

# Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom- Biologe Dirk Vocke aus Darmstadt  
Tag der mündlichen Prüfung:

# Danksagung

Für die hier vorliegende Arbeit gilt mein ausdrücklicher Dank Herrn Dr. A. Blaukat. Durch ihn habe ich stets sehr gute Anregungen und wertvolle Tipps zur Konzeption von Experimenten und Hypothesen erhalten. Er hat maßgeblich mein Interesse weit über die hier vorliegenden Thesen hinaus in dem Gebiet der präklinischen Onkologie gefördert und mich immer sehr angenehm und freundschaftlich für viele Aspekte motiviert und begeistert. Er war mir in dieser Zeit ein hervorragender wissenschaftlicher Tutor. Ich habe diese Zeit sehr genossen. Gleichbedeutend gilt mein Dank auch Herrn Prof. T.W. Holstein, der nicht weniger durch interessante Gespräche Anregungen zu dieser Arbeit und zu meiner allgemeinen Begeisterung für Signaltransduktionsprozesse beisteuerte. Durch ihn lernte ich mit großer Freude fachübergreifende Sichtweisen kennen.

Auch Herrn PD. Dr. J.O. Funk danke ich für das Interesse an diesem Thema und die Möglichkeit bei Merck KGaA in der Abteilung TA Oncology diese Arbeit anzufertigen.

Für das wissenschaftliche Interesse danke ich ebenso Herrn Prof. N.A. Dencher, Herrn PD Dr. Urban und Frau Prof. I. Sinning.

Für die schöne tägliche Atmosphäre, die mir viel Freude bereitet hat, danke ich meinen Kollegen Vanessa Schadel (geb.Jacob), Denis Irmer, Friederike Krop, Elena Kilian, Dr. Jessica Deacke, Ralf Reiners, Katharina Bergmann, Katja Wischrop, Per Hillertz, Jens Hrach und Gregor Tuschl sowie den weiteren Kollegen der Abteilung TA Oncology. In diesem Team fand ich nette, hilfsbereite und verständnisvolle Kollegen. Vielen Dank für die schöne Zeit!

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der „regeneration islet-derived gene family“ (Reg-Familie) im Zusammenhang der Krebsentstehung erläutert. Insbesondere wird dabei auf die Mitglieder Reg4 und HIP/PAP beim Menschen fokussiert. Daraus leiteten sich die Fragestellungen nach Reg4 und HIP/PAP abhängigen Signaltransduktionsmechanismen ab. Solche Prozesse sind für Reg4 und HIP/PAP bislang nur fragmentarisch verstanden. Eine strukturierte Signalkaskade induziert durch eine Transmembranrezeptorklasse ist nicht charakterisiert. Um hierzu neue Erkenntnisse zu liefern wurden Expressionsplasmide zur Generierung von Reg4 und HIP/PAP Protein generiert. Zu diesem Zweck wurden NS0-Zellen mit Reg4 und HIP/PAP Fc-Fusionsplasmiden transfiziert und durch Selektion Klone mit stabiler Expression hergestellt. Des Weiteren wurden Reg4- und HIP/PAP Expressionsplasmide ohne „Tag“ zur transienten Transfektion erzeugt. Durch Nutzen des transgen erzeugten amino- und carboxyterminalen „Fc-Tags“ wurden die Proteine gereinigt. Zum Nachweis von Reg4- und HIP/PAP-Protein wurden Antikörper produziert und charakterisiert. Für funktionelle Studien wurden Zelllinien auf endogene Expression von Reg4 und HIP/PAP hin analysiert und ausgewählt. Mit diesen Materialien wurden Stimulationsexperimente durchgeführt. Auf Ebene der Proteinphosphorylierungen wurden Reg4 und HIP/PAP abhängige Phosphorylierungen von zentral wirkenden Signaltransduktionsproteinen überprüft. Dabei konnte die Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 in Abhängigkeit von Reg4 und HIP/PAP in Zellen mit endogener Reg4 Expression festgestellt werden. Diese Beobachtungen unterschieden sich von Zellen mit fehlender Reg4 Expression. So wurde in HT29-Zellen mit fehlender Reg4 Expression die Phosphorylierung von NF $\kappa$ B detektiert. Durch Mikroarray Studien wurde ein Expressionsprofil von HT29-Zellen nach Reg4 und HIP/PAP Stimulation erstellt, wobei Gene, die im Kontext von Apoptoseregulation und Migrationsprozessen als differentiell exprimiert ermittelt wurden. Durch Bindungsstudien sollten Hinweise auf eine mögliche Reg4 und/oder HIP/PAP Rezeptorfamilie erhalten werden, die es zu isolieren und zu charakterisieren gilt. Diese Experimente lieferten erste Indizien auf Zelllinien, die zu einer Rezeptorisolation herangezogen werden könnten.

# Summary

The present thesis summarises the role of the „regeneration islet-derived gene family“ (Reg-family) for the development of cancer. The main focus is on the human Reg-family members Reg4 and HIP/PAP. Based on published data, the question did arise how Reg4 and/or HIP/PAP could be involved in signal transduction processes leading to a benefit of cancer cells in survival or apoptosis resistance. A well established signal transduction model including a transmembrane receptor class is missing so far. To get a better understanding for the biological role of these proteins, Reg4 and HIP/PAP expression systems with and without tag were generated. Amino- and carboxyterminal Fc-fusionvectors were established and stable NS0 cell clones expressing Reg4 and HIP/PAP Fc-fusionproteins were produced. These expression systems were used to purify Reg4 and HIP/PAP proteins. Cancer cell lines with endogenous Reg4 and/or HIP/PAP expression were screened and used for stimulation experiments. Further, Reg4 and HIP/PAP antibodies were produced and characterised.

To get new information on the biological role of Reg4 and HIP/PAP selected cell lines were stimulated with Reg4 and HIP/PAP and induced protein phosphorylation of centre molecules of signal transduction processes were analysed. These experiments showed a Reg4 and HIP/PAP induced Erk1 and Erk2 phosphorylation in cells with endogenous Reg4 expression. In HT29-cells, which were lacking endogenous Reg4 expression, the treatment with Reg4 and HIP/PAP resulted in the observation of NF $\kappa$ B phosphorylation. Further, a gene expression profile was quantified by micro array studies on HT29-cells. These cells were stimulated with Reg4 and HIP/PAP. Differentially expressed genes by this assay could be put in groups of Apoptosis regulation and migration mechanisms. To isolate and characterise a receptor protein for Reg4 and/or HIP/PAP binding studies using <sup>125</sup>Iodine probed Reg4 and HIP/PAP have been carried out. First results show indications for cell lines which could be useful for this approach.

„Generierung von biologisch  
aktivem Reg4 und HIP/PAP mit  
nachfolgender Charakterisierung  
angestoßener  
Signaltransduktionsprozesse  
innerhalb von Tumorzellen des  
Gastrointestinaltraktes.“

# Inhaltsverzeichnis:

## I. Einleitung

I.1. Hintergrund und Fragestellung	Seite 1-2
I.2. Aufbau und Struktur der Reg Familie	Seite 3-6
I.3. Expressionsmuster der Reg-Familie	Seite 6-9
I.4. Korrelation zwischen der Expression von Reg-Proteinen und dem Auftreten von Krebs	Seite 9-11
I.5. Aspekte mitogener und antiapoptotischer Wirkung der Reg-Proteine	Seite 11-21

## II. Material und Methoden

II.1M. Materialien zu molekularbiologischen Methoden	Seite 22-24
II.2M. Materialien zu biochemischen Methoden	Seite 25-27
II.3M. Materialien zu zellbiologischen Methoden	Seite 28-29
II.1. molekularbiologische Methoden	Seite 30-35
Polymerasekettenreaktion	Seite 30-31
Agarosegelelektrophorese	Seite 31
DNA Hydrolyse durch Restriktionsendonucleasen	Seite 32
DNA Elution aus Agarosegelen	Seite 32
Ligation von DNA Fragmenten in Plasmid DNA	Seite 33
Transformation und Klonierung von <i>E.coli</i>	Seite 33-34
Klonierung mit gateway <sup>R</sup> System	Seite 34
Plasmidisolation aus <i>E.coli</i> Maxikultur	Seite 34
Isolierung von RNA und cDNA Synthese	Seite 35
II.2. biochemische Methoden	Seite 36-41
Lyse von Zellen aus Zellkultur zur Proteinisolation	Seite 36
Proteinseparation durch SDS-Page	Seite 37
Westernblotanalyse	Seite 37-38
Protein A/G-Affinitätspräzipitation	Seite 38-40
Bindungsstudien mit <sup>125</sup> Iod markierten Liganden	Seite 40-41

<b>II.3. Methoden der Zellkultur</b>	<b>Seite 42-51</b>
Kultivierung von Zellen	Seite 42-43
Transiente und stabile Transfektion von Zelllinien	Seite 43-45
IPTG-induzierte Protein Expression in <i>E.coli</i>	Seite 45-47
„Reportergenassay“	Seite 47-49
Mikroarray-Analyse	Seite 49-51
<b>III. Ergebnisse</b>	
<b>III.1. Generierung und Auswahl der Modellsysteme</b>	<b>Seite 52-67</b>
Generierung der Expressionssysteme	Seite 52-55
Prokaryotische Expression von Reg4 und HIP/PAP	Seite 56-57
Expression und Reinigung von Protein	Seite 58-61
Generierung und Charakterisierung von Antikörpern	Seite 62-63
Detektion von endogener Reg4 und HIP/PAP	
Expression	Seite 64-66
Zusammenfassung Ergebnisse III.1.	Seite 67
<b>III.2. Stimulationsexperimente mit Reg4 und HIP/PAP</b>	<b>Seite 68-83</b>
„Reportergenassay“	Seite 68-70
Reg4 und HIP/PAP abhängige Phosphorylierung	
Von NFκB und Erk1 und -2	Seite 71-77
Mikroarray Studie an HT29 durch Reg4 und HIP/PAP	
Stimulation	Seite 78-82
Zusammenfassung der Ergebnisse III.2.	Seite 83-84
<b>III.3. Bindungs und Interaktionsexperimente</b>	<b>Seite 85-96</b>
Bindungsexperimente mit <sup>125</sup> Iod-markierten	
Liganden	Seite 85-92
Copräzipitationsexperimente	Seite 93-95
Zusammenfassung der Ergebnisse III.3.	Seite 96
<b>IV. Diskussion</b>	
<b>IV.1. Auswahl und Generierung der Modellsysteme</b>	<b>Seite 97-101</b>
Expresionssysteme	Seite 97
Generierung und Charakterisierung der Antikörper	Seite 98-99
Auswahl der Zelllinien	Seite 100-101

**IV.2. Stimulationsexperimente** **Seite 102-119**

Westernblotanalysen der NF $\kappa$ B und Erk1 und -2

Phosphorylierung **Seite 102-112**

Mikroarray Studie an HT29 **Seite 113-118**

**IV.3. Bindungs- und Interaktionsexperimente** **Seite 119-123**

Bindungsexperimente mit <sup>125</sup>Iod markiertem Protein **Seite 119-121**

Copräzipitationsexperimente **Seite 122**

**IV.4. Zusammenfassung und Ausblick** **Seite 123**

**V. Literaturverzeichnis**

A-B **Seite 125-126**

C-D **Seite 126-128**

E-F **Seite 128**

G-H **Seite 129-130**

I-J **Seite 130**

K-L **Seite 130-131**

L-M **Seite 131-133**

N-O **Seite 133-134**

P-Q **Seite 134-**

R-S **Seite 134-135**

T-U **Seite 135-136**

V-W **Seite 136-137**

X-Y **Seite 137-138**

Z **Seite 138**

**Anhang**

Tabellen zu berechneten Werten der relativen Genexpression  
der Mikro Array Studien



# I. Einleitung

## I.1 Hintergrund und Fragestellung

Die präklinische onkologische Forschung wird seit einigen Jahren wesentlich durch molekularbiologische und biochemische Arbeiten bereichert, die zu einem besseren Verständnis von Signaltransduktionsmechanismen führen. Solche Signaltransduktionsmechanismen stellen die grundlegenden zellulären Steuerungsprozesse auf Proteinebene dar, die durch eine netzwerkartige Verknüpfung mit hoher Redundanz Zellen ihrer physiologischen Funktion zuführen. Im Fokus der onkologischen Forschung stehen dabei vor allem Prozesse, die an der Mitose- und Apoptoseregulation beteiligt sind sowie das Migrationsverhalten von Zellen beeinflussen. Vereinfacht lassen sich dabei drei Ebenen der Signaltransduktionskontrolle unterscheiden. Erstens die Assemblierung von Transkriptionsfaktorkomplexen und die Aktivierung der zielgerichteten Genexpression im Zellkern, auf der zweiten Ebene finden dazu, vorgeschaltet im cytoplasmatischen Raum, Protein-Protein Interaktionen statt, durch die Modifizierungen durch biochemische Reaktionen ablaufen. Solche Modifizierungen sind häufig Phosphorylierungen von Threonin-, Serin- oder Tyrosinresten, es finden aber auch Prozessierungen statt, die zu Abspaltungen von Proteindomänen führen. Letztendlich münden diese Modifizierungen in Konformationsänderungen der Proteine oder in veränderten Affinitäten gegenüber weiteren Interaktionspartnern, wodurch sich nachgeschaltet biologisch aktive Komplexe ausbilden. Die dritte Ebene umfasst den extrazellulären Raum, auch hier finden die beschriebenen Protein-Protein Interaktionen statt, wobei, neben weiteren Mechanismen, frei diffundierende Proteine von der extrazellulären Seite mit Proteinen der Zelloberfläche wechselwirken und der Transduktionsprozess durch Transmembranproteine auf die intrazelluläre Seite übertragen wird. Auf dieser dritten Ebene findet meist das initiale Aktivierungsmoment statt, wodurch Signale kaskadenartig innerhalb der Zelle weitergeleitet, verzweigt und amplifiziert werden.

Durch molekular diagnostische Methoden ließ sich bereits eine Vielzahl an Proteinen identifizieren, die im Rahmen der Krebsentstehung durch Mutationen und fehlerhafte Funktionsweisen zu Deregulationen dieser Signalnetzwerke führen.

Eine Proteinfamilie, die bereits seit etwa zwei Jahrzehnten bearbeitet wird und als eine aufregend in zahlreichen Tumoren vorgefunden wurde, stellen die Proteine der „regeneration islet-derived gene family“ (Reg-Familie) dar. Diese sind sekretierte, kleine Proteine, die hypothetisch als Liganden über Transmembranproteine an der Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen beteiligt zu sein scheinen. Allerdings sind die entsprechenden Signaltransduktionsmechanismen bislang wenig beschrieben. Da diese Erkenntnisse für das Verständnis der ausgelösten Effekte innerhalb einer Tumorzelle von großer Bedeutung sind, wurde in dieser Arbeit auf eine weiterführende Charakterisierung der involvierten Signaltransduktionsprozesse innerhalb von Tumorzellen, vermittelt durch Proteine der Reg-Familie, fokussiert. Dies führte zu folgender Fragestellung: „Generierung von biologisch aktivem Reg4 und HIP/PAP mit nachfolgender Charakterisierung angestoßener Signaltransduktionsprozesse innerhalb von Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes.“

## I.2. Aufbau und Struktur der Reg-Familie und deren Mitglieder

Gene der Reg-Familie wurden erstmals im Kontext von Pankreasentzündungen beim Menschen (De Caro, A. *et al.* 1979) sowie nach einer 90 prozentigen Pankreatektomie bei Ratten als hochreguliert beschrieben (Terazono, K. *et al.* 1988). Arbeiten der vergangenen zwei Jahrzehnte führten zur Charakterisierung dieser Gene als eine beim Menschen dreiarmige Genfamilie, die bei verschiedenen Erkrankungen von Geweben des Gastrointestinaltraktes von Bedeutung sind. Durch zeitgleich gewonnene Erkenntnisse kam es hierbei in der Vergangenheit zu Doppelnomenklaturen, so dass in dieser Arbeit die in Tabelle I.2.1.T. dargestellte Klassifizierung vorgenommen wird (Zhang, YW. *et al.* 2003).

Tabelle I.2.1.T. Übersicht zur Nomenklatur der Reg-Familie

Subfamilie	verwendete Nomenklatur und Spezies (..)	alternative Namen und Spezies (..)
Reg1	<b>Reg1</b> ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (Mensch, Ratte, Maus)	„Pancreatic Stone Protein“ [PSP], „Pancreatic Threat Protein“ [PTP], Lithostatin (Mensch)
Reg2	<b>Reg2</b> (Maus)	
Reg3	<b>HIP/PAP</b> (Mensch) <b>PAP1</b> (Ratte) <b>Reg3</b> (Maus)	Reg3 (Mensch), „Peptide23“ (Ratte)
Reg4	<b>Reg4</b> (Mensch)	

Eine Übersicht über die gesamte Genfamilie bis auf das Rattenhomolog zu humanem Reg4 ist in Abbildung I.2.1 dargestellt (Graf, R. *et al.* 2005).

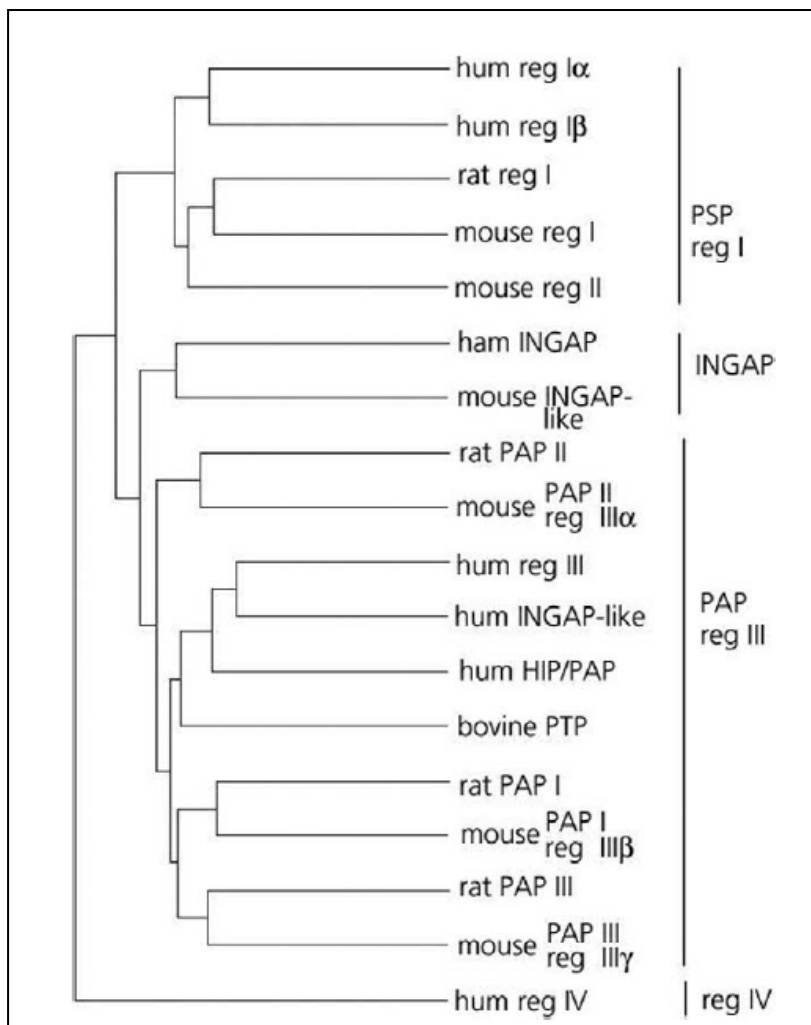


Abbildung I.2.1. Struktur der Reg-Familie nach Homologiegrad der Spezies Mensch, Maus, Ratte, Rind und Hamster (Graf, R. *et al.* 2005).

Im Fokus der Arbeiten an den Genen der Reg-Familie stehen hierbei die Mitglieder Reg1α & β (Mensch), Reg1 (Ratte), HIP/PAP (Mensch), PAP1 (Ratte) und Reg4 (Mensch) sowie Reg1 und Reg3β (Maus).

Die Gene werden vollständig der Superfamilie der C-Typ-Lektine (Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Lektine) zugeordnet (Iovanna, J. & Dagorn, J.C. 2005) und zeichnen sich durch eine weitgehend einheitliche Genstruktur aus, die aus sechs Exons und fünf Introns besteht und sich über rund drei Kilobasenpaare erstreckt (Zhang, YW. *et al.* 2003).

Humanes Reg1α besteht aus einer 166-zähligen Aminosäuresequenz mit einem Molekulargewicht, detektiert durch Immunoblotanalyse, von etwa 16.6 kDa. Des Weiteren wurde im Reg1α Promotor eine TATA-Box (Position -27 bezogen auf das ATG-Startcodon) und eine CAAT-Sequenz (Position -100 bezogen auf das ATG-Startcodon) beschrieben (Watanabe, T. *et al.* 1990). An Position -81 bis -70 wurde im Promotor von Ratten Reg1 ein *cis*-Element sensitiv gegenüber Interleukin-6 detektiert (Akiyama, T. *et al.* 2001). Zusätzlich wurde ein *cis*-Element zur Gastrin-abhängigen Expressionsstimulation an Position -79 bis -72 detektiert (Ashcroft, F.J.

*et al.* 2004). Aus Arbeiten mit rekombinantem Protein ließ sich ableiten, dass die Aminosäuren 1 bis 22 als Signalpeptid dienen und nach Einleiten des sekretorischen Pfades während der Proteinreifung prozessiert werden und so zu einem 16 kDa Protein führen (Itoh, T. *et al.* 1990). In der Sekundärstruktur konnten Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten an Position 115 und 132, 14 und 25 sowie 42 und 140 identifiziert werden. Der Anteil an  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen beträgt 12 % bis 17 % bzw. 22 % bis 26 % (Itoh, T. *et al.* 1990).

Für das Mitglied PAP1 (Ratte) ergaben ähnliche Arbeiten eine 175-zählige Aminosäuresequenz mit einem Signalpeptid von 29 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht des reifen Proteins von 16,63 kDa (Iovanna, J. *et al.* 1991). Hingegen wurde weder TATA-Box noch CAAT-Sequenz im Promotor gefunden, allerdings wurde eine ATAAA (TATA-ähnliche Sequenz) an Position –30 und zwei CACCTG-Sequenzen an Position –204 und –210 lokalisiert (Frigerio, J.M. *et al.* 1993). Die CACCTG-Sequenz wurde als Pan-1 Transkriptionsaktivator sensitive Sequenz von pankreasspezifischen Genen beschrieben (Meister, A. *et al.* 1989). Des Weiteren konnten jedoch, wie bei humanem Reg1 $\alpha$ , zwei Interleukin-6 sensitive Sequenzen innerhalb der Promotorsequenz detektiert werden (Dusetti, N.J. *et al.* 1995).

Um die biologische Funktion der Proteine zu verstehen, wurden zunächst beschriebene Charakteristika von Lektinen analysiert. Die Ähnlichkeit zu weiteren Lektinen wurde mit 16 % bis 26 % als am höchsten zu hepatischen Lektinen der Ratte und Thrombomodulin (Mensch) ermittelt. Darüber hinaus wurden die Affinitäten von PAP1 gegenüber Maltose, D-Mannose, D-Galaktose, N-Acetyl-D-Glukosamin, N-Acetyl-D-Galaktosamin, und D(+)-Melibiose ermittelt, hieraus ließen sich jedoch keine Hinweise auf eine spezifische Interaktion ableiten (Iovanna, J. *et al.* 1991; Frigerio, J.M. *et al.* 1993). Für HIP/PAP-GST Fusionsproteine hingegen wurde eine Bindung an Laktose beobachtet (Christa, L. *et al.* 1994), welche allerdings durch eine weitere Arbeit in Frage gestellt wurde (Cash, H.L. *et al.* 2006).

Durch die starke Konservierung der Sequenzen lassen sich diese Erkenntnisse weitgehend auf die homologen Mitglieder der Reg-Familie verschiedener Spezies übertragen. Das dem Ratten PAP1 humane Homolog HIP/PAP besteht ebenso aus einer 175-zähligen Aminosäuresequenz, die konservierte Cysteinreste beinhaltet und ein Molekulargewicht von 16 kDa aufweist. (Orelle, B. *et al.* 1992). Auch die  $\alpha$ -

Helix- und  $\beta$ -Faltblattstruktur sind identisch (Lasserre, C. *et al.* 1992; Lasserre, C. *et al.* 1994) und konservierte Sequenzen in den Promotorbereichen wurden speziesübergreifend beschrieben (Akiyama, T. *et al.* 2001) Die humanen Mitglieder Reg1 $\alpha$  &  $\beta$  und HIP/PAP sind in einem Tandemmuster auf Chromosom 2p12 innerhalb einer 95 Kilobasensequenz codiert (Miyashita, H. *et al.* 1995). Ein weiteres, bislang nur beim Menschen und der Ratte charakterisiertes Mitglied, Reg4, liegt auf Chromosom 1q12-q21 (Human) (Zhang, YW. *et al.* 2003; Namikawa, K. *et al.* 2005). Humanes Reg4 besteht aus einer Sequenz von 158 Aminosäuren, weist ein durch Immunoblotanalysen ermitteltes Molekulargewicht von 15 kDa auf (Hartupee, J.C. *et al.* 2001, Li, A. *et al.* 2003) und besitzt eine Signalpeptidsequenz, die 22 Aminosäuren des Aminoterminus umfasst (Hartupee, J.C. *et al.* 2001).

### **I.3 Expressionsmuster von Proteinen der Reg-Familie**

Neben frühen Arbeiten an Rattenpankreas wurde die Expression von Reg1 im Menschen auf mRNA-Ebene im Pankreas, in Magenschleimhaut (relativ zu Pankreas 10 %) und zu geringem Anteil in der Niere detektiert. Keine Expression wurde dabei in Gehirn, Leber, Schilddrüse, Milz, Submandibulardrüsen, Speiseröhrenschleimhaut, Lymphozyten und Rektum beobachtet. Weitere Studien weisen neben einer Expression von Reg1 in Pankreas auch eine geringere Konzentration in Jejunum, Magen und Kolon (Bartoli, C. *et al.* 1993) sowie eine erhöhte Expression in Kolontumoren (fünf von sechs) nach, wobei tumorbenachbartes Gewebe keine Expression zeigte (Watanabe, T. *et al.* 1990).

Ratten, die mit „growth-hormone releasing factor“ (GRF) behandelt wurden, zeigten in Duodenum und Jejunum eine induzierte Expression von Reg1 gegenüber unbehandelten Tieren, das Pankreasgewebe zeigte sich auf die GRF-Stimulation allerdings unbeeinflusst (Chakraborty, C. *et al.* 1995). Eine Expressionsanalyse von Reg1 während der Entwicklung von WBN/Kob Ratten, die als ein Modellsystem von Pankreatitis genutzt werden, zeigte im Vergleich zu Wistar-Ratten, die als Wildtypmodell mit normalem Pankreasgewebe gegenübergestellt werden, eine erhöhte Expression in 24 und 36 Wochen alten- sowie bei einjährigen Tieren (Bimmler, D. *et al.* 2004). Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch Gastrin-Stimulation, einem Wachstumsfaktor des Gastrointestinaltraktes (Larsson, H. *et al.*

1986), in Ratten eine Expression von Reg1 in Zellen der Magenschleimhaut bewirkt werden konnte (Fukui, H. *et al.* 1998).

In der Maus konnte die Expression nach Aurothioglucose-Behandlung, üblicherweise eingesetzt zur Behandlung rheumatischer Beschwerden, für Reg1 im Pankreas, moderat in Galle und schwach in der Leber nachgewiesen werden, die Reg2 Expression wurde in Pankreas und schwach in der Leber, jedoch nicht in der Galle beobachtet. Keine Expression wurde dabei in Niere, Gehirn, Schilddrüse, Magen, Lunge, Herz, Milz, Kolon und adrenergen Drüsen festgestellt (Unno, M. *et al.* 1993).

Neben der gesteigerten Expressionsrate von Reg1 nach 90 prozentiger Pankreatektomie und der erhöhten Expressionsrate in den WBN/Kob Ratten als Pankreasentzündungsmodell konnten in früheren Arbeiten bereits ähnliche Effekte für das Reg-Familienmitglied PAP1 beobachtet werden. Nach induzierter Pankreatitis wurde dabei eine bis zu 300-fach erhöhte Konzentration ermittelt werden (Terazano, K. *et al.* 1990, Iovanna, J. *et al.* 1991).

Expressionsuntersuchungen in anderen Geweben ergaben, dass PAP1-mRNA bei Ratten exklusiv während Entzündungsreaktionen des Pankreas auftritt, in gesundem Gewebe hingegen keine Expression nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnte auch in Gehirn, Bauch, Hoden, Leber, Niere und Speicheldrüse bei gesunden Tieren keine Expression detektiert werden (Iovanna, J. *et al.* 1991). Eine weitere Studie zeigte bei Caerulein induzierter Pankreasentzündung bei Ratten eine 5000-fache Induktion der Expression von PAP1 und einen 500-fachen Anstieg der PAP2 Proteinkonzentration im Pankreas innerhalb von 24 Stunden. Es folgte ein starker Rückgang nach 48 Stunden auf Proteinebene (Graf, R. *et al.* 2002). In einem Zeitintervall von 0 bis 36 Wochen alten Tieren wurde ein Maximum der PAP1, PAP2 und PAP3 Expression nach 12 Wochen in WBN/Kob Rattenpankreas detektiert (Bimmler, D. *et al.* 2004). Gleiches konnte in Expressionsstudien auf Proteinebene für das Mitglied PAP2 bei Ratten bestätigt werden (Frigerio, J.M. *et al.* 1993). Außerdem konnte bei Entzündungsreaktionen in der Ratte die Expression von PAP3 sowohl in Pankreasgewebe als auch im Dünndarm beobachtet werden (Frigerio, J.M. *et al.* 1993; Kandil, E. *et al.* 2006).

Die Expression von PAP1 mRNA bei Ratten, die mit humanem „Growth Hormone-Releasing Factor“ (GRF) behandelt wurden, konnte jedoch auch in pylorischem

Gewebe des Magens, in Duodenum, in Jejunum und am stärksten in Ileum festgestellt werden (Katsumata, N. *et al.* 1995). Im Kontext von Organ- und Gewebeentwicklungsstudien wurde die Expression von PAP1 in Ileum bei Ratten 3 bis 6 Wochen *post-partum* sowie der Rückgang dieser nach 12 und 24 Wochen festgestellt (Chakraborty, C. *et al.* 1995). Darüber hinaus wurde die PAP1 Expression bei regenerierenden Nervenzellen der Ratte *in vitro* und *in situ* beobachtet (Livesey, F.J. *et al.* 1997, Nishimune, H. *et al.* 2000, Averill, S. *et al.* 2002, Namikawa, K. *et al.* 2005). Von PAP3 wurde in diesem Kontext eine schwache Expression auf mRNA-Ebene beobachtet, PAP2 wurde nicht detektiert (Namikawa, K. *et al.* 2005).

Das humane Homolog HIP/PAP wurde in Dünndarm und Pankreas hierbei in äußeren Bereichen von Langerhans-Inselzellen und in geringerem Maße in Duodenum, Jejunum und Ileum exprimiert vorgefunden (Christa, L. *et al.* 1996). Des Weiteren ist, wie auch in der Ratte, die HIP/PAP Serumkonzentration bei entzündetem Pankreas erhöht (Orelle, B. *et al.* 1992). Bei Entzündungen des Gastrointestinaltraktes wurden erhöhte HIP/PAP Konzentrationen in Dünndarmgewebe detektiert (Gironella, M. *et al.* 2005). Ebenso vergleichbar zu Arbeiten an der Ratte, konnte auch eine HIP/PAP Expression während der Embryonalentwicklung des Menschen zwischen der achten Woche in endokrinen Zellen des Pankreas und ab der elften Woche im ventralen Pankreas detektiert werden, die Expressionsraten in Glukagon-produzierenden Zellen der zehnten Woche entsprachen dabei dem Niveau im adulten Pankreasgewebe (Hervieu, V. *et al.* 2006).

Durch Studien an der Maus konnte die Expression von Reg3 $\alpha$ , einem Homolog zu HIP/PAP (Mensch) bzw. PAP1 (Ratte), in Pankreas und Dünndarm, für Reg3 $\beta$  und Reg3 $\gamma$  in Dünndarm, moderat in Kolon und schwach in Pankreas gezeigt werden. Wiederum keine Expression, wie auch in den anderen analysierten Spezies, konnte in Leber, Niere, Gehirn, Gallenblase und Hoden festgestellt werden (Narushima, Y. *et al.* 1997). Die Expression des Mitglieds Reg3 $\delta$  konnte hingegen ausschließlich im exokrinen Pankreas detektiert werden (Abe, M. *et al.* 2000).

Das Mitglied Reg4 wurde erstmals in gastrointestinaler Schleimhaut von enteroendokrinen Zellen des Ileum beim Menschen vorgefunden (Li, A. *et al.* 2003).



Weitere Arbeiten detektierten die Reg4 Expression in Dünndarm und zu geringerem Anteil in Kolon und Pankreas (Violette, S. *et al.* 2003). Außerdem wurden starke Korrelationen zwischen der Expression und dem Auftreten von kolorektalen und gastrointestinalen Tumoren beschrieben ( Zhang, Y. *et al.* 2003; Oue, N. *et al.* 2005).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die PAP1 bzw. HIP/PAP Expression offenbar relativ eng gefasst gewebspezifisch im Pankreas auftritt, während sich Reg1 auf weitere Gewebe des Gastrointestinaltrakts erstreckt. Reg4 hingegen scheint im Expressionsmuster eher abdominal zum Pankreas angesiedelt zu sein. PAP1 bzw. HIP/PAP und Reg1 gemein ist jedoch eine offensichtliche Funktion während der Embryonal- bzw. der Organ- und Gewebeentwicklung. Vor allem bei PAP1 deuten auch Arbeiten mit regenerierenden Neuronen auf eine solche Funktion hin.

Unter verschiedenen Stimulationsexperimenten die im Bereich von Wachstums- und Entzündungsmodulatoren des Gastrointestinaltraktes anzusiedeln sind, scheint vor allem PAP1 bzw. HIP/PAP von diesen Mechanismen in der Expression reguliert zu werden.

#### **I.4. Korrelationen zwischen der Expression von Proteinen der Reg-Familie und dem Auftreten von Krebs**

Erste Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Expression von Proteinen der Reg-Familie und dem Auftreten von Krebs wurden bereits im Jahr 1990 für die ektopische Expression von Reg1 $\alpha$  in Kolon- und Rektumtumoren beschrieben (Watanabe, T. *et al.* 1990). In einer weiteren Studie wurde in 53 % (75/142) des kolorektalen Tumorgewebes Reg1 $\alpha$  detektiert, hingegen zeigten nur 18 % (16/88) des nicht-Tumorgewebes der selben Patientengruppe eine Reg1 $\alpha$  Expression (Macadam, RCA. *et al.* 2000). Vergleichbare Beobachtungen wurden auch bei Tumoren der Magenschleimhaut gemacht (Yonemura, Y. *et al.* 2003). In detaillierteren Arbeiten wurde eine Reg1 $\alpha$  Expression in 37,7 % (23/61) (Fukui, H. *et al.* 2004) oder 52,4 % (55/105) (Sekikawa, A. *et al.* 2005) der analysierten Fälle von Magenschleimhauttumoren ermittelt und Hinweise auf eine Korrelation von Reg1 $\alpha$  Expression und Invasivität der Tumorzellen in das Lymphgefäßsystem abgeleitet (Fukui, H. *et al.* 2004). Neben diesen beschriebenen Tumoren konnte auch Reg1 $\alpha$

Expression in eitriger Kolitis und daraus hervorgehenden Tumoren festgestellt werden (Sekikawa, A. *et al.* 2005).

Bei HIP/PAP wurde die Expression auf Proteinebene in Karzinomen der Leber (5/5), aber nicht in tumorbenachbartem Gewebe oder normalem Gewebe detektiert (Christa, L. *et al.* 1996; Lasserre, C. *et al.* 1992). Immunchemisch positiv gefärbte Zellen lagen dabei vereinzelt oder in Bündeln vor, die Färbung trat dabei entweder granulär in perinukleärem Zellplasma oder membranös lokalisiert auf (Christa, L. *et al.* 1996). Diagnostische Methoden zeigten sowohl in kolorektalem Tumorgewebe eine HIP/PAP Expression (78/142), als auch in nicht-Tumorgewebe (31/72) der selben Patientengruppe. Des Weiteren wurde jedoch analysiert, dass HIP/PAP und Reg1 $\alpha$  Coexpression in kolorektalem Tumorgewebe der Krankheitsstadien I und II einen prognostischen Marker darstellen, der - wenn positiv - die Fünf-Jahre Überlebensrate um etwa 50 % reduziert. (Macadam, RCA. *et al.* 2000). Interessanterweise zeigte eine weitere Arbeit in hepatozellulären Karzinomen eine Korrelation der HIP/PAP Expression mit frühen Tumorstadien (I-II),  $\beta$ -Catenin Mutationen und einer guten Fünf-Jahre Überlebensprognose. Dem gegenüber gestellt jedoch eine Coexpression von HIP/PAP und Reg1 $\alpha$  mit einer Korrelation von späten Tumorstadien (III - IV) und einer hohen Rate an p53 Mutationen beobachtet wurde (Yuan, RH. *et al.* 2005). Eine weitere Arbeit bestätigte dies mit einer gefundenen Korrelation zwischen dem Auftreten von  $\beta$ -Catenin Mutationen (Deletion der Aminosäuren Asparaginsäure 32, Serin 33, Glutaminsäure 34 in der zur Degradierung notwendigen Domäne) und der Expression von HIP/PAP in 50 % der betrachteten Fälle (21/42) und partiell auftretender Coexpression von Reg1 $\alpha$  in hepatozellulären Karzinomen (Cavard, C. *et al.* 2005).

Außerdem wurden auch Tumore des Pankreas mit HIP/PAP Expression beschrieben (Hervieu, V. *et al.* 2006). In Adenokarzinomen des Pankreas wurde hierbei die HIP/PAP Konzentration bis zu 1000-fach erhöht vorgefunden (Rosty, C. *et al.* 2002). Möglicherweise kann durch HIP/PAP auch die Zelladhäsion in Tumorgewebe reduziert werden und die Zellmobilität gesteigert werden. Hierzu konnten Hinweise aus einer ektopischen PAP1-Expression und dadurch reduzierten zellulären Interaktionen mit Laminin-1 und Fibronectin erhalten werden (Valery, C. *et al.* 2001).

Reg4 wurde ebenso in kolorektalem Tumorgewebe (in Adenomen (12/12) und Karzinomen (9/12)) ektopisch- bzw. überexprimiert vorgefunden, zum Vergleich dienten Expressionsraten von Normalgewebe. Hierbei zeigte sich die Hochregulation von Reg4 besonders deutlich in Adenomen, die einem karzinomartigen Übergangszustand zugeordnet wurden (Zhang, Y. *et al.* 2003). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Reg4 Expression in kolorektalen Tumoren mit chemoresistenten Subpopulationen an Zellen korreliert sein könnte (Violette, S. *et al.* 2003). In metastasierenden Prostatakarzinomen wurde verglichen mit nicht metastasierenden Tumoren eine Reg4 Hochregulation gefunden (Gu, Z. *et al.* 2005). Ferner konnte auch eine erhöhte Reg4 Expression in Magenschleimhauttumoren in 30,4 % (14/46) bzw. in 29,4% (42/143) (Oue, N. *et al.* 2005) der Fälle festgestellt werden. Keine Expression wurde dabei in Tumorgewebe aus Brust oder Lunge detektiert ( Oue, N. *et al.* 2005).

Allerdings konnte auch in Adenokarzinomen der Pankreaskanäle (7/9), (14/31) und (35/64) eine Überexpression von Reg4 detektiert werden (Takehara, A. *et al.* 2006).

Werden diese Erkenntnisse von Expressionsuntersuchungen klinischer Proben mit Arbeiten abgeglichen, die Hinweise auf die biologische Funktion von Reg1, HIP/PAP und Reg4 liefern, lässt sich auf eine mitogene und/oder antiapoptotische Rolle der Proteine in diesem Zusammenhang schließen.

## **I.5. Mitogene und antiapoptotische Effekte sowie Signaltransduktionsmechanismen der Proteine der Reg-Familie**

Erste Erkenntnisse von mitogenen Effekten von Reg1 wurden durch Experimente an Ratten mit 90 prozentiger Pankreatektomie erhalten, indem die Replikations- und Regenerationsrate der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen, erfasst nach 30 bzw. 60 Tagen, durch Injektion von rekombinantem Reg1 (1 mg/kg und Tag) signifikant erhöht werden konnte (Watanabe, T. *et al.* 1994). Durch eine detailliertere Betrachtung konnte Reg1 in der Maus als ein trophischer Faktor für schleimhautproduzierende Zellen des Pankreas analysiert werden, wobei neben der Proliferation auch Zelldifferenzierungsmechanismen angestoßen wurden (Miyaoka, Y. *et al.* 2004). Diese Beobachtungen wurden durch weitere Arbeiten untermauert, die eine

Abmilderung von Diabetes in Ratten durch die Gabe von Reg1 aufzeigten (Gross, D. J. *et al.* 1998). Im Kontext einer Diabetes Verlaufskurve stellt die Beobachtung, dass die Expressionsregulation von Reg1 in Rattenpankreas offenbar metabolismus-unabhängig zu sein scheint, eine wichtige Erkenntnis dar (Bimmler, D. *et al.* 1999). Weitere Hinweise auf proliferative Mechanismen, angestoßen durch Reg1, konnten in Zellkulturversuchen mit ARIP- und RIN 1046-38-Zelllinien, Modellsysteme für Ratten Pankreaskanalzellen bzw.  $\beta$ -Zellen, erhalten werden. Dabei zeigte die Stimulation mit Reg1 Protein (Human, Rind oder rekombinant) eine Erhöhung der Inkorporation von markiertem Thymidin, was sich durch monoklonale Antikörper gegen Reg1 kompensieren ließ (Zenilman, M.E. *et al.* 1996; Levine, JL *et al.* 2000). In RINm5F-Zellen, einem Rattenpankreas  $\beta$ -Zellen Modell, konnte durch Interleukin-6 (IL-6) / Dexamethason die Reg1 Transkription induziert werden und ein mitogener Effekt vermittelt werden, welcher durch Anti-Reg1 Antiseren kompensiert werden konnte, hingegen zeigte Interleukin-6 alleine, ebenso wie Dexamethason, „Tumornecrosis-factor- $\alpha$ “ (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1- $\beta$ ) keine Effekte auf die Reg1 Expression (Akiyama, T. *et al.* 2001). Davon abweichende Beobachtungen wurden in Zelllinien aus Tumoren der Magenschleimhaut beschrieben, wobei die Stimulation von Interleukin-6 oder Interferon- $\gamma$  alleine zur Transkriptionsinduktion von Reg1 $\alpha$  führte und auch hierbei eine erhöhte Inkorporationsrate von Thymidin durch Reg1 $\alpha$  Stimulation beobachtet werden konnte, was Rückschlüsse auf eine erhöhte Proliferationsrate erlaubt. Dabei führten detailliertere Betrachtungen von Signaltransduktionsmechanismen zur Detektion einer Reg1 $\alpha$  abhängigen Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473 und der verstärkten Expression von BCL-x<sub>L</sub> (Sekikawa, A. *et al.* 2005). In der Magenschleimhautkrebszelllinie MKN45 konnte mit Ratten Reg1 konditioniertem Medium die Phosphorylierung von „extracellular signal-related kinase“ (Erk) angestoßen werden und eine erhöhte Thymidin Inkorporation gezeigt werden. Dieser Effekt konnte durch Zugabe des MEK Inhibitors PD98059 reduziert werden (Kadowaki, Y, *et al.* 2002).

Neben der bereits erwähnten Gastrin induzierten Reg1 Expressionsstimulation konnte in weiteren Zellkulturexperimenten dieser genannten Arbeit gezeigt werden, dass durch Einsetzen der Inhibitoren Ro-32-0432 und C3-Transferase, ersterem einem Protein-Kinase-C Inhibitor, zweiterem einem RhoA Inhibitor, der beobachtete

Effekt reduziert werden konnte. Neben diesen Erkenntnissen wurde die Bindung von SP1 und SP3 Transkriptionsfaktoren an den Reg1 Promotor beobachtet (Ashroft, F.J. *et al.* 2004). Des Weiteren ließen sich aus Experimenten in RINm5F-Zellen Beobachtungen sammeln, die eine Reg1 abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor ATF-2 unterstützen, die positiv abhängig von PI-3-K zu sein scheinen (Takasawa, S. *et al.* 2006).

Diesen Beobachtungen gegenüber zu stellen sind Arbeiten, in denen die Reg1 Expression herunterreguliert wurde. Allen voran zu erwähnen ist eine Reg1 „knockout“ Maus, die jedoch nur einen schwachen Phänotyp aufzeigt und bei genauer Charakterisierung auf einer geringeren Dichte an Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas begrenzt zu sein scheint. Dennoch wurde dieses Modell durch weitere Modifikation erfolgreich verwendet, so ließ sich aus diesen Arbeiten eine Reduzierung von Diabetes in NOD Mäusen (Modellsystem für Diabetes) abhängig von konstitutiv aktivierbarer Reg1 Expression ableiten, was als Hinweis auf dadurch bewirkte Regenerationsmechanismen diskutiert wurde (Unno, M. *et al.* 2002).

Außerdem konnte in einem „Insulin-like Growth Factor-1“ (IGF-1) Pankreas „knockout“ Modell (Maus) die signifikante Hochregulation von Proteinen der Reg-Familie beobachtet werden (Lu, Y. *et al.* 2006).

Entscheidend für die Wirkung sekretierter Proteine ist die Existenz spezifischer Rezeptorproteine, um diese Signale auf die intrazelluläre Seite zu transduzieren. In einer bislang noch nicht unabhängig wiederholten Arbeit konnte für Reg1 die Bindung mit einem Bindungskoeffizienten von  $K_D = 4,41$  nM an das EXTL3-Homolog der Ratte gezeigt werden, einem 919-Aminosäuren zähligen Transmembranprotein vom Typ II mit einer Größe von 105 kDa. Das Protein besteht aus einer Transmembrandomäne von Aminosäuren 29 bis 51, einer großen extrazellulären Domäne mit 868 Aminosäuren und einem kurzen intrazellulären Abschnitt am Aminoterminus. Zudem wurde eine Bindung an das humane Homolog, EXTL3, mit einem Bindungskoeffizienten von  $K_D = 14,0$  nM wurde detektiert. RINm5F-Zellen mit transienter ektopischer Expression von EXTL3 und Stimulation durch Reg1 zeigten erhöhte Mitoseaktivität. Das Expressionsmuster des Ratten EXTL3 Homolog zeigte keine Hochregulation während der Regeneration von Pankreas  $\beta$ -Zellen nach Pankreatektomie, jedoch nach Induktion von akuter Pankreatitis (Kobayashi, S. *et al.* 2001; Bluth, M. *et al.* 2006). Ferner konnte ein relativ ubiquitäres Expressionsmuster

in vorwiegend gastrointestinalen Geweben von Leber, Bauch, Dünndarm, Dickdarm, bis hin zu Niere und Gehirn sowie adrenergen Drüsen und der Hypophyse gefunden werden (Kobayashi, S. *et al.* 2001).

Eine vollkommen andere physiologische Funktion des Proteins wurde durch Beobachtungen abgeleitet, die in Reg1 bei Pankreasentzündungen einen inhibitorischen Effekt auf die Bildung von Calciumcarbonatpräzipitaten feststellten (Multigner, L. *et al.* 1983), was jedoch widerlegt wurde (Bimmler, D. *et al.* 1997).

Für das Reg-Familien Mitglied PAP1 konnte in der Ratte nach Verletzung in regenerierenden Neuronen ein fördernder Effekt auf das Auswachsen der Axone festgestellt werden. Dies ließ sich mit polyklonalem anti-PAP1 Antiserum inhibieren. Darüber hinaus konnte die Proliferation von Schwanzzellen durch PAP1 *in vitro* schwach induziert werden und ließ sich durch Costimulation mit Forskolin (10  $\mu$ M) abhängig von der PAP1 Dosis deutlich steigern. Im Rahmen dieser Beobachtungen wurden Cytokine der LIF/CNTF Familie als biologische Stimulationsfaktoren und Interleukin-6- (gp130) und LIF-Rezeptoren zur Aktivierung der PAP1 Transkription mit einer Signalkaskade durch Jak/Stat diskutiert (Livesey, F.J. *et al.* 1997). Aus diesen Überlegungen wurde konsequent durch die Stimulation mit Faktoren der Interleukin-6 Familie („Cytokines related to ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) 10 ng/ml, Cardiotrophin-1 (CT-1) (10 ng/ml) und „Leukaemia inhibitory factor“ (LIF) (10 ng/ml)) gezeigt, dass die Expression von PAP1 in kultivierten Motoneuronen der Ratte induziert werden kann. Gereinigtes PAP1 führte durch Zugabe zu isolierten und kultivierten embryonalen Motoneuronen dosisabhängig zu einem Überlebensvorteil, was durch konstitutive ektopische Expression von PAP1 in solchen Zellen bestätigt werden konnte. Durch Inhibition von Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-K) mit LY294002 (20  $\mu$ M) konnte der trophische Effekt von PAP1 auf diese Zellen aufgehoben werden und eine Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473 in Abhängigkeit von PAP1 wurde dabei reduziert, hingegen war die Inhibition der „mitogen activated protein kinase (MAPK) ohne Effekt. Außerdem konnten aus weiteren Experimenten Hinweise auf die Involvierung von NF $\kappa$ B in die PAP1 induzierten Mechanismen gewonnen werden, wobei durch ektopisch erhöhte Expression von „Inhibitor-of- $\kappa$ -B“ (I $\kappa$ B) der Effekt von PAP1 inhibiert werden konnte. Aus diesen Beobachtungen wurde für PAP1 die Rolle als Cofaktor in einer CNTF

induzierten trophischen Signalkaskade in Motoneuronen der Ratte diskutiert, was durch Expressionsanalysen während der Embryonalentwicklung des neuralen Systems unterstützt wurde (Nishimune, H. *et al.* 2000). Diese Beobachtung, die für eine PAP1 abhängige Aktivierung von NF $\kappa$ B spricht, die aber in einem Überlebensvorteil für die Zellen mündet, steht dabei im Gegensatz zu nachfolgend dargestellten Erkenntnissen aus Entzündungsreaktionen, die eine reduzierte nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B abhängig der PAP1 bzw. HIP/PAP Konzentration feststellten.

Die Beobachtungen der PAP1 abhängigen Differenzierung und Regeneration von neuronalem Gewebe sowie die beschriebene Beobachtung einer Hochregulation der Expression in Kolontumoren sollten im Zusammenhang mit Arbeiten eines transgenen Wnt-Signalkaskaden Zellmodells gesehen werden. Dabei konnte eine starke Transkriptionsinduktion von HIP/PAP in Abhängigkeit von aktivierter Wnt-Signalkaskade, insbesondere durch mutiertes und dadurch nicht mehr degradiertes  $\beta$ -Catenin ermittelt werden (Cavard, C. *et al.* 2006). Bemerkenswert ist dies, da bei beiden Differenzierungsphänomenen, erstens der Neuralentwicklung und zweitens Entartungen, besonders in Kolongewebe, die in Krebs münden, die Wnt-Signalkaskade eine grundlegende Steuerebene dieser Prozesse darstellt (Segditsas, S. & Tomlinson, I. 2006; Fradkin, L.G. *et al.* 2005).

Beobachtungen *in vivo* an Mäusen zeigten mitogene Effekte von HIP/PAP. Hierbei führten HIP/PAP exprimierende implantierte Hepatocyten in der Mausleber nach partieller Hepatektomie durch parakrine Effekte zu einer deutlichen Steigerung der Leber Regeneration. In diesen Modellen wurde nach einer Hepatektomie eine zeitlich frühere Expression von TNF- $\alpha$  und der Phosphorylierung von Stat3 beobachtet. Darüber hinaus zeigten die Tiere eine erhöhte Überlebensrate und Apoptoseresistenz gegenüber der Behandlung mit ROS („reactive oxygen species“) (Lieu, HT. *et al.* 2005).

Neben der sekretierten Form von HIP/PAP konnten auch Fraktionen colokalisiert mit Golgi-Apparat Strukturen detektiert werden. Aus einer solchen Beobachtung wurde in Zellmodellen von hepatozellulären Karzinomen mit HIP/PAP Überexpression die Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit RII $\alpha$  der cAMP-abhängigen Protein-

Kinase-A (PKA) nachgewiesen. Zusätzlich konnten aus *in vitro* Kinase Experimenten Hinweise gewonnen werden, dass HIP/PAP durch PKA an den Serinresten 73, 138 und 153 phosphoryliert werden kann (Demaugre, F. *et al.* 2004). Ob neben der sekretierten Form jedoch auch eine intrazelluläre Fraktion des Proteins an der Initiierung von Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist oder hierbei andere physiologische Funktionen eine Rolle spielen, konnte bislang nicht geklärt werden.

Antiapoptotische Effekte wurden erstmals *in vitro* an AR4-2J-Zellen, einem Modell von Ratten Pankreasdrüsenzellen, beobachtet. Hierbei führte die Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) und Menadion, welches zu ROS (0,05 mM) führt, nach 12 bis 18 Stunden zur Transkriptionsinduktion von PAP1. Die Expression von PAP1 vermittelte den Zellen nach 16 Stunden eine um den Faktor 2 gesteigerte Apoptoseresistenz gegenüber der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Inkubation. Die Transkriptionsaktivierung von PAP1 konnte durch N-acetyl-L-Cystein (30 mM), einem unspezifischen Inhibitor von NFκB, reduziert werden (Ortiz, E.M. *et al.* 1998).

In einer weiteren Arbeit konnte in transgenen Mäusen, welche HIP/PAP Expression in der Leber zeigen, eine erhöhte Regenerationsrate des Organs nach partieller Hepatektomie beobachtet werden, wie dies auch in der Ratte beobachtet wurde. Isolierte und kultivierte Zellen aus diesen Organen zeigten, dass in transgenen HIP/PAP exprimierenden Zellen induzierte Apoptose durch Costimulation mit TNF-α und Actinomycin-D reduziert werden konnte. Des Weiteren wurde die HIP/PAP abhängige Phosphorylierung von Bad am Serinrest 112 detektiert (Simon, MT. *et al.* 2003). Durch ein weiteres transgenes Mausmodell mit ektopischer HIP/PAP Expression konnten diese Beobachtungen untermauert werden, da diese Tiere eine erhöhte Resistenz gegenüber Fas induzierter Apoptose im Lebergewebe aufzeigten (Lieu, HT. *et al.* 2006).

Außerdem konnte mit p8 „knockout“ Mäusen gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor p8 neben zahlreichen Prozessen auch die Transkriptions-Coaktivierung von Reg3β (Maus Homolog zu HIP/PAP) steuert. Abgeleitet aus diesem p8<sup>-/-</sup> Modellsystem konnte in Ratten gezeigt werden, dass nach Caerulein induzierter Pankreatitis die Kompetition von PAP1 durch Antiseren die Entzündungsreaktion im Pankreas signifikant stärker ablaufen ließ, was durch das Einwandern von Makrophagen, die Aktivierung der TNF-α Expression sowie der cytosolisch-nukleären Translokation von NFκB gezeigt werden konnte und auf die geringere Konzentration an Reg3β zurückzuführen war (Vasseur, S. *et al.* 2004).



Ähnliche Beobachtungen konnten auch durch PAP(1) siRNA Applikationen in der Ratte festgestellt werden (Zhang, H. *et al.* 2004).

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich für HIP/PAP bzw. PAP1 (Ratte) oder Reg3( $\beta$ ) (Maus) auf eine biologische Funktion als Entzündungsmodulator schließen.

Interessant ist dabei auch die detektierte erhöhte HIP/PAP Konzentration bei Patienten mit Entzündungen des Gastrointestinaltraktes. Aus Zellkulturexperimenten mit Biopsien dieser Patientengruppe konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von Cytokinen der Entzündungsreaktionen (IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) reziprok zur HIP/PAP Serumkonzentration korrelierte und die nukleäre Lokalisation von NF $\kappa$ B nach TNF Stimulation dieser Zellen umgekehrt abhängig der HIP/PAP Dosis gesenkt war (Gironella, M. *et al.* 2005).

Schließlich wurden in AR4-2J Zellen entzündungshemmende Mechanismen gezeigt, in denen die autokrine Rückkopplungsschleife von TNF- $\alpha$  auf die eigene Expressionsrate durch PAP1 reduziert werden konnte und die Phosphorylierung von Stat3 an Tyrosinresten nach 30-minütiger Stimulation durch PAP1 einen Höhepunkt erreicht und die Expressionsrate von „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS) signifikant erhöht werden konnte. Frühere Beobachtungen der PAP1 abhängigen inhibierten nukleären NF $\kappa$ B Lokalisation ließen sich in dieser Arbeit durch Verwenden von Jak-Inhibitoren (AG490) (30  $\mu$ M) blockieren, so dass eine TNF- $\alpha$  induzierte cytosolisch-nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B durch PAP1 nicht länger unterdrückt wurde (Folch-Puy, E. *et al.* 2006).

In einer weiterführenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PAP1 Expression in Ratten selektiv hoch reguliert wurde, wenn diese Tiere mit *Pseudomonas pneumonia* infiziert waren, hingegen aber eine Expressioninduktion bzw. Hochregulation der Proteinkonzentration weiterer Entzündungsmarker (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12) nicht beobachtet wurde (Tribl, B. *et al.* 2004). Außerdem wurde auch Reg1 Expression in Ratten in Kontext zu einer *Helicobacter pylori* Infektion gestellt (Yoshino, N. *et al.* 2005). Möglicherweise lassen sich diese Beobachtungen auf einen Abwehrmechanismus zurückführen, bei dem C-Typ Lektine an der Erkennung und Markierung von pathogenen Mikroorganismen beteiligt sind (Cambi, A. *et al.* 2005, Cash, H.L. *et al.* 2006).

In AR4-2J- und RINm5F-Zellen wurde darüber hinaus beobachtet, dass die Transkription von HIP/PAP und Reg1 abhängig von Poly-ADP-Ribose-Polymerase ist und die Halbwertszeit der PAP1-mRNA kurzlebig ist (Bödeker, H. *et al.* 1998, Akiyama, T. *et al.* 2001).

Die Bindung an ein Transmembranprotein wie es für Reg1 gezeigt werden konnte, ist für HIP/PAP bislang noch nicht beschrieben, allerdings konnten für HIP/PAP Interaktionen mit den extrazellulären Matrixkomponenten Laminin-1 und Fibronectin nachgewiesen werden, die offenbar nicht von Glykosylierungsmustern abhängig sind (Christa, L. *et al.* 1996). Weiterhin wurden Homodimere von PAP1 und Heterodimere von PAP1 und Reg1 detektiert (Bödeker, H. *et al.* 1999) und die Eigenschaft von PAP1 (Ratte) und Reg1 (Ratte) beobachtet, dass nach einer Trypsinspaltung zwischen Argininrest 11 und Isoleucinrest 12 die Proteine mit den C-Terminal verbleibenden Peptiden *in vitro* zu hoch organisierten fibrillären Strukturen präzipitieren (Schiesser, M. *et al.* 2001; Graf, R. *et al.* 2001;). Derartige Präzipitate von Reg1 $\alpha$  könnten auch bei der Ausbildung von Proteinpräzipitaten in Ablagerungen innerhalb der Pankreaskanäle beteiligt sein (Ochiai, K. *et al.* 2004). Interessant in diesem Kontext ist auch die Beobachtung einer hohen HIP/PAP Konzentration in Gehirnen von Alzheimer Patienten (de la Monte, S.M. *et al.* 1990) sowie das Vorkommen von einem HIP/PAP Homologen Protein, welches in „Scrapie“ Tieren aufreguliert vorliegt (Skretting, G. *et al.* 2006).

In detaillierteren Analysen konnte aufgeklärt werden, dass HIP/PAP Aggregate im Durchmesser 6 bis 68 nm starke Fibrillen bilden können, wobei die native Proteinkonformation bestehend aus 2  $\alpha$ -Helices und 8  $\beta$ -Faltblattstrukturen erhalten bleibt. Die Proteine lagern sich mit den Bereichen der Aminosäurereste 84 bis 116 aneinander und bilden dadurch hohe elektrostatische Wechselwirkungen, da positiv und negativ geladene Aminosäurereste auf gegenüberliegenden Seiten lokalisiert liegen (Ho, MR. *et al.* 2006).

Funktionelle Aspekte des Reg-Familienmitglieds Reg4 sind bislang noch wenig beschrieben, es gibt jedoch erste Arbeiten mit Zellkulturmodellen, die die mitogene Wirkung von Reg4 sowie eine dosisabhängige die Phosphorylierung von Akt am Threoninrest 308 und Serinrest 473 belegen (Takehara, A. *et al.* 2006; Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006) und Hinweise auf eine Beteiligung an

Phosphorylierungsmechanismen des EGF-Rezeptors zeigen. Des Weiteren wurde in diesen Arbeiten herausgefunden, dass der Transkriptionsfaktor Komplex AP-1 (bestehend aus cJun-Homodimeren oder cJun / cFos Heterodimeren) Reg4 abhängig aktiviert und die Expression von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> induziert werden konnte (Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006). Dies erlaubt Rückschlüsse auf antiapoptotische, induzierte Mechanismen. Außerdem wurde in Zellkulturmodellen die Reg4 Expressionsinduktion durch Stimulation mit TGF- $\alpha$ , EGF, „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und „hepatocyte growth factor“ (HGF) nachgewiesen. Zusätzlich ergaben diese Studien, dass Reg4 Apoptoseresistenz gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung vermitteln kann (Nanakin, A. *et al.* 2007).

Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen zu den Mitgliedern der Reg-Familie ein proliferativer Effekt von Reg1 auf verschiedene Zellen des Gastrointestinaltraktes abgeleitet werden (Watanabe, T. *et al.* 1994; Miyaoka, Y. *et al.* 2004; Zenilman, M.E. *et al.* 1996; Levine, J.L. *et al.* 2000), wobei Interleukin-6 mit PKC und möglicherweise kleinen G-Proteinen offensichtlich ein wichtiger Induktionsfaktor der Expression zu sein scheint und die Expression unter bestimmten Umständen von IGF-1 gehemmt werden kann (Akiyama, T. *et al.* 2001; Sekikawa, A. *et al.* 2005; Ashroft, F.J. *et al.* 2004, Lu, Y. *et al.* 2006). Vertreter der MAP-Kinase Kaskade, wie Erk-1 und Erk-2, des Weiteren aber auch Akt, sowie PI-3-Kinase wurden als durch Reg1 Stimulation aktivierte Kinasen beschrieben. Weiterhin konnte die Interaktion mit dem Transmembranprotein EXTL3 (human) detektiert werden (Kadowaki, Y. *et al.* 2002; Takasawa, S. *et al.* 2006; Kobayashi, S. *et al.* 2000; Bluth, M. *et al.* 2006).

Dabei lassen sich gewisse Differenzierungen zu den bislang analysierten Mechanismen von HIP/PAP finden. So scheint bei HIP/PAP neben mitogenen Effekten, die vor allem in neuronalem Gewebe detektiert wurden, ein antiapoptotischer bzw. ein entzündungshemmender Effekt aufzutreten (Livesey, F.J. *et al.* 1997; Nishimune, H. *et al.* 2000; Lieu, H.T. *et al.* 2005; Oritz, E.M. *et al.* 1998; Simon, M.T. *et al.* 2003; Lieu, H.T. *et al.* 2006; Vasseur, S. *et al.* 2003; Gironella, M. *et al.* 2005; Folch-Puy, E. *et al.* 2006; Tribl, B. *et al.* 2004). Neben zahlreichen Stimulantien, die die HIP/PAP bzw. PAP1 (Ratte) oder Reg3 $\beta$  (Maus) Transkription induzieren können, sind neben Interleukin-6 auch Effekte der Wnt-Signalkaskade

beschrieben (Nishimune, H. *et al.* 2000; Cavard, C. *et al.* 2006). HIP/PAP selbst wiederum scheint über komplexe Rückkopplungsmechanismen, an denen NF $\kappa$ B beteiligt ist, negativ auf die Expression von Entzündungsfaktoren der Interleukinfamilie zu wirken und die Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion, ausgelöst durch ROS, Fas oder auch TNF- $\alpha$  zu erhöhen. Möglicherweise ist bei diesem HIP/PAP vermittelten Effekt die Jak-Kinase positiv beteiligt. Des Weiteren ließ sich, gleichwohl wie bei Reg1, die Phosphorylierung von Akt detektieren, welche in Abhängigkeit von PI-3-K ermittelt wurde, funktionell gegensätzlich zur vermittelten Apoptoseresistenz erscheint jedoch die detektierte Phosphorylierung von Bad zu stehen (Simon, MT. *et al.* 2003; Oritz, E.M. *et al.* 1998; Lieu, HT. *et al.* 2005; Folch-Puy, E. *et al.* 2006).

Die induzierte Phosphorylierung von Akt könnte ubiquitär auf Mitglieder der Reg-Familie zutreffen, da dies ebenso für Reg4 gezeigt werden konnte, wobei Reg4 gleichfalls zu einer erhöhten Apoptoseresistenz sowie einer erhöhten Expression des Apoptose Repressors BCL-x<sub>L</sub> beisteuern kann als auch die Ausbildung des Transkriptionsfaktorkomplex AP1 aktivieren kann (Takehara, A. *et al.* 2006; Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006; Nanakin, A. *et al.* 2007).

Übersichtsartikel und Verknüpfungen dieser Ergebnisse bezugnehmend auf Expressionsmuster und Funktion der Proteine der Reg-Familie, wurden ebenfalls erstellt (Graf, R. *et al.* 2006; Kinoshita, Y. *et al.* 2004; Closa, D. *et al.* 2007).

Grafisch zusammengefasst sind diese Ergebnisse in Abbildung I.5.a & b dargestellt.

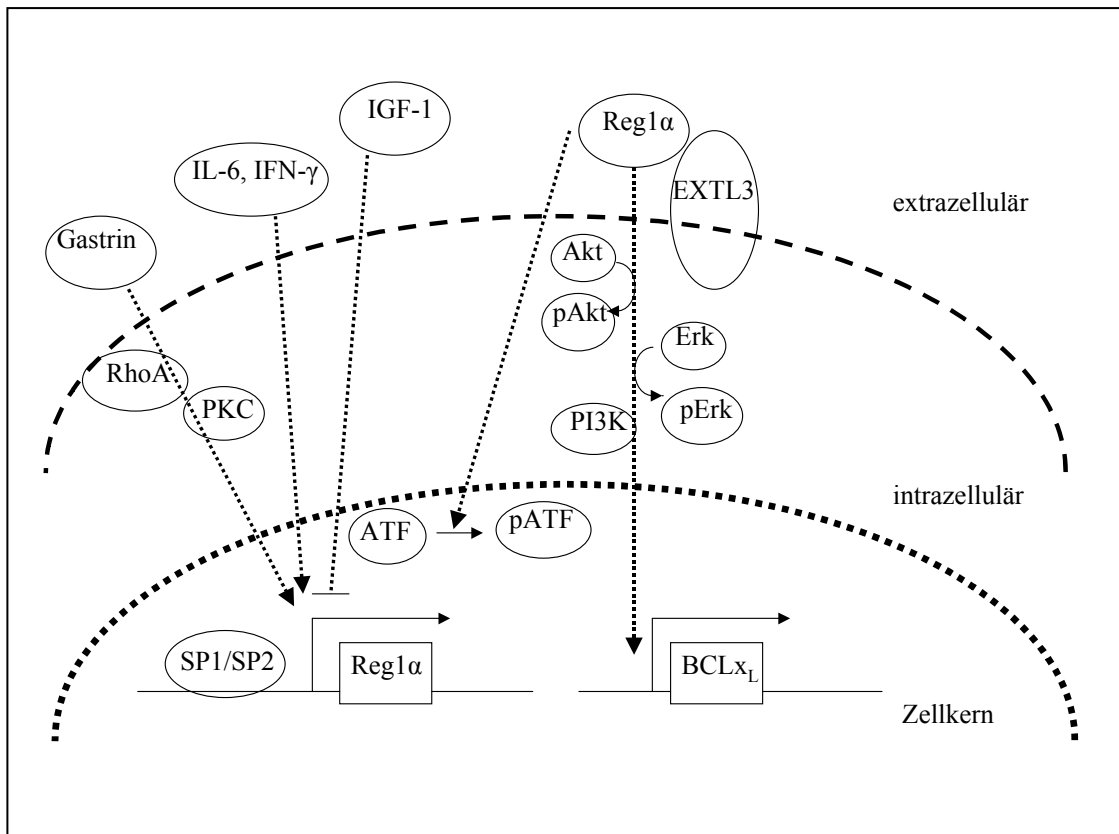


Abbildung I.5.a.: Involvierte Proteine und Signaltransduktionsprozesse unter Beteiligung von Reg1α (Human) bzw. den Homologen Reg1 (Maus, Ratte). Abgeleitet und zusammengefasst aus publizierten Arbeiten.

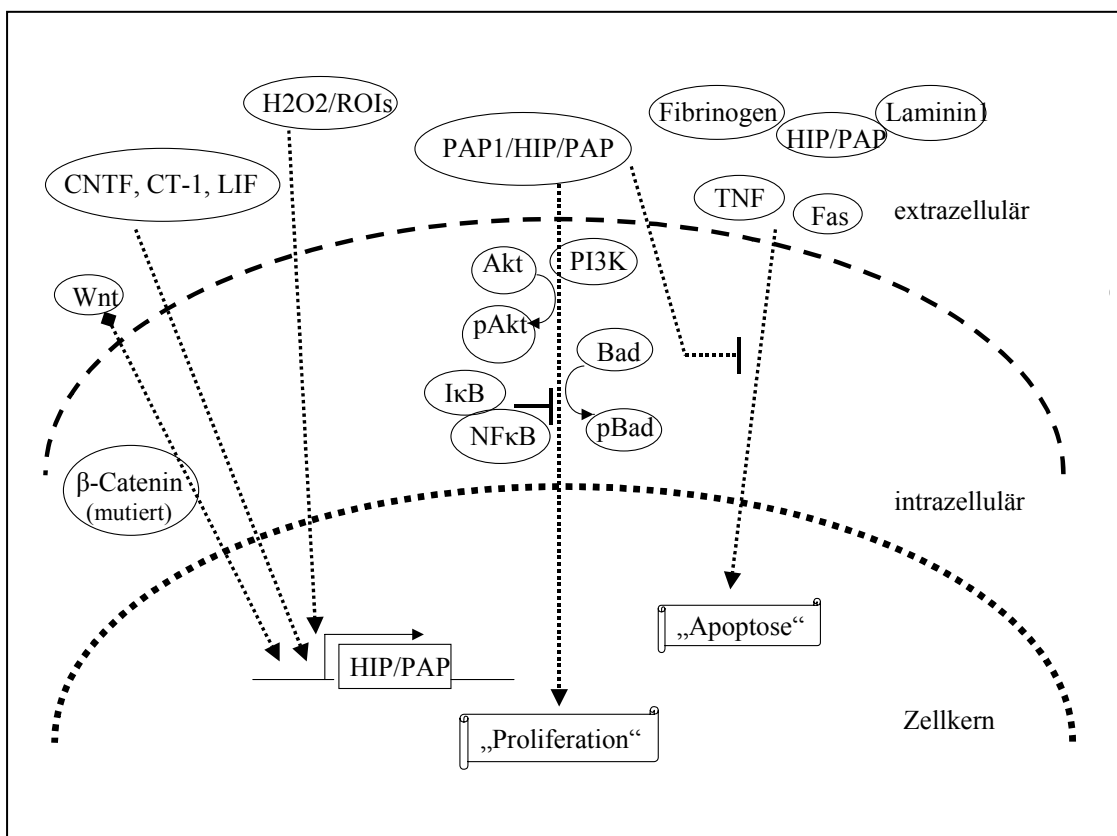


Abbildung I.5.a.: Involvierte Proteine und Signaltransduktionsprozesse unter Beteiligung von HIP/PAP (Human) bzw. den Homologen PAPI1 (Ratte), Reg3 (Maus). Abgeleitet und zusammengefasst aus publizierten Arbeiten.

## II. Materialien & Geräte

### II.1M. Materialien & Geräte zu molekularbiologischen Arbeiten

#### Polymerasekettenreaktion

Taq-Polymerase + Reaktionspuffer + Nukleotidgemisch [10 mM]

(Peqlab, Nr.: 01-1020)

Pwo-Polymerase + Reaktionspuffer + Nukleotidgemisch [10mM]

(Peqlab, Nr.: 01-5010)

Oligonukleotid DNA als Primer-DNA zur Polymerasekettenreaktion (Operon GmbH):

Zu amplifizierende DNA	Primer Name <sup>*1</sup>	Position <sup>*2</sup>	Sequenz
Reg4	Reg4_Hum_277forEcoR I	5`	5`- CCTCAGGGTAGAATTCAGATGGCTTCCAG -3`
Reg4	Reg4_Hum_738revNot I	3`	5`- GGCGGCCGCGCAGAATCTTGATTCTTGCTCTATGG -3`
HIP/PAP	PAP_Hum_76forEcoR I	5`	5`- CAAGTCGGAATTCCTATGCTGCCTCCCATG -3`
HIP/PAP	PAP_Hum_584revNot I	3`	5`- CCAAACACAGGCTGCTGACTTCGCGGCCGCACTAG -3`
Reg4	Reg4_Hum_324forXma I	5`	5`- GTCCCGGGTGATATCATCATGAGACCCAGC -3`
Reg4	Reg4_Hum_756revHind III	3`	5`- CCCAAGCTTGGGCTGTGCAGGAGTTAGCA GAATC -3`
HIP/PAP	PAP_Hum_130forXma I	5`	5`- GTCCCGGGTGAAGAACCCAGAGGGAAC TGCC -3`
HIP/PAP	PAP_Hum_583revHind III	3`	5`- CCCAAGCTTGGGCTGCTGACTTCCCTCC TGCCTAGTC -3`
Reg4	Reg4_Hum_173forHind III	5`	5`- GGTAAGCTTACCATGGCTTCCAGAAGCATGCGG CTGC-3`
Reg4	Reg4_Hum_740rev Not I	3`	5`- TTGCTGCGGCCGCTGGTCTGACTTGACAG GAAGTGTGG-3`
HIP/PAP	PAP_Hum_61forHind III	5`	5`- GTC AAGCTTACCATGCTGCCTCCCATGGCCCTG CCCAG -3`
HIP/PAP	PAP_Hum_585revNot I	3`	5`TCCTGCAGCGGCCGCGTCAGTGAACCTGCAGACATAGGGTAACC -3`
EXT1	EXT1_gateway_774for	5`	5`- CACCATGCAGGCCAAAAACGCTATTTTCATC -3`
EXT1	EXT1_gateway_2011rev	3`	5` - AAGTCGCTCAATGTCTCGGTATTTCTTCC -3`
EXTL1	EXTL1_gateway_714for	5`	5`- CACCATGCAGTCGTGGAGGAGAAGAAAGTCC -3`
EXTL1	EXTL1_gateway_2741rev	3`	5`- GGGCTTCTCCAGGCTGCGGTACTTCTTGC -3`
EXT2	EXT2_variant1gateway_487for	5`	5`- CACCATGTGTGCGTCCGTC AAGTATAATATCC -3`
EXT2	EXT2_variant1gateway_2617rev	3`	5` - TAAGCTGCCAATGTTGGGGAAGCTC -3`
EXTL3	Reg1Rez_113_gateway	5`	5`- CACCATGACAGGCTATACCATGCTGCG -3`
EXTL3	Reg1Rez_2870r_gateway	3`	5`- GATGAACCTTGAAGCACTTGGTCTTG -3`

\*1 unter Angabe der Position im offenen Leserahmen der entsprechenden cDNA und, wenn vorhanden, der fusionierten Restriktionsendonuclease Erkennungssequenz.

\*2 bezogen auf das entsprechende Ende des codierenden Stranges.

„Thermocycler“: (Applied Biosystems, Gene Amp PCR Systems 9700)

Agarosegelelektrophorese:

TAE-Puffer:	50-fach: 2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA (Gibco, Nr.: 24710-030)
Agarose:	(Invitrogen, Nr.: 15510-027)
Ethidiumbromid:	1 % [v/v] (Appllichem, Nr.: A1152-0025)
Ladepuffer:	6-fach (Fermentas, Nr.: R0611)
DNA-Größenmarker	1 kb-Plus-DNA (Invitrogen, Nr.: 12308-011)
Apparatur:	(Biorad, Mini-Sub <sup>R</sup> Cell GT)
Spannungsquelle	(Amersham Pharmacia Biotechnologies, EPS 601)
UV-Detektor	(Syngene UV-Detector)
UV-Tisch	(Biorad, UV-Transilluminator 2000)

Restriktionsendonucleasen:

<i>EcoR I:</i>	(20 U/μl, New England Biolabs, Nr.: R0101T)
<i>Not I:</i>	(10 U/μl, New England Biolabs, Nr.: R0189M)
<i>Xma I:</i>	(10 U/μl, New England Biolabs, Nr.: R0180M)
<i>Hind III:</i>	(20 U/μl, New England Biolabs, Nr.: R0104T)
<i>Pvu I</i>	(10 U/μl, New England Biolabs, Nr.: R0150S)
<i>Fsp I</i>	( 5 U/μl, New England Biolabs, Nr.: R0135S)

DNA Elution aus Agarosgelen:

Kit:	(Genomed, Jetquick Nr.: 420250)
------	---------------------------------

Absorbtionsspektrometer: (Peqlab, NanoDrop ND-1000)

T4-DNA-Ligase und Puffer:

Kit:	(Enzym: 15 U/μl, Invitrogen, Nr.: 15224-041)
------	--

*E. coli*-Transformation:

<i>E. coli</i>	(Invitrogen one shot <sup>R</sup> TOP10 <sup>R</sup> chemically competent, Nr.: K2400-20)
<u>Kanamycin:</u>	(Stammlösung: 100 mg/ml, Appllichem, Nr.: A0839-0025)
<u>Ampicillin:</u>	(Stammlösung 50 mg/ml, Appllichem, Nr.: A1493-0025)
<u>LB-Medium:</u>	(Tryptone (Appllichem Nr.: 1553.1000) 10 g/l, Hefe Extrakt (Appllichem Nr.: A1552.1000) 5 g/l, NaCl (Merck Nr.: 1.06400.1000) 10 g/l)

LB-Agar: (LB-Medium + 1% Agar-Agar (Merck Nr.: 1.01614.1000))

S.O.C. Medium: (Tryptone (Appllichem Nr.: 1553.1000) 20 g/l, Hefe Extrakt (Appllichem Nr.: A1552.1000) 5 g/l, NaCl (Merck Nr.: 1.06400.1000) 0,5 g/l)

Klonierung mit gateway<sup>R</sup> System:

Kit: (Invitrogen, Gateway<sup>R</sup> Technology, Nr.: 12535-019)

Plasmid Minipräparation:

Kit: (Promega, Wizard plus Nr.: A7510)

Plasmid Maxipräparation:

Kit: (Qiagen, High Speed Maxi Kit Nr.: 12663)

cDNA Synthese:<sup>\*1</sup>

Kit: (Roche, First strand cDNA Synthesis Kit Nr.: 11 483 188 001)

<sup>\*1</sup> abweichend bei cDNA Synthese im Rahmen der Mikroarray Durchführung (siehe Mikroarray).

Total RNA Isolation:

Kit: (Qiagen RNeasy Nr.: 74104)



## II.2M. Materialien & Geräte zu biochemischen Methoden

### Lyse von Zellen aus Zellkultur zur Protein Isolierung:

HGNT Puffer: (20 mM HEPES (Sigma, H-0527), 10 % (v/v) Glycerin (Merck, Nr.: 1.04201.1000), 150 mM NaCl (Merck, Nr.: 1.06400.1000) 1 % (v/v) Triton x-100 (Merck, Nr.: 1.08603.1000), 2 mM EDTA (Merck, Nr.: 1.08418.1000))

RIPA Puffer: (1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Nr.: 8.14735.0500), 200 mM NaCl (Merck, Nr.: 1.06400.1000), 20 mM HEPES (Sigma, H-0527), 0,4 mM EDTA (Merck, Nr.: 1.08418.1000), 1 % [v/v] Triton x-100 (Merck, Nr.: 1.08603.1000), 0,3 % [w/v] SDS (Merck, Nr.: 8.22050.1000), pH: 7,5 (HCl, (Merck, Nr.: 1.00317.1000))

Chaps Puffer: (10 mM Tris (Merck, Nr.: 1.08382.1000), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Nr.: 8.14735.0500), 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich, Nr.: E4378), 0,5 % [v/v] Chaps (Calbiochem, Nr.: 220201), 10 % [v/v] Glycerin (Merck, Nr.: 1.04201.1000), pH: 7,5 (HCl, (Merck, Nr.: 1.00317.1000))

### Protein Trennung durch SDS-PAGE:

Ladepuffer: (BioRad, Nr.: 161-0791 & -92)

Polyacrylamidgele: (BioRad, Criterion™ Precast, Nr.: 395-0124 & -0125)

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese: (BioRad, Criterion SDS-PAGE)

MES-Laufpuffer (BioRad, Nr.: 161-0789)

MOPS-Laufpuffer (BioRad, Nr.: 161-0788)

### Protein Detektion durch Westernblotanalyse

„Blotting-Apparatur“: (BioRad, Criterion Blotter)

Transferpuffer (0,18 M Tris (Merck, Nr.: 1.08382.1000), 1,6 M Glycerin (Merck, Nr.: 1.04201.1000), pH: 8,6 )

TBS [20-fach Stammlösung]: (3 M NaCl (Merck, Nr.: 1.06400.1000), 1 M Tris (Merck, Nr.: 1.08382.1000), pH: 7,5 (HCl, (Merck, Nr.: 1.00317.1000))

TBST: (siehe TBS, zusätzlich: 0,05 % [v/v] Tween20 (Merck, Nr.: 8.17072.1000))

Blockierlösung: 5 % (w/v) BSA (AppliChem, Nr.: A1391.0500), 0,01 % (v/v) NaN<sub>3</sub> (Merck, Nr.: 1.06688.0100), in 1x TBS + Spatelspitze Phenolrot (Merck, Nr.: 1.07241.0005) pH 7,5 (Lagerung bei +4°C)

Milchpulver: (Merck, Nr.: 1.15363.0500)  
 ECL-Reagenz (plus) (Roche, Nr.: 12 015 196 001)  
 ECL-Reagenz (standard) (Roche, Nr.: 12 015 200 001)  
 Chemiluminiszenzdetektionsapparatur: (BioRad; Versa Doc)

Antikörper:

Erstantikörper:

Anti Reg4 biotinyliert (R&D Systems, Nr.: BAF1379)  
 Anti Reg4 IgG Fraktion (Biogenes Tier 6489)  
 Anti HIP/PAP IgG Fraktion (Biogenes Tier 6492)  
 Anti-V5 (Invitrogen, R96025)  
 Anti-Phospho-Akt (Ser473)(Cell Signaling Technologies, Nr.: 9271)  
 Anti-Human IgG-HRP gekoppelt (Sigma-Aldrich, Nr: A 0170)  
 Anti-Phospho-Erk1/2 (Thr202/Thr204) (Cell Signaling Technologies, Nr.: 9101)  
 Anti-Phospho-NFκB (Ser536) (Cell Signaling Technologies, Nr.: 3031)  
 Anti-Cofilin (Cell Signaling Technologies, Nr.:3312)

Zweitantikörper und Detektionssysteme:

Anti-Maus (Amersham, Nr.: NA931V)  
 Anti-Kaninchen (Cell Signaling Technologies, Nr.: 7074)  
 Streptavidin-HRP (AMDEX™, Nr.: RPN 4401)

Ponceau-S Färbelösung 0,25 % (w/v) Ponceau-S (Merck, Nr.: 1.14275.0010)  
 10 % (v/v) Essigsäure (Merck, Nr. : 1.00063.2510)

Coomassie Färbelösung 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck, Nr.: 1.02082.0025)  
 10 % (v/v) Essigsäure (Merck, Nr. : 1.00063.2510)  
 12,5 % (v/v) Isopropanol (Merck, Nr.: 1.09634.1000)

Coomassie Entfärbelösung      10 % (v/v) Essigsäure  
   12,5 % (v/v) Isopropanol

Protein A/G-Affinitätspräzipitation von Fc-Fusionsproteinen:

Protein-A/G Sepharose Kügelchen      (Santa Cruz, Nr.: sc-2003)

Bindungsassay mit <sup>125</sup>Iod markierten Liganden:

<sup>125</sup>Iod markierte Proteine      (Biotrend)

γ-Strahlen Detektor      (γ-Master, LKB Wallac)

NaOH      (Merck, Nr.: 1.09137.1000)

## II.3M. Materialien & Geräte zu zellbiologischen Methoden

### Zellkultur:

D-MEM	(Gibco, Nr.: 41965-039)
FCS	(PAN, Nr.: 3302P251110; Lot. P251110)
Glutamin	(Gibco, Nr.: 25030)
PenStrep	(Gibco, Nr.: 15070-063)
Zellkulturgefäße	(Schalen, Platten und Flaschen: Nalge Nunc international, nunc™)
Trypsin	(1-fach, Gibco, Nr.: 25200)
PBS	(Gibco, Nr.: 14190)

### Transfektion von HEK293T-, CX1- und AGS-Zellen:

Fugene	(Roche, Nr.: 11 814 443 001)
Lipofectamin™2000	(Invitrogen, Nr.:111668-027)
Polyfect	(Qiagen, Nr.: 301105)
Optimem	(Invitrogen, Nr.: 31985)

### Protein Expression in *E.coli*:

IPTG	(Sigma-Aldrich, Nr.: I1284)
Ultraschallsonde	(Bandelin Sonopuls, UW2070)

### „Reportergenassay“:

Plasmide	Stratagene PathDetect <sup>R</sup> in vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems;
	Egr-1 <i>cis</i> -Reporting System (Nr.: 240129),
	CRE <i>cis</i> -Reporting System (Nr.: 210975),
	SRE <i>cis</i> -Reporting System (Nr.: 219079),
	GAS <i>cis</i> -Reporting System (Nr.: 219093),
	TARE <i>cis</i> -Reporting System (Nr.: 219095)
	β-Galaktosidase-Plasmid (pCMVβ, Clontech)



## II. Methoden

### II.1. Molekularbiologische Methoden

#### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte durch Polymerasekettenreaktion ausgehend von Plasmid-DNA oder cDNA als Vorlage. Die zu amplifizierende DNA wurde in der Konzentration von 5-50 ng/µl bei Plasmid-DNA oder cDNA eingesetzt. Im Falle der Kolonie-PCR wurde mit einer Zahnstocherspitze abgenommene *E.coli*-Kolonie kurz in den Reaktionsansatz eingetaucht und anschließend in die zu beimpfende LB-Flüssigkultur abgeworfen wurde. Es wurde 1 µl [Stammlösung 10 µM] des jeweiligen sequenzspezifischen Oligonukleotids als Primerelement der Polymerasereaktion eingesetzt, die jeweils verwendeten Primer sind im Ergebnis- bzw. Materialteil angegeben. Darüber hinaus wurde dem Reaktionsansatz 1 µl [10 mM] eines homogenen Nukleotidgemisches, bestehend aus gleichen Teilen Adenosintriphosphat (ATP), Guanosintriphosphat (GTP), Cytidintriphosphat (CTP) und Thymidintriphosphat (TTP), zugegeben und 5 µl eines 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers entsprechend der verwendeten Polymerase. Pro Ansatz wurden des Weiteren 1 µl Polymerase zugegeben. Reaktionsansätze wurden auf ein Volumen von 50 µl eingestellt und wurden in 200 µl Gefäßen angesetzt.

Die Reaktion wurde in einem Thermozyklusheizblock durchgeführt, dabei wurden pro Zyklus drei Temperaturstufen eingestellt, wobei zu erst die Denaturierung der DNA-Doppelstrangstruktur bei 94 °C für eine Minute, nachfolgend das Anlagern der Primer-DNA bei 55 °C für eine Minute und abschließend die Elongation der Primer-DNA durch die Polymerase bei 72 °C für Taq- und Pwo-Polymerase erfolgte. Hierbei wurden als Zeitfenster bei Taq-Polymerase 1 Minute pro 1000 zu prozessierender Basenpaare und bei Pwo-Polymerase 2,5 Minuten pro 1000 zu prozessierender Basenpaare eingestellt. Insgesamt wurden 35 solcher Zyklen wiederholt, denen initial eine Denaturierungsphase von 2 Minuten bei 94 °C vorgeschaltet und abschließend 10 Minuten bei 72 °C nachgeschaltet wurden. Zum qualitativen Nachweis von Transkripten aus cDNA bzw. zur Kolonie-PCR wurde Taq-Polymerase verwendet, bei Amplifikationen von DNA-Fragmenten zur nachfolgenden Ligation in

Expressionsvektoren wurde Pwo-Polymerase verwendet, die sich durch eine geringere Prozessivität, aber ebenso eine geringere Fehlerrate verglichen zur Taq-Polymerase auszeichnet. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

### Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in einem ~1 % Agarosegel elektrophoretisch bei einer Spannung von 100 bis 120 Volt in TAE-Puffer getrennt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die zu separierenden DNA-Fragmente hinreichend als einzelne Banden in einem UV-Detektor erkannt wurden. DNA-Fragmente, die zu Ligationsreaktionen eingesetzt werden sollten, wurden auf einem UV-Leuchttisch detektiert und entsprechende Gelstücke mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in 1,5 oder 2 ml Gefäße überführt und darin enthaltene DNA-Fragmente entweder sofort aus dem Gel eluiert oder diese bei 4 °C für maximal 18 Stunden gelagert.

Agarosegele wurden unmittelbar vor Verwenden gegossen, hierzu wurden 0,5 g Agarose in 55 ml TAE-Puffer gekocht, bis eine klare homogene Flüssigkeit ohne Schlieren entstanden war, der Lösung wurden 1 µl einer Ethidiumbromidlösung [Stammlösung: 1% v/v] zugegeben und die Gellösung blasenfrei in eine Elektrophoreseapparatur gefüllt. Im noch flüssigen Aggregatzustand der Gellösung wurde ein Probenkamm in die Apparatur eingesetzt.

Zu separierende DNA-Lösungen wurden 6:1 [v/v] mit Ladepuffer versetzt und sobald die Agaroselösung ausgehärtet war in die nach Entfernen des Probenkamms vorhandenen Taschen geladen und die Elektrophorese gestartet .

## Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Um Plasmid-DNA zu linearisieren und DNA-Fragmente mit definierten 5' und 3' Überhangsequenzen zu erhalten, wurden diese durch Restriktionsendonucleasen bei 37 °C hydrolysiert. Für präparative Hydrolysen wurden hierzu 2 bis 3 µg Plasmid-DNA oder 5 µl aus PCR-Amplifikation gewonnene DNA eingesetzt. Dem Ansatz wurden jeweils 1,5 µl der angegebenen Restriktionsenzyme und 2 µl der dem Enzym spezifischen Pufferlösung [10-fach konzentriert] zugegeben. Der Ansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt. Die hydrolytische Reaktion lief bei 37 °C für 18 Stunden ab.

Zu analytischen Hydrolysen wurden 0,3 bis 0,5 µg DNA eingesetzt und ein Ansatz von 10 µl Gesamtvolumen erstellt. Dem Ansatz wurden 0,75 µl des jeweiligen Restriktionsenzym und 1 µl des spezifischen Reaktionspuffers [10-fach konzentriert] zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 bis 2 Stunden. Die Wahl der Restriktionsendonucleasen richtete sich nach den zu erhaltenden Hydrolyseprodukten, verwendete Restriktionsendonucleasen zu den jeweiligen Reaktionen sind im Ergebnis- und Materialteil angegeben.

Reaktionsprodukte der Reaktion wurden durch Agarosegelelektrophorese separiert und detektiert.

## DNA-Elution aus Agarosegelen

Die Elution, der DNA-Fragmenten in den durch ein Skalpell ausgestochenen Agarosegelstücken, erfolgte unter Anwendung eines kommerziellen Kits (Jetquick, Genomed) nach Anweisung des Herstellers. Erhaltene Ausbeuten wurden durch Absorptionmessung der optischen Dichte bei 260 nm mit einem Absorptionsspektrometer (NanoDrop<sup>R</sup>) quantifiziert. Die so gewonnene DNA-Lösung wurde unmittelbar im Anschluss für nachfolgende Ligationsreaktionsansätze verwendet.



## Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-DNA

Zu inserierende DNA-Fragmente wurden zur Ziel-Plasmid-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt (Berechnung nach Formel II.1.F). Die eingesetzte Plasmid-DNA Menge betrug hierbei mindestens 20 ng und maximal 80 ng. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde auf 12 µl eingestellt. Es wurden 1 µl T4-Ligase und 1,2 µl Reaktionspuffer [10-fach konzentriert] zugegeben. Die Ligrationsreaktion erfolgte bei 4 °C für 18 Stunden. Nachfolgend wurden die Reaktionsprodukte durch Transformation in *E.coli* eingebracht und durch Klonierung amplifiziert, hierzu wurde der Ansatz vollständig zur Transformationsreaktion eingesetzt.

$$x \text{ ng Insert (vorhandene Menge)} = \frac{\text{Länge Insert (bp)} \cdot x \text{ ng Vektor (vorhandene Menge)}}{\text{Länge Vektor (bp)}}$$

Formel II.1.F.: Zur Berechnung des molaren Verhältnisses von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA

## Transformation von *E.coli* mit nachfolgender Klonierung

Plasmid-DNA wurde durch Transformation in *E.coli* eingebracht und anschließend durch Klonierung amplifiziert. Zur Transformation wurde je ein Anteil der *E.coli* Stammkultur (50 µl) pro Transformationsansatz auf Eis aufgetaut. Der Bakteriensuspension wurden 0,5 bis 6 µl Plasmidlösung oder 12 µl der Ligrationsreaktion zugegeben, so dass die Plasmid-DNA Gesamtmenge zwischen 20 bis 200 ng eingestellt war. Der Ansatz wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert, es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Thermoblock für 1 Minute, unmittelbar danach wurde der Transformationsansatz wieder auf Eis gestellt und für weitere fünf Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl S.O.C. Medium zugegeben und die Ansätze bei 37 °C unter horizontalem Schütteln bei 300 rpm im Thermoblock für 45 Minuten inkubiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Ansätze vollständig auf LB-Agarplatten mit Selektionsfaktoren ausplattiert. Positiv transformierte *E.coli* enthielten je nach eingebrachter Plasmid-DNA Ampicillin- oder Kanamycin-resistenzgene und wurden durch die Wahl von LB-Agarplatten mit Ampicillin [100 µg/l] oder Kanamycin [50 µg/l] selektioniert.

Die Kultivierung auf LB-Agarplatten erfolgte bei 37 °C für 16 Stunden im Thermoschrank. Zur Klonierung wurden vereinzelt gewachsene Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte abgenommen und nach Ansetzen einer Kolonie-PCR nachfolgend in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsfaktor für weitere 16 Stunden bei 37 °C unter horizontalem Schütteln [350 rpm] inkubiert. Nachfolgend wurde die in *E.coli* enthaltene Plasmid-DNA durch Minipräparation mit einem Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert, je 500 µl des Kulturansatzes wurden zuvor für Glycerindauerkulturen abgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Hydrolyse mittels Restriktionendonucleasen oder durch PCR auf ihre Identität hin analysiert. Glycerindauerkulturen von auf diese Weise positiv getesteten Klonen wurden bei –80 °C gelagert. Glycerindauerkulturen wurden 1:1 [v/v] aus abgenommener *E.coli*-Suspension und Glycerin [66 % v/v] erstellt.

### Klonierung mit gateway<sup>R</sup> System

Insertionen von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA, die mit dem gateway<sup>R</sup> System durchgeführt wurden, verliefen nach Anweisung des Herstellers, nachfolgende Klonierungen entsprachen dabei dem obigen Schema.

### Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Maxikulturen

Zur Maxipräparation von Plasmiden wurde mit einem sterilen Zahnstocher einmal in die Glycerindauerkultur des entsprechenden plasmidtragenden positiven Klons eingestochen und dieser in 1 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsfaktor abgeworfen. Diese Vorkultur wurde zwischen 3 und 5 Stunden bei 37 °C unter horizontalem Schütteln (300 rpm) im Thermoschüttelinkubator inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz in 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsfaktor gegeben und dieser Ansatz für 16 Stunden bei 37 °C unter horizontalem Schütteln [300 rpm] im Thermoschüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Plasmid Maxipräparation mit einem Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

## Isolierung von RNA aus Zellkultur und nachfolgender cDNA Synthese

Zellen wurden unter den jeweils beschriebenen Bedingungen in 6-Loch- oder 10 cm Durchmesser Zellkulturschalen kultiviert und die RNA Isolierung erfolgte unter Verwendung eines Kits nach Anweisung des Herstellers. Die Ausbeute der isolierten RNA wurde durch Konzentrationsbestimmung ermittelt. Die nachfolgende cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung eines cDNA-Synthese Kits gemäß Anweisung des Herstellers. Synthetisierte cDNA wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## II.2. Biochemische Methoden

### Lyse von Zellen aus Zellkultur zur Proteinisolierung

Zur Isolierung von Protein aus Zelllinien wurde nach erfolgter Inkubationsphase das jeweilige Kulturmedium abgenommen und die Zellen in einem dem Kulturmedium entsprechend gleichen Volumen PBS gewaschen. Nach vollständigem Abnehmen der PBS-Waschlösung wurden die Zellen in spezifisch eingestellter Menge Lysepuffer auf Eis inkubiert, hierbei wurde für 6-Loch Zellkulturplatten 300 µl und in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser 1 ml Lysepuffer verwendet, das entstehende Lysat wurde mit Zellschabern von der Zellkulturschale gelöst und in 1,5 ml Gefäße überführt. Nachfolgend wurden diese Ansätze durch eine Inkubationsphase von 30 Minuten bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die Lysate bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert um solubilisiertes Zelllysate von Zelltrümmern zu trennen. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt.

Ab dem Zugeben des Lysepuffers zu den Zellen erfolgten alle Schritte stets auf Eis, ebenso wurden die Lysepuffer stets bei 4 °C verwendet. Sowohl der verwendete HGNT-Lysepuffer als auch der RIPA- und Chaps-Lysepuffer wurden unmittelbar vor dem Verwenden mit kommerziellen Proteinase- und Phosphataseinhibitormixturen in einer Konzentration von 1:100 [v/v] versetzt, um Degradation durch Proteinasen zu reduzieren, den Phosphorylierungsstatus der Proteine weitgehend zu erhalten und Phosphatasen zu inhibieren. Wenn erhaltene Lysate nicht direkt im Anschluss zur Westernblotanalyse verwendet wurden, wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

## Proteinseparation durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Westernblotanalyse wurden präparierte Zelllysate direkt eingesetzt oder, wenn diese bei  $-20\text{ °C}$  gelagert waren wurden diese auf Eis aufgetaut. Zur nachfolgenden SDS-PAGE wurden die Lysate 3:1 [v/v] mit Ladepuffer versetzt und 7 Minuten bei  $98\text{ °C}$  denaturiert. Beim Verwenden von Gelen mit 18 Taschen wurden  $30\text{ }\mu\text{l}$  oder  $15\text{ }\mu\text{l}$  beim Verwenden von Gelen mit 26 Taschen pro Spur eingesetzt.

Die Separation erfolgte bei 200 Volt unter Verwendung von MES- oder MOPS-Elektrophoresepuffer und einer Vernetzung des Polyacrylamidgels von 10 % bzw. von Gradienten von 4 % bis 12 %. Der Prozess wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau Lauffront des Ladepuffers aus dem Gel herauszulaufen begann.

## Proteindetektion durch Westernblotanalyse

Hierzu wurden die Gele unmittelbar nach abgeschlossener SDS-PAGE eingesetzt. Den Gelen wurde eine Cellulosemembran aufgelegt und Gel und Membran zwischen zwei Filterpapieren und zwei Schwämmen in ein „Blotting Sandwich“ eingebaut und in die Apparatur eingesetzt. Unter Einsatz eines auf  $-20\text{ °C}$  gekühlten Kühlelements wurde der Blot-Vorgang in Blottingpuffer bei 100 Volt für 45 Minuten durchgeführt. Die Qualität der elektrophoretischen Übertragung der Proteine auf die Cellulosemembran wurde nach dem Vorgang durch reversibles Anfärben der Membran mittels Ponceau-S überprüft und dokumentiert. Die Ponceau-S Färbung wurde durch vorsichtiges Spülen der Membran in vollentsalztem Wasser entfernt. Die Membranen wurden im Anschluss mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert oder über Nacht in Blockierlösung bei  $4\text{ °C}$  gelagert.

Zur Detektion von separierten Proteinen wurden spezifische Antikörper in Blockierlösung angesetzt. Eine Ausnahme hierzu stellt der verwendete anti-Human-Fc-Antikörper mit gekoppelter HRP dar, der direkt in Zweitantikörperlösung angesetzt wurde. Die Inkubation mit Erstantikörperlösung erfolgte unter horizontalem Schwenken bei  $4\text{ °C}$  über Nacht, so dass die Membranen stets vollständig durch die Lösung bedeckt wurden.

Die Erstantikörperlösung wurde nach der Inkubationsphase abgenommen, die Membranen wurden dreimal in einem Überschuss an TBST-Lösung bezogen auf die

Erstantikörperlösung inkubiert (3-fach v/v bezogen auf Erstantikörperlösung). Diese drei Schritte erfolgten für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur bei horizontalem Schwenken. Im Anschluss wurden die Membranen mit Zweitantikörperlösung inkubiert. Als Zweitantikörper wurden HRP-gekoppelte Antikörper verwendet, die gegen die Immunglobulindomänen der Antikörper aus der Erstantikörperlösung gerichtet waren.

Die Zweitantikörperlösung bestand aus TBS mit 5 % Milchpulver [w/v] bei anti-Maus- oder anti-Kaninchen-Zweitantikörper. Im Falle von Streptavidin-HRP als Nachweisreagenz wurde Blockierlösung verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur unter horizontalem Schwenken. Im Anschluss wurden erneut drei Waschschriffe in TBST-Lösung wie oben beschrieben durchgeführt, gefolgt von zwei Waschschriffen in TBS-Lösung von jeweils 5 Minuten. Zur Detektion der immunologisch spezifisch markierten Proteine wurden die Membranen aus der TBS-Lösung auf Folien gelegt und tropfenweise mit HRP-Substratlösung bedeckt, die durch die enzymatische Reaktion zu Chemilumineszenzsignalen führt. Die Signale wurden durch eine Chemilumineszenz Detektionsapparatur erfasst und dokumentiert. Die Quantifizierung der Signale wurde durch die Geräte Software „Quantity One“ durchgeführt.

### Protein-A/G-Sepharose-Affinitätspräzipitation von Fc-Fusionsproteinen und putativen Interaktionspartnern

Sepharosekügelchen mit oberflächengebundenem Protein-A/G wurden zur Affinitätspräzipitation von Hybridproteinen mit fusionierter humaner IgG $\gamma$  Domäne eingesetzt. Fc-Domänen zeichnen sich durch hohe Affinitäten gegenüber Protein-A/G aus. Die Proteine wurden hierbei entweder in definierter Konzentration aus vorhandenen Anteilen mit gereinigtem Protein eingesetzt oder es wurden konditionierte Zellkulturüberstände angefertigt. Die Generierung von gereinigtem Protein ist im Abschnitt der stabilen NS0-Transfektion mit nachfolgender Proteinisolation beschrieben.

Im Falle von konditionierten Zellkulturüberständen wurden HEK293T-Zellen nach dem angegebenen Verfahren transient transfiziert und konditionierte Überstände gesammelt.

Putative Interaktionspartner wurden in solubilisierter Form aus Zelllysaten durch Verwenden von Chaps-Lysepuffer erstellt und eingesetzt. Als Grundlagen dienten hierbei kultivierte Tumorzelllinien oder HEK293T Zellen nach transienter Transfektion und Expression von putativen Interaktionspartnern. Die Kultivierung und transiente Transfektion erfolgte dabei wie im Abschnitt Methoden der Zellkultur beschrieben.

Zur Präzipitation von putativen Interaktionspartnern mit definiert eingesetzten Mengen an Fusionsprotein wurden je Ansatz 1 ml Zelllysate, gewonnen aus einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser, in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Diesem Ansatz wurden 30 µl Protein-A/G-Sepharosekügelchen zugegeben und 5 µl der Fc-Fusionsproteinlösung [1 µg/µl] oder der entsprechenden Kontrollen. Zur Kontrolle wurde hierzu Fc alleine oder Pufferlösung ohne enthaltenes Protein verwendet.

Der Ansatz wurde 3 Stunden bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Nachfolgend wurden die Protein-A/G-Sepharosekügelchen durch Zentrifugation für 1 Minute bei 14.000 rpm und 4 °C mit daran gebundenem Protein sedimentiert und der verbleibende Überstand vorsichtig entfernt. Es wurden 1000 µl kalter Chaps-Lysepuffer zugegeben und die sedimentierten Sepharosekügelchen mit der Lösung gemischt, um unspezifisch gebundene Proteine zu dissoziieren. Direkt daran anschließend wurde erneut unter vormaligen Bedingungen zentrifugiert und der genannte Vorgang zwei Mal wiederholt. Nach Abnehmen des letzten Zentrifugationsüberstandes wurden durch Verwenden einer fein ausgezogenen Pipettenspitze verbleibende Reste an Lysepuffer zwischen den Protein-A/G-Sepharosekügelchen entfernt. Anschließend wurden die Protein-A/G-Sepharosekügelchen in 35 µl Chaps-Lysepuffer / SDS-PAGE Ladebuffer (1/1 v/v) aufgenommen und der Ansatz für 7 Minuten bei 98 °C denaturiert und somit zur Westernblotanalyse vorbereitet.

Bei Verwenden von konditionierten Überständen mit Fusionsprotein wurden 1,5 ml konditionierter Zellkulturüberstand in ein 1,5 ml Gefäß überführt und 30 µl Protein-A/G-Sepharosekügelchen wurden zugegeben. Der Ansatz wurde für 1,5 Stunden über Kopf rotierend bei 4 °C inkubiert, nachfolgend wurden die Protein-A/G-Sepharosekügelchen durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C mit daran gebundenem Protein sedimentiert. Der verbleibende Überstand, bestehend aus Zellkulturmedium, wurde vorsichtig abgenommen. Es wurden dann je Ansatz 1 ml

Zelllysat zugegeben und die sedimentierten Protein-A/G-Sepharosekügelchen wurden mit dem Lysat vermischt. Die Zelllysate wurden von den genannten kultivierten Zellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser durch Verwenden von Chaps Lysepuffer erstellt.

Es folgte eine weitere Inkubation über Kopf rotierend bei 4 °C für 2,5 Stunden, daran anschließend wurden die drei Waschschrte in Chaps Lysepuffer entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise mit definiert eingesetztem Fusionsprotein (s.o.) durchgeführt. Nachfolgend wurde gleichermaßen verbleibender Lysepuffer entfernt und die Proben nach selbem Schema zur Westernblotanalyse vorbereitet.

### Bindungsstudien mit <sup>125</sup>Iod-markierten Liganden

Zu Bindungsexperimenten wurden die Zellen jeweils in 6 Kavitäten der äußersten Reihe einer 24-Loch Zellkulturschale ausgesät und 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zelldichte wurde hierbei so gewählt, dass die Zellen nach 24 Stunden der Inkubationsphase zu 80 % konfluent waren. Im Anschluss wurde das Medium vollständig abgenommen, es folgte ein Waschschrte in 1 ml PBS je Kavität und nachfolgend eine Inkubationsphase von 2 Stunden mit 1 ml je Kavität in Kulturmedium ohne FCS. Darauf folgend wurden den Zellen das FCS-freie Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen wurden dreimal in eiskaltem Kulturmedium ohne FCS in je 1 ml pro Kavität gewaschen. Hierzu wurden die 24-Lochschalen auf Eis inkubiert. Nach vollständigem Abnehmen der Waschlösung wurde je Kavität 250 µl FCS-freies Kulturmedium (4 °C) mit entsprechend eingesetzten putativen Liganden zugegeben. Die jeweiligen Ansätze mit Liganden bzw. Fusionsproteinen sind im Teil Ergebnisse aufgeführt. Die putativen Liganden wurden mit <sup>125</sup>Iod markiert. Von jedem putativem Ligandenansatz wurden je 3 nebeneinander liegende Kavitäten mit der angesetzten Lösung beladen. Die 24-Lochplatten wurden nachfolgend bei 4 °C bei horizontaler Rotation (10-20 rpm) für 4 h inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen auf Eis inkubiert und die Überstände schnell (~ 1 Sekunde pro Kavität) durch Absaugen abgenommen. Es folgten 3 Waschschrte, hierbei wurden je Kavität und Waschschrte 250 µl eiskaltes Kulturmedium ohne FCS am Rand zugegeben und sofort wieder durch Absaugen vollständig abgenommen, so dass die Verweildauer von Waschmedium pro Kavität ~



2 Sekunden war. Nach vollständigem Abnehmen der Waschlösung nach dem dritten Schritt wurde den Zellen 250  $\mu$ l 1 M NaOH zugegeben und die 24-Lochplatte 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die entstandenen Zelllysate vollständig in Gefäße des  $\gamma$ -Zählers überführt und verbliebene Reste der Lyse wurden durch einen weiteren Waschschrift in 250  $\mu$ l Kulturmedium ohne FCS gesammelt und gleichfalls in das Gefäß des jeweiligen Zelllysats überführt. Nachfolgend wurde der Anteil an  $^{125}$ Iod-Fusionsproteinen quantifiziert.

## II.3. Methoden der Zellkultur

### Kultivierung von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Inkubation erfolgte in D-MEM Zellkulturmedium unter Zugabe von 10 % (v/v) FCS und Penicillin/Streptomycin [5000 U/ml bzw. 5 mg/ml], abweichend hierzu wurde bei ASPC1-Zellen 20 % FCS und bei NS0-Zellen zusätzlich zu 10 % (v/v) FCS und Penicillin/Streptomycin [ 5000 U/ml bzw. 5 mg/ml] noch 5 ml L-Glutamin [200 mM] verwendet. Die Kultivierung von NS0-Zellen erfolgte bei 7 % CO<sub>2</sub>. Grundsätzlich wurden für Zellkulturflaschen (Oberfläche: 75 cm<sup>2</sup>) 15 ml Zellkulturmedium verwendet, Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm wurden mit 6 ml Zellkulturmedium befüllt, 6-Lochplatten erhielten je Kavität 2 ml Medium und 24-Kavitätenplatten je Reservoir 0,5 ml Zellkulturmedium.

Die Zellen wurden passagiert sobald eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht war. Hierzu wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen und ein Waschschrift in PBS in einem Volumen entsprechend des Kulturmediums durchgeführt. Nach vollständigem Abnehmen des PBS wurde tropfenweise Trypsin hinzugegeben, so dass die Zellen leicht bedeckt waren. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis die Zellen durch leichtes Klopfen vollständig vom Zellkulturschalenboden gelöst werden konnten, was durch lichtmikroskopische Kontrolle überprüft wurde. Die entstehende Zellsuspension wurde zügig in Zellkulturmedium aufgenommen und nach entsprechend einzustellenden Verdünnungsfaktoren je ein Anteil dieser Suspension auf die neuen Zellkulturschalen verteilt und mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Zur Kalkulierung des Verdünnungsfaktors zwischen verschiedenen Zellkulturgefäßen wurde die nachfolgend aufgeführte Tabelle herangezogen (Tabelle II.3.T)

Tabelle II.3.T.:

Gefäß	Oberflächengröße [mm <sup>2</sup> ]	Verdünnungsfaktor bezogen auf Zellkulturflasche
6-Loch Zellkulturschale	903	8
12-Loch Zellkulturschale	366	20
24-Loch Zellkulturschale	191	40
6 cm Durchmesser Zellkulturschale	2210	3
10 cm Zellkulturschale	6010	1,5
Zellkulturflasche	7500	1

### Transiente Transfektion von HEK293T Zellen

Zur Transfektion wurden 300 µl D-MEM ohne Zusätze in einem 1,5 ml Gefäß vorgelegt und direkt hier hinein 18 µl Fugene<sup>R</sup> Transfektionsreagenz zugegeben.

Der Ansatz wurde in 5 Hüben von je 2 Sekunden durch Schütteln auf einem „Vortexer“ bei mittlerer Drehzahl (~ 600 rpm) gemischt. Es folgte eine Inkubationsphase für 3 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden insgesamt 6 µg Plasmid-DNA zugegeben und durch 5 Hübe von je 2 Sekunden bei mittlerer Drehzahl kurz gemischt. Die Plasmidlösung wurde hierzu in einer Konzentration von 0,5 bis 2,5 µg/µl eingestellt. Nach Zugabe der Plasmidlösung und Mischen des Ansatzes folgte eine Inkubationsphase von 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Während dessen wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt, es wurden 6 ml frisches Vollmedium zugegeben. Nach der Inkubationsphase wurde die Transfektionslösung tropfenweise in die Zellkulturschale gegeben und im Anschluss durch sanftes Schwenken homogenisiert.

Transfizierte Zellen wurden bis zur Lyse bzw. bis zum Abnehmen der konditionierten Zellkulturüberstände 48 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert oder es folgte 18 Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel in D-MEM ohne FCS und eine zweite Inkubationsphase von 48 Stunden zur Anreicherung von Protein in konditioniertem Medium.

## Transiente Transfektion von AGS- und CX1-Zellen

Zur Transfektion von CX1- und AGS- Zellen wurde Polyfect<sup>R</sup>-Transfektionsreagenz verwendet. Für einen Ansatz zur Transfektion einer 6 cm Durchmesser Zellkulturschale wurden insgesamt 4 µg Plasmid-DNA (Konzentration der Plasmidlösung 0,5 bis 2,5 µg/µl) in ein 1,5 ml Gefäß vorgelegt und mit Optimem<sup>R</sup> Transfektionspuffer auf 100 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde kurz durchgemischt und anschließend wurden jeweils 20 µl Polyfect<sup>R</sup> zugegeben. Die Lösung wurde erneut für 10 Sekunden gemischt und nachfolgend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dessen wurde bei den zu transfizierenden Zellen ein Mediumwechsel vollzogen, so dass eine 6 cm Durchmesser Zellkulturschale mit 1,5 ml Medium bedeckt wurde. Anschließend an die 10-minütige Inkubationsphase wurden dem Transfektionsansatz 500 µl des verwendeten Zellkulturmediums ohne FCS zugegeben, dieser Ansatz wurde zweimal auf- und abpipettiert und unmittelbar danach auf die zu transfizierenden Zellen getropft. Nachfolgend wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Wurden von den 6 cm Durchmesser Zellkulturschalen abweichende Gefäße verwendet, richtete sich der verwendete Verdünnungsfaktor nach Tabelle II.3.T.

## Stabile Transfektion von NS0-Zellen und Klonierung

Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen aus der Zellkultur zur Transfektion abgenommen und bei 900 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert und in 10 ml PBS resuspendiert, anschließend wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation bei 900 rpm für 5 Minuten sedimentiert, in 0,5 ml PBS vollständig resuspendiert und in Elektroporationsküvetten überführt.

Der Zellsuspension wurden 40 µl Plasmidlösung [0,5 µg/µl] zugegeben, die zuvor durch Restriktionsendonucleasen linearisiert wurde. Im Falle der verwendeten pdCs-Fc-X-Vektoren durch *Fsp I* und bei plgplus-Fc-Vektorsystemen durch *Pvu I*. Der Ansatz wurde in der Küvette durch Antippen gemischt und nachfolgend 5 bis 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Elektroporation bei 250 Volt und einer Pulslänge von 15 Millisekunden bei einem einmaligen Impuls. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde die Küvette erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Darauf folgend wurde die Zellsuspension vollständig aus der Küvette in 20 ml NS0-Zellkulturmedium ohne Selektionssubstanzen überführt und durch sanftes Invertieren des Gefäßes die Lösung homogenisiert. Mittels einer Mehrkanalpipette wurden je 100 µl der Lösung in eine Kavität einer 96-Lochplatte überführt. Es folgte die Kultivierung der transfizierten Zellen unter Standardbedingungen für 48 Stunden. Nach dieser Inkubationsphase wurden je Kavität 100 µl Zellkulturmedium mit Selektionssubstanzen [1 mM MTX, 2 mg/ml G418] zugegeben, es folgte eine weitere Inkubationsphase unter Standardbedingungen für 48 Stunden. Danach wurden je 100 µl Überstand der Kavitäten abgenommen und nachfolgend erneut auf eine mit 100 µl Selektionsmedium befüllte 96-Lochplatte ausgesät. Diese Passagierung erfolgte dreimal, so dass angenommen wurde, verbleibende vitale Zellen besitzen in ihr Genom stabil integrierte Plasmid-DNA. Die Auswahl von positiven Klonen erfolgte zunächst optisch durch mikroskopische Beobachtung sowie durch Abnahme von Zellkulturüberständen und deren Kontrolle auf exprimiertes und sekretiertes Protein mittels eines ELISA. Klone mit stabiler Expression wurden in Glycerindauerkulturen in flüssigem Stickstoff eingelagert.

### IPTG induzierte Expression von plasmidcodierten Proteinen in *E.coli*

Zur Expression wurden transformierte *E.coli*-Klone des Stamms BL21 verwendet. Aus Glycerindauerkulturen wurde je Klon eine Vorkultur von 10 ml LB-Medium mit entsprechend enthaltener Selektionssubstanz (hier: Ampicillin) beimpft. Hierzu wurde eine sterile Pipettenspitze kurz in die Glycerindauerkultur getaucht und im Anschluss in die Vorkulturlösung abgeworfen. Es folgte eine Vorkultivierung der Ansätze für 25 Minuten bei 37 °C. Alle Inkubationsphasen, auch nachfolgende, fanden unter horizontalem Schwenken bei 300 rpm statt. Nach der Vorkultivierung wurde 1 ml der entstandenen Suspension in 50 ml LB-Medium mit enthaltener Selektionssubstanz gegeben und die optische Dichte des Ansatzes durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Photospektrometers quantifiziert. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde reines LB-Medium verwendet. Idealerweise sollte die ermittelte optische Dichte der Suspensionen zu diesem Zeitpunkt unter 0,1 liegen. An diese Verdünnung anschließend folgte eine Inkubationsphase bei 37 °C für weitere 90 Minuten. Nachfolgend wurde erneut die optische Dichte, wie oben

beschrieben, gemessen. Wurde zu diesem Zeitpunkt bei der optischen Dichte Werte von 0,8 bis 0,95 erreicht, erfolgte die Induktion der Expression der plasmidcodierten Proteine durch Zugabe von IPTG. Anderenfalls wurde die Inkubation fortgesetzt, bis eine optische Dichte von 0,8 bis 0,95 erreicht worden war. Entsprechend des Kulturvolumens wurde die zugegebene Menge IPTG angepasst, so dass eine Endkonzentration von 0,1 mM erhalten wurde. Die verwendete Stammlösung war auf eine Konzentration von 1 M eingestellt.

Der IPTG vermittelten Expressionsinduktion folgte eine weitere Kultivierung bei 37 °C für weitere 3 Stunden, hierbei wurde ein Anteil von 1 ml zum Zeitpunkt der IPTG Induktion und nach 3 Stunden Inkubation abgenommen.

Nach abgelaufener Inkubationsphase wurde die *E.coli* Suspension durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C für 10 Minuten sedimentiert. Der verbleibende Überstand an LB-Medium wurde vollständig abgenommen und verworfen, das verbleibende Zellsediment wurde in PBS in einem Volumen dem Kulturvolumen entsprechend erneut aufgenommen, diesem wurden Proteaseinhibitoren [1:100 v/v] zugesetzt. Es wurde durch sanftes Auf- und Abpipettieren eine homogene Suspension erstellt. Daran anschließend wurden die Zellen nach obigen Bedingungen erneut sedimentiert. Der verbleibende Überstand an PBS wurde vollständig abgenommen und das verbliebene Zellsediment vorübergehend bei -20 °C gelagert. Daran anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 5 ml PBS mit enthaltenem Proteaseinhibitor [1:100 v/v] auf Eis aufgetaut und daraus eine homogene Suspension durch vorsichtiges Pipettieren erstellt. Hiervon wurde ein weiterer Anteil von 100 µl abgenommen. Die verbleibende Suspension wurde für den Zellaufschluss eingesetzt. Dies erfolgte durch Beschallung unter Verwendung einer Ultraschallsonde. Dabei wurde die Ultraschallsonde in die Suspension eingetaucht und 4 Impulse von je 20 Sekunden Länge und einem Intervall von 20 Sekunden gegeben. Die Zellsuspension war während dessen in einem Eisbad platziert. Nachfolgend wurde dem Homogenisat 50 µl Triton X-100 zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 % [v/v] eingestellt war. Anschließend wurden die Lysate auf Eis unter sanftem Schwenken für 1 Stunde inkubiert.

Nachfolgend wurden die Lysate bei 14.000 rpm für 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und nicht solubilisierbare Lysatfraktionen wurden sedimentiert. Der erhaltene Überstand wurde aufgeteilt und bei -20 °C gelagert, das entstandene Pellet wurde in 3 ml PBS resuspendiert und ebenfalls bei -20 °C gelagert und in nachfolgenden Analysen

eingesetzt. Der zu beschriebenen SDS-PAGE-Analysen verwendete Anteil hieraus wurde 2:1 mit Ladepuffer versetzt.

Die abgenommenen Anteile zum Zeitpunkt vor der IPTG Stimulation bzw. nach 3 Stunden Expression sowie das abgenommene Aliquot unmittelbar vor dem Zellaufschluss mit Ultraschall wurden ebenso 2:1 mit SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und zur SDS-Gelelektrophorese vorbereitet.

### „Reportergenassay“

Reportergenanalysen dienen der Quantifizierung der Aktivität von Promotorelementen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Transkriptmenge nachgeschalteter Gene und kann Hinweise auf einen physiologischen Zustand der Zelle liefern, den diese unter bestimmten Voraussetzungen annimmt. Zellen wurden hierzu in 24-Loch Zellkulturschalen ausgesät und 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Dabei wurden die Transfektionsansätze im Falle einer Cotransfektion von pcDNA3-Reg4 bzw. der Negativkontrolle pcDNA3-Vektor sowie bei den entsprechend angegebenen Plasmiden, die als positive Kontrolle cotransfiziert wurden, mit einer DNA-Gesamtkonzentration von 0,8 µg DNA pro Ansatz angesetzt. Dieser einfache Ansatz entsprach dabei einer Transfektionslösung zu einer Kavität der 24-Loch Platte. Darin enthalten waren 0,35 µg (45 %) entsprechendes Reportergenplasmid, 0,35 µg (45 %) Cotransfektionsplasmid und 0,1 µg (10 %) β-Galaktosidase codierendes Plasmid.

Ausgehend von diesem einfachen Ansatz wurde die Menge multipliziert und mehrfach Ansätze erstellt. Zuvor wurden gemischte Plasmidlösungen zu entsprechenden Anteilen der genannten Plasmide erstellt. Diese dienten als Plasmidstammlösung zur Transfektion.

Die Durchführung der Transfektion erfolgte dabei wie im Abschnitt transiente Transfektion von CX1 und AGS beschrieben. Nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden unter den nach Transfektionsprotokoll standardisierten Bedingungen kultiviert. Im Anschluss daran wurde das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen wurden in dem Medium entsprechend doppeltem Volumen PBS gewaschen. Unmittelbar danach wurden die Zellen in FCS-freiem Medium für weitere 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Nach dieser Inkubationsphase wurde das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und es erfolgte die Lyse der Zellen auf Eis unter Verwendung des Lyse Puffers des verwendeten Luciferase-Quantifizierungs-Kit-Systems. Pro Kavität wurden 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer verwendet und die Zellen durch Abschaben mit einem Zellschaber von der Platte gelöst, davon wurden 40  $\mu\text{l}$  in eine weiße 96-Loch- und 10  $\mu\text{l}$  in eine klare 96-Loch-Platte überführt.

Die Messung der Luciferase- und der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität innerhalb der erstellten Zelllysate wurde durch Verwenden eines Lumineszenz- und Absorptionspektrometers erfasst.

Die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität erfolgte dabei durch Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  Luciferase-Substratlösung des verwendeten Kits zu den vorgelegten 40  $\mu\text{l}$  Zelllysate, die unmittelbar von einer Inkubationsphase von 20 Sekunden gefolgt war. Direkt anschließend folgte die Lumineszenzmessung für 40 Sekunden. Dieses Vorgehen konnte durch eine programmierbare Injektionsvorrichtung und Detektionsapparatur für alle Kavitäten nach gleicher Kinetik bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Zum Ermitteln der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden den 10  $\mu\text{l}$  Zelllysate 50  $\mu\text{l}$  entsprechende Substratlösung des verwendeten Kits zugegeben. Die Enzymreaktion wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend die optische Dichte durch Absorptionsmessung bei 560 nm gemessen.

Zum Vergleich der Luciferase-Aktivitäten wurden die Lumineszenzmesswerte eines Zelllysates durch die quantifizierten  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten dividiert und auf diese Weise auf die gesamte Transfektionseffizienz eines Ansatzes normalisiert.

Zu jeder Bedingung wurden 3-fach Transfektionsansätze erstellt, davon je 3 Kavitäten der 24-Lochplatte transient transfiziert und die daran anschließend beschriebene Prozedur für die Ansätze einzeln durchgeführt. Aus den ermittelten normalisierten Messwerten dieser drei Einzelmessungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Bei Verwenden von Reg4-konditionierten Zellkulturüberständen erfolgte keine Cotransfektion durch pcDNA3-Reg4-Plasmid. Konditionierte Zellkulturüberstände wurden aus transients Transfektion von HEK293T Zellen mit pcDNA3-Reg4 und pcDNA3 Plasmid-DNA gewonnen.

Transfektionsansätze bei nachfolgender Stimulation mit konditionierten Überständen setzten sich dabei wie folgt zusammen: 0,5  $\mu\text{g}$  Reporterplasmid, 0,2  $\mu\text{g}$  pcDNA3 und 0,1  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galaktosidase-codierendes-Plasmid. Kontrollstimulation erfolgte durch



Zugabe der angegebenen Stimuli, die in konditioniertes Medium der pcDNA3-Transfektion zugegeben wurden.

Die Vorgehensweise der Reporteranalyse mit konditionierten Überständen entsprach dabei bis auf die Zusammensetzung des Transfektionsansatzes der vorgegangenen genannten Beschreibung. Eine weitere Abweichung bestand nach dem PBS-Waschschritt 24 Stunden nach der Transfektion darin, dass hier statt FCS-freies Zellkulturmedium die entsprechend konditionierten Zellkulturüberstände verwendet wurden und die mit Reporter-Transfektionsansätzen transfizierten Zellen darin 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

### Mikroarray Analyse durch Affymetrix „DNA whole genome chips“ von stimulierten Zellen

Zellen wurden auf einer 6-Loch Zellkulturplatte 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Nachfolgend wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen in dem Kulturmedium entsprechend gleichen Volumen PBS einmal gewaschen. Nach vollständigem Abnehmen des PBS erfolgte die Zugabe von Zellkulturmedium ohne FCS von 1 ml je Kavität mit zugegebenen Proteinen zur Stimulation. Die Ansätze der Stimulationslösungen sind im Teil Ergebnisse aufgeführt.

Nach Zugabe der Stimulationslösungen erfolgte eine weitere Inkubationsphase von 24 Stunden bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss daran wurde das Kulturmedium abgenommen und es erfolgte die Isolation von Gesamt-RNA. Diese wurde zum Erfassen der Expressionsmengen in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde nach Bestimmen der Konzentration durch photometrische Absorptionsmessung 2 µg RNA pro Ansatz eingesetzt. Es wurde hierbei nach dem beschriebenen Herstellerprotokoll des „One Cycle Target Labeling Assay“ gearbeitet. Dazu wurde die isolierte totale RNA und zu jedem Ansatz eine interne Kontrolle von *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) RNA, die komplementär zu ausgewählten Genen ist (*lys, phe, thr, dap*), eingesetzt. Die Ansätze wurden wie folgt erstellt:

Proben-RNA (maximal 8 µl / 2 µg gesamt), 2 µl *B.subtilis*-RNA, 2 µl T7-Oligo-dT-Nukleotid Primer [50 µM], Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 12 µl mit RNase-freiem Wasser. Der Ansatz wurde gemischt und nachfolgend durch Zentrifugation am

Gefäßboden gesammelt. Im Anschluss wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und danach auf 4 °C für 4 Minuten abgekühlt. Die Ansätze wurden erneut durch Zentrifugieren am Gefäßboden gesammelt.

In einem zweiten Gefäß wurde ein Gesamtreaktionsansatz für alle zu synthetisierenden Proben erstellt. Hierzu wurde je Ansatz 4 µl „first strand Mastermix reaction buffer“ [5-fach konzentriert], 2 µl DTT [0,1 M], 1 µl dNTPs [10 mM] angesetzt. Dieser wurde mit dem RNA / Oligo-dT-Nukleotid Primer-Ansatz vereinigt und bei 42 °C für 2 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden je Ansatz 1 µl Superskript II (reverse Transkriptase) zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und nachfolgend für mindestens 2 Minuten auf 4 °C gekühlt.

Darauf folgend wurde zu jedem Ansatz der Reaktionsansatz zur Zweitstrangsynthesereaktion zugegeben, dieser wurde unmittelbar vor Verwenden wie nachfolgend beschrieben erstellt: 90 µl RNase freies Wasser, 30 µl „second strand Mastermix reaction buffer“, 3 µl dNTPs [10 mM], 1 µl *E.coli* DNA-Ligase, 4 µl *E.coli*-Polymerase I, 1 µl Rnase H. Der Gesamtansatz je Probe von 150 µl wurde gemischt, durch Zentrifugieren am Gefäßboden gesammelt und nachfolgend bei 16 °C für 2 Stunden inkubiert. Daran anschließend wurden je Ansatz 2 µl T4 DNA-Polymerase zugegeben und der Ansatz erneut bei 16 °C für 4 Minuten inkubiert. Abschließend wurden 10 µl 0,5 M EDTA zugegeben. Nachfolgend wurden die Ansätze mit 600 µl „cDNA binding buffer“ des verwendeten Kits versetzt und durch Säulenzentrifugationschromatographie nach Anleitung des Herstellers gereinigt und abschließend in 14 µl eluiert.

Darauf folgend wurde eine Biotinmarkierung der synthetisierten cDNA durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Arbeitsanweisungen von Affymetrix, hierzu wurden 12 µg gesamt cDNA in maximal 6 µl eingesetzt und 4 µl „labeling buffer“ [10-fach konzentriert], 12 µl NTP-Gemisch (Ribonukleotide!) „labeling nucleotides“, 4 µl „labeling-Enzym Mix“ zugegeben und mit RNase freiem Wasser auf 40 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine Reinigung entsprechend der Anweisung des Herstellers durch Verwenden einer Säulenzentrifugationschromatographie. Die danach erhaltene Konzentration an synthetisierter RNA wurde durch Absorptionsmessung quantifiziert.

Die erhaltene komplementäre RNA wurde nachfolgend fragmentiert, hierbei wurden Fragmente von 35 bis 200 Oligonukleotidlänge erstellt. Dazu wurde 20 µg cRNA in

maximal 21 µl mit 9 µl „fragmentation buffer“ versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 40 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 35 Minuten bei 94 °C inkubiert. Diese fragmentierte cRNA wurde nachfolgend zur Hybridisierung eingesetzt, hierzu wurde ein Ansatz von 5 µg cRNA, 1,7 µl eines Kontrolloligonukleotids, 5 µl von eukaryotischen Hybridisierungskontrollen, 1 µl Heringssperma-DNA [10 mg/ml], 1 µl BSA [50 mg/ml], 50 µl Hybridisierungspuffer und 10 µl DMSO eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt.

Der Rahmen mit montierter Mikroarray Oligo-DNA-Sondenmembran wurde unmittelbar vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde der Hybridisierungsansatz für 5 Minuten auf 99 °C erhitzt und mit Hilfe der vorgesehenen Vorrichtung wurden die Mikroarray Membranen gleichmäßig mit Hybridisierungspuffer befeuchtet und nachfolgend unter Rotation 10 Minuten bei 45 °C inkubiert. Der auf 99 °C erhitzte Hybridisierungsansatz wurde an diese Inkubation anschließend gleichfalls bei 45 °C für 5 Minuten inkubiert. Darauf folgend wurde der Hybridisierungsansatz bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert, die auf der Mikroarray Membran geladene Hybridisierungspufferlösung wurde durch das entsprechende Septum entfernt und nachfolgend der zentrifugierte Probenansatz auf die Mikroarray Membran geladen. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte für 16 Stunden bei 45 °C in der dafür vorgesehenen Rotationsapparatur.

Nachfolgend wurde die Hybridisierungslösung vollständig abgenommen und es folgte eine Inkubation in einem wenig stringentem Waschpuffer nach Herstellerangaben. Nachfolgend wurde die Rotations- und Inkubationsapparatur mit der Straptavidin-Phycoerythrin gekoppelten Detektionslösung und den Pufferlösungen zum Spülen der Mikroarray Membran nach Hersteller Angaben beladen und nach entsprechendem Programm des Herstellers inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte durch die dafür vorgesehene Scan-Apparatur bei 570 nm und einer Scan-Pixelgröße von 3 µm. Erhaltene Rohdaten wurden mit Hilfe der Software Expressionist<sup>R</sup> erfasst und weiter verarbeitet oder in enger Kollaboration mit Merck KGaA / BCI durch Protokolle der Programmiersprache „R“ berechnet.

## III. Ergebnisse

### III.1. Generierung und Auswahl der Modellsysteme

#### III.1.1. Klonierung von Reg4 und HIP/PAP sowie von EXT1, EXTL1, EXT2 und EXTL3 zur Expression in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen

Ausgehend von Reg4- und HIP/PAP-codierender TOPO-Blunt-II<sup>R</sup>-Vektor-DNA wurden mittels PCR Reg4- und HIP/PAP-codierende DNA-Fragmente amplifiziert. Durch die verwendeten Oligonukleotide als Primer wurden, flankierend zu der Reg4 bzw. HIP/PAP-codierenden Sequenz, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen eingeführt. Zur Ligation von Reg4- und HIP/PAP-codierenden DNA-Fragmenten in pcDNA3-Vektor-DNA wurden zur PCR 5` Primer mit einer *EcoR I* und 3` Primer mit einer *Not I* -sensitiven Überhangsequenz verwendet. Hierzu wurde bei Reg4 die Kombination „Reg4\_Hum\_277for*EcoR I*“ / „Reg4\_Hum\_738rev*Not I*“ und bei HIP/PAP die Kombination „PAP\_Hum\_76for*EcoR I*“ / „PAP\_Hum\_584rev*Not I*“ verwendet. Primer, die zur Amplifikation von Reg4- oder HIP/PAP-codierender DNA verwendet wurden, die nachfolgend in pdCs-Fc-X-Vektoren inseriert werden sollten, beinhalteten 5` eine *Xma I*- und 3` eine *Hind III* -sensitive Überhangsequenz. Die verwendeten Primer hierbei waren bei Reg4 „Reg4\_Hum\_324for*Xma I*“ / „Reg4\_Hum\_756rev*Hind III*“ und bei HIP/PAP „PAP\_Hum\_130for*Xma I*“ / „PAP\_Hum\_583rev*Hind III*“. Zur Insertion in pIlgplus-Vektoren wurden zur PCR 5` Primer mit *Hind III* und 3` Primer mit *Not I*-sensitiven Überhangsequenzen verwendet. Die Kombination bestand für die Amplifikation von Reg4 DNA-Fragmenten aus dem Primerpaar „Reg4\_Hum\_173for*Hind III*“ / „Reg4\_Hum\_740rev *Not I*“ und bei HIP/PAP aus der Kombination „PAP\_Hum\_61for*Hind III*“ / „PAP\_Hum\_585rev*Not I*“.

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zur nachfolgenden Ligation in pGEX4T2-Vektor-DNA wurden Primer mit Überhangsequenzen sensitiv für die Restriktionsendonucleasen *EcoR I* an der 5` Position und *Not I* an der 3` Position verwendet. Hierzu wurde zur Amplifikation von Reg4 codierender DNA die Primer-

kombination „Reg4\_Hum\_277forEcoR I“ / „Reg4\_Hum\_738revNot I“ und bei HIP/PAP codierender DNA die Primerkombination „PAP\_Hum\_76forEcoR I“ / „PAP\_Hum\_584revNot I“ verwendet. Die verwendeten Primer sind unter Angabe der Sequenz im Materialteil aufgeführt. Die Positionen der Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen wurde hierbei so ausgewählt, dass der Leserahmen zwischen „Fc-Tag“ bei pdCs-Fc-x und plgplus bzw. dem „GST-Tag“ bei pGEX4T2 und codierender Reg4- oder HIP/PAP-DNA identisch ist. Abbildung III.1.1.a. zeigt schematisch die Vektorkonstrukte dieser Ligationsreaktionen.

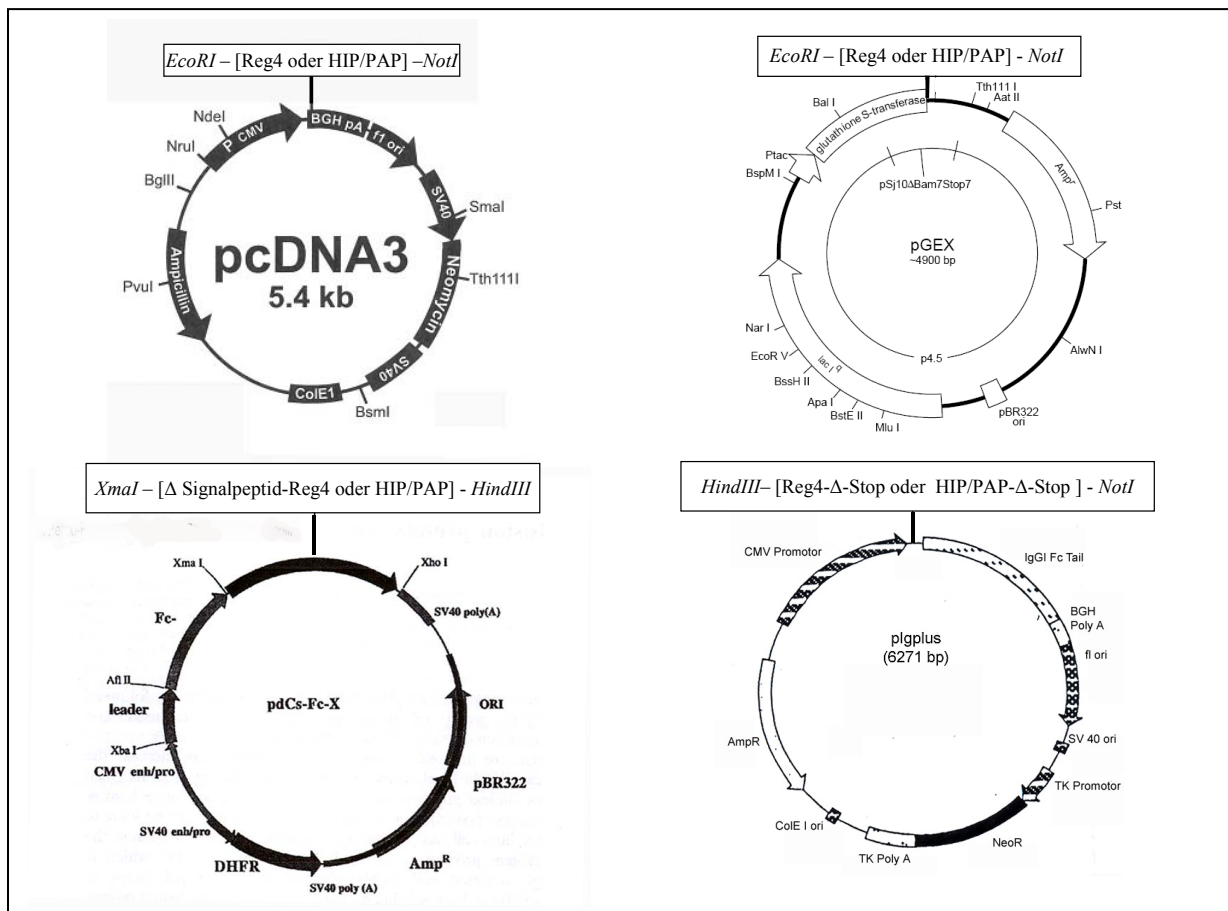


Abbildung III.1.1.a.: von links nach rechts die Schemata der Vektor-DNA Konstrukte mit Reg4 bzw. HIP/PAP Insert: pcDNA3-Reg4 bzw. -HIP/PAP, pdCs-Fc-Reg4 bzw. -HIP/PAP, plgGplus-Reg4 bzw. HIP/PAP sowie pGEX4T2-Reg4 bzw. -HIP/PAP.

Nach Vervielfältigen der Reg4- und HIP/PAP-codierenden DNA-Fragmente durch PCR wurden jeweils 5 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes entnommen und zur Hydrolyse mit den Primersequenzen entsprechenden Restriktionsendonucleasen eingesetzt.

Nach der Restriktionsreaktion wurden enthaltene DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und DNA-Fragmente, die entsprechend ihrer Größe den

jeweiligen Amplifikaten von Reg4 und HIP/PAP zugeordnet werden konnten, wurden aus dem Agarosegel eluiert. Diese wurden unmittelbar zur Ligation in entsprechende Zielvektor-DNA im molaren Verhältnis drei zu eins eingesetzt.

Die zur Ligationsreaktion eingesetzte Zielvektor-DNA wurde zuvor entsprechend der eingesetzten Insert-DNA mit den gleichen Restriktionsendonucleasen hydrolysiert. Für pcDNA3-Vektor-DNA und pGEX4T2-Vektor-DNA wurden *EcoR I* und *Not I* Restriktionsendonucleasen verwendet, pdCs-Fc-X wurde durch *Xma I* und *Hind III* hydrolysiert und plgplus durch *Hind III* und *Not I* hydrolysiert. Diese wurden ebenfalls nach abgelaufener Restriktionsreaktion mittels Agarosegelelektrophorese separiert und DNA-Fragmente, die vollständig hydrolysiertes Vektor-DNA zugeordnet werden konnten, wurden aus dem Agarosegel eluiert.

Die Reaktionsprodukte aus den Ligationsreaktionen wurden nachfolgend in *E.coli* des Stamms Top10<sup>R</sup> transformiert und durch Selektionsklonierung amplifiziert, abweichend hierzu wurden die Reaktionsprodukte der Reg4- und HIP/PAP-pGEX4T2 Ligationsreaktion in *E.coli* des Stammes BL21<sup>R</sup> transformiert, das weitere Vorgehen war für alle *E.coli* Transformationen einheitlich.

Zur Überprüfung von korrekt erfolgter Ligationsreaktion wurden einzelne Kolonien aus entsprechenden Selektionsklonierungen amplifiziert und durch Kolonie-PCR getestet sowie bei positiver Kolonie-PCR enthaltene Plasmid-DNA isoliert. Die erfolgreiche Insertion wurde zusätzlich zur Kolonie-PCR durch Hydrolyse durch Restriktionsendonucleasen und Sequenzanalyse nachgewiesen. Plasmid-DNA von positiv getesteten Klonen wurde isoliert und für nachfolgend beschriebene Experimente bereitgestellt.

EXT1-, EXTL1-, EXT2- und EXTL3-codierende DNA-Fragmente wurden nach dem „Gateway<sup>R</sup>“ System ausgehend von TOPO-Blunt-II<sup>R</sup>-Vektor-DNA codierend für die jeweiligen Mitglieder der EXT-Proteinfamilie in pDEST40<sup>R</sup>-Vektor-DNA inseriert und kloniert. Eine sequenzspezifische Hydrolyse durch Restriktionsendonucleasen mit nachfolgender Ligationsreaktion wurde hierbei nicht durchgeführt, stattdessen wurde die Insertionsreaktion durch Verwenden der „LR-Clonase<sup>R</sup>“ nach dem Mechanismus der  $\lambda$ -Phagen Rekombination durchgeführt. Hierzu wurden die DNA-Fragmente, welche die EXT-Mitglieder codierten zunächst durch PCR amplifiziert und durch

TOPO Klonierung in pENTRY<sup>R</sup>-Vektor-DNA eingebracht. Die für diese Amplifikation verwendeten Primer waren für EXT1 „EXT1\_gateway\_774for“ / „EXT1\_gateway\_2011rev“, für EXTL1 „EXTL1\_gateway\_714for“ / „EXTL1\_gateway\_2741rev“, für EXT2 „EXT2\_variant1gateway\_487for“ / „EXT2\_variant1gateway\_2617rev“ und für EXTL3 „Reg1Rez\_113\_gateway“ / „Reg1Rez\_2870r\_gateway“. Reaktionsprodukte der TOPO-Klonierung wurden mittels

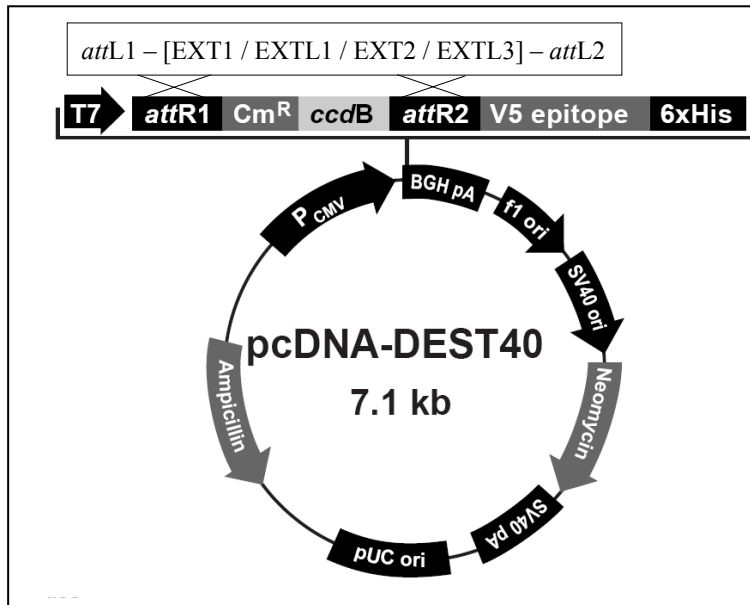


Abbildung III.1.1.b. Schema der Vektorkonstrukte von pDEST40-EXT1-, EXTL1-, EXT2- und EXTL3-V5 Vektor DNA.

Kolonie-PCR überprüft, positive Klone wurden zur DNA Minipräparation herangezogen und isolierte Vektor-DNA zur nachfolgenden Gateway Klonierung eingesetzt. Erneut wurde die erfolgreiche Insertion durch Kolonie-PCR überprüft und von positiven Klonen die korrekte Insertion zusätzlich durch Sequenzanalyse überprüft.

Von auf diese Weise positiv getesteten Klonen wurden gleichfalls die Plasmid-DNA isoliert und von positiven Klonen Glycerindauerkulturen angefertigt. Abbildung III.1.1.b. zeigt schematisch die Vektorkonstrukte.

### III.1.2. Prokaryotische Expression von GST-Reg4 und GST-HIP/PAP

GST-Reg4- und GST-HIP/PAP-Fusionsproteine sollten in *E.coli* exprimiert werden und zur Immunisierung von Kaninchen herangezogen werden, um Antikörper gegen humanes Reg4 und HIP/PAP zu generieren, da bisher keine kommerziellen Antikörper erhältlich waren.

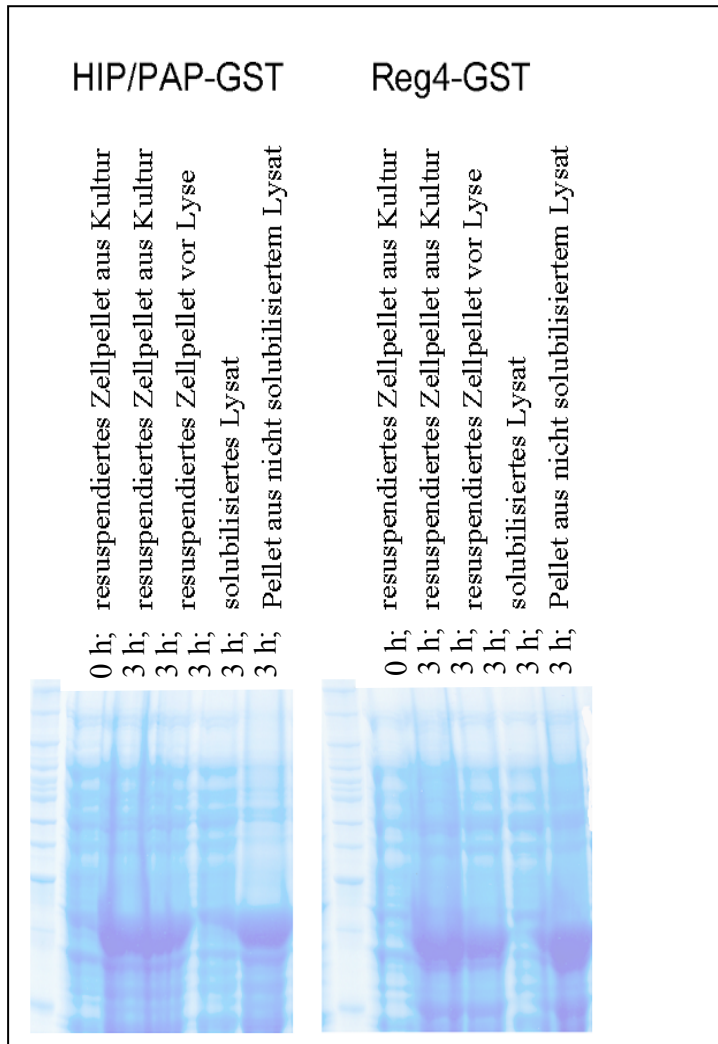


Abbildung III.1.2. SDS-PAGE und Coomassie Färbung der Expressionsprodukte der pGEX4T2-GST HIP/PAP und pGEX4T2-GST-Reg4 transformierten *E.coli* Klone. Elektrophoretisch separiert wurden von links nach rechts je zu HIP/PAP und Reg4 Klone die Proteinfractionen nach Expressionsinduktion durch IPTG (0 Stunden, 3 Stunden sowie die solubilisierter und nicht solubilisierter Protein-fraction nach Lyse.

Positiv selektionierte Klone, die nach Ligation und Klonierung Reg4-pGEX4T2- und HIP/PAP-pGEX4T2-Vektor-DNA beinhalteten, wurden ausgewählt und eine LB-Flüssigkultur angeimpft. Die Expression wurde durch IPTG induziert. Es wurde eine Expressionskultur bei 37 °C wie auch bei 28 °C durchgeführt. Beide Ansätze führten zu einer Proteinfraction, die stark exprimiert wurde und nach Aufschließen der *E.coli* Zellen nicht solubilisierter vorlag.

Das Molekulargewicht dieser Proteinfraction stimmt mit GST-Reg4 bzw. GST-HIP/PAP überein, so dass angenommen wurde, die Expressionsprodukte der GST-Reg4- und GST-HIP/PAP-Vektor-DNA werden

in „inclusion bodies“ innerhalb der Zellen abgelagert. Abbildung III.1.2. zeigt die Auftrennung durch SDS-PAGE von *E.coli* Lysaten zu Beginn der induzierten



Expression zu Beginn der induzierten Expression, sowie eine Fraktion von sedimentierten Zellen aus der Expressionskultur nach 3 Stunden und unmittelbar vor der Lyse. Diese Proben wurden in PBS resuspendiert und unmittelbar mit SDS-Probenpuffer versetzt. Des Weiteren wurden die solubilisierter Proteinfraktion aus den lysierten Zellen und die nicht solubilisierter Proteinfraktion nach der Lyse elektrophoretisch getrennt. Der Hauptanteil an exprimiertem Protein befand sich in der nicht-solubilisierter Fraktion.

Eine Reinigung der GST-Fusionsproteine aus der nicht-solubilisierter Proteinfraktion wurde nicht versucht. Zur Immunisierung von Kaninchen wurde alternativ auf synthetische Peptide zurückgegriffen.

### III.1.3. Expression und Reinigung von biologisch aktiven Proteinen

Bei wesentlichen Vorgängen der Signaltransduktion stellen Proteine und Protein-Protein-Interaktionen die Kernelemente dar. Die beschriebenen Effekte von Reg4 und HIP/PAP lassen in diesem Kontext auf eine Rolle als trophischer Faktor im Kontext von Entzündungsreaktionen schließen. Zum Verständnis der damit verbundenen Signalkaskaden wurden die beschriebenen Expressionssysteme genutzt, um biologisch aktive Proteine zu generieren. Auf diese Weise produziertes Protein konnte für alle nachfolgend beschriebenen Experimente genutzt werden.

#### Transiente Expression von Reg4 und HIP/PAP in HEK293T und Generierung von konditionierten Zellkulturüberständen.

Durch die Transfektion von HEK293T-Zellen mit Reg4-pcDNA3- und HIP/PAP-pcDNA3-Expressionssystemen konnten von diesen Zellen konditionierte Zellkulturüberstände abgenommen werden. Die Expressionssysteme wurden so ausgewählt, dass die transfizierten Zellen die synthetisierten Proteine in das Medium sekretierten.

Die auf diese Weise konditionierten Zellkultur Überstände wurden für nachfolgende Reporteranalysen eingesetzt. Die Expression von Reg4 bzw. HIP/PAP wurde stets durch die generierten Antikörper (siehe hierzu auch III.1.4.) überprüft. Für nachfolgende Reporteranalysen, bei denen Reg4 oder HIP/PAP konditionierte Zellkulturüberstände verwendet wurden, erfolgte die Transfektion 72 Stunden vor Verwenden dieser Überstände. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Waschschrift in PBS, anschließend wurden die Zellen zweimal 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und so durch Sekretion von Reg4- und HIP/PAP-konditioniertes Medium gewonnen.

Die zu den „Reporterassays“ eingesetzten Zellkulturüberstände wurden unmittelbar vor dem Experiment abgenommen und bei 800 g für 4 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, daraus resultierende Überstände wurden vorsichtig abgenommen und zur Stimulation der Reporterexperimente eingesetzt.

Abbildung III.1.3.a zeigt exemplarisch die Westernblotanalyse der konditionierten Überstände und den Nachweis von sekretiertem Reg4- und HIP/PAP-Protein in den Zellkulturüberstand sowie die Spezifität der generierten polyklonalen Antikörper im

Vergleich zu einem kommerziellen Anti-Reg4-Antikörper (siehe hierzu auch III.1.4.).  
Je ein Anteil der Zellkulturüberstände aus der serumfreien Inkubation

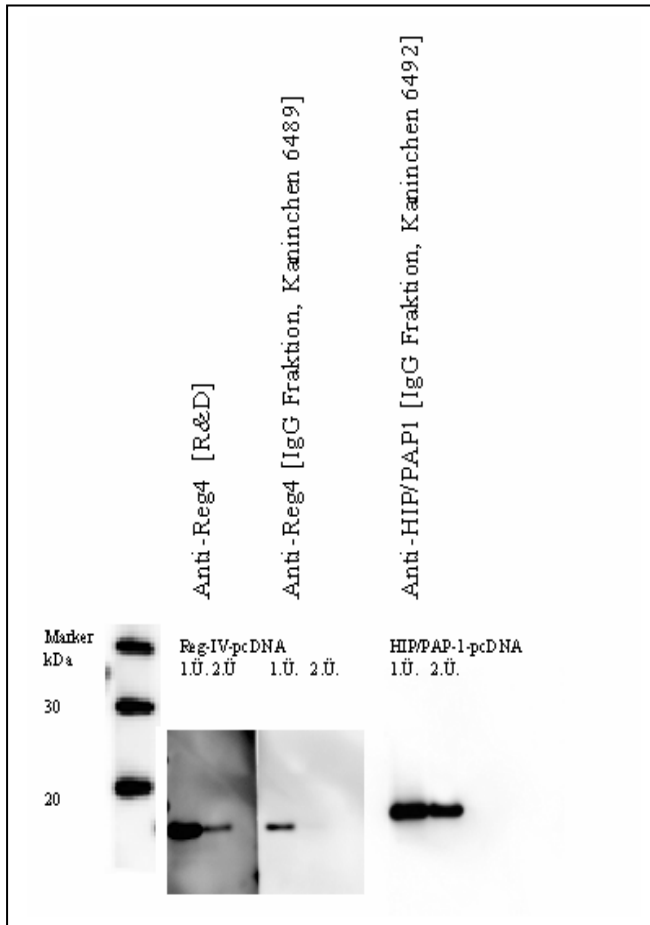


Abbildung III.1.3.a. SDS-PAGE mit Westernblot-analyse von Zellkulturüberständen von transient transfizierten HEK293T Zellen mit den Expressionssystemen pcDNA3-Reg4 und pcDNA3-HIP/PAP. Erster Überstand (1.Ü.) nach 24 Stunden serumfreier Inkubation, zweiter Überstand (2.Ü.) nach 48 Stunden serumfreier Inkubation. Der Nachweis erfolgte durch die angegebenen Antikörper [1:500 bei IgG Fraktion Kaninchen 6489 & 6492; 1:1000 bei R&D Anti-Reg4] mit entsprechenden Zweitnachweissystemen; Streptavidin-HRP [1:4000] für Anti-Reg4 [R&D] und Anti-Kaninchen IgG-HRP [1:2000] bei den eigens generierten Erstantikörpern.

## Stabile Expression von Reg4-Fc, Fc-Reg4 sowie HIP/PAP-Fc und Fc-HIP/PAP in NS0-Zellen und Proteinreinigung

Zur Isolierung größerer Proteinmengen war es notwendig, Expressionssysteme mit stabiler Expression zu generieren. NS0-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expressionsrate von Fc-Fusionsproteinen aus, die bei der Auswahl der pdCs-Fc-x und plgplus Expressionssysteme direkt in das Zellkulturmedium sekretiert werden. Proteine können somit schonend ohne denaturierende Schritte aus dem Medium isoliert werden. Fusionsproteine mit „Fc-Tag“ wurden als gut löslich und biologisch aktiv beschrieben (Lo, K.M. *et al.* 1998). Beide Eigenschaften sind für Stimulations- und Signaltransduktionsstudien sowie für Bindungsexperimente von grundlegender Bedeutung, da diese Prozesse im wesentlichen von der nativen Konformation der Proteine und den daraus resultierenden Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern bestimmt sind. Die Prozesse der Proteinreifung und Faltung von Reg4 und HIP/PAP sind bisher noch nicht beschrieben, es gibt jedoch für andere Mitglieder der Proteinfamilie Hinweise auf eine postrtranslationale Prozessierung am Aminoterminus (Schiesser, M. *et al.* 2001; Graf, R. *et al.* 2001). Daher wurden Expressionssysteme mit amino- als auch carboxyterminalem „Fc-Tag“ ausgewählt.

Tabelle III.1.3.T. Verwendete Volumina der Protein-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der Fc-Fusionsproteine

Protein und Klon	gelandenes Volumen von Zellkulturüberstand [ml]	Protein-A-Säulen-volumen [ml]	Eluierte Menge [ml]	Final eingestellter pH-Wert
<b>Fc-HIP/PAP</b>				
Klon H06-085	1100	8,2	29	7,3
Klon H06-086	1100	8,2	32,5	6,8
<b>Fc-Reg4</b>				
H06-087	1200	8,2	15,5	6,8
H06-088	1100	4	16	6,8
<b>HIP/PAP-Fc</b>				
H06-089	1000	4	18,5	6,5
H06-090	1000	4	15	6,5
<b>Reg4-Fc</b>				
H06-091	1000	1,1	3	6,5
H06-092	600	1,1	2	7
<b>Fc</b>				
H06-096	2000	34	75	6,4

Zellklone von transfizierten NS0 Zellen wurden durch selektive Klonierung generiert. Diese Klone wurden expandiert und in 2 l Kulturen inkubiert. Die sekretierten Expressionsprodukte der Fc-Fusionsvektoren wurden durch Protein-Affinitätschromatographie aus diesem Zellkulturmedium isoliert und nachfolgend weiter gereinigt. Tabelle III.1.3.T

enthält die Angaben der entsprechend verwendeten Volumina. Abbildung III.1.3.b. zeigt die Trennung der gereinigten Proteine durch SDS-PAGE und Detektion mittels nachfolgender Coomassie Färbung.

Die Fraktionen der gereinigten Proteine wurden aufgeteilt und durchgängig bei - 80 °C gelagert, für Stimulations- und Bindungsexperimente wurden die Proteine auf Eis aufgetaut und bis zum Einsatz im Experiment nicht über 4 °C erwärmt. Abbildung III.1.4.c. zeigt die Expressionsprodukte nach Westernblotanalyse. Der Nachweis erfolgte durch einen gegen den „Fc-Tag“ gerichteten Antikörper. Spezifische Detektion von pdCs-Fc-Reg4 und pdCs-Fc-HIP/PAP sowie pdCs-Fc und plgplus-Reg4-Fc und plgplus-HIP/PAP-Fc konnte mit den generierten Antikörpern (siehe III.1.4.) gezeigt werden, das Molekulargewicht der detektierten Proteinfraction entspricht dem Dimer der Fusionsproteine. Verknüpfung von Fc-Fusionsproteinen durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten sind beschrieben (Lo, K.M. *et al.* 1998).

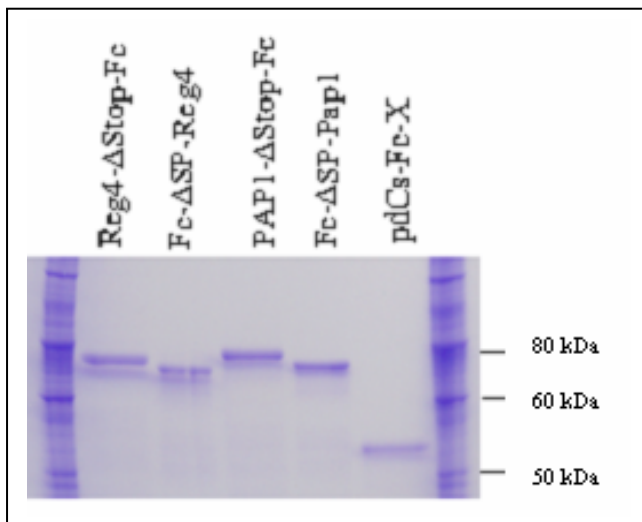


Abbildung III.1.3.b. SDS-PAGE und Coomassie Färbung der gereinigten Fc-Fusionsproteine.

### III.1.4. Generierung und Charaktisierung von Antikörpern gegen humanes Reg4 und humanes HIP/PAP

Zur Immunisierung von Kaninchen wurden synthetische Peptide generiert, die Aminosäuresequenzen von humanem Reg4 bzw. HIP/PAP abbilden. Die Peptidsequenzen wurden durch Vergleichsanalysen auf ihre Spezifität überprüft. In Abbildung III.1.4.a & b. ist die Reg4- und die HIP/PAP-Aminosäuresequenz dargestellt, die farbigen Sequenzen stellen die ausgewählten Sequenzabschnitte dar, die der synthetischen Peptidsequenz entsprechen. Die Immunisierung und Generierung der synthetischen Peptide geschah in Kollaboration mit der Biogenes GmbH.

```

MASRSMRLLLLLSCLAKTGVL
GDIIMRPSCAPGWFYHKSNCY
GYFRKLRNWSDAELECQSYG
NGAHLASILSLKEASTIAEYISG
YQRSQPIWIGLHDPQKRQQW
QWIDGAMYLYRSWSGKSMG
GNKHCAEMSSNNNFLTWSSN
ECNKRQHFLCKYRP
  
```

Abbildung III.1.4.a. Reg4 Protein Sequenz. Unterstrichen: Signalpeptidsequenz. In Farbe: Peptidsequenz zur Immunisierung. Natives Protein: 15,9 kDa (kalkuliert)

```

MLPPMALPSVSWMLLSCLMLL
SQVQGEEPQRELP SARIRCPK
GSKAYGSHCYALFLSPKSWTD
ADLACQKRPSGNLVSVLSGAE
GSFVSSLVKSIGNSYSYVWIGL
HDPTQGTEPN GEGWEWSSS
DVMNYFAWERNPSTISSPGH
CASLSRSTAF LRWKDYNCNV
RLPYVCKFTD
  
```

Abbildung III.1.4.b. HIP/PAP Protein Sequenz. Unterstrichen: Signalpeptidsequenz. In Farbe: Peptidsequenz zur Immunisierung. Natives Protein: 16,5 kDa (kalkuliert)

Isolierte Antiseren und gereinigte IgG Fraktionen aus der Immunisierung wurden mit Hilfe des Reg4- und HIP/PAP-pcDNA3-Expressionssystem und nachfolgend mit gereinigtem Fc-Fusionsprotein charakterisiert. Eine ausreichende Spezifität konnte mit der IgG-Fraktion des Kaninchens 6489, entsprechend der synthetischen Reg4-Peptidsequenz und die IgG-Fraktion des Kaninchens 9492, entsprechend der synthetischen HIP/PAP-Peptidsequenz erreicht werden. Abbildung III.1.3.a. zeigt die Detektion durch Westernblotanalyse von Reg4- und HIP/PAP-pcDNA3-Expressionsprodukten aus dem Zellkulturüberstand mit polyklonalen Antikörpern dieser IgG-Fractionen. Diese wurden für weitere Analysen verwendet.

In Abbildung III.1.4.c. ist die Westernblotanalyse der aufgereinigten Fc-Fusionsproteine in ansteigender Konzentration gezeigt. Spezifische Signale konnten

sowohl für anti-human-Reg4- als auch für anti-human-HIP/PAP-Antikörper der IgG-Fractionen gezeigt werden, bei allen Varianten an Fc-Fusionsproteinen konnten im Konzentrationsbereich zwischen 3 ng/ml bis 3000 ng/ml spezifische Signale detektiert werden. Diese ermittelten Signale wurden bei einem Molekulargewicht von ~ 80 kDa detektiert. Das kalkulierte Molekulargewicht von Reg4-Fc liegt bei 43 kDa (Dimer: 86 kDa), von Fc-Reg4 bei 40,2 kDa (Dimer: 80,4 kDa) von HIP/PAP-Fc bei 43,1 kDa (Dimer: 86,2 kDa) und Fc-HIP/PAP bei 41,1 kDa (Dimer: 82,2 kDa). Der Anteil des fusionierten „Fc-Tags“ beträgt jeweils 26,6 kDa im monomeren Fusionsprotein. Mit Hilfe des Antikörpers welcher gegen die IgG $\gamma$ -Domäne gerichtet war, ließ sich der „Fc-Tag“ nachweisen. Hierbei wurden die Fusionsproteine entsprechend ihrer Größe deckungsgleich zu den Nachweissystemen der Peptidantikörper detektiert, zusätzlich ließ sich auch der Fc-Anteil ohne fusioniertes Reg4 oder HIP/PAP in der Größe des Dimers nachweisen. Kreuzreaktion der Peptidantikörper mit „Fc-Tag“ ohne Fusionsprotein wurden nicht beobachtet.

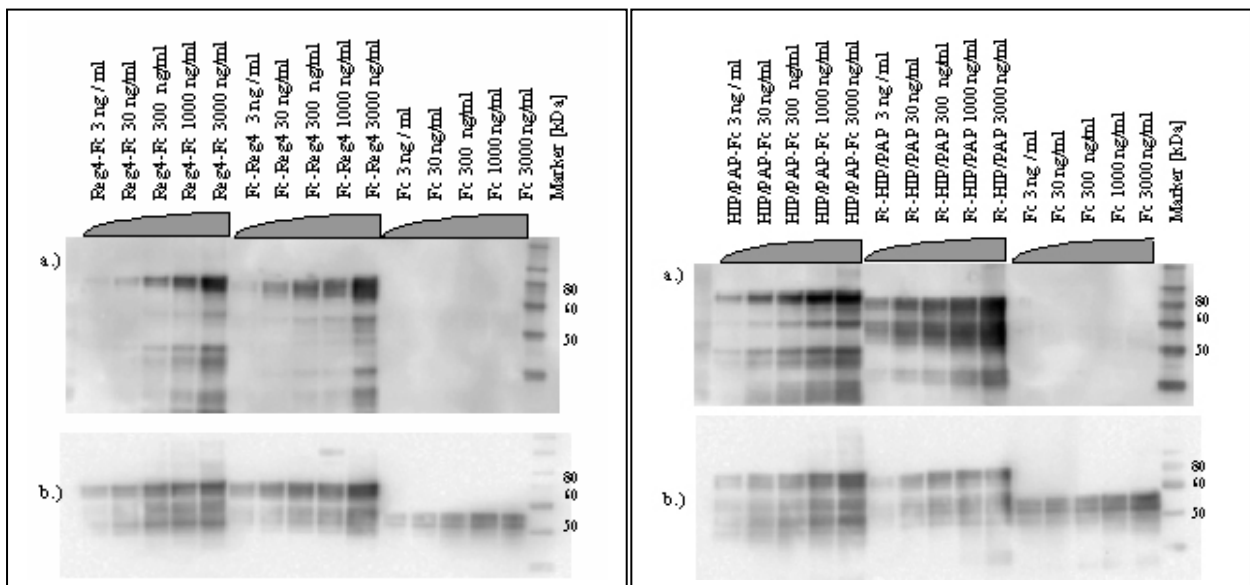


Abbildung III.1.4.c. Gereinigtes Reg4-Fc und Fc-Reg4 wurden mit aufsteigender Konzentration wie angegeben durch SDS-PAGE separiert und nachfolgend durch Westernblotanalyse detektiert. a.) Zeigt die Detektion mit generierten anti-human-Reg4-Antikörper (IgG-Fraktion, Tier 6489; 1:200) und anti-Kaninchen Zweitantikörper (1:2000) mit gekoppelter HRP. b.) Zeigt den Nachweis durch anti-human-IgG-Antikörper (1:4000) mit gekoppelter HRP.

Abbildung III.1.4.c. Gereinigtes HIP/PAP-Fc und Fc-HIP/PAP wurden mit aufsteigender Konzentration wie angegeben durch SDS-PAGE separiert und nachfolgend durch Westernblotanalyse detektiert. a.) Zeigt die Detektion mit generierten anti-human-HIP/PAP-Antikörper (IgG-Fraktion, Tier 6492; 1:200) und anti-Kaninchen Zweitantikörper (1:2000) mit gekoppelter HRP. b.) Zeigt den Nachweis durch anti-human-IgG-Antikörper (1:4000) mit gekoppelter HRP.

### III.1.5. Detektion von Reg4 und HIP/PAP exprimierenden Zelllinien

Zu funktionellen Studien der biologischen Effekte von Reg4 und HIP/PAP wurden Zelllinien ausgewählt, die eine endogene Reg4- und / oder HIP/PAP-Expression besitzen. Diese sollten als Modellsysteme die Beobachtungen aus klinischen Studien mit einer Aufregulation der Reg4 oder auch HIP/PAP Expression in gastrointestinalem Tumorgewebe widerspiegeln. Mitogene oder antiapoptotische Aktivität vermittelt durch Reg4 und HIP/PAP wurde in Zellen aus Gliagewebe und vor allem gastrointestinalen Geweben beobachtet. Um diese Effekte tiefergehend zu studieren, wurden verschiedene gastrointestinale Tumorzelllinien herangezogen. Diese wurden entsprechend den jeweils etablierten Bedingungen kultiviert und zur Isolation von RNA oder Protein in Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) ausgesät. Bei einer Dichte von etwa 80 % Konfluenz wurde jeweils eine Schale zur Isolation von Gesamtprotein und eine Schale zur Isolation der Gesamt-RNA eingesetzt. Ebenso wurden die Zellkulturüberstände zum Nachweis von sekretiertem endogenem Protein gesammelt und zur Westernblotanalyse eingesetzt.

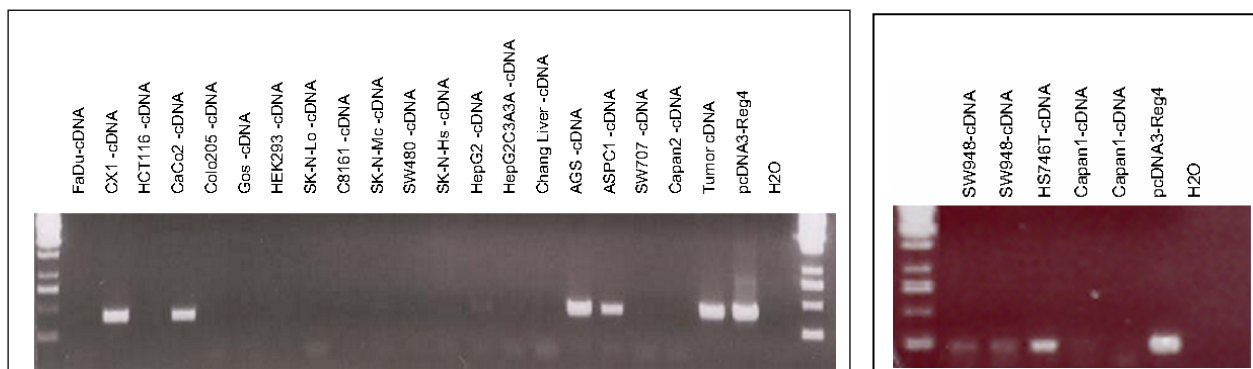


Abbildung III.1.5.a & b Agarosegelelektrophorese der PCR Produkte unter Verwendung von Reg4 Primer Oligomeren. Als „Template“ DNA wurde synthetisierte cDNA der angegebenen Zelllinien eingesetzt, als positive Kontrolle diente pcDNA3-Reg4-Vektor-DNA. Die Amplifikationsprodukte entsprechen in ihrer Größe den Reaktionsprodukten der positiven Kontrolle, eine Amplifikation ohne Zugabe von cDNA (Spur H<sub>2</sub>O) war nicht erfolgt.

Aus der isolierten RNA wurde durch reverse Transkription cDNA synthetisiert, diese wurde als Vorlage zur PCR mit Reg4- oder HIP/PAP-spezifischen Primern eingesetzt. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Primer sind unter Angabe der Sequenz im Materialteil aufgeführt. Für Amplifikationen von Reg4-codierender DNA wurde die Primer-Kombination „Reg4\_Hum\_277forEcoR I“ / „Reg4\_Hum\_738revNot I“ und für Amplifikationen von



HIP/PAP-codierender-DNA die Primer Kombination „PAP\_Hum\_76for*EcoR I*“ / „PAP\_Hum\_584rev*Not I*“ verwendet. In Abbildung III.1.5.a. und –b. ist für die Zelllinien CX1, CaCo2, AGS und ASPC1 sowie SW948 und HS746T die Expression von Reg4-mRNA gezeigt. Darüber hinaus ließ sich die Reg4 Expression auch in einer cDNA-Vorlage, die aus Magentumorgewebe stammt, nachweisen, was konform zu publizierten Beobachtungen steht. In Abbildung III.1.5.c ist die Expression von HIP/PAP-mRNA in CaCo2 Zellen gezeigt. Das jeweilige Amplifikationsprodukt entspricht der Größe, die durch die Primer und der jeweiligen eingesetzten cDNA oder der Reg4- bzw. HIP/PAP-codierenden Vektor-DNA erhalten wurde, eine Amplifikation aus dem Reaktionsansatz ohne cDNA (Wasser) hat nicht stattgefunden. Eine Amplifikation von HIP/PAP aus Magentumor-cDNA konnte ebenfalls nicht detektiert werden.

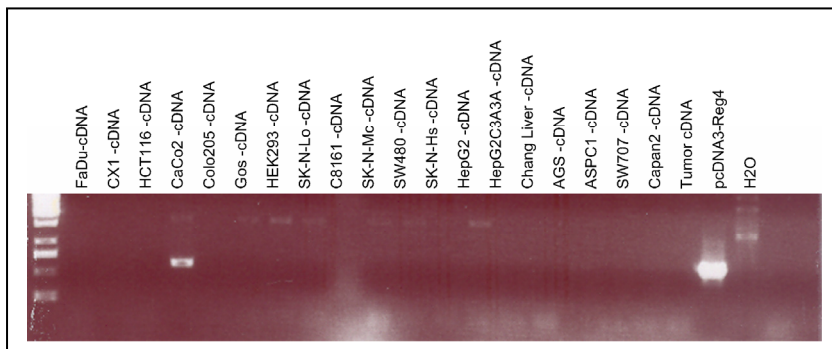


Abbildung III.1.5.c. Agarosegelelektrophorese der PCR Produkte unter Verwendung von HIP/PAP Primer Oligomeren. Als Vorlage wurde synthetisierte cDNA der angegebenen Zelllinien eingesetzt, als positive Kontrolle diente pcDNA3-HIP/PAP-Vektor-DNA. Die Amplifikationsprodukte entsprechen in ihrer Größe den Reaktionsprodukten der positiven Kontrolle, eine Amplifikation ohne Zugabe von cDNA (Spur H<sub>2</sub>O) war nicht erfolgt.

Um die Reg4- und HIP/PAP-Proteinbiosynthese ebenfalls zu prüfen, wurden die in Abbildung III.1.5.a, b. und c. positiv auf Reg4- bzw. HIP/PAP-mRNA Expression getesteten Zelllinien in HGNT Puffer lysiert und die erhaltene Proteinfraction durch Westernblotanalyse auf Protein-Expression von Reg4 und HIP/PAP getestet. In Zelllysaten aus AGS- und CX1-Zellen wurde mit Hilfe eines gegen Reg4-gerichteten Antikörpers ein spezifisches Signal in der Höhe unterhalb von 25 kDa detektiert. In Zelllysaten aus Caco2-Zellen wurde eine Proteinfraction von leicht geringerem Molekulargewicht verglichen mit dem Signal aus AGS- und CX1-Zelllysaten erhalten (Abbildung III.1.5.d.). Die Signalintensität in Zelllysaten aus CX1-Zellen ist am

stärksten, gefolgt von der Signalstärke aus Caco2-Zelllysaten. Lysate aus AGS-Zellen lieferten nur schwach detektierbare Signale.

Weiterführend wurde auch die Sekretion von Reg4 und HIP/PAP der jeweils auf Expression positiv getesteten Zelllinien überprüft. Die Westernblotanalyse der Zellkulturüberstände der vormals überprüften Zelllinien lieferte Signale bei etwas geringerem Molekulargewicht verglichen zu den detektierten Signalen aus den Zelllysaten. Positive Signale wurden dabei gleichfalls aus Zellkulturüberständen aus AGS- und CX1-Zellen erhalten. Dabei entsprach der Unterschied in den Signalintensitäten dem festgestellten Unterschied aus den analysierten Zelllysaten. Ein Signal in Zellkulturüberständen aus Caco2-Zellen wurden nicht ermittelt. (Abbildung III.1.5.d.). Die detektierten Signale stimmten mit dem beschriebenen Molekulargewicht von humanem Reg4 überein, ein Signal von Zellkulturüberständen von H460-Zellen, die keine Reg4 Expression auf cDNA Basis zeigen, wurde nicht detektiert.

HIP/PAP Expression auf Proteinebene und Sekretion dieser in Caco2 Zellen konnte nicht gezeigt werden.

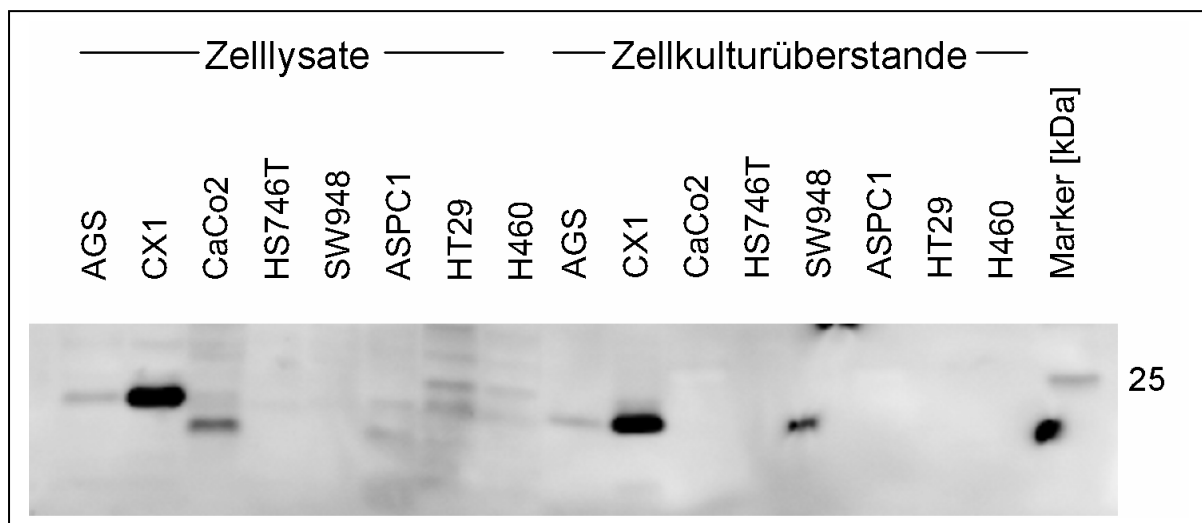


Abbildung III.1.5.d. Westernblotanalyse von Zellkulturüberständen der angegebenen Zelllinien unter Verwendung von anti-human-Reg4-Antikörpern (R&D; 1:800) und Streptavidin-HRP [1:4000].

## Zusammenfassung der Ergebnisse III.1. Auswahl und Generierung der Modellsysteme

Durch die konstruierten Expressionsvektorsysteme ließen sich Reg4 und HIP/PAP mit aminoterminalen als auch carboxyterminalen „Fc-Tag“ reinigen. Die Generierung von Proteinen der Reg Familie durch derartige Expressionssysteme ist neuartig und wurde bisher noch nicht beschrieben. Durch die fusionierte IgG $\gamma$ -Domäne wurde erwartet Proteine in solubilisierter Form und mit biologischer Aktivität zu erhalten.

Die Expressionsplasmide Reg4- und HIP/PAP-pcDNA3 wurden aus verschiedenen Gründen hergestellt. Hierbei galt es zunächst positive Nachweissysteme zur Überprüfung der generierten Peptidantikörper zu erhalten, des Weiteren erscheint ein Expressionssystem welches Reg4 bzw. HIP/PAP ohne fusionierten „Tag“ enthält als sinnvolles, ergänzendes System zu den „Fc-Fusionsproteinen“. Bei etwaigen Komplikationen, verursacht durch die IgG $\gamma$ -Domäne, würden diese Systeme zusätzlich zur Verfügung stehen.

Die generierten Peptidantikörper erfüllten ebenso mehrere Funktionen, so dienten diese zur Charakterisierung der Reg4- und HIP/PAP Fusionsproteine, aber auch zum Nachweis von endogener Expression von Reg4 und HIP/PAP aus Lysaten bzw. Zellkulturüberständen verschiedener Tumorzelllinien.

Die Auswahl von Tumorzelllinien mit endogener Expression von Reg4 und HIP/PAP wurde durchgeführt, um ein Modellsystem für nachfolgende Stimulations- und Bindungsexperimente zu erhalten. Durch den Nachweis der Reg4 und HIP/PAP Expression in AGS, CX1 und Caco2 sind mit diesen ergänzend Zelllinien zu den bislang beschriebenen mit Reg4 oder HIP/PAP Expression hinzu gekommen. Die Zelllinien zeichnen sich alle durch ihren Ursprung aus gastrointestinalem Tumorgewebe aus, was zur Bearbeitung hiesiger Fragestellungen als geeignet erschien.

Gemäß postulierten Rückkopplungsmechanismen der Signaltransduktion durch Proteine der Reg Familie wurden die Zelllinien in Folgeexperimenten herangezogen.

## III.2. Stimulationsexperimente zur Detektion von Reg4 und HIP/PAP vermittelter Signaltransduktion

### III.2.1. „Reportergenassay“

Die Lokalisation von Proteinen der Reg-Familie ist als extrazellulär beschrieben. Es wird allgemein angenommen, dass die biologischen Effekte von Reg4 und HIP/PAP von der extrazellulären Seite über einen Transmembranrezeptor vermittelt werden und intrazellulär durch eine Signaltransduktionskaskade amplifiziert werden. Der biologische Zweck dieser Protein-Netzwerke besteht darin, die Reaktion einer Zelle auf bestimmte Stimulationen zu kontrollieren und zu steuern. Durch Selektionsprozesse der Evolution haben sich hierbei bestimmte Netzwerke von Proteinen herausgebildet, die auf verschiedene Reize in verschiedenen Geweben und verschiedenen Zelltypen spezifische konservierte Antwortmuster hervorbringen. Grundlegende Prozesse, die durch solche Protein-Netzwerke fein reguliert sind, stellen die Zellteilung, das Überleben der Zelle und der programmierte Zelltod dar. Um diese Zustände zu etablieren verfügt die Zelle über ein Antwortprogramm von konservierten Genen, die spezifisch in einem solchen Zustand aktiviert werden.

Durch zahlreiche Arbeiten auf diesem Gebiet, ist es möglich geworden, einige Kontrollelemente bestimmten Stimulationen zuzuordnen und so die zelluläre Antwort auf bestimmte Reize besser zu verstehen. Wichtige Elemente zur Steuerung der Genaktivität stellen die Promotor-DNA Sequenzen dar, die spezifisch die Aktivität des auf der DNA 3' zu den Promotoren gelegenen Gens kontrollieren. An die Promotor-DNA binden jeweils spezifische Proteine oder Proteinkomplexe und aktivieren oder blockieren auf diese Weise die Transkriptionsmaschinerie.

Durch gentechnisch hergestellte Reportergensysteme ist es möglich, die Aktivierung spezifischer Promotorelemente zu ermitteln und zu quantifizieren. Solche Analysen lassen Rückschlüsse auf ein weitreichendes Netzwerk an Signaltransduktionsprozessen zu, welche zum Teil bis hin zu bestimmten Transmembranrezeptor Familien reichen kann.

Mit dieser Arbeit wurde von der Hypothese ausgegangen, dass Zelllinien, die eine endogene Expression von Reg4 besitzen, gleichfalls, basierend auf der Signalarückkopplungstheorie, einen spezifischen Rezeptor und eine damit

verbundene Signaltransduktionskaskade besitzen. Um zum detaillierteren Verständnis der durch Reg4 angestoßenen Signaltransduktionsprozesse beizutragen, wurden nachfolgend aufgeführte Reportergenelemente verwendet: GAS, Cre, Sre, Egr1 und TARE. Diese *cis*-DNA-Promotorelemente wirken verstärkend in der Transkriptionsinitiierung zusätzlich zur TATA-Box (Xu L. *et al.* 1998). Transkriptionscofaktoren, die an diese *cis*-DNA Elemente binden und somit die Genexpression amplifizieren, werden nachgeschaltet zu zahlreichen Signalkaskaden aktiviert. Zentrale Elemente dieser Signalkaskaden stellen die Protein-Kinase-A und das „cyclic-AMP response element“ (Cre), MEKK und die Aktivierung von „early-growth response element“ (Egr1) und „Tumor-associated response element“ (TARE) dar, des Weiteren tritt Interferon-abhängige Stimulierung der Interferon-abhängigen Elemente (GAS/ISRE) auf und die durch zahlreiche Wachstumsfaktoren beschriebene induzierbare Bindung an „Serum-response element“ (Sre) (Karin M. & Hunter T. 1995). Es kann innerhalb dieser Stimulationskaskaden jedoch zu Redundanzen kommen, was den grundlegenden Charakter dieser *cis*-DNA Elemente bezogen auf die Stimulation von Signalkaskaden zeigt.

Diese Reportergenelemente wurden in AGS- und CX1-Zellen transient transfiziert, die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in dem jeweiligen Zellkulturmedium mit 10 % FCS kultiviert, danach einmal in PBS gewaschen und fortan in Reg4 konditioniertem Medium für weitere 24 Stunden kultiviert. Als negativ Kontrolle diente Medium welches von Zellen abgenommen war, die mit pcDNA3-Vektor-DNA ohne Insert transfiziert worden waren. Die positiv Kontrolle bestand aus pcDNA3-Vektor-DNA konditioniertem Medium, welchem zusätzlich spezifisch Proteine zugegeben wurden, die als Aktivatoren der jeweiligen Signaltransduktionskaskaden beschrieben waren. Die Zellen wurden in diesen konditionierten Medien für 3 Stunden kultiviert und anschließend zur Reporterger Quantifizierung eingesetzt.

In einer zweiten Serie wurden die Zellen nicht mit konditionierten Medium stimuliert, sondern zu den Reportersystemen wurden pcDNA3-Reg4-Expressionsvektoren cotransfiziert. Als negativ Kontrolle diente hierbei gleichfalls pcDNA3 ohne Insert. Hierbei erfolgte ebenfalls 24 Stunden nach der Transfektion ein Waschschrift in PBS gefolgt von der Kultivierung in serumfreiem Medium. 24 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen zur Quantifizierung der Reportergene lysiert. In

Tabelle III.3.1.T. sind die Kombinationen der verwendeten Reporterelemente und der dazu eingesetzten Stimulationsmedien bzw. Kontroll-Vektor-DNA dargestellt.

Weder mit pcDNA3-Reg4 konditionierten Überständen noch durch Cotransfektion von pcDNA3-Reg4 konnte eine signifikante Stimulation der Reportergenelemente erreicht werden. Dies ist ebenfalls in Tabelle III.2.1.T. abgebildet.

Hingegen konnte eine Aktivierung ausgelöst durch die jeweiligen positiv Kontrollsysteme beobachtet werden.

Tabelle III.2.1.T Darstellung der verwendeten Reportersysteme in CX-1- und AGS-Zellen nach transienter Transfektion. Stimulation erfolgte durch konditionierte Überstände aus transfizierten HEK293T-Zellen oder durch Cotransfektion mit den angegebenen Expressionsvektoren.

verwendete Reporterelemente	Aktivierung durch	Aktivierung durch Reg4 konditioniertes Medium	Aktivierung durch Cotransfektion	Aktivierung durch Cotransfektion mit pcDNA3-Reg4
TARE	EGF	-	MEKK	-
Egr1	EGF	-	MEKK	-
GAS	IL-10	-	PKA	-
Sre	Serum	-	PKA	-
Cre	Forskolin	-	PKA	-

### III.2.2. Reg4 und HIP/PAP abhängige Phosphorylierung von NF $\kappa$ B und Erk1 und Erk2

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität von gereinigtem Reg4 und HIP/PAP und zum besseren Verständnis der biologischen Funktion dieser Proteine bei der Krebsentstehung wurden verschiedene Zelllinien mit diesen stimuliert. Exemplarisch wurden AGS- und CX-1-Zellen als Reg4 exprimierende Zelllinien ausgewählt. HT29-Zellen wurden als eine Reg4-sensitive Zelllinie beschrieben und daher ebenfalls hinzugezogen (Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006). Die Zellen wurden hierzu in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und 24 Stunden in Kulturmedium mit 10 % FCS inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Waschschrift in PBS, fortan wurden die Zellen für 24 Stunden in Kulturmedium ohne FCS inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von Fc-Reg4 bzw. Reg4-Fc sowie Fc-HIP/PAP und HIP/PAP-Fc. Als Kontrolle wurde mit Fc-Protein ohne Fusionspartner in den höchsten eingesetzten Konzentrationen der Fusionsproteine stimuliert. TNF- $\alpha$  wurde als Positivkontrolle zur Stimulation der NF $\kappa$ B-Signalkaskade und EGF zur Stimulation von Erk1 und -2 verwendet. Die Behandlung erfolgte für je 10 Minuten. Unmittelbar danach wurden die Zellen in RIPA Puffer lysiert und enthaltene Proteine durch SDS-PAGE und Westernblotanalyse separiert und detektiert.

Zum Nachweis möglicher biologischer Effekte von Reg4 und HIP/PAP auf diese Zellen wurde die Phosphorylierung in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinkonzentration von NF $\kappa$ B, Akt, Erk1 und -2 sowie von Stat3, S6-Kinase1 und FAK gemessen. Abstrahiert man die Rolle der hier analysierten Proteine auf zelluläre Gesamtzustände, so lassen sich diese als zentrale Regulationselemente der Apoptose, der Zellteilung, des Zellwachstums und der Zellwanderung bzw. Verankerung innerhalb eines Gewebes verstehen.

Da Reg4 und HIP/PAP als überexprimierte Proteine in verschiedenen Tumorgeweben des Gastrointestinaltrakts und der Leber offensichtlich maßgeblich an der Krebsentstehung beteiligt sind, sollte deren Rolle im Zusammenhang der oben aufgeführten Regulationsebenen untersucht werden. Gleichzeitig konnte auf diese Weise die biologische Aktivität der Fusionsproteine überprüft werden, um diese für nachfolgende Bindungsstudien auszuwählen.

In HT29-Zellen wurde eine leichte Zunahme der NF $\kappa$ B-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Konzentration der Reg4- und HIP/PAP-Fusionsproteine detektiert (Abbildung III.2.2.a). Diese Beobachtung konnte durch Verwenden von Reg4 mit carboxyterminalem „Fc-Tag“ und HIP/PAP mit aminoternalem „Fc-Tag“ erhalten werden. Die Fusionsproteine wurden hierbei mit zunehmender Konzentration von 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml und 1000 ng/ml eingesetzt. Die Stimulation erfolgte für 10 Minuten in FCS-freiem Medium. Die Zunahme der Phosphorylierung war nach Quantifizierung signifikant stärker als der beobachtete Effekt durch „Fc-Tag“ alleine, der als pharmakologischer Hintergrund gesehen werden kann. Durch Quantifizierung der Messwerte der phospho-NF $\kappa$ B-Detektion bezogen auf die Signalintensität von Cofilin, ließ sich die Reg4 und HIP/PAP induzierte relative Phosphorylierung ermitteln (Diagramm III.2.2.Da). Dabei wurde die angestoßenen NF $\kappa$ B-Phosphorylierung durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  auf 100 % und die unstimulierte Kontrolle auf 0 % festgelegt. Durch reversibles Anfärben der Westernblotmembran durch Ponceau-S Lösung wurde die Homogenität der analysierten Lysate bezogen auf Proteingehalt, Qualität der Lyse sowie auf die SDS-PAGE und den Blotvorgang kontrolliert.

Die nach Reg4-Fc Stimulation detektierte Zunahme der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B über den Basalwert wurde bei einer Konzentration von 100 ng/ml (Reg4-Fc) festgestellt und lag verglichen zu TNF- $\alpha$  bei 10 %. Der Effekt konnte durch die zunehmende Konzentration von Reg4-Fc auf 300 ng/ml deutlich auf 19 % gesteigert werden und blieb auch bei der höchsten Konzentration von 1  $\mu$ g/ml nahezu auf diesem Niveau, was für eine Sättigung innerhalb dieser Kinetik spricht. Die Beobachtung für Fc-HIP/PAP ergab hierbei erst bei der zur Stimulation eingesetzten Konzentration von 300 ng/ml eine detektierbare Zunahme der Phosphorylierung, die bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1  $\mu$ g/ml jedoch wieder auf 4 % reduziert war. Eine Zunahme der Phosphorylierung durch Stimulation mit 300 ng/ml und 1  $\mu$ g/ml Fc verglichen zu dem unstimulierten Basalwert konnte nach Quantifizierung nicht ermittelt werden, ebenso ohne Einfluss waren die Stimulationen durch EGF.



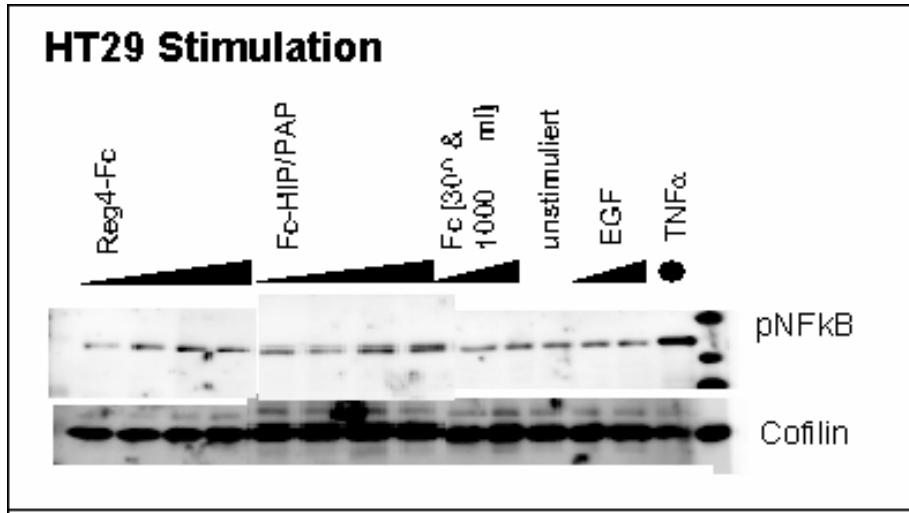
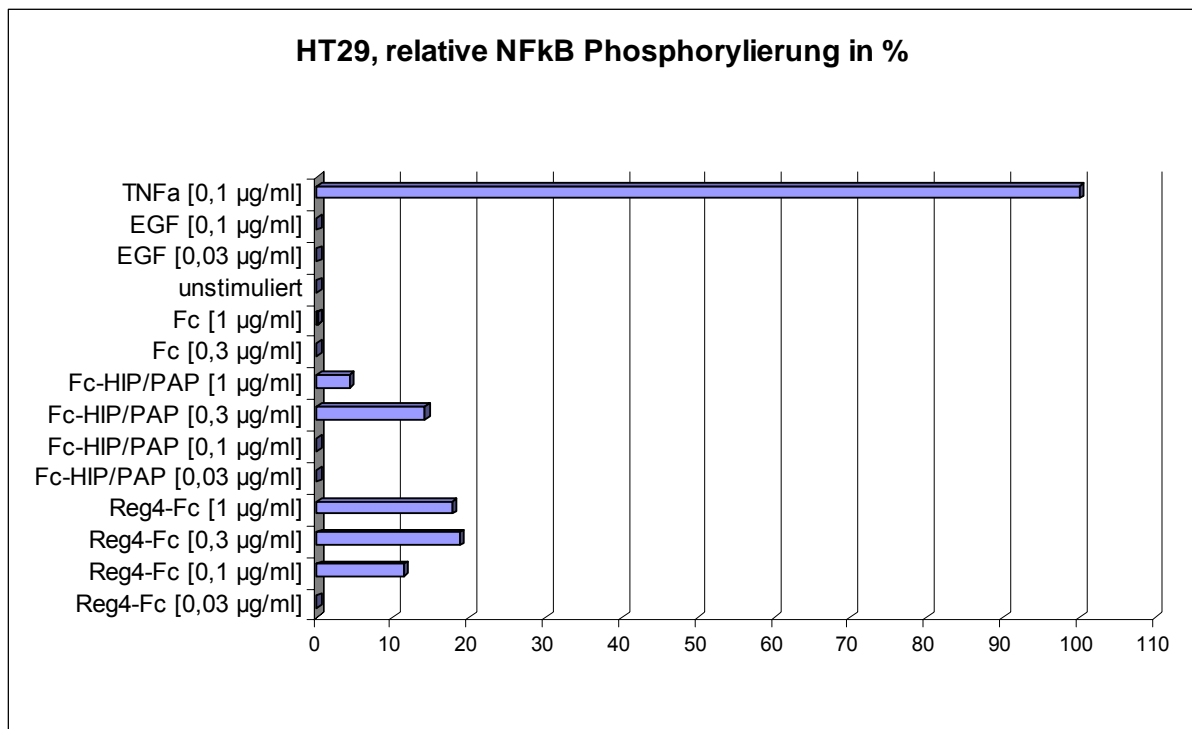


Abbildung III.2.2.a. Detektion von phospho-NF $\kappa$ B durch Westernblot-analyse mit anti-phospho-Serin-536 NF $\kappa$ B-Antikörper. Nebenstehend Ponceau-S Färbung der Membran. Zelllysate wurden aus Stimulation mit



Dosissteigerung (30 ng/ml, 100 ng/ml, 300ng/ml, 1000 ng/ml) durch angegebenen Fusionsproteine gewonnen. Als Kontrollen dienten Fc, unstimuliert. EGF und TNF- $\alpha$ .

Diagramm III.2.2.Da. Dargestellt sind die relativen Messwerte der phospho- NF $\kappa$ B-Detektion aus der Westernblotanalyse (Abbildung III.2.2.a.) normalisiert durch die Messwerte von Cofilin.



In AGS- und CX-1-Zellen ließ sich kein Effekt auf die NF $\kappa$ B-Phosphorylierung detektieren, jedoch zeigten diese Zellen eine leichte Dosis-abhängige Zunahme der Erk1 und Erk2 Phosphorylierung (Abbildung III.2.2.b & III.2.2.c). Hierbei wurden die Fusionsproteine gleichfalls in aufsteigender Konzentration von 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml und 1000 ng/ml eingesetzt. Die Stimulation erfolgte gleichfalls wie bei den HT29-Zellen für 10 Minuten in serumfreiem Medium.

Bei AGS-Zellen konnte diese Beobachtung für Reg4 mit aminoterminalen und carboxyterminalen „Tag“ erhalten werden, für HIP/PAP zeigte sich ein ableitbarer Effekt bei Fusionsprotein mit carboxyterminalen „Tag“ (Abbildung III.2.2.b. und -c.). Die Messwerte aus der Stimulation der AGS-Zellen wurden durch Erfassen der relativen Signalintensität der Erk1 und Erk2 Phosphorylierung bezogen auf die Intensität des ermittelten Cofilin Signals quantifiziert. Der Einsatz von 100 ng/ml EGF wurde dabei als 100 %, die unstimulierte Kontrolle auf 0 % festgelegt (Diagramm III.2.2.Db.). Es wurde auch die Homogenität der analysierten Lysate bezogen auf Proteingehalt, Qualität der Lyse sowie auf die SDS-PAGE und den Blotvorgang durch reversibles Anfärben durch Ponceau-S Lösung überprüft.

Dabei wurde bei der zunehmenden Konzentration von Reg4-Fc ein Maximum bei dem Einsatz von 100 ng/ml erreicht. Dieses maximale Niveau der angestoßenen Phosphorylierung lag bei 10 % bezogen auf 100 % EGF. Bei Fc-Reg4 und HIP/PAP-Fc war das quantifizierte Niveau der angestoßenen Phosphorylierung bei ~25 %, dies wurde bei Reg4-Fc durch die höchste eingesetzte Konzentration von 1  $\mu$ g/ml erreicht, hingegen ist dieser Effekt bei HIP/PAP-Fc bereits bei der Minimalkonzentration von 30 ng/ml eingetreten und ging bei der Maximalkonzentration von 1  $\mu$ g/ml auf 10 % zurück. Durch die höchste eingesetzte Konzentration an Fc wurde eine Induktion der Phosphorylierung von 2 % beobachtet.

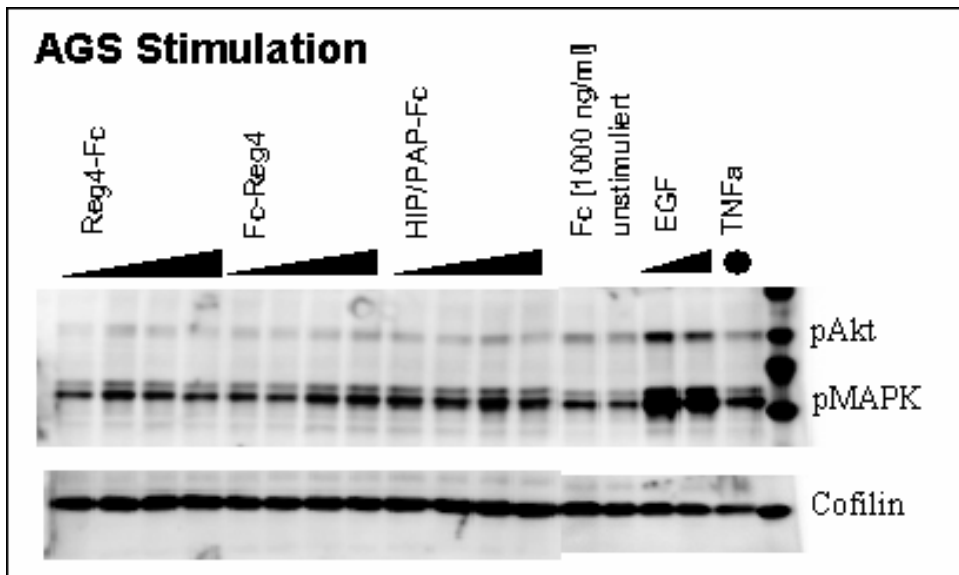
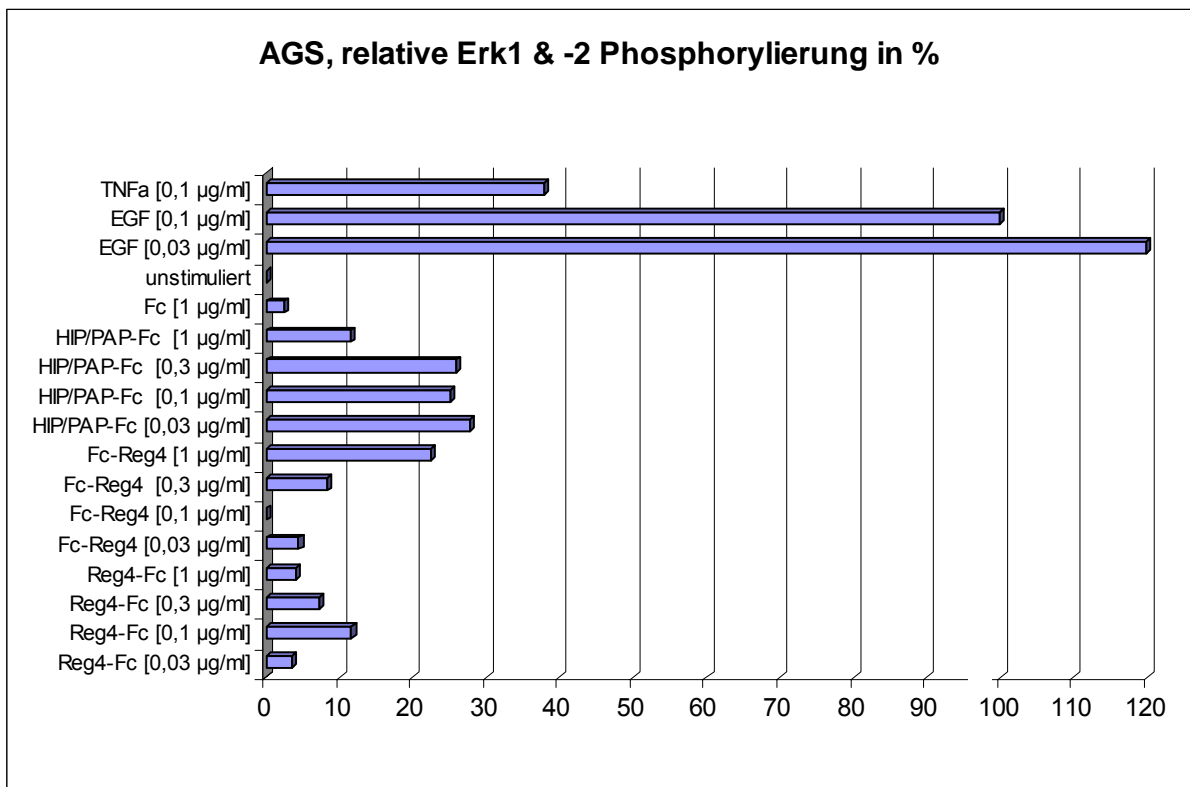


Abbildung III.2.2.b. Detektion von phospho-MAPK (Erk1&Erk2) durch Westernblotanalyse mit anti-phospho-Threonin-202-Erk1 & anti-phospho-Threonin-204-Erk2-Antikörper. Nebenstehend Ponceau-S Färbung der Blotmembran. Zelllysate wurden aus Dosissteigerung (30 ng/ml, 100 ng/ml, 300ng/ml, 1000 ng/ml) durch angegebenen Fusionsproteine gewonnen. Als Kontrollen dienten Fc, unstimuliert, EGF und TNF- $\alpha$ .



Diagramm III.2.2.Db. Dargestellt sind die relativen Messwerte der phospho-Erk1 und -Erk2-Detektion aus der Westernblotanalyse (Abbildung III.2.2.b.) bezogen auf die Messwerte von Cofilin.



In CX1 Zellen konnten die Beobachtungen einer leichten Zunahme der angestoßenen Erk1 und Erk2 Phosphorylierung für alle Varianten der Fusionsproteine festgestellt werden (Abbildung III.2.2.c.). Eine relative Quantifizierung konnte auf Grund von schwacher Cofilin Signalintensität nicht durchgeführt werden. Es wurde aber durch reversibles Anfärben der Blotmembran die Homogenität der analysierten Proben bezogen auf Proteingehalt, Qualität der Lyse sowie auf den SDS-PAGE und den Blotvorgang überprüft. Auch in dieser Analyse trat in den höchsten eingesetzten Konzentrationen von HIP/PAP-Fc ein Rückgang des Stimulationseffekt auf die angestoßene Erk1 und -2 Phosphorylierung ein, wie dies auch bei den AGS Zellen festgestellt wurde. Des Weiteren ließ sich dies auch für Fc-HIP/PAP beobachten, während dies, ebenso vergleichbar mit den Daten der AGS-Zellen Stimulation für Fc-Reg4 nicht beobachtet wurde.

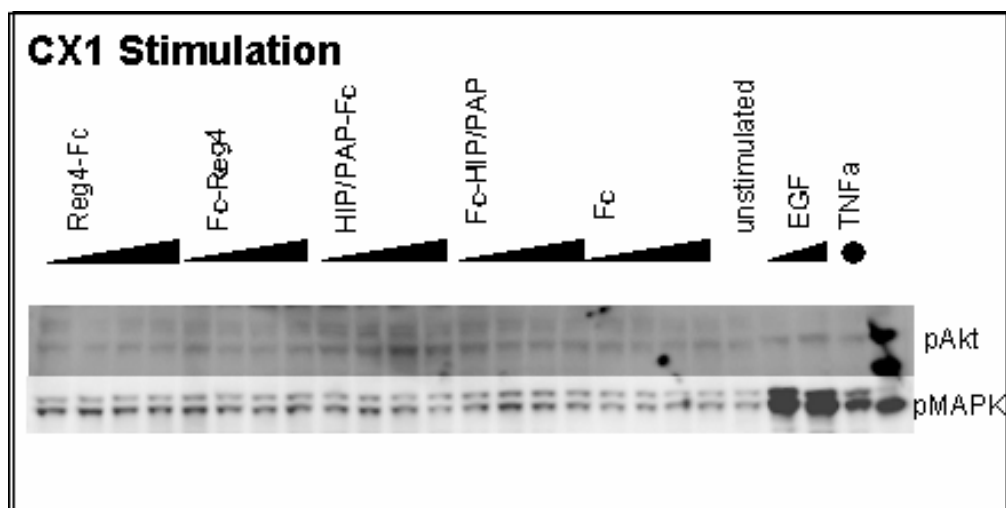
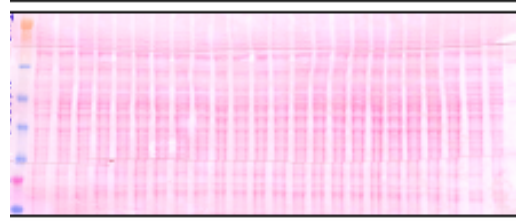


Abbildung III.2.2.c. Detektion von phospho-MAPK (Erk1&Erk2) durch Westernblotanalyse mit Anti-phospho-Threonin-202-Erk1 & Anti-phospho-Threonin-204-Erk2 Antikörper. Nebenstehend Ponceau-S Färbung der Blotmembran. Zelllysate wurden



aus der Stimulation mit Dosissteigerung (30 ng/ml, 100 ng/ml, 300ng/ml, 1000 ng/ml) durch angegebenen Fusionsproteine gewonnen. Als Kontrollen dienten Fc, unstimuliert, EGF und TNF- $\alpha$ .

Die im Rahmen dieser Analyse durchgeführte Erfassung der Zunahme der Phosphorylierung von Akt bei AGS- und CX1-Zellen findet sich neben der Stimulation durch Reg4 und HIP/PAP Fusionsproteine auch bei Fc und ähnlich stark im unstimulierten Ansatz wieder.

### III.2.3. Mikroarray Studie von HT29-Zellen stimuliert durch Fc-Reg4, Reg4-Fc, HIP/PAP-Fc und Fc-HIP/PAP

Die beobachteten Effekte der NF $\kappa$ B Phosphorylierung in HT29-Zellen lassen den Schluss zu, dass die Zellen durch ein Signaltransduktionssystem sensitiv gegenüber Reg4-Fc und Fc-HIP/PAP sind. Da NF $\kappa$ B durch Aktivierung eine Cytosol-Nukleus Translokation erfährt und im Kern unmittelbar an der Ausbildung von Transkriptionsfaktorkomplexen beteiligt ist, wurden diese Zellen für eine Stimulationsstudie mit den aufgereinigten Fusionsproteinen herangezogen. Durch extrazelluläre Faktoren angestoßene mRNA Transkription kann bereits nach einigen Minuten einsetzen und bis zu mehreren Tagen dauern. Es ist bislang noch nicht umfassend beschrieben, welche Zielgene in ihrer Expression durch Proteine der Reg-Proteinfamilie reguliert werden. Um hierbei ein breites Spektrum an möglicher Genexpressionsregulation zu erfassen, wurden Oligonukleotid Mikroarrays verwendet, die nahezu das komplette Genom abdecken. Es wurde in dieser Studie auf ein Zeitfenster von 24 Stunden Stimulation fokussiert. Daher wurden frühere oder spätere Effekte unter Umständen nicht erfasst.

Die Zellen wurden zur Stimulation zunächst unter Standardbedingungen kultiviert, nachfolgend in serumfreiem Medium für 24 Stunden inkubiert und anschließend für 24 Stunden durch Zugabe der Fusionsproteine [500 ng/ml] stimuliert. Als negative Kontrolle wurden die Zellen ohne Zugabe von Fusionsproteinen in serumfreiem Medium unter gleichen Bedingungen kultiviert, um Effekte die nur durch die Fc Domäne der Fusionsproteine angestoßen werden konnten, zu ermitteln, wurde auch Fc alleine zur Stimulation eingesetzt. Im Anschluss wurde die vollständige RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert und durch Affymetrix<sup>R</sup> „whole genome“ Mikroarrays (HG-U133Plus2) semiquantitativ Genexpressionsprofile erstellt. Die Auswertung erfolgte durch „Expressionist<sup>R</sup>“ bzw. in Kollaboration mit Merck KGaA BCI (persönliche Kommunikation Dr. Anja von Heydebreck). Zu jedem Datenpunkt eines Fusionsproteins bzw. eines eingesetzten Stimulus wurden Triplikate erstellt, diese wurden nach der RNA Isolation vereinigt und aus diesem RNA Homogenisat die cDNA durch reverse Transkription erhalten. Dieser Ansatz wurde bis auf die unbehandelte Kontrolle zweimal unabhängig von einander durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit dem GCRMA-Algorithmus (Wu, Z. *et al.* 2004) präprozessiert, der für alle 54675 Sonden (,Probesets') des Arrays Expressionswerte auf der

logarithmischen Skala (Basis 2) liefert. Für alle folgenden Analysen wurden 14577 Affymetrix-Probesets ausgewählt, die i) in mindestens 20% der Proben eine absolute Signalintensität  $> 16$  zeigen, ii) eine Varianz über alle Proben hinweg haben, die über dem Median der Varianzen aller Probesets liegt, und iii) RefSeq-Transkripte eindeutig bestimmter Gene repräsentieren.

Um durch die Behandlung regulierte Gene zu identifizieren, wurde an die Expressionswerte jedes Affymetrix-Probesets mit der kleinste-Quadrate-Methode ein lineares Modell angepasst, das die Behandlungsgruppen als Faktoren enthält (die unstimulierten und mit Fc behandelten Proben wurden hierbei zu einer Gruppe zusammengefasst). Die Signifikanz der Behandlungseffekte wurde für jedes Gen (bzw. Affymetrix-Probeset) mit dem moderierten T-Test (Smyth, G. *et al.* 2004) untersucht. Hierzu wurde die Differenz der Mittelwerte eines Gens aus dem Vergleich der mit Fusionsprotein stimulierten Proben mit der Gruppe der durch Fc behandelten Proben und den unstimulierten Proben gebildet. Dieser Wert wurde nicht wie im T-Test durch die Standardabweichung dieses Gens innerhalb der Behandlungsgruppen dividiert, sondern durch einen Schätzer, der neben der genspezifischen Standardabweichung die Varianzen sämtlicher Gene innerhalb der Behandlungsgruppen berücksichtigt. So konnten im moderierten T-Test unspezifische Schwankungen der gemessenen gesamten Expressionswerte aller quantifizierten Transkripte statistisch berücksichtigt und mit einer jeweiligen Genbezogenen differentiellen Genexpression verrechnet werden. Als Schwelle für eine signifikant differentielle Expression wurde eine 1,5-fache Regulation mit einem p-Wert  $< 0,01$  im moderierten T-Test zu Grunde gelegt. Die relativen errechneten Unterschiede sind in einer logarithmischen (log) Farbwärmestufengrafik dargestellt. Die verwendete Teststatistik ist angegeben (Formel III.2.3.F: mT-Test).

Formel: III.2.3.F: mT-Test

$$T_g \sim \frac{\bar{X}_{g1} - \bar{X}_{g2}}{\sqrt{\mu s_g^2 + \lambda s_0^2}}$$

$T_g$ : Teststatistik

$X_{gi}$ : Mittlerer Expressionswert von Gen g in Gruppe i

$s_g$ : Gen-spezifische Standardabweichung innerhalb der Behandlungsgruppen

$s_0$ : Aus den Daten aller Gene berechnete Standardabweichung innerhalb der Behandlungsgruppen

$\mu$ : Gewichtungsfaktor

$\lambda$ : Gewichtungsfaktor

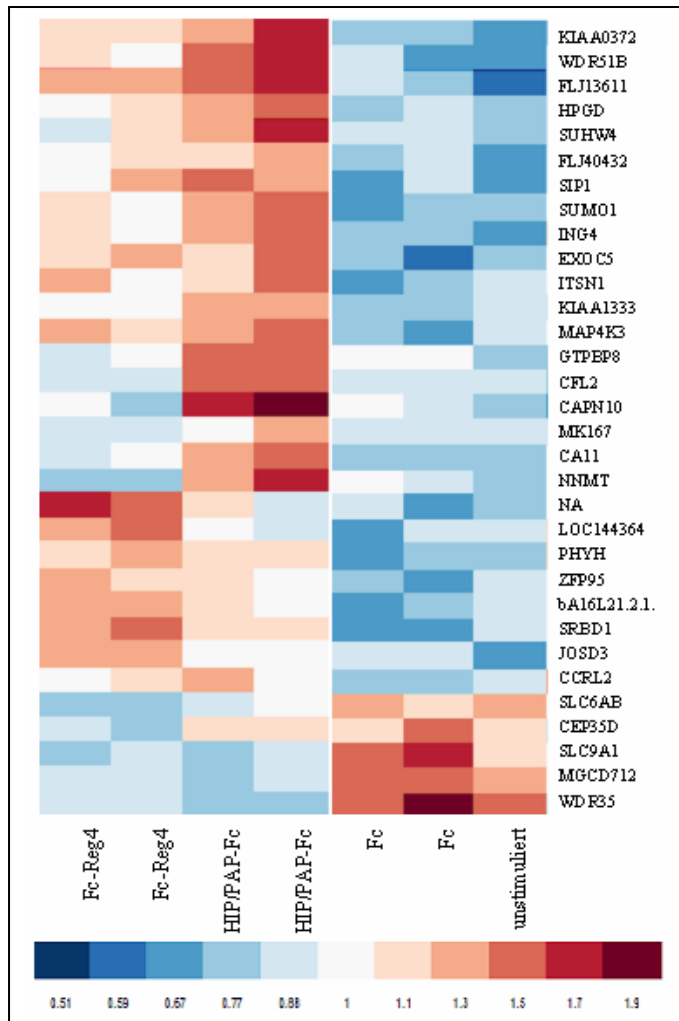


Abbildung III.2.3.a. Farbwärmestufen Grafik von differenziell exprimierten Genen innerhalb aller ausgewerteten Genexpressionsprofilen. Stimulation mit Fc-Reg4 bzw. HIP/PAP-Fc gegenübergestellt zur Kontrollgruppe Fc-alleine und unstimuliert.

Aus dieser Analyse lässt sich eine Gruppe an Genen herausstellen, die in ihren Expressionswerten einen Verband zwischen Fc-stimulierten und unbehandelten Proben bilden und der Stimulation durch HIP/PAP-Fc bzw. auch Fc-Reg4 gegenübergestellt werden können (Abbildung III.2.3.a.; Darstellung aller Affymetrix-Probesets, die bei mindestens einer Behandlung einen p-Wert  $< 0,01$  und eine mindestens 1,5-fache Regulation aufweisen). Die Stimulation durch HIP/PAP-Fc sowie Fc-Reg4 führte in der Mehrzahl der als signifikant regulierten Gene zu einer Expressionsinduktion dieser. Ist dieser erkennbare Trend durch HIP/PAP-Fc und Fc-Reg4 gleichartig, lassen sich noch weitere zwei Blöcke innerhalb dieser Beobachtung bilden.

Die Gene der Farbwärmestufen Grafik von oben nach unten gelesen von KIA A0372 bis MAP4K3 wurden stärker durch HIP/PAP-Fc reguliert, während die Gruppe von NA bis JOSD3 in ihrer Expression stärker durch Fc-Reg4 induziert wurden. Neben dieser Beobachtung bewirkte die Stimulation durch HIP/PAP-Fc und Fc-Reg4 jedoch auch die Reduzierung des Expressionsniveaus für eine Gruppe an Genen. Hierzu zählen SLC6A8, CEP35D, SLC9A1, MGCD712 und WDR35. Auffällig ist noch der Block der Farbwärmestufen Grafik von GTPBP8 bis NNMT, welcher nur durch HIP/PAP-Fc differenziell im Expressionsniveau reguliert wurde.



Des Weiteren wurden differentiell exprimierte Gene, die ihrem global biologischen Kontext nach Apoptose bzw. Mitose relevanten Gene zugeordnet werden konnten ermittelt, diese Kategorisierung erfolgte durch Unterstützung der Datenbank (<http://www.geneontology.org>). Für die Berechnung der differentiellen Expression wurde hierbei ein p-Wert von kleiner 0,05 gewählt und ebenfalls mit moderiertem T-Test berechnet. Gleichfalls wie bei der Analyse nach differentieller Expression auf alle erfassten Gene, tritt bei Apoptose relevanten Genen wieder die HIP/PAP-Fc Stimulation hervor, wenn diese Gruppe der Gruppe Fc und unstimuliert gegenübergestellt wurde.

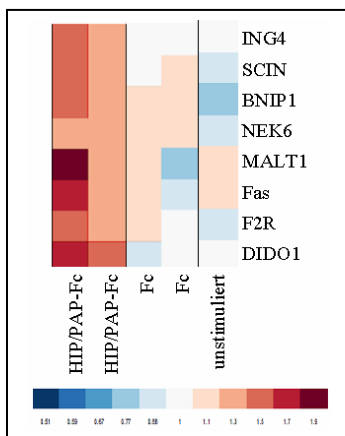


Abbildung III.2.2.b. Farbwärmestufen Grafik von differentiell exprimierten Genen nach „gene ontology“ Kategorie „Apoptose“. Stimulation mit HIP/PAP-Fc gegenübergestellt zur Kontrollgruppe Fc-alleine und unstimuliert.

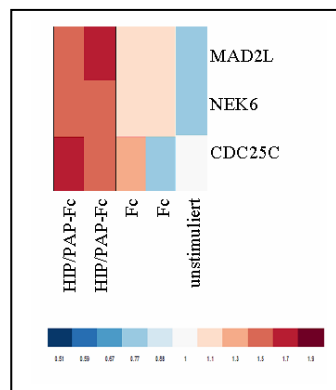


Abbildung III.2.2.c. Farbwärmestufen Grafik von differentiell exprimierten Genen nach „gene ontology“ Kategorie „Mitose“. Stimulation mit HIP/PAP-Fc gegenübergestellt zur Kontrollgruppe Fc-alleine und unstimuliert.

In Tabelle III.2.3.Tb sind die Gene dieser Analyse gelistet. Ebenso tritt HIP/PAP-Fc Stimulation nach dieser Analyse auch bei Mitose relevanten Genen als differentieller Stimulus hervor. Die Kategorisierung nach Mitose relevanten Genen erfolgte ebenfalls durch das Anwenden der Datenbank (<http://www.geneontology.org>). Auch diese Ergebnisse sind in Farbwärmestufen Grafiken dargestellt (Abbildung III.2.2.b und III.2.2.c).

Diesen ermittelten Genen ist allen gemeinsam, dass die Stimulation durch HIP/PAP-Fc zu einer Induktion ihrer Expression führte. Neben ING4, welches bereits in der vorangestellten Analyse aller differentiell exprimierten Gene ermittelt wurde, treten hier die in den Farbwärmestufen Grafiken III.2.2.b. und –c. dargestellten Gene hinzu.

Bei der Einordnung der Gene nach deren bislang beschriebenen Funktionen lassen sich aus publizierten Daten drei Gruppen, die jeweils einen Kontextverband bilden, herausstellen. Eine Gruppe, die in Zusammenhang mit Entzündungsmechanismen und der NFκB-Signalkaskade stehen, bildet sich aus ING4, CCRL2 und MAP3K4,

MALT1 und Fas (Kim, S. *et al.* 2004; Raho, G. *et al.* 2007; Fan, P. *et al.* 1998; Galligan, C.L. *et al.* 2004; Diener, K. *et al.* 1997; Varfolomeev, E. *et al.* 2006; Korkolopoulou, P. *et al.* 2007; Rzeszutko, M. *et al.* 2007).

Bereits in Prozessen der Apoptoseregulation und des zellulären Überlebens beschrieben wurden Itsn1, PGDH und BNIP (Prdescu, S.A. *et al.* 2007; Quidville, V. *et al.* 2006; Myung, S.J. *et al.* 2006; Zhang, H. *et al.* 1999; Nakajima, K. *et al.* 2004). Die dritte Gruppe tritt im Zusammenhang mit Mechanismen der zellulären Mobilität und neuronalen Differenzierungsprozessen auf, hierzu zählen SIP, EXOC5, SLC6A8, SLC9A1, CA11, SCIN und F2R (Ogawa, C. *et al.* 2007; Evans, E.H. *et al.* 2007; Hsu, C.H. *et al.* 2004; Dodd, J.R. *et al.* 2005; Rosenberger, R.H. *et al.* 2004; Meima, M.E. *et al.* 2007; Cardone, R.A. *et al.* 2007; Taniuchi, K. *et al.* 2002; Lejen, T. *et al.* 2002; Rodriguez del Castillo, A. *et al.* 1992; Zunino, R. *et al.* 2001; Kaufmann, R. *et al.* 2007; Traynelis, S.F. *et al.* 2007; Salah, Z. *et al.* 2007).

Die Darstellung der berechneten Zahlenwerte sowie der Geninformationen aus Datenbankeinträgen aus (<http://www.geneontology.org>) zu diesen Analysen sind im Anhang angegeben.

## Zusammenfassung der Ergebnisse III.2. Stimulationsexperimente zur Detektion von Reg4 und HIP/PAP vermittelter Signaltransduktion

Die in der Einleitung beschriebenen bereits publizierten Aspekte von Signaltransduktionsmechanismen angestoßen durch Reg4 und HIP/PAP deuten darauf hin, dass Regulationselemente involviert in die Apoptose-, Mitose- und Entzündungsmodulation eine Rolle zu spielen scheinen. Tumorzellen könnten durch diese angestoßenen Mechanismen einen Überlebens- bzw. Wachstumsvorteil erlangen. Somit ist ein besseres Verständnis dieser Vorgänge grundlegend zur Charakterisierung möglicher therapeutischer Angriffspunkte innerhalb dieser Reg4 oder HIP/PAP exprimierenden Tumorzellen. Da sich Signaltransduktionsmechanismen vor allem auch in Tumorzellen durch eine hohe Redundanz auszeichnen, ist es nicht unwahrscheinlich, dass angestoßene Mechanismen durch Reg4- und HIP/PAP mehrfach parallel prozessiert werden.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit über die bereits publizierten Daten hinaus, die als theoretische Anhaltspunkte beachtet wurden, in einem breiten Spektrum nach neuartigen Mechanismen gesucht.

Es schien daher sinnvoll verschiedene Technologien anzuwenden. So sollten durch Reporteranalysen vor allem Hinweise auf grundlegende Promotorelemente, die stimulierbar in Abhängigkeit von Reg4 stehen, ermittelt werden. Durch die hierfür verwendeten Expressionsysteme konnten jedoch keine eindeutig positiven Effekte bestimmt werden.

Auf Ebene der Proteinphosphorylierung wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Hierbei wurden Unterschiede zwischen AGS- und CX1- verglichen mit HT29-Zellen ermittelt. Die Zelllinien mit endogener Expression von Reg4, AGS und CX1, zeigten eine leicht induzierte Phosphorylierung von Erk1 und -2 in Abhängigkeit von Reg4-Fc und Fc-HIP/PAP, hingegen zeigten HT29 Zellen mit einer nicht nachweisbaren Reg4 Expression, eine erhöhte Phosphorylierung von NF $\kappa$ B in Abhängigkeit von Reg4-Fc oder Fc-HIP/PAP.

Bislang noch nicht beschrieben sind Effekte auf den Gesamtzustand der mRNA Expression ausgelöst durch Reg4 oder HIP/PAP. Dies ist vor allem auch vor dem Hintergrund der erwähnten Redundanzmechanismen von Signalwegen in Tumorzellen entscheidend.

Durch die hier durchgeführte Mikroarray Analyse ließ sich nach stringenter Auswertung eine Gruppe an Genen herausbilden.

Dieses statistisch stringente Vorgehen gewährleistet mit hoher Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf Reg4 oder HIP/PAP zurückführbar sind.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Gene nach publizierten Arbeiten in den Kontext Entzündungsmodulation, Apoptoseregulation und zelluläre Mobilität gestellt werden können.

Die erhaltenen Daten stellen somit eine wichtige Erweiterung dar, um den Einfluss durch Reg4 oder HIP/PAP auf den physiologischen Gesamtzustand einer Zelle zu verstehen.

## III.3. Bindungs- und Interaktionsexperimente mit Reg4 und HIP/PAP

### III.3.1. Bindungsexperimente mit <sup>125</sup>Iod-markierten Liganden

Es wurde bereits beschrieben, dass Reg4- und HIP/PAP sekretierte Proteine sind und somit anzunehmen ist, dass diese extrazellulären Proteine ihre biologischen Funktionen über ebenfalls extrazelluläre Partner oder Transmembranrezeptoren ausüben. Die beobachteten Effekte auf Signalkaskaden die NFκB und Erk1/2 einzuschließen scheinen (Abbildung III.2.2.a., -b & -c), können durch die Existenz spezifischer Rezeptorproteine erklärt werden, die zelltypspezifisch in HT29- bzw. CX1- und AGS-Zellen exprimiert werden und falls mit Reg4 oder HIP/PAP assoziiert, selektiv eine Reg4 bzw. HIP/PAP vermittelte Signalkaskade induzieren.

Einen Hinweis auf eine Interaktion von Liganden der Reg-Proteinfamilie mit Zelloberflächenproteinen ist die beschriebene Interaktion von Reg1α mit EXTL3 (Kobayashi, S. *et al.* 2001; Bluth, M. *et al.* 2006).

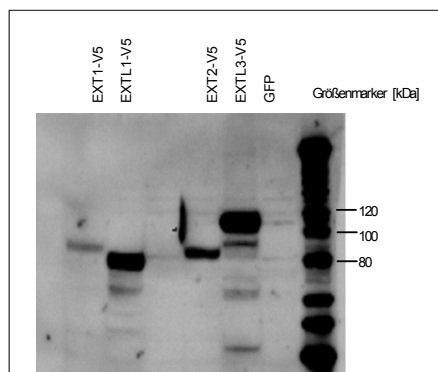


Abbildung III.3.1.a. SDS-PAGE mit nachfolgender Westernblotanalyse von Lysaten von transient transfizierten CHO Zellen mit den angegebenen EXT(L) sowie einem GFP-Expressionsplasmid. Nachweis durch Anti-V5-Antikörper (1:4000).

Durch die nachfolgend beschriebenen Bindestudien von <sup>125</sup>Iod-markiertem Reg4 und HIP/PAP mit HT29-, CX1- und AGS-Zellen sollten Hinweise auf eine spezifische Bindung der Proteine an diese Zellen gesammelt werden, um gezielt eine Rezeptorisolierung aus diesen Zellen vornehmen zu können. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die beschriebene Interaktion von Reg1α mit EXTL3 auch auf Reg4 und HIP/PAP zutrifft und ob weitere Mitglieder der EXT-Proteinfamilie Interaktionen mit Proteinen der Reg-Proteinfamilie eingehen

können. Hierzu wurden CHO- Zellen transient mit den EXT-Vektoren (Abbildung III.1.1.b.) transfiziert, die Expression der EXT-Proteine wurde durch einen parallel

Ansatz mit nachfolgender Proteinisolierung und anschließender Westernblotanalyse überprüft. Durch die Westernblotanalyse ließ sich aus den Lysaten der EXT1-Transfektion ein Signal detektieren, was sich etwas oberhalb der 80 kDa Markerbande befindet. Das kalkulierte Molekulargewicht von EXT1 ist 86,3 kDa zuzüglich des „V5-Tags“, der mit 1,42 kDa berechnet wurde. EXT1-V5 würde sich somit bei einem Molekulargewicht von 87,7 kDa detektieren lassen. EXTL1 kann zuzüglich „V5-Tag“ mit 76,2 kDa kalkuliert werden, der Nachweis von EXT2 würde nach kalkuliertem Molekulargewicht zu einem Signal in der Höhe von 83,6 kDa und der Nachweis von EXTL3-V5 nach kalkuliertem Molekulargewicht zu einem Signal in der Höhe von 105,4 kDa führen (Abbildung III.3.1.a.). In der dritten Spur der abgebildeten Westernblotanalyse wurde keine Probe geladen und aufgetrennt. Die detektierten Signale wurden den jeweiligen EXT(L)-V5 Fusionsproteinen zugeschrieben. Als negativ Kontrolle des Bindungsexperiments dienten CHO-Zellen mit transient transfiziertem GFP-Vektor, die aber durch mikroskopische Kontrolle als positiv Kontrolle für die Transfektion herangezogen werden konnten. Zum Quantifizieren der Bindung von Reg4 und / oder HIP/PAP wurden die genannten Zelllinien 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert und nachfolgend für 24 Stunden bei 37 °C / 5% CO<sub>2</sub> in serumfreiem Medium kultiviert um mit der Zelloberfläche assoziierte Proteine des Serums zu dissoziieren.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den <sup>125</sup>Iod-markierten Liganden, deren Bindung nachfolgend gemessen wurde. Wechselwirkungen von Liganden und Rezeptoren zeichnen sich durch Nano- oder Mikromolare Affinitäten aus. Durch den 500-fachen Überschuss an nicht markiertem Ligand sollte eine Kompetition des jeweils markierten Liganden erreicht werden, was sich durch eine Reduktion des <sup>125</sup>Iod Signals auf etwa 10 % des nicht kompetitierten Signals quantifizieren lassen würde. Die gemessenen Signalintensitäten wurden auf das Fc-Signal ohne 500-fachen Überschuss bezogen, dieses Signal wurde auf 100 % festgelegt. Für CHO-Zellen, die transient mit EXT1, EXTL1, EXT2 und EXTL3 transfiziert waren, konnte keine signifikant erhöhte Signalintensität eines <sup>125</sup>Iod-markierten Fusionsproteins gegenüber Fc festgestellt werden. Ebenso führte der Einsatz des 500-fachen Überschusses an unmarkiertem Fusionsprotein auch nicht zu einer Reduktion eines der ermittelten Signale. Allerdings wurde insbesondere bei der Zugabe eines 500-fachen Überschusses von HIP/PAP-Fc eine deutlich erhöhte Signalintensität verglichen zu dem Ansatz ohne Überschuss erhalten. Diese war um den Faktor 8 bis

15 erhöht. Dies könnten Hinweise auf eine möglicherweise vorliegende Präzipitation sein (Abbildung III.3.1.b bis f).

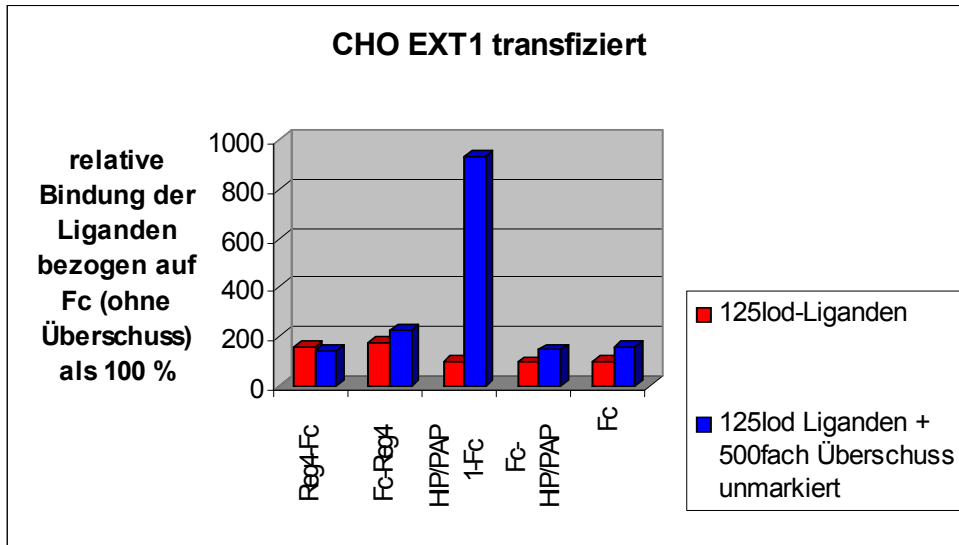


Abbildung III.3.1.b. Bindungsexperiment EXT1 mit Reg4 und HIP/PAP

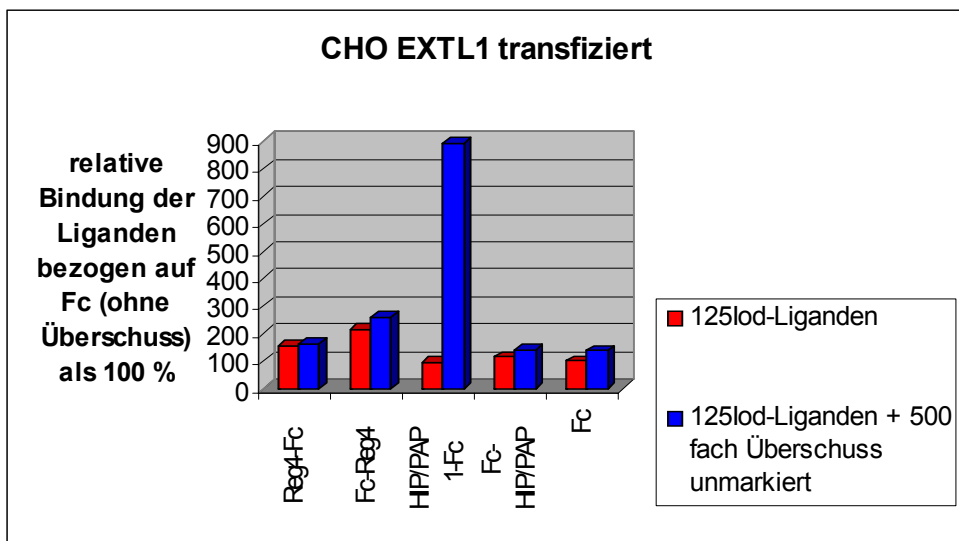


Abbildung III.3.1.c. Bindungsexperiment EXTL1 mit Reg4 und HIP/PAP

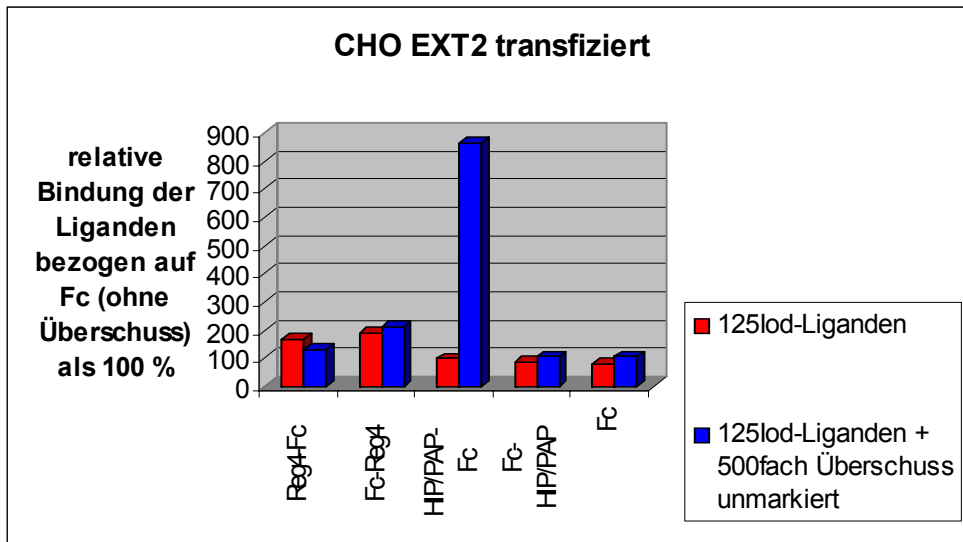


Abbildung III.3.1.d. Bindungsexperiment EXT2 mit Reg4 und HIP/PAP

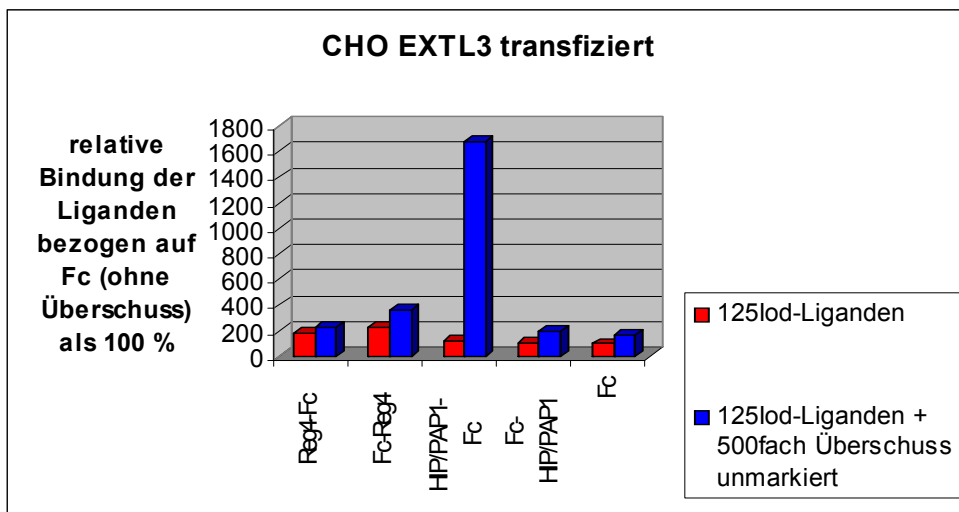


Abbildung III.3.1.e. Bindungsexperiment EXTL3 mit Reg4 und HIP/PAP

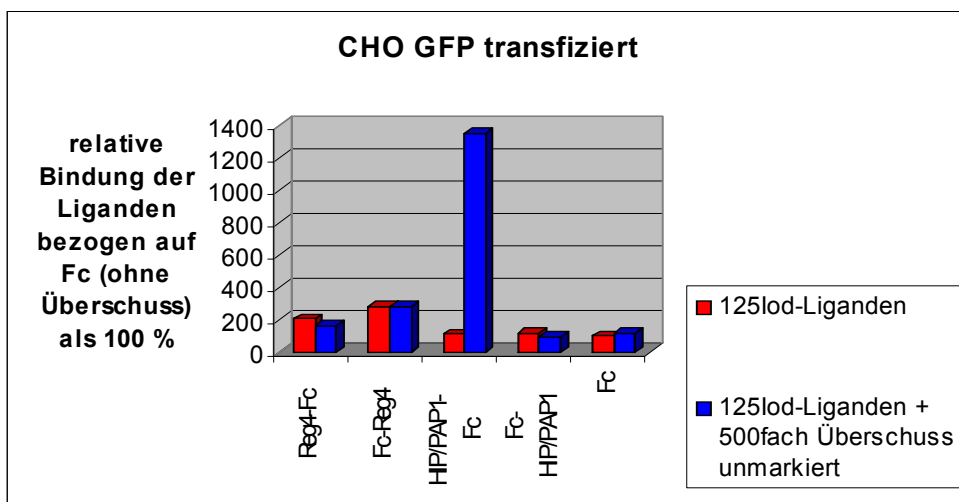


Abbildung III.3.1.f. Bindungsexperiment Kontrolle GFP mit Reg4 und HIP/PAP



Im Falle der Bindungsexperimente mit AGS- und CX1-Zellen war diese Signalerhöhung durch die Zugabe des 500-fachen Überschusses an unmarkiertem Fusionsprotein ebenso für HIP/PAP-Fc detektierbar. Die Erhöhung lag hierbei jedoch bei AGS-Zellen bei dem Faktor 1,7 und bei CX1-Zellen bei 3. Ähnliche Tendenzen einer Signalerhöhung durch Zugabe an unmarkiertem Fusionsproteinen ließen sich sowohl bei AGS- als auch bei CX1-Zellen auch bei den weiteren eingesetzten Varianten von Reg4 und HIP/PAP ermitteln. Bei beiden genannten Zelllinien konnte aber im Vergleich zu den EXT(L)-transfizierten CHO-Zellen eine höhere Signalintensität von HIP/PAP-Fc gegenüber Fc ermittelt werden, bei AGS-Zellen waren die quantifizierten Signale von HIP/PAP-Fc um den Faktor 6 verstärkt, bei CX1-Zellen um den Faktor 11 (Abbildung III.3.1.g und h).

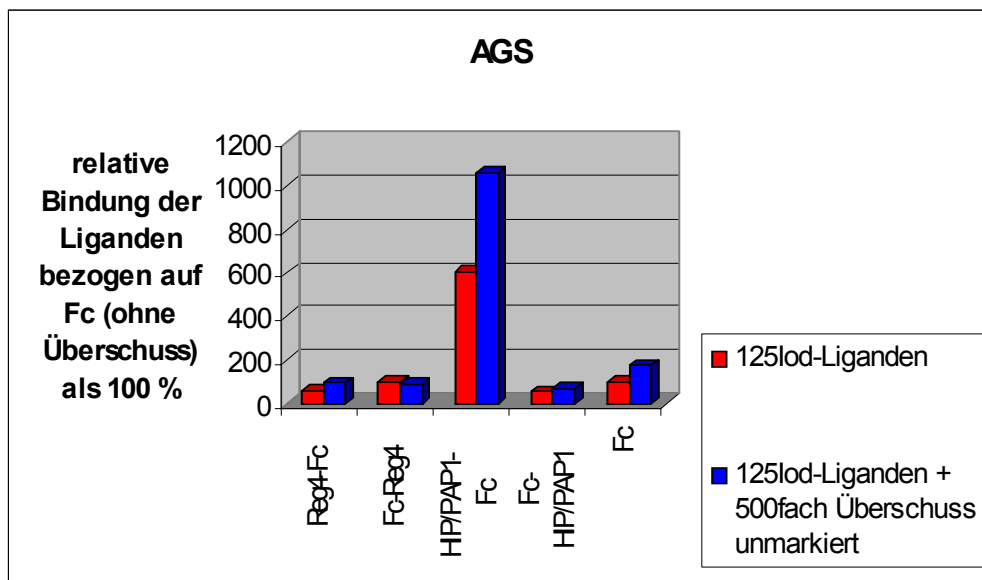


Abbildung III.3.1.g. Bindungsexperiment Reg4 und HIP/PAP an AGS

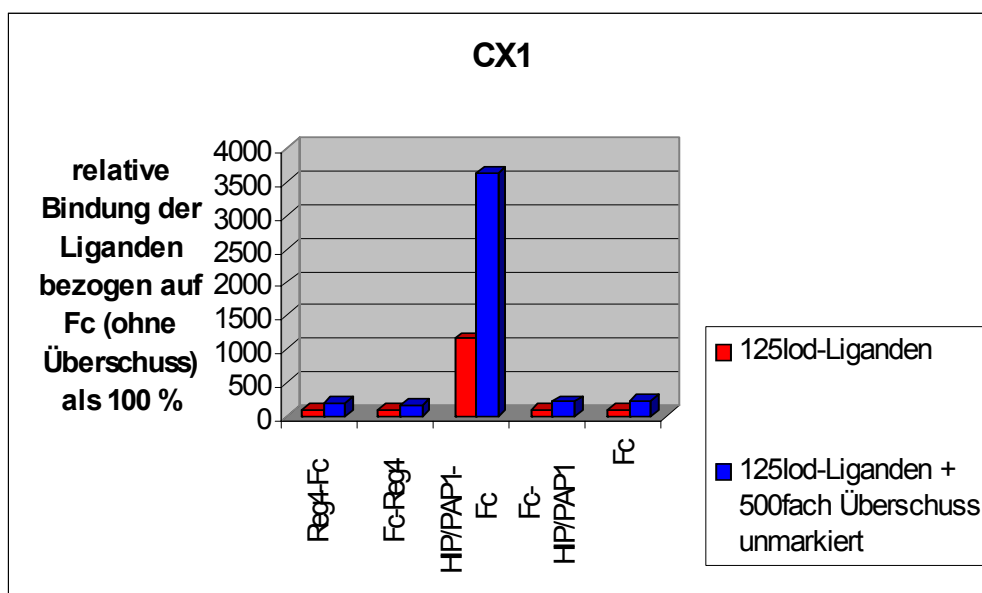


Abbildung III.3.1.h. Bindungsexperiment Reg4 und HIP/PAP an CX1

Nach gleichem Verfahren durchgeführte Bindungsexperimente mit HT29-Zellen lieferten die bereits vormals beobachteten Resultate für HIP/PAP-Fc mit einer erhöhten Signalintensität durch Zugabe an unmarkiertem Fusionsprotein. Die erhaltenen Signalintensitäten aller Fusionsproteine lagen dabei in der Größenordnung der gemessenen Fc Signalintensitäten (Abbildung III.3.1.i).

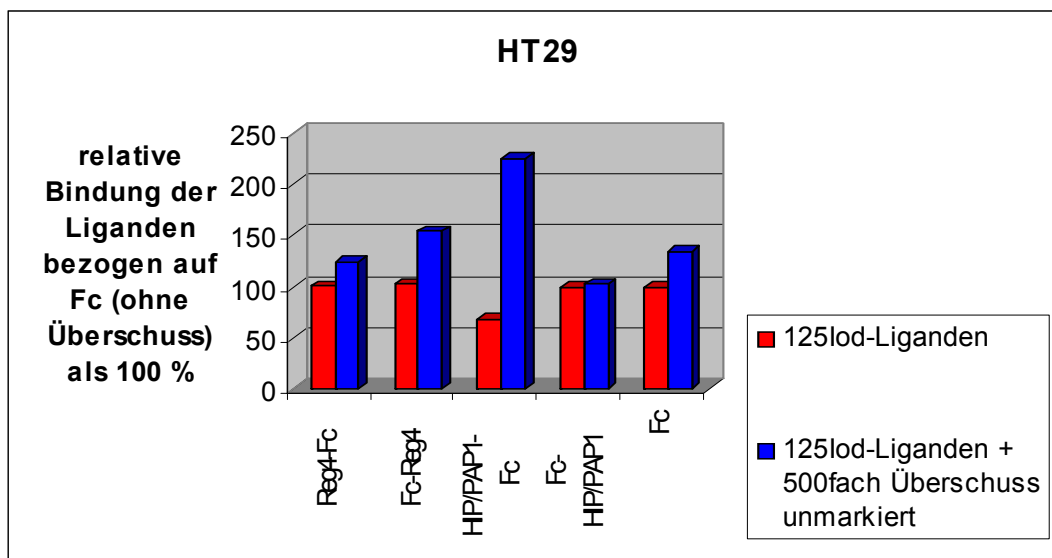


Abbildung III.3.1.i. Bindungsexperiment Reg4 und HIP/PAP an HT29

Um der beobachteten Signalintensitätserhöhung durch Zugabe an unmarkiertem Protein, welche als Hinweis auf vorliegende Präzipitationseigenschaften der Proteine gewertet wurde, entgegen zuwirken, wurden die Experimente in Anwesenheit von 1 % BSA wiederholt. Hierbei zeigte sich jedoch diese Tendenz erneut und gleichstark ausgeprägt. Dennoch wurde auch unter diesen Bedingungen die Signalstärke von HIP/PAP-Fc verglichen zu Fc bei AGS- und CX1-Zellen erhöht vorgefunden. Des Weiteren wurden auch HT29-Zellen unter diesen Bedingungen erneut inkubiert, wobei sich auch bei diesen Zellen eine erhöhte Signalstärke von HIP/PAP-Fc gegenüber Fc erfassen ließ, die um den Faktor 3 erhöht vorgelegen hat (Abbildung III.3.1.j bis l).

Eine eindeutige Aussage, ob eine spezifische Bindung der Proteine an HT29-, AGS- und CX1-Zellen vorliegt, sollte aus diesen Experimenten jedoch nicht abgeleitet

werden. Des Weiteren wurden die Daten der EXT(L) exprimierenden CHO-Zellen nicht als endgültiges Ergebnis einer nachzuweisenden Reg4 oder HIP/PAP Wechselwirkung mit Proteinen der EXT(L)-Familie gewertet. Dies führte zur Konzipierung von anschließenden Copräzipitationsexperimenten.

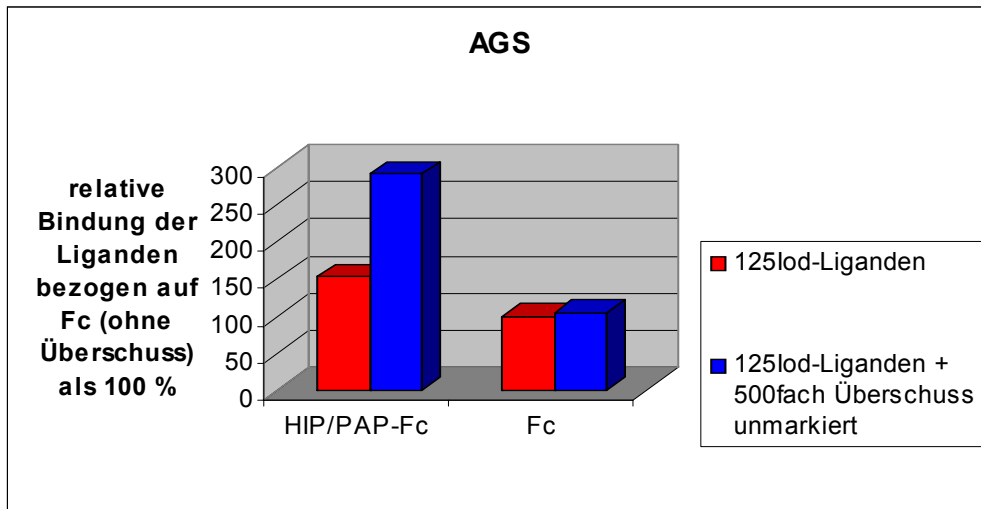


Abbildung III.3.1.i. Bindungsexperiment Reg4 und HIP/PAP an AGS

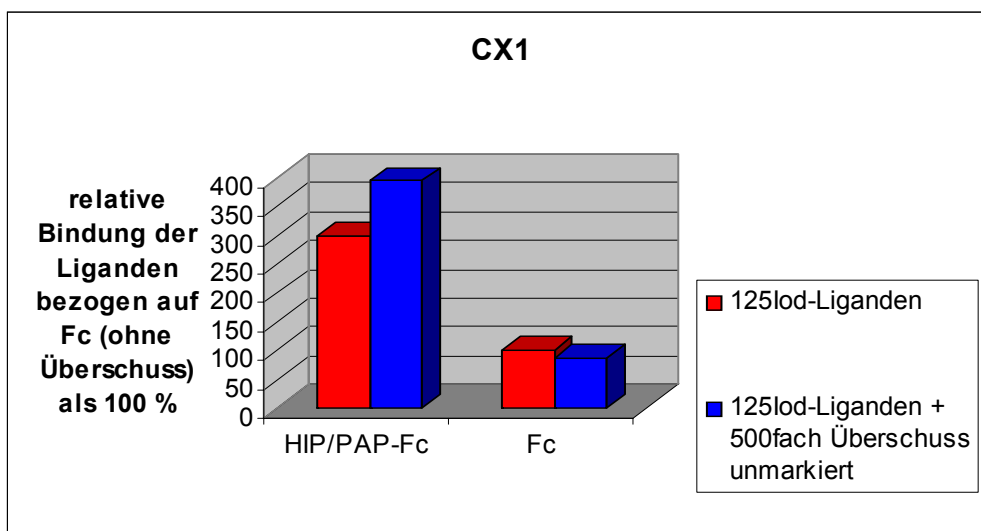


Abbildung III.3.1.i. Bindungsexperiment Reg4 und HIP/PAP an CX1

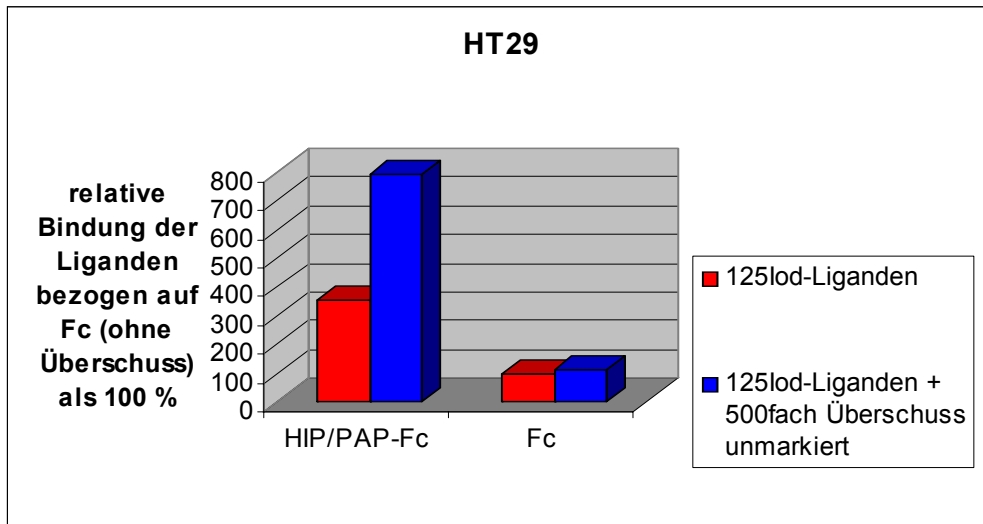


Abbildung III.3.1.i. Bindungsexperiment Reg4 und HIP/PAP an HT29

### III.3.2. Copräzipitationsexperimente

Da aus den Bindestudien mit  $^{125}$ Iod-markierten Liganden keine eindeutige Aussage über eine mögliche spezifische Interaktion der Fc-Fusionsproteine mit Mitgliedern der EXT Proteinfamilie abgeleitet werden konnte, wurde durch Copräzipitationsexperimente ein alternativer Ansatz überprüft.

Hierzu wurden Reg4-Fc konditionierte Zellkulturüberstände erhalten aus transient transfizierten HEK293T Zellen mit pdCs-Fc-Reg4 Vektoren verwendet. Diese konditionierten Überstände wurden mit Protein A/G Sepharose inkubiert. Nachfolgend wurde diese Matrix mit Zelllysaten von HEK293T Zellen inkubiert, die transient mit Expressionsvektoren der EXT-V5-Mitglieder transfiziert waren. Als negative Kontrolle wurde „Fc-Tag“ ohne fusioniertes Protein und IFN- $\gamma$ -Fc, sowie ein Lysat von HEK293T Zellen welche die Membranproteine EGFR-V5 und DR5-V5 exprimieren eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die konditionierte Protein A/G Sepharose erneut sedimentiert und unspezifische Interaktionspartner durch Waschschritte in Lysepuffer dissoziiert. Im Anschluss wurden mit der Protein A/G Sepharose assoziierte EXT-Proteine durch Westernblotanalyse überprüft (Abbildung III.3.2.a).

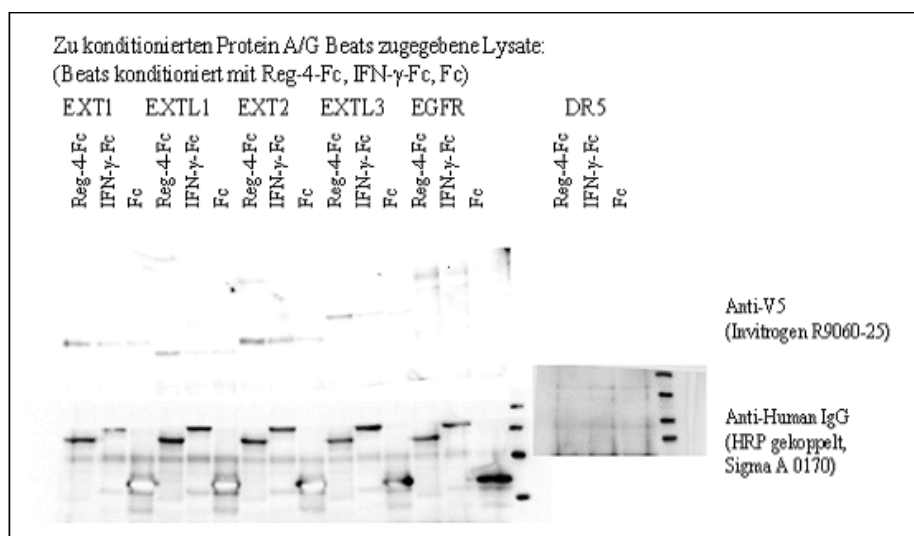


Abbildung III.3.2.a. Westernblotanalyse der Copräzipitation von EXT(L)-Proteinen mit konditionierter Protein A/G Sepharose Matrix mit Fc und Fc-tragenden Fusionsproteinen. Nachweis mittels anti-V5 und anti-IgG Antikörper.

Der Einsatz von Anti-IgG-gerichtetem Antikörper führte in der durchgeführten Westernblotanalyse zu spezifischen Signalen, die Reg4-Fc, IFN- $\gamma$ -Fc und Fc alleine

zugeordnet werden konnten. Die Signalintensität ist dabei für die Spur mit Reg4-Fc und IFN- $\gamma$ -Fc vergleichbar, hingegen bei Fc alleine deutlich stärker. Dies wurde auf die Expressionsstärke und die Proteinkonzentration zurückgeführt, so dass bei Fc alleine von einer höheren Proteinkonzentration ausgegangen wurde. Durch Verwenden des Anti-V5-Antikörpers ließen sich deutliche Signale in den Proben, die durch Reg4-Fc copräzipitiert waren, detektieren. Die Signalstärken in den Proben, die durch IFN- $\gamma$ -Fc und Fc alleine copräzipitierten waren unter oder an der Nachweisgrenze. Die durch den Anti-V5-Antikörper detektierten Signale wurden den EXT(L)-V5 Fusionsproteinen zugeordnet. Es wurde aus diesen Daten auf eine Copräzipitation von EXT1-V5, EXTL1-V5, EXT2-V5, und EXTL3-V5 mit Reg4-Fc geschlossen. Keine Signale wurden hingegen durch den Anti-V5-Antikörper in den Proben mit DR5-V5 ermittelt. Ein schwaches Signal wurde allerdings bei EGFR-V5 in dem Copräzipitationsansatz mit Reg4-Fc erhalten.

Aus diesen Resultaten ließ sich ableiten, dass eine Interaktion zwischen Proteinen der Reg-Familie und putativen Interaktionspartnern durch Copräzipitation mittels Protein A/G Sepharose erfasst werden könnten.

Aus diesem Grunde wurden Zelllysate von AGS- und CX1-Zellen, die sich beide durch endogene Reg4 Expression auszeichnen und Anhaltspunkte aus den <sup>125</sup>Iod-markierten Bindestudien erhalten waren, mit Reg4-Fc Fusionsproteinen und Protein A/G Sepharose inkubiert. Als Kontrolle wurde Fc ohne fusioniertes Protein und Protein A/G Sepharose alleine verwendet. Nach SDS-PAGE und chromogener Detektion dieser Fc-Copräzipitation wurden schwache Banden von separiertem Protein detektiert werden, die in den Ansätzen von Fc und Protein A/G alleine nicht erscheinen (Abbildung III.3.2.b. & c.). Diese durch Pfeile markierten Banden wurden zur massenspektroskopischen Analyse eingesetzt, erhaltene Signale lagen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze und ließen keine eindeutige Bestimmung zu. Rot markierte Pfeile kennzeichnen die Banden, die Fc alleine und den Reg4-Fc Fusionsproteinen zugeordnet worden waren.

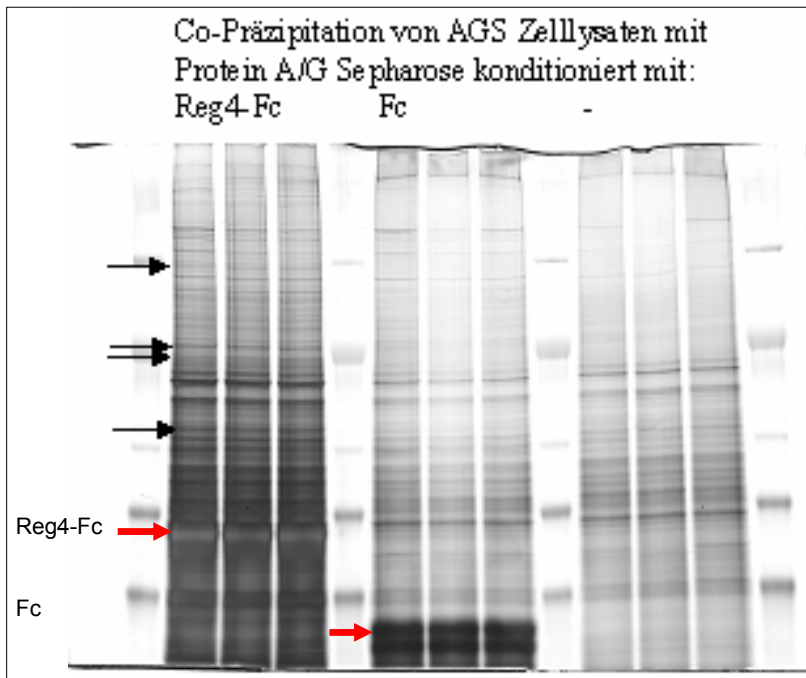


Abbildung III.3.2.b. Silberfärbung von PAGE von elektrophoretisch getrennten copräzipitierten Proteinen aus AGS Lysaten mit Reg4 konditionierter Protein A/G Sepharose.

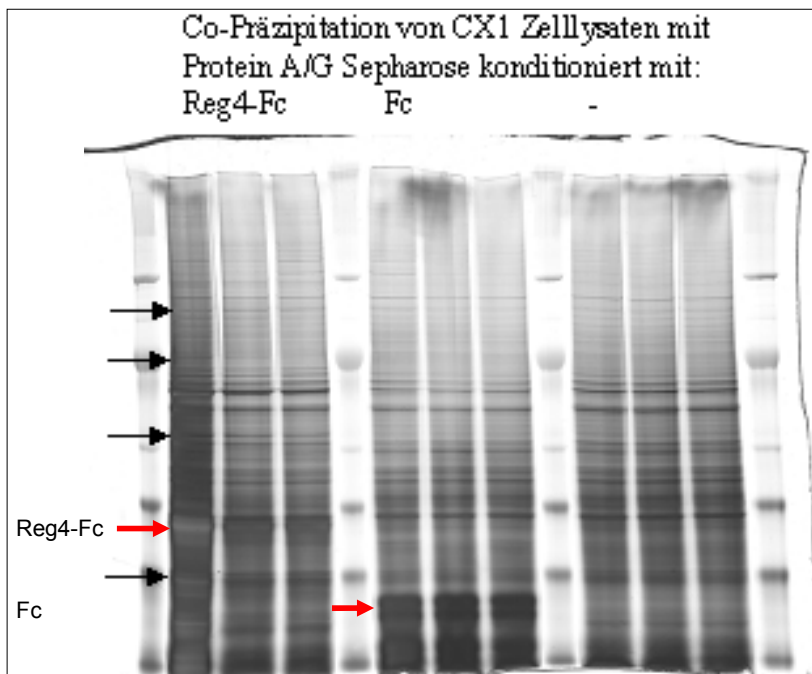


Abbildung III.3.2.c. Silberfärbung von elektrophoretisch getrennten copräzipitierten Proteinen aus CX1 Lysaten mit Reg4 konditionierter Protein A/G Sepharose.

## Zusammenfassung der Ergebnisse III.3. Bindungs- und Interaktionsexperimente mit Reg4 und HIP/PAP

Da die Proteine Reg4 und HIP/PAP in sekretierter Form extrazellulär vorliegen, wird allgemein angenommen, dass der biologische Effekt der Signaltransduktion über Transmembranrezeptormoleküle vermittelt wird.

Die Kenntnis solcher Transmembranproteine ist nicht nur für das Verständnis nachgeschalteter Signaltransduktionsprozesse von grundlegender Bedeutung. Da Transmembranrezeptorproteine häufig gute Angriffspunkte für Therapeutika der Krebstherapie darstellen, würde die Charakterisierung eines solchen Proteins neue Ziele der Krebstherapeutikaentwicklung darstellen.

Mittels der generierten Fusionsproteine ließen sich Bindungsexperimente mit Zelllinien durchführen, die aus den Stimulationsexperimenten als sensitiv gegenüber Reg4 oder HIP/PAP Stimulation hervorgingen.

Durch Wettbewerbsversuche ließ sich jedoch nicht eindeutig eine Bindungskurve mit einem definiertem Bindungskoeffizienten ermitteln. Dennoch zeigt vor allem HIP/PAP-Fc verglichen zu Fc und den weiteren Mitgliedern der Reg-Proteinfamilie eine erhöhte Signalintensität.

Mittels der fusionierten IgG $\gamma$  Domäne wurden darüber hinaus Copräzipitationsexperimente durchgeführt, um etwaige interagierende Proteine zu ermitteln. Dabei wurde für Reg4 die Interaktion mit Proteinen der EXT Familie gezeigt, wie dies bereits für Reg1 und EXTL3 publiziert ist. Diese Beobachtung für Reg4 ist bislang noch nicht beschrieben, ebenso war bislang unbekannt, dass neben EXTL3 offenbar auch weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie unter den genannten Bedingungen mit Mitgliedern der Reg-Familie in Interaktion treten können. Diese Erkenntnisse wurden als wichtiger Hinweis gewertet, dass die Fusionsproteine geeignet für weitere Interaktionsexperimente sind. Wenn auch aus den Bindungsexperimenten und den Copräzipitationen möglicher putativer Interaktionspartner aus AGS oder CX1 Zelllysaten nicht eindeutige Ergebnisse bestimmt werden konnten, so sollte sich dennoch von diesen Erfahrungen ausgehend ein Detektionssystem zur Isolierung putativer Rezeptorproteine aufbauen lassen.



## IV. Diskussion

### IV.1. Generierung und Auswahl der Modellsysteme

Zur funktionellen Charakterisierung von Reg4 und HIP/PAP abhängigen Signaltransduktionsmechanismen und einem fundierterem Verständnis der biologischen Funktion der Proteine während der Krebsentstehung wurden Modellsysteme herangezogen.

Dies erforderte die Generierung von Expressionssystemen zur Erzeugung von Reg4 und HIP/PAP Proteinen, die Auswahl von Tumorzellmodellen zur gezielten Stimulation durch Reg4 und HIP/PAP sowie Antikörper zum spezifischen Nachweis der Proteine.

#### Erstellen von Reg4 und HIP/PAP sowie EXT1, EXTL1, EXT2 und EXTL3 Expressionssystemen

Die erzeugten Expressionssysteme waren die notwendigen molekularen Werkzeuge für die genannten nachfolgenden Experimente zur Stimulation, Copräzipitation und der Bindestudien. Die zur Reinigung von Reg4- und HIP/PAP-Fusionsproteinen generierten Klone können als stabile Systeme auch zukünftig hierfür herangezogen werden. Derartige Fusionsproteine von Reg4 und HIP/PAP sind bislang nicht beschrieben und können über die hier genannten Experimente hinaus zu biochemischen Interaktionsexperimenten und zur Isolation von putativen Interaktionspartnern genutzt werden. Die Reg4- und HIP/PAP-Expressionssysteme ohne „Tag“ wurden im Rahmen der Reporterstudien eingesetzt. Diese Expressionssysteme ohne „Tag“ sind eine wichtige Erweiterung. Hierdurch konnten Überexpressionsmodelle durch transiente Transfektion entwickelt werden, so dass diese Systeme Modelle nachbildeten, die Beobachtungen aus klinischen Studien mit einer gesteigerten Reg4 Expression aufgriffen. Einzig die Expressionssysteme mit fusioniertem „GST-Tag“ wurden über die geplante Reinigung von Protein zur Immunisierung hinaus nicht weiterverwendet.

Die erzeugten Expressionssysteme von EXT1, EXTL1, EXT2 und EXTL3 sind alle mit „V5-Tag“ ausgestattet. Dieser „Tag“ wurde erfolgreich zum spezifischen Nachweis der Proteine eingesetzt.

### Generierung von Reg4 und HIP/PAP Antikörpern

Zur Generierung der Antikörper sollten Proteine in *E.coli* exprimiert werden, mit Hilfe des „GST-Tag“ gereinigt werden und nachfolgend zur Immunisierung verwendet werden. Die Expression der verwendeten GST-Reg4 und GST-HIP/PAP Fusionsvektoren führte jedoch zur Ablagerung der Proteine in „inclusion bodies“. Mögliche Ursachen hierfür können hohe Expressionsraten durch die zu Grunde liegenden transgenen Mechanismen sein. Durch eine Konzentrationserhöhung von einem Protein kann es zu Proteinaggregation dieser Moleküle kommen, dies wird gleichfalls bei der Kristallstrukturanalytik genutzt. Bei Aggregationsprozessen innerhalb von Zellen spielen häufig Faltungsprozesse, die einer thermodynamischen Kinetik gehorchen, eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich eignen sich „inclusion bodies“ zur Proteinreinigung, daher werden Expressionssysteme vielfach bewusst nach diesem Kriterium ausgewählt. Häufig geht aber einer derartigen Proteinaggregation eine unphysiologische Proteinreifung und Faltung voraus, in dieser Arbeit führte auch ein Absenken der Temperatur auf 28 °C und einer damit verbundenen Reduzierung der Proteinbiosyntheseaktivität nicht zur Erhöhung des solubilisierten Anteils. Es kann angenommen werden, dass die Proteine in einem unreifen Zustand in den Aggregaten vorliegen (Carrio, M & Villaverde, A; 2001). Darauf folgend wurden synthetische Peptide, abgeleitet aus der Primärstruktur der Proteine, zur Immunisierung eingesetzt. Zur Ausbildung einer spezifischen Interaktion eines Antikörpers mit einem Protein zeigen Erfahrungswerte, dass ein solches Epitop in der Regel einen Sequenzabschnitt von 10 Aminosäuren umfassen sollte, im vorliegenden Fall wurden Peptide bestehend aus 15 Aminosäuren eingesetzt (Harlow E. & Lane D. 1988). Es kann jedoch problematisch sein auf Peptide zur Immunisierung zurückzugreifen, da diese nicht zwingend deckungsgleich mit der Oberflächenstruktur eines nativen Proteins sind. Daher sind Antikörper aus einem solchen Verfahren u.U. affin und spezifisch gegenüber denaturiertem Protein, aber nicht gegenüber nativem Protein. Dies schränkt die Verwendungsmöglichkeit solcher Antikörper ein, da Applikationen in denen Proteine in nativem Zustand unter

physiologischen Bedingungen detektiert werden sollen, in diesem Fall nicht durchgeführt werden können. Solche Applikationen können immunologische Detektionen von Proteinen innerhalb von Geweben oder zellulären Strukturen oder auch Präzipitationsexperimente von solubilisiertem aber nicht denaturiertem Protein sein. Die Antikörper wurden in dieser Arbeit im Wesentlichen zum Nachweis von Protein nach Transfektion und von endogener Expression in Westernblotanalysen verwendet, somit konnte diese mögliche Einschränkung toleriert werden.

Entscheidend für die Spezifität der Antikörper kann darüber hinaus der ausgewählte Sequenzabschnitt sein, dieser wurde in dieser Arbeit durch Sequenzvergleichsanalysen gegenüber dem humanem und zur Verfügung stehenden *Mammalia* Proteom abgeglichen.

Die aus der Immunisierung mit diesen Peptiden gewonnenen Antikörper zeigen eine ausreichende Affinität und Spezifität gegenüber Reg4 und HIP/PAP bei Westernblotanalysen. Eine Detektion von Reg4 *in situ* bei AGS- und CX1-Zellen konnte nicht beobachtet werden, so dass angenommen wird, die Antikörper sind zum Nachweis von nativem Protein nicht oder nur eingeschränkt verwendbar.

Allerdings konnte Reg4 und HIP/PAP aus Zellkulturüberständen aus transienter Transfektion mit pcDNA3-Expressionssystemen nachgewiesen sowie der Spezifizierung der gereinigten Proteine der stabilen NS0-Transfektion mit Fc-Fusionsvektorsystemen durch die Antikörper überprüft werden.

## Auswahl von Zelllinien mit endogener Expression von Reg4 und HIP/PAP

Die Auswahl von Zelllinien des Gastrointestinaltraktes mit endogener Reg4- oder HIP/PAP-Expression wurde durch qualitativen Expressionsnachweis auf cDNA und Proteinebene durchgeführt. Hierbei zeigte sich die detektierte Expression von Reg4 auf cDNA Ebene in AGS- und CX1-Zellen auch auf Proteinebene als nachweisbar. Positive Signale wurden dabei sowohl aus Zelllysaten als auch aus Proben des Zellkulturüberstands gemessen. Das Vorhandensein dieser sekretierten Form von Reg4 wurde als ein starkes Indiz dafür gewertet, dass diese Zellen geeignete Modellsysteme darstellen, um die physiologische Funktion von Reg4-abhängigen Effekten daran zu studieren.

Hierbei wurde angenommen, dass die These eines vorhandenen autokrinen Mechanismus, der allgemein für HIP/PAP diskutiert wird (Livesey, F.J. *et al.* 1997), auch auf die sekretierte Form von Reg4 übertragbar ist.

Die auf cDNA-Ebene festgestellte Detektion von Reg4 in ASPC1-, SW948- und HS746T-Zellen konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Die wahrscheinliche Ursache hierfür kann eine Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Antikörper sein.

Das gemessene Signal auf Proteinebene des Zelllysats von Caco2-Zellen zeigte ein Protein an, welches ein geringeres Molekulargewicht als Reg4 besitzt. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine prozessierte Variante von Reg4. Posttranslationale Prozessierungen des aminoterminalen Sequenzabschnitts sind für PAP1 (Ratte) gezeigt worden und werden als eine Vorstufe bei der Ausbildung von PAP1-Aggregaten angenommen (Schiesser, M. *et al.* 2001; Graf, R. *et al.* 2001). Diese Beobachtung in Caco2 Zellen könnte daher einen Hinweis dazu liefern, dass dies ebenso für Reg4 zutreffen kann und dementsprechend vom jeweiligen zellulären Hintergrund abhängig ist, dennoch sind alle Zelllinien aus Tumorgewebe gastrointestinalen Ursprungs (CX1: Kolonkarzinom, AGS: Magenadenokarzinom, Caco2: Kolonadenokarzinom; ATCC; <http://www.lgcpromochem-atcc.com/>).

Caco2-Zellen unterscheiden sich von den übrigen Zelllinien dahingehend, dass in diesen auch die Expression auf cDNA-Ebene von HIP/PAP detektiert werden konnte. Möglicherweise sind die genannten Prozessierungsmechanismen, die für PAP1

diskutiert werden, somit in diesen Zellen aktiv, während in Zellen ohne HIP/PAP-Expression die Prozessierungsmechanismen nicht aktiviert sind.

Allerdings konnte kein positiver Nachweis auf Proteinebene von HIP/PAP in Caco2-Zellen erreicht werden, dabei wird gleichfalls eine Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze als wahrscheinlich angenommen.

Auf Grund der beobachteten Sekretion von Reg4 in CX1- und AGS-Zellen bei dem kalkulierten Molekulargewicht und der Tatsache, dass für beschriebene prozessierte Varianten von HIP/PAP bisher keine Erkenntnisse einer davon abhängigen Signaltransduktionskaskade vorliegen, wurde in Folgeexperimenten ausschließlich auf CX1- und AGS-Zellen mit endogener Reg4-Expression fokussiert, den genannten Beobachtungen bei Caco2-Zellen wurde nicht weiter nachgegangen. Ebenso wurden ASPC1-, HS746T- und SW948-Zellen mit Reg4-Expression auf cDNA nicht für Folgeexperimente herangezogen.

## IV.2. Stimulationsexperimente zur Studie von Signaltransduktionsmechanismen

### Detektion der Reg4- und HIP/PAP abhängigen NF $\kappa$ B- und Erk1/Erk2 Phosphorylierung

Die im Rahmen der Tumorentstehung bedeutenden Mechanismen einer erhöhten Mitoseaktivität und Apoptoseresistenz ließen sich in zahlreichen Arbeiten mit der Expression oder Stimulation durch Proteine der Reg-Familie in Korrelation bringen.

Eingangs ist in dieser Arbeit ausführlich dargestellt, dass Reg1( $\alpha$ ) in Tumorgewebe des Gastrointestinaltraktes und hierbei vor allem in Kolontumoren ektopisch exprimiert vorliegt (Watanabe, T. *et al.* 1990; Macadam, R.C.A. *et al.* 2000; Yonemura, Y. *et al.* 2003; Fukui, H. *et al.* 2004; Sekikawa, A. *et al.* 2005). Hinweise auf eine mitogene Wirkung konnten ebenfalls mehrfach abgeleitet werden, Beobachtungen hierzu wurden sowohl aus Injektionsexperimenten im Tier, aus Regenerationsstudien mit transgenen Modellen, als auch aus Stimulationsexperimenten mit Zellkulturzelllinien erhalten (Watanabe, T. *et al.* 1994; Miyaoka, Y. *et al.* 2004; Zenilman, M.E. *et al.* 1996; Levine, JL *et al.* 2000).

Ein Kernelement der Signaltransduktion und Regulation mitogener Prozesse stellen Mitglieder der „mitogen-activated protein kinases“ (MAPK) dar. Erk1 und -2, die zur dreiarmligen Familie der MAPKs zählen (1.: Erk(s) [„extracellular signal-related kinases“], 2.: c-Jun (JNK(s) [„Jun-amino terminal kinases“]), 3.: p38-MAP), können im Kontext der Zellteilungskontrolle aber auch der Apoptoseregulation genannt werden (Lu, Z. & Xu, S. 2006; Kuida, K. *et al.* 2004). Die Aktivität dieser Kinasen wird durch die Phosphorylierung eines konservierten Threonin-X-Tyrosinrest Motifs vermittelt (Widmann, C. *et al.* 1999). Die kanonische Signalkaskade wird durch Transmembranrezeptoren aktiviert, hieran können Ste20 Kinasen oder auch „small GTP-binding proteins“ beteiligt sein (Gutkind, S.J. *et al.* 2000), nachfolgend werden die Signale dreistufig amplifiziert, der MAPK-Familie sind MAPK-Kinase (MAP2K oder MKK) und MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K oder MEKK) vorgeschaltet (Chang, L. & Karin, M. 2001). Dem gegenübergestellt ist die Wirkung dualspezifischer Tyrosin-Threoninrest-Phosphatasen (Yao Z. & Seger R. 2004). Des Weiteren sind spezifische Interaktionen mit Gerüstproteinen, z.B. Erk1 mit MP1, an der

zielgerichteten Regulation beteiligt. Für die Subfamilie Erk1 und Erk2 konnten proliferative Effekte gezeigt werden, die synergistisch mit autokrinen Wachstumsfaktoren wirken, deren Expression selbst wiederum durch die Erk1 und Erk2 getriebene Formation des AP1 Transkriptionskomplexes induziert wird (Treinies, I. *et al* 1999, Graves, I. *et al* 2000). Die Kinasen Erk1 und Erk2 wirken als Prolin-gerichtete Serin/Threonin Kinasen und phosphorylieren Serin- bzw. Threoninreste in Pro-Leu-Ser oder Thr-Pro Motiven in zahlreichen Substratproteinen, die cytosolisch, cytoskelettassoziiert oder auch final nukleär lokalisiert sind (Pearson, G. *et al.* 2001, Gonzalez, F.A. *et al.* 1991). Diese komplexe, weitverzweigte Signaltransduktion mit Erk (1/2) im Zentrum beinhaltet auch nahezu alle ~ 200 bekannten Onkogene, entweder Erk (1/2) vor- oder nachgeschaltet (Rubinfeld H. & Seger R. 2005). So konnte in zahlreichen Tumortypen (Pankreas, Kolon, Lunge, Ovarien und Nieren) oder tumorabgeleiteten Zelllinien konstitutiv aktivierte MAPK detektiert werden (Hoshino, R. *et al.* 1999).

Im Kontext der Reg-Proteinfamilie wurde eine Aktivierung von Erk1 und Erk2 durch Reg1 $\alpha$  in Zellkulturversuchen beobachtet (Kadowaki, Y, *et al.* 2002). Vorgeschaltete Transmembranrezeptoren, die im Falle der MAPK-Kaskade meistens der Klasse der G-Protein-gekoppelten- aber auch Rezeptortyrosinkinaserzeptoren angehören können, wurden dabei weder ermittelt noch diskutiert.

Solche Beobachtungen wurden bisher nicht für HIP/PAP oder Reg4 gezeigt. Dem gegenüber zu stellen sind jedoch Beobachtungen, die HIP/PAP und auch Reg4 als Faktoren mit mitogener Wirkung identifizierten (Livesey, F.J. *et al.* 1997; Lieu, H.T. *et al.* 2005; Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006) und auch die detektierte Hochregulation in Tumorgewebe sollte in diesen Kontext gesetzt werden (Christa, L. *et al.* 1996; Lasserre, C. *et al.* 1992; Rosty, C. *et al.* 2002; Hervieu, V. *et al.* 2006; Zhang, Y. *et al.* 2003; Violette, S. *et al.* 2003; Gu, Z. *et al.* 2005; Oue, N. *et al.* 2005). Es war daher naheliegend, Effekte von biologisch aktivem HIP/PAP- und auch Reg4-Protein auf dieser Ebene der Signaltransduktion zu überprüfen.

Die detektierte leichte Zunahme der Phosphorylierung von Erk1/2 in AGS- und CX1-Zellen entsprechend einer zunehmenden Konzentration der eingesetzten Fusionsproteine verglichen mit der Stimulation durch Fc alleine, werden als Hinweise auf eine Beteiligung dieser Kinasen gewertet. Der quantifizierte Effekt auf die Erk (1/2) Phosphorylierung durch HIP/PAP-Fc lag bei der Stimulation von AGS Zellen bei ~ 25 % verglichen zur Stimulation durch EGF. Da der Einfluss eines Liganden auf die

Aktivierung einer Signalkaskade von zahlreichen Faktoren abhängig ist, angefangen von der Wechselwirkung mit einer Transmembranrezeptorklasse, die das Signal überträgt und erstmalig amplifiziert, bis hin zu nach geschalteten Faktoren, lassen sich aus diesen Daten noch keine Rückschlüsse auf die der Erk (1/2) vorgeschalteten Mechanismen festhalten.

Den mitotischen Effekten gegenüberzustellen sind Mechanismen, die die Apoptoseresistenz von (Tumor-)Zellen erhöhen. Hierzu sind im Wesentlichen Arbeiten zu HIP/PAP zu nennen, wobei hierbei sowohl *in vivo* durch transgene Modelle als auch in Zellkulturexperimenten eine HIP/PAP abhängige gesteigerte Apoptoseresistenz ermittelt wurde (Lieu, H.T. *et al.* 2005; Ortiz, E.M. *et al.* 1998; Simon, M.T. *et al.* 2003). Neben vereinzelt Hinweisen zu Regulationsprozessen, wobei Reg1( $\alpha$ ) und Reg4 an der Expressionsinduktion der Apoptose-Effektorproteine BCL- $x_L$  beteiligt zu sein scheint (Sekikawa, A. *et al.* 2005; Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006), wurden für HIP/PAP mehrere Arbeiten publiziert, die starke Hinweise auf die Beteiligung von NF $\kappa$ B enthalten.

NF $\kappa$ B lässt sich im Kontext der programmierten Zelltodkontrolle und der zellulären Überlebensrate in Stresssituationen wiederfinden. Hierbei führt in der kanonischen NF $\kappa$ B Signalkaskade ein extrazellulärer Stimulus übertragen durch einen Transmembranrezeptorkomplex zur Phosphorylierung von Inhibitor-von- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), welcher NF $\kappa$ B inhibierend komplexiert. Dieser, durch die I $\kappa$ B-Kinase katalysierte Prozess, mündet in der Degradierung des I $\kappa$ B und zur cytoplasmatisch-nukleären Translokation der NF $\kappa$ B-Faktoren (Bsp.: RelA(p65)/p50). Neben der Phosphorylierung des NF $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B, dessen nachfolgender Degradierung und der nukleären Lokalisation der NF $\kappa$ B-Faktoren, besitzt auch NF $\kappa$ B selbst Phosphorylierungsstellen am Serinrest 276, -529 und -536 (Schmitz, L. *et al.* 2001; Sakurai, H. *et al.* 1999; Wang, D. *et al.* 1998; Schmitz, M.L. *et al.* 1995). Diese können durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden, was gleichfalls zur Dissoziation des NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B-Komplexes führen kann (Kefaloyianni, E. *et al.* 2006; Hall, G. *et al.* 2006; Bohuslav, J. *et al.* 2004).

Typische Stimuli sind hierbei Entzündungs-, Infektions-, Verletzungs- oder andere Stressfaktoren (Pahl, H.L. 1999; Scheidereit, C. 2006). Eine deregulierte NF $\kappa$ B Aktivität wird vielfach in Prozessen mit gestörtem programmiertem Zelltod beobachtet. Die Aktivität von NF $\kappa$ B scheint dabei in zahlreichen Geweben und



Zelltypen in einem engen Bereich austariert zu sein, so dass sowohl verstärkende als auch reduzierende Mutationen von in die NF $\kappa$ B Kaskade involvierten Faktoren mit einer erhöhten Überlebensrate der Zellen auftreten können. (Dutta, J. *et al.* 2006). Neben zahlreichen weiteren Krebsformen wird in Kolon- und Prostata Tumoren eine erhöhte Chemoresistenz und somit gesteigerte Überlebensrate auf eine veränderte NF $\kappa$ B-Aktivität zurückgeführt (Basseres, D.S. & Baldwin A.S. 2006; Rayet, B. & Gelinas, C. 1999; Baldwin, A.S. *et al.* 2001; Karin, M. *et al.* 2000). Durch eine erhöhte NF $\kappa$ B Aktivität können Effekte von proapoptotischen Faktoren wie TNF- $\alpha$  kompensiert werden (Chen, X. *et al.* 2003). Hierbei führt aktiviertes NF $\kappa$ B zur Induktion der Transkription von antiapoptotischen Genen (Dutta, J. *et al.* 2006).

Eine ektopisch induzierte Überexpression des Inhibitors I $\kappa$ B führte in einer HIP/PAP-Stimulation zur Kompetition des vormals vermittelten trophischen Effekts (Livesey, F.J. *et al.* 1997). Die HIP/PAP-Expression wurde jedoch auch als NF $\kappa$ B nachgeschaltet vorgefunden (Ortiz, E.M. *et al.* 1998), was die zentrale Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors unterstreicht und auf komplexe Rückkopplungsmechanismen schließen lässt. Ebenso können IL-6 abhängige Mechanismen mit nachfolgender induzierter HIP/PAP-Expression verstanden werden (Livesey, F.J. *et al.* 1997) sowie wiederum Beobachtungen aus klinischen Proben von Entzündungsreaktionen des Gastrointestinaltraktes mit reziproker Konzentration der Entzündungsfaktoren IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zum gemessenen HIP/PAP-Serumspiegel (Gironella, M. *et al.* 2005). Diese Beobachtungen ließen einen direkten Effekt von Reg4 oder HIP/PAP auf NF $\kappa$ B möglich erscheinen, so wurde die Phosphorylierung von NF $\kappa$ B in Abhängigkeit der Stimulation der Fusionsproteine überprüft.

In HT29 Zellen führte die Stimulation durch Reg4-Fc und Fc-HIP/PAP zu einer dosisabhängigen Zunahme der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B. Welche biologische Konsequenz sich aus dieser beobachteten Phosphorylierung ableiten lässt, kann nicht eindeutig beantwortet werden, da NF $\kappa$ B die besprochenen kontroversen Regulationsprozesse im Rahmen der Apoptosesteuerung zugesprochen werden. Da Reg4 jedoch in Kolontumoren hochreguliert vorgefunden wurde (Violette, S. *et al.* 2003; Zhang, Y. *et al.* 2003), könnte es möglich sein, dass in diesem Fall ein Apoptose hemmender Mechanismus aktiviert wird.

Weitere zentral wirkende Proteine in Signaltransduktionsprozessen, die im Rahmen dieser Experimente überprüft wurden, waren Akt, Stat3, S6-Kinase1 und FAK. Eine Änderung der Phosphorylierungen dieser Kinasen in Abhängigkeit der Fusionsproteine konnte jedoch nicht festgestellt werden. Allerdings wurde die Phosphorylierung von Akt wurde durch Stimulation von Reg1 $\alpha$  aber auch durch Reg4 ermittelt (Sekikawa, A. *et al.* 2005; Bishnupuri, K.S. *et al.* 2006). Die Signaltransduktion, die über Akt (alternativ auch als PKB bezeichnet) vermittelt wird, ist auf zellulärer Ebene im Kontext von Wachstumskontrolle und damit verknüpfter Apoptoseregulation anzusiedeln. Die Akt-Familie setzt sich aus den Mitgliedern Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) und Akt3 (PKB $\gamma$ ) zusammen (Testa J.R. & Bellacosa A. 2001). Die Aktivierung erfolgt durch die durch die Peckstrinhomologie-Domäne vermittelte Lokalisation an der Zellmembran und der nachfolgenden Phosphorylierung des Threoninrestes 308 und des Serinrestes 437 (Chan T.O. *et al.* 1999; Datta S.R. *et al.* 1999). Zahlreiche extrazelluläre Stimulationen können über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) mit nachfolgender Generierung von Phosphatidylinositolen die Aktivierung von Akt bewirken. Darunter fallen nahezu alle bekannten onkogenen Wachstumsfaktoren (Sun M. *et al.* 2001; Sun M. *et al.* 2003). Durch Bindung der Phosphatidylinositole an Akt und dadurch katalysierter Konformationsänderung kommt es zur Phosphorylierung von Akt durch Phosphatidyl-abhängige Kinasen (PDK(s)) (Alessi D.R. 1997). Die Phosphatase PTEN wirkt inhibierend auf die Aktivität von Akt, indem intrazellulär die Konzentration von Phosphatidylinositolen durch dieses Enzym reduziert wird (Stambolic V. *et al.* 1998).

In Tumorgewebe wurde vor allem Akt2 überexprimiert vorgefunden, eine konstitutiv aktive dominante Mutation wurde bisher noch nicht beschrieben (Testa J.R. & Bellacosa A. 2001; Cheng J.Q. 2005). Die experimentelle Herunterregulation von Akt durch siRNA in Tumorzellen, die Überexpression von Akt zeigen, führt selektiv in diesen Zellen zu Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion sowie zu reduziertem Tumorstadium und reduzierter Tumordinvasivität (Cheng J.Q. *et al.* 1996; Chen W.S. *et al.* 2001; Asnaghi L. *et al.* 2004; Remy I. *et al.* 2004; Tabellini G. *et al.* 2005).

Die dosisabhängige leichte Zunahme der Phosphorylierung von Akt, die in AGS-Zellen in Korrelation mit zunehmender Konzentration der Fusionsproteine beobachtet wurde, wurde jedoch vergleichbar auch durch die Kontrollstimulation mit Fc alleine

detektiert. Es wurde daher nicht auf einen Reg4 bzw. HIP/PAP spezifischen Effekt geschlossen.

Aus Studien mit Tumorgewebe wurden Hinweise auf eine erhöhte Invasivität von Reg1 $\alpha$  exprimierenden Zellen diskutiert (Fukui, H. *et al.* 2004). Außerdem konnte für HIP/PAP eine Interaktion mit den extrazellulären Matrix (EZM) Komponenten Laminin und Fibronectin gezeigt werden (Christa, L. *et al.* 1996).

FAK ist ein Endpunkt von zellulärer Signaltransduktion bei dem die zelluläre Adhesion mit der Umgebung und der extrazellulären Matrix reguliert wird (BurrIDGE, K. *et al.* 1992; Cary, L.A. *et al.* 1996). FAK besitzt am Tyrosinrest 397 eine Autophosphorylierungsposition, die in phosphoryliertem Zustand die aktivierte Form repräsentiert, diese dient als Verknüpfungsstelle für Proteine mit SH2-Domänen (namentlich Src-homologie-Domäne 2), wobei u.a. Src zu nachfolgender Phosphorylierung der Tyrosinreste 576 und 577 führt (Calalb, M.B. *et al.* 1995; Owen, J.D. *et al.* 1999). In Tumorgewebe wurde häufig FAK-Überexpression (Owens, L.V. *et al.* 1995; Tremblay, L. *et al.* 1996; Kahana, O. *et al.* 2002) jedoch in Leber Metastasen auch Herunterregulation beobachtet (Ayaki, M. *et al.* 2001). Durch die Interaktion über Talin mit Integrinen und Paxillin ist Fak an der Ausbildung der Fokalkontakte beteiligt (Chen, H.C. *et al.* 1995; Hildebrand, J.D. *et al.* 1993; Tachibana, K. *et al.* 1995). In gesundem Gewebe durchlaufen Zellen mit aufgelöster Adhesion ein spezielles Apoptoseprogramm: Anoikis. In Tumorgewebe ist dieser Prozess häufig gestört, die Resistenz einer Tumorzelle gegenüber Anoikis kann durch überexprimiertes und konstitutiv aktives FAK vermittelt werden (Frisch, S.M. *et al.* 1994; Xu, L.H. *et al.* 1996; Hungerford, J.E. *et al.* 1996). Darüberhinaus fördert aktives FAK die Metastasierungsrate in Tumorzellen (Hauck, C.R. *et al.* 2002; Abdel-Ghany, M. *et al.* 2002; von Nimwegen, M.J. *et al.* 2005).

Zu HIP/PAP wurden bereits Beobachtungen diskutiert, dass in Tumorgewebe HIP/PAP-abhängig die Invasivität der Tumorzellen gesteigert sein könnte. Darüber hinaus wurde die Interaktion von HIP/PAP mit Komponenten der EZM beschrieben und bei Reg4 die Expression in Tumorzellen detektiert, die einem adenomalem-karzinomalem Übergangszustand zugeordnet worden waren, einer Phase in der Metastasierung einsetzen kann (Zhang, Y. *et al.* 2003). Zusammenfassend aus diesen Informationen schien es denkbar, dass FAK an diesen Prozessen, die durch Proteine der Reg-Familie angestoßen werden, beteiligt sein könnte. Jedoch konnten

hierzu keine Hinweise auf eine Reg4 oder HIP/PAP induzierte Phosphorylierung von FAK erhalten werden.

Ferner wurde noch eine potentielle Reg4 und HIP/PAP abhängige Phosphorylierung von Stat3 und PS6 überprüft. Das Protein Stat3 kann mechanistisch der Jak-Stat Signalkaskade zugeordnet werden. Der abstrahierte generelle Mechanismus fungiert über Cytokinrezeptoren und die Interaktion mit Jak, die nachgeschaltet Stat Proteine an Tyrosinresten, in Ausnahmen an Threoninresten, phosphorylieren (Murray P.J. 2007). Dadurch dimerisieren diese und translozieren in den Zellkern, um dort an der Assemblierung von Transkriptionsfaktorkomplexen beteiligt zu sein (Behrmann I. *et al.* 2004; O`Shea J.J. *et al.* 2002). Negativ beeinflusst wird diese Kaskade durch Proteine der SOCS-Familie („suppressor of cytokine signaling“, bislang 8 Mitglieder beschrieben), die an Cytokinrezeptoren binden und diese blockieren (Fenner, J.E. *et al.* 2006; Gingras, S. *et al.* 2004). Es wurden bislang 4 Jak und 7 Stat-Proteine beschrieben, zu den Rezeptoren zählen IFN- $\gamma$ -Rezeptor aber auch Interleukin-Rezeptoren, die Spezifität der Jak-Stat-Kaskade ist jedoch noch wenig verstanden (Murray, P.J. *et al.* 2007; O`Shea, J.J. *et al.* 2002). Beispielsweise kann durch IL-10-Rezeptor aktiviertes Stat3 ein Anti-Entzündungseffekt vermitteln, hingegen über IL-6-Rezeptor aktiviertes Stat3 diesen Effekt nicht ausüben (El Kasmi, C. *et al.* 2006; Yasukawa, H. *et al.* 2003). Der Einfluss von Stat-Proteinen in der Tumorentstehung und Progression wurde mehrfach unabhängig gezeigt. Ein denkbarer Effekt, unter Annahme einer Herunterregulation der Stat-Proteine, könnte hierbei in der Resistenz des Tumorgewebes gegenüber Entzündungsfaktoren der Familie der Interferone liegen, die zum Zellzyklusarrest führen können (Klampfer L. 2006). Beispielsweise ist in HT29-Zellen die Expression von Stat1 -2 und -3 durch DNA-Methylierung blockiert (Karpf, A.R. *et al.* 1999). In wie fern AGS- und CX1-Zellen ebenso über epigenetische Mechanismen eine reduzierte Stat-Expression besitzen oder möglicherweise Reg4 auf die Expressionsrate und die Phosphorylierungszustände einen Einfluss haben könnte ist nicht bekannt. Im Gegenzug wurden Stat Proteine aber auch in erhöhter Konzentration in Zusammenhang mit der Tumorgenität gesetzt (Coffer, P.J. *et al.* 2000).

Aus Arbeiten zu Entzündungsreaktionen des Gastrointestinaltraktes im Menschen kann aber abgeleitet werden, dass HIP/PAP offenbar einen Mechanismus reguliert, der unabhängig von den bekannten Entzündungsfaktoren IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  und

TNF- $\alpha$  zu sein scheint (Gironella, M. *et al.* 2005). Andererseits konnten in Zellkulturexperimenten positive Effekte von PAP1 (Ratte) auf Mitglieder der Stat-Familie gezeigt werden (Folch-Puy, E. *et al.* 2006). Ein direkter Einfluss auf die Phosphorylierung von Stat3 durch HIP/PAP oder auch Reg4 konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, so dass hierzu keine weiteren Erkenntnisse erhalten wurden.

Der metabolische Zustand einer Zelle spiegelt sich unter anderem in den energieaufwendigen Prozessen der Proteinbiosynthese wieder, hierbei spielt die S6-Kinase1 (p70), die unmittelbar an der Translation durch Initiierung des ribosomalen Komplexes durch Phosphorylieren der eIF2-Kinase und eIF4b beteiligt ist, eine bedeutende Rolle (Wang, X. *et al.* 2001; Raught, B. *et al.* 2004). Die S6-Kinase1 wird über die mTOR-Signalkaskade reguliert und ist daher nachgeschaltet sensitiv gegenüber Rapamycin, einem Inhibitor der mTOR-Kaskade (Schalm, S.S. & Blenis, J. *et al.* 2002). Die mTOR-Aktivität selbst ist durch zahlreiche vorgeschaltete krebsrelevante Kinasen kontrolliert, hier spiegelt LKB1 und nachfolgend AMPK eine energiestatussensitive Signalkaskade wieder, die (u.a.) durch den zellulären ATP/AMP-Haushalt der Zelle gesteuert wird (Averous, I. & Proud, C. 2006; Guertin, D.A. & Sabatini, D.M. 2005; Wullschleger, S. 2006). Darüber hinaus ist das zelluläre Angebot an essentiellen Aminosäuren ein limitierender Faktor der mTOR- und somit S6-Kinase1 Aktivität (Kimball, S.R. & Jefferson, L.S. 2006). Der Phosphorylierungsstatus der S6-Kinase1 wird mit diesen Prozessen in Zusammenhang gebracht und ist in Tumorzellen häufig erhöht (Averous, I. & Proud, C. 2006). Insgesamt sind 5 Serinreste als Phosphorylierungspositionen beschrieben (Krieg, J. *et al.* 1988).

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Überexpressionen von HIP/PAP und Reg4 in Tumorgewebe einen positiven Einfluss auf die Regulation der Energiestatus sensitiven Signalkaskaden haben könnte, wurde die potentielle Phosphorylierung von S6-Kinase1 überprüft. Hieraus konnte jedoch kein Effekt, vermittelt durch HIP/PAP oder Reg4, abgeleitet werden.

Zusammenfassend wurde ermittelt, dass in HT29-Zellen Reg4 und HIP/PAP an der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B beteiligt zu sein scheinen und in AGS- und CX1-Zellen hingegen eine Phosphorylierung der MAPK Mitglieder Erk1 und Erk2 angestoßen werden kann. Es ist interessant diesen Unterschied der angestoßenen Effekte mit

der Beobachtung der endogenen Reg4-Expression abzugleichen. Hier scheint es möglich, dass Zellen mit endogener Expression von Reg4 nach Stimulation durch Reg4 oder auch HIP/PAP gegenüber Zellen mit fehlender Reg4-Expression auf differenzielle Weise reagieren.

Bemerkenswert ist, dass solche autokrinen und parallel auftretenden parakrinen Mechanismen für PAP1 in der Ratte während der Regeneration von neuronalem Gewebe diskutiert worden sind (Nishimune, H. *et al.* 2000). Auch aus den hier beschriebenen Beobachtungen lassen sich Hinweise auf eine autokrine und eine davon abweichende parakrine Stimulation finden.

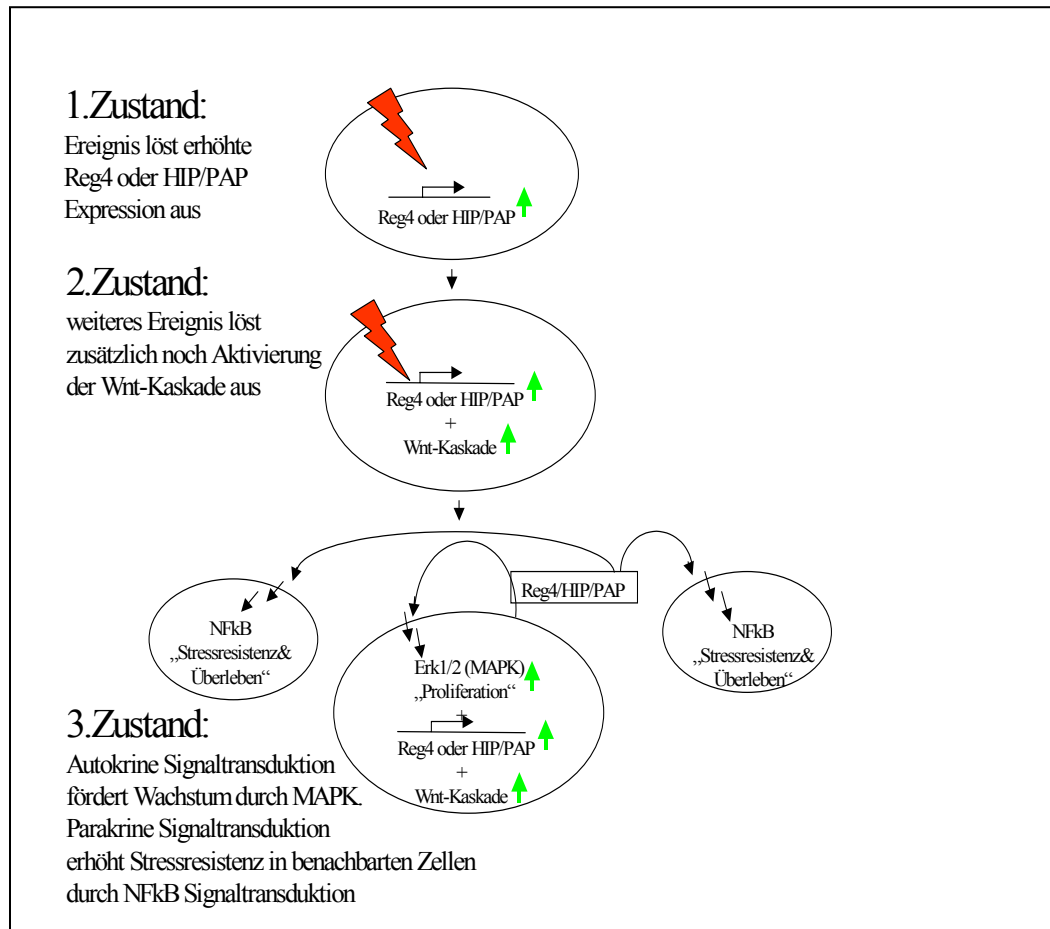
Im Kontext der Tumorentstehung könnte hierbei eine Funktion dieser Effekte darin bestehen, dass über autokrine Mechanismen und die Beteiligung von MAPK-Mitgliedern das Wachstum dieser Zellen selbst gesteigert wird wohingegen die Überlebensrate in benachbartem Gewebe durch Beteiligung von NF $\kappa$ B gesteigert wird. Eine solche Situation ließe sich auf ein Modell innerhalb eines Tumorgewebes übertragen, wobei eine kleine Population an Zellen dedifferenziert und stabiles Wachstum unabhängig der Umgebung zeigt. In benachbarten Zellen, die dadurch einer Stresssituation ausgesetzt sind, wird durch parakrine Signaltransduktion das Überleben gesteigert, indem entsprechende Signalkaskaden die Apoptosetoleranz steigern.

Interessanterweise konnte in der Zelllinie Caco2, die in dieser Arbeit auf cDNA Ebene als HIP/PAP exprimierend gezeigt wurde, eine Subpopulation von Zellen mit tumorstammzellartigen Charakteristika detektiert werden (persönliche Kommunikation Dr. J. Daecke, Merck KGaA). Hier mit einzubinden sind auch Beobachtungen einer HIP/PAP-Expression in Zelllinien mit transgen aktiver Wnt Signalkaskade (Cavard, C. *et al.* 2005) und die Beobachtung von Tumoren in frühem Stadium (I-II) mit  $\beta$ -Catenin-Mutationen und ektopischer HIP/PAP-Expression (Yuan, R.H. *et al.* 2005). Da die Wnt-Signaltransduktion in zahlreichen Prozessen der zellulären Differenzierung von Stammzellen bis hin zur Entwicklung ganzer Gewebe hoch konserviert ist (Guder, C. *et al.* 2006), sollten diese Beobachtungen im Zusammenhang mit der beobachteten stammzellartigen Zellpopulation in Caco2-Zellen gesehen werden.

Ferner wurde eine Population an Zellen in kolorektalem Tumorgewebe mit Reg4 Überexpression als chemoresistent charakterisiert (Violette, S. *et al.* 2003). Dies sind

gleichfalls Charakteristika die Tumorstammzellen zu gesprochen werden (persönliche Kommunikation Dr. J. Daecke, Merck KGaA).

Der Annahme folgend, dass während der Tumorentstehung das Auftreten von Tumorstammzellen ein frühes Ereignis darstellt, ließe sich dies mit der Beobachtung von  $\beta$ -Catenin-Mutationen, ektoptischer HIP/PAP-Expression oder Reg4-Expression, den beobachteten Chemoresistenzmechanismen und frühen Tumorstadien (I-II) in Verbindung bringen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Beobachtungen und die genannten weiteren Informationen sind als eine spekulative Hypothese in Modell IV.1 dargestellt sind. Hierbei wird angenommen, dass Proteine der Reg-Familie während der Tumorentstehung frühzeitig ektoptisch exprimiert oder in der Expression hochreguliert auftreten, fallen diese Ereignisse mit einer mutierten ektoptisch aktivierten Wnt-Signalkaskade zusammen, könnten diese Zellen durch Beteiligung der MAPK Kaskade erhöhte Proliferation zeigen oder sich auch mit tumorstammzellartigen Charakteristika dedifferenzieren, was zusammenfassend aus Beobachtungen zu Caco2 Zellen mit Tumorstammzellartigen Eigenschaften und den publizierten Arbeiten zu HIP/PAP und Wnt Coexpression in Tumorgewebe abgeleitet wird. Hierbei würden Proteine der Reg-Familie als Wachstumsfaktoren in autokriner Weise unter Beteiligung der MAPK auf diese Population an Zellen wirken. Darüber hinaus würden Proteine der Reg-Familie in parakriner Weise die Stressresistenz von benachbarten Zellen erhöhen und unter Beteiligung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  die durch solche Ereignisse ausgelöste Apoptoserate reduzieren.



Modell IV.1.: Darstellung der hypothetischen Ereignisse die durch Reg4 bzw. HIP/PAP und aktivierter Wnt-Kaskade zur Entstehung von Tumorgewebe führen könnte.



## Beobachtungen des Einflusses von HIP/PAP und Reg4 auf die Genexpression durch Mikroarray Analyse

Informationen aus Mikroarray Studien liefern i.d.R. zunächst eine hohe Anzahl an daraus abgeleitet differentiell regulierten Genen. Kritisch zu betrachten sind dabei vor allem grundsätzliche Schwankungen der Messmethode, die durch statistische Annahmen dieser Technologie zu begründen sind. Aus diesem Grund ist es entscheidend, welche nachfolgenden Berechnungsprotokolle angewendet werden, um tatsächliche Effekte herauszuarbeiten (Heber, S. *et al.* 2006).

Prinzipiell sind dabei zwei Vorgehensweisen üblich, erstens Gene mit starken Expressionsschwankungen zwischen den differentiell betrachteten Gruppen zu ermitteln und zweitens Gene, deren gemessene Expressionswerte innerhalb der jeweils betrachteten Gruppe eine sehr geringe Schwankung der Messwerte zeigen, zu ermitteln.

Da in der hier durchgeführten Analyse keine Informationen hinzugezogen werden konnten, zu welchem Zeitpunkt mögliche Regulationseffekte der Genexpression, die durch Reg4 oder HIP/PAP induziert werden könnten, am stärksten auftreten, wurde der Zeitpunkt nach 24 Stunden während der Stimulation gewählt. Gemäß physiologischen Beobachtungen der Kinetik der PAP1-Konzentration während Entzündungsreaktionen erschien dieser Zeitpunkt als geeignet (Graf, R. *et al.* 2002). Des Weiteren muss jedoch bemerkt werden, dass mögliche Expressionsregulationen bereits nach wenigen Minuten einsetzen könnten und je nach Halbwertszeit der synthetisierten mRNA nach 24 Stunden bereits wieder auf dem Basisniveau eingestellt sein könnten. Da einer mRNA-Expressionskurve über die Zeit prinzipiell eine modifizierte Kurve der Form  $y = ax - (a-b)x^2$  mit  $a > a-b$  zu Grunde gelegt werden kann, jedoch nicht bekannt war in welchem Zeitbereich hier mögliche Maxima erreicht werden, wurde eine differentielle Expressionsregulation des Faktors 1,5 als bereits signifikant akzeptiert, um ein möglichst breites Spektrum an regulierten Genen zu erfassen. Um dem gegenüber die Signifikanz der ermittelten Messwerte zu gewährleisten, wurde ein stringenter P-Wert von 0,01 gewählt. Abweichend davon wurde bei Genen, die nach bioinformatischer Auswahl nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen im Kontext von Apoptose oder Mitose gesetzt waren, mit einem P-Wert von 0,05 gerechnet.

Nach dieser Vorgehensweise zeigte die Stimulation durch HIP/PAP-Fc und Fc-Reg4 eine Anzahl differentiell exprimierter Gene, wobei die Stimulation durch Fc-HIP/PAP offenbar einen stärkeren Effekt aufzeigte. Auffallend ist, dass dabei eine Gruppe, deren Expression durch HIP/PAP-Fc stark angestoßen wird, von Reg4-Fc offenbar nicht reguliert zu sein scheint (GTBP8, CFL2, CAPN10, MK167, CA11, NNMT), demgegenüber jedoch die induzierte Expression von einer weiteren Gruppe etwas stärker für Fc-Reg4 festgestellt wurde (NA, LOC144364, PHYH, ZFP95, bA16L21.2.1., SRBD1, JOSD3). Den Beobachtungen liegt in der Mehrzahl eine Expressionsinduktion vermittelt durch Stimulation von Fc-HIP/PAP oder Reg4-Fc zu Grunde, für ~ 16 % der analysierten Gene wurde jedoch auch ein reduzierender Effekt auf deren Expression ermittelt. So fern zu den analysierten Genen bereits publizierte Arbeiten vorliegen, ließen sich diese nach funktionellen Aspekten gruppieren. Dabei lässt sich eine Gruppe von Genen bilden, deren Funktion in der Regulation des zellulären Überlebens und der Apoptoseregulation besprochen werden.

Hierzu zählen *Itn1* (Intersektin-1) was an der Steuerung der mitochondrialen Apoptosekaskade beteiligt ist (Prdescu, S.A. *et al.* 2007) und funktionell gegenüber gestellt PGDH (15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase). Ein Enzym, das als Tumorsuppressorprotein besprochen wird (Tong, M. *et al.* 2006; Quidville, V. *et al.* 2006; Myung, S.J. *et al.* 2006). Außerdem BNIP, das zur BCL2-interagierenden Proteinfamilie zählt und somit die antiapoptotischen Signale dieser Proteine kompetitiert (Zhang, H. *et al.* 1999; Nakajima, K. *et al.* 2004).

Gene, die als mechanistisch verknüpft mit NF $\kappa$ B und Entzündungsmechanismen ermittelt wurden stellen *Ing4*, *CCRL2*, *MAP3K4*, *MALT1* und *Fas* dar. Im Zusammenhang der Krebsentstehung wurde *Ing4* („inhibitor of growth 4“) bereits mehrfach genannt. Von *Ing4* wurden in Tumoren mehrfach „Splicevarianten“, die zu biologisch inaktivem Protein führen, vorgefunden (Raho, G. *et al.* 2007). Mechanistisch wurde *Ing4* als Tumorsuppressorprotein beschrieben, wobei dieser Effekt durch eine Inhibition von NF $\kappa$ B fungiert und von den Splicevarianten abhängig zu sein scheint (Kim, S. *et al.* 2004). Außerdem wurde *Ing4* als Regulationselement des zellulären K<sup>+</sup>-Haushalts durch Aktivierung von p38 MAPK charakterisiert (Zhang, X. *et al.* 2007). Aus vorliegenden Daten kann jedoch nicht genau abgeleitet werden, welche Transkriptvarianten durch die Mikroarray Analyse erfasst wurden.

Für CCRL2 (Chemokine-Rezeptor-artiges Protein 2) ist auf die Expressionsregulation ein positiver Effekt durch TNF- $\alpha$  Stimulation gezeigt worden (Galligan, C.L. *et al.* 2004). TNF- $\alpha$  ist als NF $\kappa$ B-Stimulator und Zielgen zugleich beschrieben (Fan, P. *et al.* 1998).

Das Mitglied der MAPK Kaskade MAP3K4 wurde als positiv abhängig von Entzündungsfaktoren beschrieben und als vorgeschaltetes Element der Aktivierung der cJun-Kinase Kaskade beobachtet (Diener, K. *et al.* 1997).

MALT1 ist an der Signalkaskade von Angiotensin II vermittelter NF $\kappa$ B-Aktivierung während Leberfibroseprozessen beteiligt. Auch während der Krebsentstehung in Lymphomen wurde eine MALT1 abhängige NF $\kappa$ B-Aktivierung detektiert, die als unabhängig von den Stimulatoren TRAF1 und TRAF2 ermittelt wurde (Varfolomeev, E. *et al.* 2006).

FAS zählt zur TNF-Rezeptor Superfamilie. Funktionell steuert der Rezeptor den Dualismus zwischen Apoptoseinduktion über den Komplex von „Fas-associated-Death-Domain Protein“ (FADD), Caspase-8 und -10 (Cheng, J. *et al.* 1994) und antiapoptische Effekte, die über eine Aktivierung von NF $\kappa$ B, Erk und Jun ablaufen können. Dieser Prozess könnte in kolorektalen Tumoren über c-FLIP transduziert sein, was sich aus der Expressionskorrelation von Fas, Fas-Ligand und c-FLIP ableiten ließe (Korkolopoulou, P. *et al.* 2007). Starke Hinweise auf eine Funktion bei der Tumorentstehung durch Fas Expression wurden auch aus Proben von Schilddrüsentumoren gewonnen (Rzeszutko, M. *et al.* 2007).

DIDO gehört zu den Zinkfinger Transkriptionsfaktoren und wirkt Apoptose induzierend. Dabei wurde festgestellt, dass der Effekt von DIDO durch eine Überexpression von BCL2 inhibiert werden kann (Garcia-Domingo, D. *et al.* 1999).

Es bleibt jedoch genauer zu analysieren, in wie weit diese ermittelten Gene unmittelbar positiv auf die Überlebensrate der durch HIP/PAP oder Reg4 stimulierten Zellen wirken können.

Eine zweite Gruppe kann aus publizierten Arbeiten funktionell neuronalen Differenzierungsmechanismen und/oder zellulärer Mobilität zugeordnet werden. Diese lässt sich aus den Genen SIP, EXOC5, SLC6A8, SLC9A1, CA11, SCIN und F2R bilden. SIP1 ist an der Ausbildung von Proteinkomplexen beteiligt, die maßgeblich als Überlebensfaktoren in Motoneuronen charakterisiert wurden (Ogawa, C. *et al.* 2007). Des Weiteren wurde SIP1 als ein Repressor der E-Cadherin

Expression in rektalen Tumoren beschrieben (Evans, E.H. *et al.* 2007). Eine reduzierte E-Cadherin Rate wird als charakteristisches Phänomen während der Epidermalen-Mesenchymalen-Transition (EMT) von entstehenden Tumorzellen verstanden und funktionell eines damit steigenden Metastasierungsrisikos besprochen.

EXOC5 zählt zu den Proteinen, die an der polarisiert gerichteten Exocytose Regulation beteiligt sind und über diesen Mechanismus an der Ausbildung der Zellpolarität und der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind (Hsu, C.H. *et al.* 2004).

SLC6A8 zählt zur Familie der Creatin Transporter, nach Homologievergleichen und Charakterisierung der physiologischen Funktion kann das Protein in die Superfamilie der Na<sup>+</sup>-regulierten Transporter zur Aufnahme von GABA, Serotonin und Norepinephrine gruppiert werden. (Nash, S.R. *et al.* 1994). Aus genetischen Studien wurden Hinweise auf eine mutierte Variante von SLC6A8 im Kontext zu mentaler Retardierung erhalten (Dodd, J.R. *et al.* 2005; Rosenberger, R.H. *et al.* 2004).

Für SLC9A1 hingegen wurden neben der Funktion als zelluläre Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> Pumpe und der damit katalysierten pH-Homöostase und Zellvolumenkontrolle weitere Mechanismen in der Regulation von Aktinfilamenten und der Bindung von Signalfaktoren und damit verbundenen zellulären Adhäsionen beschrieben (Meima, M.E. *et al.* 2007). Interessant ist die Beobachtung aus Brustumorgewebe, wobei unter ischämischen bzw. hypoxischen Bedingungen eine Hochregulation detektiert wurde, die offenbar funktionell zur Invasivität der Tumorzellen unter Beteiligung einer Protein-Kinase-A, RhoA – p38 MAPK Kaskade beiträgt (Cardone, R.A. *et al.* 2007).

CA11 („Carbonic Anhydrase 11“) ist, gegensätzlich zu weiteren Mitgliedern der Proteinfamilie ein sekretiertes Protein und zeigt ein hoch differenziertes Expressionsmuster in neuronalen Vorläuferzellen während der humanen Embryonalentwicklung (Taniuchi, K. *et al.* 2002).

SCIN (Scinderin) wurde als Ca<sup>2+</sup>-reguliertes Aktin-bindendes Protein beschrieben, welches zur submembranösen Aktindynamik beiträgt und dabei an der Exocytoseregulation beteiligt zu sein scheint (Lejen, T. *et al.* 2002). Die vorgeschaltete Stimulationskaskade kann dabei über den Nikotinsäurerezeptor zur Dissoziation von F-Aktin und Reorganisation von SCIN während eines solchen Exocytoseprozesses ablaufen (Rodriguez del Castillo, A. *et al.* 1992). Wertvolle Hinweise auf eine Beteiligung von SCIN bei der Tumorentstehung wurden bei der Analyse von schnell proliferierenden megakaryoblastischen Leukaemien erhalten,

wobei neben dem Aktin-bindenden Protein Gelsolin auch eine veränderte SCIN Expression detektiert wurde. Interessant ist, dass diese Zellen auch sensitiv gegenüber einer Blockade des Thrombin-Rezeptors PAC1 sind und bei erhöhter SCIN Expression eine erhöhte Rate von Serotonintransport zeigten (Zunino, R. *et al.* 2001). Diese könnte funktionell in Zusammenhang mit der Hochregulierten Expressionsrate von SLC6A8 und den hierzu beschriebenen Effekten auf den Serotonin Transport stehen.

F2R zählt zur Thrombin Rezeptorfamilie (alternativ PAR1), welche zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählt. Eine Expression dieses Rezeptors wurde in hepatozellulären Tumorzellen als auslösend für deren Migrationsverhalten charakterisiert (Kaufmann, R. *et al.* 2007). Darüber hinaus wurde der Rezeptor auch in Prostatakarzinomen hoch exprimiert vorgefunden (Traynelis, S.F. *et al.* 2007). Weitere Modelle zeigen, dass PAR1 mechanistisch zur Apoptoseinhibition beitragen kann und bei Überexpression auch über eine korrelierte reduzierte Paxillin-Phosphorylierung Einfluss auf die Cytoskelettstruktur nehmen kann, dabei wurde ein Proteaseaktivierungsmechanismus aufgezeigt. (Salah, Z. *et al.* 2007).

Diese Beobachtungen sollten auch im Kontext der publizierten Arbeiten der HIP/PAP induzierten Regeneration von neuronalem Gewebe und den Hinweisen auf eine gesteigerte zelluläre Mobilität von Tumorzellen durch HIP/PAP Expression gesehen werden (Livesey, F.J. *et al.* 1997, Nishimune, H. *et al.* 2000, Valery, C. *et al.* 2001).

In der Expression hochregulierte promitotische Gene wurden in NEK6 und CDC25C vorgefunden. NEK6 ist eine Serin/Threonin Kinase der Familie der NIMA-Kinasen (Yin, M.J. *et al.* 2003) und wurde hochreguliert in hepatozellulären Karzinomen vorgefunden (Chen, J, *et al.* 2006).

CDC25C zählt zu den Tyrosin-Phosphatasen und bewirkt über die Dephosphorylierung von Cyclin-B gebundenem CDC2 den Eintritt in die Mitose.

Durch die Mikroarray Studie analysierte Gene, die ihrer Funktion nach weniger spezifisch einem der oben genannten biologischen Phänomene zugeordnet werden können sind PHYH, ZFP95, Capn10 und NNMT.

PHYH (Phytanoyl-CoA-Hydroxylase) ist als peroxisomales Enzym an der Umsetzung von Phytanoyl-CoA zu Hydroxyphytanoyl-CoA beteiligt und ist am Fettsäure Katabolismus beteiligt. ZFP95 (Zinkfinger Protein 95) zählt zur Krüppel-Proteinfamilie

und zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster sowohl in fötalem als auch adultem Gewebe (Dreyer, S.D. *et al* 1999).

Ferner wurden noch Capn10 und NNMT als differentiell exprimiert vorgefunden.

Capn10 zählt zu der Cystein-Protease Familie der Calpaine (Sorimachi, H. *et al.* 1997). NNMT Expression (Nicotinamid-N-Methyltransferase) wurde in Tumorgewebe der Schilddrüse und des Kolorektaltraktes hochreguliert vorgefunden und wird darüber hinaus als Serummarker zur Tumordiagnostik besprochen (Xu, J. *et al.* 2006; Roessler, M. *et al.* 2005).

Fasst man diese Erkenntnisse aus publizierten Arbeiten übergreifend zusammen und setzt diese in Kontext der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, lassen sich eine Gruppe an differentiell regulierten Genen finden, die offenbar im Zusammenhang mit der Apoptoseregulation und NF $\kappa$ B Signaltransduktion stehen. Des Weiteren könnte durch Reg4 und HIP/PAP die Mobilität der Tumorzellen gefördert werden, allerdings treten auch Gene hervor, die auf eine erhöhte sekretorische Aktivität dieser Zellen schließen lassen, was möglicherweise mit parakriner zellulärer Kommunikation in Verbindung zu bringen wäre. Die Beobachtungen der Mikroarray Studie geben somit Anhaltspunkte für weitere zu prüfende Mechanismen, die durch Reg4 oder auch HIP/PAP induziert werden könnten.

### IV.3. Bindungs- und Interaktionsexperimente mit Reg4 und HIP/PAP

#### Bindestudien mit <sup>125</sup>Iod-Fusionsproteine

Die Affinitäten von Liganden zu zellulären Transmembranrezeptoren liegen üblicherweise im nanomolaren Bereich. Die Kinetik einer solchen Bindung kann wiederum sehr vielfältig ausgestaltet sein, so dass es zu zeitlich äußerst kurzen (im Millisekunden Bereich) Interaktionen kommen kann, die aber auch bis hin zu mehreren Minuten stabil vorliegen können (Model, M.A. & Omann, G.M. 1995). Grundsätzlich gilt dabei jedoch, dass der zu Grunde liegende Bindungsmechanismus dem Massenwirkungsgesetz gehorcht und sich somit bei hoher Konzentration an Ligand vollständig im „gesättigten“ Zustand befindet. Ist zur Analyse eines solchen Mechanismus ein Gemisch an markiertem und unmarkiertem Ligand eingesetzt, wird es folglich zu einer Kompetition an freien Bindungsstellen zwischen markiertem und unmarkiertem Ligand kommen. Je höher dabei der Anteil an unmarkiertem Ligand ist, desto geringer wird die Menge an markiertem Ligand sein, die sich zu einem jeweils bestimmten Zeitpunkt in gebundenem Zustand befindet.

Zur Bindungsanalyse wurden die Fusionsproteine zunächst in einem Konzentrationsbereich eingesetzt, wie dies auch in den Stimulationsexperimenten zu detektierbaren Effekten führte. Bei einer Konzentration von 500 ng/ml entspricht dies bei Reg4-Fc / Fc-Reg4 vorliegend als Dimer einer molaren Konzentration von 5,9 µM, bei Fc-HIP/PAP / HIP/PAP-Fc liegt die molare Konzentration bei eingesetzten 500 ng/ml für das Dimer bei 5,7 µM. Dieser Konzentrationsbereich ist deutlich über üblichen physiologischen Konzentrationsbereichen, allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass nur ein prozentualer Anteil des Proteins in biologisch aktiver Konformation vorliegt, somit der Anteil an Protein, welches in physiologisch nativer Konformation vorliegt, im nanomolaren Bereich liegt. Dem gegenüber führte eine Reduzierung der eingesetzten Fusionsproteine auf eine Konzentration von ~ 50 nM an eingesetztem Fusionsprotein nicht zu detektierbaren Signalen.

Problematisch ist die verwendete relativ hohe Konzentration, da dies Präzipitationsprozesse fördern kann, wie es bewusst bei Kristallisierungsprotokollen eingesetzt wird. Dies kommt vor allem zum Tragen, wenn der Zusatz eines 500-fachen Überschusses an unmarkiertem Protein zur Konkurrenz eingesetzt wird, da hier ein molarer Konzentrationsbereich erreicht wird. In vorliegenden Versuchen konnte eine Reduktion des Signals durch Zugabe des 500-fachen Überschusses, wie es für eine Konkurrenz einer spezifischen Bindung zu erwarten wäre, nicht erreicht werden. Dies könnte mit Präzipitationsprozessen zu erklären sein. Da die Signalintensität bei Zugabe des unmarkierten Überschusses zunahm, ließe sich dies durch die Ausbildung von Präzipitaten erklären, in denen auch markiertes Protein gebunden vorliegt, diese könnten sich auf der Zelloberfläche absetzen und würden auf diese Weise zu der Signalstärke führen.

Unter Einsatz von 1 % BSA hingegen lässt sich diese Beobachtung gleichfalls nicht vollständig verhindern. Die Signalintensität von HIP/PAP-Fc liegt dennoch über dem Messwert von Fc alleine, welcher als unspezifisches Hintergrundsignal gewertet wurde, dies könnte ein Hinweis auf eine Bindung von HIP/PAP-Fc an AGS- CX1- und auch HT29-Zellen darstellen.

Interessant ist diese Erkenntnis auch deshalb, da mit diesem Fusionsprotein die stärksten Effekte während der Mikroarray Studie erzielt wurden.

Allerdings liegen ernsthafte Hinweise auf Präzipitationseigenschaften vor, so konnte bereits gezeigt werden, dass durch aminoterminalen Prozessierung von PAP1 Proteinvarianten generiert werden können, die zu fibrillenartigen Strukturen kristallisieren können (Schiesser, M. *et al.* 2001; Graf, R. *et al.* 2001). Für einen solchen möglicherweise auch vorliegenden Prozessierungsprozess müsste der Aminoterminus zugänglich sein, was in der Variante HIP/PAP-Fc gewährleistet wäre, demgegenüber ist jedoch nicht genau beschrieben, ob diese Prozessierungen extrazellulär oder während Reifungsprozessen beim Durchlaufen des sekretorischen Pfades stattfinden. Es muss daher in Frage gestellt werden, ob solche Prozessierungsprozesse an humanem HIP/PAP in dem gewählten Expressionssystem der NS0 (Maus Fibroblastenzellen) zu selbem Anteil funktionsfähig wären, wie dies unter physiologischen Bedingungen beobachtet wurde. Des Weiteren könnten aber auch Prozessierungen innerhalb extrazellulärer Matrix Komponenten stattfinden, dies würde bedeuten, dass die zu Bindungsexperimenten eingesetzten Zelllinien diesen Mechanismus abbilden



könnten. In wie weit die Beobachtung der Fibrillenbildung von PAP1 mit den hier beschriebenen Beobachtungen übereinstimmen, bleibt weiter zu klären. Allerdings sollten diese Erkenntnisse auch im Hinblick der Expression von Genen, die an Migrationsprozessen beteiligt sind, überdacht werden. Denkbar wäre ein Modell, wobei Fibrillen bestehend aus HIP/PAP-Präzipitaten die EZM-Struktur derart verändern, dass Wanderungsprozesse der Zellen gefördert würden.

## Copräzipitationsexperimente

Nach der beschriebenen Interaktion von Reg1 mit EXTL3 (Kobayashi, S. *et al.* 2001) wurde durch Nutzen der Fc-Reg4 Fusionsproteine überprüft, in wie weit diese Interaktion auch auf Reg4 übertragen werden kann. Die Copräzipitationsexperimente liefern hierzu starke Hinweise, da EXTL3 mit Fc-Reg4 copräzipitiert vorgelegen hat. Funktionell gibt es zu EXTL3 Hinweise eines positiven Einflusses auf die NF $\kappa$ B Signalkaskade (Mizuno, K. *et al.* 2001). Darüber hinaus würde nach den hier beschriebenen Beobachtung Reg4 auch an die weiteren Mitglieder dieser Proteinfamilie, namentlich EXT1, EXTL1 und EXT2 binden. Funktionell wurde EXT1 und EXT2 mehrfach im Rahmen der Osteochondroma Entstehung genannt (einer Krebserkrankung von Knochen und Knorpelgewebe), wobei hierbei mutierte Allele als ursächlich diskutiert werden (Signori, E. *et al.* 2007). Eine unmittelbare Verknüpfung und Interaktion von EXT(L) Proteinen mit weiteren Signaltransduktionsproteinen auf intrazellulärer Seite ist bislang jedoch noch nicht erfolgt. Denkbar wäre jedoch ein Mechanismus, in dem EXT(L) Proteine als Corezeptoren wirken und somit Liganden, z.B. Reg4, ihren jeweiligen Rezeptoren zu führen. Dies wäre abgeleitet aus dem Modell der Wnt-Signaltransduktion, wobei LRP6 hier vergleichbar zu EXT(L) als Corezeptor Wnt-Liganden den Frizzled Rezeptoren bereitstellt.

Durch die positiven Resultate dieser Copräzipitationsexperimente wurden nachfolgende Präzipitationsversuche zur Isolierung putativer Interaktionspartner vorgenommen. Hierbei ließen sich nur bedingt diskrete Banden in Ansätzen der Reg4 Präzipitation erkennen, dennoch wurde versucht aus diesen Daten mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen Identifizierungen von Proteinen durchzuführen. Die aus diesen Analysen erhaltenen Signale ließen jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse zu.

#### IV.4. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Modellsysteme und molekulare Werkzeuge zur Charakterisierung von Signaltransduktionsprozessen vermittelt durch Reg4 und HIP/PAP erzeugt und beschrieben. Fc-Fusionsproteine wurden erfolgreich zur Stimulation von AGS- und CX1-Zellen angewendet, die gemäß einer Hypothese eines autokrinen Rückkopplungsmechanismus sensitiv gegenüber Reg4 sind. Hierbei zeigte sich eine leichte Induktion der Phosphorylierung von Erk1 und -2. Bei HT29-Zellen ließ sich ein hierzu differentieller Effekt ermitteln, wobei die Stimulation zu einer Phosphorylierungszunahme von NF $\kappa$ B führte. Aus diesen Erkenntnissen ließ sich unter Berücksichtigung bereits publizierter Daten ein Modell zur Entwicklung von Krebszellen erstellen. Neuartige Erkenntnisse in diesem Kontext lieferten auch Daten aus den Mikroarray Analysen, wobei hier, neben den bereits auf Proteinebene beobachteten Effekten auf die NF $\kappa$ B Kaskade, weitere Regulationsebenen, die Migrations- und Exocytoseprozessen zugeordnet werden können, erhalten wurden.

Es erscheint daher sinnvoll an diese Arbeit anschließend Experimente durchzuführen, die die zelluläre Mobilität in Abhängigkeit von Reg4 oder HIP/PAP überprüfen, zumal es hierzu Hinweise aus publizierten Arbeiten gibt.

Wichtig ist auch die Isolierung und Aufklärung eines Transmembranrezeptorproteins, welches spezifisch die Reg4 und / oder HIP/PAP vermittelte Signalkaskade amplifiziert. Mit den beschriebenen Bindungsexperimenten konnte dies nicht erreicht werden, dennoch könnten sich aus Copräzipitationsversuchen putative Interaktionspartner isolieren lassen. Hierzu könnten 2-dimensionale Elektrophoresen, ggf. mit nativer erster Dimension hilfreich sein.

Des Weiteren könnte angedacht werden Mikroarray Studien an AGS- und CX1-Zellen durchzuführen, so sollten sich gemäß den Beobachtungen aus den Westernblotanalysen auch auf mRNA Expressionsebene Unterschiede zwischen HT29 und dem gegenüber AGS und CX1 detektieren lassen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die vorliegenden Erkenntnisse die Bedeutung von Reg4 und auch HIP/PAP im Rahmen der Krebsentstehung unterstreicht und vor allem in Bezug auf die Unterschiede zwischen autokriner und parakriner Signaltransduktion und einer möglicherweise induzierten zellulären Mobilität wichtige neue Erkenntnisse erhalten werden konnten.



- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Eible RC, Pauli BU;** Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. 2002 September 13;277(37), J Biol Chem.
- Abe M, Nata K, Akiyama T, Shervani NJ, Kobayashi S, Tomioka-Kumagai T, Ito S, Takasawa S, Okamoto H;** Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. 2000 April 4;246(1-2): 111-22, Gene.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P;** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. 1997 April 1;7(4):261-9, Curr Biol.
- Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, Okamoto H;** Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation. 2001 Januar 2;98(1):48-53, Proc Natl Acad Sci U S A.
- Ashcroft FJ, Varro A, Dimaline R, Dockray GJ;** Control of expression of the lectin-like protein Reg-1 by gastrin: role of the Rho family GTPase RhoA and a C-rich promoter element. 2004 Juli 15;381(Pt 2):397-403, Biochem J.
- Asnaghi L, Calastretti A, Bevilacqua A, D'Agnano I, Gatti G, Canti G, Delia D, Capaccioli S, Nicolini A;** Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. 2004 Juli 29;23(34):5781-91, Oncogene.
- Averill S, Davis DR, Shortland PJ, Priestley JV, Hunt SP;** Dynamic pattern of reg-2 expression in rat sensory neurons after peripheral nerve injury. 2002 September 1;22(17):7493-501, J Neurosci.
- Averous J, Proud CG;** When translation meets transformation: the mTOR story. 2006 Oktober 16;25(48):6423-35, Oncogene.
- Ayaki M, Komatsu K, Mukai M, Murata K, Kameyama M, Ishiguro S, Miyoshi J, Tatsuta M, Nakamura H;** Reduced expression of focal adhesion kinase in liver metastases compared with matched primary human colorectal adenocarcinomas. 2001 Oktober 7(10):3106-12, Clin Cancer Res.
- Baldwin AS Jr;** Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. 2001 Januar 107(1):3-6, J Clin Invest.
- Bartoli C, Gharib B, Giorgi D, Sansonetti A, Dagorn JC, Bergé-Lefranc JL;** A gene homologous to the reg gene is expressed in the human pancreas. 1993 August 2;327(3):289-93, FEBS Lett.
- Bassères DS, Baldwin AS;** Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. 2006 Oktober 30;25(51):6817-30, Oncogene.
- Behrmann I, Smyczek T, Heinrich PC, Schmitz-Van de Leur H, Komyod W, Giese B, Müller-Newen G, Haan S, Haan C;** Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: the exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak.receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase. 2004 August 20;279(34):35486-93, J Biol Chem.
- Bimmler D, Graf R, Scheele GA, Frick TW;** Pancreatic stone protein (lithostathine), a physiologically relevant pancreatic calcium carbonate crystal inhibitor? 1997 Januar 31;272(5):3073-82, J Biol Chem.
- Bimmler D, Angst E, Valeri F, Bain M, Scheele GA, Frick TW, Graf R;** Regulation of PSP/reg in rat pancreas: immediate and steady-state adaptation to different diets. 1999 Oktober 19(3):255-67, Pancreas.
- Bimmler D, Schiesser M, Perren A, Scheele G, Angst E, Meili S, Ammann R, Graf R;** Coordinate regulation of PSP/reg and PAP isoforms as a family of secretory stress proteins in an animal model of chronic pancreatitis. 2004 Mai 15;118(2):122-35, J Surg Res.

**Bishnupuri KS, Luo Q, Murmu N, Houchen CW, Anant S, Dieckgraefe BK;** Reg IV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas. 2006 Januar 130(1):137-49, Gastroenterology.

**Bluth MH, Patel SA, Dieckgraefe BK, Okamoto H, Zenilman ME;** Pancreatic regenerating protein (reg I) and reg I receptor mRNA are upregulated in rat pancreas after induction of acute pancreatitis. 2006 Juli 28;12(28):4511-6, World J Gastroenterol.

**Bödeker H, Vasseur S, Duseti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL;** PAP gene transcription induced by cycloheximide in AR4-2J cells involves ADP-ribosylation. 1998 Oktober 29;251(3):710-3, Biochem Biophys Res Commun.

**Bödeker H, Keim V, Fiedler F, Dagorn JC, Iovanna JL;** PAP I interacts with itself, PAP II, PAP III, and lithostathine/regIalpha. 1999 September-Dezember;2(3):150-4, Mol Cell Biol Res Commun.

**Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC;** p53 induces NF-kappaB activation by an I kappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. 2004 Juni 18;279(25):26115-25, J Biol Chem.

**Burrige K, Turner CE, Romer LH;** Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. 1992 November 19(4):893-903, J Cell Biol.

**Calalb MB, Polte TR, Hanks SK;** Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. 1995 Februar 15(2):954-63, Mol Cell Biol.

**Cambi A, Koopman M, Figdor CG;** How C-type lectins detect pathogens. 2005 April (4):481-8, Cell Microbiol.

**Cardone RA, Bellizzi A, Busco G, Weinman EJ, Dell'Aquila ME, Casavola V, Azzariti A, Mangia A, Paradiso A, Reshkin SJ;** The NHERF1 PDZ2 domain regulates PKA-RhoA-p38-mediated NHE1 activation and invasion in breast tumor cells. 2007 Mai 18(5):1768-80, Mol Biol Cell.

**Carrió MM, Villaverde A;** Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. 2001 Januar 26;489(1):29-33, FEBS Lett.

**Cary LA, Chang JF, Guan JL;** Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. 1996 Juli 109 ( Pt 7):1787-94, J Cell Sci.

**Cash HL, Whitham CV, Hooper LV;** Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in Escherichia coli. 2006 Juli 48(1):151-9, Protein Expr Purif.

**Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV;** Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. 2006 August 25;313(5790):1126-30, Science.

**Cavard C, Terris B, Grimber G, Christa L, Audard V, Radenen-Bussiere B, Simon MT, Renard CA, Buendia MA, Perret C;** Overexpression of regenerating islet-derived 1 alpha and 3 alpha genes in human primary liver tumors with beta-catenin mutations. 2006 Januar 26;25(4):599-608, Oncogene.

**Cavard C, Terris B, Grimber G, Christa L, Audard V, Radenen-Bussiere B, Simon MT, Renard CA, Buendia MA, Perret C;** Overexpression of regenerating islet-derived 1 alpha and 3 alpha genes in human primary liver tumors with beta-catenin mutations. 2006 Januar 26;25(4):599-608, Oncogene.

**Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN;** AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. 1999;68:965-1014, Annu Rev Biochem.

**Chang L, Karin M;** Mammalian MAP kinase signalling cascades. 2001 März 1;410(6824):37-40, Nature.

- Chakraborty C, Katsumata N, Myal Y, Schroedter IC, Brazeau P, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG;** Age-related changes in peptide-23/pancreatitis-associated protein and pancreatic stone protein/reg gene expression in the rat and regulation by growth hormone-releasing hormone. 1995 Mai 136(5):1843-9, *Endocrinology*.
- Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL;** Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. 1995 Juli 14;270(28):16995-9, *J Biol Chem*.
- Chen J, Li L, Zhang Y, Yang H, Wei Y, Zhang L, Liu X, Yu L;** Interaction of Pin1 with Nek6 and characterization of their expression correlation in Chinese hepatocellular carcinoma patients. 2006 März 24;341(4):1059-65, *Biochem Biophys Res Commun*.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N;** Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. 2001 September 1;15(17):2203-8, *Genes Dev*.
- Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK;** Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. 2003 März 1;63(5):1059-66, *Cancer Res*.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD;** Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. 1994 März 25;263(5154):1759-62, *Science*.
- Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR;** Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. 1996 April 16;93(8):3636-41, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV;** The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. 2005 November 14;24(50):7482-92, *Oncogene*.
- Christa L, Felin M, Morali O, Simon MT, Lasserre C, Brechot C, Sève AP;** The human HIP gene, overexpressed in primary liver cancer encodes for a C-type carbohydrate binding protein with lactose binding activity. 1994 Januar 3;337(1):114-8, *FEBS Lett*.
- Christa L, Carnot F, Simon MT, Levavasseur F, Stinnakre MG, Lasserre C, Thepot D, Clement B, Devinoy E, Brechot C;** HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells. 1996 Dezember 271(6 Pt 1):G993-1002, *Am J Physiol*.
- Closa D, Motoo Y, Iovanna JL;** Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. 2007 Januar 14;13(2):170-4, *World J Gastroenterol*.
- Coffer PJ, Koenderman L, de Groot RP;** The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. 2000 Mai 15;19(21):2511-22, *Oncogene*.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME;** Cellular survival: a play in three Akts. 1999 November 15;13(22):2905-27, *Genes Dev*.
- De Caro A, Lohse J, Sarles H;** Characterization of a protein isolated from pancreatic calculi of men suffering from chronic calcifying pancreatitis. 1979 April 27;87(4):1176-82, *Biochem Biophys Res Commun*.
- de la Monte SM, Ozturk M, Wands JR;** Enhanced expression of an exocrine pancreatic protein in Alzheimer's disease and the developing human brain. 1990 September 86(3):1004-13, *J Clin Invest*.
- Demaugre F, Philippe Y, Sar S, Pileire B, Christa L, Lasserre C, Brechot C;** HIP/PAP, a C-type lectin overexpressed in hepatocellular carcinoma, binds the RII alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and alters the cAMP-dependent protein kinase signalling. 2004 Oktober 271(19):3812-20, *Eur J Biochem*.

- Diener K, Wang XS, Chen C, Meyer CF, Keesler G, Zukowski M, Tan TH, Yao Z;** Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. 1997 September 2;94(18):9687-92, Proc Natl Acad Sci U S A.
- Dodd JR, Christie DL;** Substituted cysteine accessibility of the third transmembrane domain of the creatine transporter: defining a transport pathway. 2005 September 23;280(38):32649-54, J Biol Chem.
- Dreyer SD, Zheng Q, Zabel B, Winterpacht A, Lee B;** Isolation, characterization, and mapping of a zinc finger gene, ZFP95, containing both a SCAN box and an alternatively spliced KRAB A domain. 1999 November 15;62(1):119-22, Genomics.
- Duseti NJ, Ortiz EM, Mallo GV, Dagorn JC, Iovanna JL;** Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region. 1995 September 22;270(38):22417-21, J Biol Chem.
- Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C;** Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. 2006 Oktober 30;25(51):6800-16, Oncogene.
- El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, Mielke L, de Pauw A, Lhocine N, Smith AM, Rutschman R, Kaushal D, Shen Y, Suda T, Donnelly RP, Myers MG Jr, Alexander W, Vignali DA, Watowich SS, Ernst M, Hilton DJ, Murray PJ;** General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. 2006 Dezember 1;177(11):7880-8, J Immunol.
- Evans AJ, Russell RC, Roche O, Burry TN, Fish JE, Chow VW, Kim WY, Saravanan A, Maynard MA, Gervais ML, Sufan RI, Roberts AM, Wilson LA, Betten M, Vandewalle C, Berx G, Marsden PA, Irwin MS, Teh BT, Jewett MA, Ohh M;** VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. 2007 Januar 27(1):157-69. Epub 2006 Oktober 23, Mol Cell Biol.
- Fan P, Kyaw H, Su K, Zeng Z, Augustus M, Carter KC, Li Y;** Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor. 1998 Februar 4;243(1):264-8, Biochem Biophys Res Commun.
- Fenner JE, Starr R, Cornish AL, Zhang JG, Metcalf D, Schreiber RD, Sheehan K, Hilton DJ, Alexander WS, Hertzog PJ;** Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. 2006 Januar 7(1):33-9, Nat Immunol.
- Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D;** Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. 2006 März 15;176(6):3774-9, J Immunol.
- Fradkin LG, Garriga G, Salinas PC, Thomas JB, Yu X, Zou Y;** Wnt signaling in neural circuit development. 2005 November 9;25(45):10376-8, J Neurosci.
- Frigerio JM, Duseti NJ, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL;** Identification of a second rat pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning, gene structure, and expression during acute pancreatitis. 1993 Sep 7;32(35):9236-41. Biochemistry.
- Frigerio JM, Duseti NJ, Garrido P, Dagorn JC, Iovanna JL;** The pancreatitis associated protein III (PAP III), a new member of the PAP gene family. 1993 November 16;1216(2):329-31, Biochim Biophys Acta.
- Frisch SM, Francis H;** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. 1994 Februar 124(4):619-26, J Cell Biol.
- Fukui H, Kinoshita Y, Maekawa T, Okada A, Waki S, Hassan S, Okamoto H, Chiba T;** Regenerating gene protein may mediate gastric mucosal proliferation induced by hypergastrinemia in rats. 1998 Dezember 115(6):1483-93, Gastroenterology.
- Fukui H, Fujii S, Takeda J, Kayahara T, Sekikawa A, Nanakin A, Suzuki K, Hisatsune H, Seno H, Sawada M, Fujimori T, Chiba T;** Expression of reg I alpha protein in human gastric cancers. 2004;69(3):177-84, Digestion.



- Galligan CL, Matsuyama W, Matsukawa A, Mizuta H, Hodge DR, Howard OM, Yoshimura T;** Up-regulated expression and activation of the orphan chemokine receptor, CCRL2, in rheumatoid arthritis. 2004 Juni 50(6):1806-14, *Arthritis Rheum*.
- García-Domingo D, Leonardo E, Grandien A, Martínez P, Albar JP, Izpisúa-Belmonte JC, Martínez-A C;** DIO-1 is a gene involved in onset of apoptosis in vitro, whose misexpression disrupts limb development. 1999 Juli 6;96(14):7992-7, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Gingras S, Parganas E, de Pauw A, Ihle JN, Murray PJ;** Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling. 2004 Dezember 24;279(52):54702-7, *J Biol Chem*.
- Gironella M, Iovanna JL, Sans M, Gil F, Peñalva M, Closa D, Miquel R, Piqué JM, Panés J;** Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. 2005 September 54(9):1244-53, *Gut*.
- Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ;** Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. 1991 November 25;266(33):22159-63, *J Biol Chem*.
- Graf R, Schiesser M, Scheele GA, Marquardt K, Frick TW, Ammann RW, Bimmler D;** A family of 16-kDa pancreatic secretory stress proteins form highly organized fibrillar structures upon tryptic activation. 2001 Juni 15;276(24):21028-38, *J Biol Chem*.
- Graf R, Schiesser M, Lüssi A, Went P, Scheele GA, Bimmler D;** Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/reg, PAP I, PAP II, and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis. 2002 Juni 15;105(2):136-44, *J Surg Res*.
- Graf R, Schiesser M, Reding T, Appenzeller P, Sun LK, Fortunato F, Perren A, Bimmler D;** Exocrine meets endocrine: pancreatic stone protein and regenerating protein--two sides of the same coin. Juni 15;133(2):113-20, *J Surg Res*.
- Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS 3rd, Evans DR;** Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. 2000 Januar 20;403(6767):328-32, *Nature*.
- Gross DJ, Weiss L, Reibstein I, van den Brand J, Okamoto H, Clark A, Slavin S;** Amelioration of diabetes in nonobese diabetic mice with advanced disease by linomide-induced immunoregulation combined with Reg protein treatment. 1998 Mai 139(5):2369-74, *Endocrinology*.
- Gu Z, Rubin MA, Yang Y, Deprimo SE, Zhao H, Horvath S, Brooks JD, Loda M, Reiter RE;** Reg IV: a promising marker of hormone refractory metastatic prostate cancer. 2005 März 15;11(6):2237-43, *Clin Cancer Res*.
- Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein TW;** The Wnt code: cnidarians signal the way. 2006 Dezember 4;25(57):7450-60, *Oncogene*.
- Guertin DA, Sabatini DM;** An expanding role for mTOR in cancer. 2005 August 11(8):353-61, *Trends Mol Med*.
- Hauck CR, Hsia DA, Puente XS, Cheresch DA, Schlaepfer DD;** FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. 2002 Dezember 2;21(23):6289-302, *EMBO J*.
- Hall G, Hasday JD, Rogers TB;** Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. 2006 Oct;41(4):580-91, *J Mol Cell Cardiol*.
- Harlow L. & Lane J;** *Antibodies, a laboratory manual*. 1988, Cold Spring Harbour Press.
- Hartupée JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK;** Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. 2001 April 16;1518(3):287-93, *Biochim Biophys Acta*.

- Heber S, Sick B;** Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. 2006 Fall;10(3):358-68, OMICS.
- Hervieu V, Christa L, Gouysse G, Bouvier R, Chayvialle JA, Bréchet C, Scoazec JY;** HIP/PAP, a member of the reg family, is expressed in glucagon-producing enteropancreatic endocrine cells and tumors. 2006 August 37(8):1066-75, Hum Pathol.
- Ho MR, Lou YC, Lin WC, Lyu PC, Huang WN, Chen C;** Human pancreatitis-associated protein forms fibrillar aggregates with a native-like conformation. 2006 November 3;281(44):33566-76, J Biol Chem.
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M;** Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. 1999 Januar 21;18(3):813-22, Oncogene.
- Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT;** Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. 1993 November 123(4):993-1005, J Cell Biol.
- Hsu SC, TerBush D, Abraham M, Guo W;** The exocyst complex in polarized exocytosis. 2004;233:243-65, Int Rev Cytol.
- Hungerford JE, Compton MT, Matter ML, Hoffstrom BG, Otey CA;** Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. 1996 Dezember 135(5):1383-90, J Cell Biol.
- Iovanna J, Orelle B, Keim V, Dagorn JC;** Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. 1991 Dezember 25;266(36):24664-9, J Biol Chem.
- Iovanna JL, Dagorn JC;** The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide. 2005 Mai 25;1723(1-3):8-18, Biochim Biophys Acta.
- Itoh T, Tsuzuki H, Katoh T, Teraoka H, Matsumoto K, Yoshida N, Terazono K, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H;** Isolation and characterization of human reg protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. 1990 Oktober 15;272(1-2):85-8, FEBS Lett.
- Kadowaki Y, Ishihara S, Miyaoka Y, Rumi MA, Sato H, Kazumori H, Adachi K, Takasawa S, Okamoto H, Chiba T, Kinoshita Y;** Reg protein is overexpressed in gastric cancer cells, where it activates a signal transduction pathway that converges on ERK1/2 to stimulate growth. 2002 Oktober 23;530(1-3):59-64, FEBS Lett.
- Kahana O, Micksche M, Witz IP, Yron I;** The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. 2002 Juni 6;21(25):3969-77, Oncogene.
- Kandil E, Lin YY, Bluth MH, Zhang H, Levi G, Zenilman ME;** Dexamethasone mediates protection against acute pancreatitis via upregulation of pancreatitis-associated proteins. 2006 November 14;12(42):6806-11, World J Gastroenterol.
- Karin M, Hunter T;** Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. 1995 Juli 1;5(7):747-57, Curr Biol.
- Karin M, Delhase M;** The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. 2000 Februar 12(1):85-98, Semin Immunol.
- Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, Jones DA;** Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of 1999 November 23;96(24):14007-12, Proc Natl Acad Sci U S A.
- Katsumata N, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG;** Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. 1995 April 136(4):1332-9, Endocrinology.

- Kaufmann R, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, Henklein P, Biskup C, Westermann M, Hollenberg MD, Settmacher U;** Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. 2007 Juni 211(3):699-707, *J Cell Physiol*.
- Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I;** ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. 2006 Dezember 18(12):2238-51, *Cell Signal*.
- Kim S, Chin K, Gray JW, Bishop JM;** A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. 2004 November 16;101(46):16251-6, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kimball SR, Jefferson LS;** New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. 2006 Februar 83(2):500S-507S, *Am J Clin Nutr*.
- Kinoshita Y, Ishihara S, Kadowaki Y, Fukui H, Chiba T;** Reg protein is a unique growth factor of gastric mucosal cells. 2004 Juni 39(6):507-13, *J Gastroenterol*.
- Klumpfer L;** Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. 2006 März 6(2):107-21, *Curr Cancer Drug Targets*.
- Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, Unno M, Matsuno S, Sasaki H, Takasawa S, Okamoto H;** Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. 2000 April 14;275(15):10723-6, *J Biol Chem*.
- Korkolopoulou P, Saetta AA, Levidou G, Gigelou F, Lazaris A, Thymara I, Scliri M, Bousboukea K, Michalopoulos NV, Apostolikas N, Konstantinidou A, Tzivras M, Patsouris E;** c-FLIP expression in colorectal carcinomas: association with Fas/FasL expression and prognostic implications. 2007 August 51(2):150-6, *Histopathology*.
- Krieg J, Hofsteenge J, Thomas G;** Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. 1988 August 15;263(23):11473-7, *J Biol Chem*.
- Kuida K, Boucher DM;** Functions of MAP kinases: insights from gene-targeting studies. 2004 Juni 135(6):653-6, *J Biochem (Tokyo)*.
- Lasserre C, Christa L, Simon MT, Vernier P, Bréchet C;** A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. 1992 September 15;52(18):5089-95, *Cancer Res*.
- Lasserre C, Simon MT, Ishikawa H, Diriong S, Nguyen VC, Christa L, Vernier P, Brechet C;** Structural organization and chromosomal localization of a human gene (HIP/PAP) encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer. 1994 August 15;224(1):29-38, *Eur J Biochem*.
- Larsson H, Carlsson E, Mattsson H, Lundell L, Sundler F, Sundell G, Wallmark B, Watanabe T, Håkanson R;** Plasma gastrin and gastric enterochromaffinlike cell activation and proliferation. Studies with omeprazole and ranitidine in intact and antrectomized rats. 1986 Februar 90(2):391-9, *Gastroenterology*.
- Lejen T, Pene TD, Rosé SD, Trifaró JM;** The role of different Scinderin domains in the control of F-actin cytoskeleton during exocytosis. 2002 Oktober 971:248-50, *Ann N Y Acad Sci*.
- Levine JL, Patel KJ, Zheng Q, Shuldiner AR, Zenilman ME;** A recombinant rat regenerating protein is mitogenic to pancreatic derived cells. 2000 März 89(1):60-5, *J Surg Res*.
- Li A, Crimmins DL, Luo Q, Hartupee J, Landt Y, Ladenson JH, Wilson D, Anant S, Dieckgraefe BK;** Expression of a novel regenerating gene product, Reg IV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization. 2003 Oktober 31(2):197-206, *Protein Expr Purif*.

- Lieu HT, Batteux F, Simon MT, Cortes A, Nicco C, Zavala F, Pauloin A, Tralhao JG, Soubrane O, Weill B, Bréchet C, Christa L;** HIP/PAP accelerates liver regeneration and protects against acetaminophen injury in mice. 2005 September 42(3):618-26, *Hepatology*.
- Livesey FJ, O'Brien JA, Li M, Smith AG, Murphy LJ, Hunt SP;** A Schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. 1997 Dezember 11;390(6660):614-8, *Nature*.
- Lo KM, Sudo Y, Chen J, Li Y, Lan Y, Kong SM, Chen L, An Q, Gillies SD;** High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. 1998 Juni11(6):495-500, *Protein Eng*.
- Lu Y, Ponton A, Okamoto H, Takasawa S, Herrera PL, Liu JL;** Activation of the Reg family genes by pancreatic-specific IGF-I gene deficiency and after streptozotocin-induced diabetes in mouse pancreas. 2006 Juli 291(1):E50-8, *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Lu Z, Xu S;** ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. 2006 November 58(11):621-31, *IUBMB Life*.
- Macadam RC, Sarela AI, Farmery SM, Robinson PA, Markham AF, Guillou PJ;** Death from early colorectal cancer is predicted by the presence of transcripts of the REG gene family. 2000 Juli 83(2):188-95, *Br J Cancer*.
- Meima ME, Mackley JR, Barber DL;** Beyond ion translocation: structural functions of the sodium-hydrogen exchanger isoform-1. 2007 Juli 16(4):365-72, *Curr Opin Nephrol Hypertens*.
- Meister A, Weinrich SL, Nelson C, Rutter WJ;** The chymotrypsin enhancer core. Specific factor binding and biological activity. 1989 Dezember 5;264(34):20744-51, *J Biol Chem*.
- Mizuno K, Irie S, Sato TA;** Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF-kappaB activity induced by TNF-alpha. 2001 Februar 13(2):125-30, *Cell Signal*.
- Miyashita H, Nakagawara K, Mori M, Narushima Y, Noguchi N, Moriizumi S, Takasawa S, Yonekura H, Takeuchi T, Okamoto H;** Human REG family genes are tandemly ordered in a 95-kilobase region of chromosome 2p12. 1995 Dezember 27;377(3):429-33, *FEBS Lett*.
- Miyaoka Y, Kadowaki Y, Ishihara S, Ose T, Fukuhara H, Kazumori H, Takasawa S, Okamoto H, Chiba T, Kinoshita Y;** Transgenic overexpression of Reg protein caused gastric cell proliferation and differentiation along parietal cell and chief cell lineages. 2004 April 29;23(20):3572-9, *Oncogene*.
- Model MA, Omann GM;** Ligand-receptor interaction rates in the presence of convective mass transport. 1995 November 69(5):1712-20, *Biophys J*.
- Multigner L, De Caro A, Lombardo D, Campese D, Sarles H;** Pancreatic stone protein, a phosphoprotein which inhibits calcium carbonate precipitation from human pancreatic juice. 1983 Januar 14;110(1):69-74, *Biochem Biophys Res Commun*.
- Murray PJ;** The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. 2007 März 1;178(5):2623-9, *J Immunol*.
- Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, Lawrence E, Dannenberg AJ, Lovgren AK, Luo G, Pretlow TP, Newman RA, Willis J, Dawson D, Markowitz;** SD15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. 2006 August 8;103(32):12098-102, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Namikawa K, Fukushima M, Murakami K, Suzuki A, Takasawa S, Okamoto H, Kiyama H;** Expression of Reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat. 2005 Juni 24;332(1):126-34, *Biochem Biophys Res Commun*.
- Nakajima K, Hirose H, Taniguchi M, Kurashina H, Arasaki K, Nagahama M, Tani K, Yamamoto A, Tagaya M;** Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion. 2004 August 18;23(16):3216-26, *EMBO J*.

**Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, Chiba T;** Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. 2007 März;87(3):304-14, Lab Invest.

**Narushima Y, Unno M, Nakagawara K, Mori M, Miyashita H, Suzuki Y, Noguchi N, Takasawa S, Kumagai T, Yonekura H, Okamoto H;** Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma. 1997 Februar 7;185(2):159-68, Gene.

**Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, Rochelle JM, Suter ST, Gregor P, Seldin MF, Caron MG;** Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. 1994;2(2):165-74, Receptors Channels.

**Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M, Iovanna JL, Henderson CE;** Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. 2000 Dezember 2(12):906-14, Nat Cell Biol.

**Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL;** Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. 1992 Dezember 90(6):2284-91, J Clin Invest.

**Ortiz EM, Dusetti NJ, Vasseur S, Malka D, Bödeker H, Dagorn JC, Iovanna JL;** The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. 1998 April 114(4):808-16, Gastroenterology.

**Ochiai K, Kaneko K, Kitagawa M, Ando H, Hayakawa T;** Activated pancreatic enzyme and pancreatic stone protein (PSP/reg) in bile of patients with pancreaticobiliary maljunction/ choledochal cysts. 2004 November-Dezember 49(11-12):1953-6, Dig Dis Sci.

**Ogawa C, Usui K, Aoki M, Ito F, Itoh M, Kai C, Kanamori-Katayama M, Hayashizaki Y, Suzuki H;** Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex. 2007 April 13;282(15):11122-34, J Biol Chem.

**O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD;** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. 2002 April 109 Suppl:S121-31, Cell.

**Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H, Yasui W;** Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Reg IV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. 2005 Oktober 207(2):185-98, J Pathol.

**Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK;** Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. 1999 Juli 19(7):4806-18, Mol Cell Biol.

**Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG;** Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. 1995 Juli 1;55(13):2752-5, Cancer Res.

**Pahl HL;** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. 1999 November 22;18(49):6853-66, Oncogene.

**Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH;** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. 2001 April 22(2):153-83, Endocr Rev.

**Predescu SA, Predescu DN, Knezevic I, Klein IK, Malik AB;** Intersectin-1s regulates the mitochondrial apoptotic pathway in endothelial cells. 2007 Juni 8;282(23):17166-78, J Biol Chem.

- Quidville V, Segond N, Lausson S, Frenkian M, Cohen R, Jullienne A;** 15-Hydroxyprostaglandin-dehydrogenase is involved in anti-proliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs COX-1 inhibitors on a human medullary thyroid carcinoma cell line. 2006 Oktober 81(1-2):14-30, Prostaglandins Other Lipid Mediat.
- Raho G, Miranda C, Tamborini E, Pierotti MA, Greco A;** Detection of novel mRNA splice variants of human ING4 tumor suppressor gene. 2007 August 9;26(36):5247-57, Oncogene.
- Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW;** Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. 2004 April 21;23(8):1761-9, EMBO J.
- Rayet B, G elinas C;** Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. 1999 November 22;18(49):6938-47, Oncogene.
- Remy I, Montmarquette A, Michnick SW;** PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. 2004 Apr;6(4):358-65. Nat Cell Biol.
- Rodr guez Del Castillo A, Vitale ML, Trifar  JM;** Ca<sup>2+</sup> and pH determine the interaction of chromaffin cell scinderin with phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5,-biphosphate and its cellular distribution during nicotinic-receptor stimulation and protein kinase C activation. 1992 November 119(4):797-810, J Cell Biol.
- Roessler M, Rollinger W, Palme S, Hagmann ML, Berndt P, Engel AM, Schneidinger B, Pfeffer M, Andres H, Karl J, Bodenm ller H, R schhoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, R sch W, Langen H, Zolg W, Tacke M;** Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. 2005 September 15;11(18):6550-7, Clin Cancer Res.
- Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers HH, Fryns JP, deGrauw TJ, Jakobs C, Salomons GS;** High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. 2004 Juli 75(1):97-105, Am J Hum Genet.
- Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M;** Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein 1 as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. 2002 M rz 15;62(6):1868-75, Cancer Res.
- Rubinfeld H, Seger R;** The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. 2005 Oktober 31(2):151-74, Mol Biotechnol.
- Rzeszutko M, Rzeszutko W, Dziegiel P, Balcerzak W, Kaliszewski K, Bolanowski M;** Expression of FAS/APO 1/CD 95 in thyroid tumors. 2007;45(2):87-91, Folia Histochem Cytobiol.
- Sakurai, H;** Ikb kinases phosphorylate NF-kB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. 1999 274, 30353-30356, J. Biol. Chem.
- Salah Z, Maoz M, Pizov G, Bar-Shavit R;** Transcriptional regulation of human protease-activated receptor 1: a role for the early growth response-1 protein in prostate cancer. 2007 Oktober 15;67(20):9835-43; Cancer Res.
- Schalm SS, Blenis J;** Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. 2002 April 16;12(8):632-9. Curr Biol.
- Scheidereit C;** Ikb kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. 2006 Oktober 30;25(51):6685-705, Oncogene.
- Schiesser M, Bimmler D, Frick TW, Graf R;** Conformational changes of pancreatitis-associated protein (PAP) activated by trypsin lead to insoluble protein aggregates. 2001 M rz 22(2):186-92, Pancreas.
- Schmitz, ML;** Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF- B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. 1995 J. Biol. Chem.

- Schmitz L, Bacher S, and Kracht M;** Ik B-independent control of NF- $\kappa$ B activity by modulatory phosphorylations. 2001; 26(3):186-190, Trends Biochem Sci
- Segditsas S, Tomlinson I;** Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. 2006 Dezember 4;25(57):7531-7, Oncogene.
- Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Kusaka T, Ueno S, Nakase H, Seno H, Fujimori T, Chiba T;** Possible role of REG  $\alpha$  protein in ulcerative colitis and colitic cancer. 2005 Oktober 54(10):1437-44, Gut.
- Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Takeda J, Nanakin A, Hisatsune H, Seno H, Takasawa S, Okamoto H, Fujimori T, Chiba T;** REG  $\alpha$  protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer. 2005 März 128(3):642-53, Gastroenterology.
- Signori E, Massi E, Matera MG, Poscente M, Gravina C, Falcone G, Rosa MA, Rinaldi M, Wuyts W, Seripa D, Dallapiccola B, Fazio VM;** A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. 2007 Mai; 46(5):470-7, Genes Chromosomes Cancer.
- Simon MT, Pauloin A, Normand G, Lieu HT, Mouly H, Pivert G, Carnot F, Tralhao JG, Brechot C, Christa L;** HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. 2003 August 17(11):1441-50, FASEB J.
- Skretting G, Austbø L, Olsaker I, Espenes A;** Cloning and expression analysis of an ovine PAP-like protein cDNA, a gene differentially expressed in scrapie. 2006 Juli 5;376(1):116-22, Gene.
- Smyth GK;** Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. 2004 3:Article3, Stat Appl Genet Mol Biol.
- Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K;** Structure and physiological function of calpains. 1997 Dezember 15;328 ( Pt 3):721-32, Biochem J.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW;** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. 1998 Oktober 2;95(1):29-39, Cell.
- Sun M, Paciga JE, Feldman RI, Yuan Z, Coppola D, Lu YY, Shelley SA, Nicosia SV, Cheng JQ;** Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) via interaction between ER $\alpha$  and PI3K. 2001 August 15;61(16):5985-91, Cancer Res.
- Sun M, Yang L, Feldman RI, Sun XM, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ;** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85 $\alpha$ , androgen receptor, and Src. 2003 Oktober 31;278(44):42992-3000, J Biol Chem.
- Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, Falà F, Billi AM, Manzoli L, Cocco L, Martelli AM;** Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. 2005 Februar 202(2):623-34, J Cell Physiol.
- Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C;** Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. 1995 Oktober 1;182(4):1089-99, J Exp Med.
- Takasawa S, Ikeda T, Akiyama T, Nata K, Nakagawa K, Shervani NJ, Noguchi N, Murakami-Kawaguchi S, Yamauchi A, Takahashi I, Tomioka-Kumagai T, Okamoto H;** Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic beta-cell regeneration. 2006 Januar 23;580(2):585-91, FEBS Lett.

- Takehara A, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Kasugai T, Hosokawa M, Katagiri T, Nakamura Y, Nakagawa H;** Novel tumor marker REG4 detected in serum of patients with resectable pancreatic cancer and feasibility for antibody therapy targeting REG4. 2006 November 97(11):1191-7, *Cancer Sci*.
- Taniuchi K, Nishimori I, Takeuchi T, Fujikawa-Adachi K, Ohtsuki Y, Onishi S;** Developmental expression of carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI in the human brain. 2002;112(1):93-9, *Neuroscience*.
- Terazono K, Uchiyama Y, Ide M, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Okamoto H;** Expression of reg protein in rat regenerating islets and its co-localization with insulin in the beta cell secretory granules. 1990 April 33(4):250-2, *Diabetologia*.
- Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H;** A novel gene activated in regenerating islets. 1988 Februar 15;263(5):2111-4, *J Biol Chem*.
- Testa JR, Bellacosa A;** AKT plays a central role in tumorigenesis. 2001 September 25;98(20):10983-5, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Tong M, Ding Y, Tai HH;** Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells. 2006 November 27(11):2170-9, *Carcinogenesis*.
- Traynelis SF, Trejo J;** Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. 2007 Mai 14(3):230-5, *Curr Opin Hematol*.
- Treinius I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ;** Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. 1999 Januar 19(1):321-9, *Mol Cell Biol*.
- Tremblay L, Hauck W, Aprikian AG, Begin LR, Chapdelaine A, Chevalier S;** Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. 1996 Oktober 9;68(2):164-71, *Int J Cancer*.
- Tribl B, Filipp D, Bödeker H, Yu P, Hammerrmüller I, McKerlie C, Keim V, Sibbald WJ;** Pseudomonas pneumonia-mediated sepsis induces expression of pancreatitis-associated protein-I in rat pancreas. 2004 Juli 29(1):33-40, *Pancreas*.
- Unno M, Yonekura H, Nakagawara K, Watanabe T, Miyashita H, Moriizumi S, Okamoto H, Itoh T, Teraoka H;** Structure, chromosomal localization, and expression of mouse reg genes, reg I and reg II. A novel type of reg gene, reg II, exists in the mouse genome. 1993 Juli 25;268(21):15974-82., *J Biol Chem*.
- Unno M, Nata K, Noguchi N, Narushima Y, Akiyama T, Ikeda T, Nakagawa K, Takasawa S, Okamoto H;** Production and characterization of Reg knockout mice: reduced proliferation of pancreatic beta-cells in Reg knockout mice. 2002 Dezember 51 Suppl 3:S478-83, *Diabetes*.
- Valery C, Vasseur S, Sabatier F, Iovanna JL, Dagorn JC, Grob JJ, Verrando P;** Pancreatitis associated protein I (PAP-I) alters adhesion and motility of human melanocytes and melanoma cells. 2001 März 116(3):426-33, *J Invest Dermatol*.
- van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, van Buren L, Burg D, van de Water B;** Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. 2005 Juni 1;65(11):4698-706, *Cancer Res*.
- Varfolomeev E, Wayson SM, Dixit VM, Fairbrother WJ, Vucic D;** The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. 2006 September 29;281(39):29022-9, *J Biol Chem*.



- Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, Dagorn JC, Cloasa D, Iovanna JL;** p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. 2004 Februar 20;279(8):7199-207, J Biol Chem.
- Violette S, Festor E, Pandrea-Vasile I, Mitchell V, Adida C, Dussaulx E, Lacorte JM, Chambaz J, Lacasa M, Lesuffleur T;** Reg IV, a new member of the regenerating gene family, is overexpressed in colorectal carcinomas. 2003 Januar 10;103(2):185-93, Int J Cancer.
- Wang, D. and Baldwin, A.S.Jr;** Activation of nuclear factor-kB-dependent transcription by tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. 1998 273, 29411–29416, J. Biol. Chem.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG;** Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. 2001 August 15;20(16):4370-9, EMBO J.
- Watanabe T, Yonekura H, Terazono K, Yamamoto H, Okamoto H;** Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissues. The reg protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene. 1990 Mai 5;265(13):7432-9, J Biol Chem.
- Watanabe T, Yonemura Y, Yonekura H, Suzuki Y, Miyashita H, Sugiyama K, Moriizumi S, Unno M, Tanaka O, Kondo H;** Pancreatic beta-cell replication and amelioration of surgical diabetes by Reg protein. 1994 April 26;91(9):3589-92, Proc Natl Acad Sci U S A.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL;** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. 1999 Januar 79(1):143-80, Physiol Rev.
- Wu, Z., Irizarry, R., Gentleman, R., Martinez Murillo, F., and Spencer, F. A;** Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. 2004 Johns Hopkins University, Department of Biostatistics Working Papers, Working Paper 1. <http://www.bepress.com/jhubiostat/paper1>.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN;** TOR signaling in growth and metabolism. 2006 Februar 10;124(3):471-84, Cell.
- Xu J, Hershman JM;** Histone deacetylase inhibitor depsipeptide represses nicotinamide N-methyltransferase and hepatocyte nuclear factor-1beta gene expression in human papillary thyroid cancer cells. 2006 Februar 16(2):151-60, Thyroid.
- Xu LH, Owens LV, Sturge GC, Yang X, Liu ET, Craven RJ, Cance WG;** Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. 1996 April 7(4):413-8, Cell Growth Differ.
- Xu, L., Sanchez, T., Buchanan, M. and Zheng, C.-F;** 1998 11(3):94–97, Stratagene Strategies.
- Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A;** IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. 2003 Juni 4(6):551-6, Nat Immunol.
- Yin MJ, Shao L, Voehringer D, Smeal T, Jallal B;** The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. 2003 Dezemeber 26;278(52):52454-60, J Biol Chem.
- Yonemura Y, Sakurai S, Yamamoto H, Endou Y, Kawamura T, Bandou E, Elnemr A, Sugiyama K, Sasaki T, Akiyama T, Takasawa S, Okamoto H;** REG gene expression is associated with the infiltrating growth of gastric carcinoma. 2003 Oktober 1;98(7):1394-400, Cancer.
- Yoshino N, Ishihara S, Rumi MA, Ortega-Cava CF, Yuki T, Kazumori H, Takazawa S, Okamoto H, Kadowaki Y, Kinoshita Y;** Interleukin-8 regulates expression of Reg protein in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. 2005 Oktober100(10):2157-66, Am J Gastroenterol.

**Yuan RH, Jeng YM, Chen HL, Hsieh FJ, Yang CY, Lee PH, Hsu HC;** Opposite roles of human pancreatitis-associated protein and REG1A expression in hepatocellular carcinoma: association of pancreatitis-associated protein expression with low-stage hepatocellular carcinoma, beta-catenin mutation, and favorable prognosis. 2005 April 1;11(7):2568-75, Clin Cancer Res.

**Zenilman ME, Magnuson TH, Swinson K, Egan J, Perfetti R, Shuldiner AR;** Pancreatic thread protein is mitogenic to pancreatic-derived cells in culture. 1996 April 110(4):1208-14, Gastroenterology.

**Zhang H, Heim J, Meyhack B;** Novel BNIP1 variants and their interaction with BCL2 family members. 1999 April 1;448(1):23-7, FEBS Lett.

**Zhang X, Lin DH, Jin Y, Wang KS, Zhang Y, Babilonia E, Wang Z, Wang Z, Giebisch G, Han ZG, Wang WH;** Inhibitor of growth 4 (ING4) is up-regulated by a low K intake and suppresses renal outer medullary K channels (ROMK) by MAPK stimulation. 2007 Mai 29;104(22):9517-22, Proc Natl Acad Sci U S A.

**Zhang YW, Ding LS, Lai MD;** Reg gene family and human diseases. 2003 Dezember 9(12):2635-41, World J Gastroenterol.

**Zhang Y, Lai M, Lv B, Gu X, Wang H, Zhu Y, Zhu Y, Shao L, Wang G;** Overexpression of Reg IV in colorectal adenoma. 2003 Oktober 8;200(1):69-76, Cancer Lett.

**Zhang H, Kandil E, Lin YY, Levi G, Zenilman ME;** Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated proteins exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats. 2004 September 39(9):870-81. Scand J Gastroenterol.

**Zunino R, Li Q, Rosé SD, Romero-Benítez MM, Lejen T, Brandan NC, Trifaró JM;** Expression of scinderin in megakaryoblastic leukemia cells induces differentiation, maturation, and apoptosis with release of plateletlike particles and inhibits proliferation and tumorigenesis. 2001 Oktober 1;98(7):2210-9. Blood.

Tabelle zu differentiell exprimierten Genen aus Mikroarray Studie mit p-Wert 0,01 und 1,5-facher differentieller Regulation

Gen Namen Kurzform	Verhältnis (log Wert zur Basis 2) der Fusionsproteine zur Kontrolle (Fc und unstimuliert)		„P-Wert“		Information zu Gen	
	Fc-Reg4	HIP/ PAP-Fc	Fc-Reg4	HIP/ PAP-Fc	kurz Beschreibung des biologischen Prozesses nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen	molekulare Funktion nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen
KIAA0372	0,57	0,92	0,0039	0,00027	Protein Biosynthese	ribosomale Struktur Komponente
WDR51B	0,43	0,93	0,0031	3,1*10 <sup>-5</sup>	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
FLJ13611	0,74	0,98	0,0027	0,00054	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
HPGD	0,35	0,67	0,024	0,00093	Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15 (NAD)	Prostaglandin-D Synthase Aktivität Elektronentransport Aktivität
SUHW4	0,28	0,78	0,057	0,00044		Nukleinsäure Bindungsaktivität, (Zink)-Ionen Bindungsaktivität
FLJ40432	0,48	0,62	0,0031	0,00073	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
SIP1	0,64	0,88	0,0036	0,00066	Assemblierung mit „Spliceosom“	Protein Interaktionsaktivität, Spliceosomen assoziiert
Sumo1	0,5	0,77	0,00039	0,000026	Protein Modifizierung, negative Regulation der Transkription	Protein Bindungsaktivität
Ing4	0,51	0,83	0,00025	0,000012	Zellzyklus und Apoptose Regulation	Protein Bindungsaktivität, Ionen Bindungsaktivität
Exoc5	0,72	0,79	0,00031	0,00018	Exocytose, post-Golgi Vesikel Transport	nicht beschrieben
Itsn1	0,56	0,72	0,0032	0,00083	synaptische Vesikel Endocytose	GTP-Austausch Faktor, Ca <sup>2+</sup> Ionenbindungsaktivität
KIAA1333	0,3	0,64	0,0027	0,000032	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
MAP4K3	0,47	0,66	0,0049	0,00072	JNK Kinase Kaskade, Stress Antwort	Serin/Threonin Kinase Aktivität, kleine GTPase Regulator Aktivität

## Anhang

GTPB P8	0	0,61	0,99	0,00072	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
Cfl2	-0,01	0,68	0,87	0,000079	Protein Bindung	
Capn1 0	0,01	0,92	0,96	0,0008	Proteolyse	Calpain Aktivität
Ca11	0,29	0,75	0,072	0,001	Kohlenstoff Metabolismus	Carbonat Dehydratase Aktivität, Zinkion Bindungsaktivität
NNMT	-0,23	0,65	0,033	0,00016		Nikotinamid N- Methyltransferase Aktivität
NA	0,96	0,38	0,00052	0,045	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
LOC14 4363	0,64	0,12	0,00086	0,33	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
PHYH	0,64	0,51	0,0003	0,0011	Lipid Metabolismus, Nervensystementwic- klung	Elektronentransport Aktivität
ZFP95	0,62	0,45	0,00023	0,0015	DNA Transkriptions- regulation	Transkriptionsfaktor- Aktivität, Zinkion Bindungsaktivität
BA16L 21	0,59	0,42	0,00035	0,0025	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
SRBD 1	0,87	0,6	0,00024	0,0022	Nukleotid Metabolismus	DNA und RNA Bindung, Hydrolase Aktivität
JOSD3	0,64	0,33	0,00044	0,015	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
CCRL2	0,36	0,53	0,016	0,0023	G-Protein gekoppelter Rezeptor,	Chemokine Rezeptor Aktivität
SLC6A 8	-0,6	-0,32	0,00038	0,011	Neurotransmitter Aufnahme, Ionen Bindung	
CEP35 0	-0,54	-0,08	0,0013	0,49	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
SLC9A 1	-0,74	-0,7	0,00047	0,00063	Ionen Transportaktivität	
MGC9 712	-0,63	-0,69	0,00011	0,000064	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert
WDR3 5	-0,87	-1,06	0,00033	0,000096	nicht charakterisiert	nicht charakterisiert

Tabelle zu differentiell exprimierten Genen aus Mikroarray Studie mit p-Wert 0,05 und 1,5-facher differentieller Regulation nach „gene Ontology“ Apoptose

Gen Namen Kurzform	Verhältnis (log Wert zur Basis 2) der Fusionsproteine zur Kontrolle (Fc und unstimuliert)	„P-Wert“	Information zu Gen	
	HIP/PAP-Fc	HIP/PAP-Fc	kurz Beschreibung des biologischen Prozesses nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen	molekulare Funktion nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen
ING4	0,83	$1,2 \cdot 10^{-5}$	Protein / Aminosäure Acetylierung	
SCIN	0,71	0,18	negative Regulation der Proliferation	Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol Bindung
BNIP	0,65	0,033	Apoptose; nicht weiterführend charakterisiert	
NEK6	0,6	0,025	Positive Regulation der NFkB Kaskade, Protein Phosphorylierung	Kinase Aktivität
MALT1	0,94	0,02	Positive Regulation der NFkB Kaskade	Protein Bindung, Peptidase Aktivität
Fas	0,88	0,042	Protein Assemblierung, Apoptose Signaltransduktion	Transmembranrezeptor
F2R	0,67	0,021	G-Protein gekoppelte Rezeptor Signaltransduktion im Kontext Apoptose, positive Aktivierung der NFkB Kaskade	Rezeptoraktivität
DIDO	0,92	0,0038	Transkriptionsregulation	Zink / Metalionen Bindung

Tabelle zu differentiell exprimierten Genen aus Mikroarray Studie mit p-Wert 0,05 und 1,5-facher differentieller Regulation nach „gene Ontology“ Mitose

Gen Namen Kurzform	Verhältnis (log Wert zur Basis 2) der Fusionsproteine zur Kontrolle (Fc und unstimuliert)	„P-Wert“	Information zu Gen	
	HIP/PAP-Fc	HIP/PAP-Fc	kurz Beschreibung des biologischen Prozesses nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen	molekulare Funktion nach „gene ontology“ Datenbankeinträgen
MAD2 L1	0,63	0,013	Mitose „Checkpoint“ assoziiert	Protein Bindung
NEK6	0,6	0,025	Positive Regulation der NFκB Kaskade, Protein Phosphorylierung	Kinase Aktivität
CDC25 C	0,66	0,015	Regulation von Cyclin-abhängiger Kinase Aktivität	Tyrosin Phosphatase Aktivität