⁺	65,0	5,0	43,5	16,9	0,033	0,019

Tabelle 24: LEKTI-Proteinmenge in Abhängigkeit von Calcium

LEKTI- Proteinmenge	Mittelwert	SD	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=5)					
ohne Ca ²⁺	41,0	9,0			
ein Tag Ca ²⁺	57,0	8,0	0,015		
zwei Tage Ca ²⁺	71,0	6,0	0,0003	0,014	
drei Tage Ca ²⁺	65,0	5,0	0,001	0,080	0,074
NS-Patienten (n=4)					
ohne Ca ²⁺	48,3	22,7			
ein Tag Ca ²⁺	44,2	23,2	0,390		
zwei Tage Ca ²⁺	43,8	19,0	0,369	0,489	
drei Tage Ca ²⁺	43,5	16,9	0,355	0,479	0,490

4.6.1.2 LEKTI-Proteinmenge in rAAV2-transfizierten NS-Keratinocyten

rAAV-2-LEKTI-transfizierte NS-Keratinocyten bzw. untherapierte rAAV-2-GFP-Kontroll-infizierte NS-Keratinocyten wurden zwei bis drei Wochen nach der Transfektion untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, ob sich rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen von rAAV-2 GFP transfizierten unterscheiden und ob durch die Transfektion normale Werte erreicht werden können. Das heißt, ob die über den Gentransfer eingebrachte LEKTI-Menge zu LEKTI-Protein umgewandelt wird und ob dies über diese Methode nachweisbar ist. Es wurden unabhängige Transfektionen aus n=4 NS-Patienten (NS-Patient 1,2,3 und 6) untersucht. Abbildung 36 zeigt den Transfektionserfolg der rAAV-2 LEKTI Transfektion (orange) im Vergleich zu den rAAV-2 GFP-Transfektanten (grün).

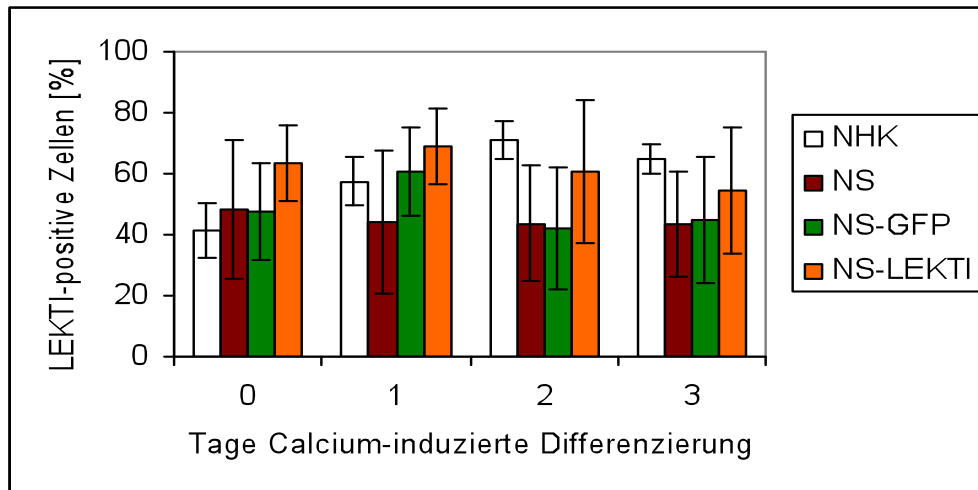


Abbildung 36: LEKTI-Proteinmenge in rAAV-2-GFP (GFP) bzw. rAAV-2-LEKTI (LEKTI) transfizierten NS-Keratinocyten (n=4, SE, LK, DW, HLM). rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen zeigen ohne Calcium sowie nach einem und nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere LEKTI-Expression als Kontroll-transfizierte Zellen (rAAV-2 GFP). Im Vergleich zu gesunden Zellen ist die LEKTI-Menge ohne Calcium signifikant erhöht und im Differenzierungsmedium nach zwei und drei Tagen nicht mehr signifikant vermindert.

Tabelle 25: Vergleich der LEKTI-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten

LEKTI-Proteinmenge	(n=4)	Mittelwert	sd	Fache Expression	p-Wert (1,1)
ohne Ca ²⁺	rAAV2-GFP	47,6	15,9		
	rAAV2-LEKTI	63,4	10,2	1,4	0,015
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	61,0	14,5		
	rAAV2-LEKTI	69,0	12,5	1,2	0,013
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	42,1	19,7		
	rAAV2-LEKTI	60,6	23,7	1,5	0,002
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	44,9	20,6		
	rAAV2-LEKTI	54,7	20,6	1,3	0,067

Wie Abbildung 36 und die Tabellen 25 und 26 zeigen, weisen rAAV-2-LEKTI transfizierte Netherton-Keratinocyten wie erwartet signifikant höhere LEKTI-Proteinmengen auf als rAAV-2-GFP transfizierte (40% im Proliferationsmedium, 20% nach einem Tag und 50% nach zwei Tagen). Nach drei Tagen im Differenzierungsmedium ist eine leichte Abnahme der LEKTI-Menge zu beobachten. Der Unterschied zur Kontroll-Transfektante ist hier nicht mehr signifikant. Dies lässt darauf schließen, dass

die über den Vektor eingebrachte LEKTI-cDNA zu einem Protein übersetzt wird, das nun zusätzlich zu dem endogen mutierten Protein in den transfizierten Zellen vorhanden ist. Und es scheint nach drei Tagen im Differenzierungsmedium ein Teil dieses eingebrachten Proteins sezerniert zu werden.

Tabelle 26: Calcium-abhängige LEKTI-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten

LEKTI-Proteinmenge		Mittelwert	sd	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
ohne Ca ²⁺	rAAV2-GFP	47,6	15,9			
	rAAV2-LEKTI	63,4	10,2			
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	61,0	14,5	0,125		
	rAAV2-LEKTI	69,0	12,5	0,253		
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	42,1	19,7	0,289	0,072	
	rAAV2-LEKTI	60,6	23,7	0,346	0,185	
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	44,9	20,6	0,305	0,078	0,484
	rAAV2-LEKTI	54,7	20,6	0,275	0,130	0,449

Im Vergleich zu gesunden Zellen zeigen rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen im Proliferationsmedium eine signifikant höhere LEKTI-Menge und im Differenzierungsmedium keine signifikante Verminderung.

4.6.2 Desmoglein-1 (Dsg1) Proteinmenge in Keratinocyten

4.6.2.1 Vergleich der Dsg1-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten

Desmoglein-1 ist ein Adhäsionsmolekül zwischen Keratinocyten, dessen Abbau durch die beiden Serinproteasen SCTE und SCCE möglicherweise von LEKTI inhibiert wird. Es wurde vermutet, dass Dsg1 in NS-Keratinocyten aufgrund der fehlenden Inhibition durch LEKTI vermehrt abgebaut wird.

Wie aus Abbildung 37 und Tabelle 27 ersichtlich, zeigen die Keratinocyten von n=4 NS-Patienten im Vergleich zu gesunden Keratinocyten von n=6 Spendern nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant geringere Mengen vom Dsg1-Protein.

Wie in Tabelle 28 erkennbar, zeigen gesunde Keratinozyten nach zwei Tagen (2) und nach drei Tagen (3) im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere Menge des Dsg1-Moleküls. NS-Keratinozyten von Patient 1 (1 x getestet), Patient 2, 3 (je 2 x getestet) und Patient 6 (1 x getestet) zeigen im Ggs. zu gesunden Zellen im Differenzierungsmedium keine signifikanten Erhöhungen dieses Moleküls, sondern eher eine gleich bleibende Menge (siehe Tabelle 28).

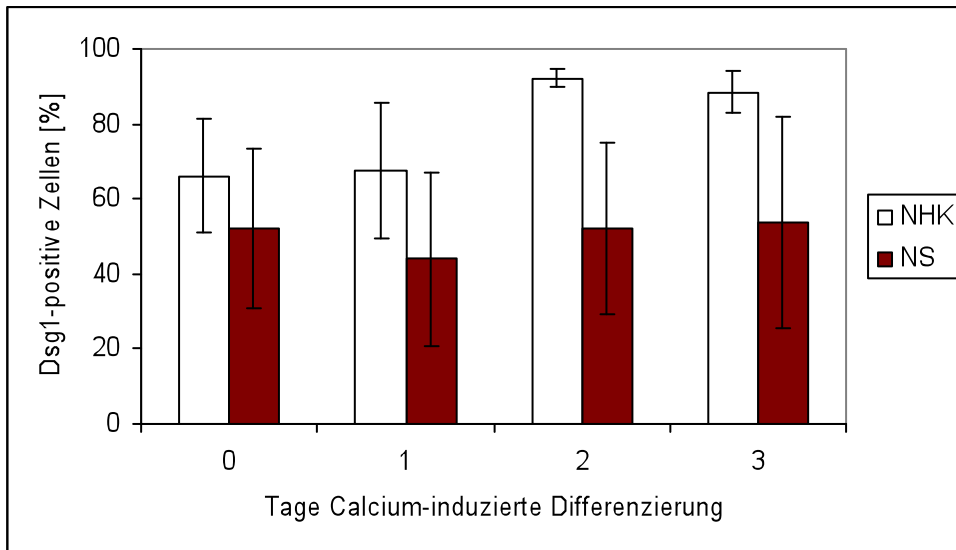


Abbildung 37: Dsg1-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten. Die Dsg1-Menge in Netherton Syndrom Keratinozyten (n=4) ist im Vergleich zu gesunden Keratinozyten (n=6) im Differenzierungsmedium (2,3) signifikant verringert. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 27)

Tabelle 27: Vergleich der Dsg1-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinozyten

Dsg1-Proteinmenge	gesunde Zellen		Patientenzellen		FTEST	p-Wert (1,2)
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD		
ohne Ca ²⁺	72,0	19,0	48,3	20,0	0,470	0,130
ein Tag Ca ²⁺	72,0	19,0	45,3	25,9	0,689	0,065
zwei Tage Ca ²⁺	90,0	4,0	60,8	18,5	0,001	0,006
drei Tage Ca ²⁺	85,0	14,0	55,0	18,0	0,003	0,011

Tabelle 28: Desmoglein-1 (Dsg-1) Menge in Abhängigkeit von Calcium

Dsg1- Proteinmenge	Mittelwert	SD	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=6)					
ohne Ca ²⁺	66,0	15,0			
ein Tag Ca ²⁺	67,0	18,0	0,486		
zwei Tage Ca ²⁺	92,0	2,0	0,008	0,014	
drei Tage Ca ²⁺	89,0	6,0	0,011	0,018	0,258
NS-Patienten (n=4)					
ohne Ca ²⁺	52,0	21,4			
ein Tag Ca ²⁺	44,0	23,2	0,291		
zwei Tage Ca ²⁺	52,1	22,9	0,204	0,387	
drei Tage Ca ²⁺	53,5	28,2	0,137	0,298	0,398

4.6.2.2 Dsg1-Proteinmenge in rAAV2-transfizierten Netherton-Keratinocyten

Auch hier wurde untersucht, ob die Transfektion mit rAAV2-LEKTI einen Effekt auf die oben geschilderten Unterschiede in der Dsg1-Expression hat. Wie die Abbildung 38 und die Tabelle 29 zeigen, weisen rAAV2-LEKTI transfizierte Netherton-Keratinocyten von n=3 Netherton-Patienten im Proliferationsmedium eine 70% höhere (signifikant), nach einem und zwei Tagen im Differenzierungsmedium eine 40% bzw. 20% höhere und nach drei Tagen Inkubation im Differenzierungsmedium eine 30% höhere Dsg1-Expression auf als rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen.

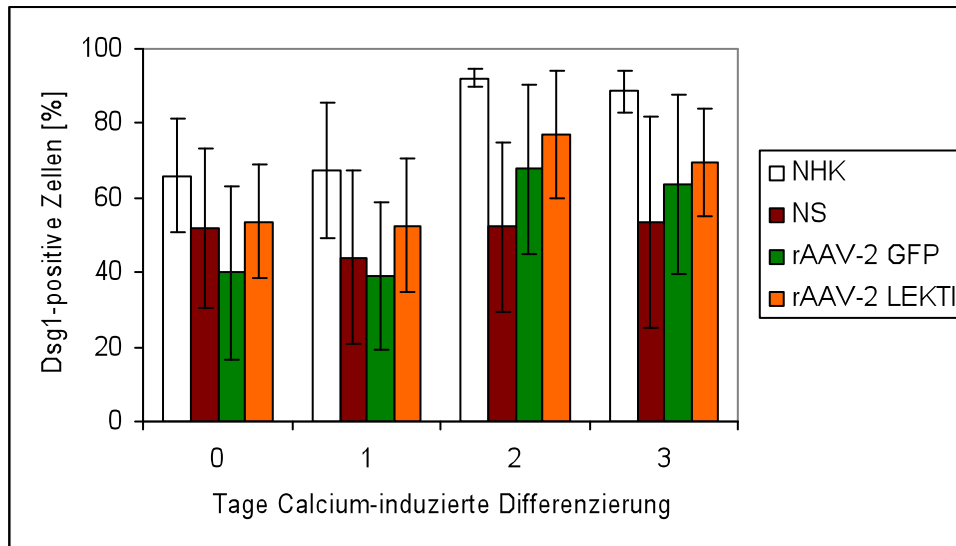


Abbildung 38: Dsg1-Proteinmenge in rAAV2-GFP (GFP) und rAAV2-LEKTI (LEKTI) transfizierten NS-Keratinocyten von n=4 Netherton-Patienten (einseitiger T-Test, Typ1; siehe Tabelle). Die Dsg1-Menge ist in rAAV-2 LEKTI-transfizierten NS Zellen im Proliferationsmedium signifikant höher als in rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen. Auch im Differenzierungsmedium zeigen rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen mehr Dsg1 als rAAV-2 GFP transfizierte (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Dsg1- Proteinmenge in rAAV-2 transfizierten NS-Keratinocyten

Dsg1-Proteinmenge		Mittelwert	sd	Fache Expression	p-Wert (1,1)
ohne Ca	rAAV2-GFP	39,9	23,1		
	rAAV2-LEKTI	53,5	15,3	1,7	0,038
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	39,2	19,7		
	rAAV2-LEKTI	52,6	18,1	1,4	0,128
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	67,7	22,7		
	rAAV2-LEKTI	77,1	17,1	1,2	0,066
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	63,6	23,9		
	rAAV2-LEKTI	69,5	14,3	1,3	0,215

Das durch das Einbringen der LEKTI-cDNA gebildete Protein scheint sich also bereits zwei bis drei Wochen nach der Transfektion positiv auf das Vorhandensein von Dsg1-Proteinen auszuwirken. Bei der in Tabelle 30 dargestellten Untersuchung der Calcium-abhängigen Dsg1-Menge, zeigen rAAV-2 LEKTI transfizierte Zellen nur nach 2 Tagen

im Differenzierungsmedium signifikant höhere Dsg1-Mengen als rAAV-2 GFP transfizierte NS-Zellen (Tabelle 30, $p=0,037$).

Tabelle 30 : Calcium-abhängige Dsg-1 Menge in rAAV-2 transfizierten NS Zellen

Dsg1-Proteinmenge		Mittelwert	sd	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
ohne Ca^{2+}	rAAV-2-GFP	39,9	23,1			
	rAAV-2-LEKTI	53,5	15,3			
ein Tag Ca^{2+}	rAAV-2-GFP	39,2	19,7	0,482		
	rAAV-2-LEKTI	52,6	18,1	0,470		
zwei Tage Ca^{2+}	rAAV-2-GFP	67,7	22,7	0,062	0,047	
	rAAV-2-LEKTI	77,1	17,1	0,037	0,043	
drei Tage Ca^{2+}	rAAV-2-GFP	63,6	23,9	0,096	0,077	0,404
	rAAV-2-LEKTI	69,5	14,3	0,083	0,091	0,257

Dies deutet darauf hin, dass die Transfektion mit rAAV2-LEKTI nicht nur eine Erhöhung der LEKTI-Expression, sondern durch diese auch eine verbesserte Differenzierung bewirken kann oder es spiegelt die geringere Prozessierung des Moleküls Dsg1 durch die von LEKTI inhibierten Proteasen wieder.

4.6.3 Corneodesmosin-Menge in Keratinozyten

4.6.3.1 Vergleich der CDSN-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinozyten

Auch das mit Desmosomen assoziierte Molekül Corneodesmosin (CDSN) ist laut Literatur ein mögliches Substrat für die beiden Serinproteasen SCTE und SCCE.

Abbildung 39 und Tabelle 31 zeigen den Vergleich der CDSN-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinozyten. NS-Keratinozyten ($n=4$, NS-Patient 1-3, 6) zeigen nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant niedrigere CDSN-Mengen als gesunde Keratinozyten ($n=7$), was auf einen erhöhten Abbau dieses Moleküls durch die nicht-inhibierten Proteasen hindeutet.

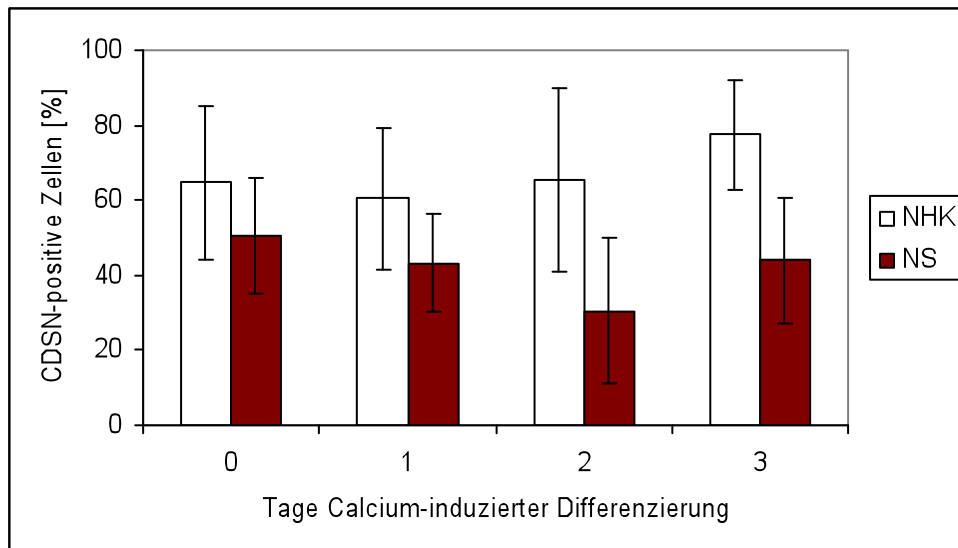


Abbildung 39: CDSN-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten. Die CDSN-Menge in NS-Keratinozyten (n=4) ist im Vergleich zu gesunden Keratinozyten (n=7) nach Inkubation im Differenzierungsmedium für drei Tage (3) signifikant verringert. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle)

Tabelle 31: Vergleich der CDSN-Menge in gesunden und NS-Keratinozyten

CDSN-Proteinmenge	gesunde Zellen		Patientenzellen		FTEST	p-Wert (1,2)
	Mittelwert	sd	Mittelwert	sd		
ohne Ca ²⁺	65,0	21,0	50,5	15,5	0,656	0,130
ein Tag Ca ²⁺	61,0	19,0	43,2	13,0	0,533	0,067
zwei Tage Ca ²⁺	65,0	24,0	30,4	19,4	0,738	0,015
drei Tage Ca ²⁺	78,0	15,0	44,1	16,7	0,667	0,004

Wie die Tabelle 32 zeigt, sind weder in gesunden noch in NS-Zellen Calcium-abhängige Unterschiede in der CDSN-Proteinmenge erkennbar.

Tabelle 32: CDSN-Menge in Abhängigkeit von Calcium

CDSN- Proteinmenge	Mittelwert	SD	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=7)					
ohne Ca ²⁺	65,0	21,0			
ein Tag Ca ²⁺	61,0	19,0	0,361		
zwei Tage Ca ²⁺	65,0	24,0	0,477	0,352	
drei Tage Ca ²⁺	78,0	15,0	0,118	0,053	0,160
NS-Patienten (n=4)					
ohne Ca ²⁺	50,5	15,5			
ein Tag Ca ²⁺	43,2	13,0	0,246		
zwei Tage Ca ²⁺	30,4	19,4	0,072	0,153	
drei Tage Ca ²⁺	44,1	16,7	0,295	0,468	0,159

Nach diesen Ergebnissen werden in den hier untersuchten NS-Patienten sowohl Dsg1 als auch CDSN verstärkt von den nicht durch LEKTI inhibierten Proteasen abgebaut.

4.6.3.2 CDSN-Proteinmenge in rAAV-2 transfizierten NS-Keratinocyten

Abbildung 40 und Tabelle 33 zeigen die CDSN-Expression von rAAV-2 LEKTI-transfizierten Keratinocyten aus n=4 Transfektionen im Vergleich zu rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen. Die CDSN-Menge ist in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant (gepaarter TTEST, p=0,041) höher als in rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen (1,7x). Danach sind aber keine Unterschiede mehr erkennbar.

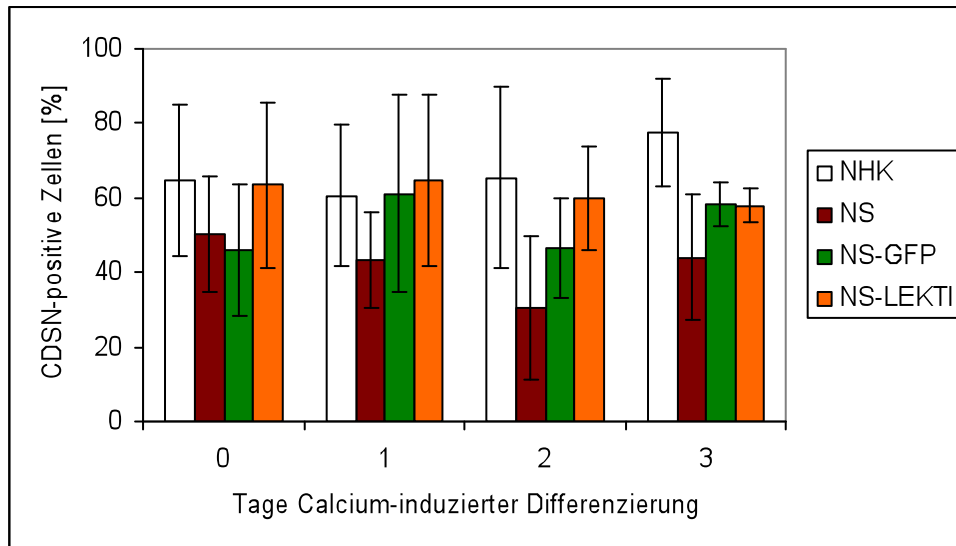


Abbildung 40: CDSN-Menge in rAAV2-GFP (GFP) und rAAV2-LEKTI (LEKTI) transfizierten NS-Keratinocyten von n=4 NS-Patienten (einseitiger T-Test, Typ1; siehe Tabelle 33). Die CDSN-Expression ist in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen im Proliferationsmedium 40 % höher (signifikant, p=0,018) und nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium 30 % höher (signifikant, p=0,021) als in rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen.

Die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI scheint also auch einen Einfluss auf die vorhandene CDSN-Menge der transfizierten Zellen zu haben. Dieser Effekt ist nach zwei Tagen Inkubation mit Calcium am höchsten.

Tabelle 33: Vergleich der CDSN-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten

CDSN-Proteinmenge		Mittelwert	sd	Fache Expression	p-Wert (1,1)
ohne Ca ²⁺	rAAV2-GFP	45,9	17,9		
	rAAV2-LEKTI	63,4	22,0	1,4	0,018
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	61,0	26,5		
	rAAV2-LEKTI	64,8	23,0	1,1	0,226
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	46,6	13,2		
	rAAV2-LEKTI	60,0	13,8	1,3	0,021
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	58,4	5,7		
	rAAV2-LEKTI	58,0	4,4	1,0	0,373

4.6.4 Dsc1-Proteinmenge in Keratinozyten

Ein anderer Bestandteil von Desmosomen, der möglicherweise von den beiden Proteasen SCTE und SCCE abgebaut werden könnte, ist das Molekül Desmocollin-1 (Dsc-1).

4.6.4.1 Vergleich der Dsc1-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinozyten

Abbildung 41 und Tabelle 34 vergleichen die Dsc1-Proteinmenge von n=4 gesunden Keratinozyten mit Keratinozyten von n=3 NS-Patienten (NS-Patient 2, 3 und 6). Das Dsc1-Molekül ist in den NS-Keratinozyten nach drei Tagen im Differenzierungsmedium in signifikant geringeren Mengen vorhanden als in gesunden Zellen.

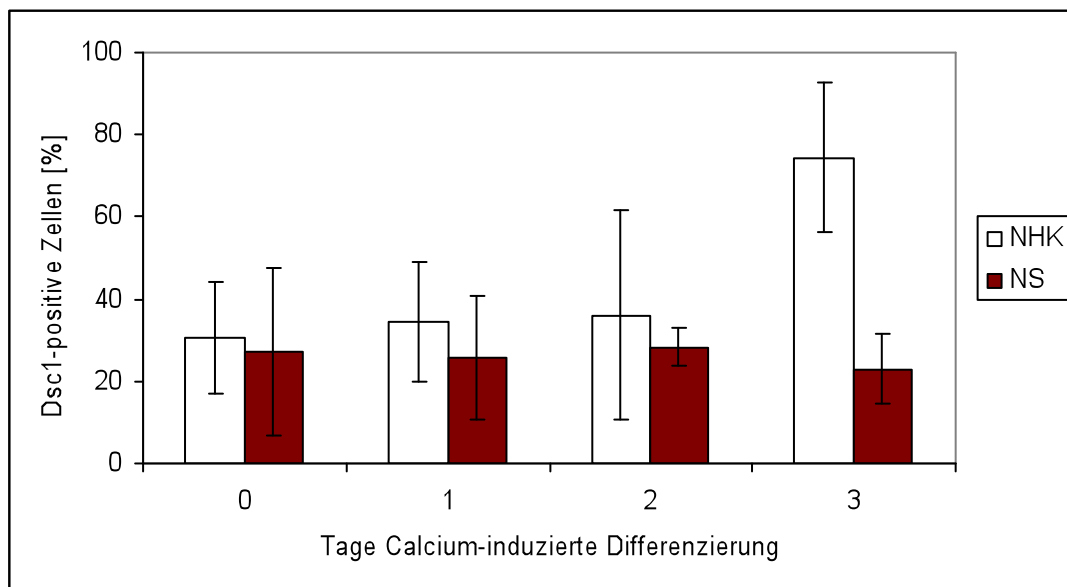


Abbildung 41: Dsc1-Proteinmenge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten. Die Dsc1-Menge in Netherton Syndrom Keratinozyten (n=3) ist im Vergleich zu gesunden Keratinozyten (n=4) nach Inkubation im Differenzierungsmedium für drei Tage (3) signifikant verringert. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle)

Tabelle 34: Vergleich der Dsc1-Menge in gesunden und NS-Keratinocyten

	gesunde Zellen		Patientenzellen			
Dsc1-Proteinmenge	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	FTEST	p-Wert (1,2)
ohne Ca ²⁺	30,0	13,0	27,3	20,4	0,447	0,423
ein Tag Ca ²⁺	34,0	15,0	25,9	15,1	0,822	0,277
zwei Tage Ca ²⁺	36,0	25,0	28,4	4,5	0,068	0,340
drei Tage Ca ²⁺	74,0	18,0	23,0	8,5	0,415	0,006

Die Dsc1-Menge steigt in gesunden Zellen von n=4 Spendern nach drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant an. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 35). Dieses Molekül wurde auch in NS-Patient 2, NS-Patient 3 und NS-Patient 6 untersucht. In den NS-Keratinocyten kommt es nicht zu dem in gesunden Zellen beobachteten Calcium-abhängigen Anstieg (Tabelle 35).

Tabelle 35 : Dsc1-Menge in Abhängigkeit von Calcium

Dsc1- Proteinmenge	Mittelwert	SD	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=4)					
ohne Ca ²⁺	30,0	13,0			
ein Tag Ca ²⁺	34,0	15,0	0,373		
zwei Tage Ca ²⁺	36,0	25,0	0,373	0,460	
drei Tage Ca ²⁺	74,0	18,0	0,007	0,012	0,039
NS-Patienten (n=3)					
ohne Ca ²⁺	27,3	20,4			
ein Tag Ca ²⁺	25,9	15,1	0,469		
zwei Tage Ca ²⁺	28,4	4,5	0,473	0,416	
drei Tage Ca ²⁺	23,0	8,5	0,397	0,412	0,236

4.6.4.2 Dsc1-Proteinmenge in rAAV-2 transfizierten NS Keratinozyten

Abbildung 42 und Tabelle 36 zeigt die Dsc1-Menge nach der Transfektion von Keratinozyten von NS-Patient 2, 3 und 6 mit rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP.

Im Proliferationsmedium ist die Dsc1-Menge 1,4 x höher, nach einem Tag im Differenzierungsmedium 1,2 x höher, nach zwei Tagen ist die Dsc1-Menge 20 % geringer und nach drei Tagen im Differenzierungsmedium ist die Menge 1,7 x höher in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen im Vergleich zu rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen. Wie die Abbildung zeigt ist die Dsc1-Menge in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen nach drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant höher als in rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen, was auf einen verminderten Abbau des Moleküls hindeuten könnte.

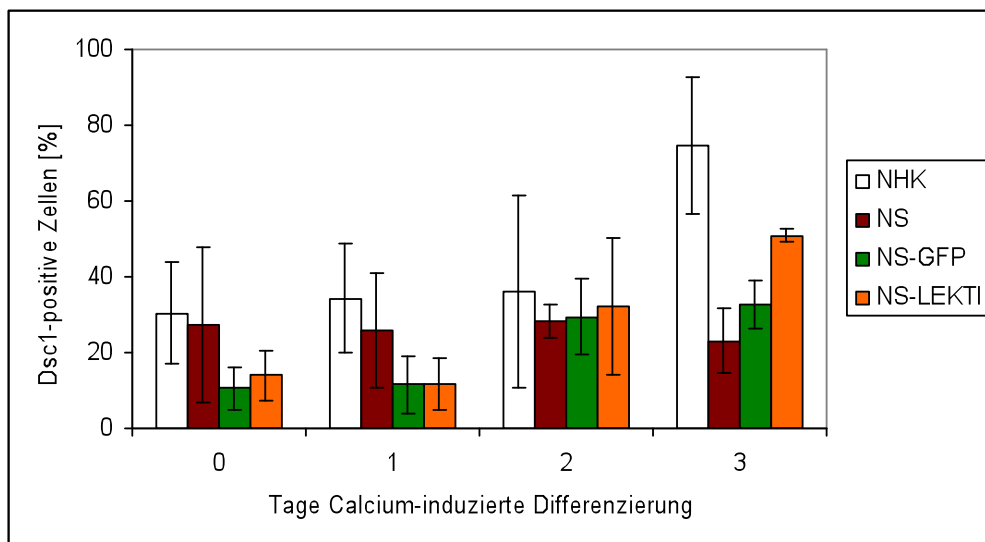


Abbildung 42: Dsc1-Menge in rAAV2-GFP (GFP) und rAAV2-LEKTI (LEKTI) transfizierten NS-Keratinozyten (n=3 Transfektionen) (siehe Tabelle 36). Die Dsc1-Expression ist in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen im Proliferationsmedium (0) 30 % höher (signifikant, $p=0,037$), nach einem Tag und nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium unverändert und nach drei Tagen im Differenzierungsmedium (3) 60 % höher (signifikant, $p=0,025$) als in rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen.

Tabelle 36: Dsc1-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten

Dsc1-Proteinmenge	(n=3)	Mittelwert	SD	Fache Expression	FTEST	p-Wert (1,1)
ohne Ca ²⁺	rAAV2-GFP	10,6	5,7			
	rAAV2-LEKTI	13,9	6,8	1,3	0,821	0,037
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	11,5	7,5			
	rAAV2-LEKTI	11,8	6,8	1,1	0,914	0,423
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	29,5	10,2			
	rAAV2-LEKTI	32,2	18,0	1,0	0,489	0,362
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	32,6	6,5			
	rAAV2-LEKTI	50,9	1,7	1,6	0,122	0,025

Demnach hatte die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI nicht nur zu der erwarteten Erhöhung des LEKTI-Proteins geführt, sondern zudem eventuell einen leicht verminderten Abbau der Moleküle Dsg1, Dsc1 und CDSN zur Folge.

4.6.5 Intrazelluläre FACS-Messung von Proteasen in Keratinocyten

Um festzustellen, inwieweit sich die Bildung der beiden Proteasen, die von dem Serinprotease-Inhibitor LEKTI reguliert werden, zwischen gesunden und NS-Keratinocyten unterscheidet, wurden auch diese Moleküle mit geeigneten Antikörpern über die intrazelluläre FACS-Analyse untersucht.

4.6.5.1 Vergleich der SCTE-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten

Abbildung 43 und Tabelle 37 vergleichen die SCTE-Expression zwischen gesunden (n=5) und NS-Keratinocyten (n=3). Die SCTE-Menge ist in NS-Keratinocyten höher als in gesunden Keratinocyten. Im Proliferationsmedium ist die SCTE-Menge 2,3 x höher, im Differenzierungsmedium nach einem Tag 1,4 x höher und nach zwei und drei etwa 3,0x höher als in gesunden Keratinocyten. Im Proliferationsmedium sowie nach zwei

und drei Tagen im Differenzierungsmedium ist die SCTE-Menge in NS-Keratinocyten signifikant höher als in gesunden Zellen (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 37).

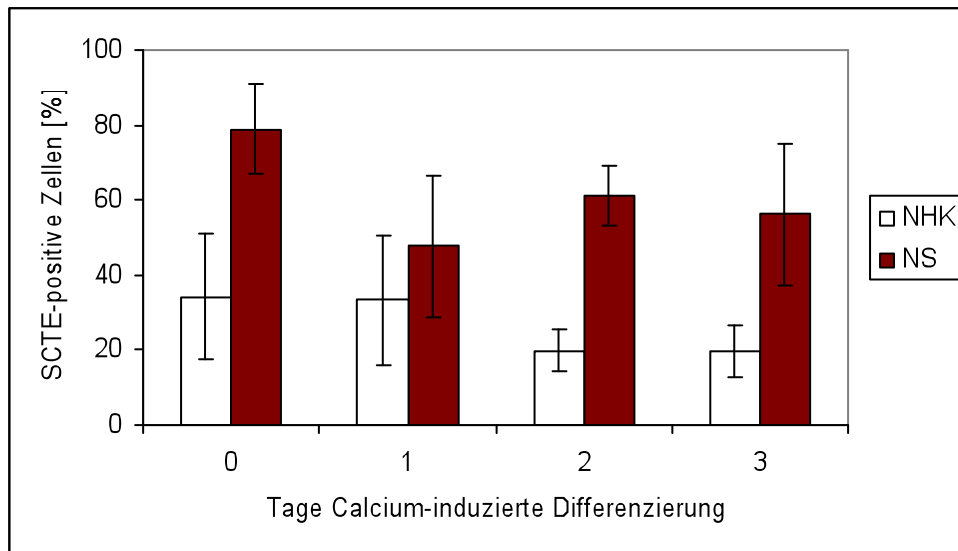


Abbildung 43: SCTE-Proteinmenge in gesunden Keratinocyten im Vergleich zu NS-Keratinocyten. Die SCTE-Expression in NS-Keratinocyten (n=3) ist im Vergleich zu gesunden Keratinocyten (n=5) im Proliferationsmedium und im Differenzierungsmedium nach zwei und drei Tagen (3) signifikant erhöht. Im Proliferationsmedium zeigen NS-Keratinocyten 2,3 x mehr SCTE, nach einem Tag 1,4 x mehr, nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium 3,0 x mehr SCTE als gesunde Zellen. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle)

Tabelle 37: Vergleich der SCTE-Menge in gesunden und NS-Keratinocyten

SCTE-Proteinmenge	gesunde Zellen		Patientenzellen		FTEST	p-Wert (1,2)
	Mittelwert	sd	Mittelwert	sd		
ohne Ca ²⁺	34,0	17,0	79,0	12,0	0,838	0,007
ein Tag Ca ²⁺	33,0	17,0	48,0	19,0	0,670	0,189
zwei Tage Ca ²⁺	20,0	5,0	61,0	8,0	0,361	0,0002
drei Tage Ca ²⁺	19,0	7,0	56,0	19,0	0,064	0,007

Es kann keine signifikante Calcium-abhängige Regulation dieses Moleküls beobachtet werden (Tabelle 38). Dennoch ist die SCTE-Menge nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium etwa 42 % und nach drei Tagen etwa 43 % niedriger als im Proliferationsmedium.

Auch in den Keratinozyten von NS-Patient 1, 4 und 6 zeigt sich keine Calcium-abhängige Veränderung der SCTE-Menge (Tabelle 38). Nach zwei Tagen Inkubation im Differenzierungsmedium ist die SCTE-Menge aber anders als in gesunden Zellen nur um 23% geringer und nach drei Tagen um 29% geringer als im Proliferationsmedium.

Tabelle 38 : SCTE-Proteinmenge in Abhängigkeit von Calcium

SCTE- Proteinmenge	Mittelwert	SD	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=5)					
ohne Ca ²⁺	34,0	17,0			
ein Tag Ca ²⁺	33,0	17,0	0,473		
zwei Tage Ca ²⁺	20,0	5,0	0,072	0,088	
drei Tage Ca ²⁺	19,0	7,0	0,072	0,087	0,467
NS-Patienten (n=3)					
ohne Ca ²⁺	79,0	12,0			
ein Tag Ca ²⁺	48,0	19,0	0,061		
zwei Tage Ca ²⁺	61,0	8,0	0,080	0,205	
drei Tage Ca ²⁺	56,0	19,0	0,114	0,340	0,375

4.6.5.2 SCTE-Proteinmenge in transfizierten NS-Keratinozyten

Abbildung 44 und Tabelle 39 zeigen, dass die SCTE-Menge nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI zunächst deutlich höher ist als in rAAV-2 GFP transfizierten Zellen, mit signifikant höheren Werten nach einem Tag im Differenzierungsmedium. Dies scheint aber eher daran zu liegen, dass hier die Werte in den rAAV-2 GFP transfizierten Zellen ähnlich zu untransfizierten Zellen (Tabelle 39) deutlich erniedrigt waren. Nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium sind die Proben aber nicht signifikant unterschiedlich.

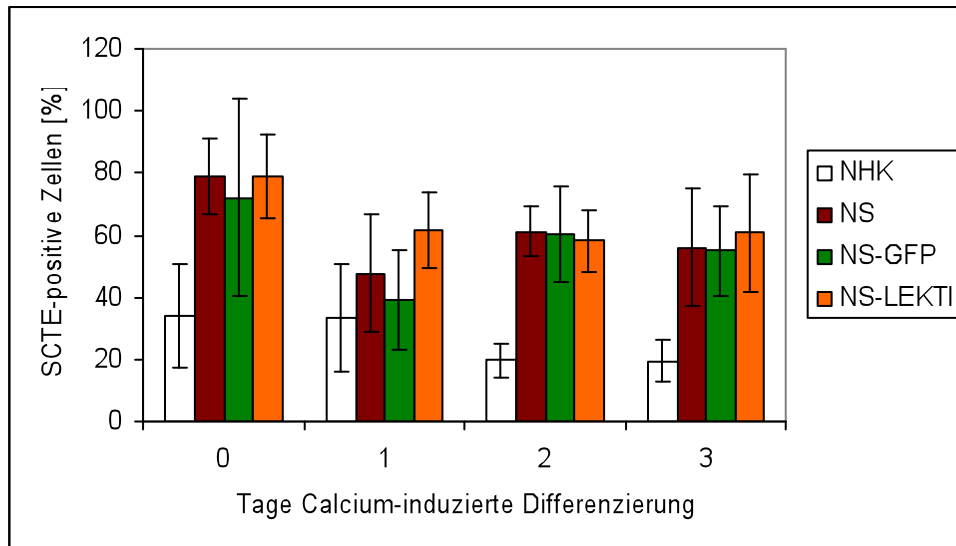


Abbildung 44: SCTE-Menge in transfizierten NS-Keratinocyten. Die SCTE-Menge ist in rAAV-2 LEKTI transfizierten Zellen nach einem Tag im Differenzierungsmedium signifikant erhöht, unterscheidet sich aber sonst nicht signifikant zu rAAV-2 GFP transfizierten Zellen. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 42)

Tabelle 39: SCTE-Menge in transfizierten Netherton-Keratinocyten

SCTE-Proteinmenge	(n=4)	Mittelwert	SD	Fache Expression	p-Wert (1,1)
ohne Ca ²⁺	rAAV2-GFP	72,1	31,6		
	rAAV2-LEKTI	79,1	13,6	1,6	0,309
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	39,3	15,9		
	rAAV2-LEKTI	61,5	12,2	1,8	0,039
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	60,3	15,3		
	rAAV2-LEKTI	58,2	10,0	1,0	0,375
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	55,1	14,4		
	rAAV2-LEKTI	60,7	19,0	1,1	0,135

4.6.5.3 Vergleich der SCCE-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten

Abbildung 45 und Tabelle 40 vergleichen die SCCE-Menge zwischen gesunden (n=5) und Netherton Syndrom Keratinocyten (n=3). Die SCCE-Menge in NS-Keratinocyten (n=3) ist im Vergleich zu gesunden Keratinocyten (n=5) im Proliferationsmedium 3,4 x

höher (signifikant). Im Differenzierungsmedium ist die SCCE-Menge nach einem Tag 1,8 x höher, nach zwei Tagen 7,0 x höher (signifikant) und nach drei Tagen 9,7 x höher (signifikant) als in gesunden Zellen (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 40).

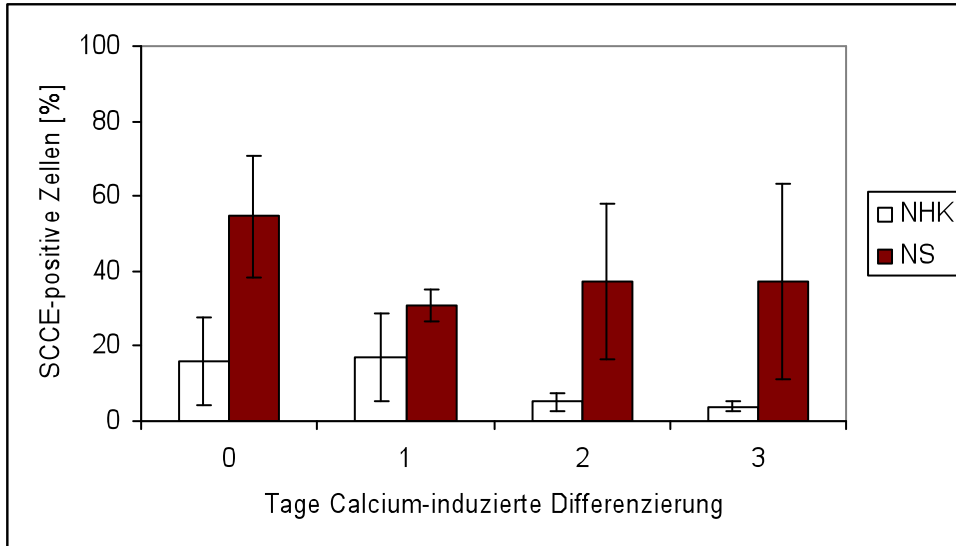


Abbildung 45: SCCE-Menge in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten. Die SCCE-Menge in NS-Keratinozyten (n=3) ist im Vergleich zu gesunden Keratinozyten (n=5) nach Inkubation im Proliferationsmedium 3,4 x höher (signifikant), nach einem Tag im Differenzierungsmedium 1,8 x höher, nach zwei Tagen 7,0 x höher und nach drei Tagen 9,7 x höher. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 43)

Tabelle 40: Vergleich der SCCE-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinozyten

SCCE-Proteinmenge	gesunde Zellen		Patientenzellen		FTEST	p-Wert
	Mittelwert	sd	Mittelwert	sd		
ohne Ca ²⁺	16,0	12,0	55,0	16,0	0,447	0,007
ein Tag Ca ²⁺	17,0	12,0	31,0	4,0	0,477	0,123
zwei Tage Ca ²⁺	5,0	2,0	37,0	21,0	0,001	0,013
drei Tage Ca ²⁺	4,0	1,0	37,0	26,0	0,00004	0,024

Tabelle 41 zeigt die Analyse der Calcium-Abhängigkeit der SCCE-Menge in gesunden Keratinozyten (n=5). Nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium ist die SCCE-Menge etwa 65 % geringer als im Proliferationsmedium. Die Abnahme ist nach

zwei Tagen signifikant geringer als nach einem Tag im Differenzierungsmedium und nach drei Tagen signifikant geringer als im Proliferationsmedium und nach einem Tag im Differenzierungsmedium.

Die SCCE-Menge wird in Keratinozyten von NS-Patient 1,4 und 6 wie in gesunden Zellen im Differenzierungsmedium signifikant verringert. Nach einem Tag Kultivierung im Differenzierungsmedium ist die SCCE-Menge 37 % geringer, nach zwei Tagen 45% geringer und nach drei Tagen 50 % geringer als im Proliferationsmedium (Tabelle 44).

Tabelle 41: SCCE-Menge in Abhängigkeit von Calcium

SCCE- Proteinmenge	Mittelwert	SD	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=5)					
ohne Ca ²⁺	16,0	12,0			
ein Tag Ca ²⁺	17,0	12,0	0,436		
zwei Tage Ca ²⁺	5,0	2,0	0,058	0,040	
drei Tage Ca ²⁺	4,0	1,0	0,039	0,026	0,164
NS-Patienten (n=3)					
ohne Ca ²⁺	55,0	16,0			
ein Tag Ca ²⁺	31,0	4,0	0,045		
zwei Tage Ca ²⁺	37,0	21,0	0,200	0,287	
drei Tage Ca ²⁺	37,0	26,0	0,234	0,323	0,499

4.6.5.4 SCCE-Proteinmenge in transfizierten NS-Keratinozyten

Abbildung 46 und Tabelle 42 zeigen, dass die SCCE-Expression nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI nach einem Tag im Differenzierungsmedium deutlich höher ist als in rAAV-2 GFP transfizierten Zellen (signifikant). Nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium sind die Proben aber nicht signifikant unterschiedlich.

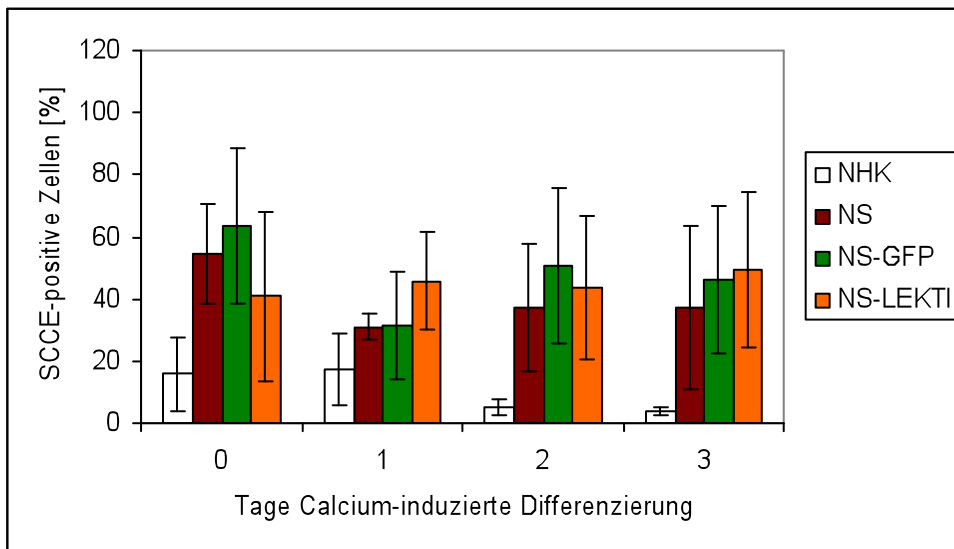


Abbildung 46: SCCE-Menge in transfizierten Netherton- Keratinozyten. Die SCCE-Menge ist in rAAV-2 LEKTI transfizierten Zellen nach einem Tag und nach drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant erhöht und unterscheiden sich sonst nicht signifikant von rAAV-2 GFP transfizierten Zellen. (einseitiger T-Test; siehe Tabelle 42)

Tabelle 42: SCCE-Menge in transfizierten Netherton-Keratinozyten

SCCE-Proteinmenge	(n=4)	Mittelwert	SD	Fache Expression	FTEST	p-Wert (1,1)
ohne Ca ²⁺	rAAV2-GFP	63,4	24,9			
	rAAV2-LEKTI	40,8	27,2	1,6	0,200	0,309
ein Tag Ca ²⁺	rAAV2-GFP	31,5	17,5			
	rAAV2-LEKTI	45,8	15,9	1,8	0,670	0,039
zwei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	50,5	24,9			
	rAAV2-LEKTI	43,8	22,9	1,0	0,448	0,375
drei Tage Ca ²⁺	rAAV2-GFP	46,4	23,6			
	rAAV2-LEKTI	49,4	25,3	1,1	0,661	0,135

4.7. Funktionelle Untersuchungen

Nachdem nun geklärt war, dass die in NS-Zellen eingebrachte LEKTI-cDNA zu LEKTI-mRNA transkribiert wurde und diese mRNA auch zu LEKTI-Proteinen umgewandelt wurde, musste nun noch die Funktionalität dieser Proteine gezeigt werden.

Da es sich bei LEKTI um einen Inhibitor von Serinproteasen handelt, bot es sich an, einen indirekten Test auf diese inhibitorische Aktivität durch Messung der ungehemmten Enzym-Aktivität der Trypsin-ähnlichen Serinprotease SCTE bzw. der Chymotrypsin-ähnlichen Serinprotease SCCE durchzuführen. Eine hohe Aktivität der Proteasen deutet eine geringe Hemmung durch LEKTI an, eine niedrige Aktivität dagegen eine starke Hemmung. Die Bestimmung der Enzym-Aktivität erfolgte durch Zugabe eines Fluorophor-gekoppelten Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Substrates zu den Zellhomogenaten von gesunden bzw. NS-Keratinocyten, die vor der Ernte im Proliferations- oder im Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. In der Literatur war der Test mit dem Trypsin-Substrat mit Stratum corneum Proben von NS-Patienten [Komatsu et al., 2002] bzw. von Ichthyosis vulgaris Patienten [Suzuki et al., 1996] bereits durchgeführt worden. NS-Patienten zeigten dabei eine höhere hydrolytische Aktivität (schwerer Phänotyp 5x höher, milder Phänotyp 2x höher) als gesunde Probanden [Komatsu et al., 2002].

Nach Bestimmung der Gesamtproteinmenge über einen BCA-Proteinbestimmungstest wurde dieselbe Proteinmenge von jedem Ansatz verwendet und mit einem Amino-methyl-coumarin-gekoppelten Substrat inkubiert. Die Abspaltung des fluoreszierenden 7-Amino-Methyl-Coumarin (AMC) durch die untersuchte Protease wurde in einem Fluoreszenzspektrophotometer bei 37°C gemessen (Duplikate). Über eine Standardkurve, die durch Messung definierter Mengen von AMC erhalten wurde (Triplikate), wurde die entstandene AMC-Menge in den Reaktionsansätzen bestimmt. Letztlich folgte eine Umrechnung der Ansätze auf 1 mg Protein und die Bestimmung der Aktivität im linearen Abschnitt der Reaktionskurven als nmol AMC/(mg Protein x min).

4.7.1 Vergleich der Trypsin-Aktivität in gesunden und NS Keratinozyten

Um die ungehemmte Trypsin-ähnliche-Aktivität von SCTE zu bestimmen wurde als Substrat BOC-Phe-Ser-Arg-AMC eingesetzt. Abbildung 47 und Tabelle 43 zeigen den Vergleich der hydrolytischen Aktivität in Homogenaten von gesunden (n=10) und NS-Keratinozyten (n=4). NS-Keratinozyten zeigen nach einem und nach drei Tagen im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere Trypsin-ähnliche Aktivität als gesunde Keratinozyten.

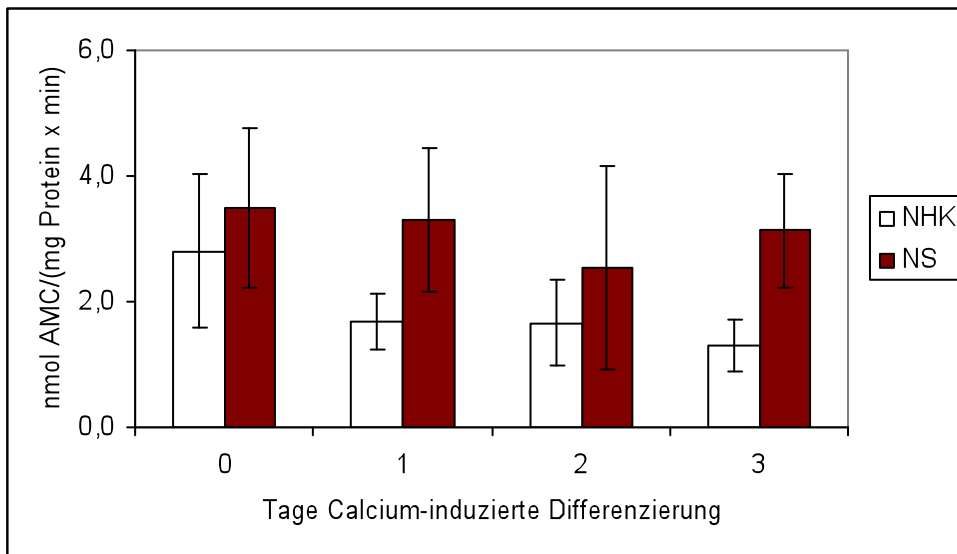


Abbildung 47: Trypsin-Aktivität in gesunden Keratinozyten im Vergleich zu NS-Keratinozyten. Die Trypsin-Aktivität in Netherton Syndrom Keratinozyten (n=4) ist im Vergleich zu gesunden Keratinozyten (n=10) im Differenzierungsmedium signifikant geringer. (zweiseitiger T-Test; siehe Tabelle 43)

Tabelle 43 : Vergleich der Trypsin-Aktivität zwischen gesunden und NS Keratinozyten

Trypsin-Aktivität	gesunde Zellen		Patientenzellen		FTEST	p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD		
ohne Ca ²⁺	2,81	1,22	3,49	1,26	0,881	0,291
ein Tag Ca ²⁺	1,68	0,44	3,30	1,13	0,010	0,006
zwei Tage Ca ²⁺	1,66	0,68	2,53	1,62	0,018	0,217
drei Tage Ca ²⁺	1,30	0,41	3,14	0,90	0,029	< 0,001

Gesunde humane Keratinozyten zeigen im Proliferationsmedium die höchste AMC-Freisetzung aus dem Substrat. Die Kultivierung von gesunden humanen Keratinozyten in Differenzierungsmedium führt zu einer signifikanten Abnahme der AMC-Bildung. Die Aktivität wird nach einem Tag im Differenzierungsmedium um 40 % erniedrigt, nach zwei Tagen um 41 % und nach drei Tagen um 54 % (Tabelle 44). In gesunden Keratinozyten ist also eine deutliche Abnahme der Aktivität durch die Kultivierung der Zellen in Calcium-haltigen Medium zu beobachten. Diese Abnahme ist nach Kultivierung in Differenzierungsmedium für drei Tage am stärksten signifikant.

In Keratinozyten von NS-Patient 1-4 (je 2 x gemessen) nimmt die hydrolytische Trypsin-ähnliche Aktivität nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium um 48 % ab, diese Abnahme ist aber nicht signifikant. Nach drei Tagen im Differenzierungsmedium steigt die hydrolytische Aktivität erneut an und ist nur mehr 18 % geringer als der Wert im Proliferationsmedium.

Tabelle 44: Trypsin-Aktivität in Abhängigkeit von Calcium

Trypsin-Aktivität	Mittelwert	SD	FTEST	p-Wert (1,2)
gesunde Spender (n=10)				
ohne Ca ²⁺	2,81	1,22		
ein Tag Ca ²⁺	1,68	0,44	0,005	0,024
zwei Tage Ca ²⁺	1,66	0,68	0,098	0,028
drei Tage Ca ²⁺	1,30	0,41	0,003	0,005
NS-Patienten (n=4)				
ohne Ca ²⁺	3,49	1,26		
ein Tag Ca ²⁺	3,30	1,13	0,782	0,772
zwei Tage Ca ²⁺	2,53	1,62	0,524	0,236
drei Tage Ca ²⁺	3,14	0,90	0,396	0,558

4.7.2 Trypsin-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion

Um die Funktionalität der in transfizierte NS- Keratinozyten eingebrachten LEKTI-cDNA zu testen, wurde auch hier die hydrolytische Trypsin-Aktivität in den Zellhomogenaten bestimmt. Da die Patienten unterschiedliche Mutationen im *SPINK5*-Gen aufwiesen, wurden sie im Folgenden einzeln betrachtet.

4.7.2.1 SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 1

Abbildung 48 und die Tabellen 45 und 46 zeigen die hydrolytische Aktivität in NS-Patient 1 nach rAAV-2 Transfektion. Bei NS-Patient 1 wurde durch die Sequenzierung nur eine Mutation in Exon 5 gefunden, diese liegt in LEKTI-Domäne 2.

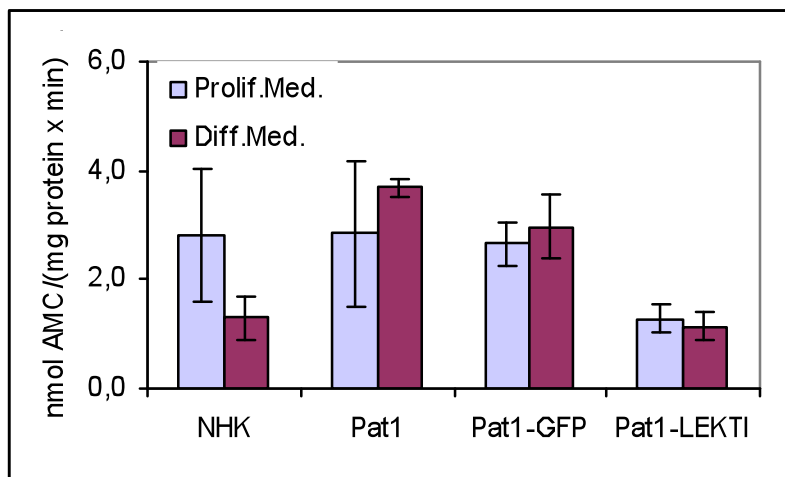


Abbildung 48: Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten (n=3) bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 1. Die hydrolytische Aktivität von untransfizierten und rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen ist nicht signifikant unterschiedlich. Nach rAAV-2 LEKTI Transfektion ist die Aktivität im Vergleich zur rAAV-2 GFP Transfektion signifikant erniedrigt und nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen. Diese Abnahme ist nach Kultivierung der Zellen im Differenzierungsmedium für drei Tage signifikant.

Tabelle 45: Vergleich der Aktivität von Patient 1 mit gesunden Zellen

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
NHK	2,81	1,30		
sd	1,22	0,41		
NS-Patient 1	2,84	3,69	0,975	< 0,001
sd	1,33	0,16		
rAAV-2 GFP	2,66	2,96	0,856	< 0,001
sd	0,40	0,58		
rAAV-2 LEKTI	1,28	1,15	0,074	0,525
sd	0,24	0,25		

Tabelle 46: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von Patient 1

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
rAAV-2 GFP	2,66	2,96		
sd	0,40	0,58		
rAAV-2 LEKTI	1,28	1,15	0,014	0,015
sd	0,24	0,25		

Die Transfektion von Netherton Patient 1 mit rAAV-2 LEKTI führte also zu einer signifikanten Abnahme der hydrolytischen Aktivität im Vergleich zu rAAV-2 GFP transfizierten Zellen. Diese Abnahme bewirkt, dass die hydrolytische Aktivität versus gesunden Zellen nicht mehr signifikant erhöht ist.

4.7.2.2 SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 2

Abbildung 49 und die Tabellen 47 und 48 zeigen die hydrolytische Aktivität in NS-Patient 2 nach rAAV-2 Transfektion. Bei NS-Patient 2 wurde durch die Sequenzierung

eine Mutation in Exon 5 gefunden (LEKTI-Domäne 2) und eine Mutation in Intron 15 (LEKTI-Domäne 7).

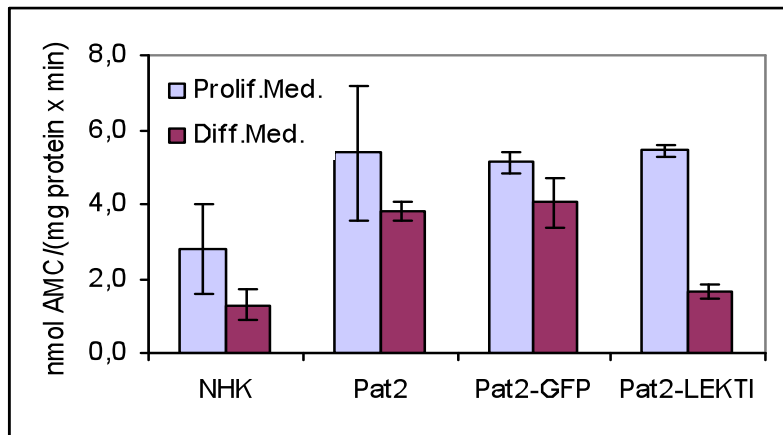


Abbildung 49: Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 2 (n=3). Die hydrolytische Aktivität von untransfizierten und rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen ist nicht signifikant unterschiedlich. Nach rAAV-2 LEKTI Transfektion ist die hydrolytische Aktivität im Vergleich zur rAAV-2 GFP Transfektion signifikant erniedrigt und nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen. Diese Abnahme ist nach Kultivierung der Zellen im Differenzierungsmedium für drei Tage signifikant. (zweiseitiger TTEST)

Tabelle 47: Vergleich der Aktivität von Patient 2 mit gesunden Zellen

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
NHK	2,81	1,30		
sd	1,22	0,41		
NS-Patient 2	3,41	3,61	0,489	0,017
sd	1,01	0,55		
rAAV-2 GFP	5,12	4,05	0,036	< 0,001
sd	0,30	0,66		
rAAV-2 LEKTI	5,45	1,65	0,019	0,216
sd	0,15	0,21		

Tabelle 48: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von NS-Patient 2

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
rAAV-2 GFP	5,12	4,05		
sd	0,30	0,66		
rAAV-2 LEKTI	5,45	1,65	0,421	0,008
sd	0,15	0,21		

Auch in diesem Patienten bewirkt die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zu rAAV-2 GFP transfizierten Zellen. Durch diese Abnahme ist die hydrolytische Aktivität nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen.

4.7.2.3 SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 3

Abbildung 50 und die Tabellen 49 und 50 zeigen die hydrolytische Aktivität in NS-Patient 3 nach rAAV-2 Transfektion. Bei NS-Patient 3 wurde durch die Sequenzierung eine homozygote Mutation in Intron 15 (LEKTI-Domäne 7) gefunden.

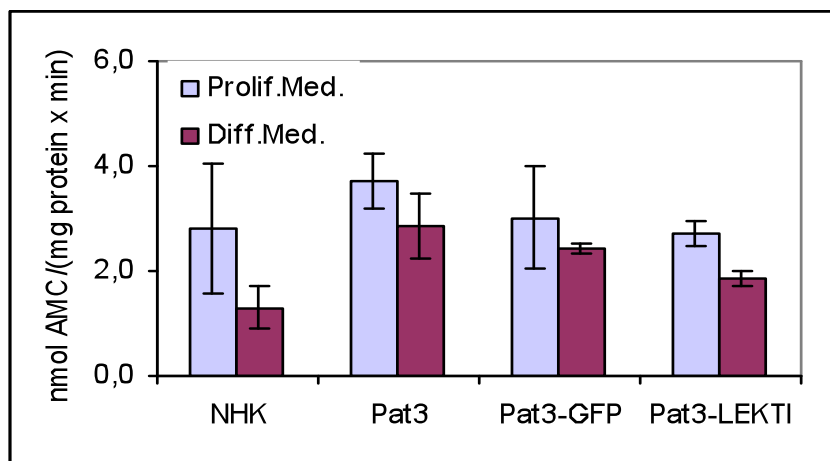


Abbildung 50: Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 3 (n=3). Die hydrolytische Aktivität von untransfizierten und rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen ist nicht signifikant unterschiedlich. Nach rAAV-2 LEKTI Transfektion ist die hydrolytische Aktivität im Vergleich zur rAAV-2 GFP Transfektion signifikant erniedrigt und nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen. Diese Abnahme ist nach Kultivierung der Zellen im Differenzierungsmedium für drei Tage signifikant. (zweiseitiger T-TEST)

Tabelle 49: Vergleich der Aktivität von NS-Patient 3 mit gesunden Zellen

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
NHK	2,81	1,30		
sd	1,22	0,41		
NS-Patient 3	3,70	2,87	0,280	< 0,001
sd	0,52	0,61		
rAAV-2 GFP	3,01	2,43	0,811	0,001
sd	0,97	0,11		
rAAV-2 LEKTI	2,71	1,85	0,901	0,058
sd	0,23	0,15		

Auch in diesem Patienten bewirkt die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zu rAAV-2 GFP transfizierten Zellen. Durch diese Abnahme ist die hydrolytische Aktivität nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen.

Tabelle 50: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von NS-Patient 3

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
rAAV-2 GFP	3,01	2,43		
sd	0,97	0,11		
rAAV-2 LEKTI	2,71	1,85	0,689	0,010
sd	0,23	0,15		

4.7.2.4 SCTE-Aktivität nach rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 4

Abbildung 51 und die Tabellen 51 und 52 zeigen die hydrolytische Aktivität in NS-Patient 4 nach rAAV-2 Transfektion. Bei NS-Patient 4 wurde durch die Sequenzierung eine Missense-Mutation in Exon 10 gefunden (LEKTI-Domäne 4). Durch diese Mutation entsteht ein zusätzliches Cystein in dieser Domäne, das eventuell einen Einfluss auf die

LEKTI-Funktion nehmen könnte, da diese von den für das Kazal-Motiv wichtigen Cystein-Resten abhängt [Mägert et al., 1999; Bitoun et al., 2003].

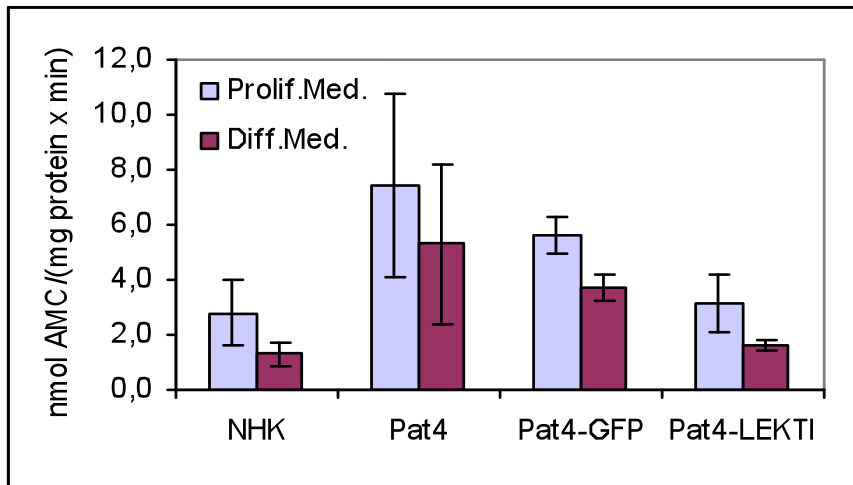


Abbildung 51: Vergleich der hydrolytischen Aktivität von gesunden Keratinozyten (NHK, n=10), untransfizierten (n=3) bzw. transfizierten Keratinozyten von NS-Patient 4 (n=2). Die hydrolytische Aktivität von untransfizierten und rAAV-2 GFP-transfizierten Zellen ist nicht signifikant unterschiedlich. Nach rAAV-2 LEKTI Transfektion ist die hydrolytische Aktivität im Vergleich zur rAAV-2 GFP Transfektion erniedrigt und nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen. Diese Abnahme ist nach Kultivierung der Zellen im Differenzierungsmedium für drei Tage signifikant. (zweiseitiger TTEST)

Tabelle 51: Vergleich der Aktivität von Patient 4 mit gesunden Zellen

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif. medium	p-Wert Diff. medium
NHK	2,81	1,30		
sd	1,22	0,41		
NS-Patient 4	7,43	5,32	0,006	0,010
sd	3,31	2,91		
rAAV-2 GFP	5,62	3,70	0,016	< 0,001
sd	0,68	0,49		
rAAV-2 LEKTI	3,14	1,60	0,751	0,384
sd	1,07	0,19		

Tabelle 52: Vergleich der Aktivität in den Transfektanten von NS-Patient 4

SCTE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
rAAV-2 GFP	5,62	3,70		
sd	0,68	0,49		
rAAV-2 LEKTI	3,14	1,60	0,190	0,057
sd	1,07	0,19		

4.7.3 Vergleich der SCCE-Aktivität in gesunden und NS-Keratinocyten

Um zu überprüfen, ob LEKTI außer dem unter 4.7.2 beschriebenen Einfluss auf die Protease SCTE, auch einen Einfluss auf die Protease SCCE hat, wurde auch die SCCE-Aktivität in Keratinocyten untersucht. Wie die Abbildung 45 zeigte, ist in NS-Keratinocyten auch die SCCE-Proteinmenge deutlich höher als in gesunden Zellen.

Für die Messung dieser Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität wurde das Chymotrypsin-Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC verwendet. Durch Verwendung dieses Substrates, das spezifisch für Chymotrypsin-ähnliche Proteasen ist, wurde zunächst untersucht, ob sich die Aktivität der Chymotrypsin-ähnlichen Protease SCCE (humanes Kallikrein 7) zwischen gesunden und NS-Keratinocyten unterscheidet und dies durch einen Funktionstest nachweisbar ist.

Abbildung 52 und die Tabelle 53 zeigen das Ergebnis der Untersuchung der Aktivität dieser Protease in n=3 gesunden Keratinocyten sowie den NS-Keratinocyten von Patient 2, 3 und 4, die zuvor im Proliferationsmedium bzw. für drei Tage im Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Wenn LEKTI einen Einfluss auf die Protease SCCE hat, sollte durch die Mutation in LEKTI eine deutlich höhere Aktivität in den NS-Keratinocyten vorhanden sein, als in gesunden Zellen.

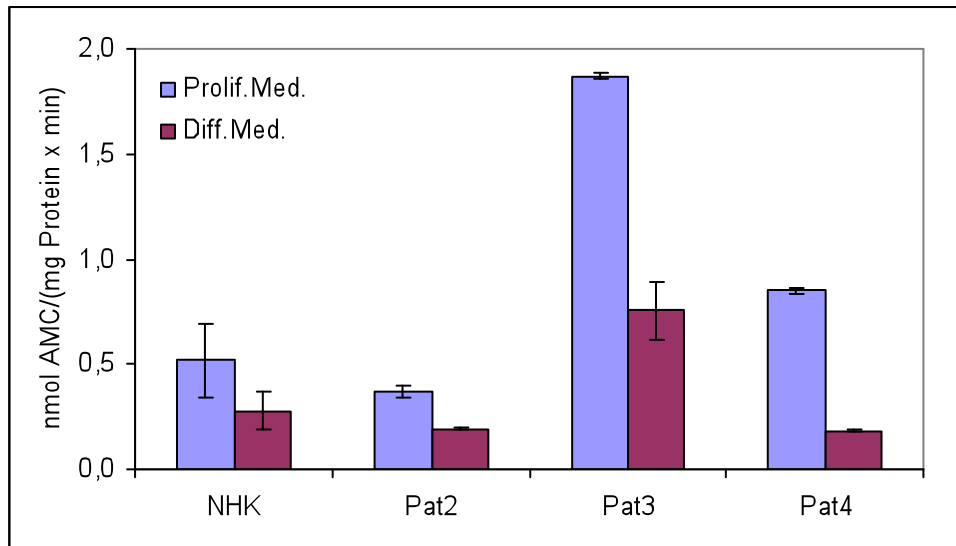


Abbildung 52: Vergleich der SCCE-Aktivität in n=3 gesunden (NHK) und NS-Keratinocyten von Patient 2, Patient 3 und Patient 4. Im Proliferationsmedium ist die SCCE-Aktivität in NS-Keratinocyten in Patient 3 signifikant erhöht und in Patient 4 etwa doppelt so hoch wie in gesunden Keratinocyten, in Patient 2 sieht man dagegen keinen Unterschied. Im Differenzierungsmedium zeigt nur Patient 3 eine signifikant höhere Chymotrypsin-Aktivität als gesunde Zellen.

Tabelle 53: Vergleich der SCCE-Aktivität in gesunden und NS Keratinocyten

	Prolif. medium	Diff. medium (3 Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
NHK	0,52	0,28		
sd	0,18	0,09		
NS-Patient 2	0,37	0,19	0,107	0,084
sd	0,03	0,01		
NS-Patient 3	1,87	0,76	< 0,001	0,004
sd	0,01	0,14		
NS-Patient 4	1,06	0,44	0,061	0,063
sd	0,52	0,31		

4.7.3.1 SCCE-Aktivität nach Transfektion mit rAAV-2 Transfektion von NS-Patient 3

Nur in NS-Patient 3 sind signifikante Unterschiede in der Aktivität der Protease SCCE im Vergleich zu gesunden Zellen zu sehen. Um zu überprüfen, ob diese erhöhte Aktivität in den Zellen von NS-Patient 3 aus der Mutation in LEKTI resultiert und sich

durch die Transfektion mit intakter LEKTI-cDNA senken lässt, wurden die Zellen von NS-Patient 3 mit rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP transfiziert und danach die Aktivität mit dem Chymotrypsin-Substrat gemessen.

Wie Abbildung 53 und Tabelle 54 zeigen, bewirkt die Transfektion von Keratinozyten aus NS-Patient 3 mit rAAV-2 LEKTI keine Senkung der Chymotrypsin-Aktivität im Differenzierungsmedium, aber eine geringe Senkung im Proliferationsmedium.

Die Aktivität der Protease SCCE ist aber sowohl im Proliferationsmedium als auch im Differenzierungsmedium auch nach der Transfektion mit rAAV-2 LEKTI noch signifikant versus den gesunden Zellen erhöht. Die Werte in den untransfizierten Zellen, den rAAV-2 GFP transfizierten Zellen und den rAAV-2 LEKTI transfizierten Zellen unterscheiden sich im Differenzierungsmedium kaum. Die Abnahme der Aktivität der Protease SCCE im Differenzierungsmedium versus der im Proliferationsmedium scheint also nicht an einer Hemmung durch LEKTI zu liegen.

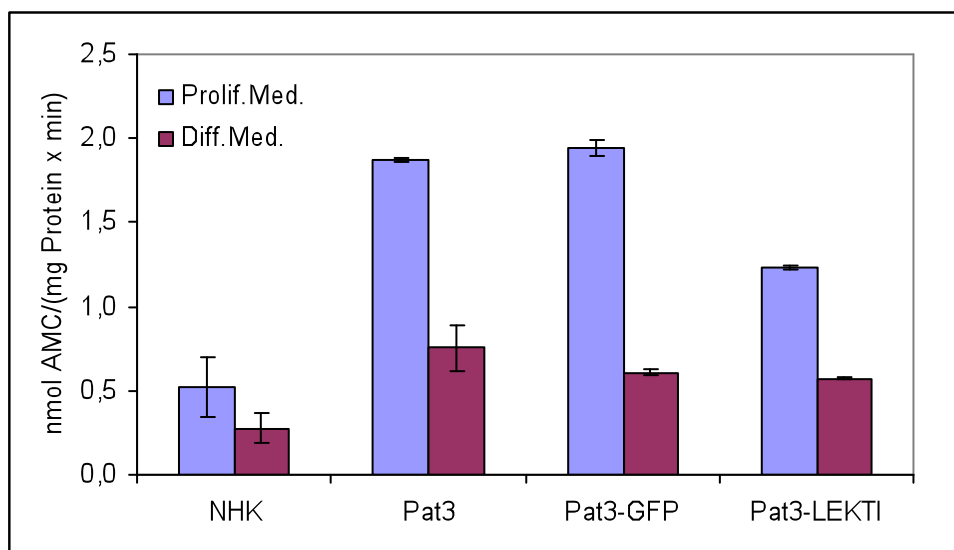


Abbildung 53: Vergleich der SCCE-Aktivität in n=3 gesunden (NHK) Keratinozyten von NS-Patient 3. Dieser Patient zeigt sowohl im untransfizierten Zustand als auch nach Transfektion mit rAAV-2 GFP bzw. rAAV2-LEKTI eine deutlich höhere Aktivität als gesunde Zellen.

Tabelle 54: SCCE-Aktivität nach Transfektion von NS-Patient 3

SCCE-Aktivität	Prolif. medium	Diff. medium (drei Tage)	p-Wert Prolif.medium	p-Wert Diff.medium
NHK	0,52	0,28		
sd	0,18	0,09		
NS-Patient 3	1,87	0,76	< 0,001	0,004
sd	0,01	0,14		
rAAV-2 GFP	1,94	0,61	< 0,001	0,004
sd	0,05	0,02		
rAAV-2 LEKTI	1,23	0,57	< 0,001	0,007
sd	0,01	0,01		

4.8 Dotblot- und Westernblot-Analysen

4.8.1 Dotblot-Analysen in Keratinozyten

Abbildung 54 zeigt einen in gesunden Keratinozyten durchgeführten Dotblot. Die Keratinozyten wurden wie oben beschrieben im Proliferationsmedium oder im Differenzierungsmedium für ein bis drei Tage kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Überstände abgenommen und mit Hilfe von Amicon-Zentrifugenröhrchen konzentriert. Parallel dazu wurden die Keratinozyten geerntet und durch Zugabe eines hypotonischen Lysepuffers deren Proteine gewonnen. Sowohl mit den konzentrierten Überständen (ÜS) als auch mit den zellulären Proteinen wurde anschließend ein BCA-Proteinbestimmungstest durchgeführt und jeweils 10 µg jeder Bedingung mit Hilfe einer Dotblot-Apparatur auf eine PVDF-Membran transferriert. Anschließend wurde die Membran mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (siehe Abb. 54).

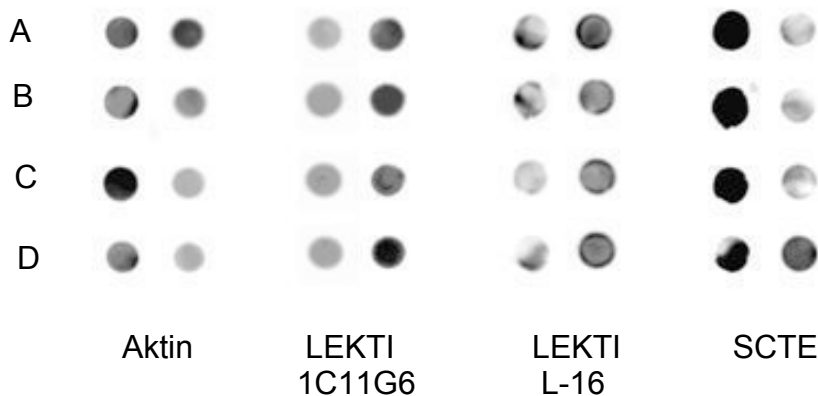


Abbildung 54: Dotblot in gesunden Keratinozyten. Aufgetragen wurden je 10 µg Gesamtprotein aus Zellen (Z) oder konzentrierter Überstand (ÜS). Die Zellen waren vor der Ernte ohne Calcium (A) oder für einen Tag (B), zwei Tage (C) oder drei Tage (D) im Differenzierungsmedium kultiviert worden. Danach erfolgte die Färbung mit den Antikörpern für beta-Aktin, LEKTI (Klon 1C11G6 und Klon L-16) und SCTE.

Aktin wurde zwar hauptsächlich in den Zellen detektiert, konnte aber auch im konzentrierten Überstand gefärbt werden. Die höchste Aktin-Menge wurde innerhalb der Zellen nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium detektiert.

Für die Detektion von LEKTI wurden zwei verschiedene Klone getestet, Klon 1C11G6 (erkennt rLEKTI D1-15, D1-6, D6-9, D9-12 stark und D13-15 schwach) und Klon L-16 (erkennt laut Santa Cruz das Vorläuferprotein und HF7665, also D6). Beide Antikörper färbten im Überstand mehr Protein an als innerhalb der Zellen.

Mit Hilfe dieses Dotblots sollte die Frage beantwortet werden, warum sich die Ergebnisse bzgl. der Calcium-abhängigen LEKTI-Expression in der Real Time-PCR und in der FACS-Analyse so stark voneinander unterscheiden. Offensichtlich wird sowohl im Proliferationsmedium als auch im Differenzierungsmedium bereits LEKTI von den Zellen ins Medium sezerniert und stand somit nicht für die intrazelluläre FACS-Analyse zur Verfügung.

4.8.2 Vergleichender Dotblot zwischen gesunden und NS-Keratinozyten

Abbildung 55 zeigt den Vergleich von Protein aus gesunden Keratinozyten mit dem aus Keratinozyten von NS-Patient 2. Bei diesem Patienten lag eine Stoppmutation in Domäne 2 vor, sowie eine Leserasterverschiebung in Domäne 7, wodurch 20 „falsche“ Aminosäuren in die Sequenz eingebaut wurden, bevor auch hier der Kettenabbruch erfolgte.

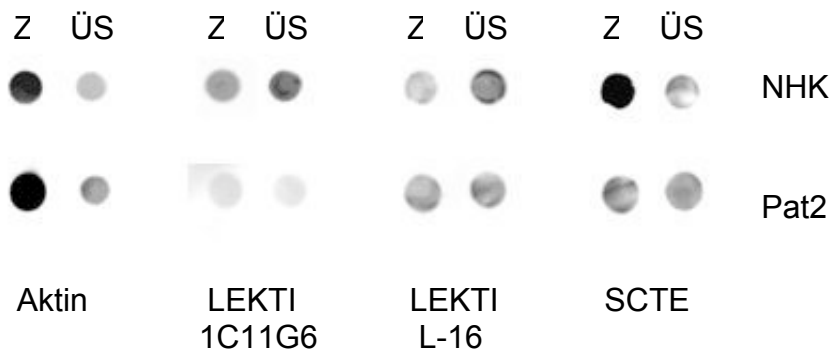


Abbildung 55: Dotblot in gesunden Keratinozyten und denen von NS-Patient 2.

Aufgetragen wurden je 10 µg Gesamtprotein aus Zellen (Z) oder konzentrierter Überstand (ÜS). Die Zellen waren vor der Ernte zwei Tage im Differenzierungsmedium kultiviert worden. Danach erfolgte die Färbung mit den Antikörpern für beta-Aktin, LEKTI (Klon 1C11G6 und Klon L-16) und SCTE.

Hier schien die LEKTI-Menge sowohl mit dem Klon 1C11G6 als auch L-16 in den konzentrierten Überständen bei NS-Patient 2 geringer zu sein als in denen von gesunden Zellen (NHK). Interessanterweise zeigte der Klon 1C11G6 im Vergleich zu L-16 sehr viel weniger LEKTI-Protein bei NS-Patient 2 an.

4.8.3 Westernblot-Untersuchungen in Keratinozyten

In Westernblot-Analysen erwies sich sowohl der Antikörperklon 1C11G6 als auch der Klon L-16 als ungeeignet, da in den meisten durchgeführten Analysen sehr starker Hintergrund detektiert wurde. Die Kontroll-Färbung mit dem beta-Aktin Antikörper zeigte dagegen keine Hintergrundfärbung. Abbildung 56 zeigt die Färbung von gesunden Keratinozyten

1 2 3 4 5 6

1 2 3 4 5 6

1 2 3 4 5 6

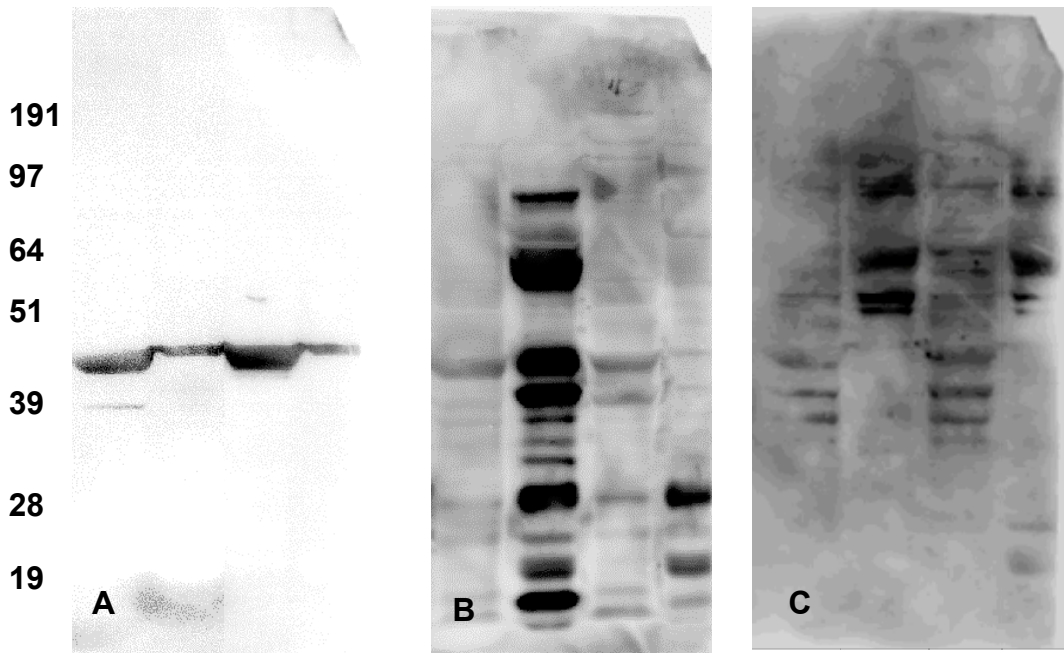


Abbildung 57: Westernblot in gesunden und NS-Keratinozyten. Aufgetragen wurden je 50 μg Gesamtprotein aus gesunden Zellen (1,2) bzw. aus Keratinozyten von NS-Patient 1 (3,4), die vor der Ernte im Differenzierungsmedium für zwei Tage kultiviert worden waren. Es wurden jeweils Proteine der Zellen (1,3) und Proteine aus konzentriertem Medium (2,4) aufgetragen. Danach erfolgte die Färbung mit den Antikörpern für beta-Aktin (A) oder LEKTI (Klon 1C11G6 (B) und Klon L-16 (C)).

4.9. Hautäquivalente und Histochemie

4.9.1 Histochemische Färbung in normaler Haut

Abbildung 58 zeigt Färbungen in Cryostatschnitten von normaler Haut, die mit den Antikörpern gegen Involukrin (A), Desmoglein-1 (B) und LEKTI (C) gefärbt wurden. Sowohl bei Involukrin als auch bei LEKTI ist die stärkste Färbung im Stratum granulosum zu sehen. Aber beide Moleküle können bereits in den darunterliegenden Keratinozytenschichten detektiert werden, was die FACS-Ergebnisse bestätigt.

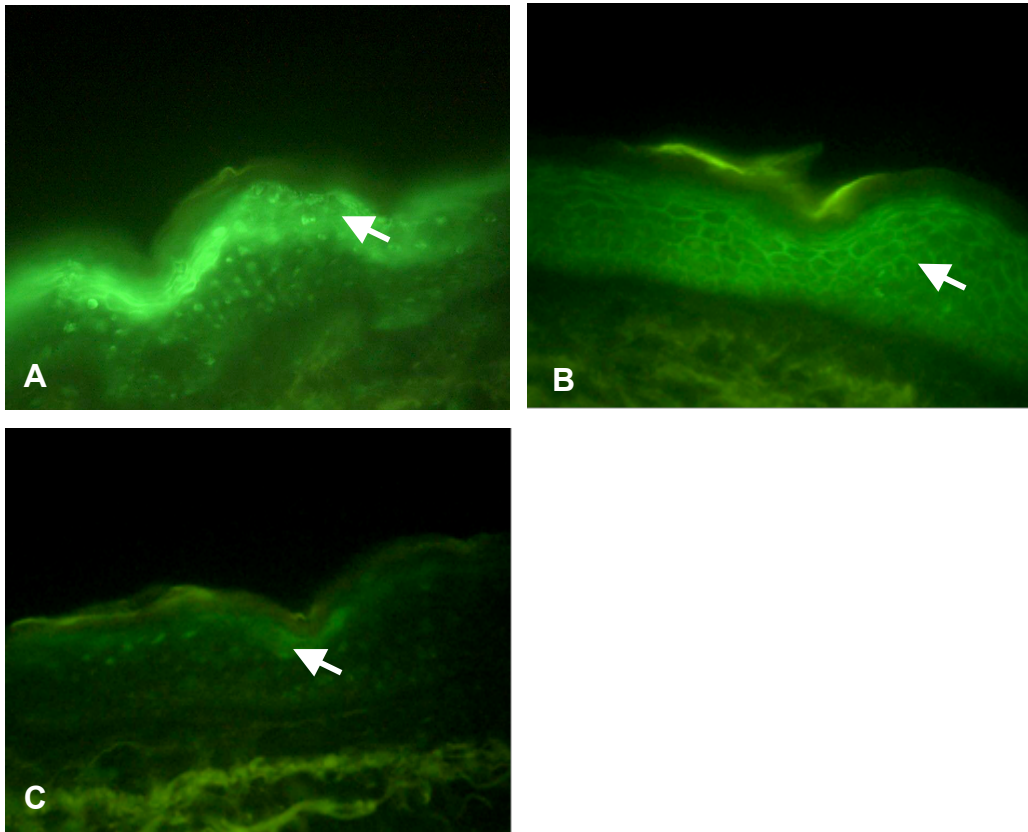


Abbildung 58: Histochemische Färbung in gesunder Haut. 4 μm -Cryostatschnitte wurden mit Antikörpern gegen Involukrin (A), Dsg1 (B) und LEKTI (C) gefärbt und mit einem Alexa488-gekoppelten 2. Antikörper gegengefärbt. Vergrößerung 400 x , Pfeil deutet auf gefärbte Bereiche.

4.9.2 Hautäquivalente auf Basis von dermaler Vorhaut

Abbildung 59 zeigt das Ergebnis der dreiwöchigen Kultivierung von gesunden Keratinozyten und rAAV-2 LEKTI bzw. rAAV-2 GFP transfizierten Keratinozyten auf dermaler Vorhaut. Die jeweils linke Abbildung zeigt die DAPI-Färbung, die rechte die Färbung mit dem LEKTI-Antikörper 1C11G6.

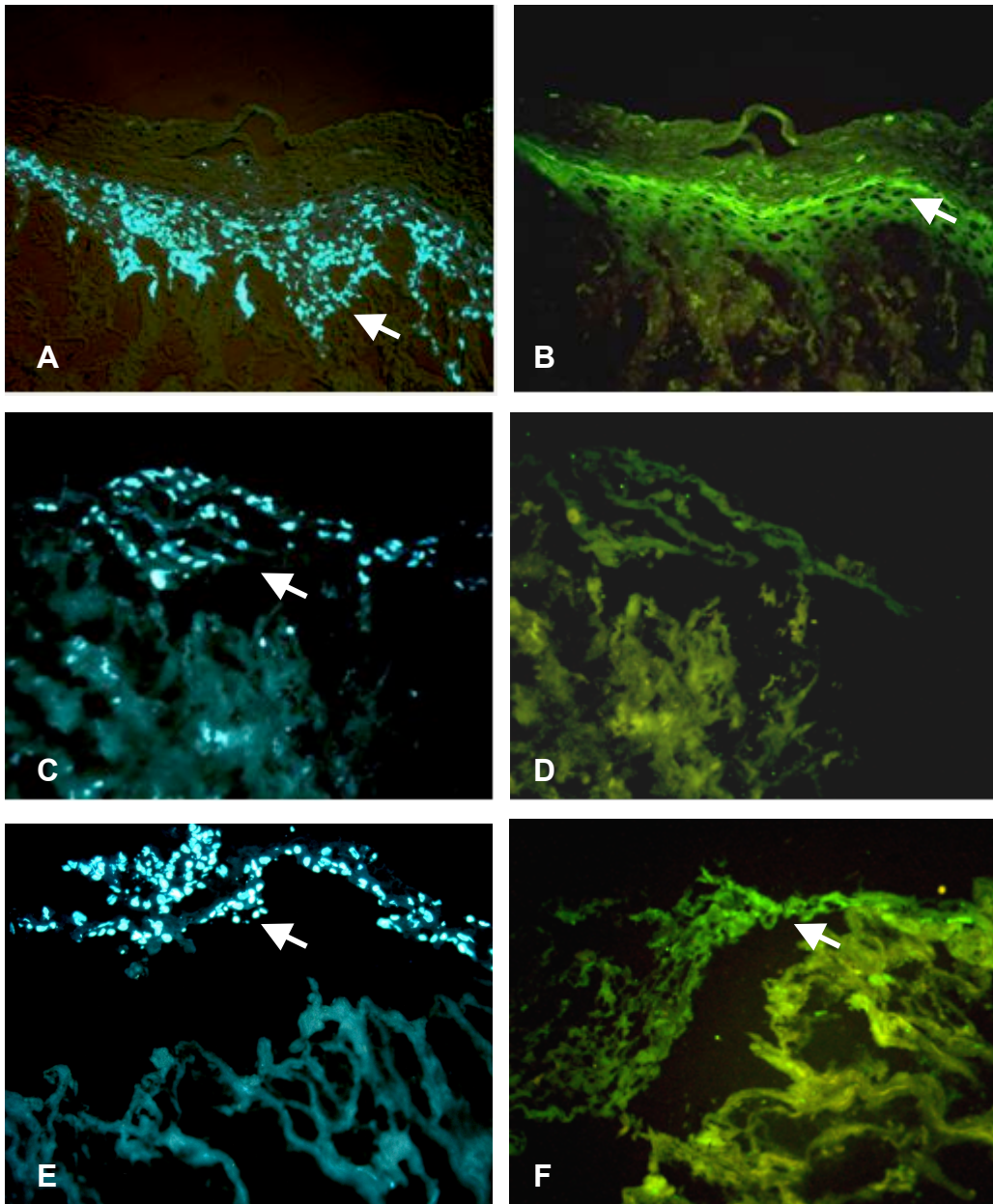


Abbildung 59: Histochemische Färbung in Hautäquivalenten . 4 μm -Cryostatschnitte wurden mit DAPI (A, C, E) oder einem Antikörper gegen LEKTI gefärbt (B, D, F). Vergrößerung 200 x .

Wie auch aus Abbildung 60 erkennbar wird, lassen sich die Keratinozyten der NS-Patienten nur sehr schlecht auf der dermalen Unterlage kultivieren. Möglicherweise ist die Absterberate während der dreiwöchigen Kultivierung größer als die Rate der neu gebildeten Zellen. Zumindest zeigen LEKTI-transfizierte Zellen (A) eine etwas bessere, kompaktere Morphologie (B) als GFP-transfizierte Zellen.

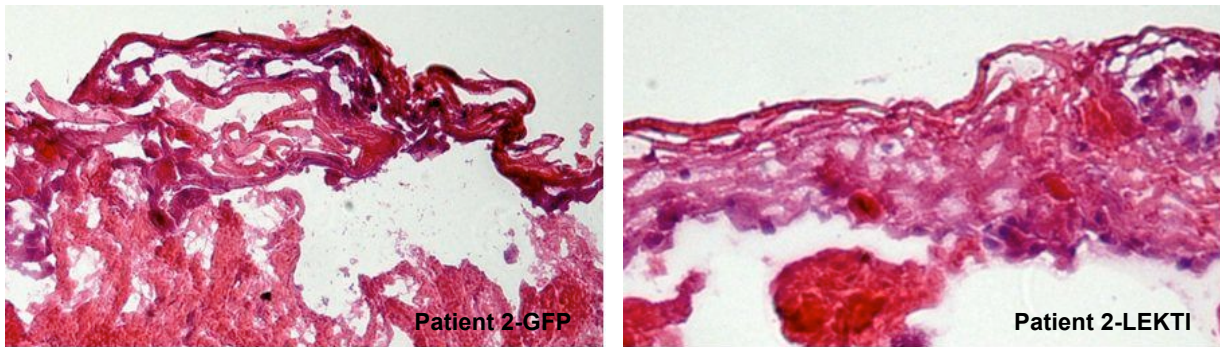
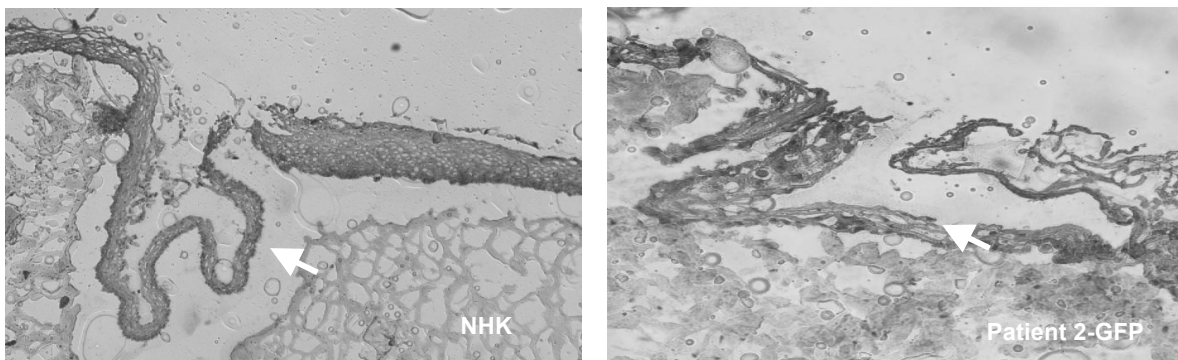


Abbildung 60: Hämalaun-Eosin-Färbung in Hautäquivalenten . 4 μm -Cryostatschnitte wurden mit Hämalaun und Eosin gefärbt (Vergrößerung 200 x).

In diesen wenigen Schichten von NS-Keratinocyten ist ein Vergleich der Färbung von LEKTI und von anderen Proteinen (Dsg1, Inv, nicht gezeigt) nicht möglich.

4.9.3 Hautäquivalente auf Collagen-Gelen

Abbildung 61 zeigt Hautäquivalente von gesunden Keratinocyten bzw. rAAV-2 GFP und rAAV-2 LEKTI transfizierten Keratinocyten von NS-Patient 2 auf einer Collagengel-Matrix. Das Problem bei dieser Methode war, dass die Anheftung der Keratinocyten nach unten weniger stark war als untereinander, wodurch beim Cryoschneiden eine Ablösung der Schichten erfolgte. Betrachtet man nur die Schichten an sich, zeigt sich hier 33 Tage nach der Transfektion in rAAV-2 LEKTI transfizierten Zellen (C) eine Stratum corneum ähnliche Struktur, die in den rAAV-2 GFP transfizierten Zellen (B) weniger erkennbar war.



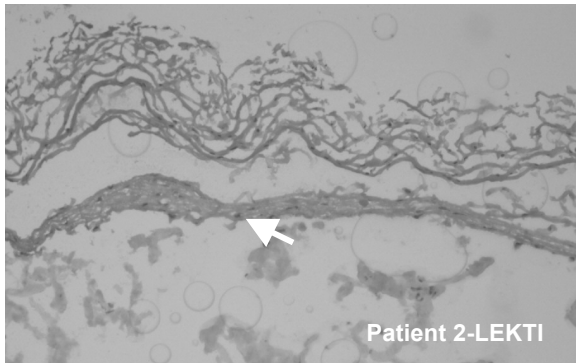


Abbildung 61: Hämalaun-Eosin-Färbung in Hautäquivalenten auf Collagengelen . 4 µm-Cryostat-schnitte wurden mit Hämalaun und Eosin gefärbt (Vergrößerung 100 x).

Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern waren in diesen Hautäquivalenten ebenfalls nicht zufrieden stellend (nicht gezeigt).

4.10 Cytochemie in transfizierten NS-Keratinocyten

Abbildung 62 zeigt das Ergebnis der Cytochemischen Färbung transfizierter NS-Keratinocyten, die neun Tage (NS-Patient 6; NS-Patient 1) bzw. 7 Tage (NS-Patient 2) nach der Transfektion durchgeführt wurde. Die NS-Patienten 6 und 1 zeigten eine stärkere Färbung der Moleküle Dsg1 und CDSN zumindest in einem Teil der rAAV-2 LEKTI transfizierten Zellen an. Die NS-Patienten 6 und 2 zeigten zudem auch eine stärkere Färbung von LEKTI, die im NS-Patienten1 aber nicht so deutlich war. NS-Patient 2 zeigte zwar ebenfalls eine stärkere Färbung von Dsg1, aber nicht von CDSN.

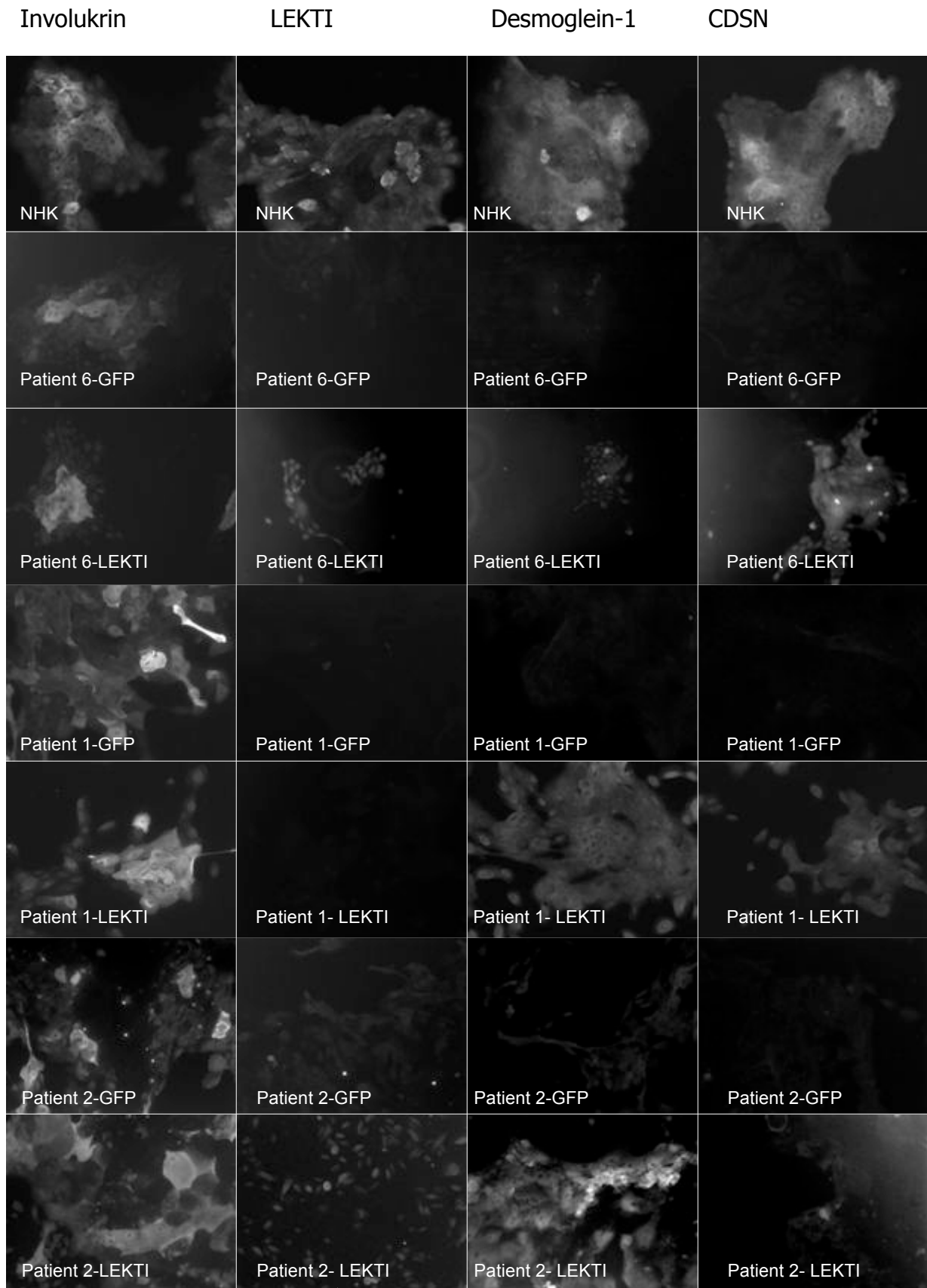


Abbildung 62: Cytochemische Färbung in transfizierten NS-Keratinocyten. Transfizierte NS-Keratinocyten von Patient 1, Patient 2 und Patient 6, die drei Tage im Differenzierungsmedium kultiviert worden waren, wurden mit Antikörpern gegen Involukrin, LEKTI, Dsg1 und CDSN gefärbt und die Ergebnisse untereinander und mit der Färbung in gesunden Keratinocyten verglichen (Vergrößerung 100 x).

Diese Ergebnisse deuten an, dass die Transfektion von NS-Keratinocyten mit rAAV-2 LEKTI Vektorpartikeln dazu führt, dass die Proteasesubstrate Dsg1 und CDSN zumindest in Patient 1 und 6 weniger stark abgebaut werden, was auf die erfolgreiche Inhibition der Proteasen durch LEKTI hindeutet.

4.11 Vergleich von gesunden und NS-Keratinocyten mit denen aus AD-Patienten

Da zum klinischen Erscheinungsbild vom Netherton Syndrom auch atopische Merkmale zählen, wie Hauterscheinungen, die atopischer Dermatitis (AD) ähneln, hohe IgE-Level und zahlreiche Allergien gegen Nahrungsmittel, wurde spekuliert, dass LEKTI in die Pathogenese von AD involviert sein könnte [Kiyohara et al., 2008]. Daher untersuchten wir auch die LEKTI-mRNA-Expression und inhibitorische Aktivität in Keratinocyten von Patienten mit atopischem Ekzem [Roedl et al., 2009].

Die AD-Keratinocyten stammten aus nicht-läsionaler Haut von drei AD-Patienten mit deutlichem klinischen AD-Bild und sehr hohen Serum-IgE-Leveln über 5.000 IU/ml. Alle drei AD-Patienten zeigten den SNP (single nucleotide polymorphism) 1258G→A in Exon 14 des *SPINK5*-Gens, der zu dem bereits für AD bekannten AS-Austausch Glu420→Lys führt [Walley et al., 2001; Kato et al., 2003; Kabesch et al., 2004; Kusunoki et al., 2005]. Zudem zeigten die Keratinocyten der drei AD-Patienten die Polymorphismen 1221-50G→A in Intron 13 und 1302+19G→A in Intron 15 des *SPINK5*-Gens.

Wie die in Abbildung 63 und Tabelle 55 dargestellten Ergebnisse der realtime-PCR Untersuchung zeigen, steigt die LEKTI-Expression im Laufe der Differenzierung in Medium mit hohem Calciumgehalt in gesunden Zellen (n=5) an, während NS-Patienten (n=3) aufgrund ihrer Mutationen im *SPINK5*-Gen keinen Anstieg zeigen. In AD-

Keratinocyten (n=3) steigt die LEKTI-Expression im Laufe der Differenzierung zwar ebenfalls an, aber zu einem signifikant geringeren Ausmaß als in gesunden Zellen (p=0,0004).

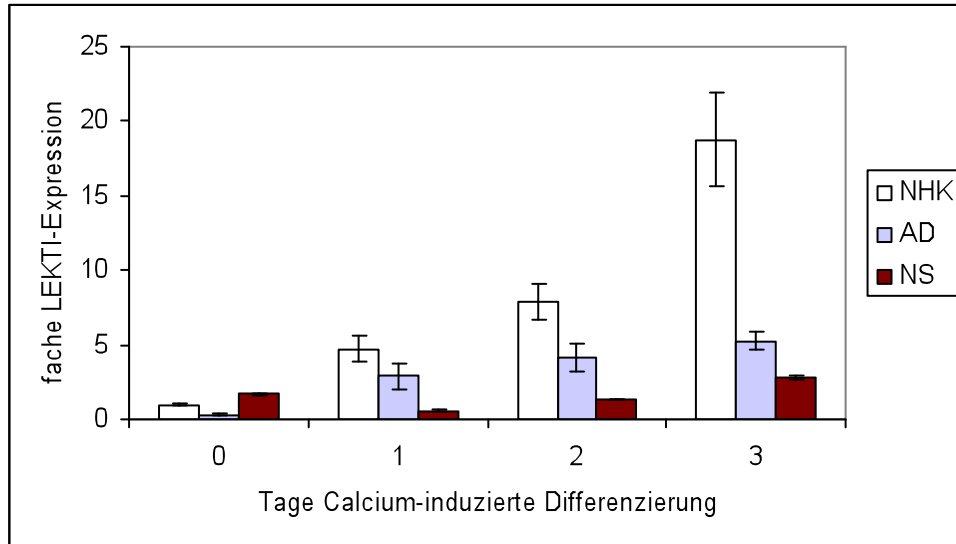


Abbildung 63: Vergleich der dCT-Werte der LEKTI-Expression in gesunden Keratinocyten (n=5) und in Keratinocyten von Patienten mit AD (n=3) und NS (n=3). AD-Patienten zeigen wie gesunde Zellen und damit im Ggs. zu NS-Patienten einen Calcium-abhängigen Anstieg in der LEKTI-mRNA-Expression. Dieser Anstieg ist aber signifikant niedriger als in gesunden Zellen (p=0,0004).

Tabelle 55: Vergleich der LEKTI-Expression von gesunden, AD und NS-Keratinocyten

	dCT NHK	dCT NS	dCT AD	ddCT NHK	ddCT NS	ddCT AD	Ratio NHK	Ratio NS	Ratio AD
ohne Ca ²⁺	20,08	19,31	21,74	0	-0,77	1,66	1,00	1,71	0,32
sd	2,08	0,48	3,65				0,10	0,04	0,05
1 Tag Ca ²⁺	17,83	20,84	18,55	-2,25	0,76	-1,52	4,74	0,59	2,87
sd	3,43	2,18	5,99				0,91	0,06	0,93
2 Tage Ca ²⁺	17,09	19,67	18,02	-2,99	-0,41	-2,06	7,94	1,33	4,16
sd	2,58	0,43	4,21				1,20	0,03	0,97
3 Tage Ca ²⁺	15,85	18,58	17,68	-4,23	-1,49	-2,40	18,77	2,82	5,27
sd	2,64	0,87	2,17						0,64

Um zu überprüfen, ob die signifikant verringerte LEKTI-mRNA Menge sich auf die hydrolytische Aktivität in AD-Patienten auswirken könnte, wurde ein Trypsin-Aktivitätstest mit gesunden Keratinozyten (n=5), NS-Keratinozyten (n=3) und AD-Keratinozyten (n=3) durchgeführt [Roedl et al., 2009].

Wie in Abbildung 64 zu erkennen ist, zeigen die Keratinozyten von AD-Patienten zwar einen Trend in Richtung einer höheren hydrolytischen Aktivität, also einer verminderten inhibitorischen Aktivität von LEKTI, die erhaltenen Werte sind aber im Vergleich zu gesunden Zellen nicht signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 56). NS-Patienten zeigen an Tag 3 eine signifikant höhere hydrolytische Aktivität als gesunde Zellen ($p=0,003$).

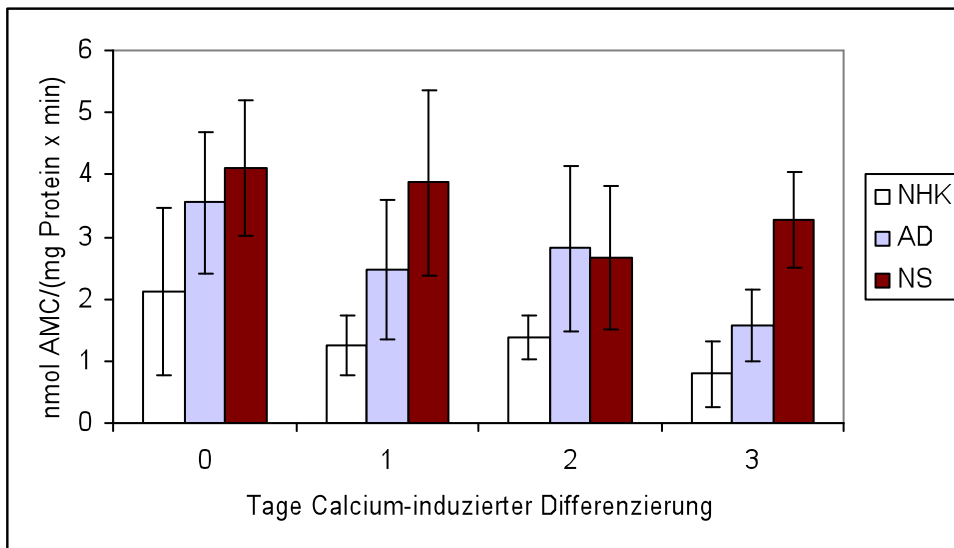


Abbildung 64: Trypsin-Aktivität in gesunden Keratinozyten (n=5) im Vergleich zu AD- und NS-Keratinozyten (jeweils n=3). Die Trypsin-Aktivität ist in gesunden Keratinozyten durch die inhibitorische Wirkung von LEKTI nach 3 Tagen im Differenzierungsmedium signifikant verringert, während NS-Keratinozyten durch die fehlende inhibitorische Wirkung signifikant höhere Werte zeigen. Die hydrolytische Aktivität in AD-Keratinozyten zeigt zwar die Tendenz höher zu sein als in gesunden Zellen, die Unterschiede sind hier aber nicht signifikant.

Tabelle 56: Vergleich der Trypsinaktivität von gesunden, AD- und NS-Keratinocyten

Trypsin-Aktivität	gesunde Zellen		NS-Zellen		AD-Zellen		p-Wert	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	NS	AD
ohne Ca ²⁺	2,81	1,22	3,49	1,26	3,55	1,13	0,107	0,172
ein Tag Ca ²⁺	1,68	0,44	3,30	1,13	2,48	1,12	0,020	0,068
zwei Tage Ca ²⁺	1,66	0,68	2,53	1,62	2,81	1,33	0,094	0,056
drei Tage Ca ²⁺	1,30	0,41	3,14	0,90	1,57	0,58	0,003	0,098

Diese Ergebnisse zeigen, dass mutiertes LEKTI in NS-Keratinocyten zu einer signifikant erhöhten hydrolytischen Aktivität führt. Aber auch Keratinocyten von AD-Patienten zeigen durch die Reduktion von LEKTI, die möglicherweise aus dem Glu420→Lys Polymorphismus resultieren könnte, zumindest eine leicht erhöhte Proteaseaktivität.

5. Diskussion

Beim Netherton Syndrom (NS, MIM 256600) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Genodermatose die durch die klinische Trias einer variablen Erythrodermie, Haarschaftanomalien und das Auftreten von ekzematösen, an Neurodermitis erinnernde Hautveränderungen charakterisiert ist [Ring et al., 2006]. Ursache der Erkrankung sind Mutationen im *SPINK5*-Gen, welches für den Protease Inhibitor LEKTI (lympho-epithelial kazal-type related inhibitor) kodiert. In der Epidermis von Netherton-Patienten bewirkt der *SPINK5*-Gendefekt einen Verlust der natürlichen Kontrolle der im Stratum corneum vorkommenden Serinproteasen SCTE (stratum corneum trypsin-like enzyme) und/oder SCCE (stratum corneum chymotrypsin-like enzyme). Dies resultiert in einer erhöhten hydrolytischen Aktivität der Proteasen und somit einem unkontrollierten und verfrühten Abbau von Desmosomenbestandteilen, was zu der erhöhten Desquamation in der Epidermis der Patienten führt [Komatsu et al., 2002; Caubet et al., 2004] (siehe Abb. 66).

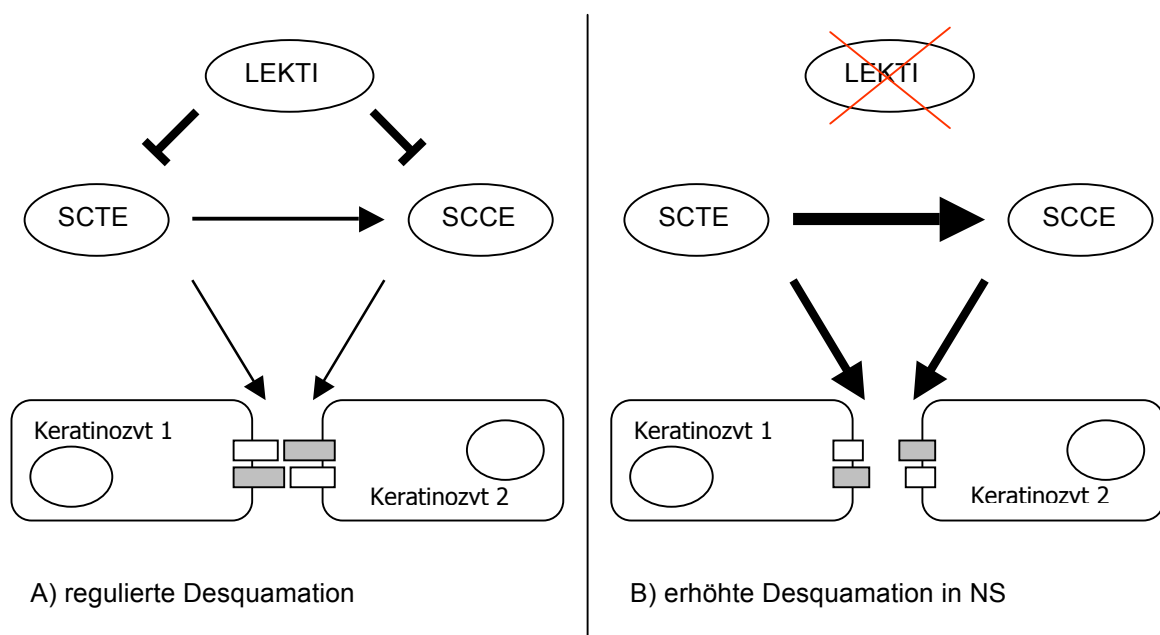


Abbildung 66: Modellhafte Darstellung der Funktionsweise von LEKTI und seiner Zielproteasen

A) Intaktes LEKTI hemmt die Proteasen SCTE und direkt oder zumindest indirekt SCCE, wodurch es zu einer regulierten Desquamation in gesunder Epidermis kommt. B) Mutiertes LEKTI ist nicht in der Lage seine Zielprotease zu hemmen. SCTE kann SCCE unkontrolliert aktivieren (Abspaltung des pro-Peptids) und beide Proteasen können ihre Ziele in den Desmosomen (Dsg1, Dsc1, CDSN) unkontrolliert abbauen. Dadurch kommt es zu der beobachteten erhöhten Desquamation bei Netherton-Patienten.

Bisher wird das Netherton Syndrom nur auf symptomatischem Weg behandelt. Derzeit existieren zwei vielversprechende molekulare Konzepte, die kausalen therapeutischen Nutzen liefern könnten – Proteinersatztherapie und Gentherapie. Theoretisch könnte der Proteinersatz durch topische Applikation von rekombinantem LEKTI dem LEKTI-Protein erlauben die beeinträchtigte Hautbarriere von Netherton-Patienten zu durchdringen und in der granulären Schicht aktiv zu werden und so die Folgen der LEKTI-Defizienz verbessern. Durch die ständige Erneuerung der Hautschichten, könnte das zugegebene Protein aber schnell ausgedünnt werden und schließlich verloren gehen, was eine ständige Reapplikation nötig machen würde.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Möglichkeit einer Korrektur des *SPINK5*-Gendefekts in Keratinozyten von Netherton-Syndrom-Patienten durch Gentransfer funktionsfähiger LEKTI-cDNA mittels rAAV-2 Vektoren auszutesten. Als mögliche Substrate von SCTE und/oder SCCE in Desmosomen der Epidermis kommen Corneodesmosin (CDSN), Desmoglein-1 (Dsg1) und Desmocollin-1 (Dsc1) in Frage [Komatsu et al., 2002; Caubet et al., 2004]. In vorliegender Arbeit sollte nun geklärt werden, ob das Einbringen einer intakten LEKTI-cDNA in Keratinozyten von Netherton-Patienten zu einer Verminderung der hydrolytischen Aktivität der von LEKTI inhibierten Proteasen führt.

5.1 Herstellung eines geeigneten Vektors

Die 3,3 kb große LEKTI-cDNA wurde über gängige Methoden in den Vektor pTRUF/C kloniert. In diesem Vektor ist die Expression des Transgens von einem CMV-Promotor kontrolliert (siehe Abb. 6 und Abb. 11). Anschließend wurde über die Methode von Xiao eine einzelsträngige Kopie der LEKTI-cDNA in die virale Hülle von AAV-2 verpackt (rAAV-2 LEKTI) [Xiao et al., 1998]. Zur Herstellung einer Kontrolle für die nachfolgenden Transfektionsversuche wurde eine GFP-cDNA verwendet und zu rAAV-2 GFP verpackt. Nach Aufreinigung dieser Partikel wurden die Konzentrationen mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens mit 10^{11} und 10^{12} Partikel/ml bestimmt (siehe Tab. 17). Durch zytochemische Färbung mit einem Antikörper gegen die Hüllproteine von AAV-2 wurde auf die Infektiosität der Vektoren getestet (siehe Abb. 18 und Abb. 21), hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Transfizierbarkeit von gesunden und NS-Keratinozyten. Damit konnten die Grundvoraussetzungen für das Forschungs-

vorhaben geschaffen werden, nämlich ein infektiöser hochtitriger Vektor mit LEKTI als Transgen und für diesen Vektor permissive Zellen von NS-Patienten.

Die Transfektion mit diesen rAAV-2-LEKTI-Vektoren führte zu einer deutlichen Erhöhung der LEKTI-mRNA-Menge in den Keratinozyten aller untersuchten Netherton-Patienten, während in rAAV2-GFP transfizierten und untransfizierten NS-Zellen kaum eine LEKTI-mRNA-Expression zu erkennen war. Zur Quantifizierung der beobachteten Ergebnisse wurde eine „realtime“ PCR-Analyse auf SYBRgreen-Basis durchgeführt. Hierbei zeigten rAAV-2-LEKTI-transfizierte Zellen im Proliferationsmedium eine 4,7 x bzw. im Differenzierungsmedium 3,7 x höhere LEKTI-Expression als rAAV-2 GFP transfizierte Zellen. Wie intrazelluläre FACS-Analysen und zytochemische Färbungen zeigten, wurde die eingebrachte LEKTI-cDNA in LEKTI-Protein translatiert. Mittels intrazellulärer FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI, bezogen auf die GFP-Kontrolle, eine signifikante Erhöhung der Proteasesubstrate Dsg1, Dsc1 und CDSN bewirkte. Eine deutliche Annäherung an gesunde Zellen konnte aber bei dieser geringen Fallzahl nicht beobachtet werden. Zytochemisch zeigten die rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen der Patienten 1, 2 und 6 bezogen auf die rAAV-2 GFP-Kontrolle eine stärkere Färbung des Moleküls Dsg1, während CDSN nur in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen von Patient 1 und 6 stärker gefärbt war.

Über einen Trypsin-Aktivitätstest wurde indirekt auf eine wiederhergestellte inhibitorische Wirkung von LEKTI in den NS-Keratinozyten getestet. Untransfizierte und rAAV-2-GFP-transfizierte NS-Zellen zeigten im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere Trypsin-ähnliche Aktivität, als gesunde Zellen. In allen fünf getesteten Patienten (1, 2, 3, 4, 6) führte die Transfektion mit rAAV-2-LEKTI-Vektoren zu einer Senkung der Trypsin-ähnlichen Aktivität. In den Patienten 1, 2 und 4 betrug die Senkung der Aktivität etwa 60 %, während sie in den Patienten 3 und 6 immerhin 25 % betrug.

5.2 Vergleich von Netherton-Keratinocyten mit gesunden Kontrollen

5.2.1 Kultivierung von Keratinocyten im Differenzierungsmedium

Keratinocyten aus Hautgewebeproben wurden auf Mitomycin C-inaktivierten 3T3-Fibroblasten angereichert und für weitere Versuche ohne Fibroblasten kultiviert. Aus nicht nachvollziehbaren Gründen zeigten die Keratinocyten von NS-Patient 5 bereits nach der ersten Passage kein Wachstum mehr. Insgesamt entstand der Eindruck, dass die Keratinocyten von NS-Patienten langsamer wachsen als die von gesunden. Ob es sich hierbei aber um eine Folge des Gendefekts handelt oder um die natürlich vorkommende Wachstumsvariabilität, kann hier nicht entschieden werden. Da der Differenzierungsprozess in Keratinocyten durch den Gehalt von extrazellulärem Calcium reguliert wird und sowohl LEKTI als auch seine Zielproteasen in den differenzierten Schichten der Epidermis gebildet werden, wurde dem Keratinocyten-Proliferationsmedium 1,2 mM Calciumchlorid zugesetzt [Bitoun et al., 2003]. Nach Kultivierung in diesem Medium wurden keine morphologischen Unterschiede zwischen gesunden und NS-Keratinocyten beobachtet (Abb. 22).

5.2.2 LEKTI-Expression auf mRNA-Ebene

Die auf mRNA-Ebene untersuchte LEKTI-Expression in gesunden Keratinocyten ist wie vorausgesagt Calcium-abhängig [Bitoun 2003] (siehe Abb. 28 und 29). „realtime“ PCR Untersuchungen des Calciumprofils in Zellen von fünf gesunden Spendern zeigten nach einem Tag im Differenzierungsmedium eine 4,7 fache, nach zwei Tagen eine 7,9 fache und nach drei Tagen eine 18,8 fache Erhöhung der LEKTI-mRNA-Expression im Vergleich zum Proliferationsmedium (Abb. 32 und Tab. 20). NS- Keratinocyten zeigen nach Kultivierung im Proliferationsmedium auf mRNA-Ebene eine geringere LEKTI-Expression als gesunde Keratinocyten (Abb. 30 und 31). Realtime PCR Untersuchungen in Keratinocyten von NS-Patient 1, 2 und 3 zeigten im Differenzierungsmedium zunächst eine Abnahme der Expression und danach nur einen leichten Anstieg: sie zeigten nach einem Tag eine 0,4 fache, nach zwei Tagen eine 0,8 fache und nach drei Tagen eine 1,7 fache Menge der LEKTI-Expression im Vergleich zum Mediumwert (Abb. 32 und Tab. 20).

5.2.3 Untersuchungen auf Proteinebene

5.2.3.1 LEKTI

In dieser Arbeit wurde erstmalig die LEKTI-Proteinmenge in Keratinozyten über die Methode der intrazellulären FACS-Analyse bestimmt. Nach Kultivierung von gesunden Zellen in Differenzierungsmedium ist über diese Methode ein deutlicher Anstieg des LEKTI-Proteins zu erkennen (Abb. 35, Tab. 24). Nach 72 h kann eine Abnahme der LEKTI-Proteinmenge beobachtet werden, die auf die für das LEKTI-Protein beschriebene Sekretion hindeutet (Abb. 35, Tab. 24). NS-Keratinozyten zeigten über diese Methode erst nach zwei und drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant weniger LEKTI-Protein als gesunde Zellen (Abb. 35 und Tab. 23). Der für beide Analysen verwendete monoklonale Antikörper gegen LEKTI (Klon 1C11G6, Invitrogen) erkennt demnach im Proliferationsmedium das verkürzte mutierte Protein in den NS-Keratinozyten ebenso stark wie das korrekt gefaltete und glykosylierte, intakte Protein in gesunden Zellen. Dies könnte darin begründet sein, dass der Antikörper gegen rekombinantes in Insektenzellen produziertes LEKTI-Protein generiert wurde, das die volle Länge von 125 kDa umfasst und darin eventuell ein repetitives oder wiederkehrendes Epitop erkennt. Das rekombinante LEKTI Vorläufermolekül (125 kDa) sowie die rLEKTI-Domänen D1-6 (43 kDa), D6-9 (35,5 kDa) und D9-12 (35,2 kDa) werden von dem Antikörper stark und die rLEKTI-Domänen D13-15 (30,6 kDa) schwach erkannt [Raghunath et al., 2004]. In dem verkürzten LEKTI-Protein der Patientenzellen könnten demnach mehr Epitope für den verwendeten Antikörper vorhanden sein bzw. exponiert werden, als in dem korrekt gefalteten Volllängen-Protein der gesunden Zellen.

Die LEKTI-Proteinmenge in Keratinozyten wurde auch über zytochemische Analysen bestimmt. Gesunde Keratinozyten zeigten bereits im Proliferationsmedium eine Färbung von einzelnen Zellen (siehe Abb. 24 A), im Differenzierungsmedium war eine deutliche Färbung von LEKTI zu erkennen (Abb. 24 B). Hier entstand der Eindruck, dass gefärbte Moleküle sich vor allem außerhalb der Zellen, also interzellulär, befanden (siehe Abb. 24 B). Die zytochemische Färbung in NS-Keratinozyten erfolgte wie erwartet sehr viel schwächer als in gesunden Keratinozyten, war aber nicht völlig negativ (siehe Abb. 24 C und D).

Um eine veränderte Sekretion des LEKTI-Proteins zwischen gesunden und kranken Zellen zu untersuchen, wurden Dotblot- und Westernblotanalysen durchgeführt. Dotblot-Analysen (Abb. 54) und Westernblot-Analysen (Abb. 56) in konzentrierten Zellkulturüberständen gesunder Zellen zeigten deutlich, dass LEKTI zu jeder der untersuchten Calcium-Bedingungen von dem Antikörper 1C11G6 angefärbt werden konnte, was die Sekretion des LEKTI-Proteins anzeigt. Dotblot-Untersuchungen an konzentrierten Zellkultur-Überständen von Keratinozyten aus NS Patient 2 zeigten dagegen kaum eine Färbung mit 1C11G6 (siehe Abb. 55), was eine verminderte Sekretion andeutet. Westernblot-Analysen an konzentrierten Zellkulturüberständen von Keratinozyten aus NS Patient 1 zeigten nur Banden kleiner 30 kDa, während in denen aus gesunden Zellen auch größere Banden zu sehen waren (siehe Abb. 57). Auch dieses Ergebnis spricht für eine vermehrte Sekretion in gesunden Zellen im Vergleich zu NS-Zellen. In welche Domänen gesunde humane Keratinozyten das LEKTI-Protein umformen, ist noch nicht bekannt. Außerdem ist nicht bekannt, wann das fertige Protein ins umgebende Medium sezerniert wird. Dieser sezernierte Anteil an LEKTI-Protein kann nicht über die Methode der intrazellulären FACS-Analyse detektiert werden. Für die Erzielung deutlicherer Ergebnisse wäre es hier aber von Vorteil, Antikörper gegen andere Domänen von LEKTI bzw. monoklonale Antikörper zu verwenden. Der Antikörperklon L-16 der Firma Santa Cruz erkennt zum Beispiel nur die Domäne 6 von LEKTI. NS-Patient 2 verfügt durch seine beiden Mutationen über ein LEKTI-Molekül mit zwei Domänen und eines mit Domäne 1-6 und einem veränderten Domäne 7-Anteil. L-16 detektierte in der Dotblot-Analyse den in NS-Patient 2 vorhandenen Anteil von LEKTI, wobei der intrazelluläre Anteil der Domäne 6 höher schien als in gesunden Zellen, und ein geringerer Anteil sezerniert wurde (siehe Abb. 55).

5.2.3.2 SCTE und SCCE

In der Literatur wurde mehrmals beschrieben, dass bei Netherton-Patienten durch die fehlende Wirkung von LEKTI die beiden Serinproteasen SCTE und SCCE nicht nur überaktiv sind, sondern auch in ihrer Menge erhöht sind. Die Ursache hierfür scheint an einem Rückkopplungsmechanismus zu liegen: dadurch, dass das mutierte LEKTI-Protein die beiden Proteasen nicht hemmen kann, kommt es zu einer gesteigerten Aktivität derselben, was letztlich zu einem Verlust der Hautbarriere führt. Die Störung

der Hautbarriere führt zu einem Verlust des natürlichen Calcium-Gradienten, was wiederum die unteren epidermalen Schichten zur verfrühten Sekretion von Lamellarkörper-Inhalten treibt. Diese Lamellarkörper enthalten außer den Lipiden, die den Barrierenverlust kompensieren sollen, wenn auch nicht im selben Vesikel, LEKTI, CDSN und auch die beiden Proteasen [Simon et al., 2001; Ishida-Yamamoto et al., 2005; Sondell et al., 1995; Ishida-Yamamoto et al., 2004]. Durch die Sekretion werden diese in den extrazellulären Raum sezerniert und aufgrund der fehlenden Hemmung durch LEKTI wiederholt sich der Vorgang permanent [Fartasch, 1999].

In der intrazellulären FACS-Analyse zeigten gesunde Keratinozyten nach Calcium-induzierter Differenzierung nur im Molekül SCCE, nicht aber bei SCTE, eine signifikante Abnahme (Abb. 43 und 45 sowie Tab. 37 und Tab. 40), was eine Sekretion widerspiegeln könnte. Die SCCE-Menge war in gesunden Keratinozyten nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium um 68 %, nach drei Tagen um 75 % geringer als im Proliferationsmedium (siehe Tab. 41). Sowohl im Proliferationsmedium als auch nach zwei bzw. drei Tagen Kultivierung im Differenzierungsmedium zeigten NS-Keratinozyten signifikant höhere SCTE- und SCCE-Mengen als gesunde Keratinozyten (siehe Abb. 43 und 45 sowie Tab. 37 und 40). Dies bestätigt die Literaturangabe, dass SCTE und SCCE in ihrer Menge bei NS-Patienten signifikant erhöht sind.

Cytochemische Färbungen waren dagegen nicht geeignet, diese Unterschiede darzustellen. Hier zeigten sowohl gesunde als auch NS-Keratinozyten eine schwächere Färbung von SCTE im Proliferationsmedium und eine starke Färbung im Differenzierungsmedium (siehe Abb. 25), aber ohne deutliche Unterschiede. Dotblot-Untersuchungen in Sedimenten und konzentrierten Überständen von gesunden Zellen zeigten an, dass SCTE nach drei Tagen im Differenzierungsmedium sezerniert wurde (Abb. 54), wobei der Anteil an SCTE innerhalb der Zellen aber nicht abzunehmen schien, also offensichtlich nachgebildet wurde.

5.2.3.3 Untersuchung der Proteasesubstrate CDSN, Dsg1 und Dsc1

Wie einleitend beschrieben, ist durch die krankheitsbedingte Mutation im LEKTI-Protein die natürliche Regulation der Proteolyse in der Haut von Netherton-Patienten gestört. Dadurch kommt es zu der bei Netherton-Patienten beobachteten erhöhten

Desquamation und der gestörten Hautbarriere (Abb. 65). Der nächste Abschnitt beschreibt die Untersuchung der möglichen Proteasesubstrate CDSN, Dsg1 und Dsc1 in den kultivierten gesunden und NS-Keratinocyten. Unterschiede in diesen Molekülen könnten einen Einfluss von LEKTI auf die Regulation der Proteolyse dieser Moleküle andeuten, der in NS-Patienten fehlt und möglicherweise durch die Transfektion mit rAAV2-LEKTI Vektoren wiederhergestellt werden könnte.

5.2.3.3.1 Corneodesmosin

Bei Corneodesmosin (CDSN) handelt es sich um einen Marker für die terminale Differenzierung von Keratinocyten. Die Bildung von CDSN erfolgt laut Simon bereits im oberen Stratum spinosum, also dem Bereich, in dem auch Involukrin, LEKTI und die beiden Proteasen erstmalig auftreten [Simon et al., 2001]. CDSN wird in Lamellarkörpern zur Zellaußenseite transportiert und lagert sich bei der Bildung von Corneodesmosomen an die Zell-Adhäsionsproteine Desmoglein-1 und Desmocollin-1 an. CDSN ist möglicherweise ein Substrat der beiden Proteasen SCTE und SCCE. *In vitro* kann die Proteolyse von CDSN sowohl durch die alleinige Zugabe von rekombinantem SCTE (*Stratum corneum trypsin-like enzyme*, humanes Kallikrein 5, KLK5) als auch durch rekombinantes SCCE (*Stratum corneum chymotrypsin-like enzyme*, humanes Kallikrein 7, KLK7) zu einem Extrakt humaner Proteine der Epidermis induziert werden [Simon et al., 2001].

Untersuchung von CDSN in kultivierten Keratinocyten

Für die Untersuchung der CDSN-Proteinmenge in gesunden und NS-Keratinocyten wurde der Antikörper-Klon F28-27 verwendet, der von der Arbeitsgruppe von Guy Serre hergestellt wurde [Serre et al., 1997; Simon et al., 2001]. Dieser murine Antikörper erkennt in Proteinextrakten aus humaner Epidermis das 52-56 kDa Fragment, Fragmente von 40-48 kDa sowie die kleineren Fragmente von 30-36 kDa, also sowohl das unprozessierte Molekül als auch die beiden Proteolyse-Produkte. FACS-Analysen zeigten während der Differenzierung eine stete Zunahme des Moleküls in gesunden Zellen und im Vergleich dazu eine Abnahme des Moleküls in NS-Keratinocyten. Nach zwei bzw. drei Tagen Kultivierung im Differenzierungsmedium konnte in gesunden Zellen signifikant mehr CDSN detektiert werden als in

den NS-Zellen [Abb. 39]. Cytochemische Färbungen mit F28-27 zeigten in gesunden Zellen eine deutliche Anfärbung, während in NS-Keratinocyten kaum eine Anfärbung erkennbar war [Abb. 27]. Diese Ergebnisse deuten an, dass CDSN in den NS-Keratinocyten vermehrt zu einem nicht detektierbaren Produkt abgebaut wird. LEKTI könnte somit einen Einfluss auf die Regulation der natürlichen Proteolyse von CDSN haben. Für eine Bestätigung dieser Vermutung wäre es aber nötig, einen *in vitro*-Ansatz mit rekombinantem LEKTI und rekombinanten Proteasen durchzuführen.

5.2.3.3.2 Desmoglein-1

Desmoglein-1 (Dsg1) ist ein Adhäsionsmolekül zwischen Keratinocyten, dessen Abbau durch die beiden Serinproteasen SCTE und SCCE [Caubet et al., 2004] möglicherweise von LEKTI inhibiert wird. Es wurde vermutet, dass Dsg1 in Netherton-Keratinocyten vermehrt abgebaut wird.

FACS-Analysen in gesunden Keratinocyten zeigten im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere Dsg1-Menge als im Proliferationsmedium [Abb. 37]. NS-Keratinocyten zeigten dagegen im Differenzierungsmedium keine signifikanten Änderungen in diesem Molekül. Im direkten Vergleich zu gesunden Keratinocyten zeigten NS-Keratinocyten nach zwei bzw. drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant geringere Mengen dieses Moleküls (siehe Abb. 37 und Tab. 27). Nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium lag die Dsg1-Menge in NS-Keratinocyten nur bei 57 %, nach 3 Tagen bei 60 % im Vergleich zu gesunden Zellen. Cytochemische Färbungen dieses Moleküls zeigten in gesunden Keratinocyten eine deutliche Färbung, während in NS-Keratinocyten kaum eine Anfärbung erfolgte. (Abb. 26). Die Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass Dsg-1 aufgrund der fehlenden inhibitorischen Funktion von LEKTI in NS-Keratinocyten vermehrt abgebaut wird. Dieser Abbau könnte durch das Einbringen intakter LEKTI-cDNA und deren Umbau zu einem funktionellen Protein vermindert werden.

5.2.3.3.3 Desmocollin-1

Desmocollin-1 (Dsc1), das gemeinsam mit Dsg-1 die Adhäsion in Desmosomen zwischen den Keratinocyten vermittelt, stellt ebenfalls ein mögliches Proteasesubstrat dar, da es direkt oder indirekt von aktivem SCTE gespalten werden

kann [Caubet et al., 2004]. In der FACS-Analyse war die Desmocollin-1 Menge in NS-Keratinocyten nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant geringer als in gesunden Zellen (siehe Abb. 41 und Tab. 34). Während gesunde Zellen in diesem Molekül nach drei Tagen im Differenzierungsmedium einen signifikanten Anstieg zeigen (Abb. 41 und Tab. 35), scheint sich die Netto-Menge in NS-Zellen nicht zu verändern. Dies könnte den vermehrten Abbau von Dsc1 in NS-Zellen widerspiegeln.

5.2.4 Hydrolytische Aktivität in Keratinocyten

Um auf die Funktionalität der in den Netherton-Patienten vorhandenen mutierten LEKTI-Proteine und der durch die Transfektion mit rAAV2-LEKTI neu gebildeten LEKTI-Proteine in Keratinocyten zu testen, wurde ein Test auf die Funktion von SCTE bzw. SCCE etabliert. In der Literatur war der Test auf die SCTE-Funktion in ähnlicher Form mit Stratum corneum Proben von Netherton-Patienten [Komatsu et al., 2002] bzw. von Ichthyosis vulgaris Patienten [Suzuki et al., 1996] durchgeführt worden. Netherton-Patienten zeigten dabei eine höhere hydrolytische Aktivität (schwerer Phänotyp 5x höher, milder Phänotyp 2x höher) als gesunde Probanden [Komatsu et al., 2002].

Der AMC-Aktivitätstest mit dem Trypsinsubstrat wurde wie bei Komatsu beschrieben durchgeführt, mit der Abwandlung, dass anstelle von Stratum corneum Proben Keratinocyten-Homogenate eingesetzt wurden und diese wie oben beschrieben vor der Ernte in Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium kultiviert worden waren.

Um auf die Aktivität von SCTE zu testen, wurde das Trypsinsubstrat Boc-Phe-Ser-Arg-AMC (100 nmol/mg Protein) verwendet, für die Messung der Aktivität von SCCE, das Chymotrypsinsubstrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (400 nmol/mg Protein, nach Angabe des Herstellers).

5.2.4.1 Hydrolytische SCTE-Aktivität in Keratinocyten

Primär isolierte humane Keratinocyten aus 10 gesunden Spendern zeigten im Proliferationsmedium die höchste SCTE-bedingte AMC-Freisetzung aus dem

Substrat (siehe Abb. 47 und Tab. 44). Die Kultivierung in Differenzierungsmedium führte zu einer signifikanten Abnahme dieser AMC-Freisetzung. Die Aktivität wurde nach 24 h und 48 h im Differenzierungsmedium um 40 % und nach 72 h um 54% erniedrigt. NS-Keratinocyten zeigten erst nach 48 h im Differenzierungsmedium eine Abnahme der Aktivität von 28 % und nach 72h eine erneute Zunahme der hydrolytischen Aktivität, die nur mehr 10 % geringer als im Proliferationsmedium war (Tab. 44). Im Vergleich zu gesunden Zellen zeigten NS-Keratinocyten nach Calcium-induzierter Differenzierung für drei Tage eine höchst signifikant höhere SCTE-Aktivität (Abb. 47 und Tab. 43).

5.2.4.2 Hydrolytische SCCE-Aktivität

Eine Untersuchung der Chymotrypsin-Aktivität in den Keratinocyten-Homogenaten ergab nur in Zellen von Patient 3 signifikante Unterschiede zu gesunden Zellen und denen von Patient 1, 2 und 4 im Differenzierungsmedium (Abb. 52, Tab. 53). Patient 3 zeigte eine homozygote Mutation im Intron 15, die zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stopp-Codon in LEKTI-Domäne 7 führt und damit zu einer veränderten LEKTI-Sequenz (siehe Anhang). In Zellen von Patient 1 wurde bei der Genanalyse nur eine Mutation im Exon 5 detektiert, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon in LEKTI-Domäne 2 führt. Patient 2 hat ebenfalls eine Mutation in Exon 5, die zu einer Verkürzung auf zwei LEKTI-Domänen führt, die zweite Mutation entspricht der von Patient 3, liegt aber nur im heterozygoten Zustand vor. Patient 4 weist dagegen eine homozygote Mutation in Exon 10 auf, die vermutlich zu einer Funktionsänderung führt, da hier ein für die LEKTI-Funktion wichtiger Cysteinrest zusätzlich auftritt.

5.3 Transfektion mit rAAV2-Vektoren

Die Transfektion von Keratinocyten wurde in Gegenwart der Substanz AG1478 durchgeführt, da diese die Doppelstrangsynthese der viralen DNA, durch Hemmung der EGF-Rezeptor-tyrosinkinase und damit verminderter Phosphorylierung von FKBP52, steigert [Braun-Falco et al., 2005; Haug et al., 2005, 2006].

Wie Abbildung 18 und 21 zeigen, waren die hergestellten rAAV2-Vektoren in der Lage sowohl gesunde als auch NS-Keratinocyten zu infizieren. Mit einem Antikörper

gegen die Hüllproteine von AAV-2 (Klon B1) konnten 24 Stunden nach der Transfektion sowohl in rAAV2-GFP- als auch in rAAV2-LEKTI-transfizierten Zellen, nicht aber in untransfizierten Zellen, rAAV-2 Partikel innerhalb der Zellen nachgewiesen werden.

5.3.1 Steigerung der LEKTI-mRNA-Expression nach Transfektion

Vorversuche in gesunden Keratinozyten zeigten, dass eine Transfektion mit rAAV-2-LEKTI-Partikeln zu einer Calcium-unabhängigen Steigerung der LEKTI-mRNA-Menge in transfizierten Zellen führte (Abb.29). Die Transfektion mit rAAV-2-LEKTI-Vektoren führte zu einer deutlichen Erhöhung der LEKTI-mRNA-Menge in den NS-Keratinozyten aller untersuchten Patienten, während rAAV2-GFP-transfizierte Zellen wie untransfizierte Zellen kaum eine LEKTI-mRNA-Expression zeigten (siehe Abb. 30 und 31). Zur Quantifizierung der erhaltenen Ergebnisse wurde auch hier eine „realtime“ PCR-Analyse auf SYBRgreen-Basis durchgeführt (siehe Abb.34). Demnach war die LEKTI-Expression in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen im Proliferationsmedium 4,7 x und im Differenzierungsmedium 3,7 x höher als in rAAV-2-GFP-transfizierten Zellen (Abb.34).

5.3.2 Untersuchung der LEKTI-Proteinmenge in transfizierten Zellen

Als nächstes wurde über intrazelluläre FACS-Analysen bzw. cytochemische Färbungen untersucht, ob die Transfektion mit rAAV-2-LEKTI-Vektoren einen Einfluss auf die Moleküle LEKTI, Desmoglein-1, Desmocollin-1 und Corneodesmosin sowie auf die beiden Proteasen SCTE und SCCE zeigt. Auch für diese Untersuchungen wurde die Differenzierung in den kultivierten Keratinozyten durch Zugabe von 1,2 mM Calcium ins Keratinozytenmedium induziert.

In der intrazellulären FACS-Analyse zeigten rAAV-2-LEKTI-transfizierte Zellen deutlich mehr LEKTI-Protein als rAAV-2-GFP-transfizierte Zellen (siehe Abb. 36). Dies lässt den Schluss zu, dass die eingebrachte LEKTI-cDNA nicht nur in LEKTI-mRNA transkribiert wurde (Abb. 33), sondern wie erwartet auch zu einem LEKTI-Protein translatiert wurde (Abb.36). Die LEKTI-Menge war im Proliferationsmedium um 40 % und nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium um 50 % erhöht. Nach drei Tagen sanken die Werte ab, wodurch die LEKTI-Menge in rAAV-2-LEKTI-

transfizierten Zellen nur noch 30 % höher war als in rAAV-2 GFP transfizierten Zellen. Möglicherweise deutet dies auf die erfolgte Sekretion des eingebrachten Proteins hin.

Die intrazelluläre FACS-Analyse eignet sich aufgrund der Untersuchung auf Einzelzellbasis nicht zur Detektion von sezerniertem Protein, da vor der Zellernte der Zellkulturüberstand entfernt werden muss. Für die eigentliche Färbung liegen hier also nur Proteine vor, die sich noch innerhalb der Zellen befinden. Daher wurden konzentrierte Überstände der transfizierten Zellen über Dotplot-Analysen und Westernblot-Analysen untersucht. Hierbei konnten aber keine Verbesserungen zu untransfizierten Zellen beobachtet werden, was eventuell an einer zu geringen Transfektionseffizienz in den hier untersuchten Ansätzen lag. Die Effizienz wurde über die parallel durchgeführte rAAV-2-GFP-Transfektion bestimmt und lag zwischen 30-40%. Möglicherweise müssten hier höhere Transfektionseffizienzen erreicht werden, um sezernierte Proteine detektieren zu können.

5.3.3 Untersuchung von Protease-Substraten in transfizierten Zellen

Da Dsg1 ein mögliches Abbausubstrat der Proteasen SCTE/SCCE ist, und hier ein deutlicher Unterschied zwischen gesunden und untransfizierten NS-Zellen zu beobachten war, wurde untersucht, ob die Transfektion mit rAAV2-LEKTI einen Effekt auf die Dsg1-Menge in transfizierten Zellen hat. Wie Abbildung 38 und Tabelle 29 zeigen, weisen rAAV2-LEKTI-transfizierte Netherton-Keratinocyten im Proliferationsmedium eine 70 % höhere (signifikant), nach einem Tag im Differenzierungsmedium eine 40 % höhere, nach zwei Tagen eine 20 % höhere und nach drei Tagen eine 30 % höhere Dsg1-Expression auf als rAAV-2-GFP-transfizierte Zellen. Gegenüber untransfizierten Zellen zeigen rAAV-2-LEKTI-transfizierte erst im Differenzierungsmedium höhere Dsg1-Mengen. Gegenüber den Werten in gesunden Zellen zeigen rAAV-2-LEKTI-transfizierte Zellen aber immer noch deutlich geringere Werte. Auch wenn die Transfektion mit LEKTI einen Effekt auf die Dsg1-Proteinmenge zu haben scheint, ist offensichtlich die Fallzahl von n=4 zu niedrig, um eine deutliche Aussage über die Änderung der Dsg1-Proteinmenge über diese Methode treffen zu können.

Ähnliches gilt für die Untersuchung des Moleküls Corneodesmosin. Die intrazelluläre FACS-Analyse zeigte sowohl im Proliferationsmedium als auch nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere CDSN-Menge nach rAAV-2-LEKTI-Transfektion als nach rAAV-2-GFP-Transfektion (Abb. 40). Im Vergleich zu gesunden Zellen lagen die Werte im Proliferationsmedium in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen bei 98%, während sie in untherapierten Zellen etwa bei 78% lagen. Während in untherapierten Zellen die CDSN-Menge nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium um 30-40% abnahm, zeigten rAAV-2-LEKTI-transfizierte Zellen nur eine geringe Abnahme von 8% versus dem jeweiligen höchsten Wert. Gegenüber gesunden Zellen lag der Wert in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen hier noch bei 92%. Nach drei Tagen im Differenzierungsmedium konnten keine Unterschiede in den beiden Transfektanten beobachtet werden.

FACS-Analysen des Moleküls Dsc1 zeigten nach der Transfektion von n=3 NS-Patienten dagegen einen signifikanten Unterschied zwischen untransfizierten bzw. rAAV-2-GFP-transfizierten und rAAV-2-LEKTI-transfizierten NS-Zellen an. Hier war die Dsc1-Menge nach dreitägiger Inkubation im Differenzierungsmedium in den rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen signifikant versus untherapierten Zellen erhöht. Im Vergleich zu gesunden Zellen betrug der erreichte Wert in diesem Molekül in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen 69%, während rAAV-2-GFP-transfizierte Zellen nur 44% erreichten. Die Untersuchung dieses Moleküls zeigte also den verbesserten Zustand der NS-Zellen nach Transfektion mit rAAV-2 LEKTI am deutlichsten.

5.3.4 Zytochemische Färbungen

Zytochemische Färbungen der Moleküle Dsg1, CDSN und LEKTI wurden nach Transfektion von Keratinozyten aus Patient 1, Patient 2 und Patient 6 durchgeführt. rAAV-2-GFP-transfizierte Zellen aller drei Patienten zeigten keine Färbung der Moleküle LEKTI, Dsg1 oder CDSN. Genetische Analysen zeigten in NS-Patient 1 eine Mutation in LEKTI-Domäne 2, während die zweite Mutation unbekannt blieb. In Patient 2 lag eine Mutation ebenfalls in LEKTI-Domäne 2 vor, während sich die zweite Mutation in Domäne 7 befand. In Patient 6 lag eine Mutation in Domäne 5 vor, die zweite Mutation befand sich hier in Domäne 10. Alle vier Mutationsstellen im

LEKTI-Protein scheinen sich also auf die Funktion des Proteins auszuwirken und einen gesteigerten Abbau von Dsg1 und CDSN zur Folge zu haben.

In rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen von allen drei Patienten konnte eine Färbung von Dsg1 wiederhergestellt werden, während die Färbung von CDSN nur in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen von Patient 1 und 6 erreicht werden konnte. Zum Zeitpunkt der Färbung (zwei Wochen nach der Transfektion) zeigten nur rAAV-2-LEKTI-transfizierte Zellen von Patient 2 und 6 noch eine stärkere LEKTI-Färbung (Abb. 62).

5.3.5 Untersuchung der LEKTI-Funktion

Da es sich bei LEKTI um einen Inhibitor von Proteasen handelt und sich sowohl LEKTI als auch die Proteasen in den Zellen befinden, wurde eine indirekte Nachweismethode der LEKTI-Funktion gewählt, indem durch Zugabe eines geeigneten Substrates die Rest-Proteaseaktivität in Homogenaten gemessen wurde (Abb. 9).

Intrazelluläre FACS-Analysen der Moleküle SCTE und SCCE ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen rAAV-2-LEKTI- und rAAV-2-GFP-transfizierten Patientenzellen nach drei Tagen im Differenzierungsmedium. Beide Moleküle waren wie die untransfizierten Zellen signifikant versus gesunden Zellen erhöht (Abb. 44 und Abb. 46). Nachdem damit geklärt war, dass sich die Transfektion nicht auf die Menge von SCTE- und SCCE-Proteinen auswirkt, wurde die hydrolytische Aktivität der Proteasen in Keratinozyten-Homogenaten mit Hilfe eines Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Substrats getestet. Damit sollte untersucht werden, ob die durch die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI eingeführte LEKTI-cDNA zu einem funktionsfähigen Protein translatiert wird, das in der Lage ist seine Zielproteasen zu hemmen.

Im durchgeführten Test auf die hydrolytische Aktivität von Trypsin-ähnlichen Proteasen konnte in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen von vier NS-Patienten eine signifikante Abnahme der hydrolytischen Aktivität beobachtet werden. Diese Abnahme trat vor allem nach der Kultivierung im Differenzierungsmedium auf, und hier war der Effekt nach drei Tagen im Differenzierungsmedium signifikant (Abb. 48-51 sowie Tab. 45, 47, 49 und 51). Aufgrund der Material-Einschränkung wurde die hydrolytische Aktivität nach den meisten Transfektionen nur im Proliferationsmedium und nach drei Tagen im Differenzierungsmedium getestet. Während rAAV-2-GFP-

transfizierte Zellen im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere hydrolytische Trypsin-ähnliche Aktivität zeigten als gesunde Zellen, war die Aktivität in rAAV-2 LEKTI transfizierten Zellen nicht mehr signifikant höher als in gesunden Zellen (Abb. 48-51 sowie Tab. 45, 47, 49 und 51). Nur die Zellhomogenate von Patient 1 zeigten bereits im Proliferationsmedium eine signifikant erniedrigte hydrolytische Aktivität. Bei Patient 1 wurde durch die DNA-Sequenzanalyse nur eine Mutation in Domäne 2 detektiert, während unklar bleibt, wo sich die zweite Mutation befindet.

Bei allen anderen Patienten war die Kultivierung im Differenzierungsmedium für die Senkung der Aktivität notwendig, als wäre für die Funktionalität des neu-gebildeten LEKTI-Proteins Calcium notwendig. Homogenate aus gesunden Zellen zeigten ebenfalls eine Calcium-abhängige Abnahme der Trypsin-ähnlichen Aktivität, die aber bereits nach einem Tag im Differenzierungsmedium signifikant war.

Nur Keratinozyten-Homogenate von NS-Patient 3 zeigten auch eine signifikant erhöhte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität im Vergleich zu gesunden Zellen und den anderen Patienten (Abb. 52, Tab. 40). Um zu untersuchen, ob die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI diese erhöhte Aktivität senken kann, wurde ein Chymotrypsin-Substrat eingesetzt. Hier konnte weder im Proliferationsmedium noch im Differenzierungsmedium eine Veränderung der hydrolytischen Aktivität beobachtet werden, was eine direkte Wirkung von LEKTI auf die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in den Zellen ausschließt (Abb. 53 und Tab. 54).

5.4 Genkorrektur als neue Therapieoption für das Netherton Syndrom

Beim NS handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Genodermatose, das bedeutet, erst das Vorliegen einer Mutation in beiden *SPINK5*-Allelen führt zu einer Manifestation der Erkrankung. Dagegen hat das Vorhandensein des kranken Allels keinen Einfluss, solange wenigstens ein intaktes Allel in der Zelle vorhanden ist. Im Prinzip sind alle autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten für eine Gentherapie geeignet [Spirito et al., 2001]. Durch den Gentransfer eines intakten *SPINK5*-Gens in NS-Zellen könnte damit eine kausale Therapieoption für das Netherton-Syndrom geschaffen werden. Eine Korrektur des NS-Gendefekts zu einem frühen Zeitpunkt könnte zu einem verminderten Auftreten der Symptome führen und die Lebensqualität der NS-Patienten deutlich verbessern.

In dieser Arbeit konnten die ersten Entwicklungsschritte eines Gentherapiekonzeptes für NS gezeigt werden. Hierfür wurde ein rekombinante viraler Vektor auf Grundlage von Adenoassoziiertem Virus Typ 2 konstruiert, der die funktionale cDNA von humanem *SPINK5* exprimiert und infektiöse Vektorpartikel generiert. Mit diesem Vektor wurden humane Keratinozyten von fünf nicht-verwandten Patienten mit NS transduziert. Der Gentransfer von *SPINK5* führte zu einer fünffachen Erhöhung der LEKTI-mRNA Expression und damit etwa 75% der normalen Expression. Um zu prüfen, ob diese Erhöhung in einer Verstärkung der inhibitorischen Aktivität von LEKTI resultiert, wurde ein hydrolytischer Test durchgeführt mit dessen Hilfe gezeigt werden konnte, dass die inhibitorische Fähigkeit der *SPINK5*/LEKTI transduzierten NS-Keratinozyten auf einen Wert ähnlich dem in gesunden Keratinozyten anstieg. Diese Ergebnisse zeigen auf einer sehr basal-experimentellen Ebene, dass der Gentransfer des fehlenden *SPINK5*-Gens in defiziente NS-Keratinozyten eine geeignete Methode für die zukünftige Behandlung von NS darstellen könnte. Sie regen zu weiterer Forschungs-aktivität wie Gentransferstudien in knockout-Mäusen oder Xenotransplantations-modellen an, die die Analyse von epidermalen und systemischen Langzeit-Effekten des *SPINK5*-Gentransfers, wie die Aktivitäten von KLK5 und 7, Abbau von Dsg1 und Dsc1, oder IgE-Level, erlauben [Descargues et al., 2005]. Neben dem *ex vivo*-Gentransfer mit nachfolgender Transplantation epithelialer Schichten, könnte NS wegen der beeinträchtigten Hautbarriere auch als Modellkrankheit für einen direkten *in vivo* Gentransfer geeignet sein, da die transcorneale Permeation viraler Vektorpartikel erleichtert sein könnte.

5.5 Gentherapie von autosomal-rezessiven Genodermatosen

Bisher liegen in der Literatur keine gentherapeutischen Konzepte zur Rekonstitution des NS-Defekts vor, deshalb werden im Folgenden verschiedene Gentransferstrategien bei anderen autosomal-rezessiven Genodermatosen diskutiert.

Zu autosomal-rezessiven Genodermatosen, bei denen *in vitro* und teilweise auch *in vivo* bereits erste Fortschritte mittels gentherapeutischer Korrektur erreicht werden konnten, gehören das Sjögren-Larsson-Syndrom (SLS), Xeroderma pigmentosum (XP), die X-assoziierte Ichthyose (XLI) und die Epidermis bullosa (EB).

Das Sjögren-Larsson-Syndrom (SLS) wird durch einen Defekt in der Fettaldehyddehydrogenase (FALDH) ausgelöst, einem Enzym das wichtig für die Oxidation langkettiger aliphatischer Aldehyde zu Fettsäuren ist. *In vitro* konnte durch die Transfektion defekter SLS-Keratinocyten mittels rekombinanten AAV-2 Vektoren, die das intakte FALDH-Gen enthielten, eine Steigerung der Aktivität des Enzyms auf Werte, die zu denen von phänotypisch normalen heterozygoten Trägern vergleichbar waren, erreicht werden [Haug et al., 2006].

Beim Xeroderma Pigmentosum (XP) handelt es sich um eine autosomal-rezessive Störung der DNA-Reparatur mit Lichtüberempfindlichkeit, die zu bösartigen Hauttumoren führt [Zeng et al., 1997]. Durch die Transduktion primärer, XP-defekter Fibroblasten mit rekombinanten, retroviralen Vektoren, die intakte XPA-, XPB- oder XPC-Gene trugen, eine Wiederherstellung des Reparaturmechanismus bewirkt werden, was zu einem verminderten Hautkrebsrisiko in den korrigierten Zellen führte [Zeng et al., 1997]. Eine andere Arbeitsgruppe brachte das XPA-Gen durch einen rekombinanten, adenoviralen Vektor in XPA-Knockout-Mäuse ein, wodurch *in vitro* eine ausreichende Expression des XPA-Gens, mit normal bleibender Viabilität der Zellen, und ein Anstieg der Reparaturkapazität auf normales Niveau erreicht werden konnte [Marchetto et al., 2004]. Bei der *in vivo* Anwendung zeigten Mäuse, die das intakte XPA-Gen erhielten, nach UVB-Bestrahlung im Ggs. zu den Knockout-Mäusen, die nur den Leervektor erhielten, wie Wildtyp-Mäuse keine Tumorbildung. Desweiteren zeigten die Mäuse in dem Beobachtungszeitraum von fünf Monaten keinerlei Zeichen von Toxizität oder anderen Unverträglichkeitsreaktionen [Marchetto et al., 2004].

Die X-assoziierte Ichthyosis (XLI), die durch eine hypertrophe Epidermis und abnormale Schuppung gekennzeichnet ist [William und Elias, 1987; Bale et al., 1996], wird durch einen Defekt in der Steroidsulfatase verursacht, wodurch es zu einer Anhäufung von Cholesterolsulfat und Ausbildung einer stark verdickten Hornhaut kommt. *In vitro* konnte durch Transduktion XLI-defekter Zellen mit retroviralen Vektoren, die das funktionelle Gen für die Steroidsulfatase enthielten, die Enzymaktivität zu 100% wiederhergestellt werden [Freiberg et al., 1997]. Die Lamelläre Ichthyosis (LI) ist eine bei der Geburt vorhandene Verhornungsstörung der Keratinocyten mit lamellärer Schuppung und diffuser Rötung, die durch einen

Defekt der Keratinozyten-Transglutaminase (TGase 1) ausgelöst wird. Durch retroviralen Transfer des intakten TGase 1-Gens in defekte Keratinozyten konnten im Vergleich zu gesunden Zellen normale Transglutaminase-Aktivitäten *in vitro* erreicht werden [Choate et al., 1996; Choate et al., 1997].

Epidermolysis bullosa (EB) hereditaria ist der Oberbegriff für angeborene Dermatosen mit einer starken Tendenz zur Blasenbildung durch Berührungen [Aberdam et al., 1994; Borradori und Sonnenberg, 1999; Pulkkinen et al., 1999]. Nach der Lokalisation der Blasenbildung unterscheidet man drei Hauptgruppen: EB simplex mit intraepidermaler/epidermolytischer Blasenbildung; EB junctionalis mit Spaltbildung in der Lamina lucida der Basalmembran und EB dystrophicans, bei der die Blasen unterhalb der Basalmembran entstehen. Um den EB Typ Junctionalis zu therapieren, wurden isolierte Keratinozyten *in vitro* mit retroviralen LTR-Vektoren transfiziert, die das funktionelle *LAMB3*-Gen enthielten, wodurch korrigierte Zellen ähnliche Wachstumsraten wie gesunde Keratinozyten zeigten [Robbins et al., 2001]. In einem anderen Versuch wurden kultivierte EB-Keratinozyten-Stammzellen *in vitro* mit Retroviren transfiziert, die das intakte *Laminin 5*-Gen enthielten, wodurch korrigierte Zellen wieder ein normales Adhäsions- und Migrationsverhalten aufwiesen [Dellambra et al., 2000]. Die rezessive dystrophe EB (DEB) wird durch eine Mutation in *COL7A1* verursacht, wodurch ein defektes extrazelluläres Kollagen VII entsteht [Woodley et al., 2004]. Der Gruppe um Chen gelang ein *in vitro* Gentransfer mit minimierten Lentiviren, die ein 8,8 kb großes humanes *COL7A1*-Gen enthielten, in DEB- Keratinozyten und –Fibroblasten, was zu einer anhaltenden Synthese und Sekretion von Typ VII-Collagen führte. Im Ggs. zu unbehandelten Zellen, zeigten die therapierten Zellen normale Morphologie, proliferatives Potential, Matrix Anheftung und Beweglichkeit [Chen et al., 2002].

Kürzliche Ergebnisse der ersten Versuche einer humanen Haut-Gentherapie sind sehr ermutigend und zeigten, dass Hautgentherapie machbar ist und zu einer „Heilung“ der zugrunde liegenden Genodermatose führen kann. In diesem Versuch erhielt ein Patient, der am EB Typ Junctionalis mit einem Gendefekt in der β -Kette von Laminin 5 (*Lam5- β 3*) litt, ein autologes Hauttransplantat, welches *ex vivo* genetisch modifiziert wurde das funktionale *Lam5- β 3* Gen zu exprimieren. Auch nach einem Jahr und länger war im Transplantat die Expression des vorher

fehlenden Gens nachweisbar; es zeigten sich keine Zeichen von Blasenbildung, die sonst typisch für die Krankheit sind [Mavilio et al., 2006].

5.6 Voraussetzungen für einen langfristigen Gentransfer

Der Gendefekt in oben genannten Krankheiten ist lebenslang vorhanden. Daher sollte für eine langfristige Rekonstitution des Gendefektes ein stabiler Gentransfer angestrebt werden. Die Voraussetzung hierfür ist die Integration des Therapiegens in die chromosomale DNA der Zielzelle, da ansonsten die Genexpression im Laufe der Zellteilungen, durch die epidermale Erneuerungsphase nach 28 Tagen, verloren geht. Weiterhin sollte hier ein Gentransfer in Stammzellen [Dellambra et al., 2000] angestrebt werden und ein geeigneter Vektor für den Gentransfer ausgewählt werden. Wichtige Kriterien für die Auswahl eines Gentransfer-Vektors sind seine Expressionsdauer und –effizienz, Selektivität, Immunogenität und Sicherheit. Um zu verhindern, dass ein neuer infektiöser pathogener Organismus durch Mutationen oder Rekombination entstehen kann, sollte überdies darauf geachtet werden, dass Replikations-defiziente Viren für die Gentherapie verwendet werden [Strauss and Barranger, 1997].

5.7 Vergleich von rAAV-2 basierten Vektoren mit anderen viralen Vektoren

Bei den oben genannten Gentransferstrategien autosomal-rezessiver Genodermatosen wurden vor allem Retro- und Lentiviren eingesetzt. Die Vor- und Nachteile der jeweiligen viralen Vektoren werden im Folgenden kurz diskutiert.

Vektoren auf retroviraler Basis werden bei humanen Gentherapiestudien am häufigsten als Gentransfervehikel eingesetzt. Ihr Vorteil ist eine hohe Transduktionseffizienz, durch die *in vitro* Transduktionsraten bis zu 100 % bei Keratinozyten erreicht werden [Mathor et al., 1996; Choate und Khavari, 1997]. Einer ihrer Nachteile ist, dass sie nur proliferierende Zellen transfizieren können, wodurch eine *in vivo* Anwendung in der Hautgentherapie eingeschränkt ist, da die normale Mitoserate in der Epidermis sehr gering ist [Kuhn et al., 2002]. Bei der Gentherapeutischen Behandlung von Tumoren oder in der Wundheilung könnte es aber auch ein Vorteil sein, dass Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren können. Ein anderer Nachteil von Retroviren ist die zufällige, an mehreren Stellen im

Chromosom stattfindende Integration in die Wirtszelle, wodurch das Risiko einer Insertionsmutagenese besteht [Crystal et al., 1995]. Eine solche Insertionsmutagenese kann durch Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens oder durch Aktivierung eines Onkogens zur Tumorentstehung führen. Obwohl das Risiko über Jahre hinweg als niedrig eingestuft wurde, traten bei zwei Kindern in ersten Therapieversuchen mit Retroviren unerwartet T-Zell-Leukämien auf, die vermutlich durch Insertionsmutagenese ausgelöst wurden [Marshall et al., 2002; Marshall et al., 2003; Kohn et al., 2003; Kaiser et al., 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003].

Lentiviren, zu denen auch HIV gehört, stellen eine Subgruppe von Retroviren dar. Lentiviren können im Ggs. zu den anderen Retroviren auch ruhende Zellen transfizieren, wodurch sie auch für *in vivo* Transfektionen geeignet sind [Kuhn et al., 2002]. Mittels Lentiviren konnte in mehreren *in vitro* Transfektionsversuchen an EB-Keratinocyten eine Reversion des Phänotyps erreicht werden [Ghazizadeh et al., 2004; Chen et al., 2002]. In einem Xenotransplantationsmodell konnte humane Haut mittels Lentiviren erfolgreich *in vivo* transfiziert werden [Baek et al., 2001; Kuhn et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur *in vitro* Behandlung des Netherton-Syndroms AAV-2 Vektoren verwendet. AAV-2 Vektoren wurden gewählt, weil sie in das Genom integrieren können und somit für einen Langzeitgentransfer zur Behandlung vererbter Krankheiten prinzipiell geeignet sind [Rizzo et al., 2000; Braun-Falco et al., 2005]. AAV-2 integriert hierbei bevorzugt in die Stelle AAVS1 auf Chromosom 19, was die Gefahr einer Insertionsmutagenese minimiert.

Außerdem ist mit AAV-2 wegen seiner Fähigkeit sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen zu infizieren, sowohl ein *in vitro* als auch ein *in vivo* Gentransfer möglich, wodurch rAAV-2 Vektoren gegenüber Retroviren im Einsatz bei der Hautgentherapie einen entscheidenden Vorteil haben. In einer *in vivo* Applikation im Schweinmodell wurde ein erfolgreicher Gentransfer in die Epidermis, Haarfollikel und adnexale Strukturen bereits gezeigt. Die Transgenexpression hielt hier nach intradermaler Vektorinjektion für mehr als 6 Wochen an [Hengge and Mirmohammadsadegh, 2000]. Eine subkutane Injektion von rAAV-Partikeln in Mäuse, resultierte sogar in einer dauerhaften Transgenexpression von mehreren Monaten [Donahue et al., 1999]. Es wurde auch gezeigt, dass rAAV-Vektoren

humane primäre maligne Melanomzellen sehr effizient transfizieren können [Hacker et al., 2005].

5.8 Mausmodelle für das Netherton Syndrom

Bevor die gentechnisch veränderten rAAV-2 Partikel beim Menschen zum Einsatz kommen können, müssten erst mögliche Nebenwirkungen ausgeschlossen werden. Hierzu ist die Verwendung von Tiermodellen unabdingbar. Es ist aber fraglich, ob sich die Mausmodelle, die derzeit für das Netherton Syndrom existieren, für Transfektionsversuche mit unserem Virus eignen. Zum einen sind die Mäuse unabhängig von der Mutationsstelle nur sehr kurz lebensfähig [Yang et al., 2004; Descargues et al., 2005; Hewett et al., 2005], zum anderen müsste vorab abgeklärt werden, ob die beobachteten Effekte auch nach Transfektion von Maus-Keratinocyten auftreten.

Das Maus-*Spink5*-Gen ist dem humanen *SPINK5*-Gen zu 68% homolog. Die genomische Organisation des Maus-*Spink5*-Gens ist der des humanen sehr ähnlich, in dem die Positionen von Exon-Intron-Übergängen gut konserviert sind. Das Maus-*Spink5*-Gen liegt auf dem Maus-Chromosom 18B3, das des Menschen auf Chromosom 5q32. Das Maus-*Spink5*-Gen wird als zwei mRNAs transkribiert, die in zwei unterschiedlichen 3'UTRs resultieren. Das humane LEKTI-Protein kann dagegen in drei verschiedenen Spleißvarianten vorkommen. Die Proteinsequenz vom Maus-Lekti ist zu 58% identisch und zu 71% homolog zum humanen LEKTI. Die beiden Proteine haben eine ähnliche Domän-Organisation, inklusive der beiden Kazal-Typ-Domänen 2 und 15. Im Maus-Lekti fehlen 70 AS völlig, was der Domäne 6 und der Linker-Region zwischen Domäne 6 und 7 von LEKTI entspricht, dagegen sind im Maus-Lekti 30 Aminosäuren zwischen Domäne 13 und 14 zusätzlich eingebaut [Yang et al., 2004; Galliano et al., 2005].

Derzeit existieren für das Netherton Syndrom drei verschiedene Mausmodelle:

In dem Modell der AG Hovnanian wurde zur Inaktivierung von Lekti ein Targeting-Vektor konstruiert, der das 5'Ende von Lekti durch homologe Rekombination deletiert, indem das Initiationscodon (ATG) sowie die ersten vier codierenden Exons

durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt werden [Descargues et al., 2005]. Die aus dieser Mutation resultierenden homozygot *Spink5* negativen Mäuse zeigen hohe Ähnlichkeit mit dem Netherton Syndrom in veränderter Desquamation, beeinträchtigter Keratinisierung, Haardefekten und einem Hautbarrierdefekt. Die Lekti-Defizienz führt durch die Hyperaktivität von SCTE und SCCE zu einem vermehrten Dsg1-Abbau im oberen Stratum granulosum. In diesen Mäusen wurde zudem eine Überexpression von CDSN beobachtet, mit erhöhten Mengen der unprozessierten und prozessierten CDSN-Formen. Im Westernblot wurde eine zusätzliche 50 kDa-Bande von CDSN detektiert, die evtl. aus einer abnormalen Prozessierung von CDSN resultieren könnte. Außerdem zeigten die Knockout-Mäuse eine erhöhte Prozessierung von pro-Filaggrin in Filaggrin-Monomere [Descargues et al., 2005]. Da die *Spink5*-Knockout-Mäuse innerhalb weniger Stunden nach der Geburt starben wurden für Untersuchungen der phänotypischen Veränderungen in der Haut von mutanten Mäusen, Hauttransplantationen auf Nacktmäuse durchgeführt.

Ein anderes Maus-Modell für das Netherton-Syndrom, in dem das *Spink5*-Gen durch Insertionsinaktivierung mittels eines Transposons ausgeschaltet wurde, stammt von der Gruppe um Overbeek. Durch die Integration wurden alle *Spink5*-Exons auf dem Maus-Chromosom 18 deletiert. In diesem Modell kam es zu einem kompletten Abbau von CDSN, während keine signifikante Reduktion von Dsg1/2 oder Dsc1 beobachtet wurde [Yang et al., 2004]. Die mutante Mauslinie zeigt ebenfalls schwere Hautdefekte, die mit desmosomaler Fragilität assoziiert sind sowie perinatalem Tod durch Dehydrierung.

Beiden Mausmodellen gemeinsam ist der vollständige *Spink5*-Verlust durch die Mutation und daraus resultierend ein früher Tod der Knockout-Mäuse. In einem dritten Mausmodell wurde ein vorzeitiges STOPP-Codon an Position R820X in das Maus-*Spink5*-Gen eingebaut, die der Mutation E827X im humanen *SPINK5*-Gen entsprechen sollte. Obwohl diese Mutation erst in Domäne 12 auftritt, also wenigstens 11 funktionsfähige *Spink5*-Domänen vorhanden sein sollten, wirkt sich auch diese Mutation letal auf die Mäuse aus, da diese bereits wenige Stunden nach der Geburt sterben [Hewett et al., 2005]. Diese Beobachtungen widersprechen denen im humanen System, wo heterozygote und homozygote Mutationen in späteren LEKTI-Domänen nicht unweigerlich zum Tod führen.

5.9 Zielgerichtete Lieferung von rAAV-Partikeln

Der in dieser Arbeit verwendete konventionale rAAV-2 Virusvektor ist sowohl zum *ex vivo* als auch zum *in vivo* Gentransfer fähig [Braun-Falco et al., 2007]. Neuere Entwicklungen in der AAV Vektor Technologie lösten viele der vorherrschenden Probleme dieses konventionalen rAAV2 Vektors. Darunter sind die Erhöhung der Transduktionseffizienz und -spezifität durch Verwendung von Mosaik-Vektoren, die entweder aus einer Mischung von Capsid-Untereinheiten bestehen, die die Eigenschaften von mehreren parentalen Serotypen kombinieren oder chimäre Vektoren mit einem Austausch bestimmter Capsidomänen, oder Capside mit Insertionen spezifischer Liganden für die gezielte Kopplung an Zelloberflächenrezeptoren [Büning et al., 2008].

Dieselbe Technik der Capsidmodifikation wurde verwendet, um immunogene Epitope auszutauschen, um so einer neutralisierenden Antikörperantwort zu entkommen und wiederholte Vektorgaben zu erlauben. Eine Alternative könnte hier sein, die genterapeutische Expressionskassette mit den AAV-2 ITRs in die Hülle des Serotyps AAV-8 zu verpacken, da die Bildung neutralisierender Antikörper gegen AAV-8 bisher nicht beschrieben wurde.

Ein anderes Problem des AAV-Vektors war das einzelsträngige virale Genom, das zunächst zum Doppelstrang umgewandelt werden muss, wodurch trotz hoher Vektor-Dosen nur eine geringe Proteinexpression erreicht wurde. Dieses Problem wurde durch die Verwendung von selbst-komplementären AAV-Vektoren umgangen, die ein „inverted repeat genome“ verpacken, das in dsDNA falten kann ohne dass eine DNA-Synthese nötig wird [McCarthy et al., 2008]. Diese Methode reduziert aber die Transgen-Kapazität, wodurch dieses Konzept nur für kleine therapeutische Gene nutzbar wäre. Im NS könnte es eine Chance geben, die volle Länge *SPINK5*-cDNA durch eine optimierte Kombination einer Auswahl der 15 Domänen, die LEKTI bilden ohne Verlust der Proteinfunktion auf eine verkürzte Version zu reduzieren. Vor kurzem identifizierte Deraison et al. bestimmte biologisch aktive Fragmente von LEKTI, im besonderen D5, D6, D8-D11 und D9-D15, die spezifische Inhibition von KLK5, 7 und 14 zeigten, wobei hier D8-D11 gegen KLK5 am stärksten waren [Deraison et al., 2007]. Solche Fragmente könnten als therapeutisches Transgen zumindest in einigen NS-Patienten ausreichend sein, aber weitere Forschungsarbeit ist nötig, um herauszufinden, welche Domän-Kombinationen am besten für welche Mutationen sind. Ein dadurch verkleinertes Transgen wäre auch für nicht-virale

topische Gentransfermethoden im Sinne einer Genkrem geeignet, z.B. durch Verwendung von Transposonelementen, die eine stabile Integration des Transgens bewirken und eine liposomale Formulierung, die die transcorneale Permeation erleichtert [Foldvari et al., 2006]. Die defekte Barriere würde die Partikel eventuell bis zur Basalschicht durchlassen, wobei hier durch Wahl geeigneter Targeting-Rezeptoren verhindert werden könnte, dass die Partikel weiter vordringen. Ein möglicher Targeting-Rezeptor könnte das vorwiegend auf den Stammzellen der Basalschicht vorkommende β 1-Integrin CD29 sein. Hierzu wurden in unserem Labor in Analogie zur Arbeit von Ried 2002 bereits Vorversuche durchgeführt. Ein modifizierter rAAV2-GFP Vektor, der in seiner Capsidhülle eine Protein A-Sequenz enthielt, wurde durch die Zugabe eines Antikörpers gegen das CD29-Molekül direkt zu den CD29-positiven Zellen geführt. In einem Transfektionsansatz konnten dabei 54% GFP-positive Zellen detektiert werden (nicht gezeigt). Die Stammzellen der Basalschicht könnten dann durch die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI enthaltenden Vektoren, wieder intakte LEKTI-Proteine bilden, wodurch die Barriere wiederhergestellt werden könnte.

Ein anderer wichtiger Aspekt, der untersucht werden müsste, ist die Wahl eines geeigneten Promotors. Im Falle von LEKTI sollte dieser möglicherweise durch Calcium regulierbar sein, damit das Protein an den Stellen exprimiert wird, an denen es natürlicherweise vorkommt. Der in dieser Arbeit verwendete CMV-Promotor bewirkte die Expression von LEKTI Calcium-unabhängig bereits im Proliferationsmedium. Ob dies in einem *in vivo* Ansatz schädliche Auswirkungen haben könnte, kann hier nicht beantwortet werden. Da LEKTI aber natürlicherweise erst zu einem späten Zeitpunkt in der Differenzierung der epidermalen Strukturen auftritt, ist dies ohne weitere Untersuchungen nicht auszuschließen.

In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass aus rAAV-2 transfizierten Keratinozyten organotypische Strukturen wachsen können [Agrawal et al., 2004; Haug et al., 2006]. Solche Strukturen könnten durch Hauttransplantation wieder auf die Dermis von Patienten aufgebracht werden. In dieser Arbeit war es nicht möglich, ausreichend gestaltete Hautäquivalente aus transfizierten NS-Zellen zu generieren, da die NS-Keratinozyten auf Dermisunterlagen schlechter wuchsen als gesunde Keratinozyten. In solchen Hautäquivalenten wäre es möglich gewesen zu untersuchen, ob sich die Morphologie durch die Transfektion verbessern lässt. Da es aber andererseits gelang, NS-Zellen auf Kollagen Typ I-beschichteten Kammer-

Objektträgern zu kultivieren, und auch die Kultivierung auf Kollagengelen besser zu funktionieren schien als die auf Dermisstücken, könnte sich eine nachfolgende Arbeit nach einigen Modifikationen mit diesem Problem beschäftigen.

Zusammenfassend liefern die hier präsentierten Daten die Grundlage und Rationale, das Gentherapie eine vielversprechende zukünftige therapeutische Behandlung von NS darstellen könnte.

5.10 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die Hautdefekte des Netherton Syndroms gentherapeutisch *in vitro* zu korrigieren. Vorliegende Arbeit zeigt, dass sich rAAV-2 LEKTI Vektoren prinzipiell zur Rekonstitution des Gendefektes in NS-Keratinocyten eignen. Die in NS-Zellen eingebrachte LEKTI-cDNA wurde in den Zellen zu einem funktionellen Protein umgewandelt und war so in der Lage die unkontrollierte Aktivität Trypsin-ähnlicher Proteasen zu hemmen und dadurch den Zellen eine normale Differenzierung zu ermöglichen. Nächste Schritte hinsichtlich einer Gentherapie am Netherton-Syndrom könnten damit in Angriff genommen werden.

6. Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung deutsch

Diese Arbeit beschreibt den erstmaligen Versuch einer *in vitro* Gentherapie an dem autosomal-rezessiv vererbten Netherton Syndrom (NS). Für den Gentransfer wurde das nicht-human pathogene Adeno-assoziierte Virus (AAV) als Vehikel verwendet.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob der *SPINK5*-Gendefekt in Keratinozyten von NS-Patienten durch Gentransfer einer intakten LEKTI-cDNA, mittels rAAV-2 Vektoren, korrigiert werden kann. Bei NS-Patienten bewirkt der *SPINK5*-Gendefekt eine unkontrollierte Aktivität der Proteasen SCTE und/oder SCCE, was in einem unkontrollierten und verfrühten Abbau von Desmosomenbestandteilen und damit in einer erhöhten Desquamation resultiert. Als Kontrolle wurden die Patientenzellen mit rAAV-2 Vektoren transfiziert, die GFP enthielten.

Die Transfektion mit rAAV-2-LEKTI-Vektoren führte zu einer deutlichen Erhöhung der LEKTI-mRNA-Menge in den Keratinozyten aller untersuchten Netherton-Patienten, während rAAV2-GFP transfizierte Zellen wie untransfizierte Zellen kaum eine LEKTI-mRNA-Expression zeigten. Zur Quantifizierung wurde eine „realtime“ PCR-Analyse auf SYBRgreen-Basis durchgeführt. Demnach war die LEKTI-Expression in rAAV-2-LEKTI-transfizierten Zellen im Proliferationsmedium 4,7 x und im Differenzierungsmedium 3,7 x höher als in rAAV-2-GFP-transfizierten Zellen. Intrazelluläre FACS-Analysen und Zytochemische Färbungen zeigten, dass die eingebrachte LEKTI-cDNA in LEKTI-Protein translatiert wurde. Mittels intrazellulärer FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI, bezogen auf die GFP-Kontrolle, zu einer signifikanten Erhöhung der Proteasesubstrate Dsg1, Dsc1 und CDSN führte. Eine deutliche Annäherung an gesunde Zellen konnte bei dieser geringen Fallzahl nicht beobachtet werden. Zytochemisch zeigten die rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen der Patienten 1, 2 und 6 bezogen auf die rAAV-2 GFP-Kontrolle eine stärkere Färbung des Moleküls Dsg1, während CDSN nur in rAAV-2 LEKTI-transfizierten Zellen von Patient 1 und 6 stärker gefärbt war.

Untransfizierte und rAAV-2 GFP-transfizierte NS-Zellen zeigten im Differenzierungsmedium eine signifikant höhere Trypsin-ähnliche Aktivität, als gesunde Zellen. In dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob das Einbringen einer intakten LEKTI-

cDNA zu einer Verminderung der hydrolytischen Aktivität der von LEKTI inhibierten Proteasen führt.

Über einen Trypsin-Aktivitätstest wurde indirekt auf eine wiederhergestellte inhibitorische Wirkung von LEKTI in den NS-Keratinozyten getestet. In allen fünf getesteten Patienten (1, 2, 3, 4, 6) führte die Transfektion mit rAAV-2 LEKTI Vektoren zu einer Senkung der Trypsin-ähnlichen Aktivität. In den Patienten 1, 2 und 4 betrug die Senkung der Aktivität etwa 60 %, während sie in den Patienten 3 und 6 immerhin 25 % betrug.

6.2 Summary

This study describes the first attempt for an *in vitro* gene therapy on the autosomal-recessive inherited disorder Netherton syndrome (NS). The non-human pathogenic adeno-associated virus (AAV) was used as vehicle for the gene transfer. The aim of this study was to estimate, if the *spink5*-gene defect in keratinocytes of NS patients could be corrected by rAAV-2 mediated LEKTI-cDNA gene transfer. The unregulated activity of the proteases SCTE and SCCE caused by the *Spink5*-gene defect, results in an uncontrolled and premature degradation of the desmosome components and for that in an increased desquamation. Control transfection was performed using rAAV-2 GFP containing vectors.

LEKTI mRNA was significantly increased in the keratinocytes of all investigated NS patients after rAAV-2 LEKTI transfection, while nearly no LEKTI mRNA could be detected in rAAV-2 GFP transfected and untransfected cells. As determined by realtime PCR analysis, LEKTI-expression in rAAV-2 LEKTI transfected cells was 4.7 fold higher in proliferation medium and 3.7 fold higher in differentiation medium compared to the respective GFP-control.

LEKTI cDNA was translated to LEKTI protein as shown by intracellular FACS analysis and by cytochemical staining. As determined by FACS analysis the proteases substrates Dsg1, Dsc1 and CDSN were significantly higher in rAAV-2 LEKTI transfected cells as in the GFP control, but compared to cells of healthy individuals they were not significantly altered. Compared to rAAV-2 GFP transfected cells an increased cytochemical staining of Dsg1 was observed in rAAV-2 LEKTI-

transfected cells of patient 1, 2 and 6, while CDSN was increased only in patient 1 and 6.

In differentiation medium untransfected and rAAV-2 GFP-transfected NS cells showed a significant higher trypsin-like activity than healthy cells. A trypsin-activity assay was used as indirect method for detecting reconstituted inhibitory action of LEKTI in the treated NS keratinocytes. In all five rAAV-2 LEKTI transfected patients (1, 2, 3, 4 and 6) the hydrolytic trypsin-like activity was reduced. In patients 1, 2 and 4 the activity was reduced to 40 %, while patients DW and HLM showed a residual activity of 75 % after transfection.

6. Literaturverzeichnis

Aberdam, D., Galliano, M. F., Vailly, J. (1994). Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is genetically linked to the mutations in the nicein/kalinin (laminin-5) LAMC2 gene. *Nat Genet* 6, 299-304.

Agrawal, N., You, H., Liu, Y., Chiriva-Internati, M., Bremner, J., Garg, T., Grizzi, F., Krishna Prasad, C., Mehta, J.L., Hermonat, P.L. (2004). Generation of recombinant skin in vitro by adeno-associated virus type 2 vector transduction. *Tissue Eng* 10, 1707-1715.

Alexeev, V., Igoucheva, O., Domashenko, A., Cotsarelis, G., Yoon, K. (2000) Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 18, 43-47.

Baek, S. C., Lin, Q., Robbins, P. B., Fan, H., Khavari, P. A. (2001). Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue. *Hum Gene Ther* 12, 1551-1558.

Bale, S., Compton, J., Russel, L., DiGiovanna, J. (1996). Genetic heterogeneity in lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* 107, 140-141.

Beljan, G., Traupe, H., Metz, D., and Sunderkotter, C. (2003). Comel-Netherton syndrome with bacterial superinfection. *Hautarzt* 54, 1198-1202.

Bernard, D., Mehul, B., Thomas-Collignon, A., Simonetti, L., Remy, V., Bernard, M. A., Schmidt, R. (2003). Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin I2. *J Invest Dermatol* 120, 592-600.

Berns, K. I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54, 316-329.

Berns, K. I., and Linden, R. M. (1995). The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17, 237-245.

Bitoun, E., Bodemer, C., Amiel, J., de Prost, Y., Stoll, C., Calvas, P., and Hovnanian, A. (2002). Prenatal diagnosis of a lethal form of Netherton syndrome by SPINK5 mutation analysis. *Prenat Diagn* 22, 121-126.

Bitoun, E., Chavanas, S., Irvine, A. D., Lonie, L., Bodemer, C., Paradisi, M., Hamel-Teillac, D., Ansai, S., Mitsuhashi, Y., Taieb, A., et al. (2002). Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol* 118, 352-361.

Bitoun, E., Micheloni, A., Lamant, L., Bonnart, C., Tartaglia-Polcini, A., Cobbold, C., Al Saati, T., Mariotti, F., Mazereeuw-Hautier, J., Boralevi, F., et al. (2003). LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum Mol Genet* 12, 2417-2430.

- Blaese, R. M. (1993). Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res* 33, S49-53; discussion S53-45.
- Blankinship, M. J., Gregorevic, P., Allen, J. M., et al. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* 10, 671-678.
- Blaschke, S., Moller, R., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I., and Paul, E. (1998). Comel-Netherton syndrome. *Hautarzt* 49, 499-504.
- Borradori, L., Sonnenberg, A. (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complex. *J Invest Dermatol* 112, 411-418.
- Boyce, S. T., Ham, R. G. (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* 81, suppl 1, 33s-40s.
- Braun-Falco, M., and Hallek, M. (1998). Cutaneous gene therapy-perspectives of gene transfer in keratinocytes. *Hautarzt* 49, 536-544.
- Braun-Falco, M., Eisenried, A., Buning, H., Ring, J. (2005). Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer into human keratinocytes is influenced by both the ubiquitin/proteasome pathway and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Arch Dermatol Res* 296, 528-535.
- Braun-Falco, M., and Rödl, D. (2007). Recombinant adeno-associated virus vectors for somatic gene therapy in dermatology. *Expert Rev Dermatol* 2 (2), 167-177
- Braun-Falco, O., Plewig G., Wolff H.H., Burgdorf W.H.C., Landthaler M. (2005). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag 5. Auflage.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadts-Humme, S., Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, 717-733.
- Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D., and Rose, J. A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40, 241-247.
- Burge, S. (1994). Cohesion in the Epidermis. *Br J Dermatol* 131, 153-159.
- Burger, C., Gorbatyuk, O. S., Velardo, M. J. et al. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10, 302-317.
- Cao, T., Wang, X. J., Roop, D. R. (2000). Regulated cutaneous gene delivery: the skin as a bioreactor. *Hum Gene Ther* 11, 2297-2300.
- Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M., Serre, G. (2004). Degradation of corneodesmosome proteins by two

serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 122, 1235-1244.

Carter, B. J. (2005). Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 16, 541-550.

Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R. J., Walsh, C. E. (2000). Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* 2, 619-623.

Chao, S. C., Richard, G., and Lee, J. Y. (2005). Netherton syndrome: report of two Taiwanese siblings with staphylococcal scalded skin syndrome and mutation of SPINK5. *Br J Dermatol* 152, 159-165.

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

Chavanas, S., Garner, C., Bodemer, C., Ali, M., Teillac, D. H., Wilkinson, J., Bonafe, J. L., Paradisi, M., Kelsell, D. P., Ansai, S., et al. (2000). Localization of the Netherton syndrome gene to chromosome 5q32, by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 66, 914-921.

Check, E. (2003). Harmful potential of viral vectors fuels doubts over gene therapy. *Nature* 423, 573-574.

Chejanovsky, N., and Carter, B. J. (1989). Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* 173, 120-128.

Chen, M., Kasahara, N., Keene, D. R., et al. (2002). Restoration of Type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 32, 670-675.

Chiorini, J. A., Weitzman, M. D., Owens, R. A., Urcelay, E., Safer, B., and Kotin, R. M. (1994). Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J Virol* 68, 797-804.

Choate, K. A., Kinsella, T. M., Williams, M. L., Nolan, G. P., Khavari, P. A. (1996) Transglutaminase 1 delivery to lamellar ichthyosis keratinocytes. *Hum Gene Ther* 7, 2247-2253.

Choate, K. A., Khavari, P. A. (1997). Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo. *Hum Gene Ther* 8, 895-901.

Comél, M. (1949). Ichthyosis linearis circumflexa. *Dermatologica* 98, 133-136.

Davidson, B. L., Stein, C. S., Heth, J. A. et al. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3428-3432.

Dellambra, E., Pellegrini, G., Guerra, L., Ferrari, G., Zambruno, G., Mavilio, F., De Luca, M. (2000). Toward epidermal stem cell-mediated ex vivo gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 11, 2283-2287.

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

Derian C., et al. (1997). Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ*, 8, 743-749

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

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

De Semir, D., Aran, J. M. (2006). Targeted gene repair : the ups and downs of a promising gene therapy approach. *Curr Gene Ther* 6, 481-504.

Donahue, B. A., McArthur, J. G., Spratt, S. K., Bohl, D., Lagarde, C., Sanchez, L., Kaspar, B. A., Sloan, B. A., Lee, Y. L., Danos, O., Snyder, R. O. (1999). Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *Gene Med* 1, 31-42.

Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D., and Danos, O. (2001). Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75, 1824-1833.

Dranoff, G., and Mulligan, R. C. (1995). Gene transfer as cancer therapy. *Adv Immunol* 58, 417-454.

Driskell, R. A., and Engelhardt, J. F. (2003). Current status of gene therapy for inherited lung diseases. *Annu Rev Physiol* 65, 585-612.

Drögemüller, K. (2004). Untersuchungen zur Regulation der Genexpression des neuen humanen Multidomänen Serin-Proteinase Inhibitors LEKTI. Dissertation

Duan, D., Li, Q., Kao, A. W., Yue, Y., Pessin, J. E., and Engelhardt, J. F. (1999). Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 73, 10371-10376.

During, M. J., Kaplitt, M. G., Stern, M. B., and Eidelberg, D. (2001). Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* 12, 1589-1591.

Elias, P.M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80, 44-49.

Fartasch, M., Williams, M. L., and Elias, P. M. (1999). Altered lamellar body secretion and stratum corneum membrane structure in Netherton syndrome: differentiation from other infantile erythrodermas and pathogenic implications. *Arch Dermatol* 135, 823-832.

Fenjves, E. S. (1994). Approaches to gene transfer in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103, 70S-75S.

Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70, 3227-3234.

Flotte, T. R., Afione, S. A., Solow, R., Drumm, M. L., Markakis, D., Guggino, W. B., Zeitlin, P. L., and Carter, B. J. (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268, 3781-3790.

Foldvari, M., Babiuk, S., Badea, I. (2006). DNA delivery for vaccination and therapeutics through the skin. *Curr Drug Delv* 3, 17-28.

Fox, J. L. (2003). FDA panel recommends easing gene therapy trial limits. *Nat Biotechnol* 21, 344-345.

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

Freiberg, R. A., Choate, K. A., Deng, H., Alperin, E. S., Shapiro, L. J., Khavari, P. A. (1997). A model of corrective gene transfer in x-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* 6, 927-933.

Fritsch, P. O. (2004). *Dermatologie, Venerologie*. Springer Verlag 2. Auflage, 1-1101.

Fox, J. L. (2003). FDA panel recommends easing gene therapy trial limits. *Nat Biotechnol* 21, 344-345.

Galliano, M. F., Roccasecca, R. M., Descargues, P., Micheloni, A., Levy, E., Zambruno, G., D'Alessio, M., Hovnanian, A. (2005). Characterization and expression analysis of the *Spink5* gene, the mouse ortholog of the detective gene in Netherton syndrome. *Genomics* 85, 483-492

Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L. et al. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11854-11859.

- Gao, G., Vandenberghe, L. H., Alvira, M. R. et al. (2004). Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381-6388.
- Gao, G., Vandenberghe, L. H., Wilson, J. M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5, 285-297.
- Garrod, D.R., Merritt, A.J. and Niez, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14, 537-545.
- Geyer, A. S., Ratajczak, P., Pol-Rodriguez, M., Millar, W. S., Garzon, M., and Richard, G. (2005). Netherton syndrome with extensive skin peeling and failure to thrive due to a homozygous frameshift mutation in SPINK5. *Dermatology* 210, 308-314.
- Ghazizadeh, S. Taichman, L.B. (2000). Virus-mediated gene transfer for cutaneous gene therapy. *Gene Ther* 11, 2247-2251.
- Ghazizadeh, S., Katz, A. B., Harrington, R., Taichman, L. B. (2004). Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 9, 269-275.
- Greene, S. L., and Muller, S. A. (1985). Netherton's syndrome. Report of a case and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 13, 329-337.
- Greenhalgh, D. A., Rothnagel, J. A., and Roop, D. R. (1994). Epidermis: an attractive target tissue for gene therapy. *J Invest Dermatol* 103, 63S-69S.
- Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M. et al. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 10, 828-834.
- Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., Kleinschmidt, J. A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9, 2745-2760.
- Grimm, D., Pandey, K., Nakai, H., Storm, T. A., Kay, M. A. (2006). Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol* 80, 426-439.
- Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhardt, J. F., Muller, D., Lupien, P. J., and Wilson, J. M. (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6, 335-341.
- Gysel van, D., Koning, H., Baert, M. R. M., Savelkoul, H. F. J., Neijens, H. J., Oranje, A. P. (2001). Clinico-Immunological Heterogeneity in Comèl-Netherton Syndrome. *Dermatol* 202, 99-107.
- Hachem, J. P., Wagberg, F., Schmuth, M., Crumrine, D., Lissens, W., Jayakumar, A., Houben, E., Mauro, T. M., Leonardsson, G., Brattsand, M., et al. (2006). Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* 126, 1609-1621.

- Hacein-Bey-Abina, S., Kalle von, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.
- Hartschuh, W., Hausser, I., and Petzoldt, D. (1989). Successful retinoid therapy of Netherton syndrome. *Hautarzt* 40, 430-433.
- Haug, S., and Braun-Falco, M. (2005). Adeno-associated virus vectors are able to restore fatty aldehyde dehydrogenase-deficiency. Implications for gene therapy in Sjogren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* 296, 568-572.
- Haug, S., and Braun-Falco, M. (2006). Restoration of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency in Sjogren-Larsson syndrome. *Gene Ther* 13, 1021-1026.
- Hausser, I., and Anton-Lamprecht, I. (1996). Severe congenital generalized exfoliative erythroderma in newborns and infants: a possible sign of Netherton syndrome. *Pediatr Dermatol* 13, 183-199.
- Hengge, U. R., Mirmohammadsadegh, A. (2000). Adeno-associated virus expresses transgenes in hair follicles and epidermis. *Mol Ther* 2, 188-194.
- Herzog, R. W. (2004). AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle. *Meth Mol Biol* 246, 179-194.
- Hewett, D. R., Simons, A. L., Mangan, N. E., Jolin, H. E., Green, S. M., Fallon, P. G., McKenzie, A. N. J. (2005). Lethal, neonatal ichthyosis with increased proteolytic processing of filaggrin in a mouse model of Netherton syndrome. *Hum Mol Genet* 14, 335-346.
- High, K. A. (2004). Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 30, 257-267.
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M.L., Roop, D.R. and Steinert, P.M. (1991). Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem* 266, 6626-6636.
- Holzmann, H., Kippenberger, S., Ramirez-Bosca, A., Bereiter-Hahn, J., Bernd, A. (1994). Cell and tissue culture models in dermatology. The Frankfurt Center of Dermatology establishes models *Hautarzt* 45, 304-312.
- Huser, D. Weger, S., Heilbronn, R. (2002). Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J Virol* 76, 7554-7559.
- Im, D. S., and Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61, 447-457.
- Irvine, A. D., McLean, W. H. (2003). The molecular genetics of the genodermatoses: progress to date and future directions. *Br J Dermatol* 148, 1-13.

Ishida-Yamamoto, A., Deraison, C., Bonnart, C., Bitoun, E., Robinson, R., O'Brien, T. J., Wakamatsu, K., Ohtsubo, S., Takahashi, H., Hashimoto, Y., et al. (2005). LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J Invest Dermatol* 124, 360-366.

Ishida-Yamamoto, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T. J., Serre, G., and Iizuka, H. (2004). Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol* 122, 1137-1144.

Jayakumar, A., Kang, Y., Henderson, Y., Mitsudo, K., Liu, X., Briggs, K., Wang, M., Frederick, M. J., El-Naggar, A. K., Bebok, Z., and Clayman, G. L. (2005). Consequences of C-terminal domains and N-terminal signal peptide deletions on LEKTI secretion, stability, and subcellular distribution. *Arch Biochem Biophys* 435, 89-102.

Jensen, T. G. (2004). Strategies for long-term gene expression in the skin to treat metabolic disorders. *Expert Opin Biol Ther* 4, 677-682.

Judge, M. R., Morgan, G., Harper, J. I. (1994). A clinical and immunological study of Netherton's syndrome. *Br. J. Dermatol* 131, 615-621.

Kaiser, J. (2003). Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* 299, 495.

Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., and Daida, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79, 609-614.

Khavari, P. A. (1998). Gene therapy for genetic skin disease. *J Invest Dermatol* 110, 462-467.

Khavari, P. A. (2000). Genetic correction of inherited epidermal disorders. *Hum Gene Ther* 11, 2277-2282.

Khavari, P. A., Rollman, O., Vahlquist, A. (2002). Cutaneous gene transfer for skin and systemic diseases. *J Intern Med* 252, 1-10.

Kilic, G., Guler, N., Ones, U., Tamay, Z., and Guzel, P. (2006). Netherton syndrome: report of identical twins presenting with severe atopic dermatitis. *Eur J Pediatr* 165, 594-597.

Kohn, D. B., Sadelain, M., and Glorioso, J. C. (2003). Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* 3, 477-488.

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

- Kren, B. T., Bandyopadhyay, P., Steer, C. J. (1998). In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 4, 285-290.
- Kreutzmann, P., Schulz, A., Standker, L., Forssmann, W. G., and Magert, H. J. (2004). Recombinant production, purification and biochemical characterization of domain 6 of LEKTI: a temporary Kazal-type-related serine proteinase inhibitor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803, 75-81.
- Kuhn, U., Terunuma, A., Pfützner, W., Foster, R. A., Vogel, J. C. (2002). In vivo assessment of gene delivery to keratinocytes by lentiviral vectors. *Virology* 76, 1496-1504.
- Labow, M. A., Graf, L. H., Jr., and Berns, K. I. (1987). Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol Cell Biol* 7, 1320-1325.
- Laughlin, C. A., Jones, N., and Carter, B. J. (1982). Effect of deletions in adenovirus early region 1 genes upon replication of adeno-associated virus. *J Virol* 41, 868-876.
- Leiden, J.M. (1995). Gene therapy-promise, pitfalls and prognosis. *N Engl J Med* 333, 871-3.
- Leigh, I.M., Watt, F. (1994). Keratinocyte methods. Cambridge University Press, 1-207
- Lonsdale-Eccles, J.D., Resing, K.A., Meek, R.L. and Dale, B.A. (1984). High-molecular-weight precursor of epidermal filaggrin and hypothesis for its tandem repeating structure. *Biochemistry* 23, 1239-1245.
- Mägert, H. J., Kreutzmann, P., Drogemuller, K., Standker, L., Adermann, K., Walden, M., John, H., Korting, H. C., and Forssmann, W. G. (2002). The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role. *Eur J Med Res* 7, 49-56.
- Mägert, H. J., Kreutzmann, P., Standker, L., Walden, M., Drogemuller, K., and Forssmann, W. G. (2002). LEKTI: a multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 573-576.
- Mägert, H. J., Standker, L., Kreutzmann, P., Zucht, H. D., Reinecke, M., Sommerhoff, C. P., Fritz, H., and Forssmann, W. G. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 274, 21499-21502.
- Magnaldo, T., Pommès, L., Asselineau, D. and Darmon, M. (1990). Isolation of a GC-rich cDNA identifying mRNA present in human epidermis and modulated by calcium and retinoic acid in cultured keratinocytes. Homology with murine loricrin mRNA. *Mol Biol Rep* 14, 237-246.
- Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S., Larson, P. J., Herzog, R. W., Arruda, V. R., Tai, S. J., Ragni, M. V., Thompson, A., Ozelo, M., et al. (2003). AAV-mediated factor

IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963-2972.

Marshall, E. (2002). Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science* 298, 34-35.

Marshall, E. (2003). Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 299, 320.

Mathor, M. B., Ferrari, G., Dellambra, E., Cilli, M., Mavilio, F., Cancedda, R., De Luca, M. (1996). Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10371-10376.

Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro, S., Conti, A., Magnoni, C., Giannetti, A., De Luca, M. (2006). Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 12, 1397-1402.

McCarthy, D.M., Young, S.M. Jr, Samulski, R.J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38, 819-845.

McPherson, R. A., Rosenthal, L. J., and Rose, J. A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 147, 217-222.

Mendelson, E., Smith, M. G., and Carter, B. J. (1988). Expression and rescue of a nonselected marker from an integrated AAV vector. *Virology* 166, 154-165.

Mendelson, E., Trempe, J. P., and Carter, B. J. (1986). Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol* 60, 823-832.

Meyers, C., Mane, M., Kokorina, N. et al. (2000). Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* 272, 338-346.

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

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.

Morgan, R. A., and Anderson, W. F. (1993). Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 62, 191-217.

Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330, 375-383.

- Müller, F. B., Hausser, I., Berg, D., Casper, C., Maiwald, R., Jung, A., Jung, H., and Korge, B. P. (2002). Genetic analysis of a severe case of Netherton syndrome and application for prenatal testing. *Br J Dermatol* 146, 495-499.
- Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129.
- Nakai, H., Yant, S.R., Storm, S. et al. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol* 75, 6969-6976.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess, S. et al. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34, 297-302.
- Nakai, H., Wu, X., Fuess, S. et al. (2005). Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* 79, 3606-3614.
- Nakai, H., Fues, S., Storm, S., Muramatsu, S., Nara, Y., Kay, M.A. (2005b). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* 79, 214-224.
- Navsaria, H., Myers, S., Leigh, I., McKay, I. (1995). Culturing skin *in vitro* for wound therapy *Trends Biotechnol* 13, 91-100.
- Netherton, E. W. (1958). A unique case of trichorrhexis nodosa; bamboo hairs. *AMA Arch Derm* 78, 483-487.
- Onodera, M., Ariga, T., Kawamura, N., Kobayashi, I., Ohtsu, M., Yamada, M., Tame, A., Furuta, H., Okano, M., Matsumoto, S., et al. (1998). Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91, 30-36.
- Pacak, C. A., Mah, C. S., Thattaliyath, B. D. et al. (2006). Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction *in vivo*. *Circ Res* 99, e3-e9
- Pulkkinen, L., Uitto, J. (1999). Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 18, 29-42.
- Pruszkowski, A., Bodemer, C., Fraitag, S., Teillac-Hamel, D., Amoric, J. C., De Prost, Y. (2000). Neonatal and infantile erythrodermas : a retrospective study of 51 patients. *Arch Dermatol* 136, 875-880.
- Qing, K., Hansen, J., Weigel-Kelley, K. A., Tan, M., Zhou, S., and Srivastava, A. (2001). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression. *J Virol* 75, 8968-8976.
- Qing, K., Khuntirat, B., Mah, C., Kube, D. M., Wang, X. S., Ponnazhagan, S., Zhou, S., Dwarki, V. J., Yoder, M. C., and Srivastava, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells *in vitro* and murine tissues *in vivo*. *J Virol* 72, 1593-1599.

Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5, 71-77.

Raghunath, M., Tontsidou, L., Oji, V., Aufenvenne, K., Schurmeyer-Horst, F., Jayakumar, A., Stander, H., Smolle, J., Clayman, G. L., and Traupe, H. (2004). SPINK5 and Netherton syndrome: novel mutations, demonstration of missing LEKTI, and differential expression of transglutaminases. *J Invest Dermatol* 123, 474-483.

Rheinwald, J. G., Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343.

Reuter, P. (2004). Springer Lexikon Medizin. Springer Verlag 1. Auflage, 1-2382.

Ring, J., Przybilla, B., Ruzicka, T. (2006). Handbook of Atopic Eczema. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Second Edition, 2006.

Rizzo, W. B. and Craft, D. A. (2000). Sjögren-Larsson syndrome: accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma. *J Lipid Res* 41, 1077-1081.

Robbins, P. B., Lin, Q., Goodnough, J. B., Tian, H., Chen, X., Khavari, P. A. (2001) In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5193-5198.

Sanlioglu, S., Benson, P. K., Yang, J., Atkinson, E. M., Reynolds, T., and Engelhardt, J. F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* 74, 9184-9196.

Sárdy, M., Fay, A., Karpati, S., and Horvath, A. (2002). Comel-Netherton syndrome and peeling skin syndrome type B: overlapping syndromes or one entity? *Int J Dermatol* 41, 264-268.

Schnepp, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L. et al. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77, 3495-3504.

Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M., and Brauchle, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294, 1929-1932.

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

Smith, D. L., Smith, J. G., Wong, S. W., De Shazo, R. D. (1995). Netherton's syndrome: a syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings. *J Allergy Clin Immunol* 95, 116-123

- Snyder, R. O., Im, D. S., and Muzyczka, N. (1990). Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *J Virol* 64, 6204-6213.
- Snyder, R. O., Miao, C. H., Meuse, L. et al. (1999). Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 5, 64-70.
- Sondell, B., Thornell, L. E., and Egelrud, T. (1995). Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 104, 819-823.
- Spirito, F., Meneguzzi, G., Danos, O., Mezzina, M. (2001) Cutaneous gene transfer and therapy: the present and the future. *J Gene Med* 3, 21-31.
- Sprecher, E., Chavanas, S., DiGiovanna, J. J., Amin, S., Nielsen, K., Prendiville, J. S., Silverman, R., Esterly, N. B., Spraker, M. K., Guelig, E., et al. (2001). The spectrum of pathogenic mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *J Invest Dermatol* 117, 179-187.
- Steinert, P.M., Cantieri, J.S., Teller, D.C., Lonsdale-Eccles, J.D. and Dale, B.A. (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4097-4101.
- Steinert, P.M., Steven, A.C. and Roop, D.R. (1985). The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 42, 411-420.
- Stephenson, J. (2001). Studies illuminate cause of fatal reaction in gene-therapy trial. *JAMA* 285, 2570.
- Suga, Y., Tsuboi, R., Hashimoto, Y., et al. (2000). A case of ichthyosis circumflexa successfully treated with topical tacrolimus. *J Am Acad Dermatol* 42, 520-522.
- Summerford, C., Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72, 1438-1445.
- Summerford, C., Bartlett, J. S., and Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5, 78-82.
- Summerford, C., and Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72, 1438-1445.
- Suzuki, Y., Koyama, J., Moro, O., Horii, I., Kikuchi, K., Tanida, M., and Tagami, H. (1996). The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br J Dermatol* 134, 460-464.

- Taggart, C. C., Lowe, G. J., Greene, C. M., Mulgrew, A. T., O'Neill, S. J., Levine, R. L., McElvaney, N. G. (2001). Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 276, 33345-33352.
- Takeuchi, T., et al. (2000). Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated-receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* 275, 26333-26342
- Tartaglia-Polcini, A., Bonnart, C., Micheloni, A., Cianfarani, F., Andre, A., Zambruno, G., Hovnanian, A., and D'Alessio, M. (2006). SPINK5, the defective gene in netherton syndrome, encodes multiple LEKTI isoforms derived from alternative pre-mRNA processing. *J Invest Dermatol* 126, 315-324.
- Tratschin, J. D., West, M. H., Sandbank, T., and Carter, B. J. (1984). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol* 4, 2072-2081.
- Traupe, H. M., B. (1989). *The Ichthyoses A Guide to Clinical Diagnosis, Genetic Counseling and Therapy*. Springer Verlag, 1-253.
- Trempe, J. P., Mendelson, E., and Carter, B. J. (1987). Characterization of adeno-associated virus rep proteins in human cells by antibodies raised against rep expressed in *Escherichia coli*. *Virology* 161, 18-28.
- Uitto, J., Pulkkinen, L. (2000). The genodermatoses: candidate diseases for gene therapy. *Hum Gene Ther* 11, 2267-2275.
- Walley, A. J., Chavanas, S., Moffatt, M. F., Esnouf, R. M., Ubhi, B., Lawrence, R., Wong, K., Abecasis, G. R., Jones, E. Y., Harper, J. I., et al. (2001). Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* 29, 175-178.
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C. et al. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23, 321-328.
- Warrington, K. H. Jr, Herzog, R. W. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* 119, 571-603.
- Watkinson, A., (1999). Stratum corneum thiol protease (SCTP): A novel cysteine protease of late epidermal differentiation. *Arch Dermatol Res* 291, 260-268.
- Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Kotin, R. M., and Owens, R. A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5808-5812.
- Wiley, *The Journal of gene medicine*. www.wiley.co.uk/genmed/clinical
- William, M., Elias, P. (1987). Genetically transmitted, generalized disorders of cornification. *Dermatol Clin* 5, 155-178.
- Williams, M.L., Elias, P.M. (1993). From basket weave to barrier. Unifying concepts for the pathogenesis of the disorders of cornification. *Arch Dermatol* 129, 626-629.

- Woodley, D. T., Keene, D. R., Atha, T., Huang, Y., Ram, R., Kasahara, N., Chen, M. (2004). Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol Ther* 10, 318-326.
- Wraight, C. J., White, P. J., McKean, S. C., Fogarty, R. D., Venables, D. J., Liepe, I. J., Edmondson, S. R., Werther, G. A. (2000). Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18, 521-526.
- Wu, Z., Asokan, A., Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14, (3), 316-327.
- Wu, Z., Asokan, A., Grieger, J. C. et al. (2006). Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J Virol* 80, 11393-11397.
- Yakobson, B., Hrynko, T. A., Peak, M. J., and Winocour, E. (1989). Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J Virol* 63, 1023-1030.
- Yakobson, B., Koch, T., and Winocour, E. (1987). Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* 61, 972-981.
- Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Burkle, A., Schlehofer, J. R., and zur Hausen, H. (1988). DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res* 48, 3123-3129.
- Yang, T., Liang, D., Koch, P. J., Hohl, D., Kheradmand, F., Overbeek, P. A. (2004). Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in *Spink5*^{-/-} mice. *Genes Dev* 18, 2354-2358
- Xia, H., Mao, Q., Eliason, S. L., Harper, S. Q., Martins, I. H., Orr, H. T., Paulson, H. L., Yang, L., Kotin, R. M., Davidson, B. L. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10, 816-820
- Xiao, X., Li, J., Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72, 2224-2232.
- Zeng, L., Quilliet, X., Chevallier-Lagente, O., Eveno, E., Sarasin, A., Mezzina, M. (1997). Retrovirus-mediated gene transfer corrects DNA repair defect of xeroderma pigmentosum cells of complementation groups A, B and C. *Gene Ther* 4, 1077-84.
- Zolotukhin, S., Byrne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R. J., Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6, 973-985.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Daniela Rödl
Geboren	22. Februar 1972
Geburtsort	Wels, Oberösterreich
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Sonja Rödl, geb. Fink, Josef Rödl
Schwester	Alexandra Elisabeth Rödl

Schulische Ausbildung :

Gymnasium	Städt. Abendgymnasium München 1994-1997
Fremdsprachen:	Englisch, Latein, Französisch
Abschluss	Abitur 1997

Universität:

Universität	1997-2002 Biologiestudium Ludwig-Maximilian-Universität München
-------------	--

Berufliche Tätigkeit

Wissenschaftliche Mitarbeiterin der TU-München April 2004 – Februar 2009
Experimentelle Arbeiten wurden im Zentrum für Allergie und Umwelt der Dermatologie am Biederstein ausgeführt.
Seit Dezember 2008 Zusammenfassung der Thesen der Doktorarbeit und Fertigstellung der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.
Wissenschaftliche Mitarbeiterin der DFA (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie) 15. April – 30. November 2009
Wissenschaftliche Mitarbeiterin der TU-München, Epigenetik der Hautalterung, seit 01.12.2009

9. Veröffentlichungen

Poster ADF 2007: POSTERPREIS

Reconstitution of the gene defect in Netherton syndrome by rAAV2-LEKTI: effect on trypsin-activity in human keratinocytes. D. Roedl, H. Behrendt, J. Ring, M. Braun-Falco

Poster Heidelberg (DG-GT) 2007:

Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 (rAAV2)-Mediated Gene Transfer of Lympho-Epithelial Kazal-Type Related Inhibitor (LEKTI) in Keratinocytes of Netherton Syndrome Patients. Roedl D, Buters J, Behrendt H, Braun-Falco M

Poster ADF 2008:

Increased hydrolytic activity in Netherton syndrome keratinocytes can be reduced by transfection with rAAV2-LEKTI vectors. Daniela Roedl, Jeroen TM Buters, Heidrun Behrendt, Markus Braun-Falco

Vorträge:

Vortrag Arbeitskreis Gentherapie ADF 2007:

Gentherapie am Netherton-Syndrom: Effekt auf die Trypsinaktivität in humanen Keratinozyten

Summerschool Münster 2007:

Gentherapie am Netherton Syndrom mit rAAV2-LEKTI

ZAUM-Seminare:

070205 Rekonstitution des Netherton-Syndroms mit rAAV2-LEKTI
040406 Rekonstitution des Netherton-Gendefekts mit rAAV2-LEKTI
070307 Gentherapie am Netherton-Syndrom (Progress-Report)
290108 Gentherapie am Netherton-Syndrom (Progress-Report)

Veröffentlichung:

Recombinant adeno-associated virus vectors for somatic gene therapy in dermatology. Expert Review Dermatol April 2007, Vol. 2, No. 2, Pages 167-177
Markus Braun-Falco and Daniela Rödl

Serine protease inhibitor lymphoepithelial Kazal type-related inhibitor tends to be decreased in atopic dermatitis. JEADV, Juni 2009, Epub ahead of print
Roedl D, Traidl-Hoffmann C, Ring J, Behrendt H, Braun-Falco M

Enhancement of LEKTI in SPINK5-mutated keratinocytes from Netherton patients following rAAV-LEKTI gene transfer.

Daniela Roedl, Vinzenz Oji, Jeroen TM Buters, Heidrun Behrendt, Markus Braun-Falco (eingereicht bei Experimental Dermatology 12.10.09)

Anhang

Sequenz von pCMV-LEKTI-SV40 (LEKTI aus pTRE2hyg-LEKTI über KpnI—NotI einkloniert)

Sal I 10 20 30 40 50 60 *Pst* I 70 80
 GTCGACCAAT TCTCATGTTT GACAGCTTAT CATCGCAGAT CCGGGCAACG TTGTTGCATT GCTGCAGGCG CAGAAGTGGT
 CAGCTGGTTA AGAGTACAAA CTGTGCAATA GTAGCGTCTA GGCCCGTTGC AACACGTAA CGACGTCCGC GTCTTGACCA
 90 *Bgl* II 100 110 120 130 140 150 160
 AGGTATGGAA GATCTATACA TTGAATCAAT ATTGGCAATT AGCCATATTA GTCATTGGTT ATATAGCATA AATCAATATT
 TCC ATACCTT CTAGATATGT AACTTAGTTA TAACCGTTAA TCGGTATAAT CAGTAACCAA TATATCGTAT TTAGTTATAA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 GGCTATTGGC CATTGCATAC GTTGTATCTA TATCATAATA TGTACATTTA TATTGGCTCA TGCCAATAT GACCGCCATG
 CCGATAACCG GTAACGTATG CAACATAGAT ATAGTATTAT ACATGTAAAT ATAACCGAGT ACAGTTATA CTGGCGGTAC
 250 260 270 280 290 300 310 5'enhancer 320
 TTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCCGCG
 AACTGTAAT AATAACTGAT CAATAATTAT CATTAGTTAA TGCCCCAGTA ATCAAGTATC GGGTATATAC CTCAAGGCGC
 330 340 350 360 370 380 390 400
 TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA
 AATGTATTGA ATGCCATTTA CCGGGCGGAC CGACTGGCGG GTTGCTGGGG GTAACGTGAC TTATTACTGC ATACAAGGGT
 410 420 430 440 450 460 470 480
 TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA
 ATCATTGCGG TTATCCCTGA AAGGTAACGT CAGTTACCCA CCTCATAAAT GCCATTTGAC GGGTGAACCG TCATGTAGTT
Nde I 500 510 520 530 540 550 560
 GTGTATCATA TGCCAAGTCC GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCC AGTACATGAC
 CACATAGTAT ACGGTTCAAG CGGGGGATAA CTGCAGTTAC TGCCATTTAC CGGGCGGACC GTAATACGGG TCATGTACTG
 570 580 590 600 610 *Nco* I 620 630 640
 CTTACGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA
 GAATGCCCTG AAAGGATGAA CCGTCATGTA GATGCATAAT CAGTAGCGAT AATGGTACCA CTACGCCAAA ACCGTCATGT
 650 660 AP-1 670 680 690 700 710 3'enhancer 720
 CCAATGGGCG TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG TTTGTTTTGG
 GGTTACCCGC ACCTATCGCC AACTGAGTG CCCCTAAAGG TTCAGAGGTG GGGTAACTGC AGTTACCCTC AAACAAAACC
 730 740 750 760 770 CAAT 790 800
 CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT CGTAATAACC CCGCCCCGTT GACGCAAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG
 GTGGTTTTAG TTGCCCTGAA AGGTTTTACA GCATTATTGG GCGGGGGCAA CTGCGTTTAC CCGCCATCCG CACATGCCAC
 TATA-Box *Sac* I 830 840 *Bgl* II *Xba* I **Kpn** I *Bam* HI 872
 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCGTTTGTG GAACCGTCAG ATCTCTAGAA GCTGGGTACC CGGGGATCCG AC
 CCTCCAGATA TATTCGTCTC GAGCAAATCA CTTGGCAGTC TAGAGATCTT CGACCCATGG GCCCCTAGGC TG

Exon1 (Signalsequenz) | Exon2₅₆ | Domäne 1
 M K I A T V S V L L P L A L C L I Q | D A A S | K N E 25
ATG AAG ATA GCC ACA GTG TCA GTG CTT CTG CCC TTG GCT CTT TGC CTC ATA CAA | GAT GCT GCC AGT | AAG AAT GAA 947
 TAC TTC TAT CGG TGT CAC AGT CAC GAA GAC GGG AAC CGA GAA ACG GAG TAT GTT | CTA CGA CGG TCA | TTC TTA CTT (75)

| Exon 3₈₂
 D Q | E M C H E F Q A F M K N G K L F C P Q D K K F 50
 GAT CAG | GAA ATG TGC CAT GAA TTT CAG GCA TTT ATG AAA AAT GGA AAA CTG TTC TGT CCC CAG GAT AAG AAA TTT 1022
 CTA GTC | CTT TAC ACG GTA CTT AAA GTC CGT AAA TAC TTT TTA CCT TTT GAC AAG ACA GGG GTC CTA TTC TTT AAA (150)

| Exon 4₂₁₁
 F Q S L D G I M F I N K C A T C K M I L | E K E A K 75
 TTT CAA AGT CTT GAT GGA ATA ATG TTC ATC AAT AAA TGT GCC ACG TGC AAA ATG ATA CTG GAA AAA GAA GCA AAA 1097

Anhang

AAA GTT TCA GAA CTA CCT TAT TAC AAG TAG TTA TTT ACA CGG TGC ACG TTT TAC TAT GAC CTT TTT CTT CGT TTT (225)

S Q K R	Domäne 2		Exon 5 ²⁸³	L N C D D F	100
TCA CAG AAG AGG	GCC AGG CAT TTA GCA AGA GCT CCC AAG GCT ACT GCC CCA ACA GAG		CTG AAT TGT GAT GAT TTT	1172	
AGT GTC TTC TCC	CGG TCC GTA AAT CGT TCT CGA GGG TTC CGA TCA CGG GGT TGT CTC		GAC TTA ACA CTA CTA AAA	(300)	
			Sac I		Dra I

K K G E R D G D F I C P D Y Y E A V C G T D G K T 125
AAA AAA GGA GAA AGA GAT GGG GAT TTT ATC TGT CCT GAT TAT TAT GAA GCT GTT TGT GGC ACA GAT GGG AAA ACA 1247
TTT TTT CCT CTT TCT CTA CCC CTA AAA TAG ACA GGA CTA ATA ATA CTT CGA CAA ACA CCG TGT CTA CCC TTT TGT (375)

Y D N R C A L C A E N A		Exon 6 ⁴¹¹	K T G S Q I G V K S E G E	150
TAT GAC AAC AGA TGT GCA CTG TGT GCT GAG AAT GCG AAA ACC GGG TCC CAA ATT GGT GTA AAA AGT GAA GGG GAA		ATA CTG TTG TCT ACA CGT GAC ACA CGA CTC TTA CGC TTT TGG CCC AGG GTT TAA CCA CAT TTT TCA CTT CCC CTT	1322	
			(450)	

C K S S N	Domäne 3		Exon 7 ⁴⁷⁵	P E Q D V C S A F R P F V R D G R L G C	175
TGT AAG AGC AGT AAT	CCA GAG CAG GAT GTA TGC AGT GCT TTT CGG CCC TTT GTT AGA GAT GGA AGA CTT GGA TGC		GGT CTC GTC CTA CAT ACG TCA CGA AAA GCC GGG AAA CAA TCT CTA CCT TCT GAA CCT ACG	1397	
ACA TTC TCG TCA TTA			(525)		

T R E N D P V L G P D G K T H G N K C A M C A E L 200
ACA AGG GAA AAT GAT CCT GTT CTT GGT CCT GAT GGG AAG ACG ACT GGC AAT AAG TGT GCA ATG TGT GCT GAG CTG 1472
TGT TCC CTT TTA CTA GGA CAA GAA CCA GGA CTA CCC TTC TGC TGA CCG TTA TTC ACA CGT TAC ACA CGA CTC GAC (600)

F L K E A E N A K R E G E T R I R R N	Domäne 4		Exon 8	A E K D F C	225
TTT TTA AAA GAA GCT GAA AAT GCC AAG CGA GAG GGT GAA ACT AGA ATT CGA CGA AAT		GCT GAA AAG GAT TTT TGC	1547		
AAA AAT TTT CTT CGA CTT TTA CGG TTC GCT CTC CCA CTT TGA TCT TAA GCT GCT TTA		CGA CTT TTC CTA AAA ACG	(675)		
			Dra I		

K E Y E K Q V R N G R L F C T R E S D P V R G P D 250
AAG GAA TAT GAA AAA CAA GTG AGA AAT GGA AGG CTT TTT TGT ACA CGG GAG AGT GAT CCA GTC CGT GGC CCT GAC 1622
TTC CTT ATA CTT TTT GTT CAC TCT TTA CCT TCC GAA AAA ACA TGT GCC CTC TCA CTA GGT CAG GCA CCG GGA CTG (750)

G R M H G N K C A L C A E I F		Exon 10 ⁷⁹⁵	K R R F S E E N S K	275
GGC AGG ATG CAT GGC AAC AAA TGT GCC CTG TGT GCT GAA ATT TTT C AAG CGG CGT TTT TCA GAG GAA AAC AGT AAA		CCG TCC TAC GTA CCG TTG TTT ACA CGG GAC ACA CGA CTT TAA AAG TTC GCC GCA AAA AGT CTC CTT TTG TCA TTT	1697	
			(825)	

T D Q N L G K A E E K T K V K R	Domäne 5		Exon 11 ⁸⁸³	E I V K L C S Q Y	300
ACA GAT CAA AAT TTG GGA AAA GCT GAA GAA AAA ACT AAA GTT AAA AGA		GAA ATT GTG AAA CTC TGC AGT CAA TAT	1772		
TGT CTA GTT TTA AAC CCT TTT CGA CTT CTT TTT TGA TTT CAA TTT TCT		CTT TAA CAC TTT GAG ACG TCA GTT ATA	(900)		
			Pst I		

Q N Q A K N G I L F C T R E N D P I R G P D G K M 325
CAA AAT CAG GCA AAG AAT GGA ATA CTT TTC TGT ACC AGA GAA AAT GAC CCT ATT CGT GGT CCA GAT GGG AAA ATG 1847
GTT GGA GTC CGT TTC TTA CCT TAT GAA AAG ACA TGG TCT CTT TTA CTG GGA TAA GCA CCA GGT CTA CCC TTT TAC (975)

H G N L C S M C Q A Y H Q A E N E E K K K A E A R		Exon 12 ¹⁰¹¹	350
CAT GGC AAC TTG TGT TCC ATG TGT CAA GCC TAC TTT CAA GCA GAA AAT GAA GAA AAG AAA AAG GCT GAA GCA CGA		GAT CCG TTG AAC ACA AGG TAC ACA GTT CGG ATG AAG GTT CGT CTT TTA CTT CTT TTC TTT TTC CGA CTT CGT GCT	1922
			(1050)

A R N K R	Domäne 6		Exon 13 ¹⁰⁹³	E S G K A T S Y A E L C N E Y R K L V R	375
GCT AGA AAC AAA AGA	GAA TCT GGA AAA GCA ACC TCA TAT GCA		GAG CTT TGC AAT GAA TAT CGA AAG CTT GTG AGG	1997	
CGA TCT TTG TTT TCT	CTT AGA CCT TTT CGT TGG AGT ATA CGT		CTC GAA ACG TTA CTT ATA GCT TTC GAA CAC TCC	(1125)	
			Hind III		

Anhang

N G K L A C T R E N D P I Q G P D G K V H G N T C 400
AAC GGA AAA CTT GCT TGC ACC AGA GAG AAC GAT CCT ATC CAG GGC CCA GAT GGG AAA GTG CAC GGC AAC ACC TGC 2072
TTG CCT TTT GAA CGA ACG TGG TCT CTC TTG CTA GGA TAG GTC CCG GGT CTA CCC TTT CAC GTG CCG TTG TGG ACG (1200)

Exon 14¹²²¹
S M C E V F F Q A E E E E K K K K E G E S R N K R 425
TCC ATG TGT GAG GTC TTC TTC CAA GCA GAA GAA GAA AAG AAA AAG AAG GAA GGT GAA TCA AGA AAC AAA AGA 2147
AGG TAC ACA CTC CAG AAG AAG GTT CGT CTT CTT CTT CTT TTC TTT TTC TTC CTT CCA CTT AGT TCT TTG TTT TCT (1275)

Domäne 7 Exon 15¹³⁰³
Q S K S T A S F E E L C S E Y R K S R K N G R L F 450
CAA TCT AAG AGT ACA GCT TCC TTT GAG GAG TTG TGT AGT GAA TAC CGC AAA TCC AGG AAA AAC GGA CGG CTT TTT 2222
GTT AGA TTC TCA TGT CGA AGG AAA CTC CTC AAC ACA TCA CTT ATG GCG TTT AGG TCC TTT TTG CCT GCC GAA AAA (1350)

C T R E N D P I Q G P D G K M H G N T C S M C E A 475
TGC ACC AGA GAG AATGAC CCC ATC CAG GGC CCA GAT GGA AAA ATG CAT GGC AAC ACC TGC TCC ATG TGT GAG GCC 2294
ACG TGG TCT CTC TTA CTG GGG TAG GTC CCG GGT CTA CCT TTT TAC GTA CCG TTG TGG ACG AGG TAC ACA CTC CGG (1425)

Exon 16¹⁴³² **Domäne 8** Exon 17¹⁴⁸⁰
F F Q Q E E R A R A K A K R E A A K E I C S E F R 500
TTC TTT CAA CAA GAA GAA AGA GCA AGA GCA AAG GCT AAA AGA GAA GCT GCA AAG GAA ATC TGC AGT GAA TTT CGG 2369
AAG AAA GTT GTT CTT CTT TCT CGT TCT CGT TTC CGA TTT TCT CTT CGA CGT TTC CTT TAG ACG TCA CTT AAA GCC (1500)
Pst I

D Q V R N G T L I C T R E H N P V R G P D G K M H 525
GAC CAA GTG AGG AAT GGA ACA CTT ATA TGC ACC AGG GAG CAT AAT CCT GTC CGT GGA CCA GAT GGC AAA ATG CAT 2444
CTG GTT CAC TCC TTA CCT TGT GAA TAT ACG TGG TCC CTC GTA TTA GGA CAG GCA CCT GGT CTA CCG TTT TAC GTA (1575)

Exon 18¹⁶⁰⁸
G N K C A M C A S V F K L E E E E K K N D K E E K 550
GGA AAC AAG TGT GCC ATG TGT GCC AGT GTG TTC AAA CTT GAA GAA GAA GAG AAG AAA AAT GAT AAA GAA GAA AAA 2519
CCT TTG TTC ACA CGG TAC ACA CGG TCA CAC AAG TTT GAA CTT CTT CTT CTC TTC TTT TTA CTA TTT CTT CTT TTT (1650)

Domäne 9 Exon 19¹⁶⁹³
G K V E A E K V K R E A V Q E L C S E Y R H Y V R 575
GGG AAA GTT GAG GCT GAA AAA GTT AAG AGA GAA GCA GTT CAG GAG CTG TGC AGT GAA TAT CGT CAT TAT GTG AGG 2594
CCC TTT CAA CTC CGA CTT TTT CAA TTC TCT CTT CGT CAA GTC CTC GAC ACG TCA CTT ATA GCA GTA ATA CAC TCC (1725)

N G R L P C T R E N D P I E G L D G K I H G N T C 600
AAT GGA CGA CTC CCC TGT ACC AGA GAG AAT GAT CCT ATT GAG GGT CTA GAT GGG AAA ATC CAC GGC AAC ACC TGC 2669
TTA CCT GCT GAG GGG ACA TGG TCT CTC TTA CTA GGA TAA CTC CCA GAT CTA CCC TTT TAG GTG CCG TTG TGG ACG (1800)
Xba I

Exon 20¹⁸²¹
S M C E A F F Q Q E A K E K E R A E P R A K V K R 625
TCC ATG TGT GAA GCC TTC TTC CAG CAA GAA GCA AAA GAA AAA GAA AGA GCT GAA CCC AGA GCA AAA GTC AAA AGA 2744
AGG TAC ACA CTT CGG AAG AAG GTC GTT CTT CGT TTT CTT TTT CTT TCT CGA CTT GGG TCT CGT TTT CAG TTT TCT (1875)

Domäne 10 Exon 21¹⁸⁸⁸
E A E K E T C D E F R R L L Q N G K L F C T R E N 650
GAA GCT GAA AAG GAG ACA TGC GAT GAA TTT CGG AGA CTT TTG CAA AAT GGA AAA CTT TTC TGC ACA AGA GAA AAT 2819
CTT CGA CTT TTC CTC TGT ACG CTA CTT AAA GCC TCT GAA AAC GTT TTA CCT TTT GAA AAG ACG TGT TCT CTT TTA (1950)

Exon 22²⁰¹⁶
D P V R G P D G K T H G N K C A M C K A V F Q K E 675
GAT CCT GTG CGT GGC CCA GAT GGC AAG ACC CAT GGC AAC AAG TGT GCC ATG TGT AAG GCA GTC TTC CAG AAA GAA 2894
CTA GGA CAC GCA CCG GGT CTA CCG TTC TGG GTA CCG TTG TTC ACA CGG TAC ACA TTC CGT CAG AAG GTC TTT CTT (2025)
Nco I

Domäne 11
N E E R K R K E E E D Q R N A A G H G S S G G G G 700
AAT GAG GAA AGA AAG AGG AAA GAA GAG GAA GAT CAG AGA AAT GCT GCA GGA CAT GGT TCC AGT GGT GGT GGA GGA 2969
TTA CTC CTT TCT TTC TCC TTT CTT CTC CTT CTA GTC TCT TTA CGA CGT CCT GTA CCA AGG TCA CCA CCA CCT CCT (2100)

Anhang

Pst I

Exon 23²¹¹³
 G N T Q | D E C A E Y Q E Q M K N G R L S C T R E S 725
 GGA AAC ACT CAG | GAC GAA TGT GCT GAG TAT CAG GAA CAA ATG AAA AAT GGA AGA CTC AGC TGT ACT CGG GAG AGT 3044
 CCT TTG TGA GTC | CTG CTT ACA CGA CTC ATA GTC CTT GTT TAC TTT TTA CCT TCT GAG TCG ACA TGA GCC CTC TCA (2175)
 Ava I

Exon 24²²⁴¹
 D P V R D A D G K S Y N N Q C T M C K A K L | E R E 750
 GAT CCT GTA CGT GAT GCT | GAT GGC AAA TCG TAC AAC AAT CAG TGT ACC ATG TGT AAA GCA AAA TTG GAA AGA GAA 3119
 CTA GGA CAT GCA CTA CGA CTA CCG TTT AGC ATG TTG TTA GTC ACA TGG TAC ACA TTT CGT TTT AAC CTT TCT CTT (2250)

Domäne 12 | Exon 25²³¹⁴
 A E R K N E Y S R S R S | N G T G S E S G K | D T C D 775
 GCA GAG AGA AAA AAT GAG TAT TCT CGC TCC AGA TCA | AAT GGG ACT GGA TCA GAA TCA GGG AAG | GAT ACA TGT GAT 3194
 CGT CTC TCT TTT TTA CTC ATA AGA GCG AGG TCT AGT | TTA CCC TGA CCT AGT CTT AGT CCC TTC | CTA TGT ACA CTA (2325)

E F R S Q M K N G K L I C T R E S D P V R G P D G 800
 GAG TTT AGA AGC CAA ATG AAA AAT GGA AAA CTT ATC TGC ACT CGA GAA AGT GAC CCT GTC CGG GGT CCA GAT GGC 3269
 CTC AAA TCT TCG GTT TAC TTT TTA CCT TTT GAA TAG ACG TGA GCT CTT TCA CTG GGA CAG GCC CCA GGT CTA CCG (2400)
 Xho I/Ava I

Exon 26²⁴⁴²
 K T H G N K | C T M C K E K L E R E A A E K K K K E 825
 AAG ACA CAT GGT AAT AAG TGT ACT ATG TGT AAG GAA AAA CTG GAA AGG GAA GCA GCT GAA AAA AAA AAG AAA GAG 3344
 TTC TGT GTA CCA TTA TTC ACA TGA TAC ACA TTC CTT TTT GAC CTT TCC CTT CGT CGA CTT TTT TTT TTC TTT CTC (2475)

Domäne 13 | Exon 27²⁵³⁹
 D E D R S N | T G E R S N T G E R S N D K E | D L C R 850
 GAT GAA GAC AGG AGC AAT | ACA GGA GAA AGG AGC AAT ACA GGA GAA AGG AGC AAT GAC AAA GAG | GAT CTG TGT CGT 3419
 CTA CTT CTG TCC TCG TTA | TGT CCT CTT TCC TCG TTA TGT CCT CTT TCC TCG TTA CTG TTT CTC | CTA GAC ACA GCA (2550)

E F R S M Q R N G K L I C T R E N N P V R G P Y G 875
 GAA TTT CGA AGC ATG CAG AGA AAT GGA AAG CTT ATC TGC ACC AGA GAA AAT AAC CCT GTT CGA GGC CCA TAT GGC 3494
 CTT AAA GCT TCG TAC GTC TCT TTA CCT TTC GAA TAG ACG TGG TCT CTT TTA TTG GGA CAA GCT CCG GGT ATA CCG (2625)
 Hind III

Exon 28²⁶⁶⁷
 K M H I N K C A M C Q S I F | D R E A N E R K K K D 900
 AAG ATG CAC ATC AAT AAA TGT GCT ATG TGT CAG AGC ATC TTT | GAT CGA GAA GCT AAT GAA AGA AAA AAG AAA GAT 3569
 TTC TAC GTG TAG TTA TTT ACA CGA TAC ACA GTC TCG TAG AAA | CTA GCT CTT CGA TTA CTT TCT TTT TTC TTT CTA (2700)

Domäne 14 | Exon 29²⁷⁴⁰
 E E K S S S K P S N | N A K | D E C S E F R N Y I R N 925
 GAA GAG AAA TCA AGT AGC AAG CCC TCA AAT | AAT GCA AAG | GAT GAG TGC AGT GAA TTT CGA AAC TAT ATA AGG AAC 3644
 CTT CTC TTT AGT TCA TCG TTC GGG AGT TTA | TTA CGT TTC | CTA CTC ACG TCA CTT AAA GCT TTG ATA TAT TCC TTG (2775)

N E L I C P R E N D P V H G A D G K F Y T N K C Y 950
 AAT GAA CTC ATC TGC CCT AGA GAG AAT GAC CCA GTG CAC GGT GCT GAT GGA AAG TTC TAT ACA AAC AAG TGC TAC 3719
 TTA CTT GAG TAG ACG GGA TCT CTC TTA CTG GGT CAC GTG CCA CGA CTA CCT TTC AAG ATA TGT TTG TTC ACG ATG (2850)

Exon 30²⁸⁶⁸
 M C R A V F | L T E A L E R A K L Q E K P S H V R A 975
 ATG TGC AGA GCT GTC TTT | CTA ACA GAA GCT TTG GAA AGG GCA AAG CTT CAA GAA AAG CCA TCC CAT GTT AGA GCT 3794
 TAC ACG TCT CGA CAG AAA | GAT TGT CTT CGA AAC CTT TCC CGT TTC GAA GTT CTT TTC GGT AGG GTA CAA TCT CGA (2925)
 Hind III Hind III

Domäne 15 | Exon 31²⁹⁶⁵
 S Q | E E D S P D S F S S L | D S E M C K D Y R V L P 1000
 TCT CAA | GAG GAA GAC AGC CCA GAC TCT TTC AGT TCT CTG | GAT TCT GAG ATG TGC AAA GAC TAC CGA GTA TTG CCC 3869
 AGA GTT | CTC CTT CTG TCG GGT CTG AGA AAG TCA AGA GAC | CTA AGA CTC TAC ACG TTT CTG ATG GCT CAT AAC GGG (3000)

Anhang

R I G Y L C P K D L K P V C G D D G Q T Y N N P C 1025
AGG ATA GGC TAT CTT TGT CCA AAG GAT TTA AAG CCT GTC TGT GGT GAC GAT GGC CAA ACC TAC AAC AAT CCT TGC 3944
TCC TAT CCG ATA GAA ACA GGT TTC CTA AAT TTC GGA CAG ACA CCA CTG CTA CCG GTT TGG ATG TTG TTA GGA ACG (3075)
Dra I

Exon 32³⁰⁹⁶
M L C H E N L I R Q T N T H I R S T G K C E E S S 1050
ATG CTC TGT CAT GAA AAC CTG ATA CGC CAA ACA AAT ACA CAC ATC CGC AGT ACA GGG AAG TGT GAG GAG AGC AGC 4019
TAC GAG ACA GTA CTT TTG GAC TAT GCG GTT TGT TTA TGT GTG TAGGCG TCA TGT CCC TTC ACA CTC CTC TCG TCG (3150)

exon33³¹⁸⁷
T P G T T A A S M P P S D E Stop 1064 +STOP
ACC CCA GGA ACC ACC GCA GCC AGC ATG CCC CCG TCTGAC GAA TGA 4064
TGG GGT CCT TGG TGG CGT CGG TCG TAC GGG GGC AGACTG CTT ACT 3195

3205	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	3225	NotI	<i>XhoI</i>	3245	3255	<i>BamHI</i>	3265	3275					
CAGAAGGGCG	AATTCTGCAG	ATATCCATCA	CACTGGCGGC	CGCTCGAGGC	CGGCAAGGCC	GGATCCAGAC	ATGATAAGAT	GTCTTCCCGC	TTAAGACGTC	TATAGGTAGT	GTGACCGCCG	GCGAGCTCCG	GCCGTTCCGG	CCTAGGTCTG	TACTATTGTA
3285	3295	3305	3315	3325	3335	3345	3355								
ACATTGATGA	GTTTGGACAA	ACCACAATA	GAATGCAGTG	AAAAAAATGC	TTTATTTGTG	AAATTTGTGA	TGCTATTGCT	TGTAACACT	CAAACCTGTT	TGGTGTGAT	CTTACGTCAC	TTTTTTTACG	AAATAAACAC	TTTAAACT	ACGATAAGCA
3365	3375	3385	3395	3405	3415	3425	3435								
TTATTTGTAA	CCATTATAAG	CTGCAATAAA	CAAGTTAACA	ACAACAATTG	CATTCATTTT	ATGTTTCAGG	TTCAGGGGGA	AATAAACATT	GGTAATATTC	GACGTTATTT	GTTCAATTGT	TGTTGTAAAC	GTAAGTAAA	TACAAAGTCC	AAGTCCCCCT
3445	3455	3465	3475	3485	3495	3505	3515								
GGTGGGGAGG	TTTTTTAAAG	CAAGTAAAC	CTCTACAAAT	GTGGTATGGC	TGAGATTATG	ATCCGGCTGC	CTCGCGCGTT	CCACCCCTCC	AAAAAATTTT	GTTCAATTTT	GAGATGTTTA	CACCATACCG	ACTCTAATAC	TAGGCCGACG	GAGCGCGCAA
3525	3535	3545	3555	3565	3575	3585	3595								
TCGGTGATGA	CGGTGAAAAC	CTCTGACACA	TGCAGCTCCC	GGAGACGGTC	ACAGCTTGTC	TGTAAGCGGA	TGCCGGGAGC	AGCCACTACT	GCCACTTTTG	GAGACTGTGT	ACGTGCAGGG	CCTCTGCCAG	TGTCGAACAG	ACATTCGCCT	ACGGCCCTCG
3605	3615	3625	3635	3645	3655	<i>SalI</i>									
AGACAAGCCC	GTCAGGGCGC	GTCAGCGGGT	GTTGGCGGGT	GCTGGGGCGC	AGCCATGACC	GGTCGAC		TCTGTTCCGGG	CAGTCCCGCG	CAGTCGCCCA	CAACCGCCCA	CGACCCCGCG	TCGGTACTGG	CCAGCTG	

Anhang

Mutationen in den verwendeten Netherton-Patienten:

Netherton-Patient Nr. 1:

nur eine Mutation gefunden: 316 del GA , Exon 5, Domäne 2
führt zu frameshift und vorzeitigem Stop-Codon nach 7 AS

Sequenz normal:

R D G D F I C P D
AGA GAT GGG GAT TTT ATC TGT CCT GAT etc.

veränderte Sequenz in Patient Nr. 1:

R W G F Y L S STOP
AGA TGG GGA TTT TAT CTG TCC TGA

Netherton-Patient Nr. 2:

Mutation 1: 354 del TTGT , Exon 5, Domäne 2
führt zu frameshift und vorzeitigem Stopp-Codon nach 24 AS

Sequenz normal:

V C G T D G K T Y D N R C A L C A E N A K T G S Q I
GTT TGT GGC ACA GAT GGG AAA ACA TAT GAC AAC AGA TGT GCA CTG TGT GCT GAG AAT GCG AAA ACC GGG TCC CAA ATT

G V K
GGT GTA AAA

veränderte Sequenz in Netherton-Patient 2:

V A Q M G K H M T T D V H C V L R M R K P G P K L
GTG GCA CAG ATG GGA AAA CAT ATG ACA ACA GATGTG CAC TGT GTG CTG AGA ATG CGA AA A CCG GGT CCC AAA TTG

V STOP
GTG TAA

Mutation 2:

1432-13 G→A , Intron 15, Domäne 7
Generiert neue Spleißakzeptorstelle (AG), frameshift, vorzeitiges Stop-Codon nach 14 AS

Sequenz normal:

Intron15 Exon 16
 Q Q E E R A R A K A K R E A A K V I
TCG GTT TCT TAA AGT CAA CAA GAA GAA AGA GCA AGA GCA AAG GCT AAA AGA GAA GCT GCA AAG GTA ATA

veränderte Sequenz in Netherton-Patient 2, 3 und 5:

neuer Beginn von Exon 16
F L K V N K K K E Q E Q R L K E K L Q R STOP
TCA G TTT CTT AAA GTC AAC AAG AAG AAA GAG CAA GAG CAA AGG CTA AAA GAG AAG CTG CAA AGG TAA

Netherton-Patient 3:

homozygote Mutation: 1432-13 G→A , Intron 15, Domäne 7

Anhang

Generiert neue Spleißakzeptorstelle (AG), frameshift, vorzeitiges Stop-Codon nach 14 AS

(siehe Mutation 2 in Netherton-Patient 2)

Netherton-Patient 4:

Mutation: 268R→C, Exon 10, Domäne 4
neue Mutation, Wirkung unklar, evtl. Störung des Kazal-Motivs durch zusätzliches Cystein
oder Störung einer Spaltstelle (KRR)

Sequenz normal:

K R R F S E E N S K
AAG CGG CGT TTT TCA GAG GAA AAC AGT AAA

veränderte Sequenz in Netherton-Patient 4:

K R **C** F S E E N S K
AAG CGG TGT TTT TCA GAG GAA AAC AGT AAA

Netherton-Patient 5:

Mutation: 1432-13 G→A , Intron 15, Domäne 7
Generiert neue Spleißakzeptorstelle (AG), frameshift, vorzeitiges Stop-Codon nach 14 AS

(siehe Mutation 2 in Netherton-Patient 2)

Netherton-Patient 6:

Mutation: Y300X (Exon 11) **900 T→A PTC**
1913 delT PTC (Exon 21)

Sequenz normal:

K L C S Q Y
AAA CTC TGC AGT CAA TAI

veränderte Sequenz in Netherton-Patient 6:

K L C S Q X
AAA CTC TGC AGT CAA TAA