

**Die Rolle mitogener und stressinduzierter  
MAPK-Signalwege in der Regulation  
von keratinozytären Wachstums- und  
Differenzierungsvorgängen**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt

von

Marc Schmidt

aus Kronach

Würzburg 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. U. R. Rapp

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Tag des Prüfungskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Epidermis: Aufbau und Funktion .....	1
1.2	Die Epidermis als Modellsystem für Zelldifferenzierung .....	3
1.3	Regulation von keratinozytärem Wachstum und Differenzierung <i>in vitro</i> .....	3
1.4	Intrazelluläre Regulationsmechanismen der Keratinozytendifferenzierung .....	4
1.5	Die Rolle Mitogen-aktivierter Signalwege bei der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung .....	8
1.6	S100-Proteine und deren Rolle in Keratinozytendifferenzierung .....	10
1.7	MRP8 und MRP14, differenzierungsspezifisch exprimierte S100-Proteine in Keratinozyten? .....	11
1.8	Fragestellungen .....	13
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1	Chemikalien .....	14
2.2	Lösungen, Medien und Puffer .....	14
2.3	Enzyme .....	17
2.4	Pharmakologische Inhibitoren und Zytokine .....	17
2.5	Rekombinante Proteine .....	18
2.6	Antikörper .....	18
2.6.1	Antikörper und Antiseren für Westernblot und Immunpräzipitation (IP) ...	18
2.6.2	Antikörper für Immunfluoreszenz (IF) und Immunhistochemie (IH) .....	19
2.7	Reagenssätze (Kits) .....	19
2.8	Spezielle Reagenzien .....	19
2.9	Zellkulturmaterial .....	20
2.9.1	Medien und Medienzusätze .....	20
2.9.2	Sonstiger Zellkulturbedarf .....	20
2.10	Plasmide .....	21
2.10.1	Plasmide zur Genexpression in Säugerzellen .....	21
2.10.2	Ausgangsplasmide für die Herstellung von RNA-Proben für <i>in-situ</i> Hybridisierung .....	21
2.11	Zellen und Bakterienstämme .....	21
2.12	Hautbiopsien für <i>in situ</i> -Hybridisierung und Immunhistologie .....	22
2.13	Geräte .....	22
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden .....	24
3.2 Arbeiten mit DNA .....	24
3.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....	24
3.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	24
3.2.3 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	25
3.2.4 Sequenzierung von DNA.....	25
3.2.5 DNA-Elution aus Agarosegelen .....	25
3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	25
3.3 Zellkultur .....	26
3.3.1 Passagierung von Zellen .....	26
3.3.2 Wegfrieren, Lagerung und Reaktivierung von Zellen.....	27
3.3.3 Kultur der HaCaT-Zelllinie.....	27
3.3.4 Kultur primärer NHEK-Zellen.....	29
3.3.5 Stimulation und Inhibitorinkubation.....	30
3.4 Proteinanalyse.....	31
3.4.1 Lysis humaner Keratinozyten zur Proteinanalyse.....	31
3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
3.4.3 Westernblot.....	32
3.4.4 Immunkomplex-Kinaseassays .....	33
3.4.5 Ras-Aktivierungsassays.....	34
3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung.....	35
3.4.7 Immunhistochemie.....	36
3.5 In situ-Hybridisierung.....	37
3.6 Elektronenmikroskopie (Transmissions-Elektronenmikroskopie).....	39
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
4.1 Etablierung eines <i>in vitro</i> -Modellsystems für Differenzierungsstudien.....	41
4.2 Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges durch extrazelluläres Calcium .....	43
4.3 Extrazelluläres Calcium stimuliert Erk unabhängig von Ras-Aktivität .....	47
4.4 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung ist abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration, aber unabhängig von PKC-Aktivierung.....	50
4.5 MEK-Inhibitor verhindert die calciuminduzierte Expression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p21/Cip1 .....	53
4.6 Calciuminduzierte Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin kann durch MEK-Inhibition blockiert werden .....	54

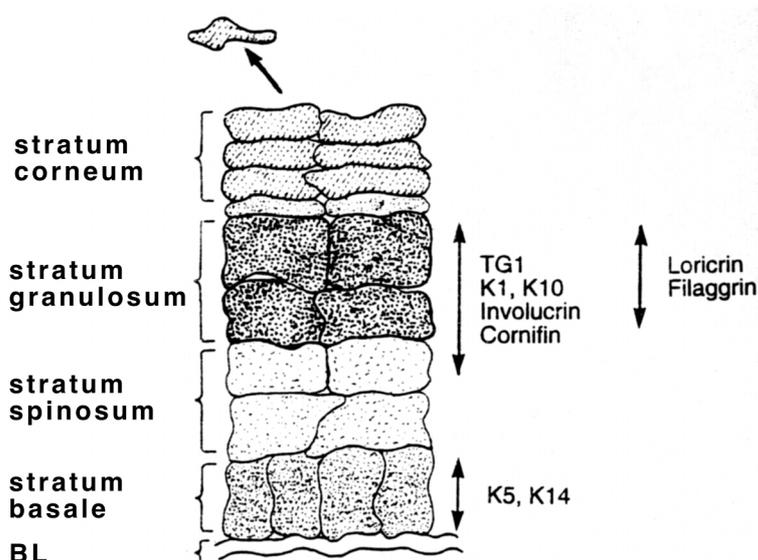
4.7 Calciuminduzierte Differenzierung humaner Keratinozyten geht mit erhöhter Expression von MRP8 und MRP14 einher .....	56
4.8 MRP8 und MRP14 werden im Haarfollikel exprimiert und können in suprabasalen Schichten der Epidermis induziert werden.....	60
4.9 IL-6 induziert MRP8/MRP14-Expression <i>in vitro</i> .....	66
4.10 Arsenitstimulation führt zur Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an Zytoskelettstrukturen.....	69
<b>5 Diskussion</b>	<b>71</b>
5.1 Calciuminduzierte Differenzierung von Keratinozyten wird von transienter Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges begleitet.....	71
5.2 Calciuminduzierte Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges erfolgt unabhängig von Ras und klassischen PKCs.....	72
5.3 Mögliche Mechanismen der Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges durch extrazelluläres Calcium .....	74
5.4 Funktion der calciuminduzierten Stimulation des Raf/MEK/Erk-Signalweges für die Initiation der Keratinozytendifferenzierung.....	76
5.5 Differenzierungsspezifische Expression der beiden S100-Proteine MRP8 und MRP14 in Keratinozyten.....	78
5.6 Induktion von MRP8/MRP14 durch IL-6 .....	80
5.7 Regulation der MRP8/MRP14-Funktion.....	81
5.8 Ausblick.....	84
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
6.1 Zusammenfassende Darstellung.....	88
6.2 Zusammenfassung.....	89
6.3 Summary.....	90
<b>7 Literatur</b>	<b>91</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>104</b>
8.1 Abkürzungen .....	104
<b>Danksagung</b>	<b>107</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>107</b>

<b>Publikationsliste und Auszeichnungen</b>	<b>109</b>
Auszeichnungen .....	109
Publikationen.....	109
Publizierte Abstracts .....	109
<b>Erklärung</b>	<b>111</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Epidermis: Aufbau und Funktion

Die Epidermis ist das terminale Abschlußgewebe der Haut. Ihr kommt vor allem eine Schutzfunktion zu. Sie reguliert den Wasserhaushalt des Körpers, bildet eine physikalische Barriere gegen den Eintritt pathogener Mikroorganismen und Viren und bietet Schutz vor anderen schädlichen Umwelteinflüssen wie ultravioletter Strahlung und Chemikalienwirkung. Wie andere Epithelien besitzt die Epidermis einen polaren Aufbau und besteht aus mehreren Schichten spezialisierter Zellen, im wesentlichen Keratinozyten, die von innen nach aussen einen wachsenden Grad an Differenzierung aufweisen. Histologisch läßt sich die Epidermis in vier distinkte Lagen einteilen, die sich sowohl morphologisch wie biochemisch voneinander unterscheiden (Abb. 1.1; Eckert *et al.*, 1997; Fuchs, 1993).

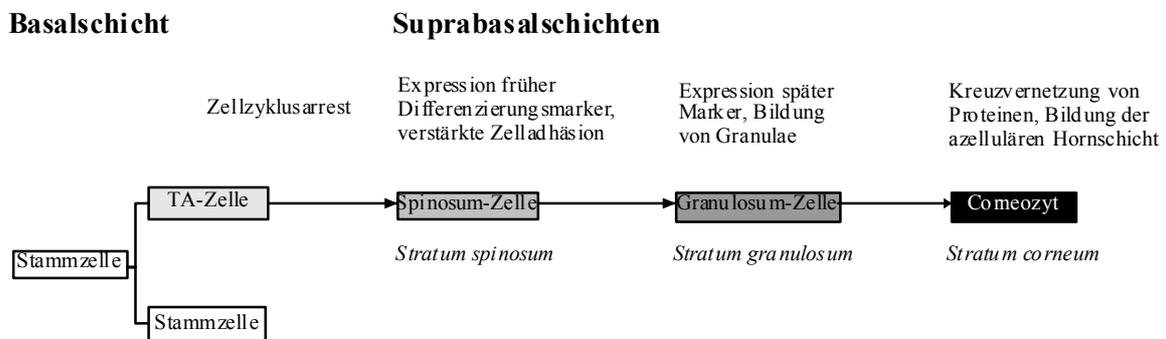


**Abbildung 1.1 Schematischer Schnitt durch die Epidermis mit Darstellung der für die einzelnen Schichten charakteristischen Markerproteine**

Während des Differenzierungsprozesses wandern die Keratinozyten vom *stratum basale* senkrecht nach außen (oben), wobei sie verschiedene charakteristische Proteine exprimieren. Am Ende ihrer etwa 3-4-wöchigen Wanderung werden die Zellen schließlich als terminal differenzierte Corneozyten von der Oberfläche abgestoßen (Pfeil). BL, Basallamina; K1, 5, 10, 14, Keratin 1, 5, 10, 14; TG1, Transglutaminase-1.  
(Nach Eckert *et al.*, 1997)

Nur die innerste Keratinozytenschicht, das *stratum basale* enthält mitotisch aktive Zellen, während die drei suprabasalen Zellschichten *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* ausschließlich aus postmitotischen, differenzierenden Zellen aufgebaut sind. Unter den mitotisch aktiven Keratinozyten im *stratum basale* unterscheidet man zwei Zellpopulationen, die epidermalen Stammzellen und die „transit amplifying cells“ (TAs) (Jones, 1997). Während die epidermalen Stammzellen einen Vorrat undifferenzierter Zellen bereitstellen, die zeitlebens an der Zelloberfläche abgestoßene Zellen ersetzen und das Epithel nach einer Verletzung regenerieren, sind die aus ihnen hervorgegangenen TAs bereits determinierte Keratinozyten, die nur noch ein begrenztes Proliferationspotential

besitzen. Sie stellen ein Zwischenstadium dar, über das epidermale Stammzellen terminal differenzierte Zellen generieren. Obwohl das initiale, für das Umschalten von Proliferation auf Differenzierung verantwortliche Signal bislang unbekannt ist, ist die Sequenz der Ereignisse doch weitgehend erforscht (Abb. 1.2; Eckert *et al.*, 1997; Fuchs, 1993).

**Mitotische Zellen****Postmitotische, differenzierende Zellen**

**Abbildung 1.2 Schematische Zusammenfassung der einzelnen Schritte des keratinozytären Differenzierungsprozesses.** Näheres im Text. TA, transient amplifying cell

Der Differenzierungsvorgang wird eingeleitet, wenn Zellen im *stratum basale* sich plötzlich von der Basalmembran ablösen, im Zellzyklus arretieren und in die distal folgende Zellschicht, das *stratum spinosum*, einwandern. Dort durchlaufen die Keratinozyten ein in seiner Abfolge genau abgestimmtes Differenzierungsprogramm, das mit einer Reihe morphologischer und biochemischer Veränderungen im *stratum spinosum* und *stratum granulosum* einhergeht. Im *stratum spinosum* kommt es zunächst zu einer Umstellung in der Keratinsynthese. Expressieren Basalzellen charakteristischerweise die Keratine K5 und K14, so werden im *stratum spinosum* zunehmend die differenzierungsspezifischen Keratine K1 und K10 gebildet, die sich zu dicken tonofibrillären Bündeln zusammenlagern. Im *stratum granulosum* werden diese Tonofibrillen zu makrofibrillären Kabeln gebündelt. Diese Schicht ist histologisch durch das Auftreten vieler Granulae gekennzeichnet, welche verschiedene Produkte der Keratinozytendifferenzierung enthalten, die zur Ausbildung terminaler Keratinozytenstrukturen im *stratum corneum* benötigt werden. Als Resultat des etwa drei- bis vierwöchigen Differenzierungsprozesses bilden sich im *stratum corneum* terminal differenzierte, kernlose Corneozyten, die in eine membranöse Hülle kreuzvernetzter Polypeptide, die azelluläre Hornschicht (auch “cornified envelope”, CE), eingebettet sind, welche die Haut nach aussen versiegelt und für ihre Widerstandsfähigkeit verantwortlich ist.

## 1.2 Die Epidermis als Modellsystem für Zelldifferenzierung

Zur Erhaltung ihrer Schutzfunktion gegen schädliche Umwelteinflüsse muß die Epidermis ihre Intaktheit durch fortwährende Proliferations- und Differenzierungsvorgänge aufrechterhalten. In gesunder Haut stehen Proliferation und Differenzierung miteinander in einem Gleichgewicht. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen wie bei Tumorgenese oder bei hyperproliferativen Erkrankungen ist diese Balance jedoch gestört. Die Aufklärung intrazellulärer Signalwege, die an der Regulation dieser Vorgänge beteiligt sind, ist daher von großer Bedeutung.

Zu den biochemischen Markern, mit deren Hilfe man die molekularen Mechanismen für Wachstum und Differenzierung in der Epidermis untersuchen kann, gehören vor allem Proteine, die zur Bildung der azellulären Schicht des *stratum corneum* benötigt werden. Diese umfassen sowohl Komponenten dieser Schicht selbst wie Involucrin (Simon and Green, 1985) oder Loricrin (Mehrel *et al.*, 1990), aber auch Transglutaminase (Thacher and Rice, 1985), ein Enzym, welches die Kreuzvernetzung der Hüllproteine katalysiert, Mitglieder der S100-Familie calciumbindender Proteine (Hoffmann *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 1995) und die differenzierungsspezifisch exprimierten Keratine K1 und K10 (Fuchs and Green, 1980).

Neben biochemischen Markern können auch morphologische Charakteristika zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen herangezogen werden. So ist beispielsweise während des Differenzierungsprozesses eine verstärkte Zell-Zelladhäsion zu beobachten, die durch die Ausbildung spezialisierter interzellulärer Kontakte, sogenannter Desmosomen, gekennzeichnet ist. Diese Desmosomenbildung geht mit umfangreichen Reorganisationsereignissen des Zytoskeletts einher, in deren Verlauf Aktin- und Intermediärfilamente an der zytoplasmatischen Seite der Desmosomen inserieren und ein kontinuierliches interzelluläres Netzwerk bilden, das wesentlich zur mechanischen Stabilität des Epithels beiträgt.

## 1.3 Regulation von keratinozytärem Wachstum und Differenzierung *in vitro*

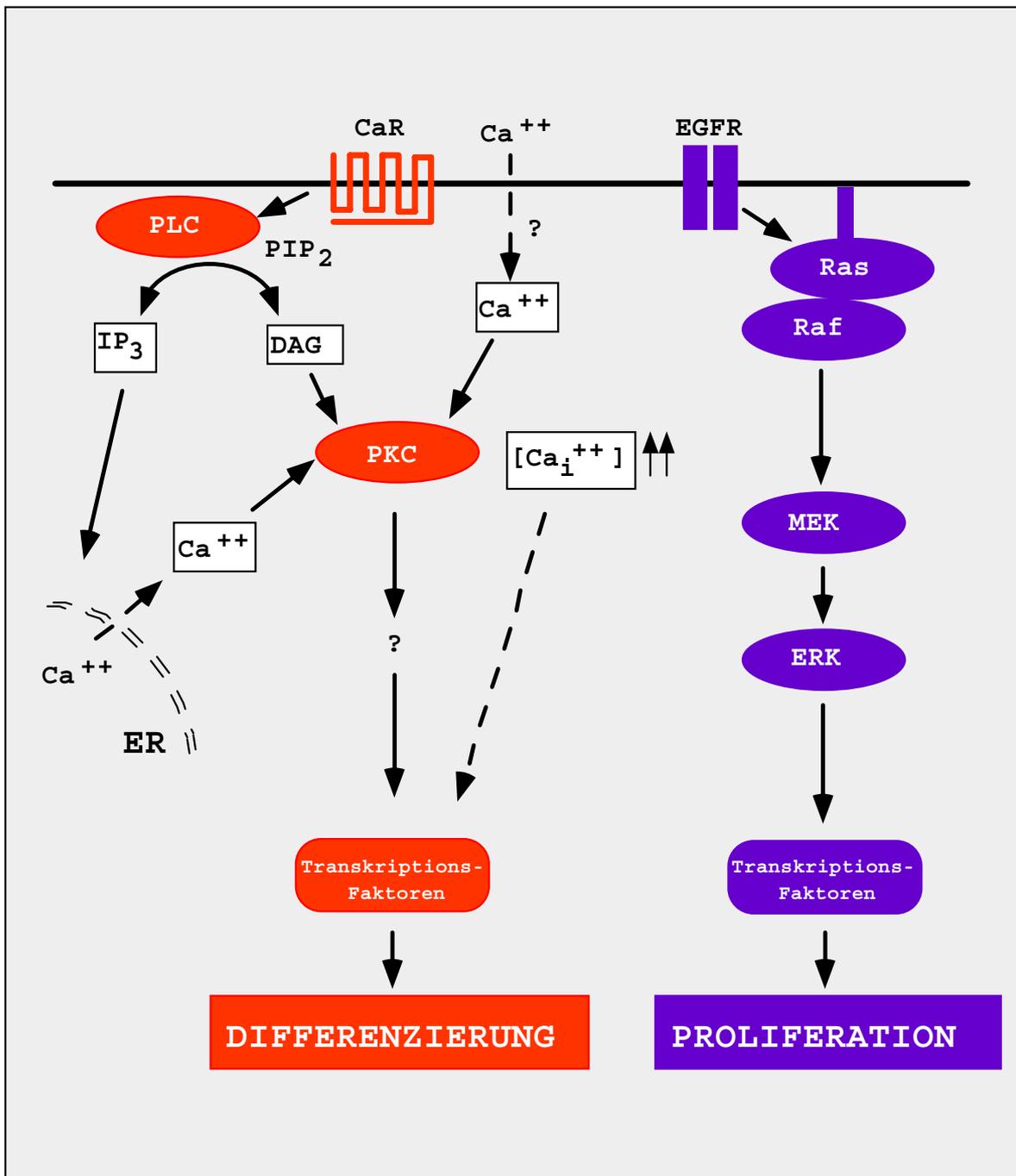
Durch Zellkulturexperimente konnten eine Reihe von *in vitro*-Modulatoren keratinozytärer Wachstums- und Differenzierungsvorgänge identifiziert werden. Proliferationsstimulierende Agenzien umfassen unter anderem den Epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF; Rheinwald, 1980) und Transformierenden Wachstumsfaktor-alpha (transforming growth factor-alpha, TGF- $\alpha$ ; Coffey *et al.*, 1987),

während Erhöhung der extrazellulären Calciumionenkonzentration viele Veränderungen induziert, die auch während des epidermalen Differenzierungsprozesses *in vivo* auftreten. Anhebung des extrazellulären Calciumspiegels von 0.05 mM auf eine Konzentration von mehr als 0.1 mM führt zu irreversiblen Zellzyklusarrest in Keratinozyten (Hennings *et al.*, 1980; Missero *et al.*, 1995). Nachfolgend kommt es auch zu erhöhter Expression differenzierungsassoziierter Proteine und der Entstehung desmosomaler Kontakte (Hennings *et al.*, 1980; Yuspa *et al.*, 1989). Verschiedenen Untersuchungen zufolge bildet Calcium einen Konzentrationsgradienten innerhalb der Epidermis (Forslind *et al.*, 1997; Menon *et al.*, 1985), so daß Calcium möglicherweise auch *in vivo* als Regulator von Wachstums- und Differenzierungsprozessen von Keratinozyten fungiert.

#### **1.4 Intrazelluläre Regulationsmechanismen der Keratinozyten-differenzierung**

Über die intrazellulären Signalwege, die an der Regulation von Keratinozytenwachstum und -differenzierung beteiligt sind, ist bislang nur sehr wenig bekannt. Lange Zeit wurde die Untersuchung differenzierungsrelevanter Signalwege durch das Fehlen effizienter Transfektionsmethoden für Keratinozyten erschwert. Erst die Entwicklung neuer Technologien wie die Generierung transgener oder gendefizienter Mäuse sowie verbesserte Transfektionsmethoden führten in jüngster Zeit zur Entdeckung einiger weniger Schlüsselkomponenten, die an der molekularen Steuerung von Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind (Abb. 1.3).

Wichtige Mediatoren von proliferativen Signalen sind membranständige Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Rezeptorfamilie (Olayioye *et al.*, 2000). Sowohl EGF als auch TGF- $\alpha$  vermitteln ihre mitogene Wirkung durch Bindung an den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR, ErbB1, Her1), ein Mitglied der ErbB-Rezeptorfamilie, das vorwiegend an der Oberfläche basaler Keratinozyten exprimiert wird (Green *et al.*, 1987). Erhöhte EGFR-Expression wird schon lange mit epidermaler Tumorgenese in Verbindung gebracht (Yamamoto *et al.*, 1986). Neuesten Untersuchungen zufolge scheint EGFR-Expression aber auch für die Persistenz epidermaler Hauttumore essentiell zu sein (Sibilia *et al.*, 2000). EGFR-defiziente Mäuse



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der bekannten regulatorischen Signalwege von Keratinozytenwachstum und -differenzierung.** ER, Endoplasmatisches Retikulum, CaR, Calciumrezeptor,  $PIP_2$ , Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Näheres im Text.

zeigen abhängig von ihrem genetischen Hintergrund Defekte in neuronalem und epidermalemem Gewebe und sterben kurz nach der Geburt (Miettinen *et al.*, 1995; Sibia *et al.*, 1998; Sibia and Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995). Bei diesen Mäusen ist die Differenzierung sowohl epidermaler Keratinozyten wie auch die Haarfollikelentwicklung gestört (Hansen *et al.*, 1997; Miettinen *et al.*, 1995; Sibia and Wagner, 1995; Threadgill *et al.*, 1995). Der EGFR scheint daher pleiotrope Effekte zu haben und sowohl bei der

Regulation von Keratinozytenwachstum als auch -differenzierung eine Rolle zu spielen. Die intrazellulären Signaltransduktionswege, die von dem EGFR bedient werden, sind komplex (Olayioye *et al.*, 2000). Ligandenbindung an den EGFR führt zur Autophosphorylierung an Tyrosinresten des zytoplasmatischen C-Terminus des Rezeptors und der Rekrutierung verschiedener Proteine mit Phosphotyrosin-bindenden Src-2 Homologie-Domänen (SH2-Domänen) wie Grb2, Shc und Phospholipase C-gamma (PLC- $\gamma$ ). Diese Proteine lösen die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege aus, die das Signal in den Zellkern weiterleiten. In einer Vielzahl von Zellen spielt die Rekrutierung des Adapterproteins Grb2 und nachfolgende Aktivierung der kleinen GTPase Ras eine Schlüsselrolle bei der mitogenen Zellantwort auf Wachstumsfaktorstimulation (Campbell *et al.*, 1998; Marshall, 1999). Translokation von Grb2 an die Plasmamembran führt zu dessen Bindung an den Guanin Nukleotid Austauschfaktor (Guanine nucleotide exchange factor, GEF) Son of Sevenless (Sos), der inaktives Ras-Protein über den Austausch von gebundenem GDP durch GTP in seine aktive Form überführt. Aktivierung von Ras wiederum resultiert in der Stimulation eines evolutionär konservierten Signaltransduktionsweges, der Raf/MEK/Erk-Kaskade (siehe Abschnitt 1.5), die das Signal durch schrittweise Aktivierung der einzelnen Komponenten in den Zellkern weiterleitet (Abb. 1.3). Dort kommt es zur Phosphorylierung von Transkriptionfaktoren und zur Expression spezifischer Gene, deren Genprodukte letztendlich die Teilung der Zelle einleiten.

Wie bereits erwähnt, führt Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration *in vitro* zur Initiation des keratinozytären Differenzierungsprozesses. Intrazellulär bewirkt Calciumstimulation unter anderem eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration (Bikle and Pillai, 1993). Dies scheint sowohl durch PLC- und Inositol-3,4,5-Triphosphat- (IP<sub>3</sub>-) vermittelte Mobilisation von Calcium aus intrazellulären Speichern (Haase *et al.*, 1997; Jaken and Yuspa, 1988), als auch durch passiven Einstrom von extrazellulärem Calcium über spannungsunabhängige Ionenkanäle zu erfolgen (Reiss *et al.*, 1991). Blockierung des Anstiegs intrazellulärer Calciumkonzentrationen durch den intrazellulären Calcium-Chelator BAPTA-AM, resultierte in Keratinozyten in verminderter Expression calciuminduzierter Differenzierungsmarker (Li *et al.*, 1995). Die Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration ist daher ein offenbar wichtiger Zwischenschritt bei der Induktion differenzierungsrelevanter Gene. Kürzlich wurde sowohl in humanen als auch murinen Keratinozyten ein Rezeptor für Calciumionen identifiziert, der das fehlende Bindeglied zwischen Erhöhung extrazellulärer Calciumkonzentrationen und dem Anstieg

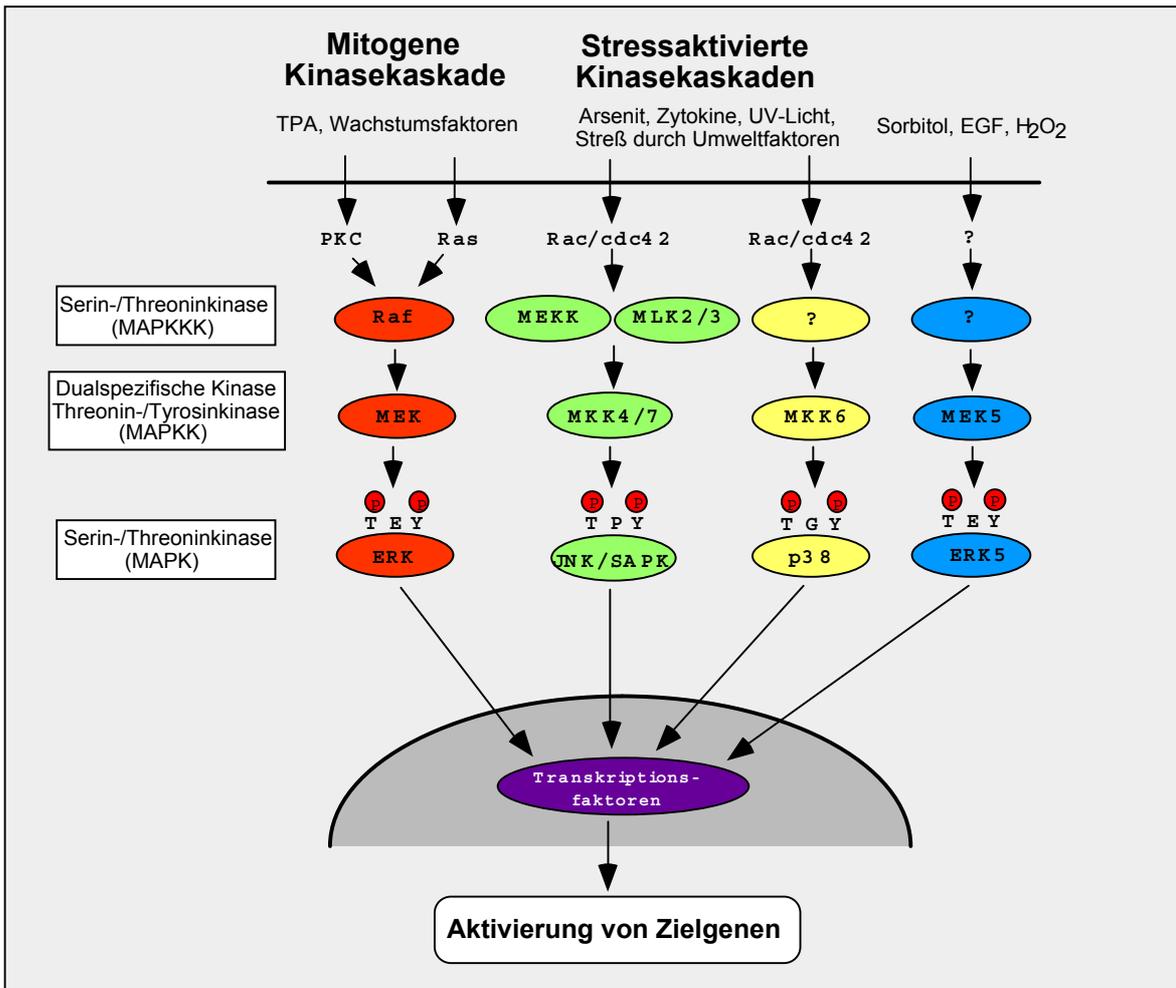
zytoplasmatischer Calciumspiegel darstellen könnte (Bikle *et al.*, 1996; Oda *et al.*, 2000; Oda *et al.*, 1998). Von diesem Calciumrezeptor wurden zwei Spleißvarianten beschrieben. Die längere Form kommt vor allem an der Oberfläche undifferenzierter Zellen vor, während eine kürzere Spleißvariante, der Exon 5 fehlt, auch in differenzierenden Zellen exprimiert wird (Oda *et al.*, 1998). Deletion der längeren Form dieses Rezeptors führte in Mäusen zu morphologischen Defekten in der Epidermis und verminderter Expression des Differenzierungsmarkers Loricrin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Oda *et al.*, 2000). Keratinozyten dieser Mäuse waren nicht in der Lage, auf Calciumstimulation mit einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zu antworten, obwohl die kürzere Form des Calciumrezeptors normal exprimiert wurde. Dies spricht dafür, daß die Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration kritisch von der Expression des vollständigen Rezeptors abhängig ist, während die kürzere Rezeptorvariante entweder nicht funktionell ist oder aber eine alternative Aufgabe erfüllt. Der in Keratinozyten exprimierte Calciumrezeptor ist seiner Sequenz nach identisch mit dem humanem Homolog eines Rezeptors aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren, der zuerst aus der Nebenschilddrüse von Rindern isoliert wurde (Brown *et al.*, 1993). Calciumbindung an diesen Rezeptor führt zur Stimulaton von Phospholipase C-Aktivität, was einen Anstieg der IP<sub>3</sub>-Konzentration und die nachfolgende Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern zur Folge hat (Chattopadhyay *et al.*, 1996; Hebert and Brown, 1995). In Keratinozyten resultierte Inhibition von PLC- $\gamma$ 1-Expression bzw. -Aktivierung in einer Hemmung calciuminduzierter Involucrin- und Transglutaminaseexpression (Xie and Bikle, 1999). Analog der Verhältnisse in der Nebenschilddrüse könnte daher in Keratinozyten PLC-Aktivierung für die Erhöhung zytoplasmatischer Calciumkonzentrationen und die nachfolgende Expression differenzierungsspezifischer Gene verantwortlich sein. Eine Klasse von Phospholipid-abhängigen Proteinkinasen, die sowohl durch Calcium als auch durch das zweite Produkt der enzymatischen Wirkung von PLC, Diazylglyzerin (DAG), aktiviert wird, sind Mitglieder der Proteinkinase C- (PKC-) Familie. Diese umfaßt mindestens 11 verschiedene Isozyme, die aufgrund struktureller und enzymatischer Eigenschaften in drei große Gruppen eingeteilt werden (Newton, 1997). Klassische PKCs (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ ) werden sowohl durch DAG als auch durch Calcium aktiviert, während die „neuen“ Isozyme (PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  und  $\mu$ ) kein Calcium für maximale Aktivierung benötigen, und die atypischen PKCs (PKC $\zeta$  und  $\iota$ ) weder durch Calcium noch durch DAG stimuliert werden. In Keratinozyten wurden verschiedene PKC-Isoformen mit

der Induktion von Differenzierung in Verbindung gebracht (Denning *et al.*, 1995; Ohba *et al.*, 1998; Ueda *et al.*, 1996). Denning *et al.* beschrieben differentielle Expression und Aktivierung unterschiedlicher PKC-Isoformen während calciuminduzierter Differenzierung von Mauskeratinozyten (Denning *et al.*, 1995). In den Experimenten dieser Forschergruppe führte Calciumstimulation zu erhöhter PKC $\epsilon$ -Expression und der Rekrutierung von PKC $\alpha$  an die Plasmamembran, wobei die Kinetik der Translokation mit der Induktion von Differenzierungsmarkern korrelierte. Inhibition von PKC $\alpha$  durch pharmakologische Verbindungen resultierte in verminderter Expression calciuminduzierter Markerproteine in diesem Zellsystem. Dagegen hatte Überexpression und Aktivierung von PKC $\alpha$  in der Basalzellschicht von transgenen Mäusen keinerlei Effekt auf Hautentwicklung und -morphogenese, sondern führte zu einer starken inflammatorischen Immunantwort in diesen Tieren (Wang and Smart, 1999). Die Aktivierung von PKC $\alpha$ -abhängigen Signalwegen alleine reicht daher offensichtlich nicht aus, Keratinozytendifferenzierung zu induzieren, was impliziert, daß zusätzliche Signale für das Umschalten von Wachstum auf Differenzierung benötigt werden.

### **1.5 Die Rolle Mitogen-aktivierter Signalwege bei der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung**

Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Wege sind evolutionär hochkonservierte Signalmodule, die an der Regulation einer Reihe von biologischen Funktionen wie Zellproliferation, -differenzierung und programmiertem Zelltod beteiligt sind (Robinson and Cobb, 1997; Treisman, 1996). In Vertebraten gibt es mindestens vier verschiedene MAPK-Signalwege, die unterschiedliche Klassen von MAPK aktivieren (Abb. 1.4).

Der am besten verstandene MAPK-Signalweg ist die Raf/MEK/Erk-Kaskade. Sie überträgt Signale von membranständigen Rezeptortyrosinkinasen und heterotrimären G-Proteinen über ein Kernmodul von intrazellulären Kinasen bestehend aus der Serin-/Threoninkinase Raf, der dualspezifischen Kinase MEK (mitogen/extracellular-signal regulated kinase kinase) und der Serin-/Threoninkinase Erk (extracellular-signal regulated kinase), die nach Aktivierung in den Zellkern wandert und dort durch Phosphorylierung verschiedener Transkriptionfaktoren die Expression spezifischer Gene anregt. Stimulation dieses Signalweges durch Wachstumsfaktoren wie EGF oder Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor, PDGF) führt zur Mitose der betreffenden Zelle, weshalb



**Abbildung 1.4 Darstellung der in Vertebraten bekannten MAPK-Signalwege**

Gezeigt sind die einzelnen Komponenten wie auch die bekanntesten Aktivatoren der einzelnen MAPK-Signalwege. Bei den MAPK ist jeweils das für deren katalytische Aktivierung verantwortliche Phosphorylierungsmotiv dargestellt.

der Raf/MEK/Erk-Weg oft vereinfachend als mitogene Kaskade bezeichnet wird. Immer mehr Daten sprechen jedoch auch für eine essentielle Beteiligung des Raf/MEK/Erk-Signalweges an entwicklungsbiologischen Vorgängen und der Regulation von Differenzierungsprozessen in einer Reihe von Organismen (Daum *et al.*, 1994; Marshall, 1995). Bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* ist Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges sowohl für die Entwicklung des Terminalsystems durch die Rezeptortyrosinkinase Torso als auch für die Spezifizierung der R7-Photorezeptorzelle durch die Rezeptortyrosinkinase Sevenless verantwortlich (Dickson and Hafen, 1994; Perrimon, 1993). Auch die Vulvaentwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* ist von der Stimulation des Raf/MEK/Erk-Signalweges abhängig (Han *et al.*, 1993; Sundaram and Han, 1996). Bei Säugern ist die Differenzierung von neuronalen Phäochromozytom-(PC12-) Zellen der Ratte das bekannteste Beispiel für die Beteiligung der Raf/MEK/Erk-

Kaskade an zellulären Differenzierungsvorgängen. In diesen Zellen entscheidet die Dauer der Erk-Aktivierung darüber, welches zelluläre Schicksal sie erfahren: Transiente Erk-Aktivierung durch EGF führt zur Mitose, während anhaltende Erk-Aktivierung durch Stimulation mit Nerven-Wachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) die Differenzierung dieser Zellen in Axon-ähnliche Neuronen fördert (Marshall, 1995; Qui and Green, 1992). In ähnlicher Weise wurde anhaltende Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges mit der Differenzierung von Muskelzellen in Verbindung gebracht (Gredinger *et al.*, 1998).

Auch die aufgrund ihrer Vermittlung zellulärer Antworten auf Stress-Stimuli als „Stresskaskaden“ beschriebenen Jnk/SAPK- (c-Jun-N-terminal kinase/stress activated protein kinase-) und p38-Signalwege scheinen bei einigen Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen von Bedeutung zu sein (Davis, 2000; Ip and Davis, 1998; Nebreda and Porras, 2000). So wird der als „dorsal closure“ bezeichnete Schluß des dorsalen Ektoderms während der Embryogenese von *Drosophila* durch das *Drosophila*-Homolog von Jnk, basket, vermittelt (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Sluss *et al.*, 1996). Bei der Differenzierung neuronaler Zellen scheint neben der Raf/MEK/Erk-Kaskade auch der p38-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen. In PC12-Zellen führten sowohl Expression einer aktiven MEK-Mutante als auch die Stimulation mit NGF zu anhaltender Aktivierung von p38 (Morooka and Nishida, 1998; Xing *et al.*, 1998). Inhibition dieses Signalweges durch Expression dominant-negativer Mutanten oder Inkubation mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 verhinderte außerdem das NGF-induzierte Auswachsen von Neuriten in diesen Zellen (Morooka and Nishida, 1998). In ähnlicher Weise wurde bei Muskelzellen eine Korrelation zwischen p38-Aktivierung und Differenzierung beobachtet (Puri *et al.*, 2000; Zetser *et al.*, 1999).

Über die Rolle des jüngst entdeckten Erk5-MAPK-Signalweges bei zellulären Vorgängen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Jedoch deutet die besonders hohe Expression von Erk5 in Skelettmuskelzellen des Herzens (English *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995) möglicherweise auf eine spezifische Funktion dieses Signalweges in Muskeln hin.

## 1.6 S100-Proteine und deren Rolle in Keratinozytendifferenzierung

Wie schon in Abschnitt 1.2 erwähnt, gehören verschiedene in Keratinozyten differenzierungsspezifisch exprimierte Proteine zur S100-Familie calciumbindender Proteine. S100-Proteine sind kleine saure Proteine von etwa 10-12 kDa Größe, die gewebespezifische Expressionsmuster besitzen und in der Lage sind, Calcium mit Hilfe

zweier calciumbindender EF-Hand-Motive zu binden (Schäfer and Heizmann, 1996; Donato, 1999). Sie wirken als Homo- und Heterodimere zweier Untereinheiten und wurden in der Vergangenheit oft mit Regulation von Zellzyklus, -differenzierung und Zytoskelett-Membraninteraktionen in Verbindung gebracht. Aufgrund ihrer Fähigkeit Calcium zu binden, könnten sie möglicherweise aber auch an der Vermittlung von Calciumsignalen und der Modulation von Kinaseaktivitäten in der Zelle beteiligt sein (Schäfer and Heizmann, 1996; Donato, 1999).

Zu den epidermalen S100-Proteinen, die in Keratinozyten verstärkt während des Differenzierungsprozesses exprimiert werden, gehören die ungewöhnlichen S100-Proteine Profilaggrin und Trichohyalin. Diese stellen eigentlich Domänen in Vorläuferproteinen epidermaler Strukturproteine dar und werden während ihrer Reifung abgespalten (Presland *et al.*, 1995). Bislang ist unklar, ob sie auch unabhängig für längere Zeit stabil sind und welche genaue Funktion sie besitzen. Erhöhte Expression von S100-Proteinen wurde in der Vergangenheit auch oft mit der Pathogenese hyperproliferativer und inflammatorischer Krankheiten der Haut (Kelly *et al.*, 1989; Madsen *et al.*, 1992) sowie epithelialer Karzinogenese in Verbindung gebracht (Schäfer and Heizmann, 1996). Ein epidermales S100-Protein, Psoriasin, wird stark in der Haut von Patienten exprimiert, die an der hyperproliferativen Hautkrankheit Psoriasis leiden (Madsen *et al.*, 1992). Interessanterweise exprimieren jedoch auch abnormal differenzierende und calciumstimulierte primäre Keratinozyten erhöhte Mengen Psoriasin (Hoffmann *et al.*, 1994; Madsen *et al.*, 1992). Die Bedeutung dieser Befunde ist nicht klar. Es ist jedoch denkbar, daß Psoriasin eine Funktion sowohl im Rahmen natürlicher als auch pathologischer Differenzierungsprozesse der Epidermis erfüllt, was auch auf andere epidermal exprimierte S100-Proteine zutreffen könnte.

### **1.7 MRP8 und MRP14, differenzierungsspezifisch exprimierte S100-Proteine in Keratinozyten?**

Zur Familie der S100-Proteine gehören auch die beiden calciumbindenden Proteine MRP8 (Macrophage inhibitory factor-related Protein 8, S100A8) und MRP14 (S100A9) (Hessian *et al.*, 1993; Kerkhoff *et al.*, 1998), die zuerst in Zellen myelomonozytärer Herkunft gefunden wurden (Odink *et al.*, 1987). Beide Proteine werden während der Differenzierung monozytärer Zellen in großer Menge von Granulozyten und Monozyten exprimiert, während sie in reifen Makrophagen oder Lymphozyten nicht vorkommen (Lagasse and Clerc, 1988; Zwadlo *et al.*, 1988). Neben Zellen myelomonozytärer Herkunft exprimieren

auch Epithelzellen wie Keratinozyten MRP8 und MRP14, besonders nach inflammatorischer Aktivierung (Kelly *et al.*, 1989). MRP8 und MRP14 bilden calciumabhängig stabile heteromere Komplexe miteinander, die vermutlich ihre biologisch aktive Form darstellen. Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt zur Translokation dieser Komplexe an die Plasmamembran und an Intermediärfilamente wie Vimentin und Keratin (Goebeler *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1993). Dies impliziert eine regulatorische Rolle der MRP8/MRP14-Komplexe bei Reorganisationsereignissen des Zytoskeletts, wie sie während der Differenzierung von Keratinozyten und bei inflammatorischen Prozessen in der Epidermis auftreten. Neben Calciumbindung könnte auch Phosphorylierung durch MAPK (siehe Abschnitt 1.5) an der Regulation der biologischen Aktivität von MRP8/MRP14-Komplexen beteiligt sein. So besitzt MRP14 an Position Threonin 113 ein Sequenzmotiv für MAPK-Phosphorylierung und Phosphorylierung dieses Threoninrestes korrelierte in Monozyten mit der Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an die Plasmamembran und Intermediärfilamente (Edgeworth *et al.*, 1989; van den Bos *et al.*, 1996).

Die Gene für MRP8 und MRP14 liegen genomisch in dem „epidermalen Differenzierungskomplex“ 1q21, der viele Gene enthält, die im Rahmen der Keratinozytendifferenzierung verstärkt exprimiert werden. Dazu gehören neben anderen S100-Proteinen wie den erwähnten Psoriasin, Profilaggrin und Trichohyalin auch die epidermalen Differenzierungsmarker Involucrin und Loricrin (Schäfer *et al.*, 1995). Die geclusterte Organisation dieser Gene scheint evolutionär konserviert zu sein. Verschiedene Homologe der humanen Gene auf Chromosom 1q21 sind bei der Maus in ähnlicher Weise in einer Region des 3. Chromosoms angeordnet (Schäfer *et al.*, 1995). Dies deutet darauf hin, daß Gene dieses konservierten Genlokus möglicherweise gemeinsam reguliert werden, was eine differenzierungsspezifische Expression von MRP8 und MRP14 in Keratinozyten nahelegt.

## 1.8 Fragestellungen

Bislang ist unbekannt, welches das initiale Signal für die Einleitung des keratinozytären Differenzierungsprozesses ist. In vielen Zelltypen stellen MAPK-Signalwege wichtige regulatorische Signalwege zellulärer Wachstums- und Differenzierungsvorgänge dar. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher zu klären, welche Rolle diese evolutionär konservierten Signalwege im Keratinozyten-Zellsystem bei der Differenzierungsinduktion spielen.

Einen weiteren Arbeitsschwerpunkt bildete die funktionelle Charakterisierung der S100-Proteine MRP8 und MRP14. Hierbei galt es, die Bedeutung dieser beiden calciumbindenden Proteine im keratinozytären Differenzierungsprozess näher zu untersuchen.

Zur Erfüllung der oben definierten Forschungsziele sollte im einzelnen auf folgende Fragenkomplexe eingegangen werden:

- Führt experimentell induzierte Differenzierung von Keratinozyten in Zellkultur zur Aktivierung von MAPK?
- Welches ist der Mechanismus einer eventuellen MAPK-Aktivierung?
- Spielt MAPK-Aktivierung eine Rolle bei der Regulation differenzierungsassoziiierter Gene?
- Führt Induktion von Differenzierung *in vitro* zu erhöhter Expression von MRP8 und MRP14?
- Werden MRP8 und MRP14 *in vivo* differenzierungsabhängig exprimiert?
- Wo sind MRP8 und MRP14 intrazellulär lokalisiert und wird deren subzelluläre Lokalisation durch Modulation der intrazellulären Calciumkonzentrationen und MAPK-Aktivität beeinflusst?

Mit der hier vorgestellten Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung der essentiellen, an der Regulation von Keratinozytenwachstum und -differenzierung beteiligten Signalwege geleistet werden. Die Identifizierung neuer regulatorischer Signalwege könnte entscheidend zum Verständnis physiologischer wie auch pathologischer Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in der Epidermis beitragen, was die Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung bestimmter hyperproliferativer und tumoröser Hauterkrankungen ist.

## 2 Material

---

### 2.1 Chemikalien

Nicht ausdrücklich erwähnte Laborchemikalien wurden in p. a. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Amersham, AppliChem, Dianova, Difco, Fluka, Gibco Life Technologies, Merck, Roche, Roth und Sigma.

### 2.2 Lösungen, Medien und Puffer

Gebräuchliche Lösungen, Medien und Puffer wurden nach Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt. Für die Durchführung der Experimente essentielle Puffer und Lösungen sind im nachfolgenden aufgelistet:

#### Puffer für Westernblot und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- ◆ 5 x SDS-Probenpuffer  
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS; Sigma), 50 % Glycerin (Roth), 25 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), 0.01% Bromphenolblau (Sigma), 312 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl, Roth) pH 6.8; wurde auch verdünnt als 1 x und 2 x Puffer verwendet.
- ◆ Trenngel-Vormix  
1.5 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; Roth) pH 9, 0.4 % TEMED (Roth), 0.4 % SDS in bidestilliertem Wasser (dd H<sub>2</sub>O)
- ◆ Sammelgel-Vormix  
0.14 M Tris, 0.11 % TEMED, 0.11 % SDS, dd H<sub>2</sub>O
- ◆ 1 x SDS-Polyacrylamidgel-Laufpuffer (SDS-PAGE-Puffer)  
25 mM Tris, 250 mM Glycin (Roth), 0.1 % SDS in dd H<sub>2</sub>O gelöst.
- ◆ 1 x Blotting-Puffer  
39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0.37% SDS; 20% Methanol (AppliChem) in ddH<sub>2</sub>O
- ◆ 1 x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline, TBS)  
20 mM Tris und 137 mM Natriumchlorid (Roth), in dd H<sub>2</sub>O gelöst, mit rauchender Salzsäure (AppliChem) auf pH 7.6 eingestellt und autoklaviert.

- ◆ 1 x TBS-Tween (TBST)  
0.05 % Tween 20 (Roth) in 1 x TBS
- ◆ Milchpulver-Blocking-Puffer (Westernblot)  
5 % Magermilchpulver (AppliChem) in 1 x TBST

#### Lysispuffer und Puffer für Protein-Aktivierungsassays

- ◆ Magnesiumhaltiger Lysis Puffer (magnesium containing lysis buffer, MLB)  
25 mM HEPES (Roth) pH 7.4, 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid (Sigma), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sigma), 10 % Glycerin, 1% Nonidet P-40 (Roche), 0.25 % Natriumdeoxycholat (Merck); dazu wurden jeweils frisch die Proteinase-Inhibitoren Aprotinin (10 µg/ml; Roth) und Leupeptin (0.5 µg/ml; Sigma) sowie 1 mM des Phosphatase-Inhibitors Natriumorthovanadat (Sigma) zugesetzt.
- ◆ Triton Lysis Puffer (TLB)  
20 mM Tris pH 7.4, 137 mM Natriumchlorid, 10 % Glycerin, 1 % Triton-X-100 (Sigma), 2 mM EDTA, 50 mM Natrium-β-Glyzerophosphat (Sigma), 20 mM Natriumpyrophosphat (Sigma); der Puffer wurde jeweils frisch mit einem Proteinase-/Phosphatase-Inhibitormix bestehend aus 0.2 mM Pefabloc (Roth), 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1 mM Natriumorthovanadat und 5 mM Benzamidin (Sigma) supplementiert.
- ◆ Kinasepuffer  
10 mM Magnesiumchlorid, 25 mM HEPES (pH 7.5), 25 mM Natrium-β-Glyzerophosphat; jeweils frisch mit 5 mM Benzamidin, 1 mM Natriumorthovanadat und 0.5 mM Dithiothreitol (DTT; Sigma) versetzt.

#### Puffer für Immunfluoreszenz (IF), Immunhistochemie (IH), *In-situ*-Hybridisierung (IS) und Elektronenmikroskopie

- ◆ Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS)  
Wurde als sterile 10 x Lösung von der Firma Gibco Life Technologies bezogen und nach Bedarf mit dd H<sub>2</sub>O verdünnt. Für *in situ*-Hybridisierung wurde jeweils steriles Ampuwa-Wasser (Fresenius) zur Verdünnung eingesetzt, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden

- ◆ Puffer A (Immunfluoreszenz)  
1 % (w/v) Bovines Serum Albumin (BSA; Biomol) in 1 x PBS
- ◆ Puffer B (Immunfluoreszenz)  
Identisch mit Puffer A, jedoch versetzt mit 1 % Normalserum der jeweiligen Spezies, von der der verwendete Sekundärantikörper stammte (verhindert unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers). Die verwendeten Normalseren (Normales Schweineserum für den Sekundärantikörper Schwein Anti-Kaninchen Fluoreszein Isothiocyanatgekoppelt, Normales Kaninchenserum für den Sekundärantikörper Kaninchen Anti-Maus-FITC) wurden von der Firma Dako bezogen.
- ◆ Eindeckmedium IF  
50 % Glycerin in 1 x PBS, wenige Flöckchen p-Phenylendiamin (Sigma; verhindert Ausbleichen); 1 ml Glycerin/PBS-Puffer wurde jeweils kurz vor Gebrauch mit p-Phenylendiamin versetzt, durch Zentrifugation (10 min 15.000g) von ungelösten p-Phenylendiaminflöckchen befreit und bis zum Gebrauch dunkel bei 4° C gehalten.
- ◆ PBS-Tween 20 (PBST)  
0.1 % Tween 20 in 1 x PBS
- ◆ IH-Blockingpuffer  
20 % Schafserum (Dianova), 0.1 % BSA in PBS
- ◆ Azetatpuffer (20 x)  
Lösung A 136 g/l Natriumazetat (Merck), Lösung B 57.2 ml/l Eisessig (Merck); 678 ml der Lösung A plus 322 ml Lösung B ergibt 20 x Azetatpuffer, bei einer Konzentration 50 mM, pH 5.0
- ◆ Carbonatpuffer  
63 ml 0.2 M Natriumcarbonat (Merck) versetzt mit 32 ml 0.2 M Natriumhydrogencarbonat (Merck) pH 10.2
- ◆ Hybridisierungslösung  
50 % (v/v) Formamid (Merck), 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1 x Denhardt's Lösung (Sigma), 10 % (w/v) Dextransulfat (Sigma), 100 mM DTT und 2 x 10<sup>5</sup> cpm/μl hitzedenaturierte RNA-Probe
- ◆ Waschlösung (*in situ*-Hybridisierung)  
50 % Formamid, 2 x SSC (Sigma), 1 mM EDTA, 10 mM DTT

◆ 0.1 M Natriumphosphatpuffer

1: 4 Mischung von 0.1 M Kaliumhydrogenphosphat und 0.1 M di-Natriumhydrogenphosphat (beide von Merck), jeweils in PBS.

◆ Epongemisch

Bestehend aus 1: 1-Mischung von Stammlösung I (62 ml Epon 812 und 100 ml 2-Decenylsuccinylsäureanhydrid, beide von Serva) und Stammlösung II (100 ml Epon 812 und 89 ml Methylnadicanhydrid); auf je 10 ml der Mischung wurden 0.15 ml des Härterers 2,4,6 Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol (Serva) gegeben.

### 2.3 Enzyme

Restriktionsenzyme	AGS, NEB, Roche
DNase I	Pharmacia
RNase A	Roche
RNase T1	Roche
Proteinase K	Roche
SP6-Polymerase	Roche
T7-Polymerase	Roche

### 2.4 Pharmakologische Inhibitoren und Zytokine

PD98059	Calbiochem
U0126	Promega
GF 109203X	Calbiochem
Ro-32-0432	Calbiochem
Ro-31-8220	Calbiochem
BAPTA-AM	Calbiochem
Thapsigargin	Calbiochem
EGF	R&D-Systems
IL-6	Peprtech
TGF- $\alpha$	Peprtech
TGF- $\beta$ 1	Peprtech

## 2.5 Rekombinante Proteine

Myelin basic Protein (MBP)	Gibco Life Technologies
Glutathion S-Transferase (GST)-c-Jun (1-135)	MSZ, Würzburg
3pK K73M	MSZ, Würzburg
MEK K97M (dominant-negatives MEK, dn MEK)	MSZ, Würzburg
GST- Ras- Bindedomäne von c-Raf-1 (GST-c-Raf-1-RBD 1-149)	MSZ, Würzburg

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Antikörper und Antiseren für Westernblot und Immunpräzipitation (IP)

Primärantikörper	Verdünnung (Western/IP)	Herkunft/Referenz
Kaninchen Anti-B-Raf (315)	1:500 / -	MSZ; Würzburg (Wixler <i>et al.</i> , 1996)
Kaninchen Anti-c-Raf-1 (503)	1:500 / 2 µl pro IP	MSZ, Würzburg (Wixler <i>et al.</i> , 1996)
Kaninchen Anti-Erk2 (SC-154)	200 ng/ml / 1 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen Anti-Jnk1 (SC-474)	200 ng/ml / 2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen Anti-p38 (SC-535)	200 ng/ml / 2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen Anti-p21/Cip1 (SC-397)	1 µg/ml / -	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen Anti-phospho Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	1:1000/ -	New England Biolabs NEB
Kaninchen Anti-MRP14	5 µg/ml / -	J. Roth, Münster (Goebeler <i>et al.</i> , 1995)
Maus IgG1 Anti-Involucrin (Sy5)*	0.4 µg/ml / -	Sigma
Maus IgG2 Anti-Hämagglutinin (HA)-Epitop (12CA5)*	1:500-1:1000 / 2-10 µl pro IP (chargenabhängig)	MSZ; Würzburg
Maus IgG1 Anti-pan Ras (R02120)*	1 µg/ml / -	BD Transduction Laboratories
Maus Anti-B-Raf (12S II)*	- / 3 µl pro IP	MSZ; Würzburg
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Herkunft</b>
Anti-Maus POD-gekoppelt	1:5000	Chemicon
Anti-Maus POD-gekoppelt	1:3000	Amersham
Anti-Kaninchen POD-gekoppelt	1:5000	Amersham

**Tabelle 2.1** Liste der für Westernblot und Immunpräzipitation verwendeten Primärantikörper sowie der zum Nachweis verwendeten Sekundärantikörper. Monoklonale Antikörper sind mit \* gekennzeichnet. POD, Meerrettich-Peroxidase

## 2.6.2 Antikörper für Immunfluoreszenz (IF) und Immunhistochemie (IH)

Primärantikörper	Verdünnung (IF/IH )	Herkunft/Referenz
Maus Anti MRP8/14-Heteromer (27E10)*	1 µg/ml / -	J. Roth, Münster (Bardwaj <i>et al.</i> , 1992)
Kaninchen Anti-MRP14	250 ng/ml / 500 ng/ml	J. Roth, Münster; (Goebeler <i>et al.</i> , 1995)
Kaninchen Anti-MRP8	1 µg/ml / 300 ng/ml	J. Roth, Münster (Goebeler <i>et al.</i> , 1995)
Kaninchen Anti-Keratin 14 (AF64)	- / 200 ng/ml	Babco
Maus IgG1 Anti-Involucrin (Sy5)*	- / 1.6 µg/ml	Sigma
Maus IgG1 anti-Zytokeratin pan (Lu5)*	4 µg/ml / -	Chemicon
Maus IgG1 Anti-Keratin 10 (DE-K10)*	- / 1: 20	Dako
Maus IgG1 Anti-Keratin 6 (Ks6/KA12)*	- / unverdünnt	Progen
Sekundärantikörper	Verdünnung (IF/IH )	Herkunft/Referenz
Schwein Anti-Kaninchen-FITC	1:40 / -	Dako
Kaninchen Anti-Maus-FITC	1:40 / -	Dako
Schaf Anti-Maus IgG-bio	- / 1: 200	Amersham
Esel Anti-Kaninchen IgG-bio	- / 1:200	Amersham

**Tabelle 2.2 Zusammenstellung der für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.** Monoklonale Antikörper sind mit \* gekennzeichnet. FITC, Fluoreszein Isothiocyanat-gekoppelt; bio, biotinyliert

## 2.7 Reagenzsätze (Kits)

ECL Western blotting detection reagents	Amersham
Nukleobond PC 500 Kit	Machery und Nagel
Qiagen Plasmid Kits (Mini, Midi, Maxi)	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer

## 2.8 Spezielle Reagenzien

Protein A-Meerrettichperoxidase- (POD-) gekoppelt	Amersham
Protein A-Agarose	Roche
Protein G-Agarose	Roche
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche

## 2.9 Zellkulturmaterial

### 2.9.1 Medien und Medienzusätze

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies
Nutrient Mixture F12 (HAM) mit L-Glutamin	Gibco Life Technologies
Medium 154 F	Cascade Biologics
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	Cascade Biologics
Eagle's minimal essential Medium, calciumfrei (EMEM)	Bio Whittaker
Serumfreies Keratinozyten-Wachstumsmedium (KSFM)	Gibco Life Technologies
Fötale Rinderserum (fetal calf serum, FCS)	PAA
Rinder-Hypophysenextrakt (bovine pituitary extract, BPE)	Gibco Life Technologies
Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF)	Gibco Life Technologies
L-Glutamin	Gibco Life Technologies
100 x Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Linaris
Calciumchlorid	Merck
Mitomycin C	Sigma
Adenin (6-Aminopurin-Hydrochlorid)	Sigma
Choleratoxin ( <i>Vibrio cholerae</i> , Type Inaba 569 B)	Calbiochem
Hydrokortison	Calbiochem
Insulin (vom Schwein)	Calbiochem
Transferrin	Roche
3, 3', 5 Triodo-L-Thyronin (T3)	Sigma

### 2.9.2 Sonstiger Zellkulturbedarf

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dispase ( <i>Bacillus polymxa</i> )	Gibco Life Technologies
10 x Trypsin-EDTA (0.5%/ 0.2% in PBS; ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )	Linaris
Trypanblau	Sigma
1 x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Gibco Life Technologies
Chelex <sup>®</sup> 100 Resin (Analytical Grade) 100-200 Mesh	BioRad
Neubauer-Zählkammer	Brand
Zellkulturschalen und -flaschen	Becton Dickinson
8-Well Chamberslides (Glas)	Nunc

## 2.10 Plasmide

### 2.10.1 Plasmide zur Genexpression in Säugerzellen

Mit Ausnahme des mit \* gekennzeichneten Vektors leiten sich alle für Transfektionsexperimente verwendeten Plasmide von dem Säuger-Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) ab. Dieser enthält einen Cytomegalovirus- (CMV-) Promotor vor einer multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS), der die Expression darin inserierter Gene in humanen Zellen erlaubt. Daneben besitzt er ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien, sowie ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion transfizierter eukaryontischer Zellen.

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
HA-Erk2	wildtypische Erk2 cDNA (Robbins <i>et al.</i> , 1993), fusioniert mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag (Ludwig <i>et al.</i> , 1998)	MSZ, Würzburg
Ras N17	cDNA für Ras N17, codiert für ein mutiertes Ras-Protein, das in Aminosäureposition 17 die Punktmutation S 17 N aufweist und dadurch dominant negativ wirkt (Stacey <i>et al.</i> , 1991)	MSZ, Würzburg
Raf C4-HA	Dominant-negative Deletionsmutante von c-Raf-1 (Bruder <i>et al.</i> , 1992) an die ein HA-Tag fusioniert wurde (Flory <i>et al.</i> , 1996)	MSZ, Würzburg
pGL*	cDNA für enhanced green fluorescent protein (EGFP) unter Kontrolle eines CMV-Promotors	Gibco Life Technologies

### 2.10.2 Ausgangsplasmide für die Herstellung von RNA-Proben für *in-situ* Hybridisierung

Zur Herstellung <sup>35</sup>S-markierter RNA-Proben wurde als Ausgangsplasmid SP72 (Promega) verwendet. Dieser Vektor enthält neben einem Ampicillin-Resistenzgen eine MCS, die von Bindestellen für die viralen RNA-Polymerasen Sp6 und T7 flankiert ist und bidirektionelle *in vitro*-Transkription darin einklonierter Gene mittels Sp6- bzw. T7-Polymerase erlaubt.

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
SP72 MRP8	cDNA von humanem MRP8 (Odink <i>et al.</i> , 1987) als EcoRI (5'-Ende c-DNA) -Bam HI-Fragment in die MCS von SP72 ligiert	J. Roth, Münster
SP72 MRP14	cDNA von humanem MRP14 (Odink <i>et al.</i> , 1987) mit Hpa I (5'Ende c-DNA) und Bam HI in den Polylinker von SP72 einkloniert	J. Roth, Münster

## 2.11 Zellen und Bakterienstämme



Minizentrifugen Eppendorf 5417C, R	Eppendorf
Megazentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Phosphoimager Fujix Bas-2000 II + Software Tina 2.09d	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Vortex-Gerät	Scientific Industries
Mikroskope: Leitz DM RB (Immunfluoreszenz, <i>in situ</i> )	Leica
Leitz DM IL (Zellkultur-Routine)	Leica
EM 109 (Elektronenmikroskop)	Zeiss
Olympus CK2 (Zellkultur-Fotographien)	Olympus
Sterilbank Lamin Air HB2448	Heraeus
Kryostat HM500 OM	Microm
Ultramikrotom 2128 Ultratome <sup>®</sup> Ultramicrotome System	LKB Bromma
Szintillationszähler Wallac 1410	Pharmacia

## 3 Methoden

---

### 3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Allgemeine molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

### 3.2 Arbeiten mit DNA

Die für Anwendungen wie *in vitro*-Transkription und Transfektion von Zellen benötigte Plasmid-DNA mußte zunächst in entsprechender Menge und Reinheit isoliert werden. Dazu wurden Bakterien mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert (siehe unten), plasmidtragende Einzelkolonien klonal expandiert und die erforderliche Menge an Plasmid-DNA durch Mini-, Midi-, oder Maxipräparation gewonnen. Anschließend wurde die DNA durch Restriktionsverdau und nachfolgende Gelelektrophorese, wenn notwendig auch durch Sequenzierung überprüft.

#### 3.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Transformation von Plasmid-DNA in kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterien erfolgte mittels Hitzeschocktransformation nach Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989). Die transformierten Zellen wurden zur Selektion plasmidtragender Bakterienkolonien auf LB-Agarplatten mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ausplattiert und von Einzelkolonien Übernachtskulturen angesetzt.

#### 3.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Minipräparationen von Plasmid-DNA wurden modifiziert nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Abweichend vom ursprünglichen Protokoll erfolgte Ethanolfällung der DNA ohne Inkubationsschritt auf 4° C durch Zentrifugation (15000 g) bei Raumtemperatur; auf Phenol/Chloroform-Extraktion wurde verzichtet. Für sensitive Anwendungen wie für Sequenzierungen wurde die Minipräparation nach dem Anwenderprotokoll der Firma Qiagen mit Anionenaustauschersäulen Qiatip 20 aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit bidestilliertem Wasser.

### 3.2.3 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Midi- und Maxipräparationen von Plasmid-DNA wurden nach dem Protokoll der Firma Qiagen durch Reinigung über Anionenaustauschersäulen Qiagen-tip 100 (Midi) bzw. Qiagen-tip 500 (Maxi) durchgeführt. Alternativ wurde für Maxipräparationen ein Purifikationskit mit entsprechenden Säulen der Firma Machery und Nagel (Nukleobond PC 500 Kit) eingesetzt. Am Ende der Purifikationsschritte wurde die gefällte DNA je nach Größe des Pellets in einem adequate Volumen Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl in Wasser) aufgenommen, photometrisch vermessen und durch Verdünnung mit dd H<sub>2</sub>O auf 1 µg/µl eingestellt. Kurzzeitige Lagerung der DNA-Lösungen erfolgte im Kühlschrank bei 4° C, sonst bei -20° C.

### 3.2.4 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden alle unter Verwendung des Abi Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer nach der Methode von Sanger et. al. (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Statt radioaktiv markierter Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) wurden jedoch unterschiedlich fluoreszierende ddNTPs eingesetzt. Als Template wurde ausschließlich über Anionentauscher-Säulen gereinigte Mini-, Midi- oder Maxipräparations-DNA verwendet. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 500 ng bis 1 µg, die Primermenge 10 pmol; von allen anderen Reagenzien wurden die Mengen eingesetzt, die in der Anleitung des Herstellers empfohlen werden. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte genau nach Anweisung und wurde als Service des Institutes für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Würzburg, von R. Krug übernommen.

### 3.2.5 DNA-Elution aus Agarosegelen

DNA wurde aus Agarosegelen nach dem Protokoll der Firma Qiagen mit Anionenaustauschersäulen und Lösungen des QIAquick-Gel-Extraction-Kits eluiert.

### 3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde näherungsweise bestimmt, indem die Bandenintensitäten der DNA-Probe und einer Probe bekannter DNA-Konzentration in einem Ethidiumbromid-gefärbten Gel verglichen wurden. Genauere Bestimmung der Konzentration verdünnter DNA-Lösungen erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 bei

doppelsträngiger DNA 50 µg/ml, so daß sich durch Multiplikation der gemessenen OD mit dem Verdünnungsfaktor die Konzentration der DNA-Lösung errechnen läßt.

### 3.3 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter Laminatluftfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, sterilen Kunststoffmaterialien oder autoklavierten Glaswaren und unter Verwendung steriler Nährmedien durchgeführt. Sämtliche Zellen und Zelllinien wurden bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit gehalten. NIH3T3-Zellen dienten ausschließlich als „Feeder“-Zellen bei der Isolation primärer NHEKs (siehe Abschnitt 3.3.4) und wurden in DMEM supplementiert mit 10 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Für HaCaT-Zellen und primäre NHEK-Zellen waren besondere Kulturbedingungen erforderlich, die teilweise selbst etabliert wurden und in den Abschnitten 3.3.3 bis 3.3.4 im Detail beschrieben werden.

#### 3.3.1 Passagierung von Zellen

NIH3T3-Zellen und primäre NHEK-Zellen wurden jeweils subkonfluent bei einem Konfluenzgrad von etwa 70-80 % passagiert. Da HaCaT-Zellen ihr normales Differenzierungspotential bei subkonfluenter Passagierung verlieren und unter diesen Kulturbedingungen abnorm erhöhte Proliferationsraten zeigen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. N. Fusenig, DKFZ Heidelberg), wurden diese erst zwei bis drei Tage nach Erreichen der Konfluenz gesplittet, wobei jeweils am Vortag nochmals ein Mediumwechsel erfolgte. NIH3T3-Zellen wurden zweimal mit calcium- und magnesiumfreiem PBS gewaschen und durch drei- bis fünfminütige Inkubation mit 1 x Trypsin/EDTA (0.05 %/ 0.02 %) von der Kulturschale gelöst. HaCaTs und NHEK-Zellen wurden abweichend davon vor der Trypsin/EDTA-Behandlung jeweils noch 12 Minuten lang mit 0.05 % iger EDTA-Lösung (pH 8.0) vorinkubiert. Für alle Zelltypen wurde das Trypsin nach Ablösung der Zellen durch Zugabe eines äquivalenten Volumens einer 10 % igen FCS-Lösung (in PBS; für NHEKs und HaCaTs Chelex-behandelt, siehe Abschnitt 3.3.3) inaktiviert und die Zellen für 5 min bei 1100 rpm pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt. Wenn erforderlich wurde vor der Neuaussaat die Zellzahl durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.3.2 Wegfrieren, Lagerung und Reaktivierung von Zellen

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Wegfrieren von Zellen wurden diese durch Inkubation mit Trypsin/EDTA von der Kulturplatte gelöst und in 1 ml Einfriermedium bestehend aus 10 % DMSO, 10 % FCS (für NHEKs und HaCaTs Chelex-behandelt, siehe Abschnitt 3.3.3) und 80 % des jeweiligen Kulturmediums aufgenommen. Je nach Bedarf wurden die Zellen in kleinere Portionen aufgeteilt und in einem Styroporrack über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Reaktivierung der Zellen wurden diese so schnell wie möglich in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und direkt in der 10- bis 20fachen Menge an frischem, vorgewärmten Medium verdünnt und auf Kulturschalen verteilt. Am darauffolgenden Tag wurden die adhärenierten Zellen zur Entfernung von DMSO-Resten zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium gefüttert.

### 3.3.3 Kultur der HaCaT-Zelllinie

#### Dauerkultur

Routinemäßig wurde die HaCaT-Zelllinie in Anlehnung an die ursprünglich beschriebenen Kulturbedingungen (Boukamp *et al.*, 1988) in DMEM supplementiert mit 5 % FCS, 2 mM L-Glutamin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin/Streptomycin kultiviert. Um die Proliferationsrate der Zellen möglichst konstant zu halten, wurde regelmäßig alle zwei Tage das Medium gewechselt und die Zellen konstant etwa alle sieben Tage 1:10 gesplittet.

#### Kulturbedingungen für Experimente

Immer wenn es nötig war, HaCaT-Zellen bei genau definierter extrazellulärer Calciumkonzentration zu halten, wurde calciumfreies EMEM als Ausgangsmedium benutzt. Dieses wurde standardmäßig mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin/Streptomycin supplementiert und durch Zugabe einer 250 mM Calciumchlorid-Stocklösung (in PBS,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) auf einen Calciumgehalt von 0.05 mM eingestellt. Als Wachstumsfaktorsupplement wurde dem Medium außerdem FCS zu einer Endkonzentration von 5 % (EMEM-Wachstumsmedium) bzw. 0.5 % (EMEM-Hungermedium) zugesetzt. Um durch den FCS-Zusatz nicht die Calciumkonzentration des Mediums zu beeinflussen, wurden diesem vorher mittels Chelex-100-Harz vorhandene

Calciumionen entzogen (Hennings *et al.*, 1980). Die Chelex-Behandlung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll der Firma BioRad nach der „Badge“-Methode.

Für den Ansatz von Experimenten wurden HaCaT-Zellen zunächst von DMEM 1:10 auf EMEM-Wachstumsmedium (0.05 mM Calcium, 5 % Chelex-FCS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) gesplittet, einmal passagiert und für alle Experimente in EMEM-Wachstumsmedium ausgesät. Die minimale Aussaatdichte betrug bei einer 10 cm Schale  $3.5 \times 10^5$  (entspricht ca. 6000 Zellen/cm<sup>2</sup>; Wachstumsdauer bis zur Konfluenz etwa sieben Tage), maximal wurden  $1.2 \times 10^6$  Zellen ausgesät (ca. 20700 Zellen/cm<sup>2</sup>; Wachstumsdauer bis zur Konfluenz etwa vier Tage). Bei Verwendung von 8-Kammer-Chamberslides (für Immunfluoreszenz und *in-situ*-Hybridisierung) wurden 5000 Zellen je Kammer (Fläche ca. 0.7 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Zellen erreichten unter diesen Bedingungen nach ca. acht Tagen Konfluenz.

#### Transfektion von HaCaT-Zellen

Zur Einschleusung und Expression von Plasmid-DNA in HaCaT-Zellen wurde ein neuartiges, auf Lipiden basierendes Multikomponenten-Reagenz, FuGENE 6 (Roche), verwendet. Dieses bildet während der Transfektion mit der DNA Komplexe, die dann nach dem Prinzip Liposomen-vermittelten Gentransfers in die Zelle transportiert werden. Zur Transfektion wurden HaCaT-Zellen in EMEM-Wachstumsmedium (siehe Abschnitt 3.3.3) bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  ( $1.2 \times 10^6$ ) auf 6-Well-Kulturschalen (10 cm Schalen) ausgesät. Nach zwei Tagen Wachstum (bei einer Konflunz von 50-70 %) wurde das Medium erneuert und die Zellen mit 2 µg (12 µg) DNA mit Hilfe von FuGENE 6 nach Herstelleranweisung transfiziert. 3 µl (18 µl) auf Raumtemperatur vorgewärmtes FuGENE 6-Reagenz wurde dazu in 97 µl (582 µl) calciumfreies EMEM-Medium (ohne Zusätze) pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde tropfenweise zu der DNA gegeben und der FuGENE6/DNA-Komplex nach einer 15-minütigen Inkubationszeit direkt auf die Zellen getropft. Nach sechs Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für HA-Erk2-Kinaseassays 24 Stunden später wie unter 3.4.4 beschrieben gehungert. Der Erfolg der Transfektion wurde in parallelen Transfektionen mit einer äquivalenten Menge eines GFP-Reporterplasmids (pGL siehe 2.10.1) fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

### 3.3.4 Kultur primärer NHEK-Zellen

#### Isolation aus humanen Vorhäuten

Primäre humane NHEK-Zellen wurden unter Verwendung muriner NIH3T3 „Feeder“-Zellen aus Vorhäuten Neugeborener isoliert. Bei dieser erstmals von Rheinwald und Green (Rheinwald and Green, 1975) beschriebenen Methode versorgen wachstumsarretierte NIH3T3-Fibroblasten kokultivierte Keratinozyten mit essentiellen Wachstumsfaktoren, wodurch diese ihre Fähigkeit zu klonalem Wachstum behalten und optimale Proliferationsraten erreichen.

Zur Vorbereitung der NIH3T3-Feeder wurden diese zunächst auf 10 cm-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert. Zur Wachstumsarretierung wurden die Zellen dann für 2 h mit 15 µg/ml Mitomycin in serumfreiem DMEM inkubiert. Das mitomycinhaltige Medium wurde abgenommen, und die arretierten Feeder nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 12 ml KCM (DMEM/Ham F12-Mischung im Verhältnis 3:1, supplementiert mit 10 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 ng/ml EGF, 24 µg/ml Adenin-6-aminopurinhydrochlorid, 0.84 mg/ml Cholera-toxin, 0.4 µg/ml Hydrokortison, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin und  $2 \times 10^{-9}$  M Triodo-L-Thyronin) gefüttert.

Zur Präparation der Keratinozyten wurden Vorhautbiopsien mehrerer Neugeborener (nicht älter als 6-8 h) mehrmals mit sterilem PBS gewaschen und mit einem sterilen Skalpell in kleinere Stücke (etwa 3 x 3 mm) zerteilt. Zur Trennung der Epidermis von der Dermis wurden die Stückchen dann für 1 h bei 37 °C mit Dispase-Lösung (2.4 mg/ml in serumfreiem DMEM) behandelt und nach Ende der Inkubationszeit in 10 % FCS (in PBS) überführt. Anschließend wurde die Epidermis mit sterilen Pinzetten von der Dermis abgezogen und in einem 15 ml Röhrchen mit 1 x Trypsin/EDTA für 1 h bei 37° C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden von der Oberseite der Dermis die an ihr verbliebenen basalen Keratinozyten durch mehrmaliges Kratzen mit dem Skalpell abgelöst und in zweites 15 ml Röhrchen mit 10 % FCS (in PBS) transferiert. Beide Röhrchen wurden für 5 min bei 1100 g abzentrifugiert, und die Zellen dann in KCM resuspendiert. Anschließend wurden beide Isolate vereinigt und die Keratinozyten auf die mitomycin-behandelten Feeder-Zellen ausgesät. Nach 4 Tagen waren die ersten Keratinozytenkolonien sichtbar und ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen alle zwei Tage mit einer 1:1 Mischung aus KSM (supplementiert mit 12.5 µg/ml BPE, 1.25 ng/ml EGF)

und Medium 154 F (supplementiert mit Human Keratinocyte Growth Supplement, HGKS) gefüttert. Bei einem Konfluenzgrad von ca. 70-80 % (nach etwa 14 Tagen) wurden die Zellen schließlich abtrypsinisiert und nach Bestimmung der Zellzahl aliquotiert weggefroren.

### Versuchsbedingungen

Für Versuchesansätze wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellaliquots aufgetaut (siehe Abschnitt 3.3.2) und in einer Dichte von  $2.8 \times 10^6$  in einer 1:1 Mischung aus KSFM (supplementiert mit  $12.5 \mu\text{g/ml}$  BPE,  $1.25 \text{ ng/ml}$  EGF) und EMEM (ohne weitere Zusätze) auf 10 cm Schalen verteilt (entspricht Passage 0). Die Wachstumsfaktorkonzentration des Mixmediums betrug  $6.25 \text{ mg/ml}$  BPE und  $0.625 \text{ ng/ml}$  EGF bei einem Calciumgehalt von  $0.05 \text{ mM}$ . Nach einmaliger Passage in diesem Medium wurden die Zellen für die einzelnen Experimente in einer Minimalverdünnung von  $4300 \text{ Zellen/cm}^2$  (entspricht  $2.5 \times 10^5$  Zellen pro 10 cm Schale) und bei einer maximalen Dichte von  $20700 \text{ Zellen/cm}^2$  (äquivalent mit  $1.2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Schale) auf neue Kulturgefäße verteilt. Bei diesen Aussaatdichten erreichten die Zellen nach 5-6 Tagen bzw. 2-3 Tagen Konfluenz. Für alle Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passage 1 verwendet.

### **3.3.5 Stimulation und Inhibitorinkubation**

Zur Stimulation wurde Calcium in einer Endkonzentration von  $1.0 \text{ mM}$  aus einer Stocklösung von  $250 \text{ mM}$  Calciumchlorid (in PBS) direkt zu dem Kulturmedium pipettiert und die Kulturschale zur Mischung sanft geschwenkt. Bei Verwendung anderer Stimuli wurden die Agenzien ebenfalls direkt aus einer Stocklösung dem Kulturmedium zugesetzt. Wenn nötig wurden diese zuvor in wachstumsfaktorfreiem Kulturmedium oder, bei Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen, in dem jeweiligen Lösungsmittel vorverdünnt. Bei Zugabe von Inhibitoren wurde genauso verfahren und diese vor Stimulation jeweils für 30 min vorinkubiert. Die eingesetzten Endkonzentrationen der verwendeten Stimuli und Inhibitoren sind im Ergebnisteil explizit angegeben.

### 3.4 Proteinanalyse

#### 3.4.1 Lysis humaner Keratinozyten zur Proteinanalyse

Zur Lyse von HaCaTs und primäre NHEK-Zellen wurden diese nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS direkt auf der Kulturschale für 1 h bei 4° C in dem jeweiligen Lysispuffer inkubiert. Für Ras-Aktivierungsassays erfolgte die Lyse in MLB-Puffer (siehe Abschnitt 2.2), für alle anderen Anwendungen wurde TLB-Puffer verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in ein gekühltes Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4° C und 15.000 g abgetrennt. Der Proteingehalt in den Überständen wurde standardmäßig unter Verwendung des BioRad-Proteinassays (BioRad) nach Herstellerangaben bestimmt. Anschließend wurden die Lysate durch Verdünnung mit dem jeweiligen Lysispuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und meist sofort weiterverarbeitet. Lysate, die zur Analyse von MAPK-Aktivierung bestimmt waren, wurden teilweise vor der Weiterverarbeitung aliquotiert bis zu einer Woche bei –80 ° C gelagert. Ausschließlich für Westernblot bestimmte Proteinlysate wurden in einem Verhältnis 4:1 mit 5 x SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.2) gemischt und nach kurzem Aufkochen bei 95° C bis zur Verwendung bei –20° C aufbewahrt.

#### 3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen wurden diese zunächst durch eindimensionale Gelelektrophorese mit denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) entsprechend ihrem Molekulargewicht fraktioniert. Die dazu benutzten Gele setzten sich aus einem 5 % igem Sammelgel und einem Trenngel mit abweichendem pH-Wert zusammen. Der Acrylamidgehalt (7.5 % bis 15 %) des Trenngeles richtete sich dabei nach der Größe der zu untersuchenden Proteine. Die nachfolgende Tabelle enthält die Pipettierschemen, nach denen die einzelnen Gele gegossen wurden, sowie die Auftrennungsoptima der verwendeten Trenngele. Die Zusammensetzung der Vormixe für Laufgel und Sammelgel sind in Kapitel 2.2 beschrieben.

<b>Gelkonzentration</b>	<b>5% Sammelgel (10 ml)</b>	<b>7,5 % (10 ml)</b>	<b>10 % (10 ml)</b>	<b>12.5 % (10 ml)</b>	<b>15 % (10 ml)</b>
30 % Acrylamid	1.24 ml	2.8 ml	3.4 ml	4.1 ml	5.1 ml
Laufgel-Vormix		2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Sammelgel-Vormix	8.6 ml				
bidest. Wasser		4.6 ml	4.0 ml	3.3 ml	2.3
Ammoniumpersulfat (APS)	0.16 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	
Auftrennungsoptimum		> 90 kDa	40-90 kDa	20-40 kDa	< 20 kDa

Nach Polymerisierung des Gels wurden die einzelnen Proben im Verhältnis 4:1 mit 5 x SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.2) gemischt und die enthaltenen Proteine durch fünfminütiges Aufkochen bei 95° C denaturiert. Bis zu 50 µg jeder Probe wurden auf ein Minigel geladen, und die Proteine anschließend mit Hilfe eines kontinuierlichem Tris/Glycin-Puffers (SDS-PAGE-Puffer, siehe Abschnitt 2.2) bei einer konstanten Stromstärke von 35-50 mA fraktioniert. War eine größere Auftrennungstrecke erforderlich, oder sollten mehr Proben geladen werden, wurden bis zu 100 µg Protein auf ein großes Polyacrylamidgel geladen und die Gelelektrophorese bei 15-20 mA über Nacht durchgeführt.

### 3.4.3 Westernblot

Gleiche Mengen Totallysate oder einer Immunpräzipitation wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in Blottingpuffer (siehe Kapitel 2.2 für die Zusammensetzung der verwendeten Westernblot-Puffer) bei einer Stromstärke von 400 mA auf Nitrozellulosemembranen (0.2 µm, Schleicher und Schüll) oder methanol-aktivierte Immobilon P-Membranen (Millipore) überführt. Die Dauer des Transfervorganges richtete sich dabei sowohl nach Größe der nachzuweisenden Proteine, sowie nach Dicke und Fläche des Gels und betrug bei einem Minigel (6 x 9 cm, 1 mm Durchmesser) zwischen 20 min bei sehr kleinen Proteinen (z. B für MRP14, 14 kDa) und 45 min bei Proteinen über 100 kDa (z. B. für Involucrin). Nach dem Blotvorgang wurde die Membran entweder getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert, oder direkt zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen für 1 h in Milchpulver-Blockingpuffer geschwenkt. Zum Nachweis der einzelnen Proteine wurde die Membran dann mit dem passenden Primärantikörper, verdünnt in frischem Milchpulver-

Blockingpuffer, bei 4° C über Nacht, oder für 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen in TBST (je sieben Minuten) wurde der Primärantikörper durch 45-minütige Inkubation mit dem jeweiligen (gegen den Primärantikörper gerichteten) POD-gekoppelten Sekundärantikörper (in TBST) oder POD-gekoppeltem Protein A (Amersham; 1: 3000 in TBST) detektiert. Die Membran wurde zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Sekundärantikörper erneut viermal sieben Minuten mit TBST gewaschen, und der POD-gekoppelte Sekundärantikörper (bzw. Protein A-POD) nach dem Prinzip der verstärkten Chemolumineszenz (enhanced chemoluminescence, ECL) mit Reagenzien (ECL Western blotting detection reagents) und Röntgenfilmen der Firma Amersham dem Herstellerprotokoll entsprechend nachgewiesen.

#### 3.4.4 Immunkomplex-Kinaseassays

##### Prinzip:

Kinasen übertragen  $\gamma$ -Phosphatreste von Adenosintriphosphat (ATP) auf Zielmoleküle. Die enzymatische Aktivität von Kinasen lässt sich daher messen, indem man die Übertragung von radioaktiv markiertem [ $\gamma^{32}\text{P}$ -] ATP auf spezifische Substrate quantitativ bestimmt. In der Praxis wird die zu untersuchende Kinase zunächst mit spezifischen Antikörpern aus Zellysaten transfizierter oder untransfizierter Zellen immunpräzipitiert. Nach Präzipitation wird die Kinase dann in Anwesenheit von radioaktivem [ $\gamma^{32}\text{P}$ -] ATP mit einem spezifischen Substrat inkubiert, und die Einbaurate von radioaktivem  $^{32}\text{P}$  in das Substratmolekül durch Autoradiographie bestimmt.

##### Durchführung:

HaCaT- bzw. NHEK-Zellen wurden in EMEM-Wachstumsmedium (0.05 mM Calcium; siehe Abschnitt 3.3.3) kultiviert und etwa einen Tag vor Erreichen der Konfluenz (bei einem Konfluenzgrad von 70-80 %) für 18 h bei 0.5 % FCS in EMEM-Hungermedium inkubiert. Nach Stimulation wurden die Zellen dann wie beschrieben (siehe Abschnitt 3.4.1) in TLB-Puffer lysiert und die zu untersuchenden Kinasen nach Messung der Proteinkonzentration mit spezifischen Antikörpern aus den Lysaten immunpräzipitiert. Zur Immunpräzipitation von c-Raf-1 und endogen exprimierten MAP-Kinasen wurden 1  $\mu\text{g}$  bzw. je 500  $\mu\text{g}$  Totallysat für 2 h auf 4° C mit 25  $\mu\text{l}$  Protein A-Agarose und einem spezifischen Antiserum gegen c-Raf-1, Erk2, Jnk1 oder p38 inkubiert. Zur Analyse von B-Raf-Aktivierung oder von transfiziertem HA-Erk2 wurden pro Probe 2 mg Totalprotein

eingesetzt, und zur Präzipitation der Kinasen 25 µg Protein G-Agarose und spezifische monoklonale Mausantikörper gegen B-Raf bzw. HA verwendet. Immunpräzipitierte MAP-Kinasen wurden vor der Kinasereaktion je zweimal mit TLB-Puffer mit erhöhtem Kochsalzgehalt (500 mM) und mit Kinasepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 30° C in 20 µl Kinasepuffer mit 5 µCurie radioaktivem [ $\gamma^{32}\text{P}$ -] ATP, 100 µM nichtradioaktivem ATP und den jeweiligen Kinasesubstraten MBP für Erk2, GST-c-Jun (1-135) für Jnk1 oder 3pK K73M für p38, inkubiert. Für Raf-Kinaseassays wurden die präzipitierten Kinasen abweichend von dem Standardprotokoll zweimal mit TLB mit 150 mM Kochsalz und zweimal mit Kinasepuffer ohne DTT, aber einem erhöhtem Natriumchloridgehalt von 150 mM, gewaschen. Die Kinasereaktion wurden dann in demselben Kinasepuffer supplementiert mit 0.5 mM DTT mit dominant-negativem MEK K97M (dn MEK) als Substrat durchgeführt. Die Phosphorylierungsreaktionen wurden in allen Fällen durch Zusatz von 5 x SDS-Probenpuffer und kurzem Aufkochen bei 95° C gestoppt. Je 10 µl der einzelnen Proben wurden dann auf ein Polyacrylamidgel geladen, und die Proteine nach Gelelektrophorese auf Nitrozellulose geblottet. Die Phosphorylierungsrate der Substrate wurde routinemäßig mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fujix Bas-2000 II, Raytest Isotopenmessgeräte) quantifiziert und deren Autoradiographie zusätzlich mit Hilfe von Röntgenfilmen sichtbar gemacht. In allen Fällen wurden Westernblots durchgeführt, um Präzipitation gleicher Mengen an Erk2, Jnk1, p38, HA-Erk2, c-Raf-1 und B-Raf zu gewährleisten.

### 3.4.5 Ras-Aktivierungsassays

Ras-Aktivierungsassays wurden nach Taylor and Shalloway (Taylor and Shalloway, 1996) durchgeführt (zum Prinzip vergleiche Abschnitt 4.3). Dazu wurden HaCaT-Zellen bis zu einem Konfluenzgrad von 70 % in EMEM-Wachstumsmedium kultiviert (siehe Kapitel 3.3.3) und für 18 h bei 0.5 % FCS gehungert. Nach Stimulation wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.4.1 ausgeführt in MLB-Puffer (siehe Abschnitt 2.2) lysiert und das Zellpellet abgetrennt. Nach Messung der Proteinmenge wurden die Überstände durch Verdünnung mit MLB auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und in zwei Portionen von je 500 µg Totallysat aufgeteilt. Eine Portion wurde in flüssigem Stickstoff weggefroren und für Erk2-Kinaseassays zurückbehalten. Das zweite Aliquot wurde zur Präzipitation von GTP-beladenem Ras sofort mit 20 µg frisch an Glutathion S-Sepharose-Kügelchen gekoppeltem GST-Raf-1-RBD 1-149 (Taylor and Shalloway, 1996) inkubiert. Nach einer Präzipitationszeit von 1 h bei 4° C wurden die Kügelchen dreimal mit MLB (ohne

Inhibitorzusatz) gewaschen und nach Aufkochen in 2 x SDS-Probenpuffer zur Elektrophorese auf ein großes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Immobilon P-Membran gebロットet, und die Menge an präzipitiertem Ras-GTP schließlich durch Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen pan-Ras in Westernblot-Experimenten analysiert. Zusätzlich wurde die Menge an präzipitiertem Ras-GTP durch densitometrische Bestimmung der Bandenstärke mit Hilfe von Tina 2.09d Software (Raytest Isotopen Messgeräte GmbH) quantifiziert. Zur Messung der Erk2-Aktivität wurden die zurückbehaltenen MLB-Lysate wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben Immunkomplex-Kinaseassays unterworfen. Ein kleiner Teil davon wurde außerdem zur Bestätigung gleicher Ras-Mengen in den Ausgangslysaten für Ras-Westernblots verwendet.

#### **3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung**

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden HaCaTs oder primäre NHEKs entweder auf sterile Deckgläschen in 6-Well-Schalen oder in 8-kammrige Glas-Chamberslides (nur für HaCaTs) ausgesät und in den jeweiligen Wachstumsmedien (siehe Abschnitt 3.3.3 bzw. 3.3.4) kultiviert. Nach Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur mit 3.7 % iger Formaldehydlösung (in PBS) fixiert. Die Formaldehydreste wurden durch zwei Waschschrirte mit PBS entfernt und die Zellen dann für 10 min mit 0.5 % Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung wurden diese für 30 min mit Puffer B (siehe Abschnitt 2.2) überschichtet und anschließend zum spezifischen Nachweis der jeweiligen Proteine für 45 min mit einer geeigneten Primärantikörperverdünnung (in Puffer B) inkubiert. Danach wurde der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 0.1 % BSA (in PBS) entfernt und zum Nachweis des Antigen-Antikörperkomplexes der passende Fluoreszein Isothiocyanat- (FITC-) gekoppelte Sekundärantikörper (in Puffer A) aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 45 min (im Dunkeln) wurde dreimal intensiv mit PBS gewaschen und die Zellen in Eindeckmedium IF (siehe Abschnitt 2.2.) eingebettet. Die Präparate wurden mit Nagellack luftdicht abgeschlossen und die Färbungen meist sofort bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In Ausnahmefällen wurden die Objektträger bis zur mikroskopischen Auswertung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.7 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Proteinanalyse wurden ausschließlich paraffinfixierte Gewebeprobe verwendet. Der Nachweis der Antigen-gebundenen Primärantikörper erfolgte durch einen dreistufigen Färbeprozess mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase (ABC-HRP).

#### Prozessierung des Gewebes

Von den paraffinfixierten Gewebelöcken wurden mit dem Kryostaten 4  $\mu\text{M}$  dicke Serienschnitte angefertigt, und diese auf speziell beschichtete Objektträger (Superfrost-Objektträger, Roth) aufgebracht. Nach Trocknen der Gewebeschnitte auf einer Wärmebank (30-40 min, 60° C) wurden diese durch zweimalige Behandlung mit absolutem Xylol (je 5 min) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Xylolreihe (95 %, 70 %, 50 %, Wasser) rehydriert. Danach war das Gewebe ohne weitere Fixierung für die nachfolgende Immunfärbung bereit.

#### Durchführung der Immunfärbung

Im ersten Schritt des immunhistochemischen Färbeprozesses wurden die rehydrierten Paraffinschnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in IH-Blockingpuffer (Abschnitt 2.2.) geblockt. Danach wurden die Gewebeprobe mit einem spezifischen Primärantikörper (in PBS mit 0.1 % BSA) überschichtet und dieser über Nacht bei 4° C inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Primärantikörpers wurden die Objektträger intensiv mit PBST gewaschen (3 x 5 min) und die Antigen-Antikörperkomplexe mit dem jeweiligen biotinkoppelten Schaf-Immunglobulin (in PBS/0.1 % BSA) als Sekundärantikörper detektiert (1 h, RT). Nach erneutem Waschen mit PBST (3 x 5 min) wurde der präformierte Streptavidin ABC-HRP-Komplex (Dako) auf das Gewebe aufgebracht und nach Herstellerangaben für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten weitere Waschschrötte mit PBST (3 x 5 min). Die biotinkunden Peroxidasekomplexe wurden schließlich durch Inkubation mit 0.2 mg/ml des Substrats 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC, Sigma, 0.5 % in N, N-Dimethylformamid, Merck) und 0.005 % Wasserstoffperoxid (Merck) in Azetatpuffer (50 mM, pH 5.0, siehe Abschnitt 2.2) sichtbar gemacht. Durch den Peroxidase-vermittelten Umsatz von AEC entsteht im Bereich der Antikörperbindung ein roter Farbkomplex, dessen Lokalisation nach

Gegenfärbung mit Papanicolaou's Lösung 1b (Merck) lichtmikroskopisch untersucht werden konnte.

### 3.5 *In situ*-Hybridisierung

#### Prinzip

Einzelsträngige RNA bildet mit komplementären RNA-Molekülen stabile doppelsträngige Hybride aus. Man kann daher die mRNA-Expression zellulärer Gene *in situ* durch Hybridisierung mit <sup>35</sup>S radioaktivmarkierten, komplementären RNA-Sonden untersuchen.

#### Herstellung <sup>35</sup>S-markierter RNA-Proben

Die Herstellung <sup>35</sup>S-markierter RNA-Sonden zur Detektion spezifischer mRNA-Sequenzen erfolgte durch *in vitro*-Transkription nach Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989). Die als Matritze (Template) dienende cDNA lag dazu in einem Plasmid vor, das bei Verwendung unterschiedlicher viraler RNA-Polymerasen die Transkription komplementärer RNA-Stränge in beiden Orientierungen erlaubt (siehe Abschnitt 2.10.2). Durch Wahl der geeigneten RNA-Polymerase (T7- bzw. Sp6-Polymerase) läßt sich daher sowohl eine zum kodierenden Strang des cDNA-Inserts komplementäre Nachweissonde (antisense-Sonde) als auch eine als Kontrolle dienende <sup>35</sup>S-markierte Sinnstrang-RNA (sense-Sonde) synthetisieren.

Als Vorbereitung für die *in vitro*-Transkription wurde die Plasmid-DNA zunächst durch Verdau mit einem passenden Restriktionsenzym am Ende der abzulesenden Sequenz linearisiert (verhindert Synthese irrelevanter RNA), und das linearisierte Template durch Gelelektrophorese und nachfolgende Elution aus dem Agarosegel von ungeschnittenem Ausgangsplasmid getrennt (siehe Abschnitt 3.2.5). <sup>35</sup>S-markierte Antisense- bzw. Sense-Sonden wurden anschließend durch *in vitro*-Transkription von 2 µg Template-DNA mit SP6- bzw. T7-Polymerase und nichtradioaktivem ATP, CTP und GTP (Roche) sowie [<sup>35</sup>S] UTP (Amersham) als Substrat gewonnen. Danach wurde das Template durch DNase I-Verdau entfernt, und die Proteinkomponenten durch Phenol/Chloroformextraktion und nachfolgende Ethanol-fällung entfernt. Um das Eindringen der RNA-Proben in das Gewebe zu erleichtern, wurden die Sonden durch alkalische Hydrolyse in einem Carbonatpuffer (siehe Abschnitt 2.2; Verhältnis Probe zu Carbonatpuffer 1: 1) auf eine durchschnittliche Länge von etwa 100-150 bp gebracht. Die Hydrolyse erfolgte bei 60 °C, wobei die Inkubationszeit nach folgender Formel bestimmt wurde:

Inkubationszeit (min) =  $(L_0 - L_f) / 0.11 \times L_0 \times L_f$  ( $L_0$  = Ausgangslänge der Probe in kb,  $L_f$  = Länge der Probe nach alkalischer Hydrolyse; immer 100-150 bp)

Am Ende der Inkubationszeit wurde die Hydrolyse durch Zusatz eines Natriumazetat-Eisessiggemisches (292  $\mu$ l 3 M Natriumazetat und 21  $\mu$ l Eisessig) gestoppt und die RNA nach Ethanolpräzipitation in Tris/EDTA-Puffer (TE, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) auf eine spezifische Aktivität von  $2 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ l eingestellt.

#### Vorbereitung des Gewebes und der HaCaT-Zellen für *in-situ*-Hybridisierung

Paraffinfixierte Gewebeproben wurden wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben geschnitten und entparaffinisiert. Die Rehydrierung erfolgte dann durch eine absteigende Ethanolreihe (95 %, 80 %, 60 %, 30 %, bidestilliertes Wasser). Danach konnte ohne weitere Fixierung mit Proteinase K-Verdau fortgefahren werden (siehe unten). Bei kryokonserviertem Gewebe wurden mit dem Kryostaten (Kammertemperatur  $-20^\circ$  C) zunächst ebenfalls 4  $\mu$ M dicke Serienschnitte angefertigt und diese wie beschrieben getrocknet. Die getrockneten Kryoschnitte wurden dann für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur (Merck, in sterilem PBS) fixiert und nach Waschen mit einer absteigenden PBS-Reihe (3 x PBS, 1 x PBS, 1 x PBS; jeweils 5 min) und einem Zwischenbad in sterilem Ampuwa-Wasser (Fresenius) in einer ansteigenden Alkoholreihe (30 %, 60 %, 80 %, 95 %) dehydriert. Nach Lufttrocknung wurden die fixierten Gewebeschnitte dann entweder mit Proteinase K verdaut oder bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Für *in situ*-Hybridisierung von HaCaT-Zellen wurden diese wie in Abschnitt 3.3.3 auf sterile Glas-Chamberslides ausgesät und stimuliert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Kammern der Chamberslides entfernt, und die Zellen wie für Kryoschnitte beschrieben mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und auf die Hybridisierung vorbereitet. Die Hybridisierung erfolgte analog der unten ausgeführten Vorgehensweise für Gewebeschnitte.

#### *In Situ*-Hybridisierung

Während sämtlicher Arbeitsschritte der nachfolgenden *in situ*-Hybridisierung mußte strikt auf RNase-freie Bedingungen geachtet werden (Handschuhe, RNase-freie Lösungen und Gefäße). Kryoschnitte wurden zur Permeabilisierung mit 1  $\mu$ g/ml Proteinase K Lösung (in 100 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0) verdaut. Paraffinschnitte wurden abweichend davon mit einer erhöhten Konzentration an Proteinase K (10  $\mu$ g/ml) behandelt. Alle weiteren Schritte waren dann für Paraffin- und Kryoschnitte identisch. Nach Proteinase K-Verdau

wurden alle Gewebeschnitte mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) nachfixiert und mit einer absteigenden PBS-Reihe gewaschen (siehe oben). Nach zweimaligem Spülen in 0.1 M Triethanolaminlösung (pH 8, Merck) wurden diese dann durch 10-minütige Behandlung mit Azetanhydrid (Sigma, 0.25 % in 0.1 M Triethanolaminlösung) azetyliert, die Objektträger dreimal mit Ampuwa-Wasser gespült und das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 60 %, 80 %, 95 %) dehydriert. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und anschließend mit einem adequate Volumen Hybridisierungslösung (siehe Abschnitt 2.2; für 24 x 24 mm Deckgläser 21  $\mu$ l, für 40 x 24 mm Deckgläser 35  $\mu$ l) überschichtet und blasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt. Danach wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer mit 50 % Formamid und 2 x Natriumchlorid-Zitronensäurepuffer (SSC, Sigma) über Nacht (16-20 h) bei 46° C unter luftdichtem Abschluß inkubiert. Nach Ablösung der Deckgläser in Waschlösung (siehe Abschnitt 2.2) wurden die Gewebeschnitte zur Entfernung überschüssiger Hybridisierungslösung in jeweils frischer Waschlösung 30 min lang bei 54°C gewaschen. Die Objektträger wurden zweimal kurz in 2 x SSC mit 10 mM DTT gespült und die restliche nichthybridisierte RNA durch 30-minütige Behandlung mit 20  $\mu$ g/ml RNase A und 1 U/ml RNase T1 (in 2 x SSC, 1 mM EDTA) bei 37° C verdaut. Anschließend wurden die Spaltprodukte durch zwei Waschvorgänge mit Waschpuffer ohne DTT (je 45 min, bei 54° C und 56° C) entfernt und die Objektträger nach zweimaligem kurzen Spülen in 2 x SSC in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe oben) dehydriert und getrocknet. Zur Sichtbarmachung der Hybridisierungsreaktion wurden die Objektträger in der Dunkelkammer in NTB-2-Fotoemulsionslösung (Kodak, 1: 1 in 800 mM Ammoniumazetat) getaucht, luftgetrocknet und in lichtgeschützten Boxen (mit Kieselgel versehen) für 3-4 Wochen bei 4° C exponiert. Die Präparate wurden nach Entwicklung (Entwickler D19, Kodak) und Fixierung (Unifix, Kodak) zur besseren histologischen Beurteilung noch mit Papanicolaou 1b gegengefärbt, und die Hybridisierungssignale unter dem Lichtmikroskop im Hell- und Dunkelfeld ausgewertet.

### **3.6 Elektronenmikroskopie (Transmissions-Elektronenmikroskopie)**

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden unstimulierte und calciumstimulierte HaCaT-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und direkt in der Kulturschale für 60 min bei 4° C mit 2.5 % Glutaraldehyd (in 0.1 M Natriumphosphatpuffer siehe Abschnitt 2.2) fixiert. Nach Waschen mit 0.1 M Natriumphosphatpuffer (10 min

4° C) erfolgte ein zweiter Fixierungsschritt mit 1 % Osmiumtetroxid (in 0.1 M Natriumphosphatpuffer, 60 min 4°C). Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 4° C in 0.1 M Natriumphosphatpuffer gewaschen und anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 60%, 70 %, 80 %, 90%, absolut, je 10 min) dehydriert. Danach wurden diese zur Einbettung sofort mit Epongemisch (siehe Abschnitt 2.2) überschichtet und die Kulturschale zur Polymerisation des Epons im Brutschrank für 1-2 Tage bei 58° C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung wie das Schneiden der Eponblöcke in 50-80 nM dicke Scheiben und die Kontrastierung der Schnitte wurde freundlicherweise von Frau U. Eifert, Hautklinik, Würzburg durchgeführt, die auch bei der Bedienung des Elektronenmikroskopes behilflich war.

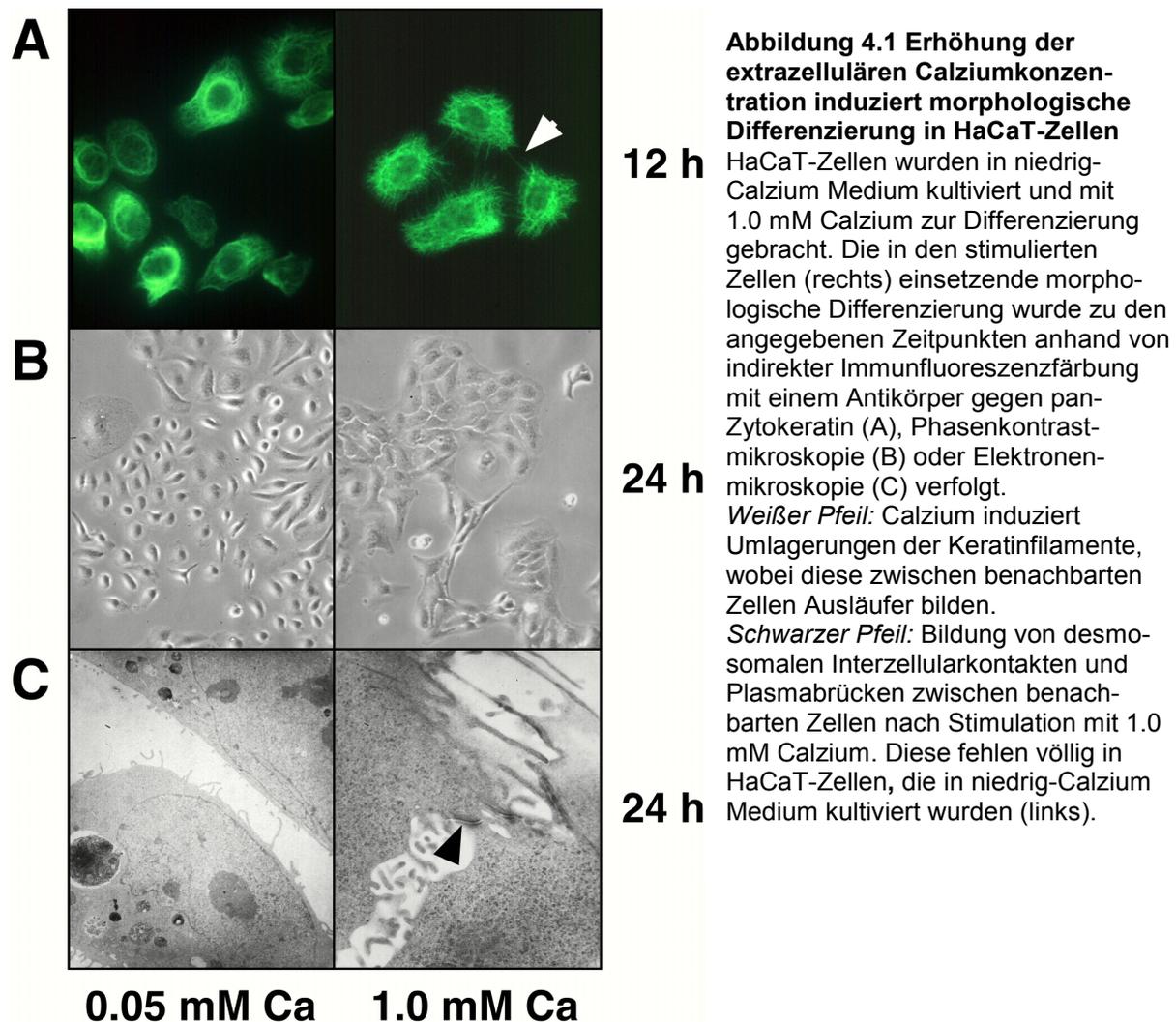
## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Etablierung eines *in vitro*-Modellsystems für Differenzierungsstudien

Zur Untersuchung der in Abschnitt 1.8 formulierten Fragestellungen galt es zunächst ein geeignetes *in vitro*-System zur experimentellen Differenzierungsinduktion von Keratinozyten zu finden. Viele der in der Epidermis ablaufenden physiologischen Prozesse lassen sich durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration *in vitro* induzieren (Hennings *et al.*, 1980; Missero *et al.*, 1995; Yuspa *et al.*, 1989; siehe Abschnitt 1.3). Einige Schlüsselenzyme des Differenzierungsprozesses wie etwa Transglutaminase-1 (Thacher and Rice, 1985) benötigen Calcium zudem als Kofaktor für ihre Aktivität. Nicht zuletzt auch wegen der calciumbindenden Eigenschaften von MRP8 und MRP14 bot sich daher das Modellsystem calciuminduzierter Differenzierung zur *in vitro*-Studie des keratinozytären Differenzierungsprozesses an. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollten ausschließlich humane Keratinozyten untersucht werden, die weit weniger gut hinsichtlich ihrer wachstums- und differenzierungsregulierenden Signale charakterisiert sind als Mauskeratinozyten, für die dieses *in vitro*-Differenzierungssystem ursprünglich etabliert wurde. Daher mußte das Modellsystem zunächst für humane Keratinozyten angepaßt werden. Primäre humane Keratinozyten benötigen spezielle Bedingungen für effizientes Wachstum und lassen sich nur für eine begrenzte Zeit *in vitro* kultivieren. Aus diesem Grund wurde für erste Versuche die spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT (human adult skin keratinocytes propagated under low calcium conditions and elevated temperature; Boukamp *et al.*, 1988) eingesetzt. Diese Zelllinie ist hinsichtlich der Kulturbedingungen weit weniger anspruchsvoll als primäre Keratinozyten und behält auch nach zahlreichen Passagen noch ihr volles Differenzierungspotential (Boukamp *et al.*, 1988). Nach eigener Beobachtung proliferieren HaCaT-Zellen auch gut unter Mediumbedingungen, die für die Kultivierung primärer Mauskeratinozyten beschrieben wurden (Hennings *et al.*, 1980), so daß die im murinen System etablierten Kulturbedingungen für calciuminduzierte Differenzierung mit wenigen Änderungen übernommen werden konnten. Primäre Mauskeratinozyten bilden in Medium mit nur 0.05 mM Calciumgehalt ausschließlich Monolayer aus und zeigen keine Schichtbildung, da unter diesen Bedingungen die Formation desmosomaler Zellkontakte inhibiert wird (Hennings *et al.*, 1980). Bei Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf mehr als 0.1 mM kommt es zu verschiedenen morphologischen Umgestaltungen wie

Desmosomenbildung und Reorganisation des Keratinzytoskeletts (Hennings *et al.*, 1980), welche sich auch lichtmikroskopisch als Veränderungen der Zellform verfolgen lassen. Abbildung 4.1 B zeigt die Morphologie von HaCaT-Zellen, die entweder in Medium mit 0.05 mM Calcium kultiviert wurden (im nachfolgenden als „niedrig-Calcium“ Medium bezeichnet; Abb. 4.1 B links) oder für 24 h mit 1.0 mM Calcium stimuliert wurden („hoch-Calcium“ Medium; Abb 4.1 B rechts).



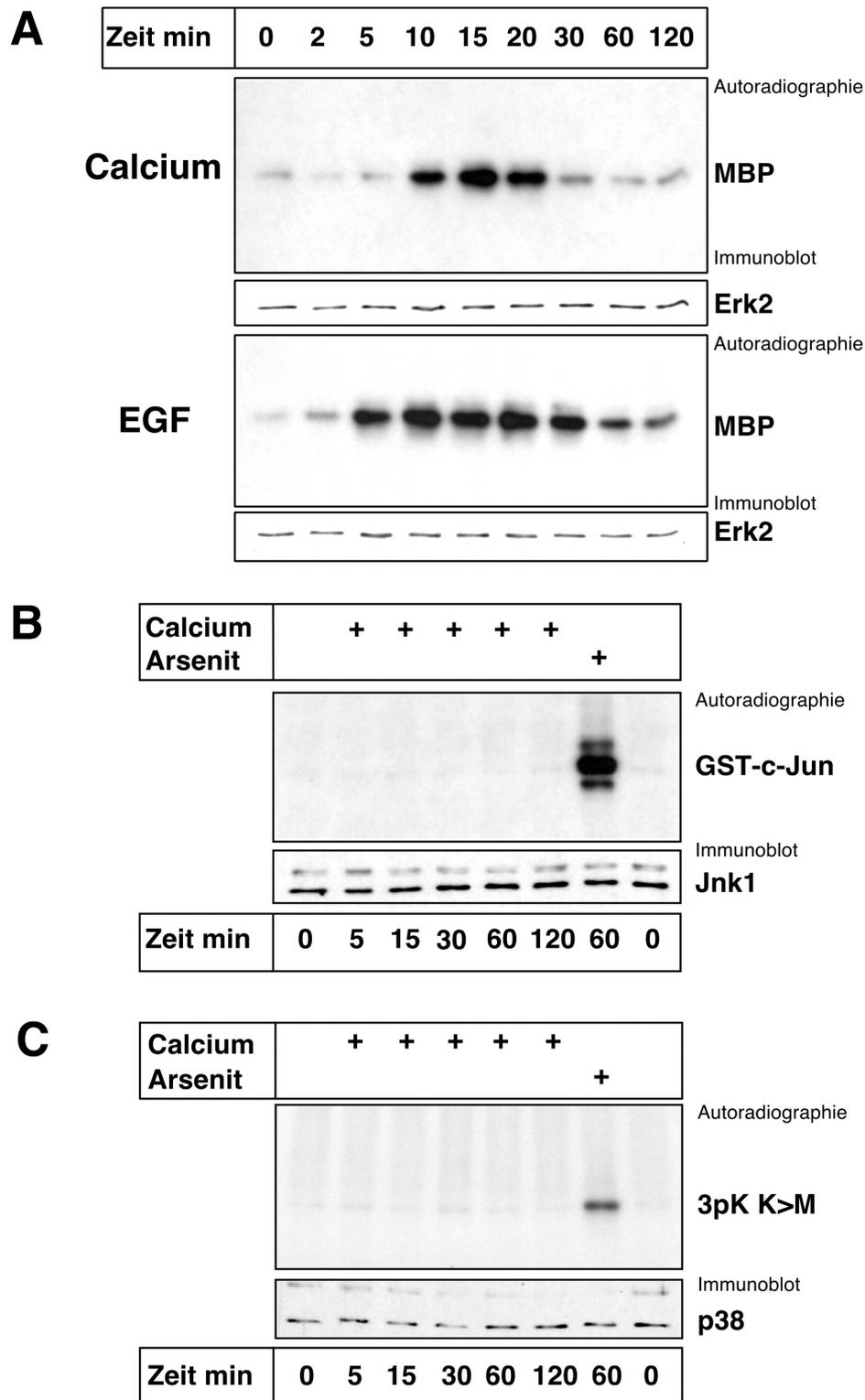
Wie für Mauskeratinozyten beschrieben (Hennings *et al.*, 1980), änderten die Zellen innerhalb von 24 h ihre Morphologie von einer polygonalen Form mit klar erkennbaren Interzellularräumen zu einer „Pfannkuchen“-ähnlichen Gestalt. Die individuellen Zellgrenzen verschwammen dabei zunehmend und waren nur noch schwer im Lichtmikroskop auszumachen, was im Keratinozytensystem als erstes Anzeichen für die Entstehung desmosomaler Zellkontakte gilt. Nach zwei Tagen war eine deutliche Stratifizierung zu erkennen (nicht gezeigt), was ebenfalls als Indiz für eine fortschreitende Zelldifferenzierung angesehen werden kann. Elektronenmikroskopisch wurden eine

deutliche Verschmälerung des Interzellularraumes und die Bildung zahlreicher Desmosomen beobachtet (Abb 4.1 C rechts). Diese fehlten völlig bei Zellen, die in niedrig-Calcium Medium kultiviert wurden (Abb 4.1 C links). Durch Immunfluoreszenzstudien mit einem zytokeratinspezifischen Antikörper wurde bestätigt, daß Calciumstimulation in HaCaT-Zellen ähnliche Zytokeratinklagerungen induziert, wie sie bei primären humanen Keratinozyten auftraten (Zamansky *et al.*, 1991). Abb. 4.1 A veranschaulicht, daß nach 12 h erste Reorganisationen des Zytokeratinnetzwerks feststellbar waren und sich zu dieser Zeit Keratinbrücken zwischen benachbarten Zellen ausbildeten. Dies fehlten immer dort, wo keine Nachbarzellen vorhanden waren, weshalb ihre Ausbildung vermutlich solche Stellen anzeigt, an denen desmosomale Zellkontakte entstanden.

Die Daten bestätigen, daß humane HaCaT-Zellen primären Keratinozyten hinsichtlich ihrer Reaktion auf erhöhte Calciumspiegel im Medium ähneln und ein Modellsystem darstellen, mit dessen Hilfe man das Differenzierungsprogramm von Keratinozyten *in vitro* untersuchen kann.

#### **4.2 Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges durch extrazelluläres Calcium**

Wie bereits erwähnt, spielen MAPK-Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Regulation zellulärer Wachstums- und Differenzierungsvorgänge (Daum *et al.*, 1994; Marshall, 1995). Bei vielen Zellen korreliert die Induktion von Differenzierung mit der Aktivierung von MAPK (Gredinger *et al.*, 1998; Morooka and Nishida, 1998; Qui and Green, 1992; Zetser *et al.*, 1999). Zur Klärung der Frage, ob calciuminduzierte Differenzierung von Keratinozyten ebenfalls mit der Aktivierung von MAPK assoziiert ist, wurden HaCaT-Zellen durch Anhebung des Calciumgehaltes von 0.05 mM auf 1.0 mM stimuliert und zu unterschiedlichen Zeiten der Aktivierungszustand von Erk, Jnk und p38 mit Hilfe von Immunkomplex-Kinaseassays (siehe Methodenteil, Abschnitt 3.4.4) bestimmt. Es zeigte sich, daß Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration keinerlei Effekt auf Jnk- oder p38-Aktivität hatte (Abb 4.2 B und C), jedoch eine schnelle und transiente Aktivierung von Erk induziert wurde (Abb 4.2 A oben). Stimulation mit dem

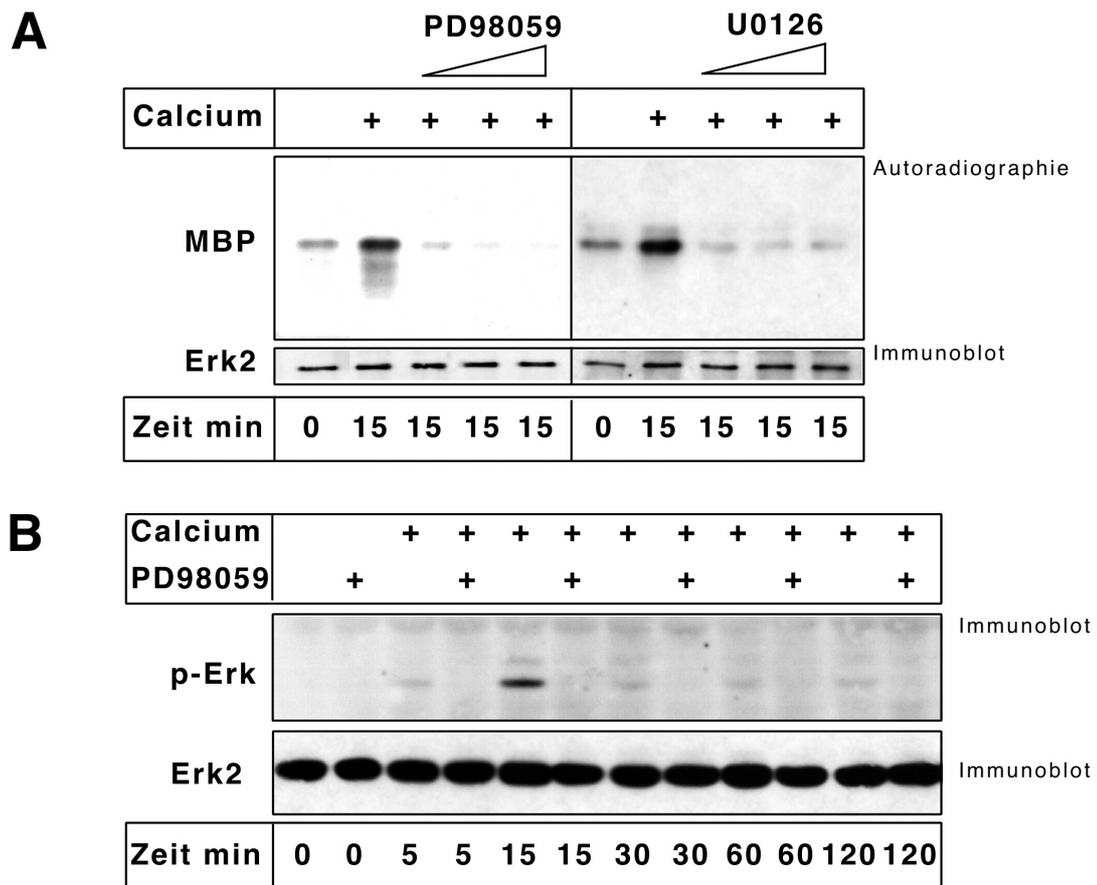


**Abbildung 4.2 Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führt zu einer raschen und transienten Aktivierung von Erk (nicht aber von Jnk und p38) in HaCaT-Zellen.**

HaCaT-Zellen wurden in niedrig-Calcium Medium mit 0.05 mM Calcium und 5 % Chelex-FCS kultiviert. Bei 70 % Konfluenz wurden die Zellen für 18 h gehungert (0.5 % FCS) und mit 1.0 mM Calcium (A, oben, B, C) oder 1 ng/ml EGF (A unten) stimuliert. Zum angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen lysiert und die Kinaseaktivitäten von Erk (A), Jnk (B) oder p38 (C) in Immunkomplex-Kinaseassays (siehe Material und Methoden) bestimmt. Als Positivkontrolle für (B) und (C) wurden die Zellen mit 0.5 mM Arsenit behandelt (Ludwig *et al.*, 1998). Als Ladekontrolle sind zusätzlich Westernblots für die immunpräzipitierten Kinasen gezeigt.

Wachstumsfaktor EGF führte erwartungsgemäß ebenfalls zu einer erhöhten Erk-Aktivität (Abb. 4.2 A unten). Jedoch unterschieden sich EGF- und calciumstimulierte Proben hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Erk-Aktivierung (Abb 4.2 A). Während bereits 2 min nach EGF-Behandlung ein Anstieg der enzymatischen Aktivität von Erk zu verzeichnen war und diese auch 2 h danach noch deutlich erhöht blieb (Abb 4.2 A unten), führte Calciumstimulation erst nach etwa 10 min zu einer Erk-Aktivierung, die ihr Maximum nach 15 min erreichte, danach aber schnell auf basales Niveau zurückging (Abb 4.2 A oben).

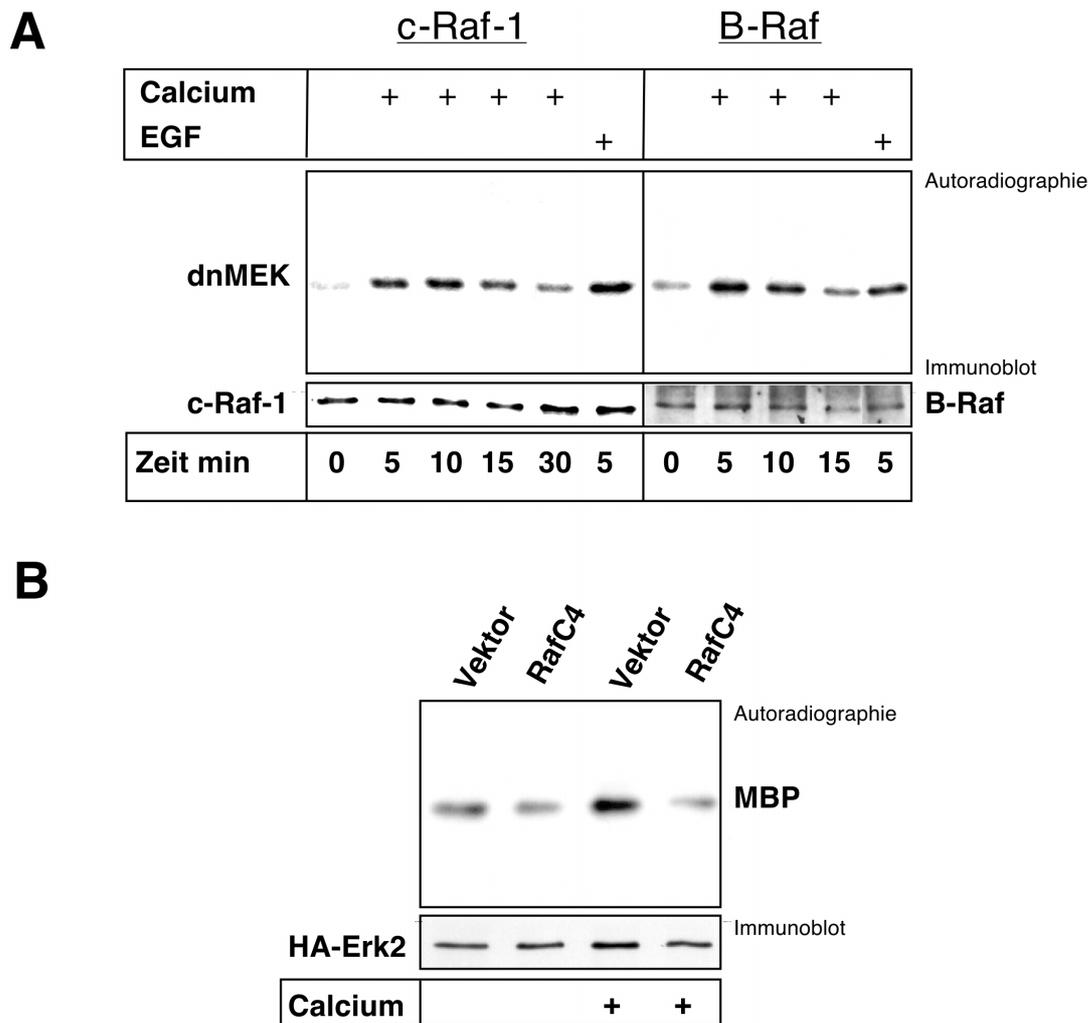
Da Calcium kein klassischer Aktivator der Raf/MEK/Erk-Kaskade ist, sollte sodann geklärt werden, ob Erk, in Analogie zur Stimulation mit Wachstumsfaktoren, durch das Raf/MEK-Modul aktiviert wird, oder ob ein alternativer Mechanismus an seiner Aktivierung beteiligt ist. Die Beteiligung der dualspezifischen Kinase MEK an calciuminduzierter Erk-Aktivierung wurde mit Hilfe zweier spezifischer MEK1-Inhibitoren, PD98059 (Alessi *et al.*, 1995) und U0126 (Favata *et al.*, 1998), untersucht. Beide Substanzen verhindern die Aktivierung von MEK1 durch Raf, indem sie an die inaktive Form von MEK binden (Alessi *et al.*, 1995; Favata *et al.*, 1998), U0126 ist darüber hinaus in der Lage, die aktive (phosphorylierte) Form von MEK1 zu binden (Favata *et al.*, 1998). In Immunkomplex-Kinaseassays verringerten sowohl PD98059 als auch U0126 die calciuminduzierte Aktivierung von Erk in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 4.3 A). Maximale Inhibition wurde für PD98059 bei 20  $\mu\text{M}$ , für U0126 bereits bei 1  $\mu\text{M}$  Konzentration erreicht. In beiden Fällen wurde eine Reduktion der Erk-Aktivität unter Basalniveau beobachtet, was impliziert, daß auch im unstimulierten Zustand eine zwar geringe, aber konstitutive Erk-Aktivität vorhanden ist. Zur Bestätigung der Kinaseassayergebnisse wurde der Aktivierungszustand von Erk nach Calciumstimulation zusätzlich mit Hilfe eines phosphospezifischen Antiserums gegen Erk1 und Erk2 untersucht. Dieses Antiserum erkennt beide Kinasen erst nach katalytischer Aktivierung durch Phosphorylierung der kritischen Aminosäurereste Threonin 202 und Tyrosin 204. In Übereinstimmung mit den Kinaseassaydaten ergab die Westernblotanalyse mit diesem aktivierungsspezifischen Antiserum, daß eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  PD98059 ausreichte, die Phosphorylierung von Erk nach Calciumstimulation vollständig zu blockieren (Abb 4.3 B). Beide Resultate sprechen eindeutig für eine Beteiligung von MEK an calciuminduzierter Erk-Aktivierung.



**Abbildung 4.3 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung wird durch MEK vermittelt.**

HaCaT-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit der spezifischen MEK-Inhibitoren PD98059 (A und B) oder U0126 (A) mit 1.0 mM Calcium stimuliert, und die Erk-Aktivität entweder durch Immunkomplex-Kinaseassay (A) oder mit Hilfe eines aktivierungsspezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes Erk1 und Erk2 (B) bestimmt. Die verwendeten PD98059-Konzentrationen in den gezeigten Experimenten betragen 5, 10 und 20  $\mu$ M (A) bzw. 20  $\mu$ M (B); von U0126 wurden 1, 5 und 10  $\mu$ M verwendet. Parallele Experimente mit entsprechenden Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO anstatt der Inhibitoren ergaben keinen inhibitorischen Effekt auf calciuminduzierte Erk-Aktivierung. Als Ladekontrollen sind Erk2-Westernblots gezeigt.

Zur Klärung der Frage, ob Calciumstimulation auch zur Aktivierung von Raf-Kinasen führt, wurden Immunkomplex-Kinaseassays mit endogen exprimierten Raf-Isoformen durchgeführt. Ähnlich wie bei den Erk-Kinaseassays resultierte Calciumstimulation von HaCaT-Zellen in einer frühen und transienten Aktivierung von c-Raf-1 wie auch B-Raf, wobei die Aktivierungskinetik dem Zeitverlauf der beobachteten Erk-Aktivierung im wesentlichen entsprach (Abb 4.4 A). Um zu bestätigen, daß calciuminduzierte Erk-Aktivierung durch Raf-Kinasen vermittelt wird, wurden Kotransfektionsexperimente mit HA-Erk2 und einer dominant-negativen Mutante von Raf, Raf-C4 (Bruder *et al.*, 1992), durchgeführt. Wie Abb. 4.4 B veranschaulicht, führte Expression von Raf-C4 zur völligen Blockade der HA-Erk2-Aktivierung durch Calcium. An calciuminduzierter Erk-Aktivierung sind demnach auch Raf-Kinasen beteiligt.



#### Abbildung 4.4 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung wird durch Raf-Isoformen vermittelt

(A) Kinetik der B-Raf- und c-Raf-1-Aktivierung durch Calcium. HaCaT-Zellen wurden mit 1.0 mM Calcium bzw. 1 ng/ml EGF für die angezeigten Zeitintervalle stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität von immunpräzipitiertem B-Raf bzw. c-Raf-1 durch Immunkomplex-Kinaseassays unter Verwendung von dn MEK als Substrat bestimmt.

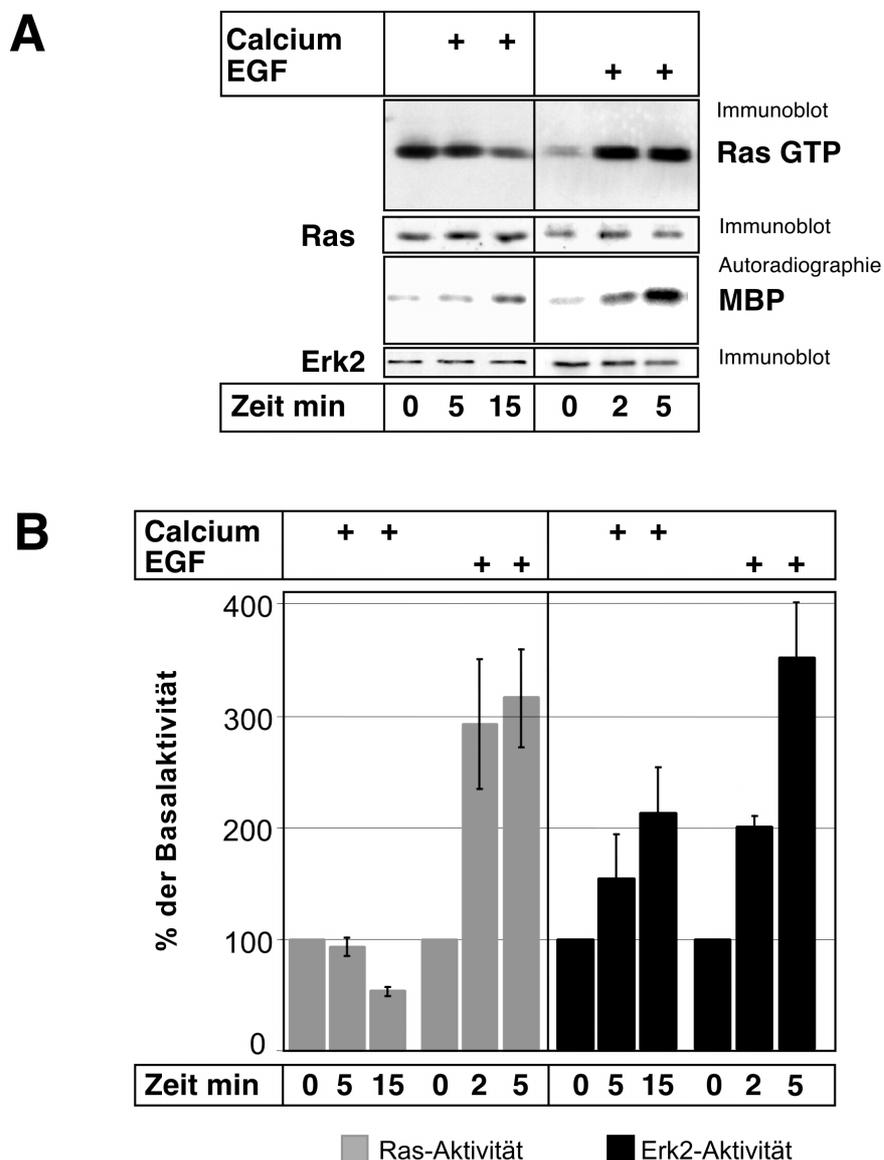
(B) Calciuminduzierte Erk-Aktivierung läßt sich durch Expression von dominant-negativem RafC4 blocken. HaCaT-Zellen wurden mit dominant-negativem RafC4 oder dem leeren Vektor transfiziert, und die Aktivierung von kotransfiziertem HA-Erk2 nach Stimulation mit 1.0 mM Calcium (15 min) oder entsprechenden Mengen PBS (Kontrolle) durch Immunkomplex-Kinaseassays bestimmt.

Gleichmäßige Immunpräzipitation der untersuchten Kinasen in (A) und (B) wurde durch Western-blot bestätigt.

### 4.3 Extrazelluläres Calcium stimuliert Erk unabhängig von Ras-Aktivität

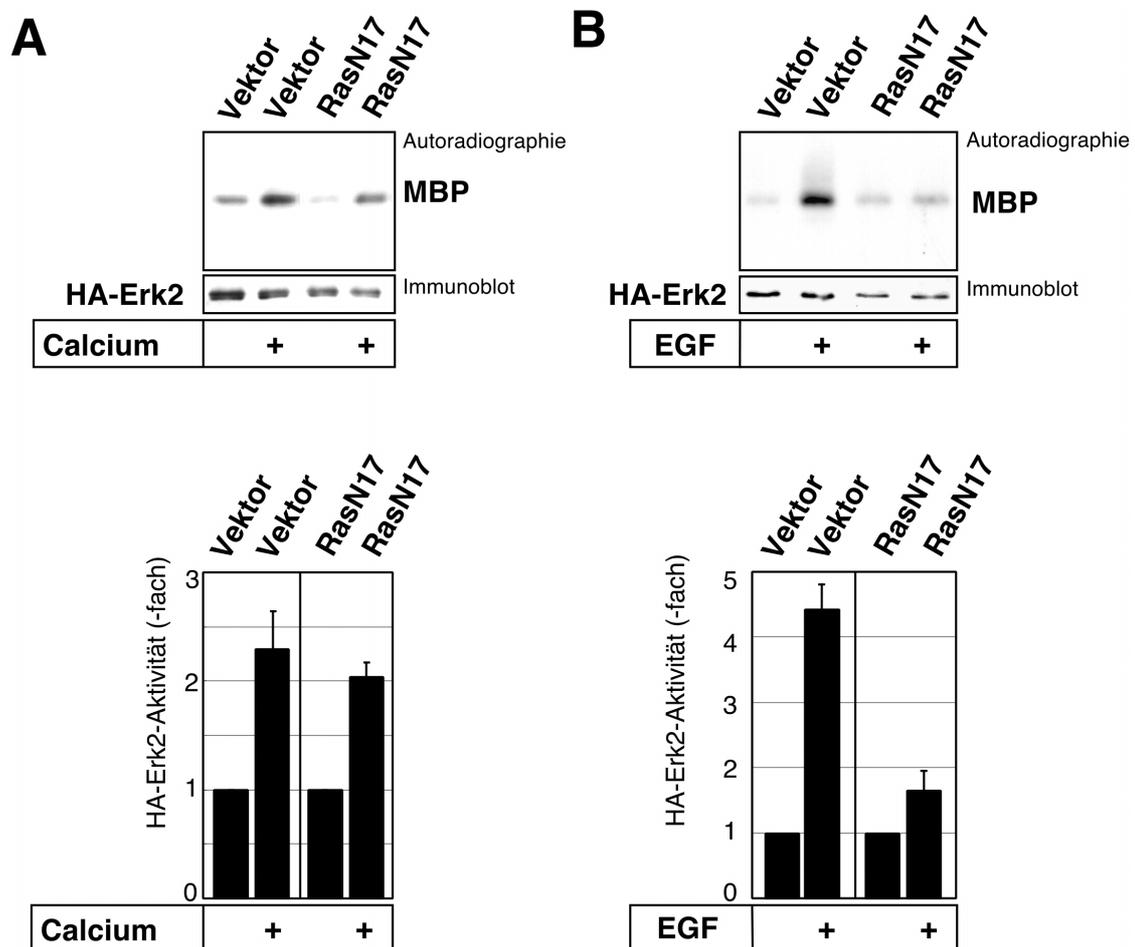
Ein üblicher Mechanismus der Raf-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren ist seine Membranrekrutierung durch aktives Ras. Zur Aufdeckung möglicher Unterschiede zwischen EGF und Calcium hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus der Raf/MEK/Erk-Kaskade sollte daher zunächst der Aktivierungszustand von Ras nach Inkubation mit beiden Stimuli ermittelt werden. Taylor und Shalloway (Taylor and Shalloway, 1996) entwickelten als erste einen nichtradioaktiven, funktionellen Test zur Bestimmung

zellulärer Ras-Aktivität. Dieser Test beruht auf der Tatsache, daß aktives GTP-beladenes Ras, jedoch nicht GDP-beladenes (inaktives) Protein selektiv mit einem GST-Fusionsprotein der Ras-Bindedomäne von c-Raf-1 (GST-c-Raf-1-RBD 1-149) präzipitiert werden kann. Die Menge an präzipitiertem GTP-Ras kann nachfolgend mittels Westernblot mit einem pan-Ras-spezifischen Antiserum ermittelt werden und liefert ein



**Abbildung 4.5 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung ist mit gleichzeitiger Hemmung der Ras-Aktivität verbunden.** HaCaT-Zellen wurden mit 1.0 mM Calcium oder 1 ng/ml EGF stimuliert und zu den angezeigten Zeitpunkten geerntet. Nach Bestimmung der Proteinmengen wurden die Lysate auf gleiche Konzentrationen eingestellt und in zwei Portionen aufgeteilt. Ein Aliquot wurde einem Ras-Aktivierungsassay unterzogen (siehe Material und Methoden), das zweite Aliquot wurde zur Analyse der Erk-Aktivität verwendet. (A) *oben*: GTP-Ras wurde mit GST-RBD (1-149) präzipitiert und mit einem Antikörper gegen pan-Ras quantifiziert. *Mitte* Totallysat-Western für Ras (Ladekontrolle), *unten* Erk-2-Kinaseassay mit MBP als Substrat. Gleichmäßige Präzipitation von Erk wurde durch Westernblot bestätigt. (B) Densitometrische Quantifizierung von Ras- (grau) und Erk-Aktivität (schwarz). Die Werte zweier Experimente sind als Prozent der Basalaktivität dargestellt (+/- SE)

Maß für zelluläre Ras-Aktivierung. Abb 4.5 zeigt, daß Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration zu einer zeitabhängigen Reduktion der Ras-Aktivität führte, während EGF-Stimulation eine drei- bis vierfache Zunahme der Ras-Aktivität zur Folge hatte. Analyse der Erk-Aktivität in denselben Lysaten ergab, daß EGF-induzierte Ras-Stimulation auch mit einer deutlichen Erk-Aktivierung verbunden war, während nach Calciumstimulation solch eine Korrelation zwischen Ras- und Erk-Aktivität nicht bestand (Abb 4.5 B). Vielmehr resultierte die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration in einem Anstieg der Erk-Aktivität zu einem Zeitpunkt, an dem bereits eine deutliche Abnahme der Ras-Aktivität zu verzeichnen war. Um zu bestätigen, daß calciuminduzierte Erk-Aktivierung unabhängig von Ras-Aktivität erfolgt, wurden zusätzlich Kotransfektionsexperimente mit HA-Erk2 und einer dominant-negativen Mutante von Ras,



**Abbildung 4.6 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung erfolgt unabhängig von Ras-Aktivität**

HaCaT-Zellen wurden mit dominant-negativem RasN17 transfiziert. Anschließend wurde die Aktivierung von kotransfiziertem HA-Erk2 nach Stimulation mit 1.0 mM Calcium (A, nach 15 min) oder 1 ng/ml EGF (B, nach 5 min) durch Immunkomplex-Kinaseassays analysiert. *Obere Abbildungen*: Kinaseassays für immunpräzipitierte HA-Erk2; *untere Abbildungen*: Quantifizierung der HA-Erk2-Aktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente +/- S.E. Die Erk-Aktivität in den unstimulierten Proben wurde willkürlich gleich 1 gesetzt.

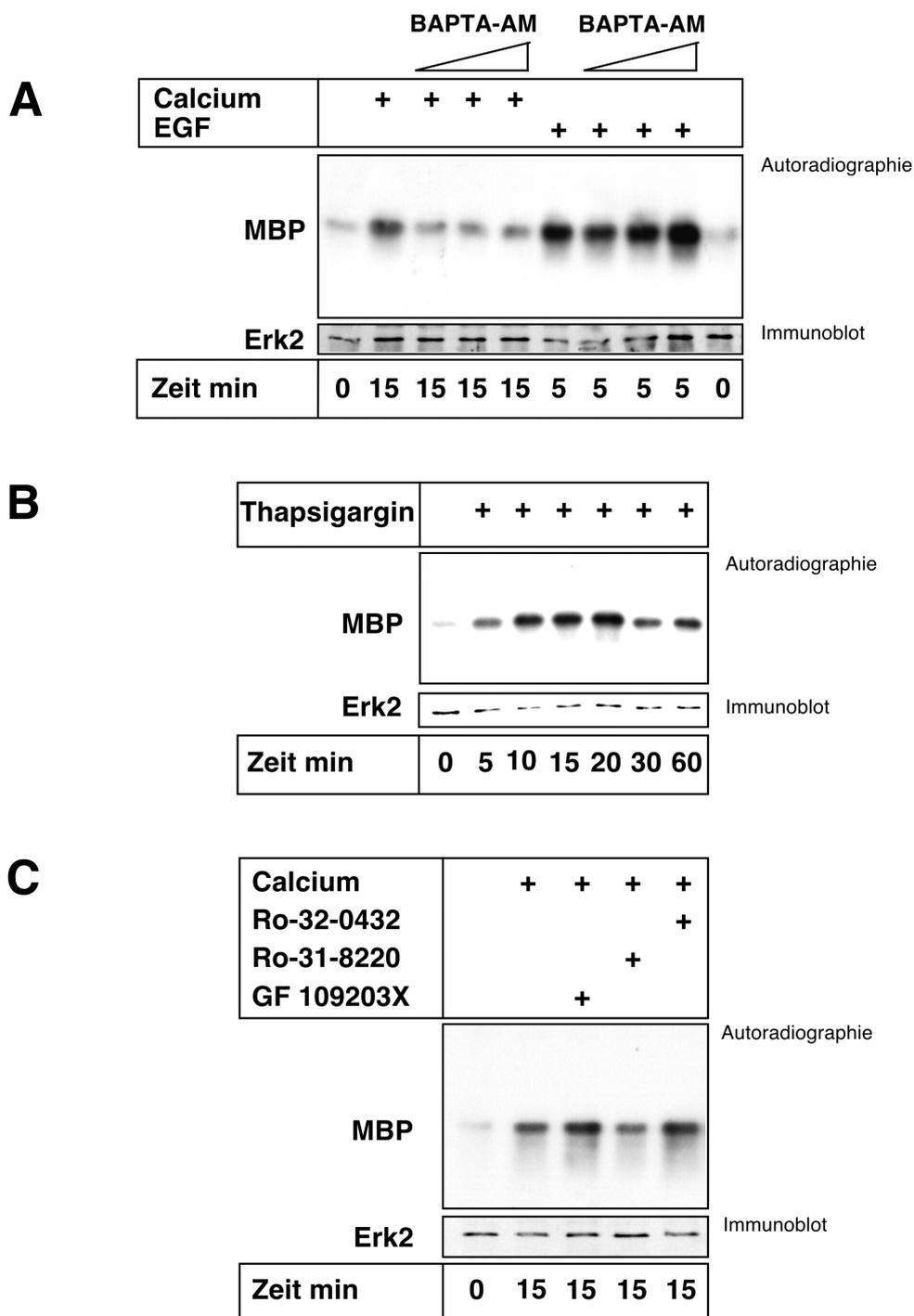
RasN17 (Stacey *et al.*, 1991) durchgeführt. Die Expression dieser Mutante unterbricht den GDP/GTP-Austauschzyklus und damit die Aktivierung von Ras-Proteinen durch GTP-Beladung vermutlich durch Bindung an Ras-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Ras guanine nucleotide exchange factors, RasGEFs; Feig, 1999).

Abb 4.6 A zeigt, daß Kotransfektion dieser dominant negativen RasN17-Mutante zwar verglichen mit den Vektorkontrollen sowohl die basale als auch calciuminduzierte Aktivierung von HA-Erk2 reduzierte, der relative Anstieg der Aktivität jedoch etwa gleich blieb. Densitometrische Auswertung zweier unabhängiger Experimente ergab im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen lediglich eine etwa 10 % ige Reduktion der calciuminduzierten HA-Erk2-Aktivierung (Abb 4.6 A unten). Im Gegensatz dazu verhinderte RasN17-Expression unter denselben experimentellen Bedingungen fast vollständig die Aktivierung von HA-Erk2 durch EGF (Abb 4.6 B). Durch densitometrische Auswertung mehrerer Experimente wurde bestätigt, daß die Expression von dominant-negativem RasN17 verglichen mit der Vektorkontrolle die EGF-induzierte Aktivierung von kotransfiziertem HA-Erk2 um mehr als 60 % reduzierte (Abb 4.6 B unten).

Insgesamt sprechen diese Daten für einen Ras-unabhängigen Aktivierungsmechanismus von Erk durch Calcium, während EGF-induzierte Erk-Aktivierung klar von Ras-Aktivität abhängig ist.

#### **4.4 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung ist abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration, aber unabhängig von PKC-Aktivierung**

Der Mechanismus, durch den Calcium die Expression differenzierungsspezifischer Gene induziert, beinhaltet die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (siehe Abschnitt 1.4). Um zu prüfen, ob eine Reduktion der zytoplasmatischen Calciumkonzentration modulierend auf die Aktivierung von Erk wirkt, wurde der Einfluß eines intrazellulären Calciumchelators, BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure) auf calcium- bzw. EGF-induzierte Erk-Aktivierung untersucht. Das hier eingesetzte BAPTA-Derivat, BAPTA-AM, ist ein in seiner Ausgangsverbindung inaktiver, zellpermeabler Azetoxymethylester (AM-), der erst durch Esterasen in der Zelle in seine aktive, calciumbindende Form überführt wird. Inkubation muriner Keratinozyten mit diesem BAPTA-Derivat führte nicht nur zur Senkung des basalen Calciumspiegels in der Zelle, sondern verhinderte auch den Anstieg zytoplasmatischer Calciummengen sowie



**Abbildung 4.7 Calciuminduzierte Erk-Aktivierung wird durch Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt, erfolgt jedoch unabhängig von klassischen PKCs**

HaCaT-Zellen wurden in niedrig-Calcium Medium kultiviert, für 18 h bei 0.5 % FCS gehungert und wie angezeigt behandelt.

(A) Calciuminduzierte Erk-Aktivierung wird durch den intrazellulären Calciumchelator BAPTA-AM gehemmt. In denselben Konzentrationen (30, 40, 50  $\mu$ M) wurde kein inhibitorischer Effekt auf EGF-induzierte Erk Aktivierung beobachtet. Stimulationskonzentrationen: Calcium 1.0 mM, EGF 1 ng/ml

(B) Aktivierungskinetik von Erk nach Stimulation mit 100 nM Thapsigargin

(C) Calciuminduzierte Erk Aktivierung wird nicht durch Inhibitoren für klassische PKCs beeinflusst.

Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen betragen 3  $\mu$ M für GF 109203X, 100 nM für Ro-31-0432 und für 1  $\mu$ M Ro-32-0432.

die Induktion differenzierungsspezifischer Gene nach Stimulation mit extrazellulärem Calcium (Li *et al.*, 1995). Abbildung 4.7 A illustriert die Wirkung von BAPTA-AM auf calcium- bzw. EGF-induzierte Aktivierung von Erk in HaCaT-Zellen. Präinkubation mit 30  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM reduzierte calciuminduzierte Erk Aktivierung bereits fast vollständig, während selbst höhere BAPTA-AM Konzentrationen von bis zu 50  $\mu\text{M}$  keinerlei Auswirkung auf EGF-vermittelte Erk-Aktivierung hatten. Dies demonstriert, daß Erk-Aktivierung durch extrazelluläres Calcium offenbar kritisch von dem Vorhandensein freier Calciumionen in der Zelle abhängig ist, während EGF Erk auch bei geringem intrazellulären Calciumgehalt noch normal aktivieren kann.

Um zu prüfen, ob Erhöhung des zytoplasmatischen Calciumspiegels in Erk-Aktivierung resultiert, wurden HaCaT-Zellen mit dem intrazellulären Calciummobilisator Thapsigargin stimuliert und zu verschiedenen Zeiten die Aktivität von Erk2 durch Immunkomplex-Kinaseassays bestimmt. Thapsigargin mobilisiert Calcium aus intrazellulären Speichern durch Hemmung einer ATP-abhängigen Calciumpumpe im Endoplasmatischen Retikulum, was in verschiedenen Zellen zu einem ähnlichen Anstieg zytoplasmatischer Calciumkonzentrationen führt wie die Erhöhung extrazellulärer Calciumspiegel (Chao *et al.*, 1992; Takemura *et al.*, 1989). Übereinstimmend damit resultierte Behandlung von HaCaT-Zellen mit 100 nM Thapsigargin in einer transienten Erk-Aktivierung, die mit der beobachteten Stimulation von Erk durch extrazelluläres Calcium vergleichbar ist (Abb. 4.7 B). Dies impliziert ein Modell, in dem die Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges über einen intrazellulären Signalweg vermittelt wird, dessen Stimulation in einem kritischen Zwischenschritt von der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig ist.

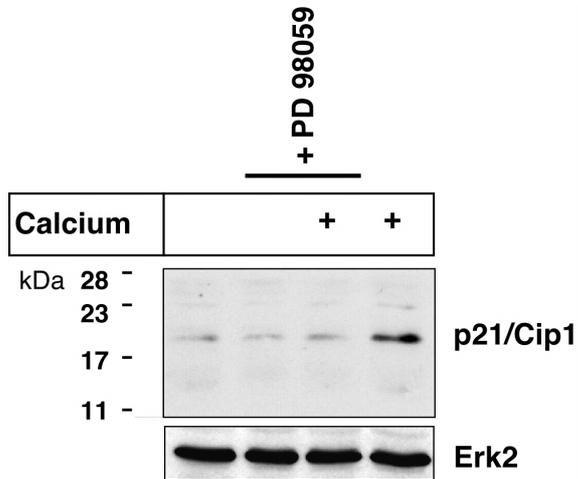
Zu den bekanntermaßen calciumregulierten Kinasen gehören auch bestimmte Isoformen der PKC-Familie, die klassischen PKCs ( $\text{PKC}\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$ ; Newton, 1997). Wie oben erwähnt (siehe Abschnitt 1.4), werden einige PKC-Isoformen, vor allem  $\text{PKC}\alpha$  und  $\text{PKC}\epsilon$ , schon länger mit calciuminduzierter Differenzierung von Keratinozyten in Verbindung gebracht (Denning *et al.*, 1995). Da beide Isoformen in anderen Zellen potente Aktivatoren von c-Raf-1 sind (Cai *et al.*, 1997; Kolch *et al.*, 1993), waren diese Enzyme auch in Keratinozyten mögliche Kandidaten für die Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges. Es wurden daher drei unterschiedliche PKC-Inhibitoren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, calciuminduzierte Erk-Aktivierung zu reprimieren. Weder die relativ breit wirksamen PKC-Inhibitoren GF-109203X und Ro-31-8220, die beide effektiv alle klassischen PKC-

Isoformen hemmen, noch der etwas spezifischere PKC $\alpha$ -Inhibitor Ro-32-432 zeigten in HaCaT-Zellen eine signifikant hemmende Wirkung auf calciuminduzierte Erk-Aktivierung (Abb. 4.7 C), obwohl alle drei Verbindungen in derselben Konzentration effektiv PKC-abhängige Genexpression in A.301-T-Zellen blockierten (nicht gezeigt). Diese Daten sprechen für eine eher untergeordnete Rolle von klassischen PKC-Isoformen bei der Vermittlung calciuminduzierter Erk-Aktivierung.

#### **4.5 MEK-Inhibitor verhindert die calciuminduzierte Expression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p21/Cip1**

Calciumstimulation führt zu einer raschen und transienten Aktivierung von Erk. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Raf/MEK/Erk-Signalweg eine wichtige regulatorische Funktion bei frühen Stadien der Keratinozytendifferenzierung ausübt. Ein initiales Ereignis im Differenzierungsprozeß von Keratinozyten ist Zellzyklusarrest (Dotto, 1998). Zu den Markermolekülen, mit deren Hilfe man den Proliferationszustand von Zellen analysieren kann, zählen Proteine der Familie cyclinabhängiger Kinaseinhibitoren (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs; (Sherr and Roberts, 1999). Diese binden und inaktivieren cyclinabhängige Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs), die wichtige molekulare Schaltstellen für die Zellzyklusprogression darstellen (Gao and Zelenka, 1997). In einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen geht die Initiation von Zellzyklusarrest während des Differenzierungsprozesses mit verstärkter Expression des CKIs p21/Cip1 einher (Halevy *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1994; MacLeod *et al.*, 1995; Missero *et al.*, 1995; Steinman *et al.*, 1994). In differenzierenden Zellen gilt Akkumulation von p21/Cip1 daher als deutliches Zeichen für einen einsetzenden Proliferationsstop. Auch bei Keratinozytendifferenzierung besteht ein Zusammenhang zwischen p21/Cip1-Expression und Zellzyklusarrest. So wurde während calciuminduzierter Differenzierung muriner Keratinozyten eine strenge zeitliche Korrelation zwischen erhöhter p21/Cip1-Expression und der Initiation von Zellzyklusarrest beobachtet (Missero *et al.*, 1996). Ebenso resultierte Calciumstimulation humaner Keratinozyten in vermehrter p21/Cip1-Expression (Todd and Reynolds, 1998). Da in vielen Zellen Komponenten des Raf/MEK/Erk-Signalweges eine wichtige Rolle bei der Zellzyklusregulation spielen (Kerkhoff and Rapp, 1998), sollte experimentell geklärt werden, ob Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges auch an der Induktion des p21/Cip1-Proteins in HaCaT-Zellen beteiligt ist. Es wurde daher geprüft, ob Inhibition von MEK-Aktivierung in der Lage ist, calciumvermittelte p21/Cip1-Proteinexpression zu blockieren. HaCaT-Zellen wurden daher mit dem spezifischen

MEK1-Inhibitor PD98059 inkubiert, und die Expression von p21/Cip1-Protein nach 24-stündiger Calciumstimulation mittels Westernblot analysiert. Die Experimente wurden jeweils unter niedrig-Serum Bedingungen (0.5 % FCS) durchgeführt, um variierende Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Konfluenzgrade der Zellkulturen zu vermeiden.

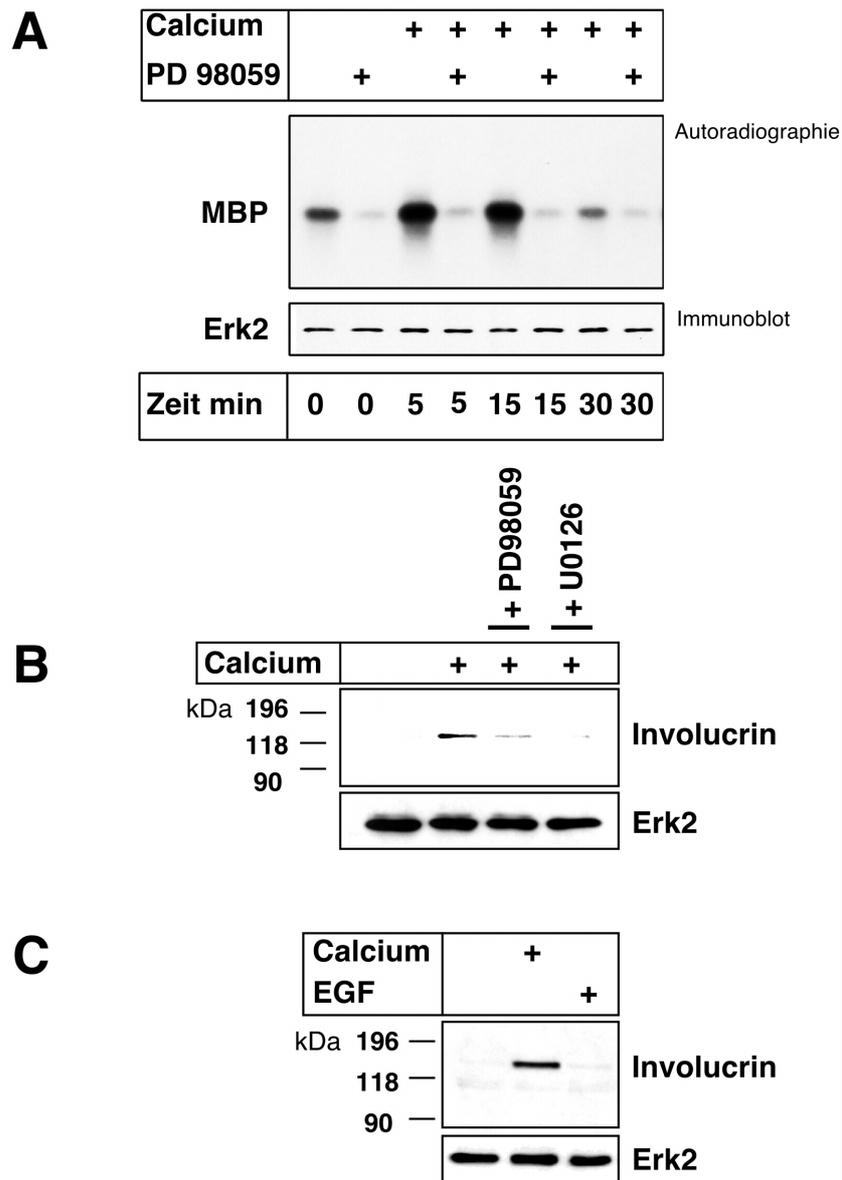


**Abbildung 4.8 Die calciuminduzierte Expression von p21/Cip1 hängt von MEK-Aktivierung ab.** HaCaT-Zellen wurden bis zu einem Konfluenzgrad von 50-70 % in niedrig-Calcium Medium kultiviert und dann in An- oder Abwesenheit von 20  $\mu$ M von PD98059 24 h lang einer Calciumkonzentration von 1.0 mM ausgesetzt. Die Zellen wurden lysiert und p21/Cip1-Protein durch Westernblot nachgewiesen. Gleiche Proteinbeladung der einzelnen Spuren wurde durch Immunfärbung der gleichen Membran mit einem Antiserum gegen Erk2 bestätigt.

Abbildung 4.8 demonstriert, daß 20  $\mu$ M PD98059 ausreichen, calciuminduzierte p21/Cip1-Proteinexpression vollständig zu inhibieren. Die Daten belegen, daß calciuminduzierte p21/Cip1-Expression von der Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges abhängig ist.

#### 4.6 Calciuminduzierte Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin kann durch MEK-Inhibition blockiert werden

Um zu verifizieren, daß die Raf/MEK/Erk-Kaskade an der Determination des keratinozytären Differenzierungsprozesses beteiligt ist, sollte analysiert werden, ob Hemmung des Signalweges auf der Ebene von MEK die Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin beeinflusst. Involucrin (Simon and Green, 1985) ist ein epidermales Strukturprotein, das zuerst im *stratum spinosum* und dann verstärkt im *stratum granulosum* als zytoplasmatisches Protein exprimiert wird (Eckert *et al.*, 1997; siehe Abschnitt 1.1, Abb. 1.1). Während der Entstehung der azellulären Hornschicht im *stratum corneum* wird es mit Hilfe von Transglutaminase-1 kreuzvernetzt und bildet einen wichtigen strukturellen Bestandteil dieser Schicht. Da HaCaT-Zellen im Vergleich zu primären Keratinozyten nach Calciumstimulation eine deutlich schwächere Verhornung und weniger ausgeprägte Schichtbildung zeigen (Boukamp *et al.*, 1988), sollten für diesen Versuch primäre NHEK-Zellen eingesetzt werden. Es galt deshalb zunächst zu überprüfen,



**Abbildung 4.9 Calciuminduzierte Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin ist sensitiv auf MEK-Inhibition in primären NHEK-Zellen.**

(A) Bestätigung der calciuminduzierten Erk-Aktivierung via MEK in primären NHEK-Zellen. Gezeigt ist ein Immunkomplex-Kinaseassay für Erk2 mit MBP als Substrat. Konzentration PD98059 20  $\mu$ M. (B, C) Westernblots für Involucrin. NHEK-Zellen wurden für 48 h mit 1.0 mM Calcium inkubiert (B, C) oder 48 h mit 50 ng/ml EGF stimuliert (C) und die Expression von Involucrin mittels Westernblot analysiert. In (B) wurde die Calciumstimulation zusätzlich in Anwesenheit von 20  $\mu$ M PD98059 bzw. 10  $\mu$ M U0126 durchgeführt. Beide MEK-Inhibitoren reduzieren deutlich die calciumvermittelte Expression von Involucrin (B), während EGF-Behandlung keinerlei Effekt auf Involucrinexpression hat (C). Als Ladekontrolle wurden die Blots in (B) und (C) jeweils zusätzlich mit einem Antiserum gegen Erk2 immungefärbt.

ob Calciumstimulation in primären NHEK-Zellen eine vergleichbare Erk-Aktivierung hervorruft wie in HaCaT-Zellen. Abb. 4.9 A zeigt, daß Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration von 0.05 mM auf 1.0 mM in NHEKs eine transiente Erk-

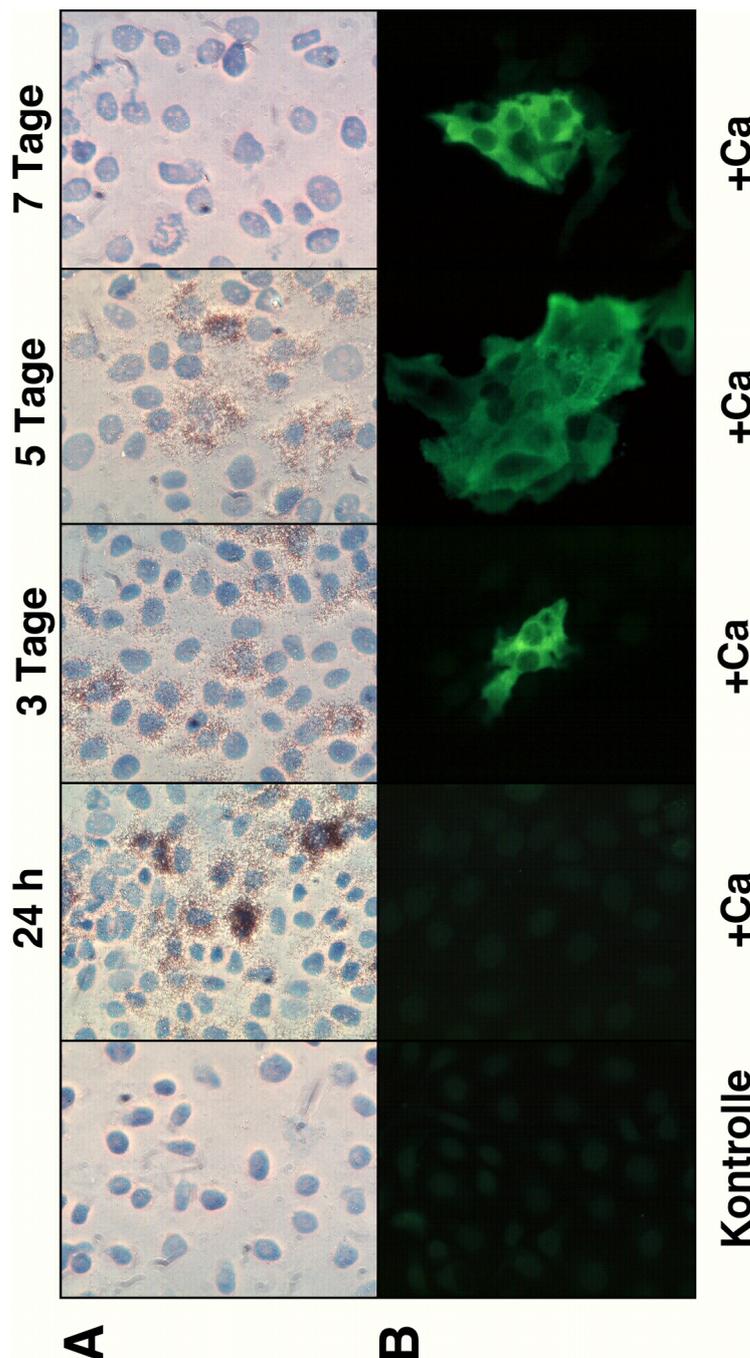
Aktivierung mit identischer Kinetik wie in HaCaTs induziert. Wie bei der HaCaT-Zelllinie ließ sich die beobachtete Erk-Aktivierung durch Inkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD98059 vollständig blockieren. Calciuminduzierte Erk-Aktivierung wird also auch in primären Keratinozyten durch MEK vermittelt.

Um nun zu testen, welchen Effekt MEK-Inhibitor auf calciuminduzierte Involucrinsynthese hat, wurden NHEK-Zellen in niedrig-Calcium Medium ausgesät und dann in An- oder Abwesenheit der MEK-Inhibitoren PD98059 (20  $\mu$ M) bzw. U0126 (10  $\mu$ M) für 48 h einer extrazellulären Calciumkonzentration von 1.0 mM ausgesetzt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die relative Menge an Involucrin durch Westernblot-Analyse mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen humanes Involucrin bestimmt. Während calciuminduzierte Involucrinsynthese durch PD98059 teilweise inhibiert wurde, reichten 10  $\mu$ M von U0126 aus, die Involucrinexpression auf basales Niveau zu reduzieren (Abb 4.9 B). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Daten von Favata et al., nach denen U0126 eine stärkere inhibitorische Wirkung auf MEK-Aktivität besitzt als PD98059 (Favata *et al.*, 1998). Die beobachtete Reduktion erfolgte nicht aufgrund einer generellen Inhibition der Proteinsynthese oder ungleicher Proteinbeladung, da bei Überprüfung mit einem Erk2-spezifischen Antikörper äquivalente Mengen an Erk2-Protein auf demselben Immunoblot nachgewiesen wurden. Weitere Kontrollexperimente, bei denen NHEK-Zellen 48 h lang in hoch-Calcium Medium kultiviert wurden, das anstatt der Inhibitoren äquivalente Mengen des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, ergaben auch keinerlei inhibitorischen Effekt von DMSO auf Involucrinexpression (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Calcium führte EGF-Behandlung von NHEKs nicht zu erhöhten Involucrinmengen (Abb. 4.9 C), was darauf hindeutet, daß Erk-Aktivierung alleine nicht ausreicht, Involucrinexpression zu induzieren. Dies impliziert, daß die Wirkung der mitogenen Kaskade auf Involucrinsynthese durch die Aktivierungskinetik bestimmt wird, und/oder kostimulatorische Signale das Resultat ihrer Aktivierung entscheidend beeinflussen.

#### **4.7 Calciuminduzierte Differenzierung humaner Keratinozyten geht mit erhöhter Expression von MRP8 und MRP14 einher**

Vielen S100-Proteinen wird eine mögliche Funktion bei der Differenzierung von Zellen zugeschrieben (Donato, 1999; Schäfer and Heizmann, 1996). Die Lokalisation der Gene für MRP8 und MRP14 in dem „epithelialen Differenzierungskomplex“ 1q21 sowie die Fähigkeit von MRP8/MRP14-Komplexen, in Epithelzellen calciumabhängig an

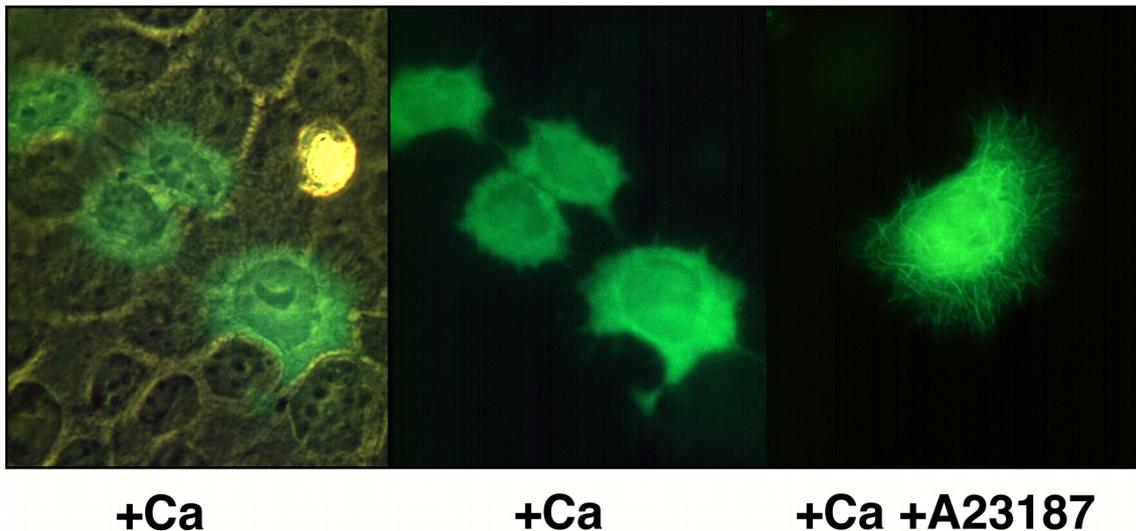
Zytokeratinfilamente zu translozieren (Goebeler *et al.*, 1995), legte eine potentielle regulatorische Rolle von MRP8 und MRP14 bei Reorganisationsereignissen des Zytoskelettes während des keratinozytären Differenzierungsprozesses nahe. Um die Expression von MRP8 und MRP14 in Keratinozyten *in situ* zu analysieren, wurden die mRNA-Mengen von MRP8 und MRP14 in undifferenzierten und differenzierenden HaCaTs mit Hilfe von *in-situ* Hybridisierung miteinander verglichen. HaCaT-Zellen wurden dazu in geringer Dichte in achtkammrige, Objektträger-basierte Kultursysteme



**Abbildung 4.10 MRP8 und MRP14 werden in Keratinozyten differenzierungsspezifisch exprimiert**  
 HaCaT-Zellen wurden in niedrig-Calcium Medium ausgesät und durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1.0 mM zur Differenzierung gebracht. Zu den angezeigten Zeitpunkten nach der Stimulation wurde die Expression von MRP8 und MRP14 entweder durch *in situ*-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten MRP14-anti-sense-RNA-Probe (A) oder durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem Maus-monoklonalen Antikörper 27E10 analysiert, der ausschließlich MRP8/MRP14-Heteromere erkennt (B). Zusätzliche *in-situ*-Hybridisierung mit einer Antisense-Sonde für MRP8 zeigte Koinduktion von MRP8-mRNA mit identischer Kinetik wie MRP14 (nicht gezeigt)

ausgesät (Chamberslides, siehe Material und Methoden). Nach Anwachsen in niedrig-Calcium Medium wurden dann, über einen Zeitraum von sieben Tagen, alle 24 h Zellen je

einer Kammer mit 1.0 mM Calcium stimuliert und durch Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierten Antisense-Proben auf MRP8/MRP14-mRNA-Expression hin untersucht. Während bei undifferenzierten HaCaTs keine mRNA von MRP8 oder MRP14 nachweisbar war, kam es bereits 24 h nach Erhöhung des extrazellulären Calciumgehaltes zu einem sprunghaften Anstieg der MRP8/MRP14-mRNA-Expression (Abb. 4.10 A; Daten nicht gezeigt). Es war zu beobachten, daß die Induktion beider Gene zeitlich streng miteinander korrelierte (Daten nicht gezeigt), aber nicht in allen Zellen verstärkte MRP8/MRP14-mRNA-Synthese nach Calciumstimulation erfolgte. Im untersuchten Zeitraum blieben die mRNA-Mengen von MRP8 und MRP14 jeweils noch 4-5 Tage erhöht, gingen dann aber rasch auf Basalniveau zurück. Um die Induktion von MRP8 und MRP14 durch Calcium auf Proteinebene zu verifizieren, wurde deren Expression in unstimulierten und calciumstimulierten HaCaTs durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem MRP8/MRP14-spezifischen Antikörper überprüft. Der dazu verwendete monoklonale Antikörper 27E10 erkennt ausschließlich MRP8/MRP14-Heteromere, nicht jedoch die sie konstituierenden Monomere (Bhardwaj *et al.*, 1992), so daß damit gleichzeitig die Expression beider Proteine analysiert werden konnte. Abb 4.10 B zeigt, daß erste MRP8/MRP14-Komplexe nach drei Tagen in hoch-Calcium Medium vorhanden waren und nachfolgend im gesamten restlichen Untersuchungszeitraum (bis sieben Tage nach Calciumstimulation) nachweisbar blieben. Wie bereits bei den *in-situ*-Experimenten fiel auf, daß nicht alle Zellen auf Calciumstimulation mit erhöhter MRP8/MRP14-Proteinsynthese antworteten, jedoch die jeweils positiven Zellen große Mengen an MRP8 und MRP14 produzierten. Interessanterweise schienen sich viele MRP8/MRP14-positive Zellen räumlich oberhalb der basalen Zellschicht zu befinden (Abb 4.11 links und Mitte), was ein Anzeichen für ein verändertes Proliferationspotential dieser Zellen sein könnte. Eine genauere Analyse der Lokalisation der MRP8/MRP14-Proteinkomplexe ergab ein diffus zytoplasmatisches Färbemuster, wie es für unstimulierte Zellen der konstitutiv MRP8/MRP14-positiven Plattenepithelkarzinomlinie, TR146 (Rupniak *et al.*, 1985), beschrieben wurde (Goebeler *et al.*, 1995). Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch Stimulation mit dem Calciumionophor A23187 führte bei dieser Zelllinie zur Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an Keratin-Intermediärfilamente (Goebeler *et al.*, 1995). Es wurde daher untersucht, ob Inkubation mit A23187 auch in HaCaTs Translokation der calciuminduzierten MRP8/MRP14-Komplexe an Zytoskelettstrukturen bewirkt.



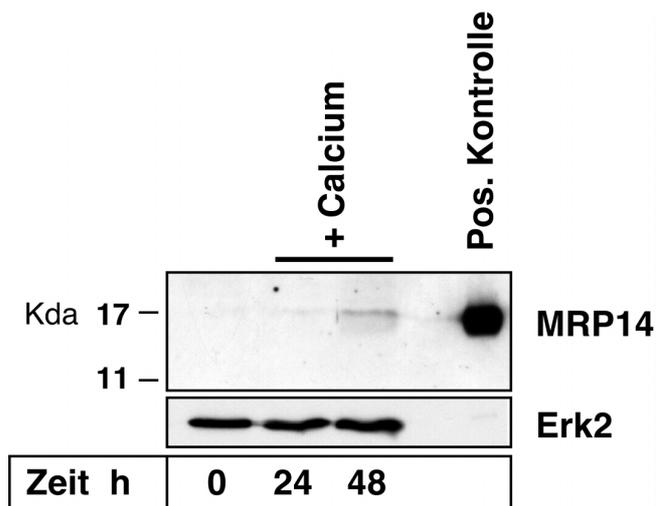
**Abbildung 4.11 MRP8 und MRP14 werden in HaCaT-Zellen calciumabhängig an Zytoskelettstrukturen transloziert.** HaCaT-Zellen wurden durch 5-tägige Kultur in hoch-Calcium Medium (1.0 mM Calcium) zur Expression von MRP8 und MRP14 angeregt und dann entweder 1 h mit 10  $\mu$ M des Calciumionophors A23187 stimuliert (rechts), oder unstimuliert belassen (links und Mitte). Danach wurde die Lokalisation der MRP8/MRP14-Komplexe mittels Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem monoklonalen MRP-Komplexantikörper 27E10 analysiert. Man erkennt ein deutlich filamentöses Färbemuster der MRP-Komplexe nach A23187-Stimulation (rechts), während die nur mit Calcium stimulierten Zellen ein diffus zytoplasmatisches Färbemuster aufweisen (Mitte). Bei Überlagerung von Immunfluoreszenz und Phasenkontrast ist deutlich zu sehen, daß einige MRP8/MRP14-positive Zellen sich räumlich oberhalb der basalen Zellschicht befinden (links).

Abb. 4.11 (rechtes Bild) illustriert, daß A23187-Kostimulation von HaCaT-Zellen in einer deutlichen Änderung der intrazellulären Lokalisation der MRP8/MRP14-Proteine resultierte. Statt einer zytoplasmatischen Färbung war in der Immunfluoreszenz nach A23187-Stimulation ein deutlich filamentöses Färbemuster der MRP8/MRP14-Heteromere zu erkennen. In Kontrollexperimenten, bei denen HaCaT-Zellen kurz vor der A23187-Stimulation in niedrig-Calcium Medium umgesetzt wurden, wurde diese Translokation der MRP8/MRP14-Komplexe nicht beobachtet (nicht gezeigt), was dafür spricht, daß ähnlich wie bei der TR146-Zelllinie die Translokation der MRP8/MRP14-Heteromere calciumabhängig erfolgt.

Um auszuschließen, daß Calciumstimulation nur aufgrund des immortalisierten Charakters der HaCaT-Zelllinie erhöhte MRP8/MRP14 Expression bewirkt, wurden auch primäre NHEK-Zellen untersucht. Sowohl Westernblot-Experimente mit einem spezifischen Antiserum gegen MRP14 als auch Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem komplexspezifischen 27E10-Antikörper bestätigten, daß auch primäre NHEKs nach Calciumstimulation vermehrt MRP8- und MRP14-Protein synthetisierten (Abb. 4.12; Abb. 4.18 B, Abschnitt 4.9). Jedoch reagierten NHEKs sensibler auf eine Erhöhung der

extrazellulären Calciumkonzentration und zeigten bereits nach 24-48 h Stimulationszeit verstärkte MRP8/MRP14-Proteinexpression. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß calciumvermittelte morphologische Differenzierung primärer Keratinozyten ebenfalls früher erfolgt (Daten nicht gezeigt).

Ingesamt belegen die Resultate, daß calciuminduzierte Differenzierung humaner Keratinozyten mit einer erhöhten Expression von MRP8 und MRP14 einhergeht



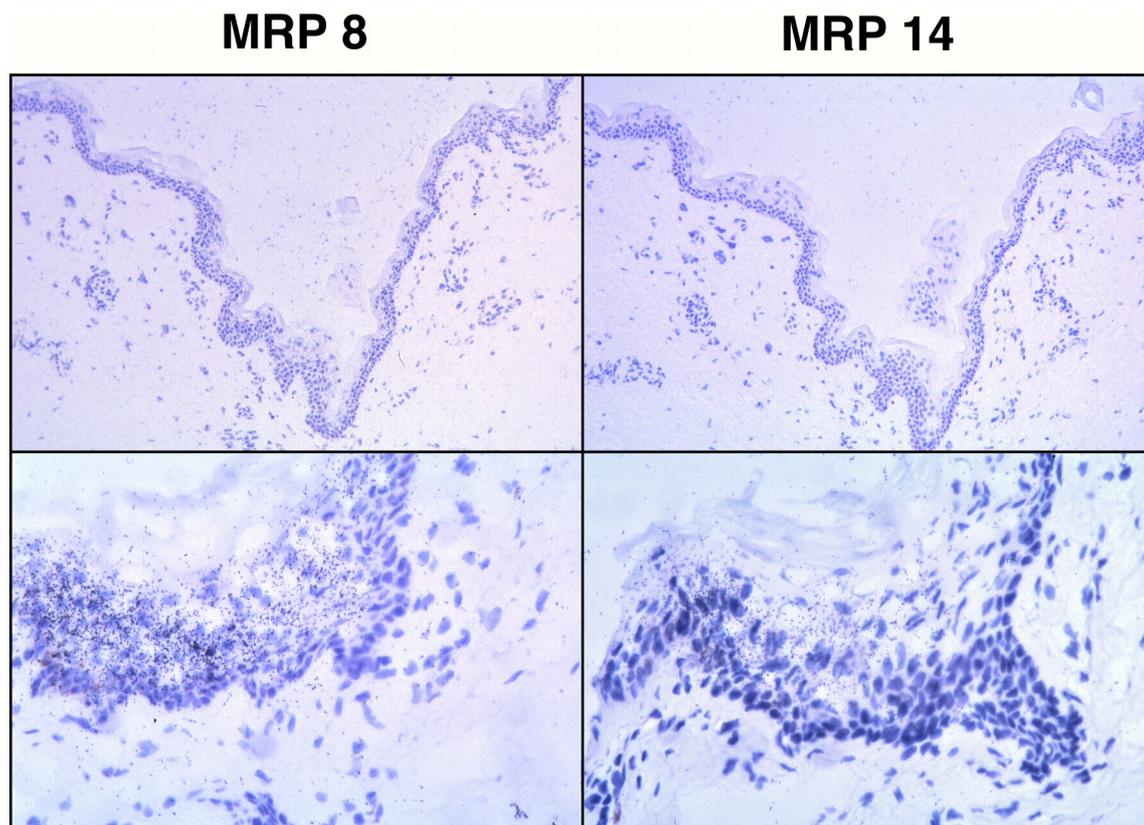
**Abbildung 4.12 Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führt zu verstärkter MRP14-Expression in primären NHEK-Zellen**

NHEK-Zellen wurden in niedrig-Calcium Medium ausgesät und mit 1.0 mM Calcium stimuliert. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Expression von MRP14 durch Westernblot mit einem spezifischen Antiserum gegen MRP14 bestimmt. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle Totallysate von humanen Granulozyten aufgetragen, die große Mengen MRP8 und MRP14 exprimieren. Als Ladekontrolle wurde derselbe Blot mit einem Antiserum gegen Erk2 gefärbt.

#### 4.8 MRP8 und MRP14 werden im Haarfollikel exprimiert und können in suprabasalen Schichten der Epidermis induziert werden

Zur Klärung der Frage, ob MRP8/MRP14-Expression auch *in vivo* mit unterschiedlichen Ausprägungen epidermaler Differenzierung korreliert, wurden Serienschnitte formalin- bzw. kryokonservierter Hautproben von Gesunden sowie von Patienten mit entzündlichen oder tumorösen Hauterkrankungen durch *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie analysiert.

Abb. 4.13 verdeutlicht, daß die Epidermis gesunder Probanden im wesentlichen negativ für MRP8/MRP14-mRNA war. In einigen Fällen wurden lokal schwache, kaum detektierbare Signale in suprabasalen Schichten des Epithels gefunden (Abb 4.13 unten). Diese fehlten in Serienschnitten derselben Biopsie, wenn sense-Proben für MRP8 oder MRP14 zum Nachweis eingesetzt wurden (nicht gezeigt), was unspezifische Bindung der Sonden in den schwach positiven Abschnitten ausschließt. Interessanterweise war in Haarfollikeln eine deutliche Expression sowohl von MRP8- als auch MRP14-mRNA im Bereich der keratogenen Zone der Medulla des Follikels zu beobachten (Abb. 4.14 a, b, d). Immunhistochemische Färbungen an Serienschnitten derselben Biopsie ergaben eine eindeutige Korrelation zwischen MRP14-mRNA-Signalen und -proteinexpression (Abb. 4.14 c, e).



**Abbildung 4.13 Expression von MRP8- und MRP14-mRNA in Normalhaut.**

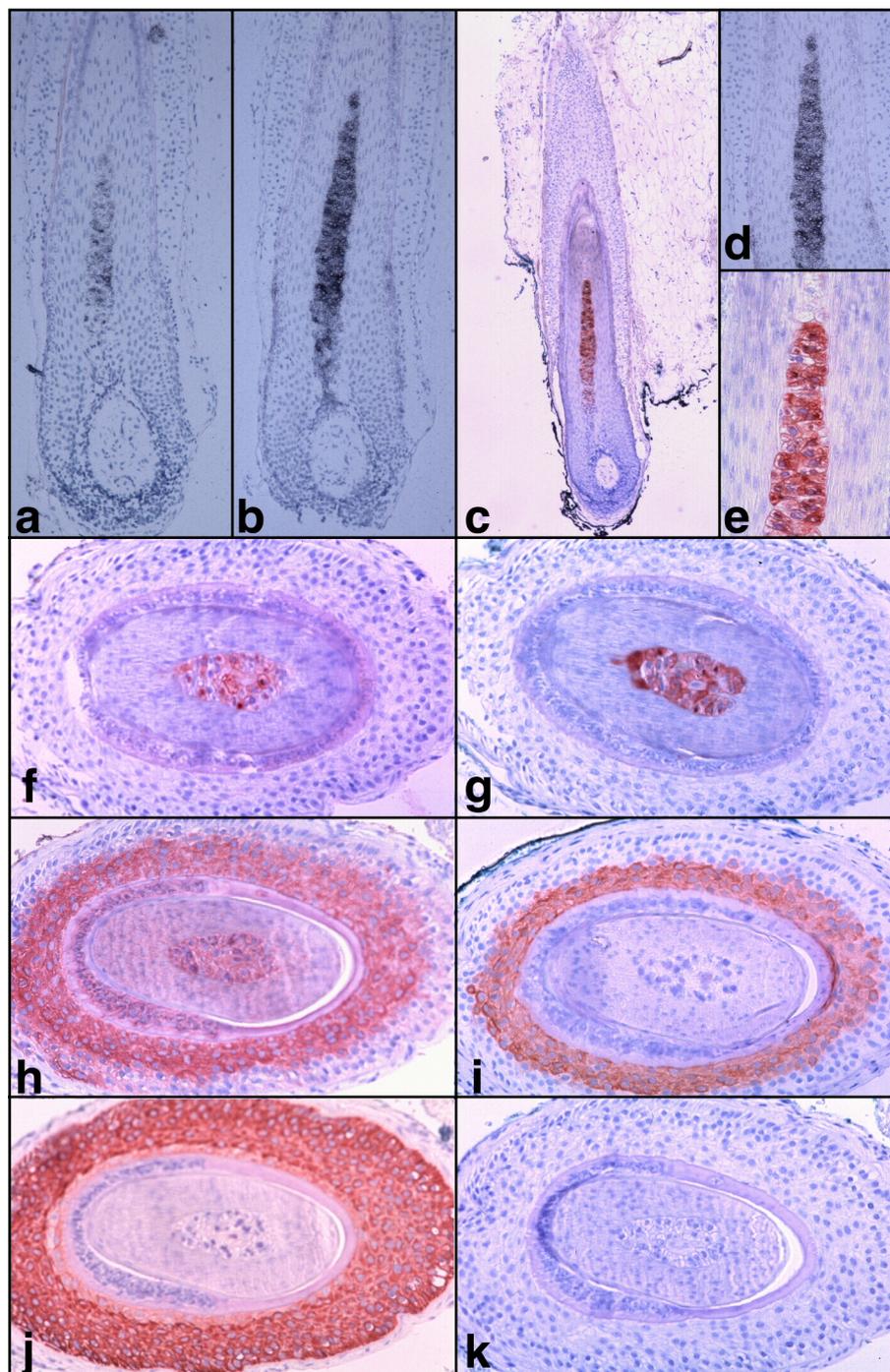
Die Expression von MRP8 und MRP14 mRNA in Normalhaut wurde mittels *in situ*-Hybridisierung formalinfixierter Proben analysiert.

*obere Abbildung:* Normalhautabschnitte negativ für MRP8/MRP14-Expression

*untere Abbildung:* Stärkere Vergrößerung eines Normalhautabschnittes mit schwacher suprabasaler MRP8- und MRP14-mRNA-Expression.

Die keratogene Zone des Haarfollikels enthält die terminal differenzierenden Keratinozyten, die für die Bildung des Haarschaftes verantwortlich sind. Daher wurden der Bereich der MRP8/MRP14-positiven Zellen durch immunhistochemische Färbungen mit MRP-spezifischen Antiseren sowie Antikörpern gegen verschiedene keratinozytäre Markerproteine näher charakterisiert. Bei Untersuchung von Haarfollikelquerschnitten wurde eine gewisse Überlappung mit dem Expressionsmuster des Differenzierungsmarkers Involucrin beobachtet, wenn auch keine strikte räumliche Korrelation zwischen MRP8/MRP14-Expression und der Lokalisation dieses Markerproteins bestand (vergleiche Abb 4.14. f, g mit h). Zellen, die den Basalzellmarker Keratin 14 exprimierten, waren hingegen ausnahmslos frei von MRP8- und MRP14-Protein (vergleiche Abb. 4.14 f, g mit j).

In Haarfollikeln ist das differenzierungsspezifische Keratin K10 durch K6 ersetzt, das sonst nur während der Wundheilung und in inflammatorisch aktivierter Epidermis vorkommt (Fuchs, 1993). Dies ließ zunächst an eine Koexpression von K6 mit MRP8 und



**Abbildung 4.14 MRP8 und MRP14 werden in der keratogenen Zone der Medulla der Haarfollikelanlage exprimiert.**

(a, b, d) *in situ*-Hybridisierung von longitudinal geschnittenen Haarfollikeln mit  $^{35}\text{S}$ -markierten Antisense-Proben für MRP8 (a) und MRP14 (b, d). Es sind deutliche Signale in der Medulla des Haarschaftes zu erkennen.

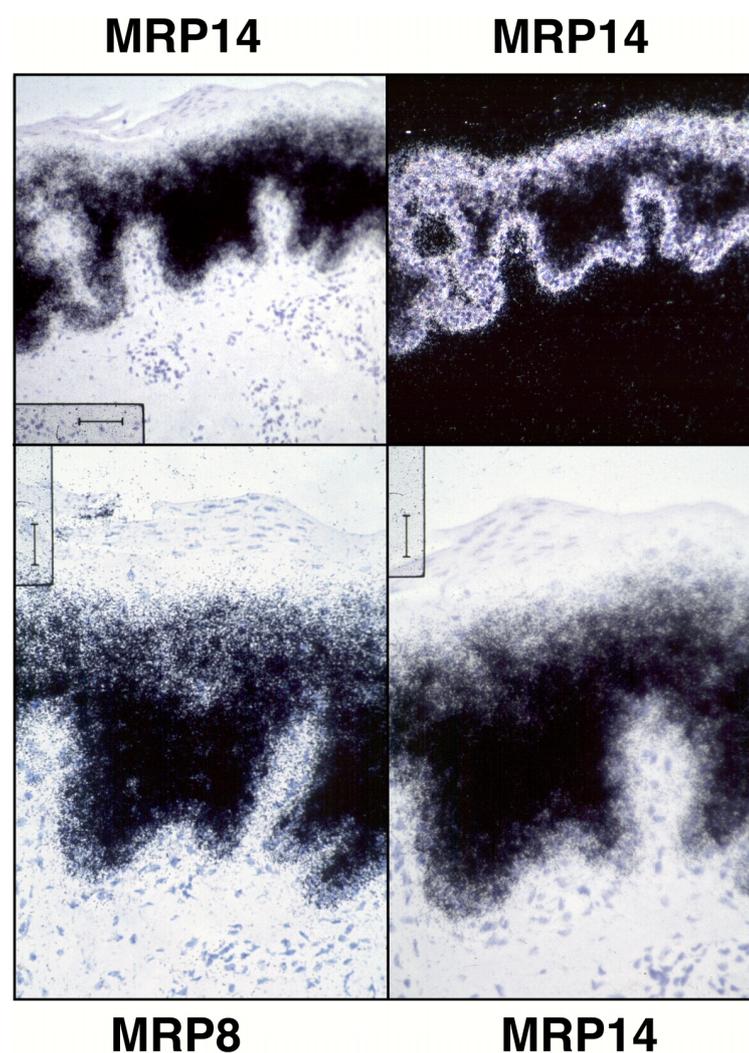
(c, e, f, g) immunhistochemische Färbungen von longitudinal geschnittenen (c, e) oder transversal geschnittenen Serienschritten (f, g) für MRP8 (f) und MRP14 (c, e, g). Parallel zur mRNA-Expression ist die Immunreaktivität gegen MRP8 und MRP14 auf die Medulla beschränkt.

(h, i, j, k) Immunfärbungen seriell geschnittener Haarfollikelquerschnitte für Involucrin (h), Keratin 6 (i), Keratin 14 (j) und Keratin 10 (k). Das Expressionsmuster von Involucrin (h) stimmt teilweise mit dem von MRP8 und MRP14 (f, g) überein, was anzeigt, daß die MRP8/MRP14-positiven Zellen differenzierende Zellen darstellen. Dagegen ist keine Kolo-kalisation mit dem Basalzellmarker Keratin 14 (j) oder Keratin 6 (k) zu sehen, das in Haarfollikeln Keratin 10 ersetzt.

MRP14 denken, da diese ebenfalls verstärkt in inflammatorischen Hauterkrankungen exprimiert werden (Kelly *et al.*, 1989). Die Färbemuster von K6 und MRP8/MRP14 in Abb. 4.14 wiesen jedoch keinerlei Ähnlichkeit miteinander auf, so daß zumindest im Haarfollikel K6 und MRP8/MRP14-positive Zellen nicht identisch sind.

Durch *in situ*-Hybridisierung an Serienschnitten hyperproliferativer, psoriatischer Haut, oder verschiedener epithelialer Hauttumore sollte sodann abgeklärt werden, ob die Expression von MRP8/MRP14 auf differenzierende Keratinozyten beschränkt ist.

Psoriatische Epidermis wies extrem hohe Expressionsraten von MRP8- und MRP14-mRNA auf (Abb 4.15). Erhöhte Expression war dabei vor allem in suprabasalen Schichten

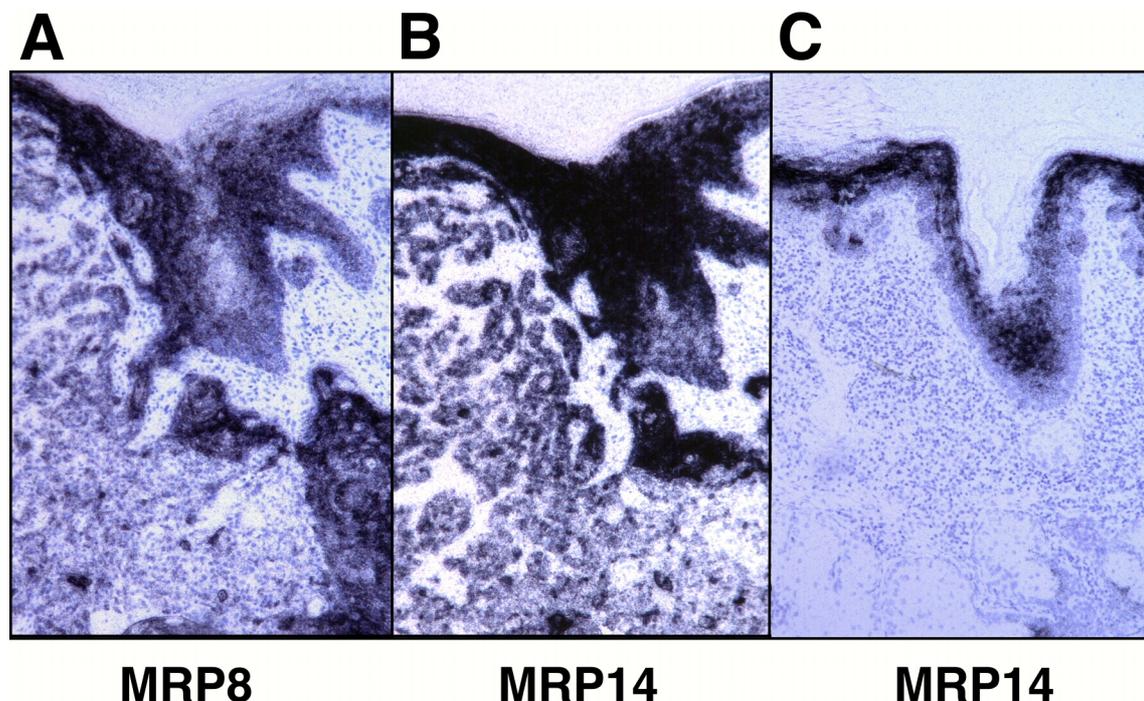


**Abbildung 4.15 MRP8 und MRP14 werden stark in suprabasalen Epidermisschichten psoriatischer Haut exprimiert.**

Serienschnitte kryofixierter Proben psoriatischer Haut wurden mittels *in situ*-Hybridisierung auf mRNA-Expression von MRP8 bzw. MRP14 hin untersucht. *Oben* Übersicht, Hellfeld (links) und Dunkelfeld (rechts) *Unten* Stärkere Vergrößerung der oben gezeigten Stelle. Während differenzierte, suprabasale Hautschichten enorme mRNA-Mengen von MRP8 und MRP14 produzieren, weist die der Dermis am nächsten liegende Basalzellschicht eine deutlich geringere mRNA-Expression auf.

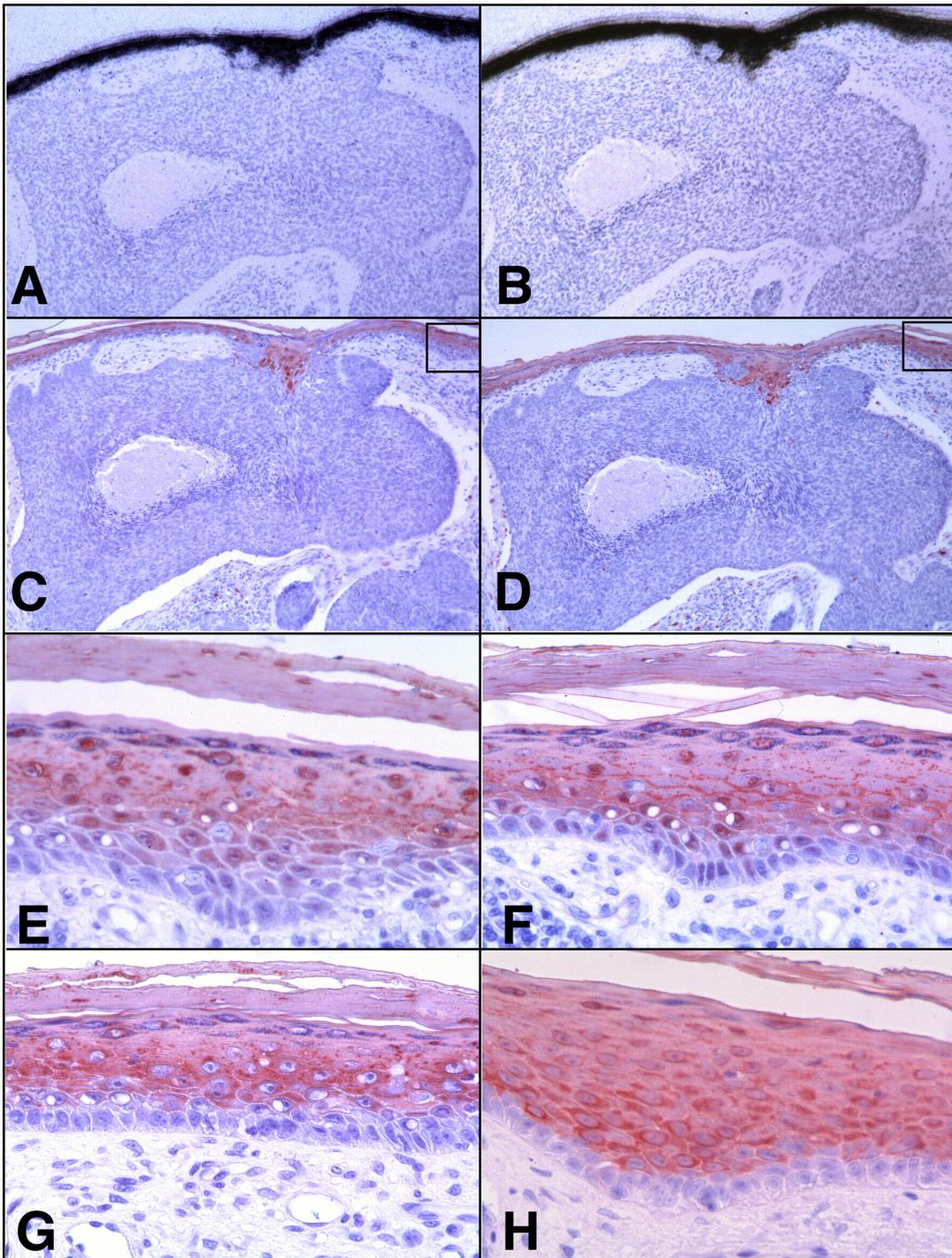
der Epidermis zu beobachten, während das *stratum basale* je nach Patient entweder völlig frei von MRP8/MRP14-mRNA war oder allenfalls moderate Mengen an MRP8/MRP14-mRNA enthielt (Abb. 4.15; nicht gezeigt). Durch immunhistochemische Analyse mit MRP8- oder MRP14-spezifischen Antisera bestätigte sich die überwiegende Lokalisation beider Proteine in suprabasalen Epidermisschichten (nicht gezeigt).

Wie psoriatische Haut wiesen auch höhergradig differenzierte Plattenepithelkarzinome, die aus dem *stratum spinosum* hervorgehen und durch starke Verhornung der befallenen Epidermis charakterisiert sind, stark erhöhte MRP8/MRP14-mRNA-Mengen auf (Abb. 4.16 A, B). Interessanterweise schien das Ausmaß der MRP8/MRP14-Positivität mit dem Differenzierungsgrad des Tumors zu korrelieren. Bei dedifferenzierten Plattenepithelkarzinomen war erheblich weniger MRP8/MRP14-mRNA nachweisbar, als bei stark differenzierten Tumoren (Abb. 4.16 C; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.16 MRP8 und MRP14-mRNA-Expression in Plattenepithelkarzinomen**  
*In situ*-Hybridisierung in paraffinfixierten Serienschnitten stark differenzierter (A, B) und dedifferenzierter Plattenepithelkarzinome. Während im Tumorgewebe dedifferenzierter Karzinome vergleichsweise schwache Signale für MRP14 detektierbar sind (C), weisen stark differenzierte Karzinome hohe Expressionsraten von MRP8- und MRP14-mRNA auf (A, B).

Ebenso wurden in Keratoakanthomen, benignen Tumoren mit epithelialer Differenzierung, stark erhöhte Expressionsraten von MRP8/MRP14-mRNA nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dagegen war das Tumorgewebe von Basalzellkarzinomen, welche nicht-differenzierte epidermale Tumore darstellen, die von transformierten Keratinozyten des *stratum basale* abstammen, ausnahmslos negativ für MRP8/MRP14-mRNA und -protein



**Abbildung 4.17 Induktion von MRP8 und MRP14 in suprabasalen Keratinozyten scheinbar normaler Epidermis in unmittelbarer Nachbarschaft von Basalzellkarzinomen.**

Paraffinschnitte von humanem Basaliomgewebe wurden mittels *in situ*-Hybridisierung (A, B) bzw. Immunhistochemie (C-H) auf Expression von MRP8 (A, C, E), MRP14 (B, D, F), Keratin 10 (G) und Keratin 6 (H) untersucht. Man erkennt eine Koexpression von MRP8 und MRP14 mit dem aktivierungsspezifischen Keratin K6 (vergleiche E, F mit H) und dem Differenzierungsmarker K10 (G) in scheinbar normaler Epidermis in Nachbarschaft von Basaliomen, während das Tumorgewebe selbst negativ für MRP8 und MRP14 ist (A-D). Die Kästen in C und D kennzeichnen die Lage der in E-H vergrößert gezeigten Epidermisabschnitte.

(Abb. 4.17 A-D). Überraschenderweise wurde in suprabasalen Epidermisschichten in direkter Nachbarschaft des Tumors eine starke MRP8/MRP14-Expression beobachtet (Abb 4.17 A-F), die mit wachsender Entfernung von dem tumorösen Bereich allmählich abnahm (nicht gezeigt). Genauere Untersuchung der MRP8/MRP14-positiven Region durch Immunhistochemie deckte auf, daß MRP8/MRP14-Expression am besten mit dem Färbemuster des Differenzierungsmarkers K10 übereinstimmte (Abb. 4.17, vergleiche G mit E und F), wenn auch MRP8 und MRP14 in K10-positiven Bereichen fern von dem Tumor nicht mehr nachweisbar waren (nicht gezeigt). Die scheinbar „normalen“ Epidermisabschnitte in direkter Nachbarschaft des Basalioms exprimierten das aktivierungsspezifische Keratin K6, was für eine Epithelaktivierung in den MRP8/MRP14-positiven Arealen spricht. Im Gegensatz zum Haarfollikel stimmte in diesen Regionen die Expression von K6 mit der von MRP8 und MRP14 weitgehend überein (Abb 4.17 vergleiche E und F mit H).

Zusammengefaßt sprechen die *in situ*-Daten dafür, daß MRP8/MRP14-Expression auch *in vivo* in differenzierenden Keratinozyten induziert werden kann, die Expression in suprabasalen Epidermisschichten jedoch nicht obligatorisch ist, sondern nur während bestimmter Entwicklungsphasen (z. B. bei der Haarfollikelentwicklung) oder bei Erkrankung der Epidermis einsetzt.

#### 4.9 IL-6 induziert MRP8/MRP14-Expression *in vitro*

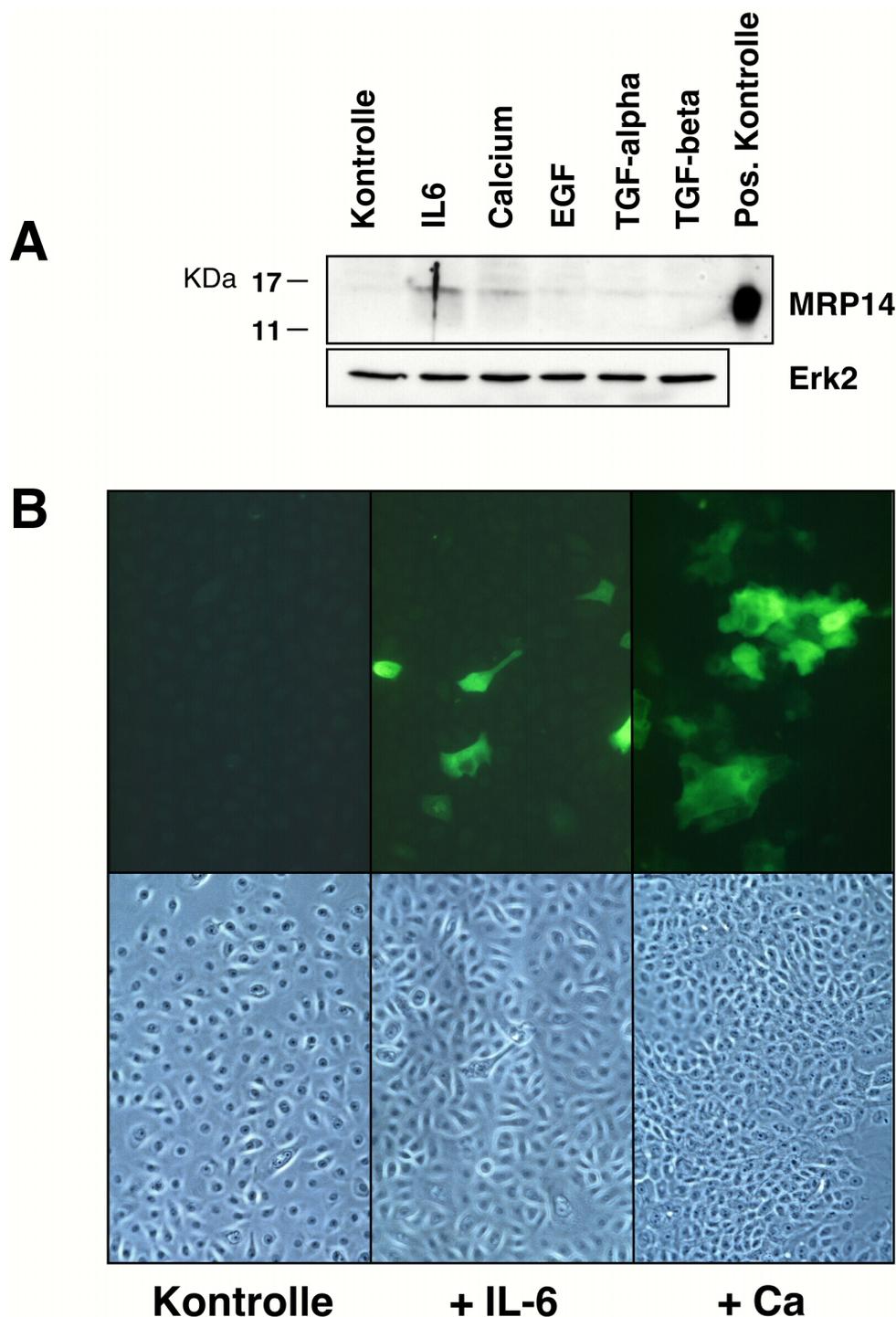
Der Befund, daß in Nachbarschaft von Basalzellkarzinomen MRP8/MRP14-Expression in suprabasalen Schichten scheinbar „normaler“ Epidermis induziert wird und dort mit dem Expressionsmuster des aktivierungsspezifischen Keratins K6 übereinstimmt, legte eine transkriptionelle Regulation durch Zytokine nahe. Es sollte daher die Wirkung verschiedener löslicher Faktoren auf MRP14-Proteinexpression mittels Westernblot untersucht werden. Bei der Auswahl der verschiedenen Stimuli galt es folgende Überlegungen zu berücksichtigen:

- Es könnten spezifische Bindemotive in der Promotorregion von MRP8 bzw. MRP14 existieren, die Hinweise auf die Regulation durch bestimmte Zytokine liefern
- Manche Krankheiten, die mit starker MRP8/MRP14-Expression verbunden sind, gehen mit einer erhöhten Konzentration bekannter Zytokine einher
- Die in den Zellkulturexperimenten beobachtete Lokalisation der MRP8/MRP14-positiven Zellen räumlich oberhalb der basalen Zellschicht (vergleiche Abb. 4.11)

sowie die ausschließliche Expression von MRP8/MRP14 in differenzierenden Zellen *in vivo* sprach dafür, daß Induktion beider Proteine vermutlich nur in zellzyklus-arretierten Zellen erfolgt. Um zu überprüfen, ob bloße Beeinflussung des Zellzyklus bereits eine Auswirkung auf MRP8/MRP14-Expression hat, sollten daher Stimuli verwendet werden, deren Wirkung bezüglich Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten gut charakterisiert ist.

Der MRP8 Promotor besitzt drei NF-IL-6- (Nuclear factor interleukin 6) Bindeelemente (DiSepio *et al.*, 1997), die auf eine Regulation durch Interleukin 6 (IL-6) hindeuten. Bei Psoriasis wie auch bei Basalzellkarzinomen kommt es in den erkrankten Bereichen zu einer starken Infiltration von putativ IL-6-produzierenden Immunzellen. IL-6 schien daher ein guter Kandidat für die Induktion von MRP8/MRP14 zu sein. Daneben wurden EGF und TGF- $\alpha$  getestet. Beide Zytokine sind in der Lage, Rezeptoren der ErbB Familie zu stimulieren und damit die Proliferation von Keratinozyten zu fördern (siehe Abschnitt 1.4). Zudem wurden in der Haut von Psoriasispatienten erhöhte Konzentrationen von TGF- $\alpha$  gefunden (Elder *et al.*, 1989), wo sie möglicherweise zur hyperproliferativen Natur dieser Krankheit beitragen. Als weiterer potentieller Regulator der MRP8/MRP14-Expression galt TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 führt in picomolaren Konzentrationen zum Zellzyklusarrest von Keratinozyten, scheint jedoch keine terminale Differenzierung auszulösen, da dieser Effekt reversibel ist (Coffey *et al.*, 1988). TGF- $\beta$ 1-Ausschüttung kann durch Calcium induziert werden und führt in hohen Konzentrationen zu K6-Synthese (Fuchs, 1993). Erhöhte TGF- $\beta$ 1-Produktion könnte demnach sowohl den stimulatorischen Effekt von Calcium auf MRP8/MRP14-Synthese als auch die bei Basaliompatienten beobachtete Koexpression beider Proteine mit K6 erklären, weshalb TGF- $\beta$ 1 ebenfalls bei der Auswahl der Zytokine berücksichtigt wurde.

Um nun die Wirkung der erwähnten Zytokine auf MRP8/MRP14-Expression zu untersuchen, wurden NHEK-Zellen zunächst für zwei bis drei Tage in niedrig-Calcium Medium kultiviert, um calciumvermittelte MRP-Expression zu unterdrücken. Nach Mediumwechsel wurden diese dann entweder bis zur Lyse weiter in niedrig-Calcium Medium inkubiert (Negativkontrolle), oder für 48 h mit den zu untersuchenden Zytokinen bzw. mit Calcium (Positivkontrolle) stimuliert. Anschließend wurde in den einzelnen Totallysaten die Proteinmenge von MRP14 durch Immunoblot mit einem MRP14-spezifischen Antiserum verglichen.



**Abbildung 4.18 IL-6 induziert *in vitro* die Expression von MRP8 und MRP14.**

(A) Primäre NHEKs wurden in niedrig-Calcium Medium kultiviert und für 48 h mit 10 ng/ml IL-6, 1.0 mM Calcium, 50 ng/ml EGF, 50 ng/ml TGF-alpha, 100 pM TGF-beta oder mit zusatzfreiem Medium als Kontrolle stimuliert. Anschließend wurde die Expression von MRP14 mittels Western blot mit einem Antiserum gegen MRP14 analysiert. Als Positivkontrolle wurde Lysat von Granulozyten aufgetragen, die konstitutiv hohe Mengen MRP14 exprimieren. Zur Kontrolle gleicher Proteinbeladung wurde die Membran zusätzlich mit einem Antiserum gegen Erk2 immungefärbt. (B) Primäre Keratinozyten wurden für 48 h mit 1.0 mM Calcium bzw. 10 ng/ml IL-6 stimuliert und die Expression von MRP8/MPR14 durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 27E10 nachgewiesen, der ausschließlich MRP8/MPR14-Komplexe erkennt (Bhardwaj *et al*, 1992). In der Phasenkontrastdarstellung (unten) ist deutlich zu sehen, daß manche MRP8/MPR14-positive Zellen sich räumlich oberhalb der basalen Zellschicht befinden.

Abb. 4.18 A zeigt die Ergebnisse der Westernblot-Analyse für MRP14 nach Stimulation mit den jeweiligen Zytokinen. Es ließ sich eine deutlich erhöhte Expression von MRP14-Protein nach Stimulation mit IL-6 und Calcium, nicht aber mit einem der anderen Stimuli erkennen. Immunfluoreszenzfärbungen mit dem komplexspezifischen MRP-Antikörper 27E10 bestätigten, daß beide Stimuli erwartungsgemäß neben MRP14- auch MRP8-Proteinexpression anregten (Abb. 4.18 B). Wie schon für calciumvermittelte MRP8/MRP14-Induktion beobachtet, kam es nach IL-6-Stimulation nicht in allen Zellen zu verstärkter MRP8/MRP14-Synthese und einige der MRP8/MRP14-positiven Zellen schienen auch hier räumlich oberhalb der basalen Zellschicht gelegen zu sein (Abb. 4.18 B unten). Dies deutet an, daß extrazelluläre Stimuli wie IL-6 und Calcium offensichtlich nur solche Zellen zu gesteigerter MRP8/MRP14-Expression veranlassen können, die entweder ein verändertes Proliferationspotential besitzen oder sich in bestimmten Phasen des Zellzyklus befinden.

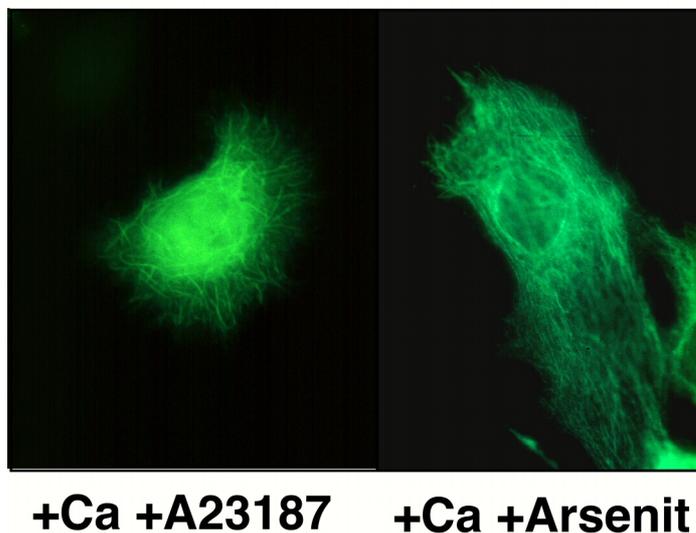
#### **4.10 Arsenitstimulation führt zur Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an Zytoskelettstrukturen**

Die calciumabhängige Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen korreliert in Monozyten mit Phosphorylierung von MRP14 an Threonin 113 (Edgeworth *et al.*, 1989; van den Bos *et al.*, 1996). Wie bereits erwähnt, stellt der Threoninrest an Position 113 eine putative Phosphorylierungsstelle für MAPK dar. Vorversuche in unserem Labor zeigten, daß diese konservierte MAPK-Phosphorylierungsstelle sehr wahrscheinlich auch funktionell ist, da MRP14 in Kinaseassays mit gereinigten Proteinen sowohl als Substrat für Erk als auch die stressaktivierten Jnk- und p38-MAPK dienen kann (S. Ludwig, unveröffentlichte Daten). Dies ließ auf eine mögliche regulatorische Funktion von MAPK bei der Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen schließen, was im nachfolgenden experimentell überprüft werden sollte.

In HaCaT-Zellen führte die calciuminduzierte Expression von MRP8/MRP14 Komplexen zu einem zytoplasmatischen Expressionsmuster (vergleiche Abb. 4.11, Abschnitt 4.7). Nach Stimulation mit dem Calciumionophor A23187 kam es analog der Verhältnisse in Monozyten zu einer Translokation dieser Komplexe an Intermediärfilamente (vergleiche Abb. 4.11). Zur Klärung der Frage, ob Aktivierung von MAPK ebenfalls zur Translokation von calciuminduzierten MRP8/MRP14-Heteromeren führt, sollte deren Lokalisation nach Kostimulation von Calcium mit einem etablierten Aktivator von MAPK durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Da *in vivo* MRP8/MRP14-Expression

oft mit inflammatorischen Prozessen korreliert ist und an der Vermittlung zellulärer Antworten auf inflammatorische Stimuli in vielen Fällen die „Streßkinasen“ Jnk und p38 beteiligt sind, lag es nahe, vor allem den Einfluß dieser beiden MAPK auf die Lokalisation von MRP8/MRP14-Komplexen zu untersuchen. Als Aktivator für Jnk und p38 wurde Arsenit verwendet (Ludwig *et al.*, 1998), das in verschiedenen Zellen, u.a. auch in HaCaTs (vergleiche Abb 4.2 B und C), zu einer starken Aktivierung dieser beiden MAPK führte. Um nun zu analysieren, welche Wirkung Arsenitstimulation auf die Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen hat, wurden HaCaT-Zellen zur Induktion von MRP8/MRP14 zunächst für fünf Tage in Gegenwart von 1.0 mM Calcium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 0.5 mM Arsenit kostimuliert, und die Lokalisation der MRP8/MRP14-Komplexe mit verschiedenen MRP-spezifischen Antikörpern mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Abb 4.19 zeigt, daß HaCaTs nach Arsenitbehandlung ein ähnlich filamentöses Färbemuster von MRP8/MRP14 aufwiesen wie Zellen, die mit dem Calciumionophor A23187 stimuliert wurden. Allerdings fiel auf, daß im Gegensatz zu A23187-behandelten HaCaTs nicht alle Zellen dieses klar filamentöse Färbemuster zeigten. Manche Zellen wiesen nur ansatzweise solch ein Muster auf oder waren ganz unauffällig (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.19 Arsenitstimulation führt zur Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an das Zytoskelett**

HaCaT-Zellen wurden zunächst zur Induktion von MRP8/MRP14-Expression für 5 Tage in hoch-Calcium Medium (1.0 mM) kultiviert. Anschließend wurden diese für 1 h entweder mit 10  $\mu$ M A23187 oder 0.5 mM Arsenit kostimuliert und die Lokalisation der MRP8/MRP14-Komplexe durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe des heteromerspezifischen MRP-Antikörpers 27E10 untersucht. Man sieht deutlich daß nach Arsenitstimulation ein ähnlich filamentöses Färbemuster auftritt wie nach Behandlung mit A23187.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie sind ein erster Hinweis darauf, daß die Aktivierung von Streßkinasen einen Einfluß auf die biologische Funktion der MRP8/MRP14-Komplexe haben könnte, wenn dies auch durch zukünftige Experimente noch zu beweisen sein wird.

## 5 Diskussion

---

### 5.1 Calciuminduzierte Differenzierung von Keratinozyten wird von transienter Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges begleitet

In dieser Arbeit wurde die Stimulation von MAPK-Signalwegen während calciuminduzierter Differenzierung humaner Keratinozyten untersucht. Sowohl in der spontan immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT als auch in primären NHEK Zellen war nach Differenzierungsinduktion durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration eine rasche und transiente Aktivierung der MAPK Erk zu beobachten (vergleiche Abb. 4.2 A und Abb. 4.9 A). Dagegen war über einen Zeitraum bis 8 h nach Calciumbehandlung keine veränderte enzymatische Aktivität der „Streßkinasen“ Jnk und p38 meßbar (Abb. 4.2 B, C; Daten nicht gezeigt), was eine initiale Rolle dieser beiden MAPKs bei der Induktion von Keratinozytendifferenzierung unwahrscheinlich erscheinen läßt.

Ähnlich wie nach Wachstumsfaktorstimulation wird die calciuminduzierte Erk-Aktivierung über die intrazellulären Kinasen MEK und Raf vermittelt. Sowohl nach Inkubation mit den spezifischen MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 als auch durch Expression einer dominant-negativen Raf-Mutante wurde die Aktivierung von Erk durch Calcium vollständig unterdrückt. (Abb. 4.3 und Abb. 4.4 B). Westernblot-Experimente ergaben, daß sowohl die HaCaT-Zelllinie als auch primäre NHEKs die MEK-Aktivatoren c-Raf-1 und B-Raf exprimieren (Abb. 4.4 A; Daten nicht gezeigt). Da nach Calciumbehandlung Stimulation beider Isoformen beobachtet wurde (Abb. 4.4 A), ist zur Zeit unklar, welche Isoform die Aktivierung von Erk durch extrazelluläres Calcium vermittelt. In Studien an PC12-Zellen war NGF-induzierte Differenzierung neuronaler Zellen das Resultat von B-Raf-Aktivierung (Wixler *et al.*, 1996; York *et al.*, 1998), was eine isozymspezifische Regulation von Proliferation und Differenzierung widerspiegeln könnte. Obwohl zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann, daß Raf-Isozyme in Keratinozyten unterschiedliche Aufgaben erfüllen, sprechen die ähnlichen Aktivierungskinetiken von B-Raf und c-Raf-1 eher gegen eine solche Vorstellung und lassen in Keratinozyten einen gemeinsamen Regulationsmechanismus beider Isozyme vermuten. Andererseits wiesen Mäuse, denen funktionelles c-Raf-1-Protein fehlte, Störungen in der Epidermisentwicklung auf (Wojnowski *et al.*, 1998). Dies impliziert, daß c-Raf-1 *in vivo* eine wichtige Funktion bei der Regulation von Keratinozytenwachstum-

und -differenzierung erfüllt, deren Verlust nicht durch B-Raf kompensiert werden kann. Da B-Raf-defiziente Mäuse früh in der Embryonalentwicklung, zwischen Embryonalstadium E10.5 und E12.5, sterben (Wojnowski *et al.*, 1997), ist eine keratinozytenspezifische Funktion der B-Raf-Isoform allerdings nicht ausgeschlossen. Eine neuere Studie in primären Fibroblastenlinien B-Raf-defizienter Mäuse und Fibroblasten mit defekter c-Raf-1-Funktion zeigte, daß weder B-Raf noch c-Raf-1 in Abwesenheit der jeweils anderen Isoform in der Lage waren, Erk nach EGF-Stimulation zu aktivieren (Wojnowski *et al.*, 2000). Es ist daher vorstellbar, daß bestimmte Stimuli B-Raf und c-Raf-1 nur gemeinsam, vielleicht durch Heteromerbildung, aktivieren. Verschiedene frühere Untersuchungen lieferten bereits Indizien, daß Dimerisierung bzw. Oligomerisierung bei der Aktivierung von c-Raf-1 eine Rolle spielt (Farrar *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1996). Der beobachtete Phänotyp der c-Raf-1-mutierten Mäuse könnte daher auch durch das Fehlen des c-Raf-1-Bindepartners für eine B-Raf-/c-Raf-1-Heteromerbildung erklärt werden, vorausgesetzt, daß Komplexbildung von Raf-Kinasen bei der Regulation von Keratinozytenwachstum und -differenzierung tatsächlich von Bedeutung ist. Solch eine Heteromerhypothese wäre jedoch prinzipiell im Einklang mit der beobachteten gleichzeitigen Aktivierung von B-Raf und c-Raf-1 durch Calcium.

## **5.2 Calciuminduzierte Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges erfolgt unabhängig von Ras und klassischen PKCs**

Eines der wichtigsten Resultate dieser Arbeit ist der Befund, daß Calcium Erk unabhängig von Ras-Aktivität stimulieren kann. Die Expression einer dominant-negativen Variante von Ras hatte keinen signifikant inhibierenden Einfluß auf calciuminduzierte Erk-Aktivierung (Abb. 4.6 A). Zudem resultierte Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration in HaCaT-Zellen in einer verminderten Ras-Aktivität (Abb. 4.5). Dies stimmt mit einer früheren Beobachtung von Medema *et al.* überein (Medema *et al.*, 1994). Bei den von dieser Forschergruppe in primären NHEKs durchgeführten Experimenten führte Stimulation mit extrazellulärem Calcium zwar nicht zu erhöhter Kinaseaktivität von Erk, hemmte jedoch nach Vorinkubation die EGF-vermittelte Erk-Aktivierung. Interessanterweise war dieser inhibitorische Effekt transient und erfolgte nur in einem sehr schmalen Zeitfenster nach Calciumvorbehandlung. Da bei den hier vorgestellten Experimenten Calciumstimulation einen transienten, sprunghaften Anstieg der Erk-Aktivität auslöste, der gleichzeitig mit Abnahme der GTP-Beladung des Ras-Proteins einherging, ist es vorstellbar, daß Calciumbehandlung die Zellen vorübergehend

unempfindlich für eine mitogene Stimulation über Erk macht. Damit ließe sich auch deren inhibitorischer Effekt auf EGF-vermittelte Erk-Aktivierung erklären. Es ist verlockend zu spekulieren, daß diese zeitweilige Hemmung der Ras-Aktivität vielleicht eine Art „Sicherheitsmechanismus“ darstellt, der eine sofortige zweite Welle von Erk-Aktivierung durch andere Stimuli verhindert, die die zelluläre Antwort auf das Calciumsignal negativ beeinflussen würde.

Obwohl Ras durch Calcium gehemmt wird, werden die direkten Effektoren von Ras, Raf und MEK, aktiviert. Überexpression von dominant-negativem RafC4 blockierte die calciuminduzierte Aktivierung von kotransfiziertem HA-Erk2 vollständig (Abb. 4.4 B). Da RafC4 die Ras-Bindedomäne von c-Raf-1 enthält und aufgrund der Ähnlichkeit der Effektor-domänen monomerer G-Proteine auch noch andere kleine GTPasen binden kann (Bruder *et al.*, 1992), ist dieser Befund ein starker Hinweis auf die Beteiligung eines kleinen G-Proteins an calciuminduzierter Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges. Ein potentieller Kandidat wäre die kleine GTPase Rap1. Die Effektor-domänen von Rap1 und Ras sind völlig identisch, was vermuten läßt, daß diese wohl auch ein ähnliches Spektrum an Bindepartnern besitzen (Bos, 1998 und Referenzen darin). Es gibt im PC12-Zellsystem Indizien, daß Rap1 während NGF-induzierter Differenzierung B-Raf rekrutiert und dadurch die anhaltende Stimulation von Erk auslöst, welche für die Initiation des Differenzierungsprozesses dieser Zellen benötigt wird (York *et al.*, 1998). Hinweise aus anderen Zellsystemen implizieren eine Funktion von Rap1 als Ras-Antagonist (Bos, 1998 und Referenzen darin), weshalb eine mögliche Beteiligung von Rap1 an calciuminduzierter Stimulation des Raf/MEK/Erk-Signalweges gut mit dem beobachteten inhibitorischen Einfluß von Calcium auf Ras-Aktivität vereinbar wäre. Da von Rap1 bekannt ist, daß es durch calciumabhängige GEFs aktiviert werden kann (Kawasaki *et al.*, 1998), könnte die beobachtete Abhängigkeit calciuminduzierter Erk-Aktivierung von der intrazellulären Calciumkonzentration mechanistisch durch die Rekrutierung eines calciumbindenden GEFs erklärt werden. In präliminären Experimenten wurde eine frühe Aktivierung von Rap1 während calciuminduzierter Differenzierung von HaCaTs-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ob Rap1 tatsächlich der gesuchte Aktivator der Raf/MEK/Erk-Kaskade durch extrazelluläres Calcium ist, könnte durch Kotransfektionsexperimente von Komponenten dieses Signalweges mit dominant-negativem Rap1 bzw. einer konstitutiv aktiven Rap1-Variante geklärt werden.

Eine Gruppe von Kinasen, die zunächst als die wahrscheinlichsten Mediatoren der calciuminduzierten Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges galten, die klassischen

PKCs, scheinen nach den Ergebnissen der PKC-Inhibitorexperimente hierfür eher keine entscheidende Rolle zu spielen. Mit keinem der verwendeten PKC-Inhibitoren wurde eine signifikante Reduktion calciuminduzierter Erk-Aktivierung beobachtet (Abb. 4.7 C). Da in Parallelexperimenten die Wirksamkeit der Inhibitoren auf PKC-vermittelte Effekte überprüft wurde, ist es auch sehr unwahrscheinlich, daß die verwendeten Inhibitorkonzentrationen für eine effektive PKC-Hemmung nicht ausreichend waren, zumal drei verschiedene Inhibitoren eingesetzt wurden.

Neuerdings wird eine Rolle eines Mitgliedes der „neuen“ PKC-Subfamilie, PKC $\eta$ , bei Keratinozytendifferenzierung diskutiert (Cabodi *et al.*, 2000; Ohba *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998). Die Wirkung der hier verwendeten Inhibitoren auf PKC $\eta$ -Aktivität ist nicht bekannt. Dennoch erscheint eine Beteiligung dieser Isoform an der calciuminduzierten Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges fraglich, da PKC $\eta$ -Expression erst im Laufe des Differenzierungsprozesses induziert wird (Denning *et al.*, 1995) und PKC $\eta$  kein Calcium zur maximalen Aktivierung benötigt (Newton, 1997). Eine PKC $\eta$ -vermittelte Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges würde daher keine direkte Erklärung für die beobachtete Abhängigkeit der calciuminduzierten Erk-Aktivierung von der intrazellulären Calciumkonzentration liefern.

### **5.3 Mögliche Mechanismen der Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges durch extrazelluläres Calcium**

Obwohl „klassische“ PKCs offenbar nicht an der calciuminduzierten Erk-Aktivierung beteiligt sind, spricht die Abhängigkeit der Erk-Stimulation von dem zytoplasmatischen Calciumspiegel (vergleiche Abb. 4.7 A, B) für einen Aktivierungsmechanismus, der durch Erhöhung der freien Calciumionenkonzentration in der Zelle eingeleitet wird. Übereinstimmend mit unserer Beobachtung, daß Erk-Aktivierung durch extrazelluläres Calcium von Raf-Isoformen vermittelt wird, wurde in einer früheren Studie berichtet, daß in murinen 3T3-Fibroblasten durch Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels Raf-abhängige Aktivierung von Erk ausgelöst wird (Chao *et al.*, 1994). Die Klonierung eines Calciumrezeptors in murinen und humanen Keratinozyten (Bikle *et al.*, 1996; Oda *et al.*, 2000), der für die Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Stimulation mit extrazellulärem Calcium verantwortlich zu sein scheint (Oda *et al.*, 2000), impliziert eine Rolle dieses Rezeptors für die calciuminduzierte Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine Studie in Rat1-Fibroblasten, in

denen Erk-Aktivierung durch extrazelluläres Calcium von einem Homolog dieses Rezeptors vermittelt wurde, wenngleich der genaue Aktivierungsmechanismus nicht näher untersucht wurde (McNeil *et al.*, 1998). Erste Experimente mit einem Inhibitor für PLC, die der hauptsächliche Effektor dieses Calciumrezeptors zu sein scheint, ergaben zwar eine hemmende Wirkung dieser Verbindung auf die calciumvermittelte Erk-Aktivierung, doch wurde in diesen Versuchen auch eine unspezifische Hemmung der EGF-induzierten Erk-Aktivierung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Frage, ob PLC-Isoformen und der beschriebene Calciumrezeptor bei der Aktivierung von Erk durch extrazelluläres Calcium eine Rolle spielen, muß daher vorerst unbeantwortet bleiben.

Unabhängig von der Fragestellung, welche Komponenten die Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration nach Calciumstimulation bewirken, ist bislang noch völlig offen, durch welchen Mechanismus ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel die Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges auslöst. Eigene präliminäre Daten ergaben eine Sensitivität der calciuminduzierten Erk-Aktivität auf den spezifischen Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K-) Inhibitor Wortmannin (Daten nicht gezeigt). PI3K wird durch die Signalwirkung verschiedener Moleküle aktiviert (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). Dazu gehören unter anderem Tyrosinkinase und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten trimärer G-Proteine, zu denen auch der erwähnte Calciumrezeptor zählt. Nach Stimulation ihrer enzymatischen Aktivität phosphoryliert PI3K bestimmte membranständige Phospholipide, Phosphoinositole, an der 3'-Position ihres Inositolringes. Dadurch entstehen verschiedene 3'-Phosphoinositide, die als membranlokalisierte Botenstoffe dienen und nicht durch PLC metabolisiert werden können (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). 3'-Phosphoinositole werden in vielen Fällen von Proteinen mit Pleckstrin-Homologiedomänen (PH-Domänen; Shaw, 1996) gebunden und tragen durch einen noch nicht geklärten Mechanismus zur funktionellen Aktivierung dieser Proteine bei (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). Zu den mehr als 100 bekannten Proteinen mit PH-Domänen gehören neben Kinasen, Phospholipasen und Adapterproteinen auch viele GEFs für kleine GTPasen, so daß, wie bereits in Abschnitt 5.2 angedeutet, ein calciumbindendes GEF durch Stimulation einer kleinen GTPase an der Aktivierung der Raf/MEK/Erk-Kaskade beteiligt sein könnte. Alternativ könnten andere calciumaktivierte Signalmoleküle mit Phosphatidylinositol-bindenden Proteindomänen die Stimulation des Raf/MEK/Erk-Signalweges durch Calcium vermitteln. Obwohl eine mögliche Verbindung von PI3K-abhängigen Signalwegen mit Ras-unabhängiger Erk-Aktivierung in Keratinozyten bislang lediglich auf Inhibitoraten beruht, beweist eine

neuere Studie in CHO- (chinese hamster ovary-) Zellen, daß Aktivierung bestimmter PI3K-Isoformen prinzipiell eine Ras-unabhängige Erk-Aktivierung auslösen kann (Takeda *et al.*, 1999). In diesem Zellsystem führte Stimulation mit Lysophosphatidylsäure (lysophosphatidic acid, LPA) zu einer Ras-unabhängigen Aktivierung von MEK und Erk, die durch PI3K $\gamma$  und nachfolgende Aktivierung von PKC $\zeta$  vermittelt wurde. Eine gemeinsame Beteiligung calcium- und PI3K-abhängiger Signalwege an der calciuminduzierten Aktivierung der Raf/MEK/Erk-Kaskade, möglicherweise durch die integrative Wirkung eines calciumbindenden Proteins mit PH-Domäne vermittelt, wäre daher denkbar.

#### **5.4 Funktion der calciuminduzierten Stimulation des Raf/MEK/Erk-Signalweges für die Initiation der Keratinozytendifferenzierung**

Ein früher Schritt im Differenzierungsprozess von Keratinozyten ist Zellzyklusarrest. Die Beobachtung, daß calciuminduzierte Expression des zyklinabhängigen Kinaseinhibitors p21/Cip1 sensitiv auf MEK-Inhibition reagierte (Abb. 4.8), liefert einen ersten Hinweis, daß der Raf/MEK/Erk-Signalweg bei Keratinozyten eine wichtige Rolle für das initiale Umschalten von Proliferation auf Differenzierung spielt. Ob Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges der tatsächliche Auslöser für den calciuminduzierten Zellzyklusarrest ist, kann abschließend erst nach zusätzlichen Experimenten entschieden werden. Jedoch würde solch eine Vorstellung durch Befunde aus anderen Zellsystemen unterstützt werden, die diesen Signalweg bereits seit längerer Zeit mit Zellzyklusregulation in Verbindung brachten (zusammengefaßt in Kerkhoff and Rapp, 1998). Da TGF- $\beta$ -vermittelte Expression von p21/Cip1 in HaCaTs ebenfalls von MEK-Aktivierung abhängig ist (Hu *et al.*, 1999), könnte die Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweges einen gemeinsamen Mechanismus darstellen, durch den verschiedene Stimuli in Keratinozyten Zellzyklusarrest auslösen.

Calciuminduzierte Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin reagierte ebenfalls sensitiv auf MEK-Inhibition (Abb. 4.9 B) Dies impliziert, daß die Aktivierung der Raf/MEK/Erk-Kaskade direkt oder indirekt differenzierungsspezifische Genexpression beeinflusst. Die Aktivierung von Erk allein reicht jedoch offensichtlich nicht aus, die Synthese von Involucrin zu induzieren, da die Stimulation mit EGF nicht in erhöhter Involucrinexpression primärer NHEKs resultierte (Abb. 4.9 C). Obwohl die unterschiedliche Kinetik der Erk-Aktivierung durch Calcium und EGF (Abb. 4.2 A) die unterschiedliche Wirkung beider Stimuli auf Involucrinexpression erklären könnte,

erscheint ein Modell einleuchtender, in dem Calciumstimulation die gleichzeitige Aktivierung mehrerer Signalwege bewirkt, die im Zusammenspiel mit der Raf/MEK/Erk-Kaskade die Initiation des keratinozytären Differenzierungsprogramms einleiten.

Ein frühes Ereignis während calciuminduzierter Differenzierung ist die verstärkte Aktivität von Tyrosinkinase (Filvaroff *et al.*, 1990). Wenigstens einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase, Fyn, wird eine wichtige Rolle im Differenzierungsprozeß von Keratinozyten zugeschrieben. So wurde nach Calciumstimulation muriner Keratinozyten eine erhöhte Kinaseaktivität von Fyn beobachtet und Fyn-defiziente Keratinozyten zeigten nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration eine verringerte Induktion von Differenzierungsmarkern (Calautti *et al.*, 1995). Nach einem neueren Bericht von Cabodi *et al.* erfolgt Fyn-Aktivierung über einen PKC- $\eta$ -abhängigen Signalweg (Cabodi *et al.*, 2000). In den Experimenten dieser Autoren resultierte adenovirusvermittelte Überexpression von wildtypischer oder konstitutiv-aktiver Fyn-Kinase in verminderter DNA-Synthese und erhöhter Transglutaminase-1-Aktivität, obgleich die Expression anderer Differenzierungsmarker wie Involucrin davon unbeeinflusst blieb. Auch die Tyrosinphosphorylierung eines Proteins von etwa 60 kDa, p62, das mit dem Ras-GTPase-aktivierenden Protein (Ras GTPase activating protein, RasGAP) kolokalisiert, hat viel Aufmerksamkeit erregt, da es sowohl nach Calciumbehandlung muriner Keratinozyten (Filvaroff *et al.*, 1992) als auch nach Zerstörung integrinvermittelter Zell-Matrix Interaktionen an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Sharma *et al.*, 1997). Verminderte Oberflächenexpression von Integrinen und Verlust der Bindungsfähigkeit an die extrazelluläre Matrix gehören zu den ersten Veränderungen, die während des Differenzierungsvorganges von Keratinozyten *in vivo* auftreten (Adams and Watt, 1990). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß p62-Phosphorylierung nach Calciumstimulation dasselbe Signal vortäuscht, welches *in vivo* durch Integrinverlust generiert wird. p62-Phosphorylierung trat bereits 5 min nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf und wurde nicht nach EGF-Stimulation beobachtet (Filvaroff *et al.*, 1992). Interessanterweise war die calciuminduzierte Phosphorylierung von p62 mit Translokation von RasGAP an die Plasmamembran verbunden. Da RasGAPs die Umwandlung von GTP-beladenem, aktivem Ras in seine inaktive, GDP-beladene Form katalysieren, könnte Translokation von RasGAP an die Zytoplasmamembran vielleicht die beobachtete Hemmung der Ras-Aktivität nach Calciumstimulation erklären. Jedoch ist gegenwärtig unklar, ob die Translokation von RasGAP ausreicht, seine Enzymfunktion zu aktivieren. Die für p62-Phosphorylierung verantwortliche Tyrosinkinase wurde bislang

noch nicht isoliert, doch scheint gesichert, daß Fyn daran nicht beteiligt ist, da Aktivierung von Fyn erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Calciumstimulation erfolgt (Calautti *et al.*, 1995).

Insgesamt belegen die hier vorgestellten Daten, daß der Raf/MEK/Erk-Signalweg eine fundamentale Rolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten spielt, wenngleich auch die Stimulation zusätzlicher Signalwege einen bedeutenden Einfluß auf die zelluläre Antwort nach dessen Aktivierung haben dürfte.

### **5.5 Differenzierungsspezifische Expression der beiden S100-Proteine MRP8 und MRP14 in Keratinozyten**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob die beiden S100-Proteine MRP8 und MRP14 in Keratinozyten differenzierungsabhängig exprimiert werden.

Die Induktion von MRP8/MRP14-Expression nach Calciumstimulation primärer NHEKs und der HaCaT-Zelllinie (Abb. 4.10 und 4.12) spricht klar für eine differenzierungsspezifische Regulation beider Proteine *in vitro*. Da MRP8/MRP14-Heteromere nach Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration sowohl in Monozyten (Roth *et al.*, 1993) als auch in Epithelzellen (Goebeler *et al.*, 1995) an Intermediärfilamente translozieren, lag die Vermutung nahe, daß MRP8 und MRP14 eine regulatorische Funktion bei Reorganisationsereignissen des Zytoskelettes während der Differenzierung von Keratinozyten ausüben. In HaCaTs waren erst drei Tage nach Inkubation mit 1.0 mM Calcium erste MRP8/MRP14-Komplexe nachweisbar, während HaCaT-Zellen in niedrig-Calcium Medium auch bei Konfluenz keine detektierbare MRP8/MRP14-Expression zeigten (Abb. 4.10 und Daten nicht gezeigt). Da in diesen Zellen erste Veränderungen des Keratinzytoskeletts bereits 12 h nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auftraten (Abb. 4.1 A), kann eine Funktion von MRP8/MRP14-Komplexen bei der Regulation initialer Umlagerungen des Intermediärfilament-Zytoskelettes während des Differenzierungsprozesses ausgeschlossen werden. Auch das überwiegende Fehlen von MRP8- und MRP14-mRNA in Normalhaut (Abb. 4.13) und die zytoplasmatische Lokalisation von MRP8/MRP14 Komplexen nach Calciuminduktion *in vitro* (Abb. 4.11) spricht dagegen. Insgesamt suggerieren die *in situ*-Daten an Proben gesunder Haut eher eine spezifische Funktion von MRP8 und MRP14 im Haarfollikel (Abb. 4.14), obwohl bisweilen in interfollikulärer Epidermis lokal schwache Expression von MRP8/MRP14 in suprabasalen Schichten des Epithels nachweisbar war (Abb. 4.13). Warum in diesen Bereichen Expression von MRP8 und MRP14 auftrat, ist

nicht klar. Neuesten Untersuchungen zufolge werden MRP8 und MRP14 auch bei Wundheilungsvorgängen in der Epidermis stark induziert (S. Werner, persönliche Mitteilung), so daß vielleicht histologisch unauffällige Mikrotraumata für die beobachtete Expression verantwortlich sein könnten. Sowohl während der Wundheilung als auch in bestimmten Phasen des Haarzyklus laufen Proliferations- und Differenzierungsvorgänge mit wesentlich höheren Umsatzraten ab als in normaler Epidermis. In beiden Fällen werden neben den üblichen Differenzierungsmarkern auch epidermale Aktivierungsmarker wie Keratin 6 und Keratin 16 exprimiert, die sonst nur bei hyperproliferativen und entzündlichen Hautkrankheiten auftreten (Tomic-Canic *et al.*, 1998). Die starke Expression von MRP8/MRP14 unter Bedingungen, bei denen auch Keratin 6 exprimiert wird, ist auffällig. Wenngleich im Haarfollikel keine Kolokalisation von MRP8/MRP14 mit Keratin 6 festzustellen war (Abb. 4.14), spricht das gemeinsame Auftreten der Proteine in den oben genannten Fällen dafür, daß MRP8 und MRP14 möglicherweise besonders stark in Situationen exprimiert werden, bei denen es entweder natürlicherweise, wie bei Wundheilung und im Haarfollikel, oder pathologisch wie bei hyperproliferativen Hauterkrankungen, zu beschleunigten Differenzierungsprozessen kommt. Die Koexpression von MRP8/MRP14 und K6 in augenscheinlich „normalen“ Epidermisabschnitten in der Nähe von Basalzellkarzinomen (Abb. 4.17) könnte, ebenso wie deren Induktion im Rahmen entzündlicher Hauterkrankungen (Abb. 4.15), alternativ auch auf eine Funktion von MRP8/MRP14 bei Epithelaktivierungsprozessen zurückgeführt werden.

Wenn auch über die genaue Rolle von MRP8/MRP14 in Keratinozyten nur gemutmaßt werden kann, suggerieren doch das vorwiegend suprabasale Expressionsmuster von MRP8/MRP14 in psoriatischer Epidermis (Abb. 4.15) und ihre Kolokalisation mit Differenzierungsmarkern im Haarfollikel (Abb. 4.14) wie auch in Basaliomen benachbarten Epidermisabschnitten (Abb. 4.17), daß beide S100-Proteine ihre Funktion ausschließlich in differenzierenden Zellen ausüben. Gegen eine Aufgabe in basalen Keratinozyten sprechen auch die fehlende MRP8/MRP14-mRNA-Expression im Tumorgewebe von Basalzellkarzinomen (Abb. 4.17) sowie die Korrelation ihrer Expressionsstärke mit dem Differenzierungsgrad von Plattenepithelkarzinomen (Abb. 4.16). Da MRP8/MRP14 in gesunder interfollikulärer Epidermis für den Differenzierungsprozess entbehrlich zu sein scheint, bleibt eine Aufgabe von MRP8/MRP14 bei Keratinozytendifferenzierung vorerst Spekulation.

## 5.6 Induktion von MRP8/MRP14 durch IL-6

Die starke suprabasale Expression von MRP8/MRP14 in unmittelbarer Nähe von Basalzellkarzinomen und die abnehmende Expressionsstärke beider Proteine bei zunehmender Entfernung vom Tumorgewebe ist ein Hinweis darauf, daß MRP8/MRP14-Synthese *in vivo* durch Freisetzung eines löslichen Faktors induziert wird. Übereinstimmend mit der fehlenden Expression von MRP8/MRP14 in nichtdifferenzierten Zellen hatte Inkubation primärer NHEK-Zellen mit proliferationsfördernden Zytokinen wie EGF und TGF- $\alpha$  keinerlei stimulierenden Effekt auf MRP8/MRP14-Synthese zur Folge (Abb. 4.18 A). Auch TGF- $\beta$ 1-Stimulation, welche zu reversiblen Zellzyklusarrest in Keratinozyten führt, resultierte nicht in erhöhter MRP8/MRP14-Expression, was eine Induktion von MRP8/MRP14-Synthese alleine durch Proliferationshemmung ausschließt. Einen interessanten Hinweis auf möglicherweise physiologisch relevante Signalwege und Faktoren für Regulation der MRP8/MRP14-Expression liefert der Befund, daß IL-6 in Zellkultur in der Lage ist, die Synthese beider S100-Proteine zu stimulieren (Abb. 4.18 A, B). Als mögliche Mediatoren dieses Effektes kommen die Transkriptionsfaktoren STAT1 (signal transducer and activator of transcription) und STAT3 in Frage. Beide Faktoren werden außer von IL-6 auch von einer Reihe weiterer signalverwandter Mediatoren wie Oncostatin M (OsM), IL-11 oder dem Leukämie-inhibierenden Faktor (leukemia-inhibiting factor, LIF) aktiviert, denen die Rekrutierung derselben signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit, gp130, gemeinsam ist (Heinrich *et al.*, 1998). Interessanterweise wurde eine Aktivierung von STAT3 während suspensionsinduzierter Differenzierung muriner Keratinozyten beobachtet (Hauser *et al.*, 1998). Dies wirft die Frage auf, ob STAT3 nicht vielleicht auch während calciuminduzierter Differenzierung von Keratinozyten aktiviert wird, zumal bekannt ist, daß STAT3-Aktivität durch MAPK-vermittelte Serinphosphorylierung moduliert werden kann (Decker and Kovarik, 2000). Diese Fragestellung könnte in Zukunft mit Hilfe aktivierungsspezifischer Antikörpern gegen phosphoryliertes STAT3 untersucht werden. Phosphospezifische Antikörper könnten auch zur immunhistochemischen Untersuchung des Aktivierungszustandes von STAT1 und STAT3 in Hautschnitten gesunder Haut, hyperproliferativer Dermatosen (Psoriasis) und epithelialer Tumoren (v. a. Basalzellkarzinomen) herangezogen werden und vielleicht eine bestimmtere Aussage über den Zusammenhang zwischen MRP8/MRP14-Expression und der Aktivierung von STAT1 und STAT3 erlauben. Zur definitiven Klärung dieser Frage wäre es jedoch nötig, den Effekt konstitutiv-aktiver und

dominant-negativer STAT1- und STAT3-Konstrukte auf MRP-Expression direkt, z. B. mittels MRP-Promotor Reporter-Gen-Assays, zu analysieren.

Unabhängig von der Rolle der putativen Effektoren STAT1 und STAT3 gilt es die physiologische Relevanz von IL-6 selbst für die *in vivo* Induktion von MRP8/MRP14 zu überprüfen. Bei Vergleich der Expression von IL-6 und MRP8/MRP14 durch *in situ*-Hybridisierungen konnte in MRP8/MRP14-positiven Abschnitten sowohl in psoriatischer Haut als auch beim Basaliom. IL-6-mRNA-Produktion durch infiltrierende Immunzellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). IL-6-Transkripte waren allerdings nur lokal detektierbar und die Signale zu schwach, um die starke Expression von MRP8/MRP14 vor allem in psoriatischer Epidermis erklären zu können. Wie oben ausgeführt, benutzen eine Reihe weiterer Zytokine die für die Vermittlung von IL-6-Effekten verantwortliche gp130-Rezeptoruntereinheit. Stimulation mit diesen sogenannten IL-6-Typ-Zytokinen löst daher intrazellulär die Aktivierung derselben Signalwege wie IL-6 aus und ruft ähnliche physiologische Antworten hervor. Zur Klärung der physiologischen Relevanz des IL-6-Befundes ist es daher nötig, zukünftig auch IL-6-ähnliche Faktoren wie OsM und LIF sowie die jeweiligen gp130-assoziierten Rezeptoren in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

## 5.7 Regulation der MRP8/MRP14-Funktion

Die Regulation der biologischen Funktion von MRP8 und MRP14 könnte auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Zum einen sind MRP8 und MRP14 in der Lage, unterschiedliche homo- und heteromere Komplexe auszubilden. Als gereinigte rekombinante Proteine bildeten MRP8 und MRP14 sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Calcium stabile Heterodimere aus (Hunter and Chazin, 1998). Heterodimere waren auch bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen beider Proteine die bevorzugt gebildete Komplexart und dürften daher auch *in vivo* vorherrschen. In Abwesenheit ihres Bindepartners konnten aber auch Monomere und Homodimere von MRP8 und MRP14, sowie, im Falle von MRP8, in geringem Maße Oligomere höherer Organisation nachgewiesen werden (Hunter and Chazin, 1998). Jedes Protein könnte daher auch für sich eine spezifische Aufgabe erfüllen. Aufgrund der generellen Koexpression von MRP8 und MRP14 bei allen hier *in situ* untersuchten Hautproben, wie auch der Koinduktion von MRP8- und MRP14-Expression durch Calcium in Zellkultur, erscheint eine Funktion monomerer oder homodimerer MRP-Proteine in Keratinozyten jedoch

fraglich. Bei parallelen Färbungen mit entweder einem MRP14-spezifischen Antiserum oder dem MRP8/MRP14-komplexspezifischen 27E10-Antikörper war nach Calciumstimulation kein Hinweis auf eine unterschiedliche Syntheserate oder veränderte Lokalisation des MRP14-Proteins im Vergleich zu MRP8/MRP14-Komplexen zu erkennen (nicht gezeigt), was ebenfalls gegen eine Existenz von MRP14-Monomeren oder -homodimeren in Keratinozyten spricht.

Der zweite Regulationsmechanismus der biologischen Funktion von MRP8 und MRP14 scheint Calciumbindung sein. Sowohl MRP8 als auch MRP14 besitzen zwei calciumbindende EF-Hand Motive (Kerkhoff *et al.*, 1998), so daß die intrazelluläre Calciumkonzentration die Bindungsfähigkeit von MRP8/MRP14-Komplexen an Zielproteine stark beeinflussen könnte. Sowohl in HaCaT-Zellen als auch in primären NHEKs waren die nach calciumvermittelter Expressionsinduktion gebildeten MRP8/MRP14-Proteinkomplexe zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 4.11., 4.18 B). Es wurde berichtet, daß in Keratinozyten der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit extrazellulärem Calcium einen biphasischen Verlauf nimmt (Kruszewski *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995). Dieser ist charakterisiert durch einen frühen, sprunghaften Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der rasch abfällt und nach einem zweiten geringeren Anstieg ein über mehrere Tage anhaltendes Plateau vom 2-3fachen des Basalniveaus erreicht (Kruszewski *et al.*, 1991). Obgleich in unseren Experimenten der intrazelluläre Calciumgehalt nicht ermittelt wurde, ist doch anzunehmen, daß zum Beobachtungszeitpunkt der zytoplasmatische Calciumspiegel gleichermaßen erhöht war. Dementsprechend scheint eine moderat erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration keine Änderung der zytoplasmatischen Lokalisation von MRP8/MRP14-Komplexen zu bewirken. Stimulation mit dem Calciumionophor A23187 dagegen resultierte in Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an Intermediärfilamente (Abb. 4.11), was darauf hindeutet, daß MRP8/MRP14-Heteromere durch sprungartige Erhöhung des zytoplasmatischen Calciumspiegels ihre biologische Funktion ändern. In Monozyten konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von Calcium die Komplexbildung von MRP8 und MRP14 beeinflusst (Teigelkamp *et al.*, 1991). Neben MRP8/MRP14-Dimeren wurden in diesen Zellen in Abhängigkeit von Calcium in verstärktem Maße auch höhermolekulare  $(\text{MRP8})_2(\text{MRP14})$ -Trimere und  $(\text{MRP8})_2(\text{MRP14})_2$ -Tetramere gebildet. Calciumabhängige Heteromerbildung würde ein flexibles Reagieren auf unterschiedliche intrazelluläre Calciumkonzentrationen ermöglichen, und wäre eine plausible Erklärung für die beobachtete Translokation der

MRP8/MRP14-Komplexe nach Stimulation mit dem Calciumionophor A23187. Hinter dieser Hypothese muß dennoch ein Fragezeichen stehen, da die oben erwähnten *in vitro*-Versuche mit gereinigten MRP-Proteinen in An- und Abwesenheit von Calcium das Vorherrschen von MRP8/MRP14-Heterodimeren postulieren (Hunter and Chazin, 1998). Die Diskrepanz zwischen den *in vivo* und *in vitro* Versuchen könnte vielleicht durch die Existenz eines weiteren Regulationsmechanismus wie Phosphorylierung von MRP14 erklärt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, daß in Monozyten Translokation von MRP8/MRP14 an Keratinfilamente mit Phosphorylierung von MRP14 an Threoninrest 113 korrelierte (Edgeworth *et al.*, 1989; van den Bos *et al.*, 1996). Obwohl in diesem Fall nicht bestimmt wurde, welche Komplexe in den einzelnen Zellkompartimenten vorhanden waren, wurde doch berichtet, daß durch Phosphorylierung von MRP14 dessen Bindungsfähigkeit für Calcium erhöht wurde (van den Bos *et al.*, 1996). Wie bereits erwähnt, stellt Threonin 113 ein Sequenzmotiv für MAPK-Phosphorylierung dar. MRP14 kann auch als *in vitro*-Substrat für Phosphorylierung durch die MAPK Erk, Jnk und p38 dienen (S. Ludwig, unpublizierte Daten). Arsenitbehandlung, die zur Aktivierung der MAPK Jnk und p38 führt, resultierte in HaCaTs in einer ähnlichen Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen an Zytoskelettstrukturen wie A23187-Stimulation (Abb. 4.19), auch wenn dies nicht mit der gleichen Effektivität geschah. Diese Beobachtung wäre gut mit einer Hypothese vereinbar, nach der Phosphorylierung die Calciumbindungsfähigkeit der MRP8/MRP14-Komplexe erhöht, so daß diese auch ohne einen sprunghaften Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration ihre intrazelluläre Lokalisation ändern. Erste Versuche mit gereinigter p38 und rekombinant exprimierten MRP-Proteinen ergaben, daß MRP14 nur in Abwesenheit seines Komplexpartners MRP8 effektiv phosphoryliert werden kann, der hemmende Effekt von MRP8 jedoch mit steigender Konzentration von Calcium aufgehoben wird (S. Ludwig, unpublizierte Daten). Calciumbindung scheint also ihrerseits erst die Phosphorylierung von MRP8/MRP14-Komplexen zu ermöglichen. Es wäre daher vorstellbar, daß im Falle von A23187 sprunghafte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Phosphorylierung von MRP8/MRP14-Komplexen durch endogene MAPK-Aktivität erleichtert. Eine Schlußfolgerung daraus wäre, daß Phosphorylierung von MRP14 der eigentliche Auslöser für die beobachtete Translokation der MRP8/14-Komplexe ist. Diese Frage könnte durch Kotransfektionsexperimente von MRP8 mit MRP14-Konstrukten entschieden werden, bei denen die MAPK-Phosphorylierungsstelle mutiert wurde.

Zusammengenommen spricht alles dafür, daß alle drei genannten Regulationsmechanismen (Komplexbildung, Calciumbindung und Phosphorylierung durch MAPK) sich gegenseitig beeinflussen und gemeinsam die biologische Funktion von MRP8 und MRP14 bestimmen. Sowohl die Lokalisierungsdaten als auch die Abhängigkeit der MRP14-Phosphorylierung von Komplexbildung und Calciumbindung belegen, daß MRP8/MRP14-Heteromere Konvergenzpunkte calcium- und MAPK-abhängiger Signalwege sind. Die Aufklärung der Funktion von MRP8 und MRP14 und deren Regulation durch MAPK könnte daher in Zukunft entscheidend zum Verständnis beitragen, wie MAPK zelluläre Prozesse steuern und auf welche Weise sie mit anderen Signalwegen interagieren.

## 5.8 Ausblick

Obwohl die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente klar demonstrieren, daß der Raf/MEK/Erk-Signalweg eine bedeutende Funktion im keratinozytären Differenzierungsprozeß ausübt, ist noch unklar, wie genau dessen Aktivierung das Gleichgewicht von Wachstum und Differenzierung dieser Zellen beeinflusst. Dies könnte in Zukunft durch stabile Expression konstitutiv-aktiver Komponenten dieses Signalweges weiter analysiert werden. Um zwischen konstitutiver und transientser Aktivierung wechseln zu können, wäre ein induzierbares System wie etwa ein Tetrazyklin-regulierbares Expressionssystem von Vorteil (Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). Alternativ könnten konstitutiv-aktive Kinasen als Fusionsproteine mit einem mutierten Östrogenrezeptor (estrogen receptor, ER<sup>TM</sup>) stabil exprimiert werden. Bei diesen Fusionsproteinen kann die enzymatische Aktivität der Kinasen direkt durch Zusatz des Östrogenhormon-Analogons 4-Hydroxytamoxifen (OHT) reguliert werden, was den Vorteil einer wesentlich schnelleren Aktivitätsinduktion der betreffenden Kinase hat (Littlewood *et al.*, 1995). Im Rahmen dieser Dissertation wurde bereits ein retrovirales Fusionskonstrukt der katalytischen Domäne von c-Raf-1 mit einem ER-tag (Raf-BxB-ER) (Kerkhoff and Rapp, 1997) stabil in HaCaTs eingebracht. Allerdings konnte trotz der stabilen Integration in keinem der erhaltenen Klone Expression des BxB-ER-Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch andere stabil integrierte Genkonstrukte in diesem Vektorkonstrukt wurden nicht exprimiert (nicht gezeigt), so daß in Zukunft auf neuere, verbesserte retrovirale Vektoren mit anderen Promotoren zurückgegriffen werden sollte.

Die Rolle der Raf/MEK/Erk-Kaskade bei Keratinozytendifferenzierung könnte auch in Mäusen mit Hilfe transgen exprimierter, induzierbarer Komponenten dieses Signalweges untersucht werden. Es wurden mehrere Promotoren beschrieben, die die Expression eines Transgens auf basale bzw. suprabasale Keratinozyten beschränken. So wurde durch Verwendung eines Loricrin-Promotors transgene Expression des Transkriptionsfaktors c-Myc erfolgreich ausschließlich in suprabasalen Schichten der murinen Epidermis erreicht (Pelengaris *et al.*, 1999), während Expression mutierter Varianten des nukleären Faktors  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) unter Kontrolle des Keratin 14-Promotors eine überwiegende Lokalisation der Transgene in basalen Keratinozyten zur Folge hatte (Seitz *et al.*, 1998). Durch Verfügbarkeit von Mäusen mit defizienter c-Raf-1-Funktion (Wojnowski *et al.*, 1998), wären auch „rescue“-Experimente mit epidermal exprimierten c-Raf-1-Konstrukten denkbar.

Noch gilt es auch zu klären, durch welchen molekularen Mechanismus extrazelluläres Calcium die Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalweg auslöst. Die Rolle des jüngst klonierten Calciumrezeptors und seiner untergeordneten Signalwege auf calciuminduzierte Erk-Aktivierung könnte durch transiente Kotransfektionsexperimente von HA-Erk2 und dominant-negativen Komponenten dieses Signalweges näher bestimmt werden. Da von der funktionellen, längeren Variante des Rezeptors Knockout-Mäuse vorliegen (Oda *et al.*, 2000), könnten die Versuche auch mit Calciumrezeptor-defizienten Keratinozyten durchgeführt werden. Die Beteiligung von Rap1 und PI3K könnte gleichermaßen durch transiente Transfektionsexperimente mit dominant-negativen Varianten dieser Signalmoleküle überprüft werden. Gleichzeitig wäre es nötig, die spezifische Aktivierung von PI3K und Rap1 durch extrazelluläres Calcium zu verifizieren.

Um zukünftig entscheiden zu können, ob Phosphorylierung von MRP14 an seiner MAPK-Phosphorylierungsstelle ausreicht, die Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen auszulösen, könnte man sich MRP14-Konstrukten bedienen, bei denen die MAPK-Phosphorylierungsstelle von MRP14 an Threoninrest (T) 113 mutagenisiert wurde. MRP14-Punktmutationskonstrukte, bei denen T113 entweder durch Alanin (A; nicht phosphorylierbar) bzw. Glutaminsäure (E; bringt eine negative Ladung ein und täuscht damit Phosphorylierung vor) ausgetauscht wurde, wurden bereits im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt. Mit Hilfe der T113A-Mutante könnte beispielsweise überprüft werden, ob A23187-vermittelte Translokation der MRP8/MRP14 T113A-Komplexe noch stattfinden kann. Alternativ würde eine konstitutive Keratinlokalisierung der putativ „aktivierten“ MRP8/MRP14-T113E-Komplexe für eine alleinige Lokalisationskontrolle

von MRP-Heteromeren durch Phosphorylierung sprechen. Nach rekombinanter Expression könnte auch die Komplexbildung der gereinigten Proteine in An- und Abwesenheit von Calcium durch biophysikalische Meßverfahren wie MALDI-Analyse (matrix-assisted laser desorption/ionisation) untersucht werden.

Obwohl *in vitro* MRP14 sowohl von Erk als auch den stressaktivierten MAPK Jnk und p38 phosphoryliert werden kann, deutet die Translokation der MRP8/MRP14-Komplexe nach Arsenitstimulation auf eine Funktion von Jnk bzw. p38 *in vivo* hin. Die Beteiligung dieser beiden Signalwege an arsenitvermittelter Translokation von MRP8/MRP14-Komplexen könnte sowohl durch Einsatz spezifischer p38-Inhibitoren als auch durch Expression dominant-negativer Komponenten beider Signalwege in Doppelfärbungen für MRP8/MRP14-Heteromere und die jeweiligen koexprimierten Kinasen analysiert werden. Da einerseits die Transfektionsrate von Keratinozyten besonders in Medium mit hoher Calciumkonzentration relativ gering ist (nicht gezeigt) und nach Calciumstimulation nie alle Zellen MRP8/MRP14-Expression induzieren, ist jedoch nur eine geringe Überlappung der endogen exprimierten MRP8/MRP14-Proteine und der transient transfizierten Kinasen zu erwarten. Es wäre daher vermutlich aussichtsreicher, durch Kotransfektion sowohl Wildtyp-MRP8 und -MRP14 als auch die jeweils dominant-negativen Mutanten der beiden Signalwege gemeinsam zu exprimieren und die Lokalisation der MRP8/MRP14-Komplexe nach Arsenitstimulation in hoch- und niedrig-Calcium Medium zu bestimmen. Alternativ könnte der Effekt konstitutiv-aktiver Varianten des Jnk- und p38-Signalweges auf die Lokalisation kotransfizierter MRP8/MRP14-Proteine in niedrig- und hoch-Calcium Medium untersucht werden.

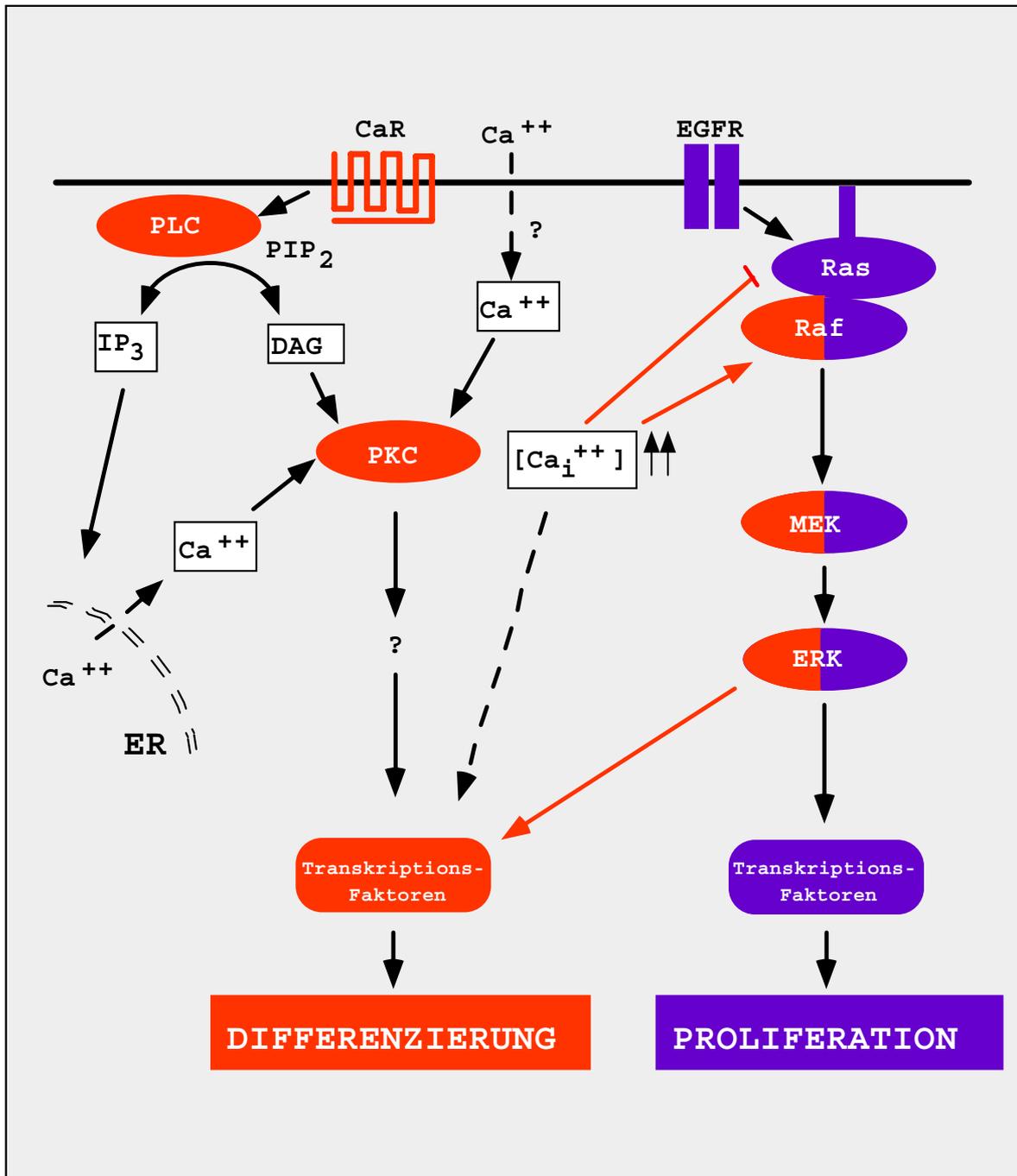
Große Unklarheit besteht derzeit noch darüber, welche Faktoren *in vivo* die hohe Expression von MRP8 und MRP14 bei den verschiedenen Hautkrankheiten auslösen. Die beobachtete *in-vitro*-Induktion von MRP8 und MRP14 durch IL-6 liefert einen ersten Hinweis, daß daran Signalwege beteiligt sein könnten, die durch Stimulation von gp130-Rezeptoren vermittelt werden. Untersuchung der Expression verschiedener Liganden für gp130-Rezeptoren sowie der einzelnen Rezeptoren durch *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie könnte in Zukunft Aufschluß über eine mögliche Beteiligung dieser Rezeptoren und Zytokine an der *in vivo*-Induktion der MRP8/MRP14-Expression geben. Es wäre sicher auch von Bedeutung, die molekulare Basis der IL-6- und calciumvermittelten Induktion der MRP8/MRP14-Expression durch Transfektionsexperimente mit Promotorkonstrukten von MRP8 bzw. MRP14 in Reporterassays zu studieren. Eine Aufklärung der Expressionsregulation von MRP8 und MRP14 könnte

wichtige Aufschlüsse über deren aberrant hohe Expression in den verschiedenen epithelialen Krankheiten geben und vielleicht neue Einblicke in die Pathogenese dieser Erkrankungen erlauben.

Zusammenfassend belegen die hier vorgestellten Daten, daß der Raf/MEK/Erk-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten spielt, und daß bestimmte durch MAPK regulierte Proteine wie MRP8/MRP14 potentiell eine wichtige Funktion bei pathologisch veränderter Zelldifferenzierung, als auch bei natürlicherweise beschleunigt ablaufenden Differenzierungsprozessen der Epidermis ausüben. Ein genaues Verständnis der regulatorischen Mechanismen, durch die MAPK-Signalwege, allem voran der Raf/MEK/Erk-Signalweg, Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten steuern, könnte in Zukunft wichtige Fortschritte bei der Bekämpfung all jener Krankheiten bringen, die durch Störungen des sensiblen Gleichgewichtes von Proliferation und Differenzierung in der Epidermis charakterisiert sind.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassende Darstellung



**Abbildung 6.1 Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten regulatorischen Signalwege keratinozytärer Wachstums- und Differenzierungsprozesse inklusive der neu identifizierten Signalbeziehungen.** Die in dieser Arbeit neu aufgeklärten Signalzusammenhänge sind durch rote Pfeile kenntlich gemacht. Der Raf/MEK/Erk-Signalweg ist aufgrund seiner dualen Funktion sowohl in Proliferation (blau) als auch Differenzierung (rot) von Keratinozyten zweifarbig dargestellt.

## 6.2 Zusammenfassung

Fehlgeleitete Proliferations- und Differenzierungsprozesse von Keratinozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vieler Hauterkrankungen. Die intrazellulären Signalmechanismen, die die Balance zwischen Keratinozytenwachstum und -differenzierung steuern, sind bislang weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK-) Signalwege in keratinozytären Wachstums- und Differenzierungsvorgängen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Induktion von Keratinozytendifferenzierung durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration mit einer raschen und transienten Aktivierung des Raf/MEK/Erk- (MAPK-) Signalweges verbunden ist, während keine veränderte Aktivität der stressinduzierten MAPK Jnk und p38 nachweisbar war. Die calciuminduzierte Erk-Aktivierung unterschied sich in ihrer Kinetik von mitogener Erk-Aktivierung durch den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und konnte durch Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration moduliert werden. Während die mitogene Erk-Aktivierung durch die kleine GTPase Ras vermittelt wird, erfolgte calciuminduzierte Aktivierung von Erk Ras-unabhängig, was auf einen fundamentalen Unterschied mitogener und differenzierungsinduzierender Stimuli hinsichtlich ihrer Aktivierungsmechanismen der Raf/MEK/Erk-Kaskade hindeutet. Trotz der transienten Natur der calciuminduzierten Erk-Aktivierung waren die calciumvermittelte Expression des Zellzykusinhibitors p21/Cip1 und des Differenzierungsmarkers Involucrin sensitiv für MEK-Inhibition, was auf eine wichtige Rolle des Raf/MEK/Erk-Signalweges in frühen Stadien des Differenzierungsprozesses hinweist.

Wichtige Konvergenzpunkte zwischen calcium- und MAPK-abhängigen Signalwegen scheinen die beiden calciumbindenden S100-Proteine MRP8 und MRP14 zu sein. Beide Proteine werden *in vitro* differenzierungsabhängig exprimiert und translozieren sowohl nach Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration als auch nach Stimulation stressaktivierter MAPK an Zytoskelettstrukturen. Untersuchung der Expression von MRP8 und MRP14 in paraffin- und kryofixierten Serienschnitten gesunder und pathologisch veränderter Haut ergab, daß deren Expression normalerweise auf differenzierende Zellen im Haarfollikel beschränkt ist, jedoch in differenzierten Hautschichten hyperproliferativer oder tumoröser Haut massiv induziert werden kann.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden interessante neue Signalbeziehungen identifiziert, deren Entdeckung einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der regulatorischen Mechanismen leisten könnte, durch die die Epidermis ihre funktionell wichtige Homöostase erhält.

### 6.3 Summary

Abnormal proliferation and differentiation processes play an important role in the pathogenesis of various skin diseases. The intracellular signaling mechanisms governing the balance between growth and differentiation of keratinocytes are still largely unknown. In this thesis the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades in keratinocyte growth and differentiation was analysed. Induction of keratinocyte differentiation by elevation of extracellular calcium levels resulted in a rapid and transient activation of the Raf/MEK/Erk (MAPK) pathway but did not increase activity of the stress-activated Jnk or p38 MAPKs. Calcium-induced Erk activation differed in kinetics from mitogenic Erk activation by epidermal growth factor (EGF) and could be modulated by alterations of intracellular calcium levels. While EGF-induced Erk activation was mediated by the small GTPase Ras, calcium-induced Erk activity occurred independently of active Ras. This suggests that proliferative and differentiation-inducing stimuli use alternative mechanisms to activate the Raf/MEK/Erk pathway. Despite the transient nature of Erk activation, calcium-induced expression of the cell cycle inhibitor protein p21 and the differentiation marker involucrin were sensitive to MEK inhibition which implies a role for the Raf/MEK/Erk pathway in early stages of keratinocyte differentiation.

The two calcium binding S100 proteins additionally studied here, MRP8 and MRP14, seem to represent important convergent points between calcium and MAPK signaling. *In vitro* both proteins are expressed in a differentiation-dependent manner in keratinocytes. Elevation of intracellular calcium levels as well as activation of stress-activated MAPKs resulted in translocation of MRP8/MRP14 complexes to the cytoskeleton. When expression of MRP8 and MRP14 was analysed in serial paraffin- or kryo-sections of healthy or diseased skin, signals in normal skin were largely restricted to differentiating cells of the hair follicle, however, additionally a strong induction of MRP8/14 expression was observed in differentiating epidermal layers of hyperproliferative or tumorigenic skin. In this thesis important novel signaling interactions were identified which provide new basic insights into the molecular mechanisms involved in the regulation of skin homeostasis which is essential for the maintenance of the multiple functions of the epidermis.

## 7 Literatur

---

1. Adams, J. C., and Watt, F. M. (1990). Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell* **63**, 425-35.
2. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**, 27489-94.
3. Bhardwaj, R. S., Zotz, C., Zwadlo-Klarwasser, G., Roth, J., Goebeler, M., Mahnke, K., Falk, M., Meinardus-Hager, G., and Sorg, C. (1992). The calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 form a membrane-associated heterodimer in a subset of monocytes/macrophages present in acute but absent in chronic inflammatory lesions. *Eur J Immunol* **22**, 1891-7.
4. Bikle, D. D., and Pillai, S. (1993). Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr Rev* **14**, 3-19.
5. Bikle, D. D., Ratnam, A., Mauro, T., Harris, J., and Pillai, S. (1996). Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* **97**, 1085-93.
6. Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
7. Bos, J. L. (1998). All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* **17**, 6776-82.
8. Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-71.
9. Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J., and Hebert, S. C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-80.
10. Bruder, J. T., Heidecker, G., and Rapp, U. R. (1992). Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev* **6**, 545-56.
11. Cabodi, S., Calautti, E., Talora, C., Kuroki, T., Stein, P. L., and Dotto, G. P. (2000). A PKC-eta/Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Mol Cell* **6**, 1121-9.

12. Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U., and Cooper, G. M. (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 732-41.
13. Calautti, E., Missero, C., Stein, P. L., Ezzell, R. M., and Dotto, G. P. (1995). fyn tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control. *Genes Dev* **9**, 2279-91.
14. Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., and Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395-413.
15. Chao, T. S., Byron, K. L., Lee, K. M., Villereal, M., and Rosner, M. R. (1992). Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* **267**, 19876-83.
16. Chao, T. S., Foster, D. A., Rapp, U. R., and Rosner, M. R. (1994). Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J Biol Chem* **269**, 7337-41.
17. Chattopadhyay, N., Mithal, A., and Brown, E. M. (1996). The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism [published erratum appears in *Endocr Rev* 1996 Oct;17(5):517]. *Endocr Rev* **17**, 289-307.
18. Coffey, R. J., Jr., Derynck, R., Wilcox, J. N., Bringman, T. S., Goustin, A. S., Moses, H. L., and Pittelkow, M. R. (1987). Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature* **328**, 817-20.
19. Coffey, R. J., Sipes, N. J., Bascom, C. C., Graves-Deal, R., Pennington, C. Y., Weissman, B. E., and Moses, H. L. (1988). Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. *Cancer Res* **48**, 1596-602.
20. Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J., and Rapp, U. R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* **19**, 474-80.
21. Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-52.
22. Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-37.
23. Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Williams, E. K., Szallasi, Z., Blumberg, P. M., and Yuspa, S. H. (1995). Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* **6**, 149-57.

24. Dickson, B., and Hafen, E. (1994). Genetics of signal transduction in invertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 64-70.
25. DiSepio, D., Malhotra, M., Chandraratna, R. A., and Nagpal, S. (1997). Retinoic acid receptor-nuclear factor-interleukin 6 antagonism. A novel mechanism of retinoid-dependent inhibition of a keratinocyte hyperproliferative differentiation marker. *J Biol Chem* **272**, 25555-9.
26. Donato, R. (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* **1450**, 191-231.
27. Dotto, P. (1998). The keratinocyte growth-differentiation switch. *Front Biosci* **3**, d502-8.
28. Eckert, R. L., Crish, J. F., and Robinson, N. A. (1997). The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev* **77**, 397-424.
29. Edgeworth, J., Freemont, P., and Hogg, N. (1989). Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14. *Nature* **342**, 189-92.
30. Elder, J. T., Fisher, G. J., Lindquist, P. B., Bennett, G. L., Pittelkow, M. R., Coffey, R. J., Ellingsworth, L., Derynck, R., and Voorhees, J. J. (1989). Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* **243**, 811-814.
31. English, J. M., Vanderbilt, C. A., Xu, S., Marcus, S., and Cobb, M. H. (1995). Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* **270**, 28897-902.
32. Farrar, M. A., Alberol, I., and Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* **383**, 178-81.
33. Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**, 18623-32.
34. Feig, L. A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* **1**, E25-7.
35. Filvaroff, E., Calautti, E., McCormick, F., and Dotto, G. P. (1992). Specific changes of Ras GTPase-activating protein (GAP) and a GAP-associated p62 protein during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **12**, 5319-28.

36. Filvaroff, E., Stern, D. F., and Dotto, G. P. (1990). Tyrosine phosphorylation is an early and specific event involved in primary keratinocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **10**, 1164-73.
37. Flory, E., Hoffmeyer, A., Smola, U., Rapp, U. R., and Bruder, J. T. (1996). Raf-1 kinase targets GA-binding protein in transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* **70**, 2260-8.
38. Forslind, B., Lindberg, M., Roomans, G. M., Pallon, J., and Werner-Linde, Y. (1997). Aspects on the physiology of human skin: studies using particle probe analysis. *Microsc Res Tech* **38**, 373-86.
39. Fuchs, E. (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* **17**, 197-208.
40. Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033-42.
41. Gao, C. Y., and Zelenka, P. S. (1997). Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *Bioessays* **19**, 307-15.
42. Goebeler, M., Roth, J., van den Bos, C., Ader, G., and Sorg, C. (1995). Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochem. J.* **309**, 419-24.
43. Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.
44. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-9.
45. Gredinger, E., Gerber, A. N., Tamir, Y., Tapscott, S. J., and Bengal, E. (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem* **273**, 10436-44.
46. Green, M. R., Mycock, C., Smith, C. G., and Couchman, J. R. (1987). Biochemical and ultrastructural processing of [125I]epidermal growth factor in rat epidermis and hair follicles: accumulation of nuclear label. *J Invest Dermatol* **88**, 259-65.
47. Haase, I., Liesegang, C., Binting, S., Henz, B. M., and Rosenbach, T. (1997). Phospholipase C-mediated signaling is altered during HaCaT cell proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* **108**, 748-52.

48. Halevy, O., Novitch, B., Spicer, D., Skapek, S., Rhee, J., Hannon, J., Beach, D., and Lassar, A. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**, 1018-21.
49. Han, M., Golden, A., Han, Y., and Sternberg, P. W. (1993). C. elegans lin-45 raf gene participates in let-60 ras-stimulated vulval differentiation. *Nature* **363**, 133-40.
50. Hansen, L. A., Alexander, N., Hogan, M. E., Sundberg, J. P., Dlugosz, A., Threadgill, D. W., Magnuson, T., and Yuspa, S. H. (1997). Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *Am J Pathol* **150**, 1959-75.
51. Hauser, P. J., Agrawal, D., Hackney, J., and Pledger, W. J. (1998). STAT3 activation accompanies keratinocyte differentiation. *Cell Growth Differ* **9**, 847-55.
52. Hebert, S. C., and Brown, E. M. (1995). The extracellular calcium receptor. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 484-92.
53. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334**, 297-314.
54. Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-54.
55. Hessian, P. A., Edgeworth, J., and Hogg, N. (1993). MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol* **53**, 197-204.
56. Hoffmann, H. J., Olsen, E., Etzerodt, M., Madsen, P., Thogersen, H. C., Kruse, T., and Celis, J. E. (1994). Psoriasin binds calcium and is upregulated by calcium to levels that resemble those observed in normal skin. *J Invest Dermatol* **103**, 370-5.
57. Hu, P. P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., and Wang, X. F. (1999). The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **274**, 35381-7.
58. Hunter, M. J., and Chazin, W. J. (1998). High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem* **273**, 12427-35.
59. Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) -from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 205-19.

60. Jaken, S., and Yuspa, S. H. (1988). Early signals for keratinocyte differentiation: role of Ca<sup>2+</sup>-mediated inositol lipid metabolism in normal and neoplastic epidermal cells. *Carcinogenesis* **9**, 1033-8.
61. Jiang, H., Lin, J., Zao-Zhong, S., Collart, F., Huberman, E., and Fisher, P. (1994). Induction of differentiation in human promyelogenic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* **9**, 3397-406.
62. Jones, P. H. (1997). Epithelial stem cells. *Bioessays* **19**, 683-90.
63. Kawasaki, H., Springett, G. M., Toki, S., Canales, J. J., Harlan, P., Blumenstiel, J. P., Chen, E. J., Bany, I. A., Mochizuki, N., Ashbacher, A., Matsuda, M., Housman, D. E., and Graybiel, A. M. (1998). A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13278-83.
64. Kelly, S. E., Jones, D. B., and Fleming, S. (1989). Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. *J Pathol* **159**, 17-21.
65. Kerkhoff, C., Klempt, M., and Sorg, C. (1998). Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta* **1448**, 200-11.
66. Kerkhoff, E., and Rapp, U. R. (1997). Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2576-2586.
67. Kerkhoff, E., and Rapp, U. R. (1998). Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* **17**, 1457-62.
68. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., and Rapp, U. R. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-52.
69. Kruszewski, F. H., Hennings, H., Tucker, R. W., and Yuspa, S. H. (1991). Differences in the regulation of intracellular calcium in normal and neoplastic keratinocytes are not caused by ras gene mutations. *Cancer Res* **51**, 4206-12.
70. Lagasse, E., and Clerc, R. G. (1988). Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* **8**, 2402-10.
71. Li, L., Tucker, R. W., Hennings, H., and Yuspa, S. H. (1995). Chelation of intracellular Ca<sup>2+</sup> inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro. *J Cell Physiol* **163**, 105-14.
72. Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., and Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* **23**, 1686-90.

73. Ludwig, S., Hoffmeyer, A., Goebeler, M., Kilian, K., Hafner, H., Neufeld, B., Han, J., and Rapp, U. R. (1998). The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J Biol Chem* **273**, 1917-22.
74. Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M., and Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* **383**, 181-5.
75. MacLeod, K. F., Sherry, N., Hannon, G. J., Beach, G., Tokino, T., Kinzler, K. W., Vogelstein, W., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes and Dev.* **9**, 935-944.
76. Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B., and Celis, J. E. (1992). Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol* **99**, 299-305.
77. Marshall, C. (1999). How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* **11**, 732-6.
78. Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-85.
79. McNeil, S. E., Hobson, S. A., Nipper, V., and Rodland, K. D. (1998). Functional calcium-sensing receptors in rat fibroblasts are required for activation of SRC kinase and mitogen-activated protein kinase in response to extracellular calcium. *J Biol Chem* **273**, 1114-20.
80. Medema, J. P., Sark, M. W., Backendorf, C., and Bos, J. L. (1994). Calcium inhibits epidermal growth factor-induced activation of p21ras in human primary keratinocytes. *Mol Cell Biol* **14**, 7078-85.
81. Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M., and et al. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* **61**, 1103-12.
82. Menon, G. K., Grayson, S., and Elias, P. M. (1985). Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* **84**, 508-12.
83. Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* **376**, 337-41.

84. Missero, C., Calautti, E., Eckner, R., Chin, J., Tsai, L. H., Livingston, D. M., and Dotto, G. P. (1995). Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5451-5.
85. Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A., and Dotto, G. P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* **10**, 3065-75.
86. Morooka, T., and Nishida, E. (1998). Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* **273**, 24285-8.
87. Nebreda, A. R., and Porras, A. (2000). p38 Map kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**, 257-60.
88. Newton, A. C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 161-7.
89. Oda, Y., Tu, C. L., Chang, W., Crumrine, D., Komuves, L., Mauro, T., Elias, P. M., and Bikle, D. D. (2000). The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in murine epidermal differentiation. *J Biol Chem* **275**, 1183-90.
90. Oda, Y., Tu, C. L., Pillai, S., and Bikle, D. D. (1998). The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* **273**, 23344-52.
91. Odink, K., Cerletti, N., Bruggen, J., Clerc, R. G., Tarcsay, L., Zwadlo, G., Gerhards, G., Schlegel, R., and Sorg, C. (1987). Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* **330**, 80-2.
92. Ohba, M., Ishino, K., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., Huh, N. H., and Kuroki, T. (1998). Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* **18**, 5199-207.
93. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* **19**, 3159-67.
94. Olsen, E., Rasmussen, H. H., and Celis, J. E. (1995). Identification of proteins that are abnormally regulated in differentiated cultured human keratinocytes. *Electrophoresis* **16**, 2241-8.
95. Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* **3**, 565-77.

96. Perrimon, N. (1993). The Torso-receptor protein tyrosine kinase signalling pathway: an endless story. *Cell* **74**, 219-22.
97. Presland, R. B., Bassuk, J. A., Kimball, J. R., and Dale, B. A. (1995). Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol* **104**, 218-23.
98. Puri, P. L., Wu, Z., Zhang, P., Wood, L. D., Bhakta, K. S., Han, J., Feramisco, J. R., Karin, M., and Wang, J. Y. (2000). Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev* **14**, 574-84.
99. Qui, M. S., and Green, S. H. (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* **9**, 705-17.
100. Reiss, M., Lipsey, L. R., and Zhou, Z. L. (1991). Extracellular calcium-dependent regulation of transmembrane calcium fluxes in murine keratinocytes. *J Cell Physiol* **147**, 281-91.
101. Rheinwald, J. G. (1980). Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol* **21A**, 229-54.
102. Rheinwald, J. G., and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-43.
103. Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A., and Hafen, E. (1996). The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* **10**, 2759-68.
104. Robbins, D. J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D., and Cobb, M. H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* **268**, 5097-106.
105. Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-6.
106. Roth, J., Burwinkel, F., van den Bos, C., Goebeler, M., Vollmer, E., and Sorg, C. (1993). MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* **82**, 1875-83.
107. Rupniak, H. T., Rowlatt, C., Lane, E. B., Steele, J. G., Trejdosiewicz, L. K., Laskiewicz, B., Povey, S., and Hill, B. T. (1985). Characteristics of four new human

- cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Natl Cancer Inst* **75**, 621-35.
108. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  109. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
  110. Schäfer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* **21**, 134-40.
  111. Schäfer, B. W., Wicki, R., Engelkamp, D., Mattei, M. G., and Heizmann, C. W. (1995). Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25**, 638-43.
  112. Seitz, C. S., Lin, Q., Deng, H., and Khavari, P. A. (1998). Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2307-12.
  113. Sharma, S. V., Boyajian, A., Myers, C. D., and Nakano, H. (1997). Specific changes in rasGAP-associated 62 kilodalton protein during integrin mediated cell-substrate interaction. *Oncogene* **14**, 2641-9.
  114. Shaw, G. (1996). The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* **18**, 35-46.
  115. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.
  116. Sibiliala, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F. M., Schlessinger, J., and Wagner, E. F. (2000). The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* **102**, 211-20.
  117. Sibiliala, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E. F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* **17**, 719-31.
  118. Sibiliala, M., and Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor [published erratum appears in *Science* 1995 Aug 18;269(5226):909]. *Science* **269**, 234-8.
  119. Simon, M., and Green, H. (1985). Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. *Cell* **40**, 677-83.

120. Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J., and Ip, Y. T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**, 2745-58.
121. Stacey, D. W., Roudebush, M., Day, R., Mosser, S. D., Gibbs, J. B., and Feig, L. A. (1991). Dominant inhibitory Ras mutants demonstrate the requirement for Ras activity in the action of tyrosine kinase oncogenes. *Oncogene* **6**, 2297-304.
122. Steinman, R., Hoffman, B., Iro, A., Guilouff, C., Liebermann, D., and El-Houseini, M. (1994). Induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* **9**, 3389-96.
123. Sundaram, M., and Han, M. (1996). Control and integration of cell signaling pathways during *C. elegans* vulval development. *Bioessays* **18**, 473-80.
124. Takahashi, H., Asano, K., Manabe, A., Kinouchi, M., Ishida-Yamamoto, A., and Iizuka, H. (1998). The alpha and eta isoforms of protein kinase C stimulate transcription of human involucrin gene. *J Invest Dermatol* **110**, 218-23.
125. Takeda, H., Matozaki, T., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M., Ochi, F., Fukunaga, K., Inagaki, K., and Kasuga, M. (1999). PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *EMBO J* **18**, 386-95.
126. Takemura, H., Hughes, A. R., Thastrup, O., and Putney, J. W. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* **264**, 12266-71.
127. Taylor, S. J., and Shalloway, D. (1996). Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* **6**, 1621-7.
128. Teigelkamp, S., Bhardwaj, R. S., Roth, J., Meinardus-Hager, G., Karas, M., and Sorg, C. (1991). Calcium-dependent complex assembly of the myeloic differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *J Biol Chem* **266**, 13462-7.
129. Thacher, S. M., and Rice, R. H. (1985). Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* **40**, 685-95.
130. Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C., and et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **269**, 230-4.

131. Todd, C., and Reynolds, N. J. (1998). Up-regulation of p21WAF1 by phorbol ester and calcium in human keratinocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *Am J Pathol* **153**, 39-45.
132. Tomic-Canic, M., Komine, M., Freedberg, I. M., and Blumenberg, M. (1998). Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci* **17**, 167-81.
133. Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 205-15.
134. Ueda, E., Ohno, S., Kuroki, T., Livneh, E., Yamada, K., Yamanishi, K., and Yasuno, H. (1996). The eta isoform of protein kinase C mediates transcriptional activation of the human transglutaminase 1 gene. *J Biol Chem* **271**, 9790-4.
135. van den Bos, C., Roth, J., Koch, H. G., Hartmann, M., and Sorg, C. (1996). Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. *J Immunol* **156**, 1247-54.
136. Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G., and Waterfield, M. D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* **22**, 267-72.
137. Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**, 239-54.
138. Wang, H. Q., and Smart, R. C. (1999). Overexpression of protein kinase C- $\alpha$  in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF- $\alpha$  expression but not tumor promotion. *J Cell Sci* **112**, 3497-506.
139. Wixler, V., Smola, U., Schuler, M., and Rapp, U. (1996). Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett* **385**, 131-7.
140. Wojnowski, L., Stancato, L. F., Larner, A. C., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (2000). Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **91**, 97-104.
141. Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Larner, A. C., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* **76**, 141-9.

142. Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R., and Zimmer, A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* **16**, 293-7.
143. Xie, Z., and Bikle, D. D. (1999). Phospholipase C-gamma1 is required for calcium-induced keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* **274**, 20421-4.
144. Xing, J., Kornhauser, J. M., Xia, Z., Thiele, E. A., and Greenberg, M. E. (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **18**, 1946-55.
145. Yamamoto, T., Kamata, N., Kawano, H., Shimizu, S., Kuroki, T., Toyoshima, K., Rikimaru, K., Nomura, N., Ishizaki, R., Pastan, I., and et al. (1986). High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res* **46**, 414-6.
146. York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W., and Stork, P. J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**, 622-6.
147. Yuspa, S. H., Kilkenny, A. E., Steinert, P. M., and Roop, D. R. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* **109**, 1207-17.
148. Zamansky, G. B., Nguyen, U., and Chou, I.-N. (1991). An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganisation of microfilaments, keratin intermediate filaments and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Derm.* **97**, 985-94.
149. Zetser, A., Gredinger, E., and Bengal, E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem* **274**, 5193-200.
150. Zhou, G., Bao, Z. Q., and Dixon, J. E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**, 12665-9.
151. Zwadlo, G., Bruggen, J., Gerhards, G., Schlegel, R., and Sorg, C. (1988). Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol* **72**, 510-5

## 8 Anhang

---

### 8.1 Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1, 2 bis(o-aminophenoxy)-ethan-N, N, N', N'-tetraessigsäure-Azetoxymethylester
bio	biotinyliert
BL	Basallamina
bp	Basenpaare
BPE	bovine pituitary extract
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celcius
Ca	Calcium
ca.	circa
CaR	Calciumrezeptor
CE	cornified envelope
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CMV	Cytomegalovirus
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diazylglyzerin
dd H <sub>2</sub> O	bidestiliertes Wasser
dd NTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn MEK	dominant-negatives MEK
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetrassigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMEM	Eagle's Minimal essential Medium
Erk	extracellular-signal regulated kinase
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat-gekoppelt
g	Gramm/ Erdbescheinigung
GDP	Guanidindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HaCaT	human adult skin keratinocytes propagated under low calcium conditions and elevated temperature
HGKS	Human Keratinocyte Growth Supplement
IF	Immunfluoreszenz
IH	Immunhistochemie

IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-3, 4, 5-Triphosphat
IS	<i>in situ</i> -Hybridisierung
Jnk	c-Jun N-terminale Kkinase
K	Keratin
kDa	Kilodalton
KSMF	serumfreies Keratinozytenmedium
l	Liter
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin basisches Protein
MCS	Multiple cloning site
MEK	mitogen/extracellular-signal regulated kinase
min	Minuten
MLB	magnesiumhaltiger Lysispuffer
MRP 8/14	macrophage inhibitory factor-related protein 8/14 kDa
MSZ	Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
NGF	nerve growth factor
NHEK	normal human epithelial keratinocytes
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OsM	Onkostatine M
PAGE	Polyarylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PC 12	Phäochromozytom
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C-gamma
pmol	picomol
POD	Meerrettich-Peroxidase
RBD	Ras-Bindedomäne
RT	Raumtemperatur
SAPK	stressaktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler (standard error)
SoS	son of sevenless
STAT	signal transducer and activator of transcription
TA	transient amplifying cell
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween 20
TG1	Transglutaminase-1
TGF- $\alpha$	transforming growth factor-alpha
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor beta-1
TLB	Triton Lysispuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/vol	Volumen
z. B.	zum Beispiel

## Danksagung

---

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf R. Rapp möchte ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Geschätzt habe ich nicht nur seine Fachkompetenz und seine Diskussionsbereitschaft, sondern bin ihm auch dafür dankbar, daß ich meine Promotionsarbeit am MSZ anfertigen durfte, das ich als ein sehr internationales Haus mit vielen guten Wissenschaftlern und netten Leuten in Erinnerung behalten werde.

Danken möchte ich auch Professor Dr. E. Buchner für die Zweitkorrektur meiner Arbeit und Professor Dr. T. Raabe, der mich erst zur Signaltransduktionsforschung brachte und meine Doktorarbeit mitbetreut hat.

Der größte Dank gebührt meinen beiden Hauptbetreuern Dr. S. Ludwig und Dr. M. Goebeler, die in jeder Hinsicht (menschlich wie fachlich) vorbildliche Chefs waren und mich nicht nur durch ihre Fähigkeit, in kürzester Zeit gute Anträge zu schreiben immer wieder in Erstaunen versetzt haben. Ich habe eine Menge von beiden gelernt und deren Kollaboration als perfekte wissenschaftliche Verbindung erlebt, wobei der Spaß nie zu kurz kam.

Dank möchte ich auch Cornelia Seitz dafür aussprechen, mich in die höheren Weihen der Isolation primärer Keratinozyten eingeweiht zu haben und PD. Dr. R. Gillitzer dafür, daß er mir bei der Vorauswahl und histologischen Begutachtung der Hautschnitte behilflich war.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Atiye Toksoy für ihre Hilfe bei den *in situ*-Untersuchungen, wobei ich auch nicht vergessen will, daß sie es war, die mich in der ersten Woche so angenehm in den Kreis der Hautklinikmitarbeiter eingeführt hat.

Für die vielen gemeinsamen Stunden im Zellkulturlabor möchte ich mich bei Sybille Schmid bedanken, die mich auch oft genug nach mißglückten Experimenten wieder aufgebaut hat und so bereitwillig in meinem Urlaub die Kultur meiner Zellen mitübernommen hat.

Allen verbliebenen und ehemaligen Mitgliedern der AG Ludwig (Bruce Jordan, Dragomir Dinev, Christina Ehrhardt, Heide Häfner, Bernd Neufeld, Peifeng Chen, Georgios Keramas, Egbert Florey, Angelika Hoffmeyer und Anne Große-Wilde) sowie Martina Gropengießer möchte ich für die tolle Atmosphäre in und außerhalb des Labors sowie die vielen schönen Erinnerungen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den vielen anderen netten Leuten der MSZ-Zeit allen voran Jörg Hartkamp, Suzanna Petrovic, Enrico Schmidt, Dima Sakkab, Antje Rhode, den „Londonern“ (Guido Posern, Sandra Ruf und Vanessa Gray-Schopfer) sowie den nach Ulm abgewanderten Gordon Chan und Anke Harenberg.

Nicht zuletzt geht ein herzlicher Dank an meine Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben..

## Lebenslauf

---

Marc Schmidt  
Steinheilstraße 54  
97080 Würzburg  
Tel.: 0931/281397

e-mail: [schmidt.marc@gmx.de](mailto:schmidt.marc@gmx.de)

### *Persönliche Daten*

Geboren in Kronach  
am 29. Juni 1971  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### *Schulausbildung*

1977 - 1981  
1981 - 1990

Grundschule Wertheim-Bestenheid  
Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wertheim, Abitur

### *Studium*

1990 - 1992  
1992 - 1997

Studium der Lebensmittelchemie, Universität Würzburg  
Studium der Biologie, Universität Würzburg  
Grundstudium (1992-1993), Vordiplom November 1993  
Hauptstudium (1993-1996), Diplomprüfung April 1996  
- Hauptfach: Genetik  
- Nebenfächer: Mikrobiologie, Tierphysiologie  
Diplomarbeit (Mai 1996-Mai 1997) am Institut für Genetik,  
Biozentrum der Universität Würzburg.  
- Betreuer: Prof. Dr. T. Raabe  
- Thema: „Funktionelle Charakterisierung der Pleckstrin  
Homology Domäne von Daughter of Sevenless  
im Sevenless-Signaltransduktionsweg“

Mai 1997

Biologie-Diplom, Universität Würzburg

### *Akademischer Werdegang*

seit Juli 1997

Promotion (Dr. rer. nat) am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Universität Würzburg, in enger Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Universität Würzburg

- Betreuer: Prof. Dr. U. R. Rapp, Dr. Stephan Ludwig  
Dr. Matthias Goebeler (Hautklinik)

- Thema: „Die Rolle mitogener und stressinduzierter MAPK-Signalwege bei der Regulation von keratinozytären Proliferations- und Differenzierungsvorgängen“

- Posterpreis XXVIII Annual Meeting der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), München (Februar 2001)

- Publikationen siehe Liste

## Publikationsliste und Auszeichnungen

---

### Auszeichnungen

Posterpreis der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), XXVIII Annual Meeting der ADF, München, Februar 2001

### Publikationen

1. **Schmidt, M.**, Gillitzer, R., Toksoy, A., Bröcker, E.-B., Rapp, U. R., Paus, R., Roth, J., Ludwig, L., Goebeler, M. (2001). Selective expression of the calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in the keratogenous zone of hair follicles. *J Invest Derm.* (eingereicht).
2. **Schmidt, M.**, Goebeler, M., Posern, G., Feller, S. M., Seitz, C.S., Broecker, E.-B., Rapp, U. R., Ludwig, S. (2000). Ras-independent activation of the Raf/MEK/Erk Pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J Biol. Chem* **275**, 4111-17.
3. Bausenwein, B. S., **Schmidt, M.**, Mielke, B., Raabe, T. (2000). In vivo functional analysis of the Daughter of Sevenless protein in receptor tyrosine kinase signaling. *Mech Dev* **90**, 205-15.

### Publizierte Abstracts

1. **Schmidt, M.**, Ludwig, S., Posern, G., Feller S. M., Seitz, C. S, Bröcker, E-B., Rapp, U. R. Goebeler, M. (2001). Ras-independent activation of the Raf/MEK/Erk signaling pathway: A novel mechanism mediating keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res.* **293**, 78.
2. **Schmidt, M.**, Goebeler, M., Posern, G., Feller S. M., Seitz, C. S, Bröcker, E-B., Rapp, U. R., Ludwig, S (2001). Ras-independent activation of the Raf/MEK/Erk-pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *Signal Transduction* **1**, 68.
3. **Schmidt, M.**, Toksoy, A., Gillitzer, R., Bröcker, E.-B., Ludwig, S., Goebeler, M. (2000): Differentiation-dependent expression of the calcium binding proteins MRP8 and MRP14 by keratinocytes. *Arch Dermatol. Res.* **292**, 132 (A).



## Erklärung

---

Ich erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den in dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich kein weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Marc Schmidt