

# **SIGNALMECHANISMEN DER EPITHELIALEN PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG**

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



vorgelegt von

**Martin Giner**

aus Thaur; ÖSTERREICH

Würzburg 2007

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2001 bis September 2003 am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, und vom September 2003 bis September 2005 am Institut für Molekulare Medizin, Heinrich-Heine-Universität des Landes NRW, Düsseldorf absolviert. Meine Betreuung hatten in beiden Fällen **Prof. Dr. Stephan Ludwig** und **Prof. Dr. Matthias Goebeler** inne.

Eingereicht am: 24.Oktober 2007

**Mitglieder der Prüfungskommission:**

Vorsitzender: *Prof. Dr. Martin J. Müller*

Gutachter: *Prof. Dr. Stephan Ludwig*

Gutachter: *Prof. Dr. Martin Heisenberg*

Tag des Prüfungskolloquiums : 2. April 2008

Doktorurkunde ausgehändigt am:

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinen beiden Betreuern **Prof. Dr. Stephan Ludwig** und **Prof. Dr. Matthias Goebeler** bedanken. Prof. Dr. Ludwig war mir all die Jahre und all die wechselnden Institute über ein verständnisvoller Doktorvater, welcher mich freundlich in seine damalige Arbeitsgruppe am MSZ aufgenommen hatte. Durch ihn wurde ich in die Mysterien des EMSA's und der Virusproduktion eingeführt. Prof. Dr. Goebeler hat mich ebenfalls herzlich in seine Arbeitsgruppe an der Hautklinik aufgenommen und mich sicher durch die Untiefen der Flowzytometrie und der Dermatologie gelotst.

**Prof. Dr. Heisenberg** danke ich für die freundliche Übernahme der Patenschaft seitens der Biologischen Fakultät und der Zweitbegutachtung.

**Prof. Dr. Rapp, Frau Prof. Dr. Bröcker** und auch **Prof. Dr. Schulze-Osthoff** danke ich für die Aufnahme an den jeweiligen Instituten und die Erlaubnis in den Weiten der Labore den wissenschaftlichen Tätigkeiten nachgehen zu dürfen.

**Prof. Dr. Leverkus** danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die Techniken der Keratinozytenpräparation und Kultivierung erlernen und optimieren zu dürfen und natürlich für die Möglichkeit, meine Frau kennen zu lernen.

Dank gilt natürlich allen unzähligen Mitgliedern und Ex-Mitgliedern dieser Institute. Namentlich möchte ich hier nur die folgenden erwähnt wissen: *Walter Wurzer, Christine Erhardt, Bille Schmid, Evi Horn, Daniel Scholtysik, Frank Essmann, Stephan Pohlmann* und *Dennis Sohn* für Unterstützung, Geduld, Diskussion, Aufmunterung, neue Techniken und viele gemeinsame unvergessliche Stunden.

**Meinen Eltern** danke ich ganz herzlich für die besondere Nachsicht und Großzügigkeit, mit der sie mich während meines Promotionsstudiums weiterhin unterstützt haben.

Ganz zum Schluss danke ich von ganzen Herzen meiner Frau **Tina**, welche mir erst als Kollegin die Wissenschaft der Haut nahe brachte, um mich dann im Moment des Liebenlernens nach Düsseldorf gehen zu lassen, aber die Geduld und das Verständnis aufbrachte, um auf mich zu warten.

*Diese Promotion ist Dir gewidmet.*

**VIELEN DANK !**

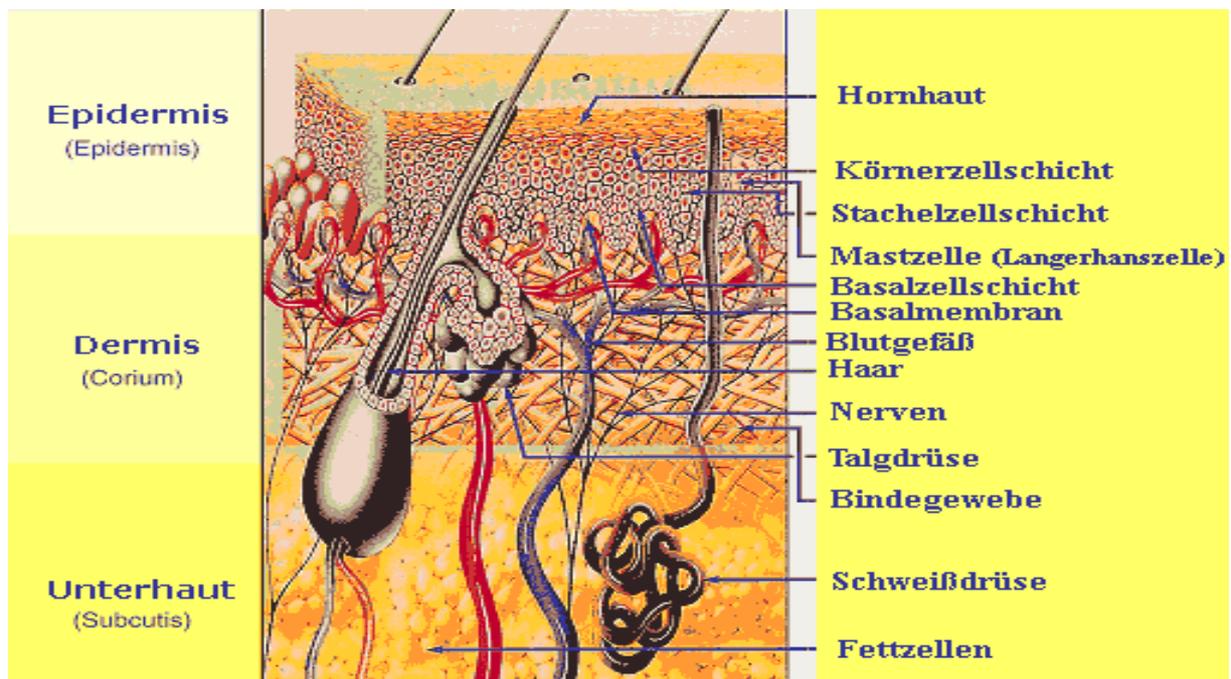
<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	AUFBAU DER MENSCHLICHEN HAUT.....	6
1.2	DIFFERENZIERUNG VON KERATINOZYTEN.....	8
1.2.1	<i>Calcium induzierte Differenzierung.....</i>	9
1.3	NF- $\kappa$ B IN DER HAUTDIFFERENZIERUNG.....	11
1.4	EINFLUSS VON NF- $\kappa$ B AUF ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN DER HAUT.....	14
1.5	TNF- $\alpha$ VERMITTELTE ZELLSIGNALE IN KERATINOZYTEN.....	15
<b>2.</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
3.1	GERÄTE UND DIVERSES MATERIAL.....	20
3.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN SOWIE REAGENZIENKITS.....	20
3.3	ENZYME.....	22
3.4	PHARMAKOLOGISCHE INHIBITOREN, REKOMBINANTE ZYTOKINE & SUBSTRATPROTEINE.....	22
3.5	LÖSUNGEN, MEDIEN UND PUFFER.....	23
3.6	ZELLKULTURMATERIAL.....	25
3.7	ANTIKÖRPER UND ANTISEREN.....	26
3.8	PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE.....	26
3.9	ZELLEN UND BAKTERIENSTAMM.....	27
<b>4.</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>28</b>
4.1	ARBEITEN MIT BAKTERIEN UND DNA.....	28
4.2	ZELLKULTUR.....	29
4.2.1	<i>Einfrieren, Lagerung und Rekultivierung der Zellen.....</i>	29
4.2.2	<i>Kultivierung von HaCaT-Zellen.....</i>	29
4.2.3	<i>Kultivierung neonataler primärer Keratinozyten (NHEK).....</i>	30
4.2.4	<i>Kultivierung von Phönix-Zellen (HEK 293T-Basis).....</i>	32
4.2.5	<i>Herstellung von Retrovirus produzierenden Zelllinien mit Lipofectamine 2000.....</i>	32
4.2.6	<i>Virale Infektion von HaCaT-Zellen.....</i>	33
4.2.7	<i>Retrovirale Infektionen von NHEK Zellen.....</i>	34
4.2.8	<i>Immunfluoreszenzoptische Dokumentation der Transfektionseffizienz.....</i>	34
4.2.9	<i>Stimulation und Inhibitorinkubation.....</i>	35
4.3	PROTEINANALYSE.....	35
4.3.1	<i>Lysis humaner Keratinozyten zur Proteinanalyse.....</i>	35
4.3.2	<i>Immunpräzipitation.....</i>	35
4.3.3	<i>Kinase-Assay.....</i>	36
4.3.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	36
4.3.5	<i>Western Blot.....</i>	37
4.3.6	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	37
4.3.7	<i>Immunfluoreszenzfärbung.....</i>	38
4.3.8	<i>„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA).....</i>	39
4.3.9	<i>DNA-Protein-Bindungsassay [Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)].....</i>	39
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
5.1	AKTIVIERUNG DER IKK/NF- $\kappa$ B SIGNALKASKADE WÄHREND DER CALCIUM-INDUZIERTEN DIFFERENZIERUNG.....	41
5.2	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG RETROVIRAL TRANSDUZIERTER ZELLINIEN ZUR UNTERSUCHUNG DES NF- $\kappa$ B SIGNALWEGES.....	43
5.3	EINSATZ VON SYNTHETISCHEN INHIBITOREN ZUR BLOCKADE DES NF- $\kappa$ B-SIGNALWEGES.....	47
5.4	INHIBIERUNG DER NF- $\kappa$ B AKTIVIERUNG VERHINDERT INFLAMMATORISCHE GENEXPRESSION.....	48
5.5	DER Ca <sup>2+</sup> INDUZIERTER INTRINSISCHER DIFFERENZIERUNGSPROZESS WIRD DURCH NF- $\kappa$ B NICHT BEEINFLUSST.....	52

<b>6. DISKUSSION</b> .....	<b>56</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>63</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>64</b>
<b>9. ANHANG</b> .....	<b>65</b>
9.2 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....	65
9.2 VEKTORKARTE .....	66
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>67</b>
<b>11. CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>75</b>
<b>12. PUBLIKATION UND PRÄSENTATIONEN</b> .....	<b>76</b>
<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>77</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 *Aufbau der menschlichen Haut*

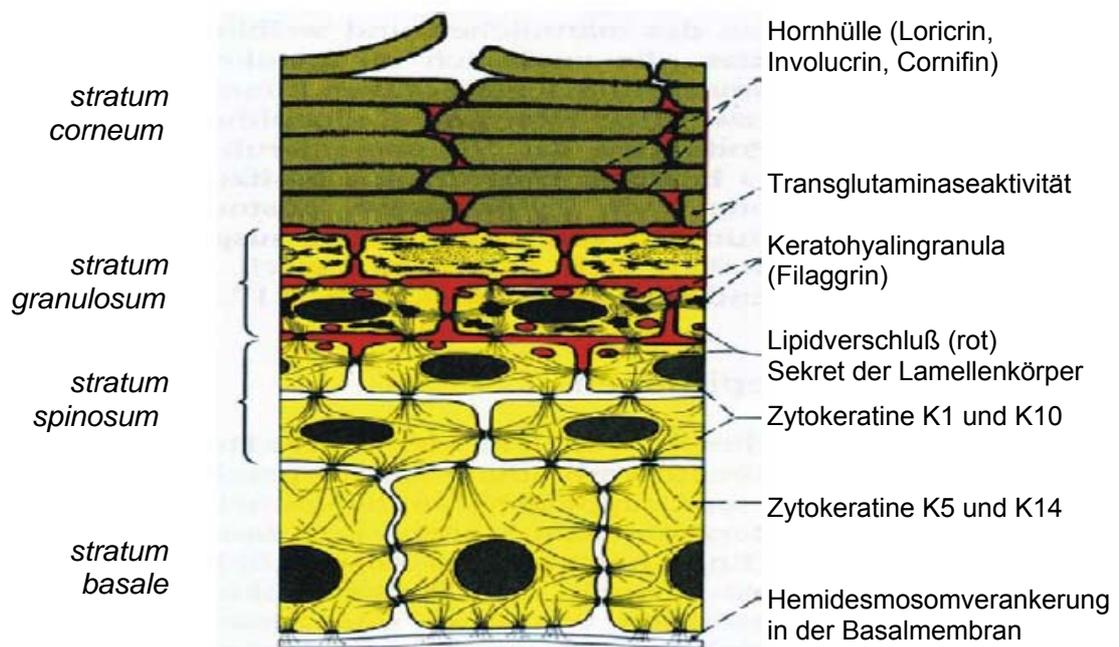
Die Haut gehört zu den wichtigsten und komplexesten Organen des menschlichen Organismus und bedeckt die äußere Körperoberfläche von ungefähr 1,5 bis 1,8m<sup>2</sup>. Neben einer Sinnes- und Kontaktfunktion kommt ihr als lebensnotwendige Grenze zum umgebenden Milieu eine besondere Bedeutung zu. Sie erfüllt multiple physiologische Aufgaben, wie Regulation des Wasserhaushalts des Körpers, bildet eine physikalische Barriere gegen pathogen einwirkende Mikroorganismen und Viren und bietet Schutz vor anderen Schädigungen der Umwelt, wie ultravioletter Strahlung und Chemikalieneinwirkung. Die Haut lässt sich in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Bindegewebe) und Subcutis (Fettgewebe) unterteilen. In ihr sind verschiedene Anhangsgebilde wie z.B. Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen eingebettet. Die durchschnittliche Hautdicke liegt, je nach regionalen und individuellen Gegebenheiten, zwischen 1,5 und 4mm. Etwa 0,1mm davon entfallen auf das terminale Abschlussgewebe, die Epidermis.



**Abb. 1.1: Aufbau der menschlichen Haut.** (entnommen aus <http://www.hermal.de>)

Die Epidermis unterliegt einer starken Zellerneuerung, wobei die Zeitspanne zwischen Mitose in der Basalzellschicht und der Abschilferung der terminal differenzierten Keratinozytenzelle ungefähr einen Monat beträgt.

Mit ca. 90% nehmen die Keratinozyten den quantitativen größten Teil der epidermalen Hautzellpopulation ein. Daneben kommen auch noch die neuroendokrinen Merkelzellen (Tastzellen) mit einem Anteil von weniger als 1% vor. Die Melanozyten (Pigmentzellen), die unmittelbar der Basalmembran aufliegen, und die suprabasalen Langerhans-Zellen mit ihrer dendritischen Morphologie bilden mit den Keratinozyten eine symbiotische und funktionelle Einheit. Als mehrschichtiges, verhornendes und sich ständig erneuerndes Plattenepithel lässt sich die Epidermis durch den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Keratinozyten histologisch, morphologisch und biochemisch in vier distinkte Schichten (*strata*) gliedern:



**Abb. 1.2: Funktionelle Histologie des verhornenden Plattenepithels (schematisiert)**

Während die drei suprabasalen Zellschichten *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* ausschließlich aus postmitotischen, differenzierenden Zellen aufgebaut sind, enthält nur das zur Basallamina anschließende *stratum basale* mitotisch aktive Zellen. Das *stratum basale* ist eine Schicht kubischer Zellen mit großen Kernen und relativ wenig Zytoplasma. Diese Zellen werden Basalzellen genannt. Darüber befindet sich das vielschichtige *stratum spinosum*, in dem die Keratinozyten größer und polygonal werden und sich in höheren Schichten abflachen. Untereinander sind diese Zellen durch multiple stachelartige Interzellularbrücken, die Desmosomen, verbunden. Das *stratum granulosum* mit seinen Körnerzellen bildet eine bis mehrere Schichten aus. Die Körnerzellen enthalten basophile Keratohyalin granula und sind deutlich abgeflacht. Es schließt sich das *stratum corneum* an, bestehend aus ganz flachen, fest gepackten, kernlosen Hornzellen, die dicht gefüllt sind mit Tonofilamenten und einer amorphen Matrix (Fritsch, 1990).

## 1.2 Differenzierung von Keratinozyten

In der Entwicklung der Säugetierhaut spielen besonders zwei Typen von Zelltod eine wesentliche Rolle, die Apoptose und die Verhornung, auch Keratinisierung genannt, welche in den unteren bzw. den oberen Schichten der Haut stattfindet. Dieser Prozess der Verhornung ist höchst organisiert, sowohl räumlich als auch zeitlich. Die teilungsfähigen, lebenden Keratinozyten im *stratum basale* wandeln sich während der Wanderung in Richtung Hautoberfläche zu toten, ausdifferenzierten Korneozyten (Hornzellen) um.

Zellproliferation, Differenzierung und Tod finden in einer bestimmten Abfolge statt und jeder dieser Prozesse ist durch die Expression spezifischer Proteine charakterisiert.

In den proliferierenden Basalkeratinozyten spielen dabei die Keratine K5 und K14 die Hauptrollen (Kartasova et al., 1993a). Sie verbinden sich zu 10nm dicken Keratin Zwischenfilamenten (*keratin intermediate filaments*, KIFs) und bilden zusammen mit Mikrotubulinen und Mikrofilamenten das Zytoskelett der epithelialen Zellen. Ausgelöst durch kaum bekannte Signale, wandern bestimmte Basalkeratinozyten vom *stratum basale* in das *stratum spinosum*, verlieren ihre mitotischen Fähigkeiten, und beginnen, völlig neue Strukturproteine und Enzyme, welche für die Keratinisierung charakteristisch sind, zu synthetisieren. Keratin K1 und K10 sind dabei die ersten Proteine, die während der Verhornung neu gebildet werden. K1 und K10 ersetzen dabei das bereits bestehende K5-K14 Netzwerk (Kartasova et al., 1993b). In weiterer Folge bilden die Zellen dann auch noch Keratohyalingranula, welche Profilaggrin, die Vorstufe zu Filaggrin, enthalten. Filaggrin verbindet dabei die bereits existierenden Keratinfilamente zu dicken Bündeln. Dies zwingt die Zelle in die abgeflachte Form, welche charakteristisch für Korneozyten in der Hornschicht ist. Zusammengenommen ergeben KIFs und Filaggrin 80-90% der Proteinmasse der Epidermis und bilden so ein homogenes Gerüst für die weitere Reifung und folgenden Aussteifungsschritte der Hornschicht. Gleichzeitig werden auch andere Strukturproteine wie z.B.: Involucrin, Loricrin, Trichohyalin und die Klasse der kleinen prolinreichen Proteine (*small proline-rich proteins*, SPRs) synthetisiert und anschließend von verschiedenen Transglutaminasen (TGs) vernetzt, um so die Hornhülle der Zelle weiter zu verstärken (Kalinin et al., 2001; Candi et al., 2005).

Grosse Anstrengungen wurden unternommen, um die zellulären und molekularen Prozesse der Proliferation und Differenzierung der Haut sowohl in Bezug auf extrazelluläre als auch intrazelluläre Abläufe zu klären, aber dennoch sind die Mechanismen der Regulation im Detail weitgehend unverstanden.

### 1.2.1 Calcium induzierte Differenzierung

**Die Calciumstimulation:** Keratinozyten bilden ein ideales Modell für *in vitro* Differenzierungsversuche von kultivierten Zellen, wobei schon seit langem die wichtige Rolle von Calcium in diesem Zusammenhang beobachtet wurde (Green, 1977; Eckert, 1989a; Hennings et al., 1980c; Pillai et al., 1990b; Yuspa et al., 1989). Wurden Zellen in einem Nährmedium mit einer Calciumkonzentration unter 0,05mM kultiviert, konnten diese proliferieren. Sie entwickelten aber fast keine interzellulären Kontakte, breiteten sich nur sehr langsam aus und verhornten kaum. Wurde nun aber die Konzentration von extrazellulärem Calcium ( $Ca_{ex}$ ) schlagartig auf über 1mM erhöht, so zeigt sich eine sehr schnelle Umverteilung von Desmoplakinen, Cadherinen, Integrinen, Aktinen aus dem Zytoplasma zur Membran hin, um dort interzelluläre Kontakte zu etablieren (Hennings et al., 1980b; Braga et al., 1995). Calcium bewirkt auch eine neue Verteilung von Protein Kinase  $C\alpha$  (PKC $\alpha$ ) (Denning et al., 1995), des Tyrosin-phosphorylierten p62-assoziierten Proteins von ras GAP (Filvaroff et al., 1994), und von Calmodulin in Richtung Membran, die wiederum den Calcium-induzierten Signal-mechanismus unterstützen. Nun läuft der Aufbau der Hornhülle wie oben beschrieben binnen 1-2 Tagen ab (Hennings et al., 1981; Pillai et al., 1990a). Die Relevanz der Calcium-induzierten Differenzierung zeigt sich *in vivo* durch den von außen nach innen abfallenden Calciumgradienten in der Epidermis, wobei es scheint, dass das Calcium der Epidermis hilft, den Differenzierungsstatus aufrecht zu erhalten (Elias et al., 2002; Tu et al., 2004).

Der Mechanismus, durch welchen die Keratinozyten auf das  $Ca_{ex}$  reagieren, ist noch nicht ausreichend untersucht. Bikle und Mitarbeiter (Bikle et al., 1996b) konnten einen multiphasischen Anstieg von freien intrazellulären Calciumionen ( $Ca_{in}$ ) in Keratinozyten zeigen. Einem anfänglich steilen Anstieg von intrazellulären Calciumionen folgt ein verlängertes Plateau, wobei sich der Anstieg von intrazellulärem Calcium maximal auf undifferenzierte Zellen auswirkt und mit zunehmender Differenzierung nachlässt (Sharpe et al., 1989). Adenosintriphosphat (ATP) und Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) z.B. aktivieren einen kurzfristigen  $Ca_{in}$  Ausstoß, können aber Keratinozyten nicht zur Differenzierung stimulieren (Pillai and Bikle, 1992).

**Der Calciumrezeptor:** Keratinozyten erkennen das  $Ca_{ex}$  über einen G Protein-gekoppelten Parathyroid-Rezeptor verwandten Calciumrezeptor (CaR) (Bikle et al., 1996a; Chattopadhyay et al., 1996b; Hebert and Brown, 1995) und bilden zusätzlich noch eine alternative gespleißte Variante des Rezeptors im Laufe der Differenzierung aus (Oda et al., 1998b). Durch Deletionsversuche in Maussystemen mit der ungespleißten Variante (Oda et al., 2000) konnte des Weiteren gezeigt werden, dass dem Standardrezeptor eine wichtige

Bedeutung in der terminalen Differenzierung von Keratinozyten zufällt (Komuves *et al.*, 2002). So wurde durch Blockierung der Synthese des CaR mittels eines Antisense-Konstrukts die Fähigkeit von Calcium, den  $Ca_{in}$  zu erhöhen und somit Gene für Involucrin und TGs zu exprimieren, verhindert (Tu *et al.*, 2001).

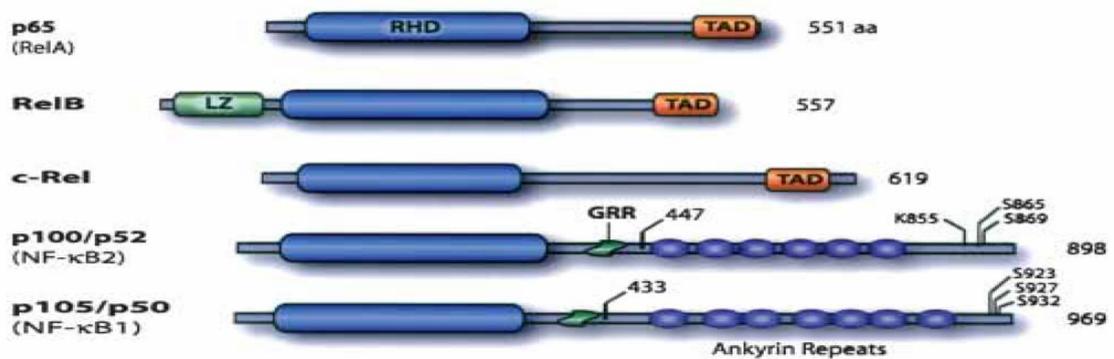
**Die Phospholipase C:** Nach einer Calciumstimulation erhöhen sich die Inositol 1,4,5-Trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DG) - Werte in kürzester Zeit und aktivieren den Phospholipase C (PLC) abhängigen Signalweg (Jaken *and* Yuspa, 1988). Durch die vermehrte Synthese von  $IP_3$  werden aus intrazellulären Speichern Calciumionen ausgeschüttet. Dies hat eine terminale Differenzierung der Keratinozyten zur Folge (Oda *et al.*, 1998a). Beide Werte,  $Ca_{in}$  und  $IP_3$ , bleiben nun über Stunden erhöht, was zu einer stetigen Aktivierung des PLC Signalweges führt. Diese konstante Stimulation des Signalweges wird durch eine Calcium - induzierte Aktivierung der PLC- $\gamma$ 1 vermittelt (Punnonen *et al.*, 1993), obwohl der erste Anstieg von  $IP_3$  und  $Ca_{in}$  nach der Calciumstimulation von PLC- $\beta$  vermittelt wird (Xie *et al.*, 2005). Die lang andauernde Aktivierung von PLC- $\gamma$ 1 wird von einer erhöhten Expression von Tyrosinkinasen der Src-Familie begleitet, die wiederum durch Calcium induziert werden. Diese Tyrosinkinasen sind ihrerseits zur Calcium vermittelten Aktivierung der PLC- $\gamma$ 1 nötig (Zhao *et al.*, 1992; Calautti *et al.*, 1995). Verhindert man die Expression der PLC- $\gamma$ 1 durch ein Antisensekonstrukt, verhindert man auch die Calcium-induzierte Differenzierung (Xie *and* Bikle, 1999).

**Die Calciumkanäle:** Das intrazelluläre Calciumsignal umfasst nicht nur den Eintritt von  $Ca_{ex}$  über die Plasmamembran, sondern auch die Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), was durch PLC und  $IP_3$  vermittelt wird (Bikle *et al.*, 2001; Chattopadhyay *et al.*, 1996a). Dieser Calcium Influx findet über verschiedene Calciumionenkanäle, die nach dem Prinzip von Speicher-aktivierten Kanälen (*store-operated channels*, SOC) funktionieren, statt (Mauro *et al.*, 1993; Grando *et al.*, 1996). Sie reagieren auf Aktivierung von  $IP_3$ -Rezeptoren mit vermehrter Ausschüttung von Calcium aus den intrazellulären Speichern. Blockiert man die  $IP_3$ -Rezeptoren und die PLC-Aktivität, so verhindert man die Öffnung der Kanäle (Cai *et al.*, 2005). Blockiert man hingegen die Expression des Calciumrezeptors, reduziert man die intrazellularen Calciumspeicher und steigert dadurch die SOC Aktivität.

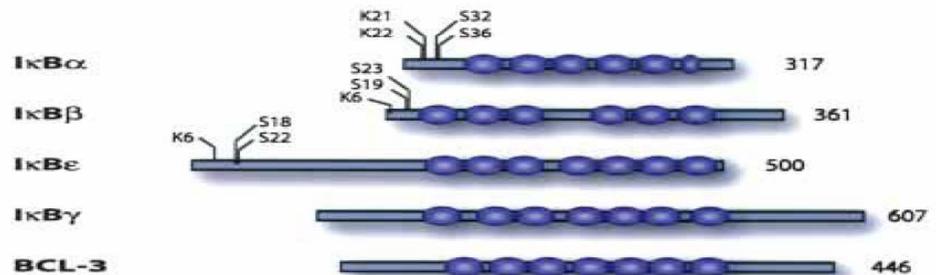
### 1.3 NF- $\kappa$ B in der Hautdifferenzierung

Die Nuklear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus einer Gruppe von verwandten, evolutionär konservierten DNA-bindenden Proteinen, unter anderem p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (relA), c-Rel und RelB. In den meisten Zelltypen ist der heterodimere NF- $\kappa$ B Faktor im Zytoplasma durch den inhibitorischen Faktor I $\kappa$ B, Inhibitor von  $\kappa$ B, welcher in verschiedenen Isoformen (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  und I $\kappa$ B $\gamma$ ) vorkommt, gebunden (Regnier et al., 1997; Zandi and Karin, 1999; Hayden and Ghosh, 2004c).

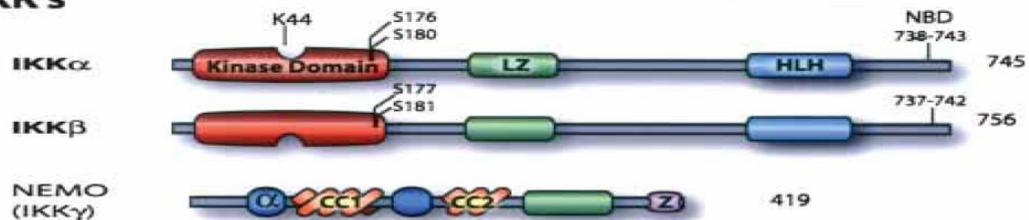
#### A NF- $\kappa$ B/Rel Family



#### B I $\kappa$ B Family



#### C IKK's

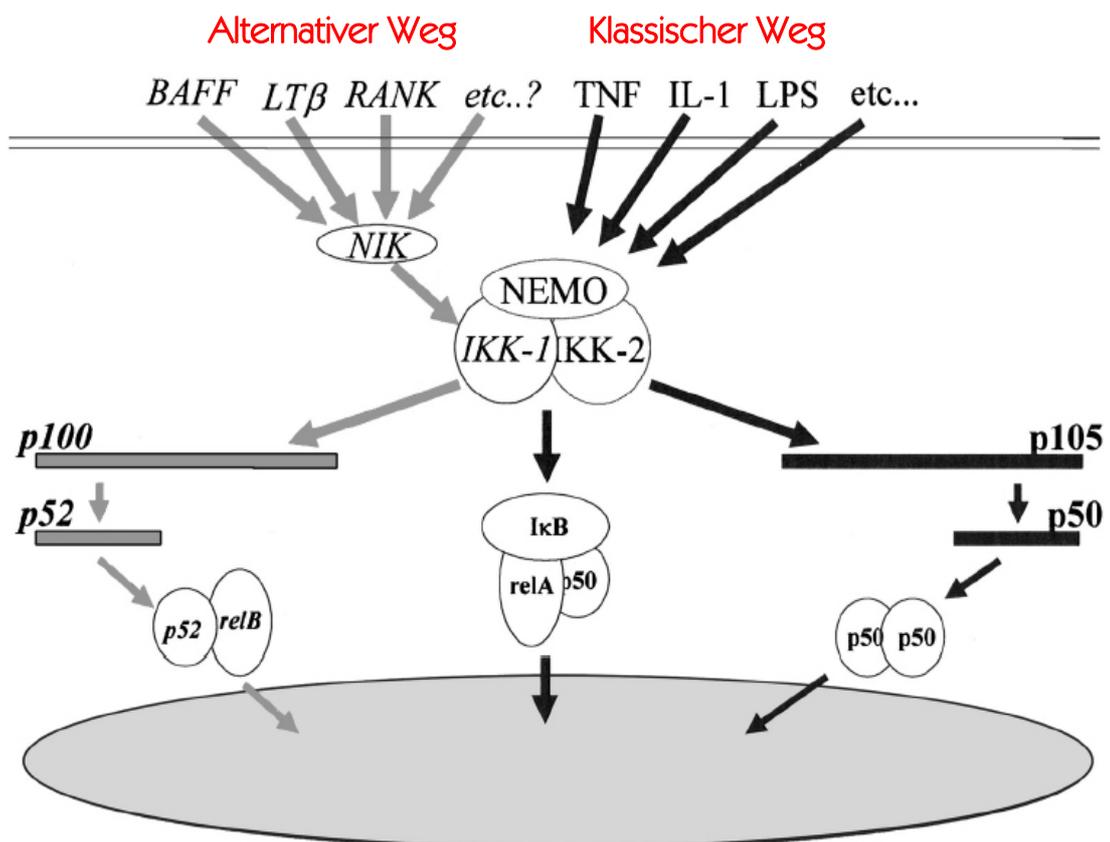


**Abb.1.3: Schematische Präsentation der NF- $\kappa$ B/Rel, I $\kappa$ B und IKK-Proteinfamilie.**

Aminosäureanzahl rechts hinter jedem Protein. Spaltstellen von p100 (aa447) und p105 (aa433), sowie Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsstellen bei p100, p105 und I $\kappa$ Bs sind angegeben; (RHD) Rel-Homologie-Domäne, (TAD) Transaktivierungsdomäne, (LZ) Leuzin Zipper Domäne, (CRR) Glycin-reiche Region, (HLH) helix-loop-helix-Domäne, (Z) Zink-Finger-Domäne, (CC1/2) coiled-coil-Domäne, (NBD) NEMO Bindestelle, ( $\alpha$ )  $\alpha$ -helikale Domäne (Hayden and Ghosh, 2004a)

Als Antwort auf eine Vielzahl unterschiedlichster Stimuli, wie z.B. inflammatorische Zytokine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), virale Infektionen oder Stress werden I $\kappa$ Bs an zwei speziellen Serinresten phosphoryliert. Diese Modifikation ermöglicht ihre Ubiquitinierung und den Abbau mittels proteasomaler Degradation. Dadurch kann das freie NF- $\kappa$ B in den Zellkern eindringen und zur Transkription von Genen beitragen, welche an einer Immun- oder inflammatorischen Antwort, bei Zelladhäsion, aber auch bei Wachstumskontrolle und Regulation von Apoptose beteiligt sind (Karin and Ben Neriah, 2000; Hayden and Ghosh, 2004b).

Bis auf ultraviolettes (UV) Licht greifen alle NF- $\kappa$ B Aktivatoren über einen hochmolekularen I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) in den Signalweg ein. Dieser Komplex besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK1 bzw.  $\alpha$  und IKK2 bzw.  $\beta$ ), einer regulatorischen Untereinheit (NEMO/IKK $\gamma$ ) und möglicherweise weiteren, aber weniger gut charakterisierten, Untereinheiten (Chen *et al.*, 2002).



**Abb.1.4: Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B.**

Der klassische Weg (rechts, schwarz) über NEMO aktiviert die I $\kappa$ B gebundenen Untereinheiten wie z.B. relA/p50 oder c-rel/p50 und ermöglicht so die Prozessierung von p50 aus dem Vorläufer p105. Der NEMO unabhängige nicht-kanonische Weg (grau) erlaubt die Prozessierung des p52-Vorläufers p100 und somit die Dimerisierung von p52 mit relB (Courtois, 2005).

NEMO wird auf dem X-Chromosom kodiert und besteht aus verschiedenen strukturellen Domänen, darunter zwei Spiraldomänen (coiled-coil), einem Leuzin-Zipper und einem Zinkfinger. Die NEMO-vermittelte Aktivierung via IKK als Antwort auf die meisten NF- $\kappa$ B-aktivierenden Stimuli ist als klassischer oder „kanonischer“ Signalweg bekannt. Dies konnte mit NEMO-defizienten Zelllinien gezeigt werden (Yamaoka *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu brauchen andere Stimuli, wie z. B. BAFF (*B cell activation factor*) oder LT $\beta$  (Lymphotoxin  $\beta$ ), kein NEMO, sondern können die IKK über NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*) aktivieren. Diese Signalkaskade ist als alternativer bzw. „nicht-kanonischer“ Weg bekannt.

Durch die Generierung transgener Mäuse konnte der Einfluss von NF- $\kappa$ B speziell auf die Hautentwicklung gezeigt werden. Seitz und Mitarbeiter (Seitz *et al.*, 1998a) generierten zwei verschiedene Mausmodelle, in denen auf unterschiedliche Weise mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg interferiert wurde. Zum einen wurde eine nichtdegradierbare Form von I $\kappa$ B $\alpha$  generiert, dessen Expression epidermal beschränkt wurde. Dadurch wird eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der Epidermis verhindert. Zum anderen wurde NF- $\kappa$ B durch Überexpression von aktiven p50- und p65-Untereinheiten aktiviert. Mäuse, welche die dominant negative Form von I $\kappa$ B $\alpha$  exprimierten, zeigten hochgradig hyperplastische Epithelien, wohingegen letztere Mausmodelle eine epidermale Hypoplasie und Wachstumsinhibition aufwiesen (Seitz *et al.*, 1998b). Ähnliche hyperplastische Epithelien konnten nach Verlust von IKK $\alpha$  gezeigt werden. Allerdings starben viele dieser Mäuse kurz nach der Geburt mit einer dysregulierten epidermalen Differenzierung (Takeda *et al.*, 1999a; Li *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999c). Diese *in vivo*-Studien zeigen eine hemmende Rolle von NF- $\kappa$ B in Bezug auf Keratinozytenwachstum und epidermale Hyperplasie. Auch wurden *knockout*-Mäuse für andere NF- $\kappa$ B Signalkomponenten generiert, z. B. gegen relA (Gugasyan *et al.*, 2004) und NEMO (Schmidt-Supprian *et al.*, 2000). Pasparakis und Mitarbeiter untersuchten die Funktion von IKK2 durch genspezifische Modifikation in epidermalen Keratinozyten. So konnte im Mausmodell durch die Deletion von IKK2 eine schwere psoriasiforme epidermale Hyperplasie gezeigt werden. Diese inflammatorische Antwort ist TNF-vermittelt, aber unabhängig von T-Zellen (Pasparakis *et al.*, 2002b). Weiters konnte durch die Einkreuzung von TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) defizienten Mäusen in die IKK2 defiziente Mauslinie eine Wiederherstellung der entzündungsfreien, normalen Epidermis gezeigt werden. Dies zeigt die wichtige Rolle von TNFR1 in der NF- $\kappa$ B vermittelten Pathogenese. So bestätigen Pasparakis und Mitarbeiter, dass eine Deletion von IKK2 nicht direkt mit der keratinozytären Proliferation und Differenzierung in Verbindung steht. Sie vermuten, dass die beobachtete Hyperplasie der Epidermis durch sekundäre Mechanismen der Inflammation der Haut hervorgerufen wurde.

Allerdings zeigten andere Versuche eine gegensätzliche Rolle von NF-κB zu oben Genanntem auf. Dabei wurde der NF-κB Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetat, TPA) oberflächlich aufgetragen und eine sichtliche Verdickung der Epidermis erzeugt (Qin et al., 1999a). Außerdem werden TNF-α und andere NF-κB aktivierende Zytokine in psoriatisch veränderter Haut, also unter Bedingungen aberranter Hyperproliferation, in großen Mengen exprimiert (Bonifati and Ameglio, 1999). Auch eine Resistenz gegen UV-induzierte Apoptose wurde mit einer *in vitro* NF-κB Aktivierung assoziiert (Qin et al., 1999b; Chaturvedi et al., 1999a).

#### 1.4 Einfluss von NF-κB auf Entzündungsreaktionen der Haut

Trotz der Komplexität des NF-κB Signalwegs findet eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors sehr schnell statt, wodurch sich dieser evolutionär für die Weiterleitung von proinflammatorischen Stimuli eignet, denen die angegriffene Zelle durch eine angeborene Immunantwort entgegenwirken kann. Solche Antworten bilden die erste Verteidigungslinien gegen Bakterien-, Pilz-, und virale Infektionen (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997).

NF-κB induziert eine Vielzahl von Genen, die für entzündliche Prozesse relevant sind. Hierzu zählt insbesondere eine große Anzahl proinflammatorisch wirkender Gene, die für Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und zelluläre Rezeptoren kodieren. Einige werden jedoch nicht nur durch NF-κB induziert, sondern sind auch selbst in der Lage, NF-κB zu aktivieren, sodass sich hier ein positiver *feed-back* Mechanismus ergibt.

NF-κB regulierte, immunologisch relevante Gene			
Genklasse	NF-κB reguliertes Gen	Genklasse	NF-κB reguliertes Gen
Zytokine/Wachstumsfaktoren	IL-1α und β	Leukozyten-Adhäsionsmoleküle	ICAM-1
	IL-2, -3, -6, -12, -15		VCAM-1
	TNF-α, TNF-β/LT-α		MAdCAM-1
	IFN-β		E-Selectin
	G-CSF		Immunregulierende Proteine
	M-CSF	MHC Klasse I und II	
		GM-CSF	TCRα und β
Chemokine	IL-8, gro		β <sub>2</sub> -Mikroglobulin
Zytokinrezeptoren	IL-2Rα		TAP1 (Transporter Associated with Antigen Processing)
Stress-Proteine	SAA (Serum Amyloid A precursor)	Transkriptionsfaktoren	c-Rel
	Komplementfaktoren C3, C4 und B		p105
	α <sub>1</sub> -Acid-Glykoprotein		IκB-α
	COX-1, -2		
	INOS		

Tab. 1.1: Beispiele NF-κB-regulierter Zielgene (Messer and Rupec, 2001)

Zusätzlich zu Zytokinen und Chemokinen reguliert NF-κB auch Zelladhäsionsmoleküle, um die Rekrutierung inflammatorischer Zellen aus dem umliegenden Gewebe und den darunter liegenden Blutgefäßen zu ermöglichen (Pahl, 1999; Zhang *and* Ghosh, 2001).

### 1.5 TNF-α vermittelte Zellsignale in Keratinozyten

Ein von NF-κB selbst induziertes proinflammatorisches Zytokin ist der Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), welcher mit einigen weiteren Faktoren der TNF-Superfamilie zugehört (Fraser *and* Evan, 1996). Neben Nekrose kann TNF Apoptose, zelluläre Proliferation, Inflammation, Tumorigenese und Virusreplikation auslösen. Die primäre Rolle von TNF ist die Regulation von Immunzellen, aber es ist auch bekannt, dass es eine große Rolle in pathogenen Regulationsstörungen wie der rheumatoiden Arthritis, Asthma und im septischen Schock spielt.

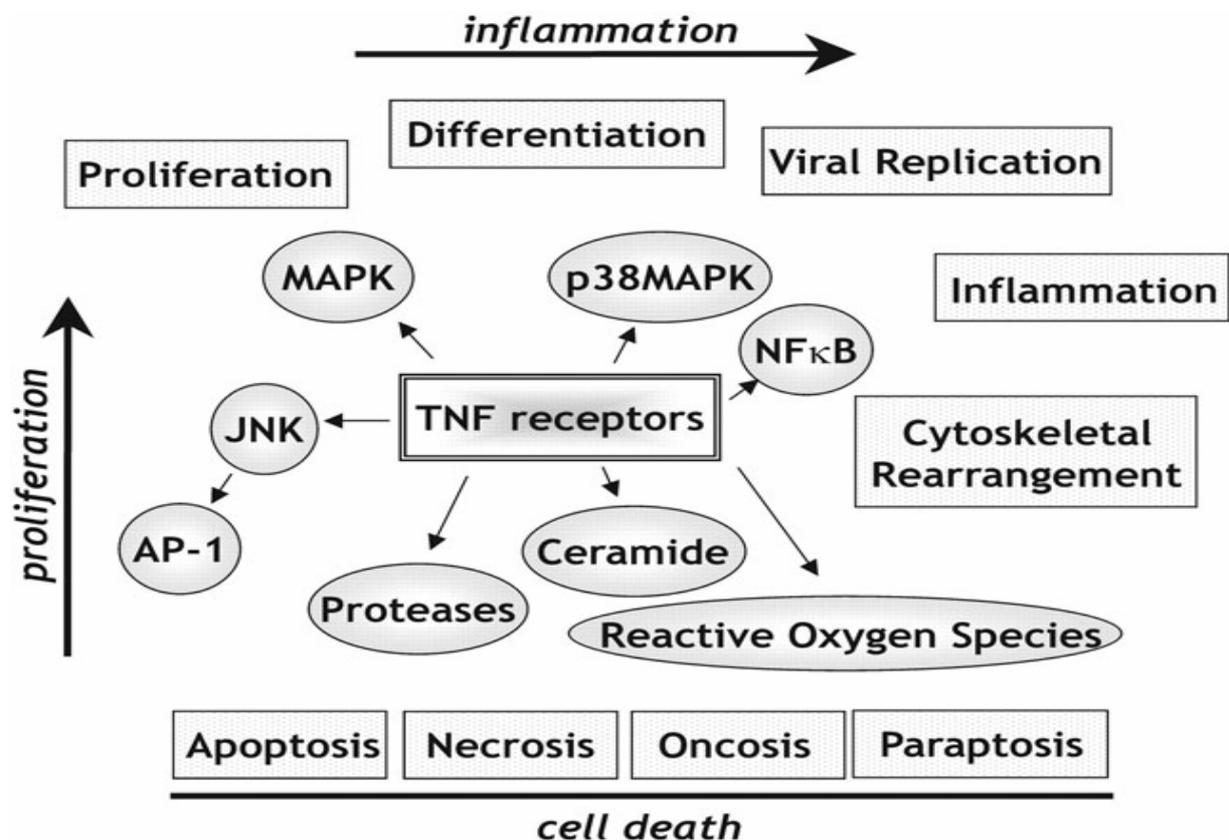


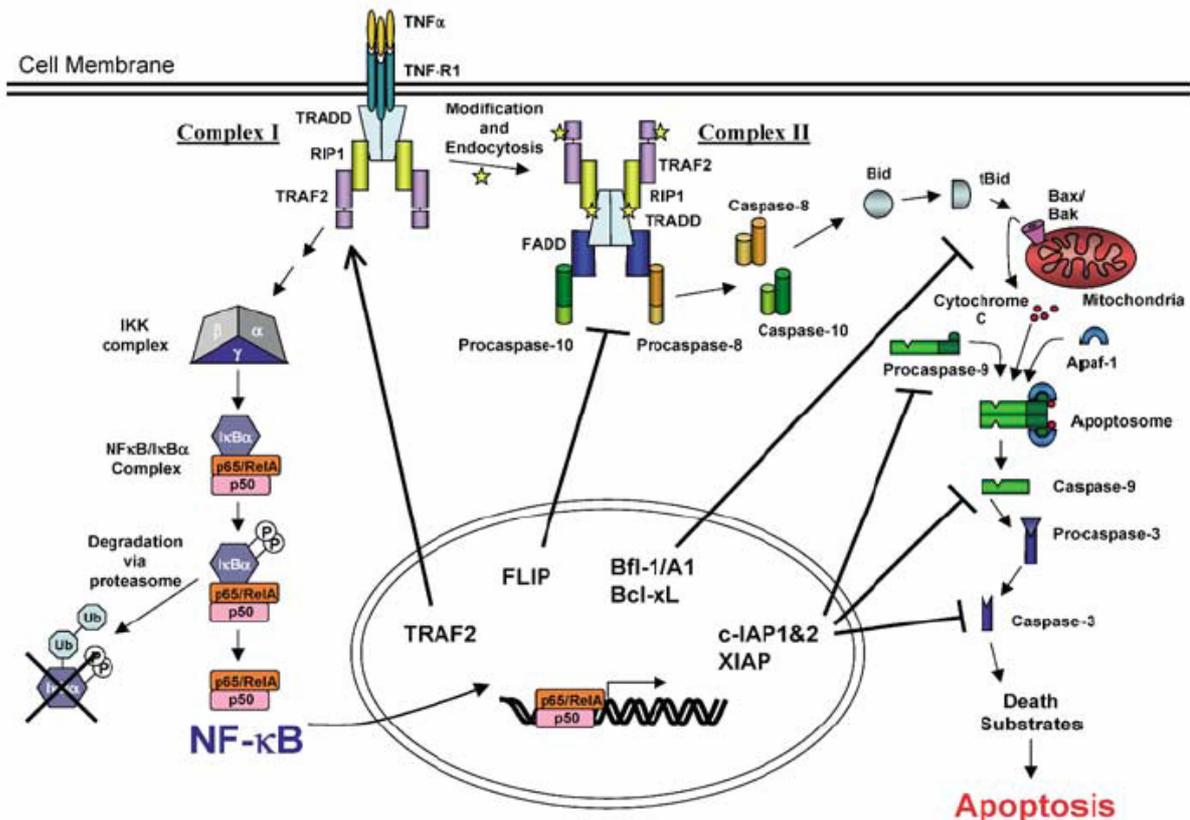
Abb.1.5. TNF Rezeptor vermittelte zelluläre Antworten. (Abbildung aus (MacEwan, 2002)

**Induzierter Zelltod durch Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ):** Der TNF Ligand erzielt alle unterschiedlichen zellularen und pathologischen Effekte durch die Bindung an die Subtypenrezeptoren TNFR1 bzw. TNFR2. Die einzelnen Transmembranglykoproteine weisen eine 28%ige Homologie zumeist in den extrazellulären Domänen aus. Diese wiederum sind aus vier cysteinreichen Tandemsequenzen aufgebaut, wohingegen die intrazellulären Regionen weitestgehend nicht homolog sind. Frühe Publikationen wiesen auf unterschiedliche Signalfunktionen hin (Grell *et al.*, 1994). Beide Rezeptoren weisen verschiedene Motive mit bekannter funktioneller Bedeutung auf. So enthalten die extrazellulären Domänen eine spezielle Domäne (*pre-ligand-binding assembly domain*, PLAD), welche die Rezeptoren vorzeitig komplexiert und besonders bei der Aktivierung durch TNF- $\alpha$  die Ausbildung von Trimeren unterstützt (Chan *et al.*, 2000). TNFR1 enthält ein Todesdomäne-Motiv (*Death-Domain*, DD), welches aus ca. 80 Aminosäuren in der Nähe des Carboxylendes des Rezeptors besteht und essentiell für die Induktion des Zelltodes ist (Tartaglia *et al.*, 1993a). Daran werden TRADD (*TNF-Receptor associated Death Domain protein*) und weitere Adapterproteine rekrutiert. Die trimerisierten TNF-Rezeptoren rekrutieren zusätzlich Caspase 8, welche wiederum die Caspasen 3, 6 und 7 prozessiert und damit aktiviert (Zong *et al.*, 1998b; Abbas *et al.*, 2000). TNFR2 hingegen enthält keine DD, kann allerdings ebenfalls Adaptorproteine wie den TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) binden. Es wird vermutet, dass TNFR2 Apoptose entweder direkt vermitteln kann (Heller *et al.*, 1992; Declercq *et al.*, 1995), oder durch einen so genannten „Ligand-Vermittler“ Mechanismus. Dabei bindet TNFR2 den Ligand länger und stärker, wodurch die lokale Konzentration von TNF- $\alpha$  in der Nachbarschaft zu TNFR1 angereichert wird und somit über TNFR1 die Apoptose induziert wird (Tartaglia *et al.*, 1993b).

Andererseits können über Todesrezeptoren auch inflammatorische Signale übermittelt werden. Hierbei führt die Aktivierung von TRAF2 zur Induktion der IKK/NF- $\kappa$ B Kaskade (Abbas *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2001). Antiapoptotische Zielgene von NF- $\kappa$ B sind wiederum TRAF1 und TRAF2, die, mit TNFR1 assoziiert, das Signal des Rezeptors verändern können und die Inhibitorproteine cIAP1 und cIAP2, die die Caspasen 3 und 7 binden, um so Apoptose zu unterdrücken (Zong *et al.*, 1998a; Wang *et al.*, 1998b; Taylor *et al.*, 1999).

Obwohl sich der TNF- $\alpha$  vermittelte Weg hervorragend eignet, um Apoptose bei vielen Zellen zu initiieren, scheitert dies bei Keratinozyten meist an der erfolgreichen Unterdrückung der Apoptose durch NF- $\kappa$ B. Eine antiapoptotische Antwort beinhaltet Proteine wie TRAF1, TRAF2, cIAP1, cIAP2 (Seitz *et al.*, 2000e; Henseleit *et al.*, 1996) und bcl-XL (Ravi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000) in den suprabasalen Schichten der Epidermis, welche in direkte Bindung oder in Inaktivierung von Caspasen involviert sein können, um so den TNF- $\alpha$  induzierten Signalweg der Apoptose zu blockieren (Wang *et al.*, 1998a; Seitz *et al.*, 2000d;

Qin et al., 2001a). In verschiedenen Versuchen konnte durch die Inhibierung von NF- $\kappa$ B mittels pharmakologischer Inhibitoren bzw. dominant negativer Mutanten gezeigt werden, dass Keratinozyten dann wesentlich anfälliger gegenüber dem TNF- $\alpha$  vermittelten Zelltod waren (Seitz et al., 2000c; Qin et al., 2001b; Chaturvedi et al., 1999b).



**Abb. 1.5: TNF- $\alpha$  Aktivierungsweg**

TNF- $\alpha$  bindet an TNFR1 und führt zur Aktivierung zweier Signalwege. Komplex 1 besteht aus TRAF1, RIP1 und TRAF2 und ist verantwortlich für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dessen antiapoptotischen Genen. Nach diversen Modifikationen rekrutiert der Proteinkomplex FADD, Procaspase 8 und 10, aus denen Komplex 2 gebildet wird, welcher wiederum den apoptotischen Weg aktiviert. Das Überleben der Zelle hängt nun vom Gleichgewicht zw. NF- $\kappa$ B-abhängigen antiapoptotischen und proapoptotischen Faktoren ab, welche die Todeskaskade regulieren können (Kucharczak *et al.*, 2003)

Wie schon bei der Differenzierung der Keratinozyten beschrieben, spielt nicht nur die Keratinisierung, sondern auch die Apoptose eine wesentliche Rolle für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der Haut, (Haake and Polakowska, 1993a; Paus et al., 1993b; Teraki and Shiohara, 1999). Keratinozyten besitzen alle nötigen Komponenten, um Apoptose zu verhindern oder auszuführen (Brysk *et al.*, 1995). Trotzdem wurden bislang relativ wenige Untersuchungen zur Apoptose in gesunder Haut gemacht. So stellt sich immer noch die Frage, ob die Apoptosevorgänge der Haut mit denen anderer Zelltypen vergleichbar sind.

**Terminale Differenzierung versus Apoptose:** Zur Frage, ob die Keratinisierung einer Zelle eine spezielle Form der Apoptose sei, gibt es unterschiedliche Meinungen in der Literatur (Haake and Polakowska, 1993b; Tamada et al., 1994a; Lee et al., 1998). Bei beiden Prozessen kommen die gleichen Mechanismen zum Tragen, wie z.B. die Expression der Calcium-abhängigen Transglutaminasen (Paus et al., 1993a), die bei der Vernetzung der Keratinfilamente nötig sind, oder die Aktivierung der Calcium-abhängigen Endonuklease, die für die Fragmentierung der nuklearen DNA verantwortlich ist (Gandarillas, 2000c). Bei differenzierenden Keratinozyten verhält sich die Fragmentierung der DNA ähnlich wie bei apoptotischen Zellen, hier sind ebenfalls Caspasen involviert (Weil et al., 1999) und beide Prozesse finden in den oberen Schichten der Epidermis statt (Seitz et al., 2000b).

Andererseits gibt es aber auch Autoren, die Differenzierung und Apoptose für grundlegend unterschiedliche Mechanismen halten (Mitra et al., 1997; Haake and Cooklis, 1997; Gandarillas, 2000b; Gandarillas et al., 1999). So ereignet sich Apoptose völlig ohne Neusynthese von Proteinen (Gandarillas, 2000d) und läuft innerhalb von 48 bis 72 h ab (Haake and Polakowska, 1993e; Hockenbery et al., 1991). Ein weiterer Unterschied ist, dass apoptotische Zellen schrumpfen und von anderen Zellen phagozytiert werden, wohingegen verhornende Keratinozyten abgeflacht werden und abschilfern. Nicht zuletzt ereignet sich auch die Kondensation und Fragmentation von DNA, welche als früher Marker für Apoptose gilt (Haake and Polakowska, 1993c), sehr spät in der terminalen Differenzierung (Gandarillas, 2000a).

**Apoptoseempfindlichkeit hängt von der Lokalisation in der Epidermis ab:** In normaler Haut konnte gezeigt werden, dass Basalzellen der Epidermis relativ resistent gegen UV-induzierte Apoptose sind während suprabasale Keratinozyten deutlich empfänglicher dafür zu sein scheinen (Hisa et al., 1995). Anhand von DNA-Fragmentierungsexperimenten konnte ein Unterschied zwischen Keratinozyten aus der Basal- und der Körnerzellschicht in Bezug auf ihr apoptotisches Potential gezeigt werden (McCall and Cohen, 1991a; Tamada et al., 1994b). Wurden die Zellkerne einer erhöhten Calciumdosis ausgesetzt, so zeigte sich auch in Basalzellen eine Fragmentierung, was auf Beteiligung einer Calcium-abhängigen Endonuklease hinweist. Diese Endonuklease wird wahrscheinlich von Inhibitoren in der Basalschicht inaktiviert, und erst durch eine kürzere Halbwertszeit der Inhibitoren zu späteren Zeitpunkten, wenn die Zelle nach außen wandert, aktiviert (Haake and Polakowska, 1993d; McCall and Cohen, 1991b).

## 2. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Bislang sind nur wenige essentielle Faktoren des epidermalen Differenzierungsprozesses identifiziert worden. In vielen unterschiedlichen Zelltypen stellt der IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signalweg einen evolutionär konservierten Signalweg dar, so auch in Keratinozyten, wo NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle in der Regulation von inflammatorischen Prozessen und auch in der epidermalen Regulation von Proliferation und Differenzierung spielt.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch funktionelle Blockade einzelner IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Komponenten die Auswirkungen sowohl auf die Calcium-induzierte Differenzierung als auch die TNF $\alpha$ -vermittelte proinflammatorische Aktivierung zu untersuchen. Durch die Expression retroviraler Mutanten von IKK und I $\kappa$ B $\alpha$  wird der intrinsische Differenzierungsprozess, ausgelöst durch die Erhöhung von extrazellulärem Calcium, unterbunden. Hierdurch können die Auswirkungen der unterschiedlichen Mutanten in Keratinozyten untersucht werden. Spielen die Faktoren IKK1, IKK2 und I $\kappa$ B $\alpha$  bei der Calcium-induzierten Differenzierung beziehungsweise der TNF- $\alpha$  vermittelten Aktivierung eine wichtige Rolle? Dies wird sowohl auf morphologischer Ebene als auch durch Expressionsanalysen von differenzierungsassoziierten Proteinen wie Involucrin und p21 untersucht. Als Antworten auf inflammatorische Stimulantien wie z.B. durch TNF- $\alpha$  wird die Expression des Oberflächensmoleküls ICAM-1 und des Chemokins Interleukin 8, welche beide der Regulation von NF- $\kappa$ B unterliegen, kontrolliert.

Durch die weitere Aufklärung regulatorischer Signalwege und ihrer Komponenten können physiologische und pathologische Vorgänge in der Homöostase der Epidermis erklärt werden. Dies ist ein wichtiger Grundstein für weitere Therapieansätze bei Erkrankungen der Haut.

### 3. Material

#### 3.1 Geräte und diverses Material

Blotting Kammern: Minitrans-Blot Cell	Biorad
Brutschränke, Inkubatoren: HeraCell	Heraeus
Chemikalien für Röntgenfilm Entwickler	AGFA
Elektrophoresekammern (DNA-Gele)	G.Tietsch Mechanikerwerkstatt, MSZ Würzburg
Elektrophoresekammern (EMSA-Gele)	Biorad
Elektrophoresekammern (Protein-Gele)	Biorad
FACS, Durchflusszytometer	BD Biosciences
Flüssig-Szintillationszähler TriCarb 2100TR	Packard
Geltrockner Model 583	Biorad
„Immuno Plates Maxi Sorb“ 96-well Platten für ELISA96	Nunc
Megazentrifuge Megafuge 1,0R	Heraeus
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss
Axiovert 125	Zeiss
Fluoreszenzkamera ProGress C14	Jenoptik
Minizentrifugen Eppendorf 5417C, R	Eppendorf
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll
Phosphoimager Fujix Bas. 2000 II + Software Tina 2.09d	Raytest Isotypenmessgeräte GmbH
Polyvinylidifluorid Membran (PVDF-Membran)	Amersham
Quarzküvetten	Hellma
Röntgenfilme	Amersham
Sephadex G50 Säulen	Roche
Spektral – Photometer	Biorad
Sterilbank Lamin Air HB 2448	Heraeus
Vortex Gerät	IKA
Whatman 3MM Papier	Schleicher & Schüll

#### 3.2 Chemikalien und Reagenzien sowie Reagenzienkits

Allgemeine Labor-Chemikalien	Merck, Roth, SERVA
[ <sup>32</sup> P] γ-ATP	Hartmann

Azeton	Roth
Acrylamid (30%) , Bisacrylamid (0,8%)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose, ultra rein	Gibco-BRL
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem
Bradford-Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Chloroform	Merck
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
DNA - Längenstandardmarker	Sigma bzw. MBI Fermentas
ECL <i>Western blotting</i> Detektionslösung	Amersham
Essigsäure	Applichem
Ethanol p.A.	Roth
Ethidiumbromid 1% Lösung	Gibco-BRL
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylen-glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Glyzerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Sigma
Leupeptin	Serva
Magnesiumazetat	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma
Methanol	Roth
N,N,N',N'-Tetra-Methyl-Ethylen Diamin (TEMED)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
Pefabloc Proteaseinhibitor	Roth

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Applichem
Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF)	Fluka
Poly (d(I-C))	Roche
Propidiumiodid	Sigma
Protein A - Agarose	Roche
QIAGEN Plasmid Reinigungskit (Mini, Maxi)	Qiagen
rauchende Salzsäure	Merck
TPA-Phorbol ester	Sigma
Tris Base	Sigma
Triton X-100	Sigma
OptEIA™ ELISA Set Interleukin-8 (IL-8)	B&D Biosciences
Tween 20	Roth
Benzamidin	Sigma
HEPES	Roth
β - Mercaptoethanol	Sigma

### 3.3 *Enzyme*

Allgemeine Enzyme (Restriktionsenzyme, Polynukleasen, Ligasen)	MBI Fermentas, Promega, NEB
T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK)	Promega

### 3.4 *Pharmakologische Inhibitoren, rekombinante Zytokine & Substratproteine*

BAY 11-7082	Calbiochem
His-TRAIL	IMM (Düsseldorf)
IKK-2 Inhibitor, SC-514	Calbiochem
Interferon gamma (IFN-γ)	Sigma
Interleukin 1β (IL-1β)	Sigma
Glutathion S-Transferase (GST)-IκBα	MSZ (Würzburg)
Tumor Nekrose Factor alpha (TNF-α)	Sigma

### 3.5 Lösungen, Medien und Puffer

Transportmedium NHEK	250ml DMEM 250µg/ml Amphotericin B 100µg/ml Penicillin/Streptomycin
Sucrose/Trypsin –Lösung	0,1g Sucrose 0,25g Trypsin 1mM EDTA (2ml aus 50mM stock) Auffüllen auf 100ml mit PBS Steril filtrieren und zu je 10ml einfrieren (-20°C)
5x SDS Probenpuffer	5% Natriumdodecylsulfat (SDS) 50% Glycerin 25% β-Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau 155mM Tris-HCl ; pH 6,8 wurde verdünnt auf 1x
Trenngel-Vormix	1,5M Tris pH 9,0 0,4% TEMED 0,4% SDS in ddH <sub>2</sub> O
Sammelgel-Vormix	140mM Tris pH 6,8 0,11% TEMED 0,11% SDS in ddH <sub>2</sub> O
1x SDS-Polyacrylamidgel-Laufpuffer	25mM Tris 250mM Glycin 0,1% SDS in ddH <sub>2</sub> O
1x Blotting-Puffer	39mM Glycin 48mM Tris 0,37% SDS 20% Methanol in ddH <sub>2</sub> O
1x PBS – Tween (PBST)	0,05% Tween 20 in 1x PBS
Milchpulver <i>Blocking</i> Puffer (Western Blot)	5% Magermilchpulver in 1x PBST

Triton Lyse Puffer (TLB)	20mM Tris pH 7,4 137mM Natriumchlorid 10% Glyzerin 1% Triton X-100 2mM EDTA 50mM Natrium-β-Glycerophosphat 20mM Natriumpyrophosphat Frisch zugesetzt: 0,2mM Pefabloc 5µg/ml Leupeptin 5µg/ml Aprotinin 1mM Natriumorthovanadat 5mM Benzamidin
Kinasepuffer	10mM Magnesiumchlorid 25mM HEPES pH 7,5 25mM Natrium-β-Glycerophosphat Frisch zugesetzt: 5mM Benzamidin 1mM Natriumorthovanadat 0,5mM Dithiothreitol (DTT)
5x Tris Borat Laufpuffer (EMSA)	108g Tris 55g Borsäure 7,44g EDTA Auffüllen auf 2l mit ddH <sub>2</sub> O pH 8,0 verdünnen auf 0,25x
Kernextrakte Puffer A (EMSA)	10mM HEPES/KOH pH 7,9 1,5mM MgCl <sub>2</sub> 10mM KCL 0,5mM DTT 0,2mM PMSF
Kernextrakte Puffer C (EMSA)	20mM HEPES/KOH pH 7,9 25% Glyzerin 420mM NaCl 1,5mM MgCl <sub>2</sub> 0,2mM EDTA 0,5mM DTT 0,2mM PMSF

Gelshift Marker (EMSA)	25% Ficoll 0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylincyanol Auffüllen auf 10ml mit ddH <sub>2</sub> O
Annexin V-Bindungspuffer	10mM HEPES/NaOH pH 7,4 140mM NaCl 2,5mM CaCl <sub>2</sub>
Nicoletti-Reagenz	50µg/ml Propidiumjodid (PI) 0,1% Natriumcitrat 0,1% Triton

### 3.6 Zellkulturmaterial

Chelex® 100 Resin (100-200 mesh)	Biorad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM); <i>high Glucose</i>	PAA
Eagle's minimal essential Medium, ohne CaCl <sub>2</sub> (EMEM)	PAA
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest
Hexadimethrine Bromide (Polybrene)	Sigma
Keratinocyten-Wachstumsmedium ohne CaCl <sub>2</sub> (KGM-2)	Clonetics, Cambrex
LAB-TEK II <i>chamber Slide</i> System	Nalgene NUNC
L-Glutamin	Gibco-BRL
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Neubauer Zählkammer	Brand
OptiMEM	Gibco-BRL
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco-BRL
Sucrose	Sigma
Trypanblau	Gibco-BRL
Trypsin Neutralisierungslösung (TNS)	Clonetics, Cambrex
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL
Zellkulturflaschen und -schalen	Sarstedt, Greiner
Zeozin	Invitrogen

### 3.7 Antikörper und Antiseren

#### Primärantikörper:

Kaninchen anti-ERK-2 (C-14)	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen anti-IKK- $\alpha/\beta$	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen anti-I $\kappa$ B $\alpha$ (C-21)	Santa Cruz Biotechnology
Maus IgG1 anti-Involucrin (Sy5)	Sigma
Maus IgG1 anti-human p21 <sup>WAF-1</sup>	Oncogene
Kaninchen anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 (ser276)	Cell Signaling Technologies
Kaninchen anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 (ser468)	Cell Signaling Technologies
Kaninchen anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 (ser536)	Cell Signaling Technologies
Kaninchen anti NF- $\kappa$ B p65 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti IgG1 Human CD-54 Biotin- konjugiert (ICAM1)	BD Pharmingen
Anti-human IL-8 ( <i>Capture Antibody</i> , ELISA)	BD Pharmingen
Biotinyliertes anti-Human IL-8 ( <i>Detection Antibody</i> , ELISA)	BD Pharmingen
Recombinantes Human IL-8 (Standard, ELISA)	BD Pharmingen

#### Sekundärantikörper:

Streptavidin Cy-Chrome <sup>TM</sup> Konjugat	BD Pharmingen
Ziege Anti-Kaninchen IgG - Horse Radish Peroxidase (HRP)	Promega
Ziege Anti-Maus IgG - Horse Radish Peroxidase (HRP)	Promega
Avidin-HRP Konjugat (Enzyme Reagent, ELISA)	BD Pharmingen

### 3.8 Plasmide und Oligonukleotide

Name	Insert / Verwendungszweck	Zitat / Firma
PEGZ - GFP		(Kuss <i>et al.</i> , 1999)
PEGZ mut I $\kappa$ B $\alpha$	Mutiertes nicht degradierbares I $\kappa$ B $\alpha$	(Denk <i>et al.</i> , 2001i)
PEGZ IKK1 KD	Kinase defiziente Mutante von IKK1	(Denk <i>et al.</i> , 2001d)
PEGZ IKK2 KD	Kinase defiziente Mutante von IKK2	(Denk <i>et al.</i> , 2001h)
PEGZ IKK2 EE	Konstitutiv aktive Mutante von IKK2	(Denk <i>et al.</i> , 2001c)
PEGZ IKK2 EEA10	Konstitutiv aktive Mutante von IKK2	(Denk <i>et al.</i> , 2001f)
PVSV-G	Virales Glykoprotein	CLONTECH
PGAG-Pol	retrovirale Hüllenproteine und Polymerasen	CLONTECH
NF- $\kappa$ B Oligonukleotid	EMSA-Sonde	Promega

### 3.9 Zellen und Bakterienstamm

HaCaT	spontan immortalisierte humane Keratinozytenlinie (Boukamp <i>et al.</i> 1988); Prof. Dr. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
NHEK	primäre, normale humane epitheliale Keratinozyten (NHEKs) wurden anfangs aus frisch biopsierten Vorhäuten gesunder Neugeborener selbst isoliert (siehe Abschnitt. 4.2.3.). Die Vorhäute stammen aus dem American Military Hospital, Würzburg. Im späteren Verlauf der Arbeiten wurden die NHEK bei der Firma Cambrex bereits vorisoliert und gepoolt bestellt.
Phönix	amphotrophe Virus-Verpackungszelllinie basierend auf <i>human embryonic kidney</i> (HEK) 293T Zellen. (Orbigen Inc.)
DH5 $\alpha$	hitze-kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterienstamm zur Transformation und Amplifikation von Plasmiden (Bethesda Res. Lab.). Der Genotyp ist bei Sambrook <i>et al.</i> beschrieben.

## 4. Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, sind die nachfolgenden Methoden in Anlehnung an die beschriebenen Protokolle von Sambrook (Sambrook *and* Russell, 2001) durchgeführt worden.

### 4.1 Arbeiten mit Bakterien und DNA

**Übernachtkulturen:** 3ml ampicillinhaltiges LB-Medium (10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl in 1l ddH<sub>2</sub>O) oder *CircleGrow* (40g/l in ddH<sub>2</sub>O) wurden nach dem Autoklavieren mit 100µg/ml Ampicillin versetzt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei ca. 200UPM inkubiert.

**Herstellung kompetenter Bakterien:** 5ml einer Übernachtskultur von *E.coli* DH5α wurden mit 495ml LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>550nm</sub> von 0,5 geschüttelt. Nach einer Abkühlphase (10min) auf Eis wurde die Bakteriensuspension bei 2500UPM und 4°C abzentrifugiert und in 40ml eiskalten, sterilem 0,1M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen, weitere 15 min. auf Eis inkubiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun in 15ml eiskaltem 0,1M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 15min stehen gelassen. Abschließend wurde die Suspension mit 2,5ml eiskaltem Glycerin versetzt und in 200µl Aliquots in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Aliquots konnten so bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurden verschiedene Plasmid-DNA-Konzentrationen verwendet. Sie sollte bei ca. 10<sup>7</sup> transformierten Kolonien pro µg DNA liegen.

**Transformation von Bakterien:** Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente DH5α- Bakterien erfolgte mittels der Hitzeschockmethode (Sambrook *and* Russell, 2001). Die aus -70°C entnommenen Bakterienaliquots wurden langsam auf Eis aufgetaut und zu je 40µl Aliquot vorsichtig 1µg Plasmid-DNA untergemischt. Nach 30min Inkubation auf Eis folgte ein 90sec Hitzeschock bei 42°C und 1ml LB-Medium. Nun wurde die Kultur zur Erholung noch 1h bei 37°C geschüttelt. Die gesamte Menge der Bakteriensuspension wurde nun auf LB-Amp-Bakterienkulturplatten (100µg/ml Ampicillin in 1,4% Agar-Agar in LB-Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die überlebenden Kulturen konnten aufgrund des vom Plasmid exprimierten Ampicillinresistenzgens proliferieren.

**Mini- bzw. Maxipräparation von Plasmid-DNA:** Die für eine Transfektion von Säugerzellen benötigten größeren Mengen an gereinigter Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid MINI bzw. MAXI Kits nach den jeweiligen Herstellerangaben isoliert. Das Verfahren entspricht einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim (Birnboim, 1983) mit anschließender Aufreinigung durch eine Ionenaustauschersäule. Die photometrische Messung der DNA Lösung bei 260nm und 280nm erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA, wobei der Quotient aus  $OD_{260nm}:OD_{280nm}$  bei einer hohen Reinheit zwischen 1,6 und 2 liegen sollte.

## 4.2 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Heraeus, Laminair, Sicherheitsstufe 2) mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, sterilen Kunststoffmaterialien oder autoklavierten Glaswaren unter Verwendung steriler Nährmedien durchgeführt. Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Zentrifugation der Zellen fand, soweit nicht anders vermerkt, bei 1000UPM und 25°C (Heraeus, Megafuge) statt.

### 4.2.1 Einfrieren, Lagerung und Reaktivierung der Zellen

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in Kühllagertanks mit flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese durch Inkubation mit Trypsin/EDTA von der Kulturplatte gelöst und in 1ml Einfriermedium bestehend aus 10% DMSO, 10% FCS und 80% des jeweiligen Kulturmediums aufgenommen. Je nach Bedarf wurden die Zellen in kleinere Portionen aliquotiert und in einem Styroporrack über Nacht bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Reaktivierung der Zellen wurden diese so schnell wie möglich in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt in der 10- bis 20fachen Menge an frischem vorgewärmten Medium verdünnt und in Kulturschalen bzw. – Flaschen verteilt. Am folgenden Tag wurden die adhären Zellen zur Entfernung von DMSO-Resten mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

### 4.2.2 Kultivierung von HaCaT-Zellen

Routinemäßig wurde die HaCaT Zelllinie in Anlehnung an die in der Promotionsarbeit von Dr. Marc Schmidt (2001, Würzburg) beschriebenen Kulturbedingungen in DMEM, supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100µg/ml Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Um eine

konstante Proliferationsrate zu erhalten, wurde das Medium alle 2 Tage gewechselt und die Zellen etwa in einem 4-Tage-Rhythmus im Verhältnis 1:5 gesplittet.

Für Differenzierungsexperimente wurden die Zellen in einem „*low-calcium*“ Medium gehalten. Dazu wurden sie für eine Passage in calciumfreiem EMEM Medium, supplementiert mit 10% Chelex behandeltem FCS und 100µg/ml Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Der Calciumgehalt des Mediums wurde mittels einer 250mM Calciumstocklösung (in  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  freiem PBS) direkt auf 0,05mM eingestellt. Um nicht durch das FCS die Calciumionenkonzentration undefiniert zu modulieren, wurden diesem durch eine Behandlung mit Chelex 100 Resin nach der *Batch* Methode zuvor die  $Ca^{2+}$  Ionen entzogen (Hennings et al., 1980a).

#### 4.2.3 Kultivierung neonataler primärer Keratinozyten (NHEK)

Primäre Keratinozyten wurden anfangs aus frisch biopsierten Vorhäuten gesunder Neugeborener selbst isoliert, welche vom *American Hospital* in Würzburg bezogen wurden. Im späteren Verlauf der Arbeiten an der Universität Düsseldorf wurden bereits isolierte und gepoolte NHEKs der Firma Clonetics (via Cambrex) verwendet.

**Gewinnung primärer Keratinozyten aus neonataler Vorhaut:** Zur Präparation der NHEKs wurden Vorhautpräparationen mehrerer Neugeborener (in Transportmedium bei 4°C gelagert, nicht älter als 6-8 Stunden) mehrmals mit sterilem PBS gewaschen und mit einem sterilen Skalpell in ca. 5 x 5mm große Stücke zerteilt. Zur Trennung der Epidermis von der Dermis wurden diese Stückchen mit der Dermis nach oben für 12 bis 16h in 5ml Sucrose/Trypsin-Lösung in 6cm Petrischalen bei 4°C gelagert und am Ende der Inkubationszeit in 10% FCS (in PBS) überführt. Anschließend wurde die Epidermis mit sterilen Pinzetten von der Dermis abgezogen und in einem 15ml Röhrchen mit 1x Trypsin/EDTA für 1h bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden von der Oberseite der Dermis die an ihr verbliebenen basalen Keratinozyten mit dem Skalpell durch mehrmaliges Kratzen abgelöst und in ein 15ml-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde 5min bei 1000UPM abzentrifugiert und nach ungebremstem Auslaufen des Rotors das Pellet in 5ml frischem KGM2 aufgenommen. Nun wurde die Zellsuspension in eine mit FCS vorinkubierte T25-Kulturflasche (2ml FCS für 30min bei 37°C vorinkubieren, dann absaugen) überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anfangs wurde das Medium täglich gewechselt, um die abschwimmenden toten Zellen zu entfernen. Nach 1 bis 2 Wochen wurde in der Primärkultur Konfluenz erreicht.

Primäre Keratinozyten sollten passagiert werden, bevor sie 100% Konfluenz erreichen, weil es sonst, im Gegensatz zu HaCaT Zellen, zur terminalen Differenzierung der Zellen kommt. Wichtig bei der ersten Passage ist, die anderen Zellen der Primärkultur, vor allem

Fibroblasten oder Melanozyten, aus der Kultur durch selektive Trypsinierung zu entfernen. Dazu nützt man den Vorteil, dass sich „Fremdzellen“ unter Trypsineinwirkung schneller vom Boden der Kulturflasche lösen und somit früher entfernt werden können. Um nun einer Vorstimulation in Richtung Differenzierung entgegenzuwirken, wurde ab nun das FCS gegen eine Trypsin-neutralisierende Lösung (*trypsin neutralising solution*; TNS) ausgetauscht.

Zur selektiven Trypsinierung wurde die Primärkultur einmal mit PBS gewaschen und mit 4ml Trypsin/EDTA pro T25 Kulturflasche vorerst für 2min im Brutschrank inkubiert. Alle Zellen außer Keratinozyten lösten sich rasch vom Substrat ab. Sobald diese Zellen nach zusätzlichem mehrmaligem Klopfen gegen den Flaschenboden gelöst wurden, saugte man das Trypsin mit diesen Fremdzellen ab und gab erneut 4ml frisches Trypsin hinzu. Die verbliebenen Keratinozyten brauchten nun ca. weitere 6min zum Ablösen und wurden dann in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß (6ml KGM2 + 8ml TNS) überführt. Die Flasche wurde mit weiteren 5ml KGM2 nachgespült und die Suspension zentrifugiert (5min bei 180xg). Das Zellpellet wurde in 20ml frischem KGM2 resuspendiert und in 2 T75 (75cm<sup>2</sup>) eingesetzt. Diese Flaschen wurden mit 10ml KGM2 ca. 30min bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert.

Bei einem Konfluenzgrad von ca. 70-80% (nach etwa 14 Tagen) wurden die Zellen schließlich abtrypsiniert und nach Bestimmung der Zellzahl aliquotiert zu je 2 bzw. 4 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kryoröhrchen. Die NHEK-Aliquots wurden für 24h bei -80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

**Auftauen und Passagieren primärer Keratinozyten:** NHEKs wurden entweder direkt in 6-well-Platten (5x10<sup>5</sup> Zellen/ml) oder in 6cm Petrischalen (1x10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgetaut. Die jeweiligen Kulturgefäße wurden auch wieder mit „low calcium“ KGM2 (H) für 30min bei 37°C vorinkubiert und dann mit der Zellsuspension beschickt (vgl.: 4.2.1). Hier wurde bereits Keratinozytenmedium mit niedriger Calciumkonzentration (0,05mM CaCl<sub>2</sub>) verwendet, um ein Optimum an Proliferation und ein Minimum an Differenzierung zu erzielen.

**Kommerziell erworbene Keratinozyten der Firma Cambrex:** Kommerziell erhältliche NHEKs wurden vorisoliert und gepoolt in Kryoröhrchen geliefert und nach Protokoll der Firma Cambrex aufgetaut. Kulturgefäße wurden mit KGM2 30min vorinkubiert und die Kryoröhrchen in einer Zelldichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf T25 Flaschen ausgesät. Nach ca. ein bis zwei Wochen wurde eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht und die Zellen ein weiteres Mal mit einer Zelldichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> in T75 Flaschen gesplittet. Wurde nun wieder nach ca. eine Woche die Konfluenz erreicht, dann wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, gezählt und zu 2 x 10<sup>6</sup> bzw. 4x10<sup>6</sup> Zellen pro Aliquot eingefroren. Auch diese Zellen wurden für die Experimente, wie oben beschrieben, direkt verwendet.

#### 4.2.4 Kultivierung von Phönix-Zellen (HEK 293T-Basis)

Phönix-Zellen, basierend auf 293T Zellen, sind Verpackungszelllinien zur Produktion von ecotrophen und amphotrophen Retroviren. Sie wurden in DMEM supplementiert mit 10% FCS, 100µg/ml Penicillin / Streptomycin und 2mM L-Glutamin kultiviert. Diese adhärenen Zellen wurden bei einem Konfluenz-grad von etwa 70-90% in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 passagiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch eine 3- bis 5-minütige Inkubation mit 1x Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) aus der Kulturflasche gelöst. Nach der Zellablösung erfolgten die Aufnahme der Zellen in frischem Medium und die Aussaat in neue Kulturflaschen.

#### 4.2.5 Herstellung von Retrovirus produzierenden Zelllinien mit Lipofectamine 2000

Lipofectamine 2000 ist ein polykationisches lipidhaltiges Reagenz, mit dessen Hilfe DNA, RNA oder Proteine in eukaryontische Zellen eingebracht werden können (Sells *et al.*, 1995). Am Tag vor der geplanten Transfektion wurden  $3 \times 10^6$  Phönixzellen pro 10cm Petrischale ausgesät. Diese Zellen wurden in Antibiotika-freiem DMEM Medium kultiviert, da Penicillin und Streptomycin die Effizienz der Transfektion erheblich mindern.

Zur Transfektion wurden 50µl Lipofectamine 2000 mit 1ml OptiMEM in einem 5ml Röhrchen unter Vortexen tropfenweise gemischt; diese Suspension wurde für 5min bei RT stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden pro 10cm Schale 16µg GAG-Pol, 5µg pVSV-G und 7µg des zu transfizierenden Konstrukts in einem sterilen 5ml Röhrchen vorgelegt.

GAG ist ein Polyprotein und bildet die virale Kernstruktur aus. Durch Zugabe des viralen Hüllproteins Vesikuläres Stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G) wird die Transfektion der Zielzellen erhöht. Pol steht für das Enzym Reverse Transkriptase und ist essentiell für die Umschreibung des viralen RNA Genoms in eine doppelsträngige DNA.

Nach Ablauf der 5min wurde der Lipofectamine–OptiMEM Ansatz wiederum tropfenweise dem DNA Gemisch unter ständigem Vortexen zugegeben. Nun wurde dieser Ansatz für 15min bei RT inkubiert. Bei den Phönixzellen wurde während der Inkubationspause ein Mediumwechsel mit DMEM-FCS (ohne Antibiotika) gemacht, um auch noch letzte Reste von Antibiotika und Trypsin zu entfernen. Nach Ablauf der 15min wurde der DNA-Lipofectamine-OptiMEM Ansatz vorsichtig zu den Zellen pipettiert und zur besseren Mischung leicht geschwenkt. Für die erfolgreiche Transfektion der Zellen wurden diese nun wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Das Gemisch aus Virus und Nährmedium wurde nun 3 Tage lang täglich abgenommen und durch frisches DMEM-FCS ersetzt. Der Virusüberstand selbst wurde gesammelt, nun

entweder frisch verwendet, oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur späteren Verwendung gelagert. Um eine Anreicherung des Virus im Medium zu erzielen, wurden ab dem zweiten Tag allerdings nur noch 5ml frisches Medium pro 10cm Schale verwendet.

**Herstellung stabiler Virus-produzierender Phönix-Zelllinien:** Stabile Phönix-Linien konnten durch Selektionieren der Zellen mit Zeozin ( $400\mu\text{g/ml}$ ) mindestens 48h nach Transfektion hergestellt werden. Dazu sollte jedoch auf jeden Fall eine Kontrolle der GFP-Expression als Kontrolle der Infektion zuvor erfolgen (FACS oder fluoreszenzoptisch). Die Zellen wurden in ausreichender Menge kultiviert und portionsweise eingefroren. Die Zellen müssen nicht dauerhaft unter Selektionsdruck gehalten werden, aber von Zeit zu Zeit nachkontrolliert und ggf. nachselektioniert werden.

#### 4.2.6 Virale Infektion von HaCaT-Zellen

Zwei Tage vor der retroviralen Virusinfektion wurden HaCaT Zellen standardmäßig abgelöst und in 6-well-Platten ausgesät. Pro 6-well wurden 2 bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Die Produzenten-Zellen wurden entweder frisch mit den Konstrukten transfiziert, oder als stabile Zelllinie mit  $3 \times 10^6$  Zellen pro 10cm Schale ausgesät. Am Abend vor der geplanten Transfektion wurden beide Zellarten mit frischem Medium versorgt.

Die Virusinfektion erfolgte an zwei aufeinander folgende Tage in identischer Weise.

Der Virusüberstand von den Phönix-Zellen wurde gesammelt und durch einen  $0,45\mu\text{m}$  Sterilfilter in ein 50ml Röhrchen sterilfiltriert. Nun erfolgte die Zugabe von Polybrene 1:1000 zum Virusüberstand für eine Endkonzentration von  $5\mu\text{g/ml}$ . Das Medium auf den HaCaT Zellen wurde abgesaugt und jedes 6well mit 2ml Virusüberstand / Polybrene überschichtet. Nun erfolgte eine Zentrifugation bei 2000UPM für 3h bei  $30^{\circ}\text{C}$  in Ausschwingrotoren einer Megafuge von Heraeus. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Diese Abfolge der Infektion wiederholte sich am darauf folgenden Tag wieder.

**Transiente Plasmidexpression:** Für eine transiente Expression wurden die Zellen ohne Antibiotika-Selektionierung zwei Tage nach der zweiten Infektionsrunde für Experimente herangezogen. Hierbei ergab sich eine Effizienz von bis zu 70% drei Tage nach Infektion. Die Effizienz wurde mittels GFP-Expression des Plasmids im FACS gemessen.

**Stabile Plasmidexpression:** Um stabile HaCaT Zelllinien zu erhalten, wurden diese mit Zeozin (400µg/ml) für mindestens 14 Tage selektioniert. Anschließend wurden die Zellen in ausreichenden Mengen für spätere Versuche eingefroren.

#### 4.2.7 Retrovirale Infektionen von NHEK Zellen

Primäre Keratinozyten sind im Gegensatz zu HaCaTs um einiges empfindlicher, beispielsweise gegenüber Stress und können auch leichter ausdifferenzieren. Daher wurde hier das Protokoll zur retroviralen Infektion abgewandelt.

Zur Infektion der NHEKs wurden die Virus-produzierenden Phönix-Zellen am Vorabend mit 5ml „*low calcium*“ KGM2 (H) überschichtet. Am Morgen des Infektionstages wurde das Medium abgenommen und gepoolt. Die Phönix-Zellen wurden nun für zwölf Stunden mit frischem DMEM versorgt. Am Abend wurden die Zellen wieder mit 5ml „*low calcium*“ KGM2 (H) überschichtet.

So wurde gewährleistet, dass die Phönix Zellen keinen all zu großen Schaden wegen fehlender Wachstumsfaktoren nahmen, jedoch die Keratinozyten während der Infektion nicht der höheren Calcium-Konzentration des DMEM (ca. 0,15mM) ausgesetzt werden mussten.

Der Virusüberstand gleicher Linien wurde vereinigt, sterilfiltriert und mit 5µg/ml Polybrene versetzt. Die Zellen, ausgesät in 6well-Platten, wurden auch hier wieder mit je 2ml Virusmedium überschichtet. Der Zentrifugationsschritt wurde - anders als bei HaCaTs - in einer auf 32°C erwärmten Zentrifuge für 3h bei 300xg durchgeführt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem KGM2 (H). Im Gegensatz zu HaCaTs wurden die primären Keratinozyten nur einmal infiziert, das heißt die Zellen bekamen täglich frisches „*low calcium*“ Medium und wurden 48h nach Infektion den Versuchen zugeführt.

Da eine Selektion mit Zeozin eine Wirkung nach ca. 7 bis 10 Tagen zeigt, wurden alle Experimente mit transient infizierten nicht selektierten Keratinozyten durchgeführt.

#### 4.2.8 Immunfluoreszenzoptische Dokumentation der Transfektionseffizienz

Um die Infektionseffizienz des gewünschten Plasmids kontrollieren zu können, wurde ein Vektor gewählt, der zusätzlich „*green fluorescence protein*“ (GFP) exprimiert. Die Fluoreszenz konnte wahlweise mittels FACS (vgl.: Kapitel 4.3.6) bzw. Fluoreszenzmikroskop angeregt und analysiert werden. In Phönixzellen wurden nach Transfektion mit Lipofectamine 2000 ca. 60% und in Keratinozyten mittels retroviraler Infektion bis zu 90% Effizienz erzielt.

#### 4.2.9 Stimulation und Inhibitorinkubation

Um nun die Differenzierung der NHKs zu induzieren, wurde das „*low calcium*“ Versuchsmedium KGM2 (H) gegen ein „*high calcium*“ Stimulationsmedium KGM2 ausgetauscht. Dazu wurde Calcium in einer Endkonzentration von 1,0mM aus einer Stocklösung von 250mM Calciumchlorid (in PBS, sterilfiltriert) direkt zu dem Kulturmedium pipettiert und die Kulturschale zur Mischung sanft geschwenkt. Bei der Verwendung anderer Stimuli wurden die Agenzien ebenfalls direkt aus einer Stocklösung dem Kulturmedium zupipettiert, oder, bei Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen, in dem jeweiligen Lösungsmittel vorverdünnt. Bei Zugabe von Inhibitoren wurde genauso verfahren und diese vor Stimulation jeweils für 60min vorinkubiert. Die eingesetzten Endkonzentrationen der verwendeten Stimuli und Inhibitoren sind im Ergebnisteil im Detail angegeben.

#### 4.3 Proteinanalyse

##### 4.3.1 Lysis humaner Keratinozyten zur Proteinanalyse

Zur Lyse von Zellen wurden diese nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS direkt in der Kulturschale für mindestens 30min bei 4°C in TLB-Puffer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in ein gekühltes Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4°C und 14000UPM abgetrennt. Der Proteingehalt in den Überständen wurde standardmäßig unter Verwendung des BioRad-Proteinassays nach Herstellerangaben im Photometer bestimmt. Für den Westernblot bestimmte Lysate wurden bei -20°C und Lysate für den EMSA bei -80°C gelagert.

##### 4.3.2 Immunpräzipitation

Die zu erntenden Zellen wurden wie oben beschrieben lysiert und pelletiert. Abschließend wurde ihr Proteingehalt bestimmt. Die Ansätze wurden auf eine bestimmte Proteinkonzentration eingestellt ( $\geq 300\mu\text{g}$ ). Jedem Ansatz wurden 25 $\mu\text{l}$  Protein A-Agarose (bei Maus- und Kaninchen-Antikörper) und 1-5 $\mu\text{l}$  Antikörper gegen das zu untersuchende Protein zugefügt. Nach der Inkubationszeit von 3h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsschüttler wurden die entstandenen Immunkomplexe durch Zentrifugation (3min, 14000UPM, 4°C) pelletiert, der Überstand abgenommen und die Pellets 2-mal mit salzhaltigem TLB (TLB mit (73 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) 5M NaCl) gewaschen.

### 4.3.3 Kinase-Assay

Durch Zugabe von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP und einem geeigneten Substrat zu immunpräzipitierten Kinasen kann man *in vitro* die Kinaseaktivität messen, da diese Enzyme die Fähigkeit besitzen,  $\gamma$ -Phosphatgruppen von ATP auf ein Substrat zu übertragen.

Hierzu wurden die Kinasen, wie oben beschrieben, mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert, zwei Mal mit TLB-Puffer gewaschen und anschließend zwei weiteren Waschschritten mit Kinasepuffer unterzogen. Daraufhin setzte man einen Reaktionsmix an, der für jede Probe 100 $\mu\text{M}$  ATP, 1 $\mu\text{g}$  geeignetes Substrat, 20 $\mu\text{l}$  Kinasepuffer und 5 $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP enthält. 20 $\mu\text{l}$  des Reaktionsmixes wurden jeder Probe zugegeben und anschließend 15min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zugabe von 6 $\mu\text{l}$  5x SDS-Probenpuffer beendete die Reaktion und die darauf folgende Inkubation für 5min bei 95°C denaturierte die Proben. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt, der die Agarosepartikel sedimentieren sollte, wurde der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

### 4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (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 setzen sich aus einem 5%igem Sammelgel und einem Trenngel mit abweichendem pH-Wert zusammen. Der Acrylamidgehalt (7,5% bis 15%) des Trenngeltes richtet sich dabei nach der Größe der zu untersuchenden Proteine. Die nachfolgende Tabelle enthält das Pipettierschema, nach denen die einzelnen Gele gegossen wurden, sowie die Auftrennungsoptima der verwendeten Trenngeltes. Die Zusammensetzungen der Vormischungen für Laufgel und Sammelgel sind im Kapitel 3.5 beschrieben.

Gelkonzentration	5% Sammelgel (10ml)	7,5% (10ml)	10% (10ml)	12,5% (10ml)	15% (10ml)
30% Acrylamid	1,24ml	2,8ml	3,4ml	4,1ml	5,1ml
Laufgel-Vormix	-	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Trenngel-Vormix	8,6ml	-	-	-	-
bidest. H <sub>2</sub> O	-	4,6ml	4,0ml	3,3ml	2,3ml
APS	0,16ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
Auftrennungsoptimum		> 90kDa	40-90kDa	20-40kDa	< 20kDa

**Tab.4.1: Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen und deren Auftrennungsoptimum.**

Nach Polymerisierung des Gels wurden die einzelnen Proben im Verhältnis 4:1 mit 5x Probenpuffer gemischt und die enthaltenen Proteine durch fünfminütiges Aufkochen bei 95°C denaturiert. Standardmäßig wurden 20µg jeder Probe auf ein Minigel geladen, und die Proteine anschließend mit Hilfe eines kontinuierlichen Tris/Glycin-Puffers (SDS-PAGE-Puffer) bei einer konstanten Stromstärke von 25-80mA fraktioniert.

#### 4.3.5 Western Blot

Gleiche Mengen Totallysat oder eines Immunpräzipitats wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einer Nass-Elektroblotkammer (BioRad) in 4°C kaltem Blottingpuffer bei einer Stromstärke von 200mA auf Nitrocellulose (0,2µm) oder methanol-aktivierter PVDF-Membran überführt. Die Dauer des Transfervorganges richtete sich dabei sowohl nach der Größe der nachzuweisenden Proteine, sowie nach der Dicke und Fläche des Gels und betrug bei einem Minigel (6x9cm, 1,5mm Dicke) zwischen 40min bei sehr kleinen Proteinen (z.B.: p21, 21kDa) und 2h bei Proteinen über 100kDa (z.B.: Involucrin, 120kDa). Nach dem Blotvorgang wurde die Membran direkt zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen für 1h 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 1-3h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST (je 10min) wurde der Antikörper für eine 45minütige Inkubation mit dem jeweiligen (gegen den Primärantikörper gerichteten) HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erneut in Milchpulverlösung geschwenkt. Nun wurde erneut dreimal 10min mit PBST gewaschen und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper nach dem Prinzip der verstärkten Chemolumineszenz (*enhanced chemoluminescence*, ECL) mit Reagenzien und Röntgenfilmen der Firma Amersham dem Herstellerprotokoll entsprechend nachgewiesen.

#### 4.3.6 Durchflusszytometrie

Die Untersuchung von Zellen in der Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Scan*, FACS) erlaubt die quantitative und qualitative Erfassung zellulärer Charakteristika auf Einzelzellniveau innerhalb einer größeren Zellpopulation. Man erhält Informationen über die Zellgröße (*Forward Scatter*, FSC), die Zellgranularität (*Side Scatter*, SSC) und die Fluoreszenzintensität der an- oder eingelagerten Farbstoffe (Detektionskanäle: FL1, FL2, FL3).

**Oberflächen-FACS:** Zur Detektion mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper von induzierten Oberflächenmolekülen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz von der Zellkulturflasche abgelöst und in 15ml Röhrchen überführt. Anschließend an den Zentrifugationsschritt (1200UPM, 5min, 4°C) erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1x PBS. Zur Blockierung von unspezifischen Oberflächenbindungen wurde mit einer 1%igen BSA/PBS-Lösung für 30min auf Eis inkubiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgeschüttet, wodurch eine Restflüssigkeit von ca. 200µl übrig blieb. Diese wurde zu je 100µl in 2 Näpfe einer 96well-Platte mit V-Boden aliquotiert. Die Zellen wurden kurz pelletiert (1200UPM, 5min, 4°C), wobei es sich beim Trennen des Überstandes vom Zellpellet empfiehlt, den Flüssigkeitsüberstand nicht abzusaugen sondern abzuklopfen. Anschließend wurden dann die Pellets in 100µl Primärantikörperlösung (1:100 in 1% BSA/PBS-Lösung) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 45min auf Eis, dann wurde dreimal mit 150µl 1% BSA/PBS gewaschen (1200UPM, 5min, 4°C) und das Pellet in 100µl Sekundärantikörper (1:250 in 1% BSA/PBS-Lösung) resuspendiert. Damit der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff nicht ausbleichte, erfolgte die Inkubation für weitere 45min auf Eis im Dunkeln. Anschließend erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen der Proben mit 150µl 1% BSA/PBS, wobei die Proben beim letzten Resuspendierungsschritt in spezielle FACS-Röhrchen überführt wurden. Nun wurden die Proben auf Eis gelagert und baldmöglichst mittels FACS analysiert.

#### 4.3.7 Immunfluoreszenzfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden HaCaTs in 8-kammerigen Glas-*Chamberslides* ausgesät und in DMEM kultiviert. Nach Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10min bei RT mit 3,7%iger Formaldehydlösung (in PBS) fixiert. Die Formaldehydreste wurden durch zwei Waschschriffe mit PBS entfernt und die Zellen dann für 10min mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurden diese für 30min mit einer Blockierlösung (1% BSA / 1% Ziegen-Normal Serum in PBS) überschichtet und anschließend zum spezifischen Nachweis der jeweiligen Proteine für 45min mit einer geeigneten Primärantikörperverdünnung, angesetzt in Blockierlösung, inkubiert. Danach wurde der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 1% BSA/PBS entfernt und zum Nachweis des Antigen-Antikörperkomplexes der passende Phycoerythrocin (PE)-gekoppelte Sekundärantikörper (1% BSA in PBS) aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 45min im Dunkeln wurde dreimal intensiv mit PBS gewaschen und die Zellen in Eindeckmedium (mit DAPI) eingebettet. Die Präparate wurden mit Nagellack luftdicht versiegelt und die Färbungen meist sofort im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### 4.3.8 „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Beim ELISA bindet man die nachzuweisende Substanz zunächst an eine feste Phase und gibt dann Antikörper gegen die Substanz hinzu, an die ein Enzym (oft eine Peroxidase) gekoppelt ist („Sandwich-Prinzip“). Als Substrat für das Enzym zugegebener Farbstoff kann mittels Photometrie quantitativ detektiert werden.

HaCaT-Zellen wurden entsprechend in 6well Platten eingesetzt und bei 80-%iger Konfluenz sowohl mit 1mM  $\text{CaCl}_2$  alleine als auch mittels einer Kombination von 1mM  $\text{CaCl}_2$  und 10nM TPA stimuliert. Nach mindestens 24 Stunden wurde der Überstand abgehoben und in sterile Mikroreaktionsgefäße überführt. Nun wurde der Überstand abzentrifugiert (10min bei 14000UPM) und bei  $-20^\circ\text{C}$  zur weiteren Verwendung eingefroren.

Der ELISA selbst wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine ImmunoMaxi Sorb-Platte wurde über Nacht mit *Capture Antibody* (*Coating Buffer*: 0,1M Natriumcarbonat pH 9,5) beschichtet, dann wurde dreimal mit PBS + 0,05% Tween-20 gewaschen. Anschließend wurde die Platte für 1h bei RT mit PBS + 10% FCS geblockt. In dieser Lösung wurden auch alle Antikörper, Proben und der Standard verdünnt. Hierauf erfolgte wieder ein dreifacher Waschschrift, dem das Auftragen der Proben und des Standards folgte. Diese inkubierten für 2h bei RT in der Platte, wobei anschließend fünfmal gewaschen wurde. Nun erfolgte die Inkubation des zweiten Antikörpers in einer Arbeitslösung (*Detection Antibody* + Av-HRP) für 1h. Dann wurde siebenmal mit PBS + 0,05% Tween-20 gewaschen, die Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidine und Hydrogenperoxid, verwendet wurde das BD Pharmingen TMB Substrate Reagent Set) aufgetragen und weiter 30min im Dunkeln inkubiert. Nun musste nur noch die Stop-Lösung (2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) zugegeben werden und in einem ELISA-Reader bei 450nm ausgelesen werden.

#### 4.3.9 DNA-Protein-Bindungsassay [Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)]

Die sequenzspezifische Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA kann ermittelt werden, indem man Proteine mit radioaktiv markierten DNA-Sequenzmotiven inkubiert und die entstehenden Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel auftrennt. DNA Fragmente, an die ein Protein gebunden sind, wandern im Gel langsamer und können dadurch von ungebundener DNA getrennt werden. Synthetische Kompetitoren wie Poly dI/dC verhindern eine unspezifische DNA-Bindung durch Proteine an der Bindeprobe, indem sie in 2000-10.000fachem Überschuss (der Bindeprobe) dem Versuchsansatz hinzugefügt werden. Der Nachweis einer spezifischen DNA-Protein-Wechselwirkung erfolgt durch Konkurrenz mit einem Überschuss des entsprechenden nicht markierten Oligonukleotids.

**Herstellung von Kernextrakten:** Die Herstellung der Protein-Kernextrakte fand in Anlehnung an das Protokoll von Andrews und Faller (Andrews *and* Faller, 1991) statt. Abweichend davon wurden die Zellen ( $1 \times 10^7$  Zellen/6cm Schale) mit 4°C kaltem 1x PBS/Vanadat (1:1000) vor dem Abschaben gewaschen. Der Waschüberstand wurde abgesaugt und die Schale mit 1ml PBS/Vanadat befüllt, nun wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4°C für 2min bei 14000UPM sedimentiert und der Überstand verworfen. Jeder Ansatz wurde mit 400µl Puffer A resuspendiert, für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10sec gevortext und dann für 20sec bei 14000UPM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 bis 50µl Puffer C resuspendiert, abhängig von der zu erwartenden Proteinkonzentration, und 20min auf Eis inkubiert. Der verbliebene Zelldebris wurde im Anschluss für 2min bei 14000UPM und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgehoben, in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Ausbeute betrug zwischen 100µg und 200µg pro  $10^7$  Zellen.

**Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde:** Als DNA-Sequenzmotiv wurde ein Fragment eines NF-κB Erkennungsmotifs verwendet, welches als doppelsträngige DNA vorlag. Um nun die Polynukleotidkette radioaktiv markieren zu können, wurde am 5'-Ende ein radioaktiv-markiertes Phosphat eingebaut. Für diese Reaktion des „*end labellings*“ verwendet man die T4 Polynukleotid Kinase (T4-PNK). Hierzu wurde ein Ansatz bestehend aus 8µl ddH<sub>2</sub>O, 2µl Puffer A der T4-PNK, 4µl des NF-κB Oligonukleotids, 5µl <sup>32</sup>P γ-dATP und 1µl T4-PNK gemischt und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der Sonde vom freien ATP erfolgte über eine Sephadex G50-Säule und die Aktivität der markierten Probe wurde im Szintillationszähler bestimmt. Für einen EMSA wurde das markierte DNA-Equivalent von ca. 40.000 „*counts per minute*“ (cpm) pro Kernextraktprobe verwendet.

**„Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA):** 5µg Kernextrakt wurden auf 9,5µl Volumen eingestellt. Aus einem Puffervormix, bestehend aus 5x Gelshiftpuffer, 1mg/ml BSA, 1mM DTT, 200µM PMSF und der berechneten Menge an radioaktiv markierter Sonde, wurden 9,5µl zu den vorbereiteten Kernextraktproben gegeben, vorsichtig gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Ein natives Gel (4,5% Polyacrylamid, 7µl/ml 10% APS, 0,7µl/ml TEMED, 0,5x TBE, 6,5% Glycerol) wurde nach 20 minütigem Vorauf mit den Proben beladen. Der Lauf erfolgte bei 220V für ca. 2-3h in 0,25fachem TBE-Puffer. Abschließend wurde das Gel auf ein Blatt Whatman Papier transferiert und für ca. 1h bei 80°C auf einem Geltdrockner getrocknet. Röntgenfilme wurden zur Exposition des Gels meist 1 bis 3 Tage bei -80°C aufgelegt.

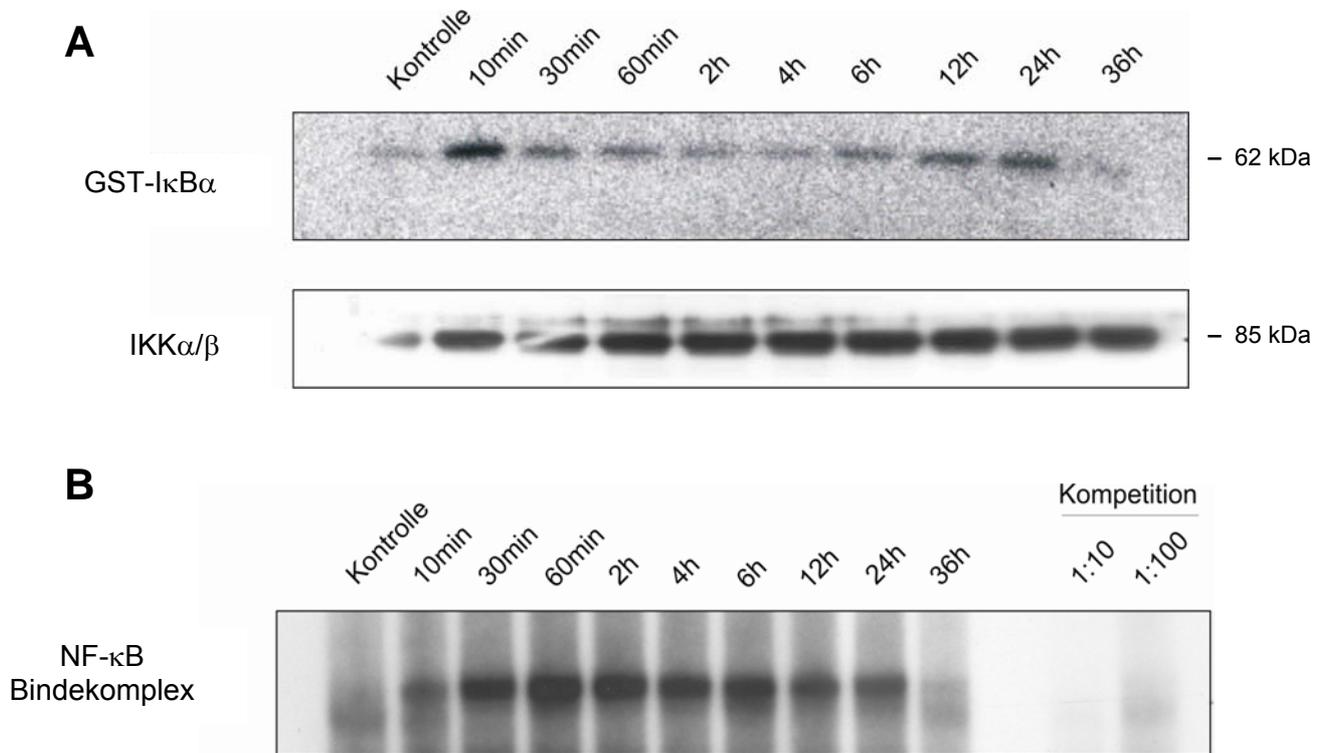
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Aktivierung der IKK/NF- $\kappa$ B Signalkaskade während der Calcium-induzierten Differenzierung

Während humane Keratinozyten wachsen und *in vitro* differenzieren, spreizen sie sich in dünnen Schichten aus und behalten trotzdem die klassische Organisation der intakten Haut bei. Extrazelluläre Calcium-Konzentrationen  $> 0,1\text{mM}$  initiieren eine Kaskade von Ereignissen, bei denen sich Keratinozyten von kleinen proliferierenden Zellen in einer Monolayer-Schicht zu gestreckten Schichten mit verhornenden Membranen wandeln (Hennings and Holbrook, 1983; Eckert, 1989b). Zu diesen Ereignissen tragen auch eine Reihe von Signaltransduktionswegen bei, die, wie zum Beispiel der IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signalweg, eine entscheidende Rolle bei der Regulation zellulärer Wachstums- und Differenzierungs-vorgänge spielen. So wird zum Beispiel NF- $\kappa$ B als wichtiger Regulator der Keratinozytenproliferation und -differenzierung in der Epidermis der Maus angesehen (Seitz et al., 1998c). Hierbei war allerdings bislang unklar, ob die NF- $\kappa$ B Abhängigkeit der Differenzierung ein Keratinozyten autonomes Phänomen darstellt oder über parakrine Wechselwirkungen mit anderen Zellen zustande kommt.

Zur Klärung der Frage, ob die Calcium-induzierte Differenzierung von isolierten humanen Keratinozyten mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B assoziiert ist, wurden primäre Keratinozyten durch Anhebung des extrazellulären Calciumgehaltes von  $0,05\text{mM}$  auf  $1\text{mM}$  stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aktivierungszustand der IKK durch einen Kinaseassay nachgewiesen (Abb.5.1 A). Hierbei wurde der I $\kappa$ B Kinase Komplex IKK1/2 immunopräzipitiert und nach Waschschritten zur Aufreinigung mit dem Substrat Glutathion S-Transferase (GST)-I $\kappa$ B $\alpha$  in Reaktion gebracht. Im Versuch zeigte sich eine biphasische Aktivierung der IKK, gemessen an der *in vitro*-Phosphorylierung von GST-I $\kappa$ B $\alpha$ , wobei die erste Phosphorylierung nach bereits 10 Minuten und ein zweiter Höhepunkt, beginnend nach circa sechs Stunden, stattfanden. Diese zweite Stimulation erfolgte nicht so intensiv wie die erste, zeigte sich aber als länger anhaltend. Das Maximum dieser transienten I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylierung zeigt sich erst circa 24 Stunden nach Stimulationsbeginn und war 12 Stunden später (36 Stunden Zeitwert, vgl. Abb.5.1 A) vollkommen abgeklungen. Belegt werden konnte diese durch die extrazelluläre Erhöhung des Calciumspiegels bedingte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in einem *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* (EMSA) unter Nachweis der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität durch Bindung einer p65-spezifischen DNA-Sonde an Lysate von unbehandelten und stimulierten Keratinozyten (Abb.5.1 B). Dazu wurden wiederum primäre Keratinozyten mit  $1\text{mM}$  Calcium-angereichertem Medium inkubiert und Kernextrakte hergestellt. (vgl. Material/Methoden). Hierbei zeigt sich eine deutliche Erhöhung

der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität nach ca. 30min, mit der maximalen Aktivität nach circa einer Stunde. Auch hier nimmt die Bindungsaktivität ab, jedoch wesentlich langsamer und weiters konnte hier kein biphasischer Verlauf mit einer zweiten Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden.



**Abb. 5.1: Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration resultiert in einer Aktivierung des IKK/NF- $\kappa$ B Signalweg.**

**A)** Primäre Keratinozyten wurden mit 1mM CaCl<sub>2</sub> für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert, anschließend lysiert und die Lysate mit IKK $\alpha$ / $\beta$  Antikörper einer Immunopräzipitation unterzogen. Die Aktivierung der Kinase wurde durch Phosphorylierung von GST-I $\kappa$ B $\alpha$  als Substrat detektiert.

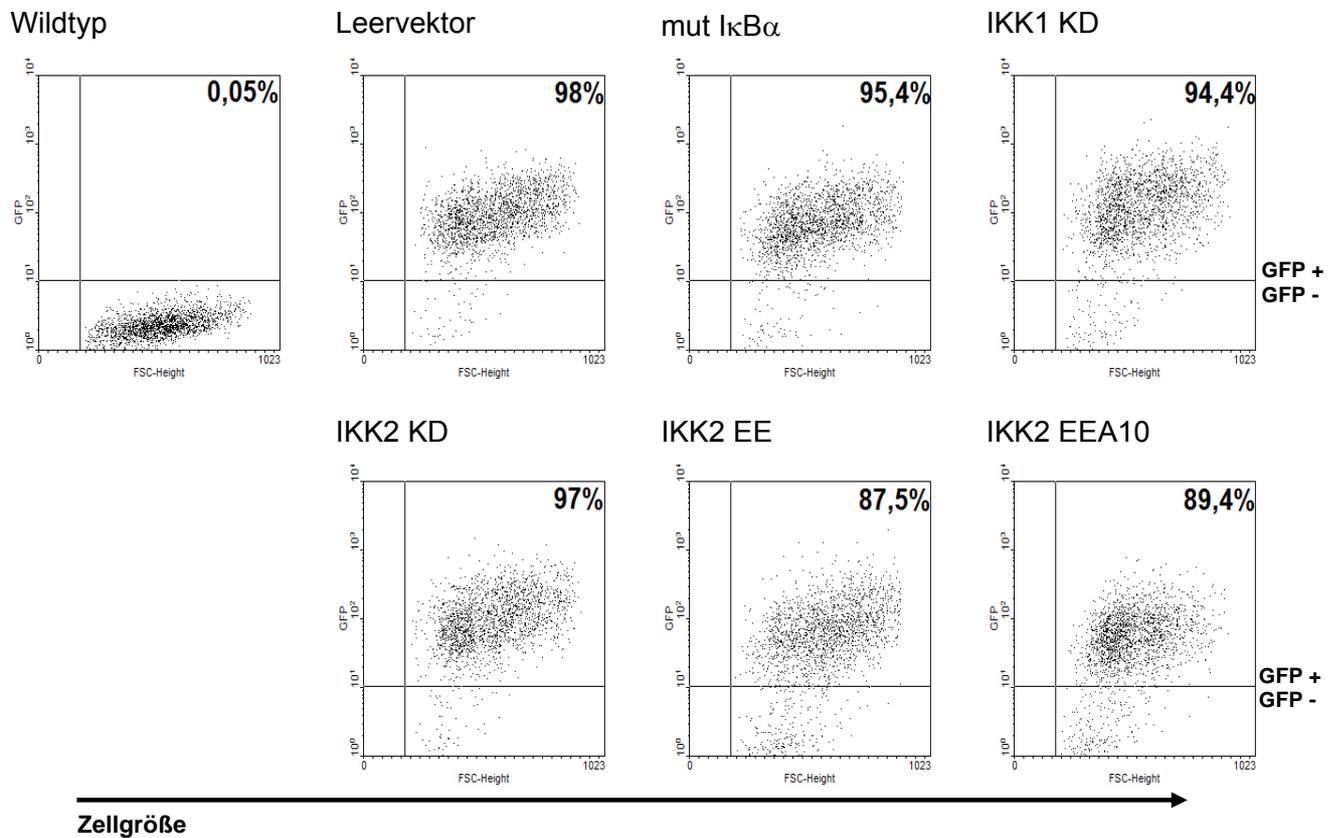
**B)** Primäre Keratinozyten wurden wie oben stimuliert und Kernextrakte wurden hergestellt. Im EMSA wurde durch Bindung von 5 $\mu$ g Extrakt pro Probe mit einer spezifischen NF- $\kappa$ B DNA Sonde die Aktivierung von NF- $\kappa$ B autoradiographisch nachgewiesen.

Die frühe calciuminduzierte Aktivierung des IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B-Moduls in diesem System könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Signalweg in Keratinozyten an den intrinsischen Mechanismen der Differenzierungsinduktion beteiligt ist. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, musste nun ein geeignetes Untersuchungsmodell gefunden werden. Da jedoch primäre humane Keratinozyten, im Gegensatz zu den murinen, weniger gut charakterisiert sind und sich wesentlich schwieriger kultivieren lassen, wurde für erste Versuche die spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (*human adult skin keratinocytes propagated under low calcium conditions and elevated temperature* (Boukamp *et al.*, 1988)) herangezogen.

## **5.2 Herstellung und Charakterisierung retroviral transduzierter Zelllinien zur Untersuchung des NF- $\kappa$ B Signalweges**

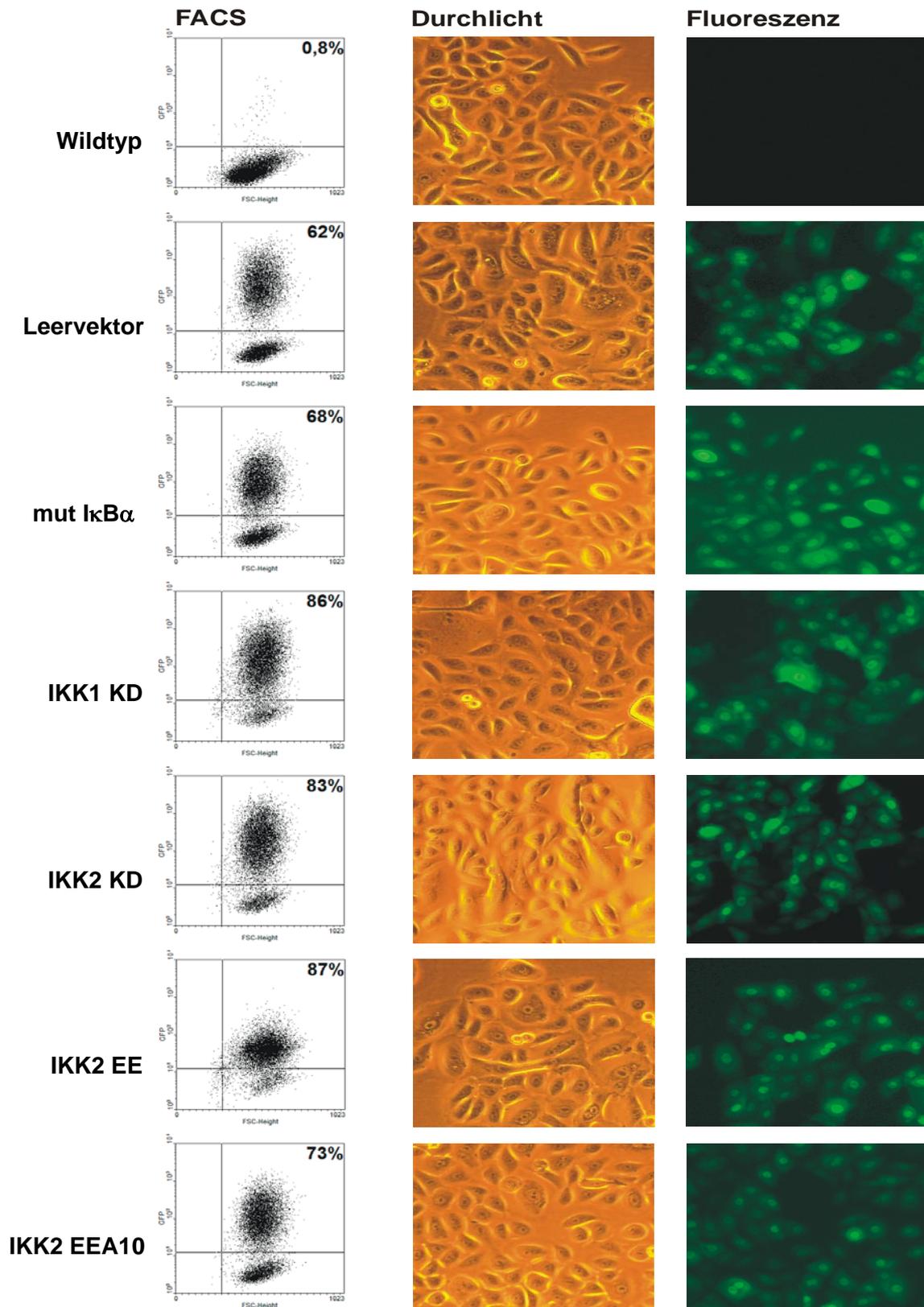
Die retrovirale Transfektion bietet eine Anzahl von Vorteilen, welche sie einmalig für den Gentransfer macht. Durch die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom werden stabile Zellpopulationen erzielt, welche über viele Generationen hinweg das gewünschte Gen enthalten. Zusätzlich kann der retrovirale Promotor, abhängig von der örtlichen Chromatinumgebung, die ihm unterstellten Gene direkt und mit hoher Effizienz exprimieren. Auch lassen sich durch diese Methode ungleich höhere Transfektionsraten erzielen als mit herkömmlichen Transfektionsmedien, wie zum Beispiel Lipofektamin oder der Calciumphosphat-Methode. Als weiterer Vorteil erweist sich die Möglichkeit, dass sich Zellen nach einer erfolgreichen Infektion erholen können und somit der zelluläre Stress gesenkt werden kann, bevor Experimente durchgeführt werden.

In unseren Experimenten wurden mittels retroviraler Transduktion ein Leervektor, zwei verschiedene konstitutiv aktive Formen der I $\kappa$ B-Kinase 2 (IKK-EE und IKK-EEA10), eine dominant negative Form der IKK2 (IKK2 KD), eine dominant negative Form der IKK1 (IKK1 KD) und eine nicht-degradierbare Form von I $\kappa$ B $\alpha$  (mut I $\kappa$ b $\alpha$ ), ein so genannter Superrepressor, in die Keratinozyten eingebracht (Denk et al., 2001b). Für die HaCaT Zellen wurden zwei Infektionsrunden und für die primären NHK wurde nur eine Infektionsrunde angewendet (siehe Material/Methoden). HaCaT Zellen wurden im Verhältnis 1:5 in T75 Flaschen umgesetzt und mindestens 14 Tage mit 400 $\mu$ g/ml Zeozin selektioniert. Die wesentlich empfindlicheren NHK wurden in geringerer Anzahl in den 6well-Platten ausgesät und daher nach der Infektionsrunde in den Platten weiter kultiviert. Alle Zellen wurden frühestens 48 Stunden nach der letzten Infektionsrunde auf das ebenfalls mitexprimierte Grün-Fluoreszierende Protein (GFP, *green fluorescent protein*) in einem Fluoreszenzmikroskop und zur genauen Bestimmung der Infektionsrate in der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell scan*) überprüft. Die stabilen HaCaT Zelllinien wurden während der routinemäßigen Passagierung alle vier Wochen nachkontrolliert und gegebenenfalls nachselektioniert (für HaCaT vgl. Abb.5.2 und für NHK vgl. Abb.5.3 linke Spalte).



**Abb. 5.2: Transduktionseffizienz der HaCaT Zellen nach retroviralem Gentransfer**

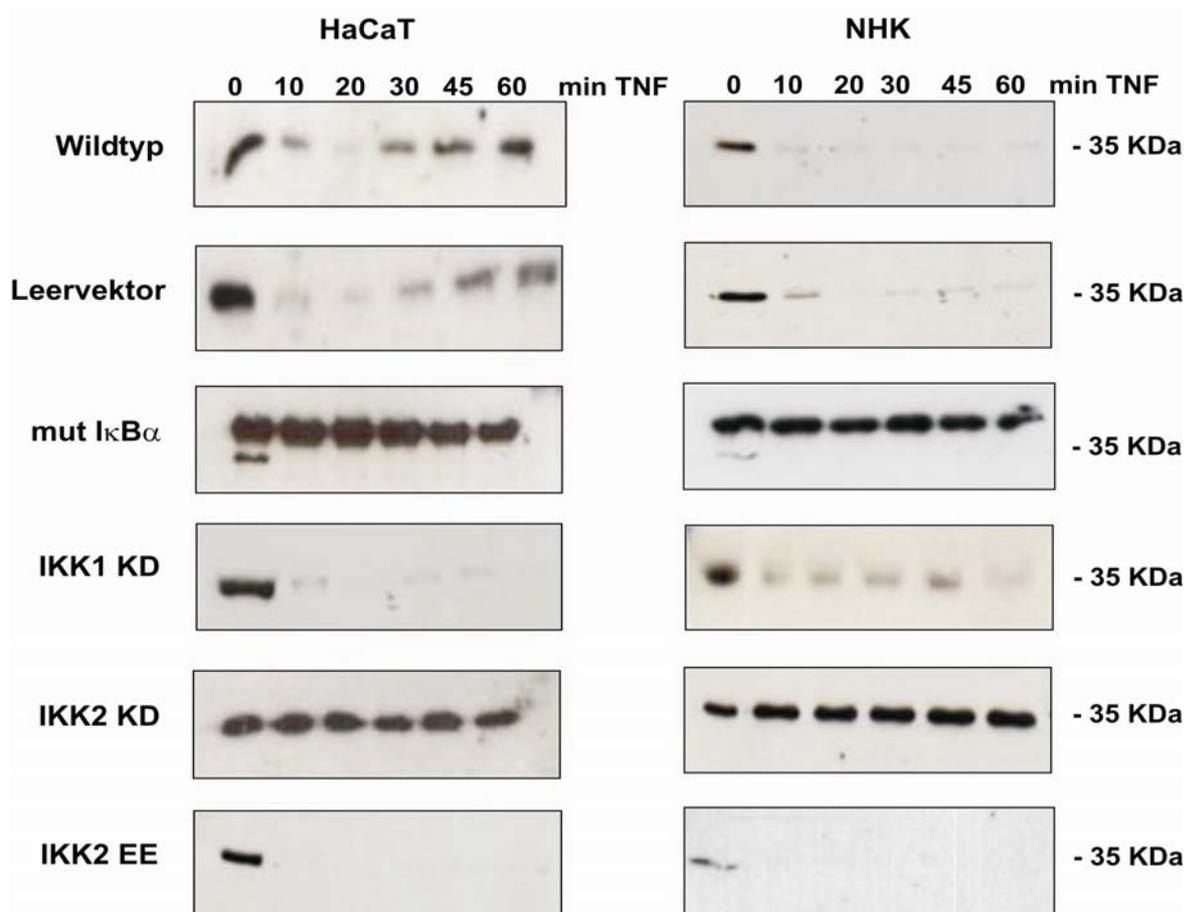
FACS Analyse auf GFP-Expression in HaCaT Zellen nach 7 tägiger Selektion mit 400µg/ml Zeozin. Darstellung der Zellgröße (FSC) gegen GFP. FACS Calibur, Cellquest 1,0, 10000 Zellen gemessen.



**Abb.5.3: Kontrolle der Transduktion von NHK nach retroviralem Gentransfer**

NHK wurden 48h nach der retroviralen Infektion im FACS und im Fluoreszenzmikroskop auf Expression des GFP-Reporterproteins kontrolliert. In den nachfolgenden Experimenten wurden nur Zellenpopulationen mit mehr als 70% GFP-positiven Zellen verwendet. (Axiovert 125 , 10-fache Vergrößerung, Fluoreszenzkamera ProGress C14)

Da die Expression des GFP-Proteins keinen Rückschluss auf die interferierende Funktionalität der exprimierten Mutante zulässt, wurde deren Wirkung mittels Stimulation durch ein stark NF- $\kappa$ B aktivierendes, proinflammatorisches Zytokin überprüft. Dazu wurde TNF- $\alpha$  ausgewählt, da es NF- $\kappa$ B über den klassischen Weg der IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Kaskade aktiviert und so deren Untersuchung ermöglicht. Die Zelllinien wurden mit 100ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert, zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert und im Western Blot analysiert. In HaCaT Zellen zeigt sich die Degradation des Inhibitors von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , bereits nach 10 bis 20 Minuten (Abb.5.4: Wildtyp und Leervektor), wobei das resynthetisierte Protein nach circa 60 Minuten in ähnlicher Menge wie zu Anfangs wieder vorlag. Deutlich ist im Versuch bereits nach 10 Minuten die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  zu erkennen und im Zeitverlauf (30, 45 und 60 Minuten) kehrt die Bande wieder zurück, was durch die Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$ , welches selbst ein Zielgen von NF- $\kappa$ B ist, erklärbar wird.



**Abb. 5.4: Funktionelle Charakterisierung der HaCaT und NHK Linien, welche stabil interferierende Mutanten aus dem NF- $\kappa$ B Signalweg exprimieren.**

Stabile HaCaT Linien wurden nach 7 tägiger Selektion mit 200 $\mu$ g/ml Zeozin für die angegebenen Zeitperioden mit 100ng/ml TNF- $\alpha$  inkubiert und Totallysate wurden gewonnen. 20 $\mu$ g Probenlysat wurde auf ein SDS-Gel (12,5%) aufgetragen und anschließend geblottet. Geblockt wurde in 5% Milchpulver/PBST. Die I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung wurde mittels I $\kappa$ B –Antikörper im Western Blot detektiert.

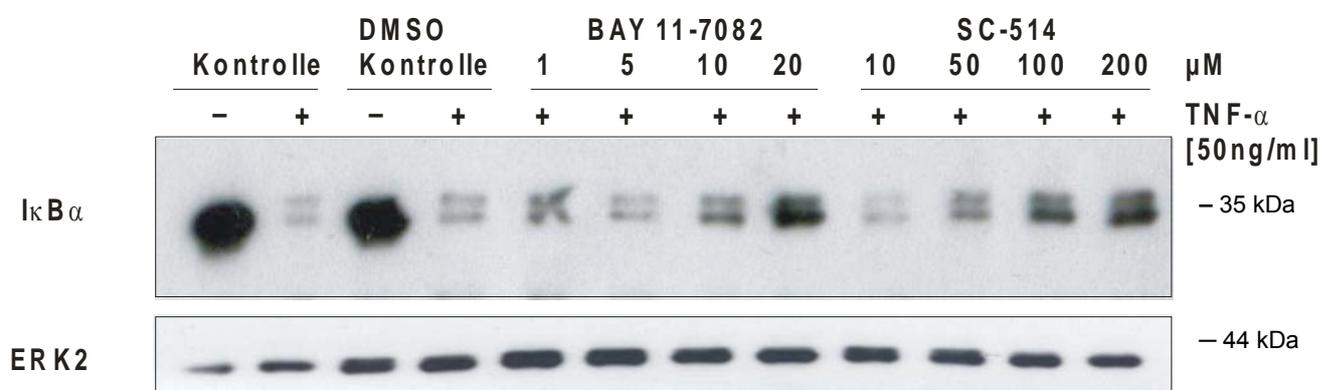
Bei Überexpression der nicht degradierbaren Mutanten von I $\kappa$ B $\alpha$  (mut I $\kappa$ B $\alpha$ ) zeigt sich ein Doppelbandenmuster. Diese unterschiedlich schnell laufenden Banden stammen von zelleigenem endogenem I $\kappa$ B $\alpha$  und von der nicht degradierbaren I $\kappa$ B $\alpha$  Mutante. Wie in Abbildung 5.4 gezeigt, bleibt die exogene Bande über den Zeitverlauf unverändert bestehen. Endogenes I $\kappa$ B $\alpha$ , welches noch in der Zelle vorliegt, wird hingegen bereits nach zehn Minuten degradiert und aufgrund der Inhibition durch die exogene Mutante nicht mehr resynthetisiert. Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich für die IKK2 KD-Mutante, wobei hier die Phosphorylierung nicht an den NF- $\kappa$ B Inhibitor weitergegeben werden kann und somit I $\kappa$ B $\alpha$  über den ganzen Zeitraum erhalten bleibt. Bei der Mutante IKK1 KD kann I $\kappa$ B $\alpha$  nach Stimulation phosphoryliert und somit auch degradiert werden. Hier zeigt sich eine sehr schwache Wiederkehr des resynthetisierten I $\kappa$ B $\alpha$ 's nach 60 Minuten mit einer weiteren zeitlichen Verzögerung über die 60 Minuten hinaus. Für die konstitutiv aktive IKK2 EE Mutante konnte in nicht abgebildeten Versuchen eine Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  auch nach zwei Stunden nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigt sich hier eine I $\kappa$ B $\alpha$  Bande vor der Stimulation. Dieses endogene I $\kappa$ B $\alpha$  könnte noch gebunden im Zytoplasma der Zellen vorliegen und erst mit TNF-Aktivierung freigesetzt werden. In primären Keratinozyten verhalten sich die Mutanten ähnlich, wobei hier die Resynthese des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins noch länger braucht, somit zeigen sich nach 60 Minuten noch keine Banden im Western Blot.

### **5.3 Einsatz von synthetischen Inhibitoren zur Blockade des NF- $\kappa$ B-Signalweges**

Der Einfluss der einzelnen Komponenten des NF- $\kappa$ B-Signalweges wurde zusätzlich zu diesem retroviralen Ansatz noch durch Einsatz von spezifischen IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ -Inhibitoren untersucht. Auf diesem Wege konnte unter anderem auch nachgewiesen werden, dass der retrovirale Transportvektor selbst das System nicht negativ beeinflusst. Dazu wurden die Inhibitoren SC-514 und BAY 11-7082 herangezogen.

Für den IKK2 Inhibitor SC-514 konnte eine äußerst spezifische Blockierung der IKK2 und der IKK1/IKK2-Heterodimere nachgewiesen werden, wobei auch antiinflammatorische Eigenschaften beobachtet werden konnten. Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung des IKK-Komplexes wird nicht inhibiert (Kishore et al., 2003; Jeong et al., 2005b). Der Inhibitor BAY 11-7082 unterbindet spezifisch die Aktivierung des I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins durch TNF- $\alpha$ . Auch BAY 11-7082 zeigt anti-inflammatorische Effekte, so zum Beispiel zeigt sich sowohl eine verringerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B als auch eine verringerte Expression der Adhäsionsproteine E-Selektin, VCAM-1 und ICAM1 (Pierce et al., 1997b; Bockelmann et al., 2005a). Diese Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und die Wirkung in Keratinozyten in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. In Abbildung 5.5 zeigt sich die blockierende

Wirkung der Inhibitoren am Beispiel der I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation. Während in den Kontrollen nach Stimulation mit 50ng/ml TNF- $\alpha$  I $\kappa$ B $\alpha$  nach 20 Minuten degradiert wird, zeigt BAY11-7082 seine inhibitorische Wirkung bei einer Konzentration von 20 $\mu$ M, wohingegen SC-514 bei 200 $\mu$ M die Degradation effektiv verhindert. In nicht gezeigten Ergebnissen konnte die Unterbindung der Phosphorylierung von p65 nicht eindeutig nachgewiesen werden, jedoch konnte eine leichte Reduktion bei BAY 11-7082 ebenfalls im Bereich von 20 $\mu$ M und bei SC-514 bei 100 $\mu$ M beobachtet werden. Aufgrund toxischer Nebeneffekte sowohl durch das DMSO als auch durch die Inhibitoren war eine weitere Erhöhungen der Konzentrationen nicht angezeigt.



**Abb.5.5: Die Inhibitoren BAY 11-7082 und SC-514 inhibieren die I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation.**

Primäre Keratinozyten wurden 1h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren BAY 11-7082 und SC-514 vorinkubiert und anschließend mit TNF- $\alpha$  (50ng/ml, 20min) stimuliert. 20 $\mu$ g Totallysat wurden mittels SDS-Gel aufgetrennt und gegen I $\kappa$ B $\alpha$  und ERK2 geblottet.

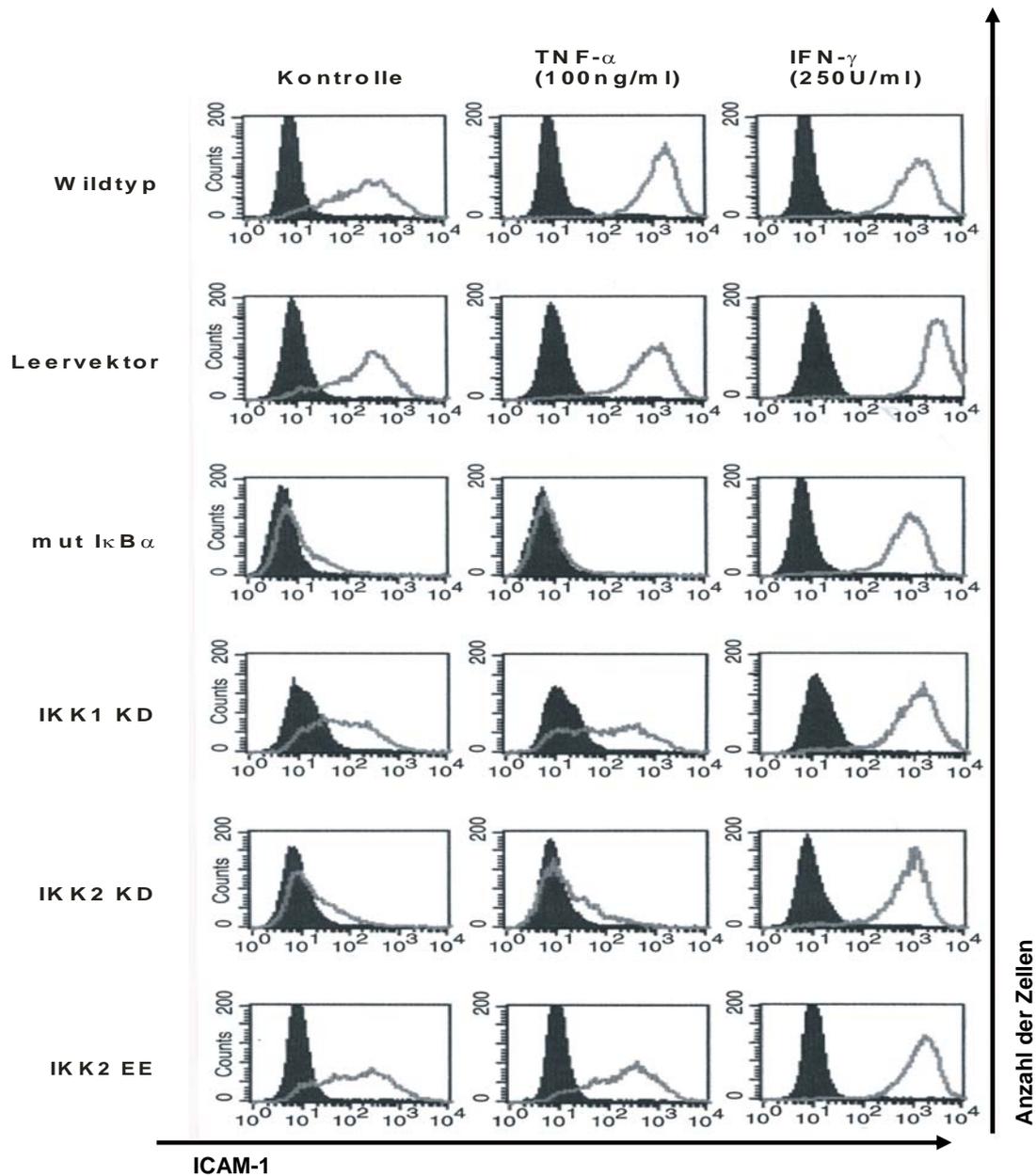
Es wurde für weitere Versuche eine Konzentration von 200 $\mu$ M für SC-514 beziehungsweise von 20 $\mu$ M BAY 11-7082 herangezogen.

#### 5.4 Inhibierung der NF- $\kappa$ B Aktivierung verhindert inflammatorische Genexpression.

Wie schon eingangs erwähnt (siehe Kapitel 1.4), spielt NF- $\kappa$ B in vielen Zelltypen vor allem in der inflammatorischen Antwort eine wesentliche Rolle. Um diese auch für Keratinozyten zu bestätigen, wurde die Synthese des proinflammatorisch induzierten Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch die interferierenden Mutanten und auch nach Applikation der Inhibitoren BAY 11-7082 und SC-514 untersucht.

Wie in Abbildung 5.6 zu erkennen ist, wurde die ICAM-1 Expression im Durchflusszytometer detektiert, nachdem die HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Zytokinen stimuliert wurden.

Nachdem NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  aktiviert wurde, zeigte sich eine gesteigerte Expression von ICAM-1 innerhalb von 14 Stunden. Wurde der IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B-Signalweg durch dominant negativ wirkende Mutanten inhibiert, so konnte die Synthese effektiv blockiert werden (vgl. Abb.5.6: mut I $\kappa$ B, IKK2 KD; Kontrolle vs TNF). Die Stimulation der konstitutiv aktiven Mutante IKK2 EE, wie auch die der IKK1 KD Mutante, führte basal nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der ICAM-1 Expression.

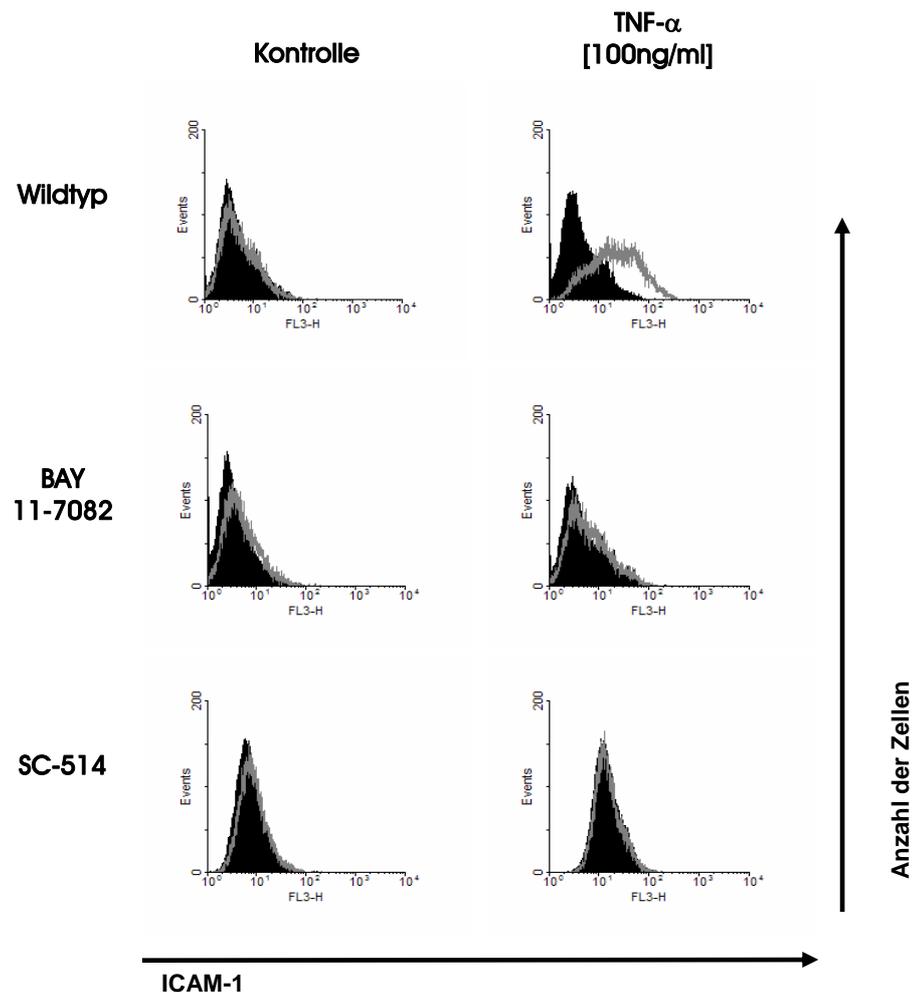


**Abb. 5.6: Expression von ICAM-1 nach Zytokinstimulation.**

Stabile HaCaT Zelllinien wurden mit den Zytokinen TNF- $\alpha$  (100ng/ml) und IFN- $\gamma$  (250U/ml) für 14h bzw. 36h stimuliert. Die Zellen wurden mit anti-ICAM-1 AK gefärbt (graue Kurve) und im FACS Calibur analysiert. Als Isotypkontrolle diente Maus-IgG1 (Schwarze Profile).

Wurden jedoch die Zelllinien mit dem Zytokin IFN- $\gamma$ , welches zur Heraufregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 über andere Signalwege führt, stimuliert, so zeigt sich kein hemmender Effekt der eingesetzten Mutanten.

Dieses Ergebnis lässt sich auch durch Exposition mit den oben genannten pharmakologischen Inhibitoren in das Keratinozytensystem belegen. Wenn auch hier nicht eine so deutliche Aktivierung bei der Wildtypkontrolle durch TNF- $\alpha$  gezeigt werden kann, so sieht man doch die signifikante Blockierung der ICAM-1 Expression nach Stimulation.



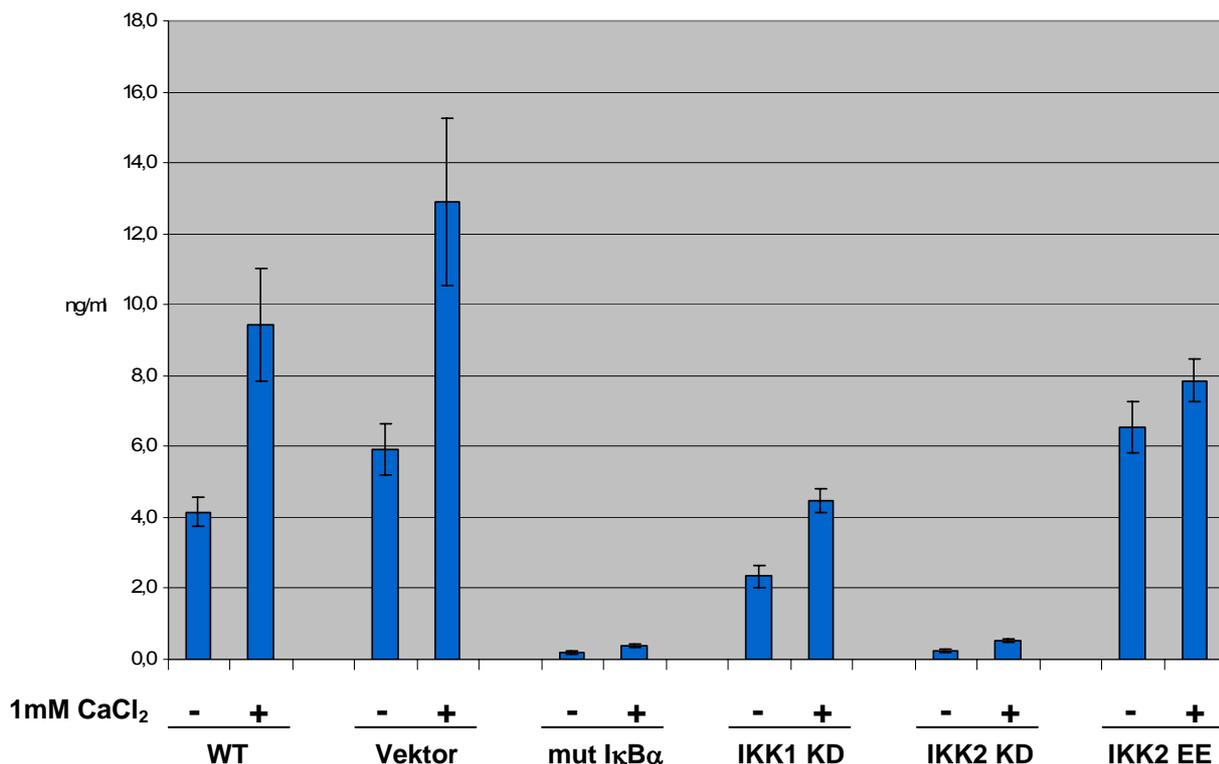
**Abb.5.7: IKK Inhibitoren blockieren die ICAM-1 Expression nach TNF- $\alpha$  Stimulation.**

Primäre Keratinozyten wurden 1h mit den Inhibitoren BAY 11-7082 (20 $\mu$ M) und SC-514 (200 $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend mit TNF- $\alpha$  (100ng/ml) für 14h stimuliert. Die Zellen wurden mit anti-ICAM-1 AK gefärbt (graue Kurve) und im FACS Calibur analysiert. Als Kontrolle diente Maus-IgG1 (Schwarzes Profil).

Um auf eine inflammatorische Bedrohung zu reagieren, werden nicht nur Adhäsionsproteine sondern auch chemotaktisch wirkende Zytokine (Chemokine) vermehrt exprimiert. Zu diesen Chemokinen gehört das in normaler Haut in sehr geringen Mengen vorliegende Interleukin-8 (CXCL8). Zytokine wie TNF- $\alpha$ , aber auch zellulärer Stress, führen zu einer transkriptionellen Aktivierung der IL-8-Expression (Hoffmann et al., 2002b).

Da auch eine Erhöhung des extrazellulären Calciumspiegels zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt, wurden oben beschriebene HaCaT Zellen mit Calcium stimuliert und die Expression von Interleukin-8 untersucht (vgl. Abbildung 5.8). Hierzu wurden Keratinozyten 24 Stunden mit 1mM CaCl<sub>2</sub>-angereichertem KGM2-Medium stimuliert.

Wie in Abbildung 5.8 an der Wildtyplinie deutlich zu erkennen ist, erzeugt die Stimulation durch CaCl<sub>2</sub> eine um das zweifache erhöhte Konzentration von IL-8 im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Signifikant niedrigere Konzentrationen von IL-8 finden sich sowohl basal als auch nach Calciumstimulation nach stabiler Expression der NF- $\kappa$ B hemmenden Mutanten mit I $\kappa$ B $\alpha$  und IKK 2KD



**Abb.5.8: Sekretion des proinflammatorischen Chemokins Interleukin-8 nach CaCl<sub>2</sub> Stimulation.** Stabil exprimierende HaCaT-Zelllinien wurden 24h mit 1mM CaCl<sub>2</sub> stimuliert und anschließend die Sekretion von IL-8 mittels ELISA in Zellüberstand bestimmt.

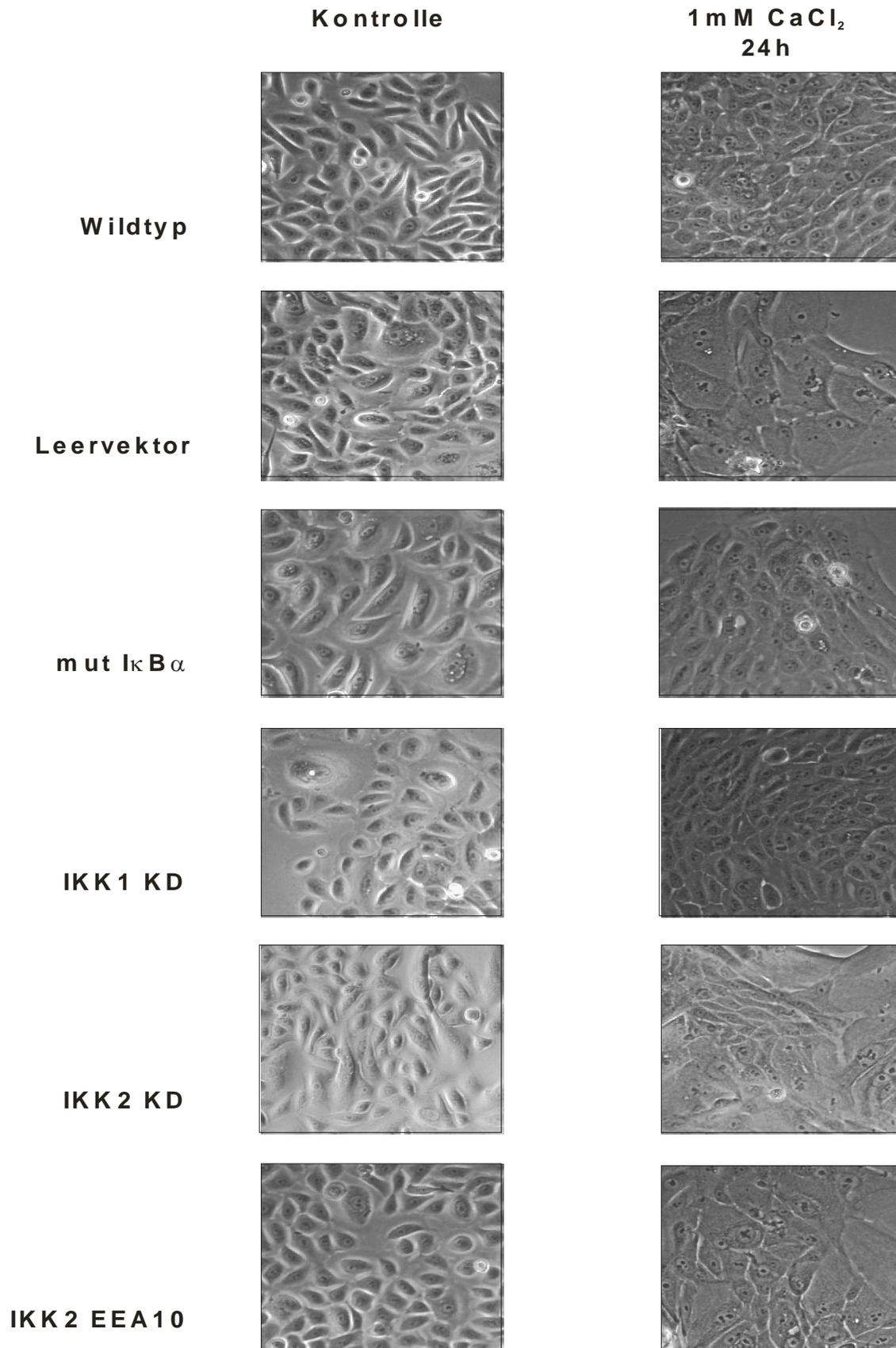
Mit rund 6ng Interleukin 8 pro ml zeigte die konstitutiv aktive Mutante IKK2 EE eine leicht höhere Konzentration basal, allerdings konnte hier auch eine weniger deutliche Induktion nach Calcium Stimulation beobachtet werden (vgl. Abb.5.8: WT vs Vektor und IKK2 EE). Diese Erhöhung des Chemokins könnte bereits auf den zellulären Stress durch die virale Infektion zurückzuführen sein.

### **5.5 *Der Ca<sup>2+</sup> induzierte intrinsische Differenzierungsprozess wird durch NF-κB nicht beeinflusst***

Wie schon eingangs beschrieben, spielt externes Calcium eine wichtige Rolle in der keratinozytären Differenzierung.

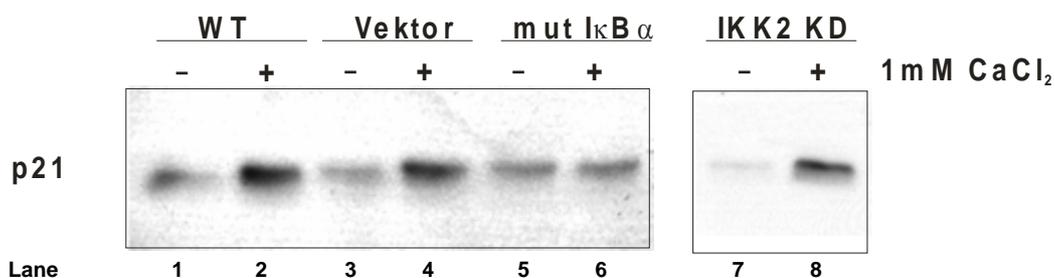
Zunächst wurden morphologische Studien (siehe Abbildung 5.9) durchgeführt. Dazu wurden primäre Wildtyp Keratinozyten und die verschiedenen NF-κB-manipulierten Zelllinien für 48h mit 1mM Calcium zur Differenzierung angeregt. Dabei wurden ausschließlich retroviral transduzierte Zelllinien mit einer Infektionsrate von mehr als 70% verwendet.

Wie in Abbildung 5.9 erkennbar ist, lassen sich die primären Keratinozyten durch die Erhöhung des extrazellulären Calciums von 0,05mM auf 1,0mM zur Differenzierung anregen. Bereits nach 24 Stunden zeigen sich deutliche morphologische Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrollpopulation. Die Keratinozyten bilden ein „Kopfsteinpflaster“-artiges Muster aus und erhöhen signifikant den Zell-Zellkontakt zu den jeweiligen Nachbarzellen. Sieht man bei den unstimulierten Zellen (linke Reihe) noch deutlich die Zellgrenzen (helle dicke Grenzen) und einen plastisch erhöhten Zellkörper mit dem Zellkern, so sind die Zellgrenzen bei den differenzierten Keratinozyten fast nicht mehr zu erkennen und auch die Zellkörper scheinen sich flach an das Substrat zu ducken. Auch bedecken die differenzierten Zellen einen relativ größeren Anteil der Fläche des Kulturgefäßes als nicht differenzierte, proliferierende Zellen. Deutlich zeigt sich in den Aufnahmen, dass die morphologischen Änderungen, die mit der Calcium-vermittelten Differenzierung eintreten, durch alle NF-κB Mutanten nicht beeinträchtigt werden.



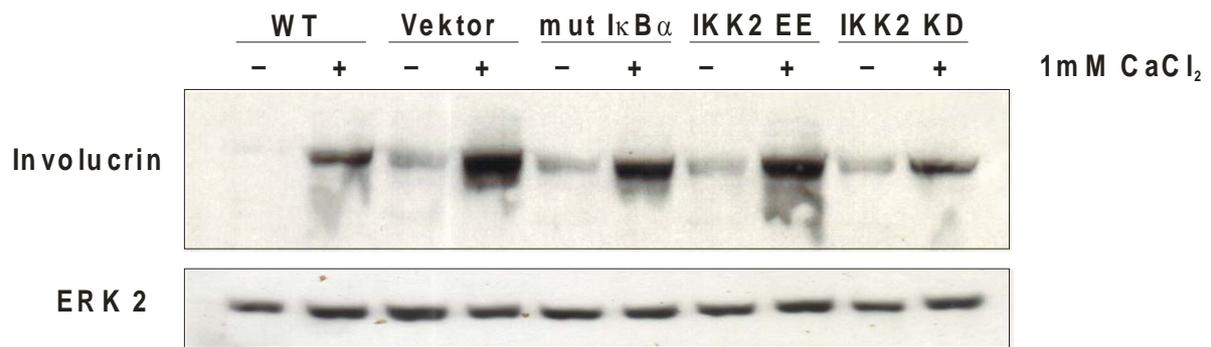
**Abb. 5.9: Morphologie primärer humaner Keratinozyten nach Ca<sup>2+</sup>-induzierter Differenzierung.** Primäre Keratinozyten wurden 48h nach retroviraler Transfektion mit 1mM CaCl<sub>2</sub> für weitere 24h stimuliert. Anschließend erfolgten Durchlichtaufnahmen mit einem Axiovert 125 bei 10facher Vergrößerung.

Da in der Morphologie keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp-Kontrolle und den NF- $\kappa$ B modulierten Zelllinien beobachtet werden konnte, wurden zur Untersuchung auf molekularer Ebene Totalzelllysate angefertigt. Wiederum wurden erst primäre Keratinozyten 24 Stunden mit  $\text{CaCl}_2$  angereichertem Medium behandelt und nach Gewinnung der Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Differenzierungsmarker wurden für die frühe Phase der cyclinabhängige Kinaseinhibitor p21 und für die terminale Phase Involucrin herangezogen (vgl. Abb. 5.10 und 5.11). In den ungeraden Beladungsreihen (Reihe 1, 3, 5, 7) wurden jeweils die unstimulierten (Kontroll-) Lysate und in die geraden Reihen 2, 4, 6 und 8 Lysate der  $\text{CaCl}_2$  stimulierten Zellen aufgetragen. In Abbildung 5.10 sieht man bei den stimulierten Kontrollen, wie p21 hoch geregelt wird, was sich jedoch nicht bei der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Mutante nachweisen ließ. Daher wurde zur Kontrolle noch der terminale Differenzierungs-marker Involucrin herangezogen (Abbildung 5.11). Bei diesen Blots lassen sich aber keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten erkennen. Sowohl bei der konstitutiv aktiven (IKK2 EE) als auch der IKK blockierenden IKK2 KD lässt sich Involucrin nach 24 Stunden  $\text{CaCl}_2$  Stimulation detektieren. Die nachweisbaren Involucrin - Banden in den unstimulierten Reihen lassen sich möglicherweise auf die Zentrifugation und den Kontakt mit dem FCS-haltigen DMEM-Medium der Virus produzierenden Phönix-Zellen zurückführen. Trotzdem sind die induzierten Involucrinmengen signifikant und keine Unterschiede erkennbar.



**Abbildung 5.10: Expression von p21 als Differenzierungsmarker nach  $\text{CaCl}_2$  Stimulation.**

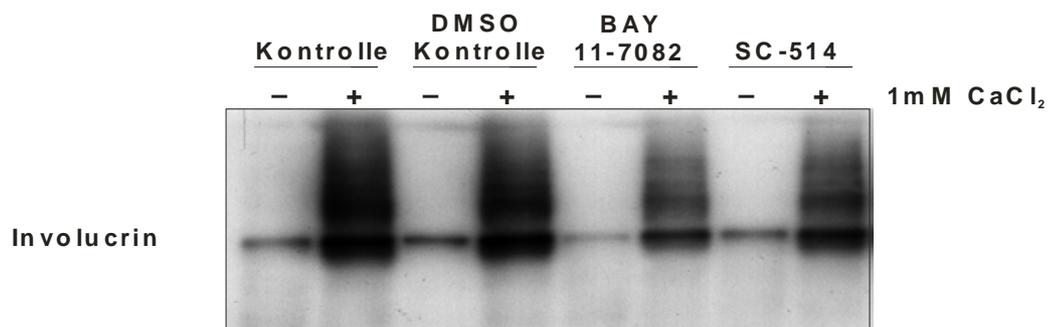
Primäre NHK wurden 48h nach der retroviralen Transfektion für 24h mit 1mM  $\text{CaCl}_2$  inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Western Blot-Abbildung resultiert aus 2 identischen Experimenten.



**Abb. 5.11: Expression von Involucrin als Differenzierungsmarker [Western Blot]**

Primäre NHK wurden 48h nach der retroviralen Transfektion für 24h mit 1mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und auf ein 7,5% SDS-Gel aufgetragen.

Um einen unspezifischen Effekt der retroviralen Infektion als Fehlerquelle auszuschließen, kamen auch bei dieser Versuchsanordnung die Inhibitoren BAY 11-8072 und SC-514 zum Einsatz. In Abbildung 5.12 zeigt sich deutlich die Induzierbarkeit von Involucrin durch die Erhöhung des extrazellulären CaCl<sub>2</sub>. Wie schon bei den vorangegangenen Versuchen zur inflammatorischen Genexpression zeigt sich hier das deutlichste Ergebnis mit dem IKK Inhibitor SC-514, jedoch lässt sich ebenfalls bei BAY 11-7082 Behandlung der Zellen signifikant Involucrin induzieren. Durch die Inhibition von IKK/I $\kappa$ B $\alpha$  konnte keine Beeinflussung der Differenzierung gezeigt werden.



**Abb.5.12: Die IKK Inhibitoren BAY 11-7082 und SC-514 zeigen keine Hemmung der keratinozytären Differenzierung gemessen an der Involucrinsynthese**

Primäre Keratinozyten wurden 1h mit den Inhibitoren BAY 11-7082 (20 $\mu$ M) und SC-514 (200 $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend für 24h mit 1mM CaCl<sub>2</sub> stimuliert. Totallysat der Proben wurde mittels PAGE Western Blot aufgetrennt und gegen Involucrin gefärbt.

## 6. Diskussion

### **Calcium-Stimulation von Keratinozyten bewirkt eine Aktivierung des IKK/NF- $\kappa$ B Signalwegs.**

Regeneration und Erhaltung der epithelialen Homöostase benötigt ein komplexes Zwischenspiel der benachbarten Zellen mit der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Basierend auf Daten aus Wundheilung, Transplantation und Zellkulturversuchen ist dieses Wechselspiel wohl bekannt. Kontrolliert wird die epidermale Regeneration von einem Netzwerk aus Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die die funktionelle Reaktion von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten regulieren (Mackenzie *et al.*, 1993; Stark *et al.*, 1999). Dabei wird die Proliferation der Keratinozyten nicht durch konstitutiv produzierte Wachstumsfaktoren von Fibroblasten unterstützt, sondern setzt sich aus einem doppelt parakrinen Mechanismus der beiden Zelltypen zusammen. Die Keratinozyten kontrollieren die Produktion ihrer Wachstumsfaktoren in den Fibroblasten aktiv durch Freisetzung von IL- $1\alpha$  und  $\beta$  (Maas-Szabowski *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf den IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B-Signalweg und dessen Rolle für die Calcium-induzierte Differenzierung von Keratinozyten gelegt. In humanen Keratinozyten konnte in vorangegangenen Arbeiten durch Einleitung der Differenzierung mittels Calcium eine Stimulation und Aktivierung des MAPK Signalweges Raf/MEK/ERK gezeigt werden (Schmidt *et al.*, 2000b), welche für den intrinsischen Differenzierungsschritt essentiell ist.

Dazu wurde sowohl bei immortalisierten HaCaT Zelllinien als auch bei primären Keratinozyten der extrazelluläre Calciumspiegel erhöht, um einen *switch* von Proliferation in Richtung Differenzierung zu erzielen. So konnte in Abbildung 5.1 eine Induktion eines NF- $\kappa$ B-Bindekomplexes sowie die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  durch ein Gemisch aus den Kinasen IKK2 und IKK1 durch Stimulation mit extrazellulärem Calcium gezeigt werden. Im IKK Kinase-Assay (vgl.: Abb.5.1 A) zeigt sich eine biphasische Aktivierung der I $\kappa$ B Kinase, welches sich durch die *in vitro* Phosphorylierung eines GST-gekoppelten I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins als Substrat nachweisen lässt. Beginnend mit einer raschen transienten Aktivierung nach ca. 10min zeigt sich später wiederkehrend und diesmal über mehrere Stunden anhaltend eine weitere Aktivierung der IKK Kinase. Diese zweite Aktivierung, welche sich allerdings schwächer als die erste zeigt, erreicht ihr Maximum nach circa 24 Stunden. In weiteren zwölf Stunden sinkt die IKK-Aktivität wieder auf basale Level ab. Diese schnelle und frühe Aktivierung des IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signalweges wird auch auf Ebene der DNA-Bindung in einem EMSA-Assay gezeigt, wobei hier jedoch eine konstant erhöhte Aktivität über einen Zeitraum von 20 Stunden beobachtet werden konnte (Abb.5.1 B).

Die maximale Aktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung wird nach 60 Minuten erreicht, wobei sie nach 36 Stunden wieder basales Niveau erreicht. Möglicherweise ist die erneute Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  nach mehreren Stunden nötig, um eine kontinuierliche NF- $\kappa$ B Stimulation aufrecht zu erhalten. Eine solche langfristige NF- $\kappa$ B-Aktivierung könnte für die terminale Differenzierung primärer Keratinozyten ein wesentlicher Faktor sein.

Um nun zu zeigen, ob die frühe Calcium-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B an der intrinsischen Differenzierungsinduktion beteiligt ist, wurden verschiedene keratinozytäre Zelllinien mittels retroviraler Transduktion hergestellt. Diese Zelllinien enthalten Konstrukte, welche entweder positiv oder negativ mit dem NF- $\kappa$ B Signalweg interferieren (Denk et al., 2001g; Wurzer et al., 2004).

Als Kontrollexperiment für die funktionelle Expression dieser Transgene wurde die stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation in den Zellen untersucht. In der Abbildung 5.4 zeigen die Wildtyp- und (Leer-)Vektorlinie nach der Stimulation mit dem NF- $\kappa$ B aktivierenden Zytokin TNF- $\alpha$  die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , welches aber, als eines der Zielgene von NF- $\kappa$ B, selbst nach circa 30-45 Minuten wieder resynthetisiert wird. Neben dem Inhibitor von NF- $\kappa$ B wurden auch zwei Isoformen der I $\kappa$ B Kinase in mutierter Form eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass die dominant negative IKK2 Mutante den Signalweg effektiv hemmt, wohingegen sich für die dominant negative IKK1 Mutante noch eine teilweise I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation erkennen lässt. Durch die konstitutiv aktive IKK2 EE Mutante konnte eine rapide Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen werden, allerdings ohne erneute Resynthese im Zeitrahmen von zwei Stunden. In Abbildung 5.4 zeigt sich bei der IKK2 EE Mutante I $\kappa$ B $\alpha$  auch noch vor der Stimulation. Dieses könnte auf Reste von endogenem I $\kappa$ B $\alpha$  zurückzuführen sein, welches erst durch einen massiven externen Stimulus wie TNF- $\alpha$  vollständig degradiert werden könnte.

Bei Expression der nicht-degradierbaren I $\kappa$ B $\alpha$  Mutante zeigten sich zwei Banden im Experiment, wobei die mutierte von der endogenen Form durch ein anderes Laufverhalten im SDS-Gel unterscheidbar ist. Durch die Stimulation zeigt sich eine rasche Degradation des endogenen I $\kappa$ B $\alpha$ , das allerdings durch die Hemmung von NF- $\kappa$ B durch die überexprimierte mutierte Form nicht wieder induziert und resynthetisiert werden kann.

Zusätzlich zum retroviralen Ansatz der Modulation des IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signalwegs wurden auch pharmakologische Inhibitoren zur Analyse der Differenzierung und der inflammatorischen Antwort eingesetzt. Eine antiinflammatorische Wirkung des NF- $\kappa$ B Inhibitors BAY 11-7082 wurde von Pierce *et al.* durch die Blockade von leukozytären Adhäsionsproteinen in Endothelzellen beschrieben (Pierce et al., 1997a). Auch in Keratinozyten konnte eine proinflammatorische NF- $\kappa$ B Antwort mittels BAY 11-7082 gehemmt werden (Bockelmann et al., 2005b). Zusätzlich wurde der IKK2-spezifische Inhibitor SC-514 für Versuche

herangezogen. SC-514 wurde als indirekter Inhibitor von NF- $\kappa$ B in Fibroblasten beschrieben, wobei in Versuchen das humane T-cell lymphotropische Virus Typ I Protein, Tax, nicht mehr das Tumorsuppressorgen p53 inhibieren konnte (Jeong et al., 2005a).

Durch die Verwendung dieser Inhibitoren in Keratinozyten ließ sich der äußerst leicht durch äußere Stimuli oder Stress induzierte Prozess der Differenzierung, welcher schon alleine durch den Vorgang der retroviralen Infektion teilweise ausgelöst werden kann, untersuchen.

In Titrationsexperimenten (vgl. Abb. 5.5) konnte für primäre Keratinozyten eine Konzentration von 20 $\mu$ M für BAY 11-7082 und für 200 $\mu$ M für SC-514 festgelegt werden. Bei diesen Konzentrationen zeigen beide Inhibitoren eine deutliche Blockade der Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ . Eine weitere Erhöhung der Konzentration empfiehlt sich aufgrund des Lösungsmittels DMSO und der eigentlichen toxischen Wirkung der Inhibitoren selbst nicht.

Mit diesen Versuchsansätzen war es möglich, die Modulation der NF- $\kappa$ B Aktivität in Keratinozyten zu analysieren. Durch die Expression von dominant negativen Mutanten von I $\kappa$ B $\alpha$  und IKK2 bzw. der Verwendung von synthetischen Inhibitoren für diese Proteine konnte eine komplette Blockade des NF- $\kappa$ B Signalwegs erzielt werden (vgl. Abb. 5.4 und Abb. 5.5)

**Inflammatorische Genexpression wird durch NF- $\kappa$ B Inhibierung verhindert.** TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität und der inflammatorischen Feindabwehr (Gloire *et al.*, 2006). So werden durch die Bindung von TNF- $\alpha$  an den korrespondierenden Rezeptor intrazelluläre Signalwege aktiviert, unter ihnen auch das IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Modul (Baud *and* Karin, 2001). Zu den frühen, ein bis vier Stunden nach Stimulation durch TNF- $\alpha$  regulierten Genen gehören Zytokine, Apoptose-relevante Proteine, aber auch für den Verhornungsprozeß bedeutsame Proteine (Banno *et al.*, 2004).

Denk *et al.* konnten 2001 die Abhängigkeit des gesamten TNF-induzierten proinflammatorischen Genexpressionprofils von der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B Kinase Komplex in Endothelzellen zeigen (Denk et al., 2001a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die inflammatorische Antwort von Keratinozyten durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B mittels retroviraler Transduktion dominant negativer Mutanten und durch den Einsatz synthetischer Inhibitoren analysiert. Als eines der Zielgene von NF- $\kappa$ B nach TNF- $\alpha$  Stimulation diente der Oberflächenrezeptor ICAM-1. Bei Untersuchung der Expression von ICAM-1 (Abb. 5.6) im Durchflusszytometer 14 Stunden nach Stimulation sieht man deutlich unterschiedliche Expressionsmuster. So zeigt sich eine deutliche Aktivierung der ICAM-1 Expression in den Wildtyp- und Vektor-Keratinozyten. Eine Expression von ICAM-1 konnte durch die undegradierbare mut I $\kappa$ B $\alpha$  und die dominant negative Form IKK2 KD inhibiert werden. Zellen, welche die konstitutiv aktive Form IKK2 EE und auch die dominant negative Isoform für IKK1 exprimierten, zeigten bereits eine basale Expression von ICAM-1. In diesen Zelllinien konnte mittels TNF- $\alpha$  keine weitere Expression

von ICAM-1 erzielt werden. So zeigen diese Experimenten, dass die I $\kappa$ B Kinase 1 zumindest teilweise eine Rolle bei der Expression von ICAM-1 spielt, wohingegen IKK2 essentiell für die Induktion von ICAM-1 ist. Interessanterweise scheint dieser Signalweg in Keratinozyten unterschiedlich reguliert zu werden. In HUVEC bewirkt IKK1 KD eine teilweise Hemmung der NF- $\kappa$ B-vermittelten Genexpression (Denk et al., 2001e), wohingegen Ergebnisse aus der Gruppe von Hu und Takeda in IKK1-defizienten Fibroblasten zeigen, dass NF- $\kappa$ B nicht mehr durch TNF- $\alpha$  aktivierbar ist (Hu et al., 1999b; Takeda et al., 1999b).

Die gleiche experimentelle Strategie (Abb. 5.7) wurde nun auch für primäre Keratinozyten, die mit synthetischen Inhibitoren vorinkubiert wurden, angewandt. Hierbei konnten sowohl für BAY 11-7082, welches spezifisch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  unterbindet, als auch für SC-514, einem potenten IKK2 Inhibitor, eine Unterdrückung der Expression von ICAM-1 gezeigt werden.

Doch nicht nur auf Bakterien und virale Produkte, sondern auch auf zellulären Stress und epidermale Wachstumsfaktoren antworten Keratinozyten mit einer inflammatorischen Antwort. Neben Regulation von Oberflächenrezeptorproteinen werden auch unterschiedliche Zytokine initiiert. Aus dieser Gruppe der chemotaktischen Botenstoffe wurde das prototypische Interleukin-8 (CXCL8) herausgegriffen. Lässt es sich in gesundem Gewebe fast nicht detektieren, so findet man eine 10- bis 100-fach erhöhte Expression nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder durch zellulären Stress (Hoffmann et al., 2002a). Regulation dieser Interleukin 8 Expression wird durch Kombination dreier Mechanismen bewirkt: erstens durch Freigabe der Genpromotoren, zweitens durch transskriptionelle Aktivierung der IL-8 Gene über Protein-Kinase-Signalwege, wie zum Beispiel NF- $\kappa$ B und drittens durch Stabilisierung der mRNA durch den p38 mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Signalweg (Holtmann et al., 1999). Dass die Erhöhung von intrazellulärem Calcium NF- $\kappa$ B aktivieren, und somit IL-8 regulieren kann, konnte Kim und Mitarbeiter in humanen Mastzellen zeigen (Kim et al., 2005).

In unserem Modellsystem wurden daher stabil transfizierte HaCaT-Zelllinien mittels extrazellulären Calciums zur Differenzierung angeregt und die Ausschüttung von Interleukin-8 analysiert. Deutlich konnte eine Verdoppelung der IL-8 Ausschüttung nach 24 stündiger Inkubation mit 1mM CaCl<sub>2</sub> in den Wildtyp- und Vektor-transduzierten Linien von HaCaT-Zellen gezeigt werden (Abb. 5.8). Durch die Inhibierung des NF- $\kappa$ B Signalweges durch dominant negative IKK2 und mut I $\kappa$ B $\alpha$  konnten die Expression von IL-8 nahezu vollständig unterbunden werden. Ähnliche Ergebnisse konnte von Huber et al. für die Proteine CCR3 und Eotaxin-1 in Fibroblasten gezeigt werden. Diese Arbeitsgruppe konnte die Abhängigkeit der Induktion der proinflammatorischen Proteine CCR3 und Eotaxin-1 von einem Funktionieren des IKK2/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signalwegs nach TNF- $\alpha$  Stimulation belegen (Huber et al., 2002).

Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression proinflammatorischer Gene durch verschiedene Mutanten gehemmt wird. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass die I $\kappa$ B-Kinase 2 für die Induktion der untersuchten Gene benötigt wird. Dies bestätigt die Ergebnisse der Gruppe von Oitzinger *et al.*, welche durch eine dominant-negative IKK2 Mutante eine Reduktion im Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen beobachten konnte (Oitzinger *et al.*, 2001). Auch Daten aus IKK2-defizienten Mäusen zeigen eine deutliche Übereinstimmung in Bezug auf eine NF- $\kappa$ B abhängige inflammatorische Aktivierung der Keratinozyten in der Epidermis (Pasparakis *et al.*, 2002c).

### **Der Calcium-induzierte Differenzierungsprozess wird von NF- $\kappa$ B nicht beeinflusst.**

Unter den von NF- $\kappa$ B regulierten Genen befinden sich nicht nur proinflammatorische Gene, sondern auch solche zur Steuerung der Proliferation und Differenzierung. Bikle und seine Arbeitsgruppe zeigten schon 1996, dass extrazelluläres Calcium zur Induktion der Differenzierung von Keratinozyten nötig ist (Bikle *et al.*, 1996c). Um den Einfluss von Calcium auf das intrinsische Differenzierungsprogramm in Keratinozyten in Bezug auf den IKK/NF- $\kappa$ B Signalweg zu analysieren, wurden Zellen zuerst morphologisch analysiert und anschließend anhand zweier Markerproteine charakterisiert. Dazu diente einerseits der zyklinabhängige Kinaseinhibitor p21/Cip1 als Hinweis auf den frühen Zellzyklusarrest bei der Differenzierung, aber auch das späte Markerprotein Involucrin, welches ein Vorstufenprotein des verhornten *stratum corneum* ist (Seitz *et al.*, 2000a; Basile *et al.*, 2003; Eckert *et al.*, 2004).

Wie in Abbildung 5.9 deutlich unter dem Durchlichtmikroskop zu erkennen ist, ließ sich bei allen primären Keratinozytenlinien durch Calcium ein morphologisch distinktes Differenzierungsprogramm induzieren. Deutlich zu erkennen sind in den Kontrollen die hellen Zellgrenzen, verursacht durch die Lichtbrechung. 24 Stunden nach der Stimulation mit 1mM Calcium ist der Zellkontakt zwischen den Zellen stark verfestigt, sodass die Grenzen zwischen den Zellen lichtundurchlässiger sind, und die Zellen nicht mehr von einem „Lichtkranz“ umgeben sind. Auch weisen die abgeflachten primären Keratinozyten ein kopfsteinpflasterartiges Muster auf. Hier konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B manipulierten Zelllinien beobachtet werden. Die Differenzierung aller Keratinozytenlinien wurde auch auf Proteinebene mit Hilfe von Markerproteinen nachgewiesen. So zeigt die Abbildung 5.10 die Expression der Differenzierungsmarker p21 (A) und Involucrin (B). Betrachtet man aber die Proteinexpression von Involucrin und p21, so zeigten sich grundsätzliche Probleme in Bezug auf die Induktion der Differenzierung. So konnte mehrfach Involucrin in unstimulierten Keratinozyten nachgewiesen werden. Zwar ließ sich Involucrin durch Calcium nach 24 Stunden verstärkt induzieren (vgl. Abb. 5.11), jedoch

konnte in vielen Fällen bereits in der Nullkontrolle basal vorhandenes Involucrin detektiert werden.

Während zu Beginn vermutet wurde, dass diese Effekte auf die virale Transduktion, die Zentrifugation bzw. den Kontakt mit nicht für Keratinozyten optimiertem Medium DMEM, welches für die Virusanzucht verwendet wurde, zurückzuführen sind, konnte im Experiment 5.11 gezeigt werden, dass die basale Aktivierung nicht im Zusammenhang mit der Transduktion zu sehen ist. In dieser Versuchskonzeption wurden die primären Keratinozyten weder zentrifugiert noch mit möglicherweise ungeeignetem Medium behandelt. Die schwächere Bande von Involucrin bei den Proben von BAY 11-7082 lässt sich auf einen allgemein schlechteren Zustand der primären Keratinozyten zurückführen, da im Experiment wiederholt beobachtet werden konnte, dass die BAY 11-7082 - behandelten Zellen *in vitro* früher absterben als die Kontrollpopulation bzw. die SC-514 behandelten Zellen.

Während sich zusammenfassend aus den *in vitro* Experimenten folgern lässt, dass NF- $\kappa$ B keine Rolle in dem Calcium-vermittelten intrinsischen Differenzierungsprogramm spielt, zeigt sich hingegen *in vivo* ein anderes Bild. Inhibiert man NF- $\kappa$ B während der Gliedmaßen- und Hautentwicklung durch transgene und knockout-Ansätze im Mausmodell oder durch Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren, resultiert dies in einer keratinozytären Hyperproliferation. Mäuse mit IKK1-knockout zeigen eine verdickte Epidermis, Hyperplasie und eine beeinträchtigte Differenzierung (Takeda et al., 1999c; Hu et al., 1999a). Auch durch eine epidermis-spezifische Deletion von IKK2 konnte im Mausmodell eine ausgeprägte psoriasisforme Hyperproliferation aufgrund fehlgeleiteter Differenzierung nachgewiesen werden. Diese Mäuse zeigten einen inflammatorischen Phänotyp, hervorgerufen durch einen TNF- $\alpha$ -vermittelte T-Zell unabhängigen inflammatorischen Signalweg (Pasparakis et al., 2002a). Diese Daten korrelieren auch mit dem Nachweis der frühen Induktion von IL-8 in psoriatischer Haut (Nickoloff et al., 1991).

Während Takao et al. keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Calcium in humanen Keratinozyten beobachten konnten, konnte in unseren Experimenten hingegen sehr wohl eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch extrazelluläres Calcium gezeigt werden (vgl. Abb. 5.1; Takao et al., 2003). Weiter vermuten diese Autoren einen von NF- $\kappa$ B unabhängigen Aktivierungsweg der Differenzierung. Diese Hypothese wird durch unsere Experimente in so weit unterstützt, dass sich auch die Zelllinien mit gehemmtem NF- $\kappa$ B Signalweg morphologisch differenzieren konnten. Zusammen mit bereits vorliegenden Daten aus unserer Arbeitsgruppe wird ein Modell bestehend aus zwei Signalkaskaden, welche sich gegenseitig beeinflussen, vorgeschlagen. So konnte bereits von Schmidt et al. die fundamentale Rolle des Raf/MEK/Erk-Signalwegs bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung bei Keratinozyten herausgearbeitet werden (Schmidt et al., 2000a). Auch andere Arbeitsgruppen beobachten Anomalien in den regulatorischen Mechanismen von psoriatischen

Keratinocyten in zumindest zwei wichtigen Transkriptionsfaktorsystemen, welche das Überleben der Zelle und die Proliferation steuern. Aber auch Anomalien in verschiedenen anderen Signalmechanismen und im Calcium Transportsystem lassen auf ein gegenseitiges Wechselwirken verschiedener Faktoren schließen (Karvonen *et al.*, 2000; McKenzie *and* Sabin, 2003).

## 7. Zusammenfassung

Gestörte Proliferations- und Differenzierungsprozesse in Keratinozyten spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Hauterkrankungen. Intrazelluläre Signalmechanismen, die die korrekte Balance zwischen epidermaler Proliferation und Differenzierung aufrecht halten, sind bis jetzt größtenteils unbekannt. Einer dieser ausschlaggebenden Transkriptionsfaktoren ist der Nukleäre Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

Uns interessierte der Einfluss des IKK/NF- $\kappa$ B-Signalweges auf das intrinsische Differenzierungsprogramm von Keratinozyten. Mittels retroviraler Infektion wurden sowohl in primären Keratinozyten als auch in HaCaT verschieden mutante Formen von Faktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges eingebracht: dominant negative (dn) Formen der IKK1 und IKK2, eine konstitutiv aktive Form der IKK2 (IKK2 EE) und eine nicht-degradierbare Form des Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . Zusätzlich wurden auch pharmakologische Inhibitoren von NF- $\kappa$ B (BAY 11-7082 und SC-514) untersucht. Die Funktionalität der Mutanten wurde im Westernblot durch Analyse der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Degradation überprüft. Anschließend wurde die Differenzierung der Keratinozyten durch Erhöhung des extrazellulären Calciums induziert. Der Grad der Differenzierung wurde durch morphologische Studien und Untersuchung der Expression der Differenzierungsmarker p21 und Involucrin untersucht. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Tiermodellen, konnten wir keine Effekte der mutierten  $\text{I}\kappa\text{B}$  Kinasen 1 und 2 auf die Calcium-induzierte *in vitro* Differenzierung beobachten.

Jedoch wurde die Aktivierung inflammatorischer Gene, gemessen an der Induktion von ICAM-1 und IL-8 nach TNF- $\alpha$  Stimulation, vollständig in den IKK2 KD und mut  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  exprimierenden Zellen inhibiert. In der Zelllinie, welche die entsprechende IKK1 Mutante trug, wurde deren Expression nur teilweise geblockt.

Zusammenfassend lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass zumindest *in vitro* IKK1 und IKK2 nicht an der Regulation des Calcium-induzierten intrinsischen Differenzierungsprozesses von Keratinozyten beteiligt sind, jedoch eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Aktivierung dieser Zellen spielen.

## 8. Summary

Disturbed proliferation and differentiation processes of keratinocytes play a major role in the pathogenesis of many skin diseases. Intracellular signalling mechanisms which regulate the balance between epidermal proliferation and differentiation, however, are thus far largely unknown. Earlier reports suggest a role for the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in such processes.

Here we attempted to analyze the impact of the IKK/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signalling pathway on the intrinsic differentiation process of keratinocytes. Primary human keratinocytes as well as HaCaT cells were retrovirally infected to express different mutant forms of components of the IKK/NF- $\kappa$ B pathway: dominant negative (dn) mutants of NF- $\kappa$ B upstream kinases IKK1 and IKK2, a constitutive active form of IKK2 (IKK2 EE), and a non degradable mutant form of I $\kappa$ B $\alpha$ . In addition, pharmacological inhibitors of the pathway such as BAY 11-7082 and SC-514 were analysed. Proper functionality of the generated mutants was subsequently confirmed by Western blot analysis monitoring induced I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. Thereafter, differentiation of keratinocytes was induced by elevation of extracellular calcium levels. The differentiation state of keratinocytes was then assessed by studying morphology and expression of differentiation markers such as p21 as well as involucrin.

In contrast to data reported from animal models, we could not detect any effects of mutated IKK1 or IKK2 on the calcium-induced intrinsic differentiation program in keratinocytes. However, inflammatory activation of keratinocytes as measured by TNF- $\alpha$ -mediated up-regulation of ICAM-1 and IL-8 was almost completely inhibited in cells expressing dn IKK2 and the I $\kappa$ B $\alpha$  mutant form whereas it was only partly blocked in IKK1dn cells.

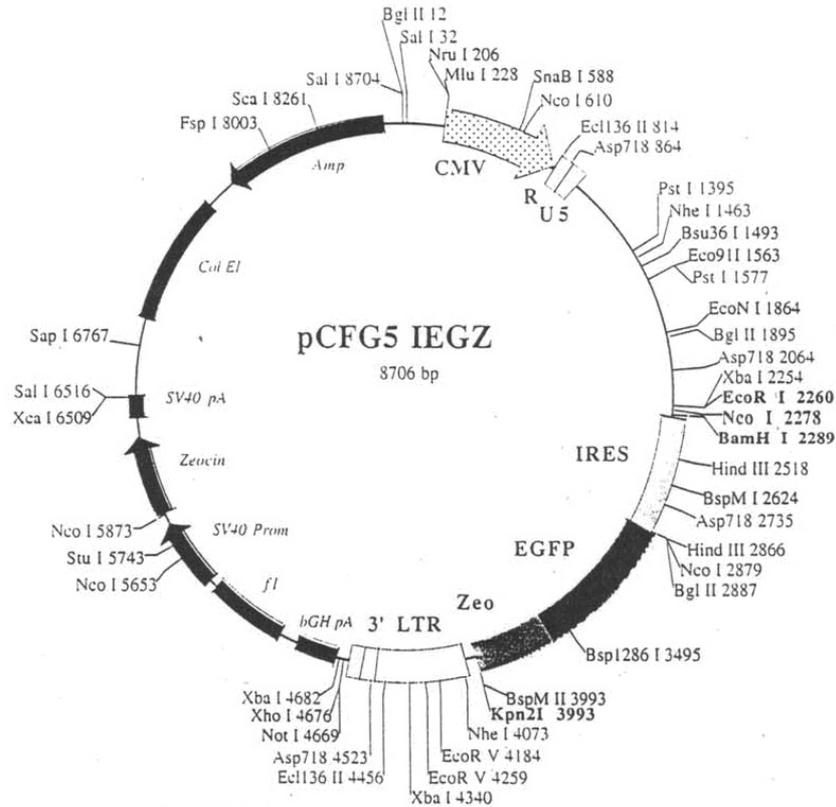
In conclusion, our data suggest that, in least *in vitro*, IKK1 and IKK2 are not involved in the regulation of calcium-induced keratinocyte differentiation while they are pivotal for inflammatory activation of these cells.

## 9. Anhang

### 9.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
7AAD	7-Amino-Actinomycin D
BSA	Bovines Serum-Albumin
Ca <sub>ex</sub>	extrazelluläres Calcium <sup>2+</sup>
Ca <sub>in</sub>	intrazelluläres Calcium <sup>2+</sup>
CaR	Calciumrezeptor
cpm	,counts per minute', Zerfalleinheiten pro Minute
DG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium,
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/-acid
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	EthylenDiaminTetraAcetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ,
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zell-Sorter
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
FITC	Fluorescein - Isothiocyanat
HaCaT	<i>Human adult keratinocytes, Calcium, Temperature</i> , Keratinozytenzelllinie
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INV	Involucrin
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 Tris-Phosphat
kDa	kiloDalton
KGM2	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i> , Keratinozyten-Wachstumsmedium 2
KGM2 (H)	0,05mM CaCl <sub>2</sub> Keratinozyten-Wachstumsmedium (Hungermedium)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrozin
PI	Propidiumjodid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
UPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (ca. 22°C)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	<i>Sideward Scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
T4-PNK	T4 – Polynukleotide Kinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-Methyl-EthyleneDiamine
TG	Transglutaminase

9.2 Vektorkarte



old Name:  
EGZ/MCS

The following enzymes do not cut in pCFG5 IEGZ

Asc I	BsaB I	BsiC I	BsiW I	Bsp119 I
BstB I	Cla I	Eco47 III	Esp I	Hpa I
Rsr II	Sac II	Sfi I	Spl I	Xcm I

Name : pczCFG5 IEGZ

Cloning Strategy

Vector  
inserts

Vector

backbone pCDNA3.1+ zeo  
type eukaryotic  
subtype expression vector  
retroviral vector

Resistance prokaryotic ampicillin  
eukaryotic zeocin

Comments Retroviral vector for the MuLV driven constitutive expression of a gene of interest inserted in the Polylinker (EcoRI/NcoI/BamHI) and through IRES mediated expression the EGFP-Zeo (EGZ) fusion protein.

Do not distribute this vector or information about it to third parties without prior written consent

References unpublished

## 10. Literaturverzeichnis

- Abbas,A.K., Lichtman,A.H., and Pober,J.S. (2000). Cellular and molecular immunology. (Philadelphia: W.B. Saunders).
- Andrews,N.C. and Faller,D.V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 2499.
- Banno,T., Gazel,A., and Blumenberg,M. (2004). Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J. Biol. Chem.* 279, 32633-32642.
- Basile,J.R., Eichten,A., Zacny,V., and Munger,K. (2003). NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol. Cancer Res.* 1, 262-270.
- Baud,V. and Karin,M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372-377.
- Bikle,D.D., Ng,D., Tu,C.L., Oda,Y., and Xie,Z. (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 177, 161-171.
- 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. *Journal of Clinical Investigation* 97, 1085-1093.
- Birnboim,H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.
- Bockelmann,R., Horn,T., Gollnick,H., and Bonnekoh,B. (2005). Interferon-gamma-dependent in vitro model for the putative keratin 17 autoimmune loop in psoriasis: exploration of pharmaco- and gene-therapeutic effects. *Skin Pharmacol. Physiol* 18, 42-54.
- Bonifati,C. and Ameglio,F. (1999). Cytokines in psoriasis. *Int. J. Dermatol.* 38, 241-251.
- 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, 761-771.
- Braga,V.M., Hovalva,K.J., and Watt,F.M. (1995). Calcium-induced changes in distribution and solubility of cadherins, integrins and their associated cytoplasmic proteins in human keratinocytes. *Cell Adhes. Commun.* 3, 201-215.
- Brysk,M.M., Selvanayagam,P., Arany,I., Brysk,H., Tying,S.K., and Rajaraman,S. (1995). Induction of apoptotic nuclei by interferon-gamma and by predesquamin in cultured keratinocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 1029-1035.
- Cai,S., Fatherazi,S., Presland,R.B., Belton,C.M., and Izutsu,K.T. (2005). TRPC channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 40, 21-28.
- 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, 2279-2291.

- Candi,E., Schmidt,R., and Melino,G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328-340.
- Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L., and Lenardo,M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chattopadhyay,N., Mithal,A., and Brown,E.M. (1996). The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr. Rev.* 17, 289-307.
- Chaturvedi,V., Qin,J.Z., Denning,M.F., Choubey,D., Diaz,M.O., and Nickoloff,B.J. (1999). Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 23358-23367.
- Chen,C., Edelstein,L.C., and Gelinas,C. (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell Biol.* 20, 2687-2695.
- Chen,G., Cao,P., and Goeddel,D.V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell* 9, 401-410.
- Courtois,G. (2005). The NF-kappaB signaling pathway in human genetic diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1682-1691.
- Declercq,W., Vandenabeele,P., and Fiers,W. (1995). Dimerization of chimeric erythropoietin/75 kDa tumour necrosis factor (TNF) receptors transduces TNF signals: necessity for the 75 kDa-TNF receptor transmembrane domain. *Cytokine* 7, 701-709.
- Denk,A., Goebeler,M., Schmid,S., Berberich,I., Ritz,O., Lindemann,D., Ludwig,S., and Wirth,T. (2001). Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 28451-28458.
- Denk,A., Goebeler,M., Schmid,S., Berberich,I., Ritz,O., Lindemann,D., Ludwig,S., and Wirth,T. (2001). Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 28451-28458.
- 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, 149-157.
- Eckert,R.L. (1989). Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev.* 69, 1316-1346.
- Eckert,R.L., Crish,J.F., Efimova,T., Dashti,S.R., Deucher,A., Bone,F., Adhikary,G., Huang,G., Gopalakrishnan,R., and Balasubramanian,S. (2004). Regulation of involucrin gene expression. *J. Invest Dermatol.* 123, 13-22.
- Elias,P.M., Ahn,S.K., Denda,M., Brown,B.E., Crumrine,D., Kimutai,L.K., Komuves,L., Lee,S.H., and Feingold,K.R. (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J. Invest Dermatol.* 119, 1128-1136.
- Filvaroff,E., Calautti,E., Reiss,M., and Dotto,G.P. (1994). Functional evidence for an extracellular calcium receptor mechanism triggering tyrosine kinase activation associated with mouse keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 269, 21735-21740.

- Fraser,A. and Evan,G. (1996). A license to kill. *Cell* 85, 781-784.
- Gandarillas,A. (2000). Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp. Gerontol.* 35, 53-62.
- Gandarillas,A., Goldsmith,L.A., Gschmeissner,S., Leigh,I.M., and Watt,F.M. (1999). Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp. Dermatol.* 8, 71-79.
- Gloire,G., Legrand-Poels,S., and Piette,J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493-1505.
- Grando,S.A., Horton,R.M., Mauro,T.M., Kist,D.A., Lee,T.X., and Dahl,M.V. (1996). Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J. Invest Dermatol.* 107, 412-418.
- Green,H. (1977). Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11, 405-416.
- Grell,M., Zimmermann,G., Hulser,D., Pfizenmaier,K., and Scheurich,P. (1994). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J. Immunol.* 153, 1963-1972.
- Gugasyan,R., Voss,A., Varigos,G., Thomas,T., Grumont,R.J., Kaur,P., Grigoriadis,G., and Gerondakis,S. (2004). The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 24, 5733-5745.
- Haake,A.R. and Cooklis,M. (1997). Incomplete differentiation of fetal keratinocytes in the skin equivalent leads to the default pathway of apoptosis. *Exp. Cell Res.* 231, 83-95.
- Haake,A.R. and Polakowska,R.R. (1993). Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J. Invest Dermatol.* 101, 107-112.
- Hayden,M.S. and Ghosh,S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195-2224.
- Hebert,S.C. and Brown,E.M. (1995). The extracellular calcium receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 484-492.
- Heller,R.A., Song,K., Fan,N., and Chang,D.J. (1992). The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70, 47-56.
- Hennings,H. and Holbrook,K.A. (1983). Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp. Cell Res.* 143, 127-142.
- 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, 245-254.
- Hennings,H., Steinert,P., and Buxman,M.M. (1981). Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 739-745.
- Henseleit,U., Rosenbach,T., and Kolde,G. (1996). Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 676-683.

- Hisa, T., Taniguchi, S., Kobayashi, H., Shigenaga, Y., Nomura, S., and Takigawa, M. (1995). Apoptosis in normal skin. *Acta Derm. Venereol.* *75*, 412-413.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., and Korsmeyer, S.J. (1991). BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 6961-6965.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 847-855.
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N.L., Cooper, J.A., Resch, K., and Kracht, M. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6742-6753.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkkappaB kinase. *Science* *284*, 316-320.
- Huber, M.A., Denk, A., Peter, R.U., Weber, L., Kraut, N., and Wirth, T. (2002). The IKK-2/Ikappa Balpha /NF-kappa B pathway plays a key role in the regulation of CCR3 and eotaxin-1 in fibroblasts. A critical link to dermatitis in Ikappa Balpha -deficient mice. *J. Biol. Chem.* *277*, 1268-1275.
- 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*, 1033-1038.
- Jansen, B.J., van Ruissen, F., de Jongh, G., Zeeuwen, P.L., and Schalkwijk, J. (2001). Serial analysis of gene expression in differentiated cultures of human epidermal keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* *116*, 12-22.
- Jeong, S.J., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Park, H.U., and Brady, J.N. (2005). A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 10326-10332.
- Kalinin, A., Marekov, L.N., and Steinert, P.M. (2001). Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. Cell Sci.* *114*, 3069-3070.
- Karin, M. and Ben Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 621-663.
- Kartasova, T., Roop, D.R., Holbrook, K.A., and Yuspa, S.H. (1993b). Mouse differentiation-specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network. *J. Cell Biol.* *120*, 1251-1261.
- Kartasova, T., Roop, D.R., Holbrook, K.A., and Yuspa, S.H. (1993a). Mouse differentiation-specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network. *J. Cell Biol.* *120*, 1251-1261.
- Karvonen, S.L., Korkiamaki, T., Yla-Outinen, H., Nissinen, M., Teerikangas, H., Pummi, K., Karvonen, J., and Peltonen, J. (2000). Psoriasis and altered calcium metabolism: downregulated capacitative calcium influx and defective calcium-mediated cell signaling in cultured psoriatic keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* *114*, 693-700.

- Kim,M.S., Lim,W.K., Park,R.K., Shin,T., Yoo,Y.H., Hong,S.H., An,N.H., and Kim,H.M. (2005). Involvement of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation in Ca<sup>2+</sup>-induced IL-8 production in human mast cells. *Cytokine* 32, 226-233.
- Kishore,N., Sommers,C., Mathialagan,S., Guzova,J., Yao,M., Hauser,S., Huynh,K., Bonar,S., Mielke,C., Albee,L., Weier,R., Graneto,M., Hanau,C., Perry,T., and Tripp,C.S. (2003). A selective IKK-2 inhibitor blocks NF-kappa B-dependent gene expression in interleukin-1 beta-stimulated synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 278, 32861-32871.
- Komuves,L., Oda,Y., Tu,C.L., Chang,W.H., Ho-Pao,C.L., Mauro,T., and Bikle,D.D. (2002). Epidermal expression of the full-length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation. *J. Cell Physiol* 192, 45-54.
- Kucharczak,J., Simmons,M.J., Fan,Y., and Gelinas,C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961-8982.
- Kuss,A.W., Knodel,M., Berberich-Siebelt,F., Lindemann,D., Schimpl,A., and Berberich,I. (1999). A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 29, 3077-3088.
- Lee,S.H., Jang,J.J., Lee,J.Y., Kim,S.Y., Park,W.S., Shin,M.S., Dong,S.M., Na,E.Y., Kim,K.M., Kim,C.S., Kim,S.H., and Yoo,N.J. (1998). Fas ligand is expressed in normal skin and in some cutaneous malignancies. *Br. J. Dermatol.* 139, 186-191.
- Li,Q., Lu,Q., Hwang,J.Y., Buscher,D., Lee,K.F., Izpisua-Belmonte,J.C., and Verma,I.M. (1999). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev.* 13, 1322-1328.
- Maas-Szabowski,N., Szabowski,A., Stark,H.J., Andrecht,S., Kolbus,A., Schorpp-Kistner,M., Angel,P., and Fusenig,N.E. (2001). Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J. Invest Dermatol.* 116, 816-820.
- MacEwan,D.J. (2002). TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.* 135, 855-875.
- Mackenzie,I., Rittman,G., Bohnert,A., Breikreutz,D., and Fusenig,N.E. (1993). Influence of connective tissues on the in vitro growth and differentiation of murine epidermis. *Epithelial Cell Biol.* 2, 107-119.
- Mauro,T.M., Isseroff,R.R., Lasarow,R., and Pappone,P.A. (1993). Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *J. Membr. Biol.* 132, 201-209.
- McCall,C.A. and Cohen,J.J. (1991). Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J. Invest Dermatol.* 97, 111-114.
- McKenzie,R.C. and Sabin,E. (2003). Aberrant signalling and transcription factor activation as an explanation for the defective growth control and differentiation of keratinocytes in psoriasis: a hypothesis. *Exp. Dermatol.* 12, 337-345.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4-9.
- Messer,G. and Rupec,R.A. (2001). [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). II. Pathophysiologic meaning]. *Hautarzt* 52, 746-752.

- Mitra,R.S., Wrone-Smith,T., Simonian,P., Foreman,K.E., Nunez,G., and Nickoloff,B.J. (1997). Apoptosis in keratinocytes is not dependent on induction of differentiation. *Lab Invest* 76, 99-107.
- Nickoloff,B.J., Karabin,G.D., Barker,J.N., Griffiths,C.E., Sarma,V., Mitra,R.S., Elder,J.T., Kunkel,S.L., and Dixit,V.M. (1991). Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *Am. J. Pathol.* 138, 129-140.
- 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, 1183-1190.
- 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, 23344-23352.
- Oitzinger,W., Hofer-Warbinek,R., Schmid,J.A., Koshelnick,Y., Binder,B.R., and de Martin,R. (2001). Adenovirus-mediated expression of a mutant I $\kappa$ B kinase 2 inhibits the response of endothelial cells to inflammatory stimuli. *Blood* 97, 1611-1617.
- Pahl,H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Pasparakis,M., Courtois,G., Hafner,M., Schmidt-Supprian,M., Nenci,A., Toksoy,A., Krampert,M., Goebeler,M., Gillitzer,R., Israel,A., Krieg,T., Rajewsky,K., and Haase,I. (2002). TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417, 861-866.
- Paus,R., Rosenbach,T., Haas,N., and Czarnetzki,B.M. (1993). Patterns of cell death: the significance of apoptosis for dermatology. *Exp. Dermatol.* 2, 3-11.
- Pierce,J.W., Schoenleber,R., Jesmok,G., Best,J., Moore,S.A., Collins,T., and Gerritsen,M.E. (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 21096-21103.
- Pillai,S. and Bikle,D.D. (1992). Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J. Clin. Invest* 90, 42-51.
- Pillai,S., Bikle,D.D., Mancianti,M.L., Cline,P., and Hincenbergs,M. (1990). Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J. Cell Physiol* 143, 294-302.
- Punnonen,K., Denning,M., Lee,E., Li,L., Rhee,S.G., and Yuspa,S.H. (1993). Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. *J. Invest Dermatol.* 101, 719-726.
- Qin,J.Z., Bacon,P., Chaturvedi,V., and Nickoloff,B.J. (2001). Role of NF-kappaB activity in apoptotic response of keratinocytes mediated by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Invest Dermatol.* 117, 898-907.
- Qin,J.Z., Chaturvedi,V., Denning,M.F., Choubey,D., Diaz,M.O., and Nickoloff,B.J. (1999). Role of NF-kappaB in the apoptotic-resistant phenotype of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 37957-37964.

- Ravi,R., Bedi,G.C., Engstrom,L.W., Zeng,Q., Mookerjee,B., Gelinas,C., Fuchs,E.J., and Bedi,A. (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell Biol.* 3, 409-416.
- Regnier,C.H., Song,H.Y., Gao,X., Goeddel,D.V., Cao,Z., and Rothe,M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90, 373-383.
- Sambrook,J. and Russell,D.W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schmidt,M., Goebeler,M., Posern,G., Feller,S.M., Seitz,C.S., Brocker,E.B., Rapp,U.R., and Ludwig,S. (2000). Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 41011-41017.
- Schmidt-Suppran,M., Bloch,W., Courtois,G., Addicks,K., Israel,A., Rajewsky,K., and Pasparakis,M. (2000). NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol. Cell* 5, 981-992.
- Seitz,C.S., Freiberg,R.A., Hinata,K., and Khavari,P.A. (2000). NF-kappaB determines localization and features of cell death in epidermis. *J. Clin. Invest* 105, 253-260.
- 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, 2307-2312.
- Sells,M.A., Li,J., and Chernoff,J. (1995). Delivery of protein into cells using polycationic liposomes. *Biotechniques* 19, 72-6, 78.
- Sharpe,G.R., Gillespie,J.I., and Greenwell,J.R. (1989). An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* 254, 25-28.
- Stark,H.J., Baur,M., Breitkreutz,D., Mirancea,N., and Fusenig,N.E. (1999). Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J. Invest Dermatol.* 112, 681-691.
- Takao,J., Yudate,T., Das,A., Shikano,S., Bonkobara,M., Ariizumi,K., and Cruz,P.D. (2003). Expression of NF-kappaB in epidermis and the relationship between NF-kappaB activation and inhibition of keratinocyte growth. *Br. J. Dermatol.* 148, 680-688.
- Takeda,K., Takeuchi,O., Tsujimura,T., Itami,S., Adachi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Yoshikawa,K., Terada,N., and Akira,S. (1999). Limb and skin abnormalities in mice lacking
- Tamada,Y., Takama,H., Kitamura,T., Yokochi,K., Nitta,Y., Ikeya,T., and Matsumoto,Y. (1994). Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA. *Br. J. Dermatol.* 131, 521-524.
- Tartaglia,L.A., Ayres,T.M., Wong,G.H., and Goeddel,D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
- Tartaglia,L.A., Pennica,D., and Goeddel,D.V. (1993). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 18542-18548.
- Taylor,J.K., Zhang,Q.Q., Monia,B.P., Marcusson,E.G., and Dean,N.M. (1999). Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. *Oncogene* 18, 4495-4504.

- Teraki, Y. and Shiohara, T. (1999). Apoptosis and the skin. *Eur. J. Dermatol.* 9, 413-425.
- Tu, C.L., Chang, W., and Bikle, D.D. (2001). The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 41079-41085.
- Tu, C.L., Oda, Y., Komuves, L., and Bikle, D.D. (2004). The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium* 35, 265-273.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and Baldwin, A.S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Weil, M., Raff, M.C., and Braga, V.M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.* 9, 361-364.
- Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O., and Ludwig, S. (2004). NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J. Biol. Chem.* 279, 30931-30937.
- Xie, Z. and Bikle, D.D. (1999). Phospholipase C-gamma1 is required for calcium-induced keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 274, 20421-20424.
- Xie, Z., Singleton, P.A., Bourguignon, L.Y., and Bikle, D.D. (2005). Calcium-induced human keratinocyte differentiation requires src- and fyn-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of phospholipase C-gamma1. *Mol. Biol. Cell* 16, 3236-3246.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I-kappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- 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, 1207-1217.
- Zandi, E. and Karin, M. (1999). Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I-kappaB kinase complex. *Mol. Cell Biol.* 19, 4547-4551.
- Zhang, G. and Ghosh, S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J. Clin. Invest* 107, 13-19.
- Zhao, Y., Sudol, M., Hanafusa, H., and Krueger, J. (1992). Increased tyrosine kinase activity of c-Src during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 8298-8302.
- Zong, W.X., Bash, J., and Gelinas, C. (1998). Rel blocks both anti-Fas- and TNF alpha-induced apoptosis and an intact Rel transactivation domain is essential for this effect. *Cell Death. Differ.* 5, 963-972.

## 11. Curriculum Vitae

Mag. rer. nat. Martin Giner

Ebertsklinge 2  
97074 Würzburg  
Deutschland

---

**GEBURTSDATUM** 02. Oktober 1975 in Innsbruck/Tirol

**FAMILIENSTAND** verheiratet

**NATIONALITÄT** österreichisch

### AUSBILDUNG

1987-1990 Humanistisches Gymnasium Angerzellgasse Innsbruck

1990-1994 Bundesoberstufen Realgymnasium Innsbruck, naturw. Zweig

1994 Matura am BORG Innsbruck

### BUNDESHEER

1994-1995 Einjährigen Freiwilligen Ausbildung

Seit 2004 Millizoffizier im JgB24 St.Johann/Tirol

### STUDIUM

1995-1998 Leopold-Franzens Universität Innsbruck

1998 Abschluss Erster Diplomabschnitt: Stzw. Mikrobiologie

1997-2001 Paris-Lodron Universität Salzburg

2001 Abschluss Zweiter Diplomabschnitt: Stzw. Genetik

Abschluss Diplomarbeit am Institut für Genetik:

*„Optimierung einzelner Schritte zur Konstruktion von cDNA Banken aus kleinen Mengen.“*

Seit 2001 Promotionsstudium an der Julius-Maximilians Universität Würzburg und der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

*„Signalmechanismen der epithelialen Proliferation und Differenzierung.“*

### BERUFSERFAHRUNG

2001-03.2004 naturwissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Universität Würzburg

04.2004-09.2005 naturwissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Medizin, Universität Düsseldorf

Seit 08.2006 Produktspezialist der Sparte GenomeLab der Firma Beckman Coulter, Krefeld

## 12. Publikation und Präsentationen

- Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation  
Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, **Giner M**, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S.  
EMBO J. 2003 Jun 2;22(11):2717-28.
- Poster:  
The Role of I $\kappa$ B kinases IKK1 and IKK2 in calcium-induced differentiation and proinflammatory activation of human keratinocytes.  
**M. Giner**, S. Schmid, EB. Bröcker, S. Ludwig, M. Goebeler  
Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft deutscher Dermatologen, Dresden 2004
- Poster:  
Interference with the NF- $\kappa$ B pathway in human keratinocytes: different effects on proinflammatory activation and calcium-induced differentiation  
**M. Giner**, S. Schmid, EB. Bröcker, S. Ludwig, M. Goebeler  
Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft deutscher Dermatologen, Innsbruck 2005

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, 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 keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Martin Giner