INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Diplom-Biologin **Julia Knebel**

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Heidelberg, 2006

Kontrolle der Stratifizierung und terminalen Differenzierung von Keratinozyten durch dermale Faktoren

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel

Prof. Dr. Aria Baniahmad

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Angel, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen, und der meine wissenschaftliche Entwicklung stark gefördert hat. Ich danke ihm für seine Unterstützung bei der Antragsstellung um ein Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds und dafür, dass ich meine Arbeit auf zahlreichen Kongressen präsentieren durfte. Weiterhin vielen Dank dafür, dass er als Gutachter dieser Arbeit auftritt.

Gleichermaßen gilt mein Dank Prof. Dr. Aria Baniahmad für seine Bereitschaft, meine Arbeit an der Justus-Liebig-Universität in Giessen zu vertreten und es mir so zu ermöglichen, trotz der Bearbeitung des Themas am Deutschen Krebsforschungszentrum meiner Heimat-Universität verbunden zu bleiben.

Herrn Prof. Dr. Clauss möchte dafür danken, dass er bei meiner Disputation als Prüfer fungiert.

Dr. Axel Szabowski möchte ich meinen Dank aussprechen für die Betreuung meiner Arbeit und für die hervorragende Konzeption des Projektes. Er führte mich geduldig an eine selbständige und eigenverantwortliche Arbeitsweise heran und war immer präsent, um mir in schwierigen Phasen der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Durch Dich habe ich viel über mich selbst und für das Leben gelernt. Zusätzlich möchte ich mich auch bei Dir für das sorgfältige Lesen meiner Arbeit, die konstruktive Kritik und für die Hilfe bei der Antragstellung des Stipendiums bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Martina Schnölzer aus der Abteilung Proteinanalytik des DKFZ für die massenspektrometrische Analyse meiner Proben.

Danken möchte ich auch meiner Kooperationspartnerin Dr. Nicole Maas-Szabowski aus der Arbeitsgruppe von Prof. Fusenig, die mich geduldig in die Zellkulturtechnik der heterologen Cokulturen eingearbeitet hat.

Dr. Lore Florin möchte ich für die Bereitstellung von Wundgewebeschnitten und Wund-cDNA danken. Prof. Dr. Erwin Wagner danke ich für die zur Verfügung gestellten *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ Fibroblasten.

Bei Sibylle Teurich möchte ich mich für die Einweisung, die Anleitung und die bereitwillige Unterstützung bei allen Fragen der praktischen Laborarbeit bedanken. Vielen Dank!

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung A100, die mich durch hilfreiche Taten und gute Ratschläge unterstützt haben. Ihr alle habt dazu beigetragen, dass mir die Arbeit mit Euch im Labor viel Freude bereitet hat – ein ganz herzliches Dankeschön Euch allen!

Letztlich gilt mein allergrößter Dank meiner Familie – meiner Mutter Christa und meinem Vater Bernd - und meinem Freund Patrick.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMV-RT	„Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase“
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5’-Triphosphat
ATRA	„All Trans Retinoic Acid“
bp	Basenpaar(e)
bFGF	„basic Fibroblast Growth Factor“
BMP	„Bone Morphogenetic Protein“
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Col1α2	Kollagen Typ (I)-alpha2
cpm	„counts per minute”
CRE	„cAMP Responsive Element”
Cre	Cre-Rekombinase
dATP	Desoxy-Adenosin-5’-Triphosphat
ddH_2O	steriles destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM	„Dulbecco´s Modified Eagles´s Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
dpp	„decapentaplegic“

DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalentwicklung
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
ECM	Extrazelluläre Matrix
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„Epidermal Growth Factor“
ERK	„Extracellular Signal Regulated Kinase“, MAP-Kinase p42/p44
EST	„Expressed sequence tags“
FAD	„F12 and DMEM“
FCS	„Fetal Calf Serum“
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	„Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor”
Gro-1	“Growth Related Protein-1“/ KC/ MGSA/ CXCL1
GRHL	“Grainyhead-Like”
h	“hour”
HB-EGF	„Heparin-Binding Epidermal Growth Factor“
HE	Hämatoxilin/eosin
IGF-1	„Insulin-like Growth Factor 1”
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
INF	Interferon
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
K	Keratin
k	kilo
kb	Kilobase(n)
kDa	„Kilodalton“
KGF	„Keratinocyte Growth Factor“
Lcn-2	Lipocalin-2
M	molar (Mol/Liter)

MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCP-1	„Monocyte Chemoattractant Protein 1“
MEF	Embryonale Mausfibroblasten
min	Minute(n)
Mip-2	„Macrophage Inflammatory Protein 2“/ CXCL2
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NEK	normale epidermale Keratinozyten
NFκB	„Nuclear factor κ B“
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
OT	Objektträger
OTK	organotypische Kulturen
p.a.	*pro analysum*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	„Platelet-derived Growth Factor“
PEDF	„Pigment Epithelium Derived Factor“
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTN	Pleiotrophin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
SSC	„Standard Saline Citrate“
SDF-1	„Stromal Cell-derived Factor 1“/ CXCL12
Tab.	Tabelle

Taq	*thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat/EDTA
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethyldiamin
TGF	„Transforming Growth Factor“
TNF	„Tumor Necrosis Factor“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Enzymeinheit (unit)
UE	Untereinheit
UV	ultraviolette Strahlung
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
VEGFR	Rezeptor von VEGF
Vol	Volumen
v/v	Volumen-Volumenverhältnis
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Seite

I Danksagung

II Abkürzungsverzeichnis

III Inhaltsverzeichnis 1

1 Summary 5

2 Zusammenfassung 6

3 Einleitung 7

3.1 Die humane Haut

3.2 Der Aufbau der Haut

3.2.1 Epidermis

3.2.1 Epidermis

3.3 Regenerative Prozesse in der Haut

3.3.1 Homöostase

3.3.2 Wundheilung

3.3.2.1 Bildung eines Fibrinpfropfes

3.3.2.2 Entzündungsphase

3.3.2.3 Bildung des Granulationsgewebes und Reepithelialisierung

3.4 Dermal-epidermale Interaktion

3.5 JNK-Signalweg

3.5.1 Die Rolle von JNK in der epidermalen Morphogenese

4 Fragestellung

5 Material und Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für zellbiologische Methoden

5.1.2 Kultivierung und Passagierung von murinen embryonalen Fibroblasten

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

5.1.4 Anreicherung löslicher Proteine in konditioniertem Medium mit der Rührzelle
5.1.5 Präzipitation von sezernierten Proteinen in konditioniertem Medium
5.1.6 Mykoplasmentest
5.1.7 Isolierung von Keratinozyten aus humaner Haut
5.1.8 Isolierung von Fibroblasten aus humaner Haut
5.1.9 Herstellen und Kultivieren von Feeder-Fibroblasten
5.1.10 von Keratinozyten auf humanen Feeder-Fibroblasten
5.1.11 Subkultivierung von Keratinozyten
5.1.12 von Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen
5.1.13 Herstellen von Kollagengelen
5.1.14 Organotypische Kulturen
5.1.15 Fixierung von organotypischen Cokulturen
5.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden
5.2.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für zellbiologische Methoden
5.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA
5.2.2.1 RNA-Isolierung mit Lösung D
5.2.2.2 RNA-Isolierung mit TRIzol®
5.2.3 DNase Verdau
5.2.4 Synthese von cDNA
5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion
5.2.5.1 Primer
5.2.6 Quantitative „Real-Time“ PCR
5.2.7 Allgemeine Klonierungstechniken
5.2.8 Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme
5.2.9 Agarose-Gelelektrophorese
5.2.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über präparative Gele
5.2.11 Ligation von Plasmiden
5.2.12 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien
5.2.13 Transformation von chemisch kompetenten ***E.coli*** Bakterien

5.2.14 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräp)
5.2.15 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräp)
5.2.16 Photometrische Konzentrationsbestimmung
5.2.17 *situ*-Hybridisierung (ISH)
5.2.17.1 radioaktiv-markierte *in situ* Hybridisierung
5.2.17.2 Fluoreszenz-markierte *in situ* Hybridisierung
5.3 Proteinbiochemische Methoden
5.3.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für zellbiologische Methoden
5.3.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten
5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry
5.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
5.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen
5.3.6 „Strippen“ einer Membran
5.3.7 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese
5.3.8 Silberfärbung
5.3.9 Proteinverdau zur Vorbereitung der Maldi-MS-Sequenzierung
5.3.10 Matrixunterstützte-Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)
5.4 Histologische Methoden
5.4.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für zellbiologische Methoden
5.4.2 Anfertigung von Paraffin-Schnitten
5.4.3 Hämatoxylin und Eosin Färbung
5.4.4 Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern
5.4.5 *In Situ*-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation

6 Ergebnisse

6.1 Experimentelle Bedingungen zum Nachweis sezernierter Proteine in konditionierten Mediumüberständen
6.2 Identifizierung JNK-abhängiger sezernierter Proteine

6.3 Charakterisierung der Expression von PEDF und BMP-4

6.4 PEDF und BMP-4 werden *in vivo* von dermalen Fibroblasen exprimiert

6.5 Die Expression von PEDF und BMP-4 wird während der Wundheilung reguliert

6.6 PEDF und BMP-4 induzieren durch eine gemeinsame Wirkungsweise eine Stratifiziereung von Keratinozyten

6.7 Eine gemeinsame Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 ist nötig, um das komplette terminale Differenzierungsprogramm in Keratinozyten zu initiieren

7 Diskussion

7.1 Die von Fibroblasten sezernierten, JNK-abhängigen Faktoren PEDF und BMP-4 sind *in vitro* und *in vivo* wundreguliert

7.2 Die parakrin agierenden Faktoren PEDF und BMP-4 induzieren durch eine gemeinsame Wirkungsweise die Stratifizierung epidermaler Keratinozyten und initiieren das terminale Differenzierungsprogramm

7.3 Ausblick

Inhaltsverzeichnis

Seite

I Danksagung

II Abkürzungsverzeichnis

1 Summary 5

2 Zusammenfassung 6

3 Einleitung 7

3.1 Die humane Haut 7

3.2 Der Aufbau der Haut 7

3.2.1 Epidermis 7

3.2.2 Dermis 9

3.3 Regenerative Prozesse in der Haut 10

3.3.1 Homöostase 10

3.3.2 Wundheilung 12

3.3.2.1 Bildung eines Fibrinpfropfes 13

3.3.2.2 Entzündungsphase 13

3.3.2.3 Bildung des Granulationsgewebes und Reepithelialisierung 14

3.4 Dermal-epidermale Interaktion 14

3.5 JNK-Signalweg 18

3.5.1 Die Rolle von JNK in der epidermalen Morphogenese 21

4 Fragestellung 23

5 Material und Methoden 24

5.1 Zellbiologische Methoden 24

5.1.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für zellbiologische Methoden 24

5.1.2 Kultivierung und Passagierung von murinen embryonalen Fibroblasten 27

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 27

5.1.4 Anreicherung löslicher Proteine in konditioniertem 28

		Medium mit der Rührzelle	
	5.1.5	Präzipitation von sezernierten Proteinen in konditioniertem Medium	28
	5.1.6	Mykoplasmentest	29
	5.1.7	Isolierung von Keratinozyten aus humaner Haut	29
	5.1.8	Isolierung von Fibroblasten aus humaner Haut	30
	5.1.9	Herstellen und Kultivieren von Feeder-Fibroblasten	30
	5.1.10	Vorkultivieren von Keratinozyten auf humanen Feeder-Fibroblasten	30
	5.1.11	Subkultivierung von Keratinozyten	31
	5.1.12	Isolierung von Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen	31
	5.1.13	Herstellen von Kollagengelen	32
	5.1.14	Organotypische Kulturen	32
	5.1.15	Fixierung von organotypischen Cokulturen	33
5.2		Allgemeine molekularbiologische Methoden	33
	5.2.1	Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für molekularbiologische Methoden	33
	5.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA	38
		5.2.2.1 RNA-Isolierung mit Lösung D	38
		5.2.2.2 RNA-Isolierung mit TRIzol®	39
	5.2.3	DNase Verdau	39
	5.2.4	Synthese von cDNA	40
	5.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	40
		5.2.5.1 Primer	41
	5.2.6	Quantitative „Real-Time“ PCR	42
	5.2.7	Allgemeine Klonierungstechniken	42
	5.2.8	Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme	43
	5.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	43
	5.2.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über präparative Gele	43
	5.2.11	Ligation von Plasmiden	44
	5.2.12	Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien	44

5.2.13 Transformation von chemisch kompetenten E.coli Bakterien 45
5.2.14 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräp) 45
5.2.15 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräp) 45
5.2.16 Photometrische Konzentrationsbestimmung 46
5.2.17 *In situ*-Hybridisierung (ISH) 46
5.2.17.1 radioaktiv-markierte *in situ* Hybridisierung 47
5.2.17.2 Fluoreszenz-markierte *in situ* Hybridisierung 49
5.3 Proteinbiochemische Methoden 51
5.3.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für proteinbiochemische Methoden 51
5.3.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten 54
5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry 54
5.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese 55
5.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen 55
5.3.6 „Strippen“ einer Membran 56
5.3.7 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese 57
5.3.8 Silberfärbung 58
5.3.9 Proteinverdau zur Vorbereitung der Maldi-MS-Sequenzierung 58
5.3.10 Matrixunterstützte-Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) 59
5.4 Histologische Methoden 60
5.4.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für histologische Methoden 60
5.4.2 Anfertigung von Paraffin-Schnitten 61
5.4.3 Hämatoxylin und Eosin Färbung 61
5.4.4 Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern 62

6 Ergebnisse 64

6.1 Experimentelle Bedingungen zum Nachweis sezernierter Proteine in konditionierten Mediumüberständen 64

6.2 Identifizierung JNK-abhängiger sezernierter Proteine 66

6.3 Charakterisierung der Expression von PEDF und BMP-4 68

6.4 PEDF und BMP-4 werden *in vivo* von dermalen Fibroblasen exprimiert 70

6.5 Expression von PEDF und BMP-4 während der Wundheilung 73

6.6 PEDF und BMP-4 induzieren durch eine gemeinsame Wirkungsweise eine Stratifiziereung von Keratinozyten 77

6.7 Eine kombinatorische Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 ist nötig, um das komplette terminale Differenzierungsprogramm in Keratinozyten zu initiieren 82

7 Diskussion 88

7.1 PEDF und BMP-4 werden von Fibroblasten JNK-abhängig exprimiert und sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wundreguliert 88

7.2 Regulation von PEDF und BMP-4 und initiierte Signalwege 91

7.3 PEDF und BMP-4 induzieren durch eine gemeinsame Wirkungsweise die Stratifizierung epidermaler Keratinozyten und initiieren das terminale Differenzierungsprogramm 94

7.4 Ausblick 101

8 Literaturverzeichnis 103

Anhang 122

1 Summary

Regeneration of the skin after wounding is modulated to a large extend by dermal-epidermal interactions (Fusenig, 1994) but little is known about the exact molecular mechanisms. A missing c-Jun activity in fibroblasts leads in heterologous cocultures to a decreased keratinocyte proliferation and modulation of late differentiation (Szabowski *et al.*, 2000). In contrast, inactivation of the upstream kinase of c-Jun namly the c-Jun amino terminal kinase (JNK) in fibroblasts leads to enhanced keratinocyte proliferation and a missing entry to terminal differentiation. This JNK-dependent phenotype can be rescued by conditioned media derived from cultures containing c-Jun-deficient fibroblasts, indicating that the observed alterations are due to a missing or reduced expression of JNK-dependent but c-Jun-independent, soluble fibroblasts-derived factors, which regulate keratinocyte proliferation and stratification. Aim of this study was to identify and characterize these JNK-dependent, soluble factors.

Using a proteomic screen “pigment epithelium derived factor” (PEDF) and “bone morphogenetic protein-4” (BMP-4) were identified as JNK-dependent, but c-Jun independent factors. Further characterisation revealed that both factors are expressed during skin homeostasis *in vivo* preferentially in the dermal compartment and are *in vivo* wound regulated. Functional analysis of either single application of one factor or the combination of both in the heterologous coculture model revealed on the one hand an anti-proliferative effect of PEDF and BMP-4 on keratinocytes. Most interestingly, the combined action of both factors is necessary for initiation of stratification and a sufficient entry to terminal differentiation. These data indicate that entry to terminal differentiation is a regulated process modulated by PEDF and BMP-4. Proliferation and differentiation of keratinocytes are therefore two uncoupled genetic processes which can be modulated separately. Thereby epithelial thickness can be modified independently from the proliferation rate of keratinocytes.

2 Zusammenfassung

Dermal-epidermale Interaktionen, bei denen Keratinozyten und Fibroblasten über lösliche Faktoren miteinander kommunizieren, sind ein wesentlicher Bestandteil der Regulation des Wundheilungsprozesses der Haut (Fusenig, 1994). Über die genauen molekularen Mechanismen in Fibroblasten die diese Interaktion steuern ist wenig bekannt. In Fibroblasten nimmt die AP-1 Transkriptionsfaktor-Untereinheit c-Jun und die von ihr regulierten löslichen Faktoren eine Schlüsselrolle in der Regulation der epidermalen Proliferation ein (Szabowski *et al.,* 2000). Die Aktivierung von c-Jun wird durch die Jun-aminoterminale Kinase JNK reguliert. Erstaunlicherweise ist in heterologen Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten nicht die Proliferation sondern der Eintritt in die terminale Differenzierung der Keratinozyten unvollständig bzw. blockiert. Vorarbeiten haben gezeigt, dass dieser Phänotyp auf der fehlenden Expression eines oder mehrerer löslicher JNK-abhängiger, c-Jun unabhängiger Faktoren beruht. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit diese Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren.

Mit Hilfe einer Proteom-Analyse wurden „pigment epithelium derived factor“ (PEDF) und „bone morphogenetic protein-4“ (BMP-4) als lösliche JNK-abhängige, c-jun unabhängigen Faktoren identifiziert. Diese beiden Faktoren werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von dermalen Fibroblasten exprimiert. Während der *in vivo* Wundheilung weisen sie eine differenzielle Expression mit einer distinkten Lokalisation innerhalb der Wunde auf. Funktionelle Analysen im heterologen Cokultur-System ergaben, dass PEDF und BMP-4 die Proliferation von Keratinozyten inhibieren, die Stratifizierung des Epithels durch eine kombinatorische Wirkungsweise initiieren und für das vollständige Durchlaufen des terminalen Differenzierungsprogramms der Keratinozyten notwendig sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Eintritt der Keratinozyten in die terminale Differenzierung ein regulierter Prozess ist. Die Proliferation und die Differenzierung von Keratinozyten sind zwei entkoppelte Prozesse, die über PEDF und BMP-4 gesteuert werden. Somit kann die Epitheldicke unabhängig von der Proliferationsrate der Keratinozyten reguliert werden.

3 Einleitung

3.1 Die humane Haut

Die Haut ist ein lebenswichtiges Organ und übernimmt als solches vielfältige Aufgaben. Als äußere Begrenzung des Körpers fungiert sie als mechanische Schutzbarriere unter anderem gegen das Eindringen von Mikroorganismen und gegen das Austrocknen. Durch eingebettete Merkel- und Nervenzellen dient sie als Sinnesorgan, welches Druck, Temperatur und Schmerz wahrnehmen kann (Elias, 2005). Die Haut hat jedoch nicht nur die Fähigkeit der Reizperzeption, sondern ist auch durch Erweiterung bzw. Verengung ihrer Blutgefäße und durch die regulierte Abgabe von Schweiß in die Thermoregulation involviert. Sowohl in der Haut angesiedelte Immunzellen als auch von Keratinozyten sezernierte anti-mikrobiell aktive Substanzen unterstützen das Immunsystem (Schmidt *et al.,* 2000). Ein besonderes Merkmal der Haut ist ihre hohe Regenerationsfähigkeit sowohl während der Homöostase als auch nach Verwundung. Diese kann durch eine Reihe innerer und äußerer Faktoren wie Alter, Wachstumsfaktoren, Zytokine beeinflusst werden (Gerstein *et al.,* 1993).

3.2 Der Aufbau der Haut

Die Epidermis (Oberhaut) wird durch eine Basalmembran von der darunter liegenden Dermis (Lederhaut, Korium) getrennt. Die unterhalb der Dermis liegende Subkutis (Unterhaut) dient als Stützgewebe und bildet mit ihrem subkutanen Fettgewebe den Übergang zwischen der Haut und den darunter liegenden Sehnen und Muskeln (Lever 1984; Bowden *et al.,* 1987; Leigh und Watt, 1994).

3.2.1 Epidermis:

Das äußerste Kompartiment der Haut, die Epidermis, ist ein mehrschichtiges, verhorntes (keratinisiertes) und gefäßloses Plattenepithel. Neben dem Hauptzelltyp, den Keratinozyten, befinden sich Melanozyten, dendritische Langerhanszellen und Merkelzellen in einem Gesamtanteil von ca. 10% in der Epidermis. Die Keratinozyten erneuern während der Gewebehomöostase und bei Verletzungen durch regulierte Proliferation und Differenzierung das Epithel. Aufgrund morphologisch/histologischer und funktioneller Unterschiede werden in der Epidermis von basal nach apikal vier

aufeinander folgende Schichten unterschieden: Das *Stratum basale* (Basalschicht) stellt dabei die mit der Basalmembran durch Integrine verankerte Zellschicht dar. Nach apikal grenzt sich das *Stratum spinosum* (Stachelschicht) vom *Stratum granulosum* (Körnerschicht) ab, dem die äußerste Hornschicht, das *Stratum corneum* folgt (Fuchs, 1990). Das *Stratum basale* ist die proliferativ aktive Basalzellschicht. Kennzeichnend und namensgebend für das mehrlagige *Stratum spinosum* ist die histologisch stachelige Form der Keratinozyten, die durch starke desmosomale Zell-Zell-Kontakte entsteht. Die Keratinozyten in dem sich anschließenden *Stratum granulosum* haben einen fortgeschrittenen Differenzierungsgrad/Reifegrad erreicht, der sich darin äußert, dass sie zahlreiche basophile membranlose Keratohyalingranula enthalten, die für die Namensgebung dieser Schicht als Körnerschicht verantwortlich sind (Weiss und Zelickson, 1995). In dieser Schicht bauen die Keratinozyten ihre Zellkerne und Zellorganellen ab, dehydrieren, bilden eine Lipidbarriere aus und verhornen schließlich (Fuchs und Green, 1980). Im „cornified envelope", einer impermeablen Hüllschicht, die den Organismus vor dem Eindringen von Mikroorganismen und vor Austrocknung schützt, sind die toten Keratinozyten mit Strukturproteinen und Keratohyalinen des *Stratum corneum* vernetzt (Rice und Green, 1979; Simon and Green, 1984). Dieser Regenerationsprozeß von einer nicht-differenzierten Basalzelle zu einer ausdifferzierten toten Hornschuppe, die an der Oberfläche abgeschilfert wird, dauert beim Menschen etwa 28 Tage (Dover, 1994). Während dieses Prozesses „durchlaufen" die Keratinozyten ein in seiner Abfolge genau abgestimmtes Differenzierungsprogramm und passieren dabei von basal nach apikal die verschiedenen Schichten der Epidermis. Ob der Prozess aktiv durch Migration oder passiv durch Schieben nachfolgender Keratinozyten abläuft, ist bis heute nicht genau geklärt. Begleitend dazu ändern die Keratinozyten je nach Differenzierungsstatus und Zelllage ihr Zytokeratin-Expressionsprofil (O'Guin *et al.,* 1987; Fuchs und Green, 1980). Keratine werden oft paarweise reguliert und exprimiert, wobei ein Keratin des Typs I und ein weiteres des Typ II miteinander assoziieren. Die Keratine K5 und K14, die von basalen Keratinozyten exprimiert werden, werden ab dem *Stratum spinosum* durch die Keratine K1 und K10 ersetzt (Bowden *et al.,* 1987; Morley und Lane 1994, Fuchs 1990). Mit dem Übergang zum *Stratum granulosum* werden Hüllproteine, wie z.B. Involucrin synthetisiert, die von innen an die Plasmamembran angelagert werden und diese

verstärken (Simon und Green, 1985). Die basophilen Keratohyalingranula im *Stratum granulosum* enthalten das Strukturprotein Filaggrin (Dale *et al.,* 1985; Gunzel *et al.,* 1991). Unmittelbar unterhalb des *Stratum corneum* wird in einem verdichteten Keratin-Netzwerk das Strukturprotein Loricrin exprimiert (Mehrel *et al.,* 1990) (Abb. 1).

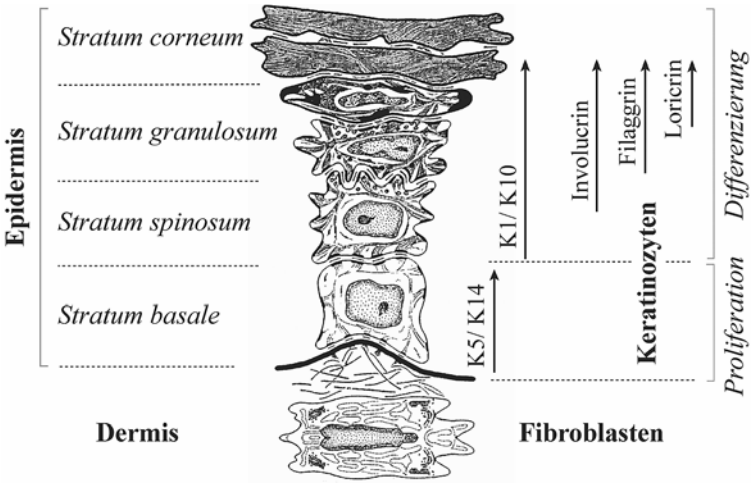

Abb. 1 **Schematische Darstellung des Aufbaus der menschlichen Haut und der Lokalisation differenzierungs-spezifisch exprimierter Proteine** (verändert nach Bowden *et al.,* 1987)

3.2.2 Dermis

Die Dermis stellt das mesenchymale Bindegewebe der Haut dar, aus dem Haarfollikel und Schweißdrüsen entspringen. Durch Verwölbungen der Dermis die sog. dermalen Papillen bzw. die Einstülpungen der Epidermis (sog. Retezapfen), wird die Berührungsfläche zwischen Epidermis und Dermis vergrößert. Dieser strukturelle Aufbau verbessert die optimale Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen aus den dermis-durchziehenden Blutgefäßen. Die Dermis gliedert sich in das obere *Stratum papillare* (Papillarschicht) und das untere *Stratum reticulare* (Geflechtsschicht /Netzschicht). Das *Stratum papillare* erstreckt sich in die Räume zwischen den epidermalen Reteleisten. In dieser Schicht sind die Kollagenfasern (Kollagen VII) dünn und locker gewebt, stellen aber durch die Verankerung mit der Basalmembran eine Verbindung zur Epidermis dar. Das in der Tiefe der Dermis liegende *Stratum retikulare* grenzt an die Subkutis und besteht aus kräftigen Kollagenfaserbündeln vom Typ I. Diese geben dem straffen Bindegewebe seinen Halt und seine Elastizität. Die Dermis liegt den bindegewebsartigen Septen der Subkutis auf. Sie dient als Fettgewebepolster

und somit der Wärmeisolierung und Energiespeicherung sowie als mechanisches Schutzpolster.

Der Hauptzelltyp der Dermis ist der Fibroblast. Fibroblasten sind in einem Netzwerk von extrazellulären Matrix Proteinen, Kollagen Typ I und III, Elastin und einer Grundsubstanz aus Mucopolysacchariden eingebettet, die sie selbst produzieren. Neben den Fibroblasten befinden sich in der Dermis Immunzellen wie Makrophagen und Mastzellen, Blutkapillaren und Nervenendigungen (Hentzer und Kobayasi, 1980). Die extrazelluläre Matrix (ECM) der Dermis dient weiterhin als Speicher für Signalmoleküle wie Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie Metalloproteinasen und Inhibitoren, die durch Spaltung der ECM sehr schnell aus dieser freigesetzt werden können.

3.3 Regenerative Prozesse in der Haut

Unser Körper unterzieht sich einer ständigen Regeneration: Haare und Nägel wachsen nach, die Epithelien von Haut werden erneuert und Wunden können geschlossen werden. Diese Prozesse erfordern eine präzise Regulation von Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten, da ein verschobenes Verhältnis von Proliferation und Differenzierung zu pathologischen Veränderungen der Haut führt. Das Verhalten der Zellen wird sowohl durch zellautonome Mechanismen als auch durch komplexe interzelluläre Kommunikation kontrolliert, in der außer direkten Zell-Zell- (Waelti *et al.,* 1992; Javaherian *et al.,* 1998) und Zell-Matrix-Interaktionen (Gailit und Clark, 1994; Ashkenas *et al.,* 1996) auch Interaktionen über Zytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle spielen (Smola *et al.,* 1993; Oliver und Jahoda, 1988, Mackenzie und Fusenig, 1983).

3.3.1 Homöostase

Die Epidermis befindet sich in einem kontinuierlichen Erneuerungsprozess, der durch eine fortwährende Proliferation der basalen Keratinozyten bei gleichzeitiger Abstoßung von Hornzellen an der Außenseite der Epidermis aufrechterhalten wird. Obwohl das initiale, für das Umschalten von Proliferation auf Differenzierung verantwortliche Signal bislang unbekannt ist, ist die Abfolge des Differenzierungsvorgangs erforscht (Fuchs, 1993). Innerhalb der Basalschicht befindet

sich eine Subpopulation an Keratinozyten, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie sich selbst erneuern und sich selten teilen (Bickenbach, 1981). Diese Keratinozyten mit Stammzelleigenschaften werden auch als epidermale Stammzellen bezeichnet. Aus diesen epidermalen Stammzellen gehen die sogenannten „transit amplifying cells" hervor, die nur eine begrenzte Anzahl an Zellzyklen durchlaufen, bevor sie in die terminale Differenzierung eintreten (Lavker und Sun, 1982; Barrandon und Green, 1987; Hall und Watt, 1989; Watt, 1998). Jede Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten zugunsten der Proliferation führt in der Regel zu einer Hyperplasie. Die Überexpression von „transforming grwoth factor β" (TGF-β) unter dem Einfluss des K10 Promoters im transgenen Tiermodell machte jedoch deutlich, dass eine gesteigerte Proliferation nicht unbedingt zu einer Hyperplasie führen muss (Cui *et al.,* 1995). Somit sind TGF-β und sein Typ II Rezeptor TGFβR-II Bestandteile der endogenen homöostatischen Regulationsmaschinerie (Wang *et al.,* 1997).

Neben zellautonomen Vorgängen wie z.B. Calcium und Vitamin D-Signalwege und Signalwege über Retinol-Hormonrezeptoren (Hennings *et al.,* 1980; Bikle *et al.,* 2001; Fisher und Voorhees, 1996) spielen Interaktionen zwischen Integrinen und ECM eine wichtige Rolle bei der Keratinozyten Differenzierung (Levy *et al.,* 2000). Transplantationsstudien zeigten, dass die lokal-spezifischen Eigenschaften der Epidermis auch durch das darunter liegende Mesenchym beeinflusst wird (Sengel, 1990; Mackenzie und Hill, 1984). Diese und andere Untersuchungen lieferten Hinweise, dass bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten während der Homöostase lösliche dermale Faktoren eine wichtige Rolle spielen (Boukamp *et al.,* 1990; Stadnyk 1994, Luger und Schwarz 1995). Es gibt Hinweise darauf, dass die durch Interleukin 1 (IL-1), „plateled-derived growth factor" (PDGF) und „tumor necrosis factor" (TNF) induzierte und balancierte Expression von Interferon β2 (IFN-β2) in der Haut an der Regulation der Homöostase beteiligt ist (Kohase *et al.,* 1987). Mäuse, denen das Gen für „fibroblast growth factor 10" (FGF-10) fehlt, sterben direkt nach der Geburt aufgrund von Defekten in der Lungenmorphogenese (Yamasaki *et al.,* 1996). Diese Mäuse besitzen jedoch zusätzlich bei Geburt eine hypoplastische Epidermis und weisen eine anormale Differenzierung auf (Suzuki *et al.,* 2000). Somit

ist FGF-10 in die embryonale epidermale Morphogenese involviert. Da es noch keine *in vitro* Modelle für die Untersuchung der epidermalen Homöostase gibt, ist unser Wissen über genaue Regulationsmechanismen beschränkt.

3.3.2 Wundheilung

Die Wunde ist eine Störung der anatomischen und funktionellen Kontinuität eines Gewebes oder Organs. Die Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, bei dem mit Hilfe der involvierten physikalischen, chemischen, biologischen und morphologischen Vorgänge durch Bildung neuer Strukturen und Wiederherstellung der Gewebeeinheit die ursprüngliche Funktion wieder erlangt werden soll. An der Heilung der Wunde sind Wundkontraktion, Gefäßneubildung, Granulation und Reepithelialisierung beteiligt. Die komplexe Wundheilung wird in mehrere, sich zeitlich überlappende Phasen eingeteilt (Martin *et al.,* 1992; Clark, 1993; Singer und Clark, 1999; Grazul-Bilska *et al.,* 2003, Eitel und Sklarek 1988): Exsudationsphase mit Blutstillung und Entzündung, Proliferationsphase mit Granulation und Reepithelialisierung, „remodeling" Phase der extrazellulären Matrix.

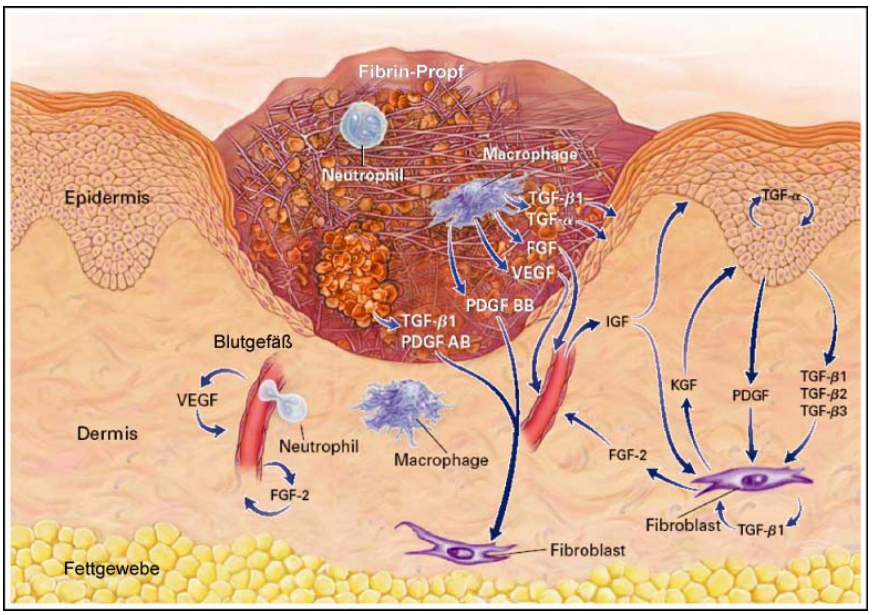

Abb. 2 **Schematische Darstellung des Wundheilungsprozesses der Haut**
Gezeigt sind wichtige Zelltypen und die von ihnen sezernierten Faktoren während der Reepithelialisierung (aus Singer und Clark, 1999).

3.3.2.1 Bildung eines Fibrinpfropfes

Den ersten Schritt im Prozess der Wundheilung der Haut stellt die Bildung eines Fibrinpfropfes dar. Wurden bei der Wundsetzung Blutgefäße verletzt, kommt es zum Kontakt zwischen Blutplättchen und Kollagenfasern. Dies führt zur Aktivierung des Gerinnungssystems und Freisetzung von vasokonstriktorischen Mediatoren. Die Blutplättchen setzen Thrombin frei, welches das lösliche Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Der hierbei gebildete Thrombus ist Voraussetzung zur Blutstillung, mechanischer Wundschutz und Matrix für später einwandernde Zellen. Zusätzlich sezernieren die Blutplättchen Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-1, TNF-α und PDGF, welche für Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten) chemotaktisch und für andere (Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten) proliferationsfördernd sind (Bowler, 2002).

3.3.2.2 Entzündungsphase

Die durch IL-1, TNF-α und PDGF angelockten neutrophilen Granulozyten phagozytieren die in die Wunde eingetretenen Mikroorganismen. (Gillitzer und Goebeler, 2001). Die durch chemoattraktive Stoffe wie „monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP-1), TGFβ und Fragmente von extrazellulärer Matrix angelockten Monozyten entwickeln sich zu aktiven Makrophagen, deren Aufgabe in der Säuberung des Wundbetts besteht, indem sie restliche pathogene Organismen sowie Zell- und Matrixreste phagozytieren. Makrophagen stellen zusätzlich eine wichtige Quelle für Zytokine und Wachstumsfaktoren dar und verstärken dadurch die anfänglichen Signale, die von Thrombozyten und Granulozyten ausgegangen sind (Hunt *et al.,* 2000). Neben TNF-α und IL-1 sezernieren Makrophagen noch weitere Wachstumsfaktoren wie TGF-β1, TGF- α, „basic fibroblast growth factor“ (bFGF), „heparin-binding epidermal grwoth factor“ (HB-EGF) und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). Nach den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wandern schließlich auch Lymphozyten in das Wundareal ein. Sie produzieren Interleukine, TNF-α, „interferone-γ“ (INF- γ) und nehmen an der Synthese der extrazellulären Matrix teil (Efron *et al.,* 1990).

3.3.2.3 Bildung des Granulationsgewebes und Reepithelialisierung

Innerhalb der ersten Stunde nach Verwundung aktivieren die oben genannten Faktoren die Keratinozyten sich aus dem Zellverband am Wundrand („leading edge“) zu lösen und zu migrieren, um ein neues Epithel aufzubauen. Des Weiteren fördern die Wachstumsfaktoren PDGF und TGF-β1 nach wenigen Tagen das Einwandern von Fibroblasten in das Wundbett (Martin *et al.,* 1992). Die Fibroblasten sezernieren Bestandteile der extrazellulären Matrix und schaffen so eine provisorische Matrix aus Fibronektin, Proteoglykanen und Kollagen, die zu einer Gewebefestigung führt. Um in das Wundbett einzuwandern, müssen Fibroblasten zusätzlich Proteasen sezernieren, die eine Degradation der extrazellulären Matrix und somit die Migration ermöglichen. Von essentieller Bedeutung ist ebenso die Einsprossung von Blutgefäßen, die das neu gebildete Gewebe mit Nährstoffen versorgen (Pettet *et al.,* 1996; Hunt *et al.,* 2000). Das Einwandern neuer Blutgefäße in die Wunde wird durch die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF induziert, die jedoch hauptsächlich von Keratinozyten und Makrophagen sezerniert werden (Werner und Grose, 2003). Die neu geschaffene Matrix bildet zusammen mit den eingewachsenen Blutgefäßen, den Makrophagen und den Fibroblasten das Granulationsgewebe. Die eingewanderten Fibroblasten differenzieren zu kontraktilen Myofibroblasten und unterstützen durch α-Aktin die Kontraktion der Wunde, indem sie das Kollagen-Geflecht zusammenziehen und verdichten (Tomasek *et al.,* 2002). Der Differenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist auf die Wirkung von PDGF und TGF-β sowie auf die in der Wunde herrschende Spannung zurückzuführen. Durch Apoptose wird die Zahl der Fibroblasten im weiteren Verlauf der Wundheilung verringert und auch die Anzahl der Immunzellen nimmt ab. In der letzten Phase des „remodelings“ unterliegt das Granulationsgewebe einer kontinuierlichen Umstrukturierung, die schließlich mit der Bildung des Narbengewebes abschließt und mehrere Wochen bis Monate dauern kann.

3.4 Dermal-epidermale Interaktion

Für alle regenerativen Prozesse in der Haut, sei es während der Homöostase oder der Wundheilung, muss das Verhältnis zwischen Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten genauestens reguliert sein. Neben Zell-Zell- (Waelti *et al.,* 1992) und

Zell-Matrix-Interaktionen (Gailit und Clark, 1994; Lonai, 2003) spielen mesenchymal-epitheliale Interaktionen über lösliche Faktoren eine bedeutende Rolle (Oliver und Jahoda, 1988; Maas-Szabowski *et al.,* 2000; Szabowski *et al.,* 2000, Tuan *et al.,* 1994; Boxman *et al.,* 1996; Falanga, 1993; Pettet *et al.,* 1996; Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Gillitzer und Goebeler, 2001; Yamaguchi und Yoshikawa, 2001). Erste Hinweise über den Einfluss des Mesenchym auf die Epidermis lieferten vor 40 Jahren Transplantationsexperimente, bei denen Billingham und Silvers 1967 vom Rumpf stammende Epidermis auf eine Fußsohlen-Dermis transplantierten und eine fußsohlen-spezifische Epidermis erhielten (Billingham und Silvers, 1967). *In vitro* Untersuchungen, bei denen sich primäre Keratinozyten nur in Anwesenheit von Fibroblasten kultivieren ließen (Rheinwald und Green, 1975), gaben einen Hinweis auf den Einfluss von Fibroblasten auf Keratinozyten und zeigten, dass Fibroblasten für ein Wachstum von Keratinozyten notwendig sind. Auch im organotypischen Cokultursystem, welches als anerkanntes *in vitro* Wundheilungsmodell die Untersuchung der Reepithelialisierung ermöglicht und allgemein als Hautäquivalent anerkannt ist, ist eine Cokultivierung von Fibroblasten für die Epithelbildung primärer Keratinozyten unerlässlich (Bell *at al.,* 1981, Mackenzie und Fusenig, 1983, Asselineau und Pruniéras, 1984). Daher spielen in der Haut Zell-Zell-Kommunikation über lösliche Faktoren eine wichtige Bedeutung Rolle (Boukamp *et al.,* 1990; Stadnyk, 1994).

Bereits während der Embryogenese beeinflussen epitheliale-mesenchymale Interaktionen die Epithelbildung (Mackenzie, 1994). Während der frühen Gastrulation induziert der lösliche Faktor „bone morphogenetic protein-4“ (BMP-4) die Epidermis und inhibiert gleichzeitig die Entwicklung des Ektoderms in Neuroektoderm (Wilson *et al.,* 1995). Doch nicht nur bei der Bildung und Erhaltung der Epidermis, sondern auch bei der Aufrechterhaltung und Entstehung ihrer Hautanhanggebilde wie Haare, Nägel, Zähne oder Federn sind lösliche Faktoren maßgeblich beteiligt. Ein untersuchtes mesenchymales-epitheliales Interaktionssystem stellt das Haarfollikel dar, dessen Wachstum und Zyklus durch dermale Papillen mitbestimmt wird (Reynolds *et al.,* 1991; Jahoda und Reynolds, 1996; Robinson *et al.,* 2001; Hardy, 1992). Transplantationsexperimente verdeutlichten den Beitrag dermaler Papillen (differenzierte mesenchymale Zellen, die unterhalb von Haarfollikel angesiedelt sind)

zum Haarwachstum, da in Haarfollikel implantierte adulte dermale Papillen in der Lage sind Haarwachstum zu induzieren (Jahoda *et al.,* 1984) .

Keratinozyten-abhängige lösliche Faktoren können auch die Expression und Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in Fibroblasten stimulieren. In Anwesenheit von Keratinozyten werden in *in vitro* Cokulturen die Expression der Zytokine IL-1, IL-6 und der Wachstumsfaktoren „keratinocyte growth factor" (KGF) und „granulocyte-macrophage colony stimulating factor" (GM-CSF) in Fibroblasten induziert (Smola *et al.,* 1993; Nowinski *et al.,* 2004). Für die erhöhte KGF Expression in Fibroblasten ist IL-1 verantwortlich, welches von Keratinozyten exprimiert wird (Maas-Szabowski *et al.,* 1999). Die Anwendung genetisch veränderter muriner „knock-out" Fibroblasten in organotypischen Cokulturen führte zu einer Erweiterung dieses einfach parakrinen Mechanismus zu einem doppelt parakrinen Mechanismus zwischen Fibroblasten und Keratinozyten. Dabei sind die Untereinheiten c-Jun und JunB des Aktivator-Protein 1 (AP-1) Transkriptionsfaktors maßgeblich beteiligt. AP-1 repräsentiert ein Set aus Homo- und Heterodimeren von Mitgliedern der Jun- (c-Jun, JunB und JunD), Fos- (c-Fos, FosB, Frau-1 und Frau-2) und ATF- (ATF1, LRF/ATF3 und B-ATF) Familien (Angel und Karin, 1991; Wisdom, 1999). Die Aktivierung von AP-1 in Fibroblasten induziert eine veränderte Genexpression (Whitmarsh and Davis, 1996; Angel *et al.,* 2001), die zu einem veränderten Zytokinprofil der Fibroblasten führt und somit das Verhalten der Keratinozyten beeinflusst. Während im Cokultur Modell in Anwesenheit c-Jun-defizienter Fibroblasten humane Keratinozyten nur schwach proliferieren und ein dünnes Epithel ausbilden, verstärken *jun*B$^{-/-}$ Fibroblasten die Epithelbildung deutlich. Dieser Effekt konnte auf die antagonistische Regulation der Genexpression von mindestens zwei Zytokinen, KGF und GM-CSF, zurückgeführt werden, wobei c-Jun als transkriptioneller Aktivator und JunB als Repressor fungiert (Szabowski *et al.*, 2000). Das von Keratinozyten sezernierte IL-1 stimuliert in den Fibroblasten die Expression der c-Jun-abhängigen Faktoren KGF und GM-CSF, die wiederum auf die Keratinozyten Proliferation (KGF und GM-CSF) und Differenzierung (GM-CSF) wirken. Neben den Jun-Zielgenen KGF und GM-CSF, die in Fibroblasten IL-1-abhängig exprimiert werden, gibt es noch andere Wachstumsfaktoren, die zwar Jun-abhängig, jedoch IL-1 unabhängig in Fibroblasten exprimiert werden. Eines dieser IL-1 unabhängigen Jun-Zielgene ist „stromal-derived factor 1" (SDF-1), das von Fibroblasten in der Haut *in*

vivo exprimiert wird und in einer parakrinen Weise *in vitro* die Proliferation von primären epidermalen Keratinozyten anregen kann (Florin *et al.,* 2005). Zu den Jun-abhängigen IL-1 unabhängigen Wachstumsfaktoren gehört auch das Chemokin Pleiotrophin (PTN), dessen erhöhte Expression in Wunden bereits beschrieben wurde (Asahina *et al.,* 2002y). Wie SDF-1 wirkt sowohl PTN als auch das JunB-abhängige „growth regulated oncogene 1“ (Gro-1) als Mitogen für Keratinozyten (Abb. 3). Diese Faktoren spielen somit eine Rolle in der dermal-epidermalen Interaktion (Florin *et al.,* 2005).

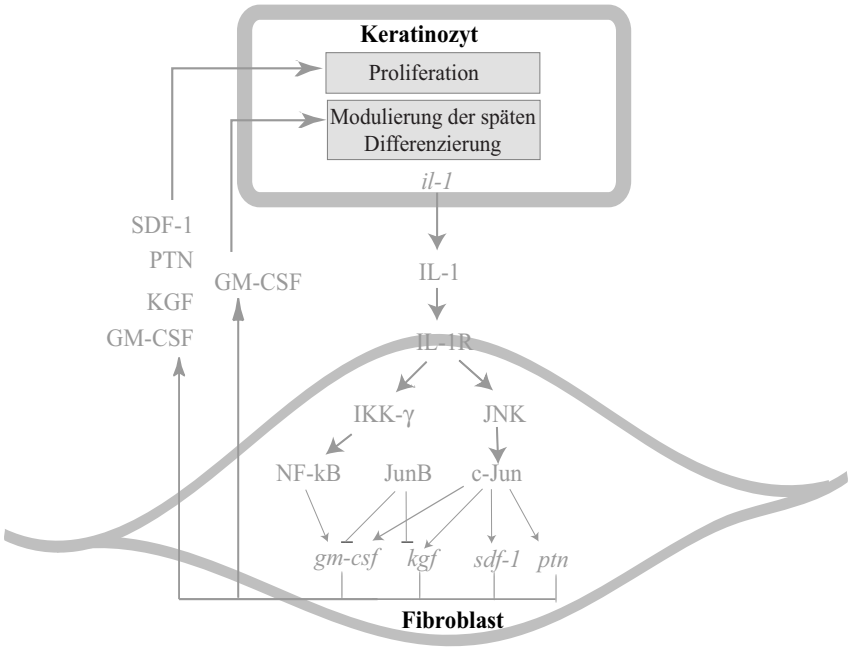

Abb. 3 **Schematische Darstellung der dermal-epidermalen Interaktion**
Keratinozyten sezernieren IL-1, das direkten Einfluss auf die Fibroblasten ausübt und die Expression von c-Jun-, JunB- und NF-κB-Zielgenen reguliert. Diese wiederum wirken rückwirkend auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten (verändert nach Szabowski et al., 2000, Florin et al., 2004a, Florin et al., 2004b).

Seit den frühen 90er Jahren ist bekannt, dass Keratinozyten nach Verwundung *in vivo* eine Reihe verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren, die entweder autokrin auf die Keratinozyten zurückwirken oder auf benachbarte Zellen einen Einfluss haben (Ansel *et al.,* 1990). Keratinozyten produzieren auch Wachstumsfaktoren wie PDGF, auf die sie selbst wegen der fehlenden Rezeptoren nicht reagieren können (Ansel *et al.*, 1993). Da die Proliferation und Migration von mesenchymalen Zellen stark von

PDGF begünstigt wird, Fibroblasten jedoch nur die PDGF-Isoform mit der geringsten Aktivität produzieren, wird deutlich, dass PDGF aus Keratinozyten hauptsächlich auf die Fibroblasten wirkt. Der von Keratinozyten gebildete VEGF regt nicht nur die Endothezellen zur Proliferation an, sondern fördert auch die Bildung von PDGF und HB-EGF in Endothelzellen, die wiederum einen positiven Einfluss auf die Proliferation und Migration der Fibroblasten haben (Arkonac *et al.,* 1998).

TGF-β ist ein weiterer Wachstumsfaktor, dem eine zentrale Rolle im mesenchymalen-epithelialen Netzwerk zuzusprechen ist. Er wird sowohl von Fibroblasten als auch von Keratinozyten produziert, übt jedoch kontroverse Funktionen auf beide Zelltypen aus: während er auf Epithelzellen als starker Wachstumsinhibitor fungiert, stimuliert er die Proliferation von Fibroblasten (Massague, 1990). KGF hingegen wird nach Verwundung hauptsächlich von Fibroblasten gebildet, übt seine Wirkung aber vor allem auf Keratinozyten aus, die den spezifischen KGF-Rezeptor im *Stratum basale* exprimieren (Werner *et al.,* 1994b). Die Aktivierung des KGF-Rezeptors resultiert in einer verminderten Proliferationsrate epidermaler Keratinozyten und führt zu einer verminderten Reepithelialisierung (Werner *et al.,* 1994a).

KGF, GM-CSF, TGFβ, HB-EGF können neben IL-8, TGF-α, „nerve growth factor" (NGF) und PDGF auch im Wundsekret und –gewebe nachgewiesen werden (Schröder, 1995). Für viele Zytokine, die in Fibroblasten durch Keratinozyten nach Verwundung *in vivo* induziert werden, kann ebenfalls Interleukin IL-1 verantwortlich gemacht werden, das direkt nach der Verwundung von Keratinozyten aus Speichern ausgeschüttet wird.

3.5 JNK-Signalweg

Die c-Jun-aminoterminale Kinase (JNK) gehört zu der Gruppe der Mitogen-aktivierenden Protein-Kinasen (MAPK), denen eine große Bedeutung bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration zukommt (Davis, 2000; Weston und Davis, 2002). Der auch als Stress-aktivierte Kaskade bezeichnete JNK/SAPK (c-jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) Signalweg ist wie die beiden anderen MAPK Signalwege, die durch die MAPK p38 und ERK reguliert werden, hierarchisch durch Phosphorylierungskaskaden aufgebaut. Zur Aktivierung der Kaskade führen zelluläre Stressinduktoren (proinflammatorische

Zytokine, Interleukine, TNFα, LPS), apoptotische Signale (Ceramide), Umweltstress (UV-Strahlung, Scherkräfte, osmotischer Schock, Hitze) und toxische Agenzien (Proteinsynthesehemmer, wie Anisomycin, Arsenit). Sie kann aber auch durch mitogene Stimuli, wie Wachstumsfaktoren erfolgen (Tibbles *et al.,* 1999; Garrington und Johnson 1999, Kyriakis *et al.,* 1992). In diesen Kinasekaskaden sind Rho GTPasen an der Signalweiterleitung von der Zelloberfläche ins Zellinnere beteiligt (Cammarano *et al.,* 2001). Die Signale werden von den Rho GTPasen auf die MAPKKK (MEKK1-4, MLK1-3, DLK und LZK) oder direkt zu der MAPK Kinase MKK6 übermittelt. MEKK (MEK Kinase) aktiviert die dualspezifische MAP kinase kinase SEK/MKK4 (SAPK/ERK kinase / stress activated protein kinase) (Yan *et al.,* 1994), wohingegen MLK2/3 die Aktivierung von MKK7, einem Homolog der SEK induziert (Sanchez *et al.,* 1994). Sowohl SEK/MKK4 als auch MKK7 sind in der Lage JNK zu stimulieren, allerdings wirkt MKK4 spezifisch auf Tyrosin- und MKK7 auf Threoninreste im TXY Motiv (Lawler *et al.,* 1998). Die Spezifität dieses Kaskadenzweiges beruht auf der Fähigkeit des Gerüstproteins JIP-1 (JNK interaction partner-1) Komplexe mit JNK (Jun-N-terminal kinase) 1 und 2, MKK7 und MLK3 ausbilden zu können (Dickens *et al.,* 1997; Whitmarsh und Davis, 1998). JNK bindet die Delta-Domäne der AP-1 Transkriptionsfaktor-Untereinheit c-Jun und phosphoryliert diese an den Aminosäuren Serin 63 und 73. Neben c-Jun aktiviert JNK noch weitere Substrate wie die Transkriptionsfaktoren ATFa und ATF-2, Elk-1, p53 und c-Myc (Derijard *et al.,* 1994; Cavigelli *et al.,* 1995; Milne *et al.,* 1995; Gupta *et al.,* 1996; Bokko *et al.,* 1996; Fuchs *et al.,* 1998; Noguchi *et al.,* 1999; Tindberg *et al.,* 2000). Damit JNK seine Substrate effizient phosphorylieren kann, benötigen diese eine spezielle Andockstelle und zusätzlich spezifische Reste, die die Phosphorylierungsstelle flankieren. JunB besitzt

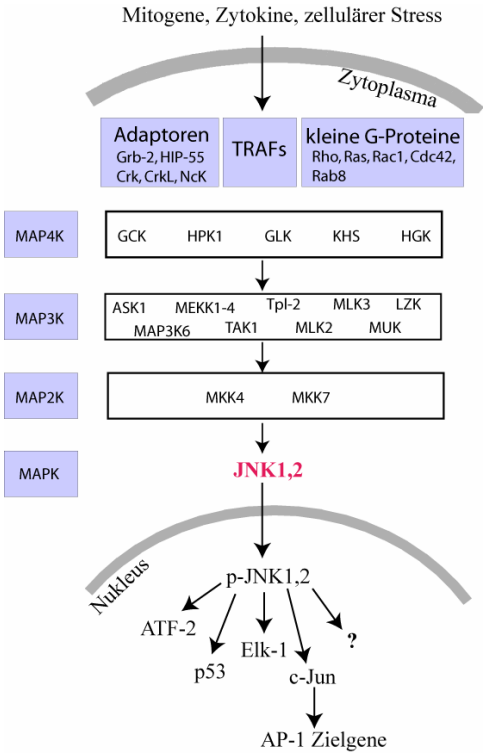

Abb. 4 **Schematische Darstellung des JNK-Signalweges** (zusammengestellt aus: Weston und Davis, 2002; Gallo und Johnson, 2002).

zwar die Andockstelle für JNK doch aufgrund des fehlenden flankierenden Motifs, kann JunB nicht von JNK aktiviert werden. JunD hingegen, welches keine JNK-Andockstelle besitzt, kann duch Heterodimerisierung eines Partners mit Andockstelle aufgrund seines funktionellen Phosphorylierungsmotifs von JNK aktiviert werden (Kallunki *et al.,* 1996).

Die Gruppe der JNK setzt sich aus JNK1, JNK2 und JNK3 zusammen. Während JNK1 und JNK2 ubiquitär exprimiert werden, wird JNK3 nur im Gehirn, im Herz und im Hodengewebe exprimiert (Chang und Karin, 2001). Alle drei Gene können alternativ gespleißt werden, wodurch 10 JNK-Isoformen entstehen, deren spezielle Funktion jedoch noch unklar ist (Gupta *et al.,* 1996). JNK1 und JNK2 haben sowohl komplementäre, überlappende (Kuan *et al.,* 1999) als auch individuelle Funktionen. So zeigen Mäuse, denen eine der beiden JNK 1 oder 2 fehlt, zwar keine morphologischen Unterschiede, dennoch weisen sie schwerwiegende Defekte in der T-Zell Funktion auf, die zu einer Immundefizienz führt (Constant *et al.,* 2000; Dong *et al.,* 2000). JNK greift zum einen in apoptotische Prozesse regulierend ein, ist zum anderen aber auch in Prozesse involviert, die das Überleben einer Zelle sichert (Reinhard *et al.,* 1997). Somit übernimmt JNK bei der Entscheidung von Apoptose oder Überleben einer Zelle eine duale Funktion (Ip und Davis, 1998). Die Rolle von JNK im stress-induzierten neuronalen Zelltod wurde unter anderem durch JNK3 knock-out Mäuse aufgeklärt, die Defekte in apoptotischen Prozessen in Neuronen des Hippocampus aufweisen (Yang *et al.,* 1997). Mäuse mit einer kombinierten Inaktivierung der Gene *jnk1* und *jnk2* zeigen ein offenes Neuralrohr (Exenzephalie) im Rhombencephalon (Rautenhirn) und sterben am 11. Tag der Embryonalentwicklung. Bei diesen Mäusen kann ein reduzierter Zelltod im Neuroepithel des Rautenhirns am Tag 9.25 der Embryonalentwicklung festgestellt werden, während nur ein Tag später (E10.5) ein drastischer Anstieg der Apoptose im Rautenhirn und Vorderhirn zu beobachten ist (Sabapathy *et al.,* 1999; Kuan *et al.,* 1999). Embryonale Fibroblasten (MEFs), die aus den *jnk1, jnk2*-defizienten Embryonen isoliert worden sind, zeigen keinen Effekt in der Fas-induzierten Apoptose. Im Gegensatz dazu sind diese Zellen resistent gegenüber UV-induzierter Apoptose (Tournier *et al.,* 2000).

3.5.1 Die Rolle von JNK in der epidermalen Morphogenese

Eine Haupt-Funktion von JNK ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktoruntereinheit c-Jun. Mäuse mit einer Keratinozyten-spezifischen Deletion von c-Jun weisen bei Geburt ein offenes Augenlied auf, das durch einen reduzierten EGFR-Signalweg hervorgerufen wird (Li *et al.,* 2003; Zenz *et al.,* 2003). Da die Entwicklung der Haut in Keratinozyten-spezifischen konditionalen c-Jun-defizienten Mäusen und in Mäusen mit einer c-Jun Phosphorylierungsmutation (JunAA-mutante Mäuse) normal verläuft (Behrens *et al.,* 1999; Li *et al.,* 2003; Zenz *et al.,* 2003), kann man davon ausgehen, dass c-Jun-Aktivität in Keratinozyten *in vivo* keine herausragende Rolle spielt.

Epidermis, die defizient an der NFκB Untereinheit RelA ist und auf eine Wildtyp Dermis transplatiert wurde, zeigt eine zellautonome Hyperproliferation, die unabhängig von Entzündungsreaktionen auftritt und keine Veränderung in der Differenzierung verursacht. Die gesteigerte Proliferation der Keratinozyten in diesen Transplantaten kommt durch eine TNFR-1-abhängige Aktivierung von JNK in Keratinozyten zustande und kann durch genetische und pharmakologische Inaktivierung von JNK normalisiert werden (Zhang *et al.,* 2004). Somit wirken RelA und JNK bzw. TNFR in Keratinozyten gegensätzlich auf die zellautonome Proliferationsregulation der Keratinozyten in der Epidermis.

Aufgrund der Letalität JNK1-und JNK2-defizienter Mäuse wurde der Einfluss von JNK1 und JNK2 in der Gestaltbildung der Epidermis in heterozygoten $jnk1^{-/-}jnk2^{-/+}$ Mäusen untersucht, die zwar lebend geboren werden, jedoch zum größten Teil 48 h nach der Geburt versterben. Diese $jnk1^{-/-}jnk2^{-/+}$ Mäuse zeigen eine verspätete epitheliale Entwicklung in der Epidermis, der Lunge und dem Darm und werden mit offenen Augenliedern bei Geburt geboren. Der Phänotyp geht mit einer reduzierten Proliferation basaler Keratinozyten und einer reduzierten Aktivierung des EGFR-Signalwegs durch reduzierte Expression von EGF und p63 in der Epidermis einher (Weston *et al.,* 2004). Da diese Studie an kompletten knock-outs durchgeführt wurde, kann jedoch nicht unterschieden werden, ob der Phänotyp auf zell-autonomen bzw. transregulatorischen Effekten beruht. Der Einfluss von JNK während der Homöostase der Haut wurde in adulten Mäusen in $JNK1^{-/-}$ bzw. $JNK2^{-/-}$ einzel-defizienten Mäusen, deren JNK-Aktivität ebenfalls in der Dermis und in der Epidermis gestört ist, untersucht. Im

Gegensatz zu Dong *et al.* (Dong *et al.,* 1998), der keine morphologischen Veränderungen in *jnk1*$^{-/-}$ Mäusen beobachtete, beschreibt Weston *et al.* einen Hautphänotyp in *jnk1*$^{-/-}$ Mäusen: Die Epidermis dieser Mäuse ist dünner und besteht aus weniger Zelllagen im Vergleich zu Wildtyp Kontroll-Mäusen, was sowohl auf eine reduzierte basale Proliferation der Keratinozyten als auch auf eine reduzierte terminale Differenzierung zurückzuführen ist. Die Defekte sind ebenso wie bei *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/+}$ Mäusen mit einer reduzierten Expression von p63 und EGF assoziiert (Weston *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu JNK1$^{-/-}$ Mäusen beobachtete Weston *et al.,* in JNK2$^{-/-}$ Mäusen eine hyperplastische Epidermis, die mit einer verstärkten Differenzierung einhergeht. Da auch diese Studie an kompletten knock-outs durchgeführt wurde, kann nicht zwischen zell-autonomen und transregulatorischen Einflüssen unterschieden werden. Somit wurde das Wirkungsprinzip von JNK1 bzw. JNK2 in der Haut nicht eindeutig geklärt.

4 Fragestellung

Sowohl bei der Homöostase der Haut als auch im Verlauf der Regeneration nach Verletzung spielen dermale-epidermale Interaktionen über lösliche Proteine eine bedeutende Rolle (Fusenig, 1994). Um den Beitrag der Dermis auf die Reepithelialisierung der Epidermis zu untersuchen, wurden JNK1- und JNK2-defiziente Fibroblasten in das heterologe Cokultur-System eingebracht. In Epithelien von organotypischen Cokulturen mit *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ Fibroblasten wird die terminale Differenzierung der Keratinozyten verhindert (Abb. 5, Szabowski unveröffentlicht). Dieser Phänotyp beruht auf einem fehlenden Signal der Keratinozyten bedingt durch die Abwesenheit mindestens eines löslichen, JNK-abhängigen Faktors. Weiterhin ist in zweidimensionalen Cokulturen mit *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ Fibroblasten eine Hyperproliferation der Keratinozyten zu beobachten, die ebenfalls durch das Fehlen dieser löslichen Faktoren zu erklären ist. Die Vorarbeiten weisen also alle darauf hin, dass die effiziente Einleitung in die terminale Differenzierung und die Proliferation primärer humaner Keratinozyten über mindestens einen JNK-abhängigen Faktor reguliert wird.

Ziel dieser Arbeit war daher:

1. Die Etablierung einer Methode, um differenziell exprimierte/sezernierte Proteine im Medium-Überstand von Wildtyp- und *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ Fibroblasten zu identifizieren
2. Die Identifizierung JNK-abhängiger löslicher Faktoren
3. Die funktionelle Charakterisierung dieser Faktoren in Bezug auf deren Fähigkeit Keratinozyten Proliferation und den Eintritt in die Differenzierung zu regulieren
4. Expressionsanalysen der identifizierten Faktoren in normaler homöostatischer Haut *in vivo* und während der Wundheilung *in vivo* und *in vitro.*

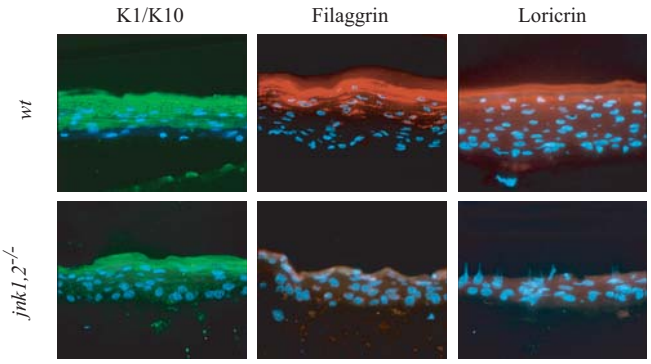

Abb. 5 **Funktionelle Inaktivierung von JNK in Fibroblasten führt zu einer unvollständigen terminalen Differenzierung von Keratinozyten** Immunfluoreszenz-Analysen gegen die differenzierungsassoziierten Proteine K1/10, Filaggrin und Loricrin von OTK mit *wt* und *jnk*-defizienten Fibroblasten (Szabowski, unveröffentlicht).

5 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde in einem molekularbiologischen Labor der Sicherheitsstufe S1 unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorkehrungen angefertigt. Alle verwendeten Chemikalien entsprechen dem analytischen Reinheitsgrad. Puffer und Lösungen werden, wenn nicht anders erwähnt, mit Reinstwasser (Millipore Qualität) hergestellt. Die Verwendung von speziellen Kits erfolgt stets nach Angaben des Herstellers und alle Reaktionen werden, wenn nicht besonders angemerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für zellbiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte werden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Alle selbst hergestellten Lösungen werden entweder vor Gebrauch autoklaviert (PBS) oder sterilfiltriert (EDTA). Die Kultivierung aller Zellen erfolgt bei 37°C, 5% CO_2 und 98% Luftfeuchtigkeit.

Feinchemikalien	Lösung	Hersteller
Adenin		Sigma, Deisendorf
Agar		AppliChem, Darmstadt
Betaisadona		Mundipharma, Limburg
DMEM	(4,5 µg/l Glucose; L-Glutamin) Zusätzlich: 100 U/ml Penicillin 10 µg/ml Streptomycin	Cambrex, Oldendorf
Dimethysulfoxid (DMSO)		Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraactetat (EDTA)		Roth, Karlsruhe
Eisessig		Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol		Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure		J.T Baker, USA
„fetal calf serum“ (FCS)		Sigma, Deisendorf

Glyzerin		Roth, Karlsruhe
Hams´s F12		Cambrex, Oldendorf
Hanks-Lösung		Biochrom AG, Berlin
H33342 Hoechst-Farbstoff		Hoechst, Frankfurt/M.
Methanol		Fluka, Buchs, Schweiz
Trichloressigsäure (TCA)		Roth, Karlsruhe
Thermolysin		Sigma-Aldrich, München
Trypsin		Roche, Mannheim
Xylol		Fluka Chemicals, Schweiz
Lösungen	Ansatz	
EDTA	0,05% in PBS mit Phenolrot	
Einfriermedium	DMEM	
	10% FCS	
	10%Glyzerin/DMSO	
FAD	DMEM+Ham´s F12 3:1	
	100 U/ml Penicillin	
	10 µg/ml Streptomycin	
	5% FCS	
	1 ng/ml hEGF	
	5 µg/ml Insulin	
	0,4 µg/ml Hydrocortison	
	10^{-10} M Choleratoxin	
Mowiol	20% (w/v) Mowiol in PBS	
	40% Glyzerin	
	pH 7,5-8	
$PBS^{-/-}$	phosphate buffered saline	
	137mM NaCl; 2,6 mM KCl;	
	1,76 mM KH_2PO_4; 8,1 mM NaH_2PO_4; pH 7,4	
Thermolysin	0,5% in PBS	
Trypsin	0,05% Trypsin in PBS	
	0,025% EDTA	
Medienzusätze		
Faktoren	Konzentrationen	Hersteller/Bezugsquelle
rBMP-4	50 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
Choleratoxin	10^{-10} M	Sigma, Deisenhofen
rhEGF	1 ng/ml	PromoCell, Heidelberg

rhGM-CSF	100 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
Hydrocortison	0,4 µg/ml	Sigma, Deisenhofen
rIL-1α	10µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden
Insulin	5 µg/ml	Sigma, Deisenhofen
rPEDF	100 ng/ml	Chemicon, Hampshire, UK
rSDF-1	50 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden

Antikörper

α–BMP-4	4 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden
α–PEDF	4 µg/ml	Upstate, Dundee, UK
α–Gro1	4 µg/ml	Abcam, Cambridge, UK

Geräte und Materialien

Amicon Filter 10 kDa	Millipore, Schwalbach
Biomax Membran-Filter	Millipore, Schwalbach
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Deckgläschen 60x24 m	Langenbrinck, Emmendingen
Einfrierbox	Nalge Nunc Int., Rochester, USA
Glasring	Sonderanfertigung, DKFZ
Kollagen-I beschichtete Zellkulturplatten	Migge Neolab, Heidelberg
Kryo-Microgefäße	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Objektträger 76x26 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Rührzelle Typ 8050	Millipore, Schwalbach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Falcon Zellkulturinsert high density 0,4 µM	Greiner bio-one, Essen
Falcon Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Essen
Zellsieb 70µm	BD Bioscience, Heidelberg
Zellzählgerät „Casy“	Schärfe System GmbH; Reutlingen
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

Verwendete Zellen

Immortalisierte murine 3T3 Wildtyp, *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$*, c-jun*$^{-/-}$*, junB*$^{-/-}$ *und ikk-γ*$^{-/-}$ Fibroblasten (von E. Wagner, IMP, Wien)

Primäre humane normale Keratinozyten

Primäre humane Fibroblasten

Y79 (humane Retinoblasoma-Zellen)

5.1.2 Kultivierung und Passagierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Immortalisierte murine 3T3 Wildtyp, *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ *und* c-*jun*$^{-/-}$ Fibroblasten werden routinemäßig in DMEM mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin auf Zellkulturschalen kultiviert und alle 2-3 Tage bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz passagiert. Dazu wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Durch die anschließende Behandlung mit Trypsin (0,05% Trypsin/0,025 EDTA) werden die Zellen innerhalb 2 Minuten abgelöst und in 10% FCS-haltigem DMEM vereinzelt. Damit die proteolytische Aktivität von Trypsin durch das im FCS enthaltene BSA abgefangen werden kann, sollte die Aufnahme der Zellen in Medium stets im mindestens dreifachen Volumen des Trypsins erfolgen. Bevor die Zellen mittels Zentrifugation (1370 g, 3 Minuten) sedimetiert werden, wird die Zellzahl mittels des Casy Zellzählgeräts quantifiziert. Nach Absaugen des Überstandes können die Zellen in einem entsprechenden Volumen an Medium resuspendiert und in der gewünschten Zellzahl ausgesät werden.

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen werden wie oben (5.1.2) beschrieben durch Trypsinieren geerntet, gezählt und nach Sedimentierung und Absaugen des Mediums $1x10^6$ in 1 ml Einfriermedium in ein Kryoröhrchen überführt (Einfriermedium: 20% FCS, 10% Glycerin in DMEM; für *c-jun*$^{-/-}$: 20% FCS, 10% DMSO, DMEM). Das Einfrieren der Zellsuspension erfolgte bei -80°C bei schrittweiser Abkühlung in speziellen Einfrierboxen, die eine Abkühlung von 1°C pro Minute gewährleisten. Zur Langzeitlagerung werden die Zellen bei -192°C über flüssigem Stickstoff konserviert.
Das Auftauen von Zellen erfolgt zügig in einem 37°C Wasserbad. Um das im Einfriermedium enthaltene Glycerin/DMSO zu beseitigen, werden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert, durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend mit 10 ml frischem Medium versetzt.

5.1.4 Anreicherung löslicher Proteine in konditioniertem Medium mit der Rührzelle

Damit der Nachweis löslicher Proteine in konditioniertem Medium durch Silberfärbung möglich wird, werden die Proteine mit Hilfe einer Rührzelle 100-fach aufkonzentriert. Dazu wird das konditionierte Medium von 5 x 15 cm Platten einer 90% konfluenten Monokultur asynchron wachsender Wildtyp-Fibroblasten vereinigt, Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13700 g für 10 Minuten und anschließender Filtration durch einen 0,45 µm Filter entfernt und das konditionierte Medium mittels Stickstoff-Druck unter ständigem Rühren durch eine poröse Membran mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 10 kDa ultrafiltriert. Um zu überprüfen, ob das auf diese Weise konzentrierte Medium noch die biologische Aktivität zur Initiierung der terminalen Differenzierung von Keratinozyten besitzt, wurde es zu „feeder layer" Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten supplementiert und der Eintritt in die Differenzierung durch das Phasenkontrasmikroskop beurteilt.

5.1.5 Präzipitation von sezernierten Proteinen in konditioniertem Medium

Wildtyp, c-Jun- und JNK-defiziente Fibroblasten werden in einer Dichte von 14000 Zellen/cm^2 in 10% FCS-haltiges DME Medium auf 10 mal 15 cm Schalen ausgesät. Nach 12 Stunden, in denen sich die Zellen anheften konnten, werden sie 3 mal mit PBS gewaschen und unter Serum-Entzug für weitere 36-48 Stunden kultiviert. Das konditionierte Medium eines Genotyps wird vereinigt, bei 13700 g zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Filter von Millipore gefiltert, um Zelltrümmer zu entfernen.
Die sezernierten Proteine im konditionierten Medium werden anschließend in einer 12,5%-igen Trichloressigsäure (TCA) für 1 Stunde auf Eis gefällt. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 13700 g für 30 Minuten werden die präzipitierten Proteine sedimentiert. Das entstandene Protein-Pellet wird dann 3 Mal mit eiskaltem Aceton gewaschen, um die Trichloressigsäure zu entfernen. Das gewaschene Protein-Pellet wird zwecks weiterer Auftrennung durch die 2-dimensionale Gelelektrophorese in Rehydrierungspuffer aufgenommen, der für die isoelektrische Fokussierung mit dem Amersham IPGphor vom Hersteller empfohlen wird. Die Proteinkonzentration der präzipitierten sezernierten Proteine wird anschließend mit dem 2D Quantification Kit von Amersham laut Herstellerangaben bestimmt.

5.1.6 Mykoplasmentest

Um eine Kontamination der verwendeten Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wird in regelmäßigen Abständen ein Mykoplasmentest durchgeführt. Der Test beruht auf einer Anfärbung von DNA durch den Hoechst-Fabstoff H33343, wodurch auch Mykoplasmen-DNA angefärbt und dadurch sichtbar wird. Dafür werden die Zellen mindestens 1 Woche in Abwesenheit von Antibiotika kultiviert und in einer Dichte von $1x10^4$ Zellen/cm^2 auf einen sterilen Objektträger ausplattiert. Am nächsten Tag werden die Zellen 1 Mal mit PBS gewaschen, bevor sie für 10 Minuten in eiskaltem Aceton fixiert werden. Nach wiederholtem Waschen des Objektträgers mit PBS werden die Zellen mit 1 µg/ml Bisbenzimid H33342 Fluorchrom (1/1000 in PBS) für 15 Minuten inkubiert. Um den Hintergrund zu reduzieren, wird der Objektträger 3 Mal mit PBS gewaschen bevor er in Mowiol eingedeckelt wird.

5.1.7 Isolierung von Keratinozyten aus humaner Haut

Die Hautproben werden so weit möglich vom Fettgewebe befreit in Betaisadonna-Lösung (Mundipharma Limburg/Lahn) 20-30 Minuten desinfiziert und anschließend mehrmals mit PBS gespült. Die Haut wird in schmale Streifen geschnitten (0,3 cm x 3 cm), in einem 50 ml Falcon Tube mit 0,5 mg/ml Thermolysinlösung überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Epithel wird dann vorsichtig mit zwei Pinzetten von der Dermis abgezogen und Epithel und Dermis werden getrennt in PBS gesammelt. Um die Keratinozyten aus dem Epithel zu isolieren, werden die Epithelien in ausreichendem Volumen 0,4% Trypsin/0,025% EDTA in einem Falcon Gefäß 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die epithelialen Zellen werden durch Schütteln und klopfen vereinzelt und die Keratinozyten über einen Zellfilter (70 µm Porengröße; Falcon, Beckton Dickinson) abgetrennt. Nachdem die Keratinozyten ausgezählt worden sind, werden sie in einer Dichte von 3,5 x 10^4 Zellen/cm^2 in FAD-Medium mit 5% FCS in Schalen mit 24 Stunden vorkultivieren humanen wachstumsarretierten Fibroblasten ausgesät und nach Erreichen von einer 100%-igen Konfluenz nach Abspülen der humanen Feeder-Fibroblasten in Einfriermedium (15% FCS, 10% Glycerin und 75% FAD_{komp}) eingefroren (Passage 0).

5.1.8 Isolierung von Fibroblasten aus humaner Haut

Aus dem abgetrennten dermalen Anteil der Haut werden primäre Fibroblasten gewonnen. Die Dermis wird in 0,5 cm^2 große Stücke geschnitten, welche in ausreichendem Abstand auf eine Zellkulturschale gesetzt werden. Nachdem sich die dermalen Stückchen durch Luftzufuhr an die Zellkulturschale angeheftet haben, werden sie mit 20% FCS-versetztem DME-Medium überschichtet. Der Mediumwechsel erfolgt alle 4-5 Tage bis die Fibroblasten nach ca. 2-3 Wochen aus den Explantkulturen auswachsen. Nachdem die Kulturen Konfluenz erreicht haben, werden sie, ohne die Dermisstücke abzulösen, trypsiniert und auf Zellkulturschalen mit 10% FCS/DMEM weiter vermehrt (Passage 2). Die verbleibenden Gewebestücke werden erneut mit 20% FCS/DMEM überschichtet, so dass erneut Fibroblasten aus dem Gewebe auswachsen können. Dieser Vorgang wird bis zu 3 Mal wiederholt, bevor die Dermisstücke entsorgt werden.

5.1.9 Herstellen und Kultivieren von Feeder-Fibroblasten

Murine bzw. humane Fibroblasten werden wie oben beschrieben trypsiniert und in einer Dichte von $5x10^6$/ml in D-10 aufgenommen. Die Bestrahlung erfolgt je nach Spezies bzw. Genotyp der Fibroblasten bei 70 Gy für humane Fibroblasten, 15 Gy für *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ und *c-jun*$^{-/-}$ Fibroblasten und 20 Gy für Wildtyp Fibroblasten. Die zur Kultivierung von primären humanen Keratinozyten dienenden Feeder-Fibroblasten, werden 24 Stunden vor Aussaat der Keratinozyten in einer Dichte von $1x10^4$ Zellen/cm^2 in FAD_{komp} ausplattiert, damit sie bereits das Medium für die Keratinozyten vorkonditionieren können. Als Monokultur verwendete Feeder-Zellen werden in einer höheren Zelldichte ($2,8x10^4$ Zellen/cm^2) in D-10 kultiviert.

5.1.10 Vorkultivierung von Keratinozyten auf humanen Feeder-Fibroblasten

Für jedes Experiment werden $1,1x10^4$ Keratinozyten/cm^2 aus Passage 0 (in flüssigem N_2 aufbewahrt) zu den humanen Feeder-Fibroblasten in das bereits 24 Stunden vorkonditionierte Medium ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2 Tage.

5.1.11 Subkultivierung von Keratinozyten

Nachdem die primären humanen Keratinozyten in der Vorkultur Konfluenz erreicht haben, erfolgt eine Subkultivierung (Passage 0 => 1). Alle Versuche werden mit Keratinozyten der Passage 1 durchgeführt, um vergleichende Aussagen treffen zu können. Die Zellen werden mit 15 ml 37°C warmen 0,05% EDTA gewaschen und anschließend für ca. 5-10 Minuten in 15 ml 37°C warmen 0,05% EDTA inkubiert. Das EDTA ist in der Lage Komplexe mit zweiwertigen Ionen vor allem Ca^{2+} einzugehen, wodurch desmosomale Kontakte zwischen den Zellen gelockert werden. Dieser Vorgang findet unter ständiger Kontrolle durch das Mikroskop statt. Sobald eine Lockerung der Zellverbände mikroskopisch sichtbar wird, werden die Feeder-Fibroblasten vorsichtig durch die EDTA-Lösung abgespült ohne die Keratinozyten von der Platte zu lösen. Die verbliebenen Keratinozyten werden dann mit 5 ml 37°C warmer 0,4% Trypsin/EDTA Lösung behandelt, damit auch sie sich von der Platte ablösen können. Der Zeitpunkt, an dem die Keratinozyten mit 10 ml FAD-Medium von der Platte gespült werden können, muss genau unter dem Phasenkontrastmikroskop abgepasst werden, um eine Schädigung der empfindlichen Keratinozyten zu vermeiden. Nachdem die Anzahl Keratinozyten in einem Zellzahlgerät (Casy) bestimmt worden ist, kann die gewünschte Zahl in FAD Medium entweder auf einen 24 Stunden vorkultivierte Feeder-Fibroblasten („feeder layer“ Cokultur) bzw. auf ein Kollagen-Gel mit integrierten oder cokultivierten Fibroblasten im „Transwell“ ausgesät werden (organotypische Kulturen).

5.1.12 Isolieren von Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen

Die Isolierung von Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen erfolgt nach Smola *et al. 1993*. Die Rattenschwänze werden uns freundlicherweise vom Tierlabor des DKFZ zur Verfügung gestellt. Die bei -20°C eingefrorenen Schwänze werden aufgetaut, für 1 Stunde in 70% EtOH desinfiziert und zweimal mit sterilem H_2O gewaschen. Die Haut des Schwanzes wird der Länge nach mit einer sterilen Schere eingeschnitten und abgezogen. Durch stückweises Brechen des Schwanzknochens werden die fädigen aus Kollagen bestehenden Sehnen vom Knochen gelöst. Die Sehnen werden dann in PBS gespült, auf Filterpapier ausgebreitet und von Blutgefäßen und Nerven befreit. Die getrockneten Sehnen werden gewogen, in der 100-fachen Menge steriler 0,1%

Essigsäure aufgenommen und bei 4°C so lange gerührt, bis sich das in den Sehnen enthaltene Kollagen aufgelöst hat. Durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 6000 g und 4°C werden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt, so dass der Überstand lyophilisiert werden kann. Die gefriergetrockneten Kollagen-Fasern können bei Raumtemperatur gelagert werden, bis sie für den Gebrauch in einer Endkonzentration in mg/ml in 0,1% Essigsäure aufgenommen werden. Die Lagerung erfolgt dann bei 4°C.

5.1.13 Herstellen von Kollagengelen

Die Kollagengele bestehen zu 80 Vol% aus 4 mg/ml Kollagen in 0,1% Essigsäure, 10 Vol% Hanks-Salzlösung (10x konzentriert mit Phenolrot) und 10 Vol% FCS, so dass die Endkonzentration des Kollagens 3,2 mg/ml beträgt. Alle Komponenten werden auf Eis und mit vorgekühlten Materialien (Rührfisch, Spitzen) gerührt. Die Essigsäure wird dann unter Rühren mit 1 M NaOH neutralisiert (Farbumschlag von Phenolrot nach Gelb). Je 2 ml dieser Kollagenlösung werden dann luftblasenfrei in ein Zellkultur-Einsatz (Falcon, 0,4 µm Poren) pipettiert. Nach 1 Stunde bei 37°C hat das Gel seine Festigkeit erreicht und ein steriler Glasring (Innendurchmesser 18 mm, 1,5 mm Wandstärke, 12 mm Höhe, Spezialanfertigung DKFZ) kann auf das Gel aufgesetzt und leicht angepresst werden. Nach einer weiteren Stunde kann das Gel mit FAD_{komp} equilibriert werden.

5.1.14 Organotypische Kulturen

Feeder-Zellen können entweder in das Kollagengel integriert oder unter den Kollagengel-Einsatz auf den Boden der 6-„well“ Zellkulturschale gesät werden. Murine Fibroblasten werden in einer Dichte von 8330 Zellen/cm^2 unter das Kollagen-Insert gesät, damit sie alle 2 Tage ausgetauscht werden können und die Notwendigkeit der harschen Bestrahlung der Feeder-Fibrobalsten zur Aufrechterhaltung der Zellzahl nicht nötig ist. Nachdem die Gele über Nacht in D-10 Medium equilibriert worden sind (2 ml unter den Einsatz, 1 ml in den Einsatz), wird das Medium im Ring abgezogen und $9x10^5$ Keratinozyten in 1 ml FAD in das Innere des Glasrings ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation wird das Medium von den Keratinozyten entfernt, die von nun an luftexponiert wachsen (Tag 0). Das D10 Medium unterhalb des Einsatzes wird durch 1,7 ml FAD ersetzt und alle 2 Tage gewechselt. Der Mediumspiegel grenzt dabei an den

oberen Gelrand. Um die Rolle verschiedener Wachstumsfaktoren auf Prozesse der Reepithelialisierung zu untersuchen, können dem Medium unterschiedliche Faktoren zugesetzt werden. Die Faktoren werden mit jedem Mediumwechsel frisch zugegeben. Neutralisierende Antikörper werden bereits beim Equilibrieren der Gele dem Medium zugefügt.

Nach ca. 10 Tagen bildet sich ein Epithel aus, das fixiert und histologisch untersucht werden kann. Falls der Gehalt proliferierender Zellen in einer Kultur später immunhistochemisch bestimmt werden soll, wird 12 Stunden vor Fixierung der Kulturen BrdU (Sigma) in einer Konzentration von 64,1 µM ins Medium gegeben.

5.1.15 Fixierung von organotypischen Cokulturen

Die Präparate werden vorsichtig mit einem Skalpell nach 9-11 Tagen aus dem Zellkultur-Einsatz heraus geschnitten und in 3,7% Formaldeyd in PBS fixiert. Nach ca. 2-3 Tagen werden sie in Agar eingebettet weitere 24 Stunden fixiert und in Kapseln eingeschlossen entwässert, indem sie eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%) durchlaufen, die in Xylol endet. Die entwässerten Präparate werden dann in Paraffin eingebettet.

Mit einem Mikrotom werden dann 6 µm dicke Schnitte hergestellt, die bei 42°C in einem Wasserbad geglättet auf silanisierte Objektträger aufgebracht werden und anschließend bei 42°C trocknen.

5.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.2.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für molekularbiologische Methoden

Sämtliche Arbeiten mit RNA sowie alle Zentrifugationsschritte erfolgten stets auf Eis bzw. bei 4°C in einer Kühlzentrifuge. Alle allgemeinen Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt; Roth Karlsruhe; Serva, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen bezogen.

Feinchemikalien und Lösungen	Hersteller/Bezugsquelle
Acetanhydrid	Merck, Darmstadt
Aqua Roti Phenol	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
AMV 5x Puffer	Promega, Mannheim
AMV-RT	Promega, Mannheim
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Casamino acids	Beckton Dickinson, Heidelberg
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Holland
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
DIG-RNA Labeling Kit	Amersham Bioscience
Diethylpyrocaronat (DEPC)	Sigma, Deishofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deishofen
DNA-Längenstandard „Gene ruler ladder mix“	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	Promega, Mannheim
DNase I Puffer	Promega, Mannheim
2’-Desoxynukleosid-5’-Triphosphate (dNTPs)	Promega, Mannheim
Enhanced Chemoluminescence Lsg.	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Entwickler Lösung	Kodak, Stuttgart
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmtadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fixier-Lösung	Kodak-Stuttgart
Formamid	Merck, Darmstadt
Herigssperma-DNA Typ III	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	J.T.Baker, USA
Kanüle	Beckton Dickinson
$MaCl_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mayers-Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natrim-Acetat	Thomas Chemikalien, Heidelberg

Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natrium-Kalium-Tartrat	Fluka, Bucks, Schweiz
NaCl	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumzitrat	Fluka, Bucks, Schweiz
Oligo dT Primer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Photoemulsion	Kodak, Stauttgart
Radiochemikalien [α-^{35}S]-UTP	Amersham, Freiburg
Rinderserumalbumin Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	Fermentas + NEB
RNase A	Sigma, Deisenhofen
RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RNA-Polymerasen	Roche, Mannheim
RNeasy	Qiagen, Hilden
Proteinase-K	Sigma, Deisenhofen
SYBR-Green	ABgene, Hamburg
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann, München
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trizol™	Invitrogen, Carlsbad, USA
tRNA	Sigma, Deisenhofen
Xylen Cyanol	Serva, Heidelberg

Lösungen	Ansatz
Agar-Platten	für 1 l: 10g Bacto Trypton
	10 g Hefeextrakt
	1g Casamino acids
	15 g Bacto Agar
DNA-Ladepuffer	0,2% Bromphenolblau (w/v)
	0,2% Xylen Cyanol
	15% Ficoll
	40% Glyzerin
Hybridisierungs-Lösung	100 µl 10x Salz
	500 µl Formamid
	2 µl t-RNA

	200 µl 50% Dextransulfat
	100 µl 1 M DTT
	100 µl DEPC H_20
Lösung D	4 M Guanidin-Thiocyanat
	25 mM Natrium-Citrat pH 7
	100 mM 2-Mercaptoethanol
	0,5% Laurysarcosin
	0,1% Antifoam A
NTE	0,5 M NaCl
	10 mM Tris-HCl pH 8,0
	5 mM EDTA
PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,3
	500 mM KCl
	0,01% Gelatine
10x Salz	0,2% Polyvenylpurrolidone (PVP)
	0,2% Ficoll 400
	1,38% NaH_2PO_4, pH 6,8
	50 mM EDTA
	3 M $MgCl_2$
	0,1 M Tris pH 8
20x SSC	175,3 NaCl
	88,2 g Natriumzitrat
	1 l H_20 pH 7,0 (mit 5 M NaOH)
TE	5 ml 1 M Tris pH 7,8
	1 ml 0,5 M EDTA
	594 ml H_2O
TBE 10x	998 mM Tris
	997 mM Borsäure
	288 mM EDTA
1 M Tris-HCl	121 g Tris-Actetat in 1 l H_2O
	pH mit HCl
TY-Medium	1% Bacto Trypton
	1% Hefeextrakt
	0,1% Casamonosäuren
	5% NaCl

<u>Vektoren</u>

pGEM-T Vector System, Promega

Bakterienstämme

E.Coli XL1 blue

Geräte und Materialien

Abi prism 310 Genetic Analyser	Abi prism, Darmstadt
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
Bakterienschüttler	Infors AG, Schweiz
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
Drehrad	cti, Idstein
Einbettungsmaschine Tissue Tek TES	Vogel, Giessen
Eismaschine	Scotsman, Ice Systems, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Eppendorf-Reaktionsgefässe	Greiner bio-one, Essen
Eppendorf-Reaktionsgefässe	Greiner bio-one, Essen
Feinwaage	Ohaus, Giessen
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Filter 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Heizblock	Grant, UK
Horizontal-Elektrophoresekammer	Stratagene, Niederlande
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Kühlzentrifuge 2K-15	Sigma, München
Küvetten	Hellma, Müllheim/Baden
Mikrotom RM 2155	Leica, Bensheim
Mikrowellengerät	Bosch, Karlsruhe
„Northern“ Membran	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Parafilm	American National Can, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Gefäße	Greiner bio-one, Essen
PCR-Thermocycler *Peltier* PTC-200	MJ Research
pH-Messgerät	Knick, Berlin
Photometer GeneQuant pro	Pharmacia, Freiburg
Pipettierhilfe	BrandTech, USA
Pipetten	Gilson, USA
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Pipettenspitzen, gestopft	Axygen, USA
Plastik-Kassetten (Paraffineinbettung)	Polysciences, USA
RNA-Quarzküvette	LabVision, Fremont, USA

Röntgenfilme Fuji RX	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Optimax Protec, Oberstenfeld
Rührzelle	Millipore, Schwalbach
Sephadex-G50-Säule	Stratagene, Niederlande
Sicherheitswerkbank	The BAKER Company, USA
Spannungsgerät	BioRad, München
Falcon Sterilfilter	Greiner bio-one, Essen
Szintillationszähler	Beckman, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Tomy Kogyo Co. Ltd, Japan
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Transilluminator	Stratagene, Heidelberg
Ultrafiltrationsfilter	Millipore, Schwalbach
Ultra-Turrax T25	Ika Labortechnik, Staufen
UV-Leuchttisch	Stratagene, Niederlande
UV-Stratalinker	Stratagene, Niederlande
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserheizbäder	GFL, Burgwedel

5.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

5.2.2.1 RNA-Isolierung mit Lösung D

Die Zellen werden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 3 ml Lösung D (4M Guanadinthiocyanat; 25mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl; 0,1% Antifoam; 100mM 2-Mercaptoethanol) auf Eis lysiert. Mit einem Gummischaber werden die lysierten Zellen von der Gewebekulturschale abgelöst. Mittels einer Injektionsspritze wird durch mehrmaliges Auf- und Abziehen die genomische DNA geschert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Pro ml Zelllysat werden 100 µl 3M NaAc (pH 4,8), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und die Proben 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 13700 g. Die wässrige, RNA-haltige Phase wird in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Der Ansatz wird kurz gemischt und die RNA anschließend auf -20°C für eine Stunde gefällt. Die präzipitierte RNA wird dann bei 13700 g für 45 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat mit 80%-igem Ethanol gewaschen. Die

gefällte RNA trocknet anschließend bei Raumtemperatur und wird schließlich in 100 µl RNase-freiem ddH_2O resuspendiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wird photometrisch bestimmt.

5.2.2.2 RNA-Isolierung mit TRIzol®

Die Zellen werden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2,5 ml TRIzol®-Reagenz pro 10 cm^2 Zellkulturschale auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen werden mit einem Gummischaber geerntet und die genomische DNA mit einer Injektionsspritze (Durchmesser 0,8 mm) durch mehrmaliges Auf- und Abziehen geschert. Die Suspension wird für 5 Minuten bei RT inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nukleoproteine zu erlauben. Nach Transfer in ein 15 ml Falcon-Röhrchen wird dem Zelllysat 1/5 Vol Chloroform zugesetzt und kräftig geschüttelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgt ein Zentrifugationsschritt (3200 g, 30 Minuten, bei 4°C). Dadurch bilden sich die untere Phenol-Chloroformphase, die Interphase und die obere wässrige Phase, die RNA enthält. Diese wird in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und die RNA mit 1 Vol Isopropanol für 20 Minuten bei 4°C gefällt. Die RNA wird durch Zentrifugation bei 3200 g für 30 Minuten bei 4°C sedimentiert und das gelartige RNA-Pellet zweimal mit 80%-igem Ethanol gewaschen. Nach Absaugen des Ethanols trocknet das RNA-Sediment bei Raumtemperatur an der Luft und wird in 100 µl RNase-freiem ddH_2O aufgenommen. Die Konzentration der RNA-Lösung wird photometrisch bestimmt und die RNA bei -80°C aufbewahrt.

5.2.3 DNase Verdau

Um genomische DNA aus extrahierter RNA zu entfernen, wird ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu werden 5 µg RNA-Extrakt in einem Gesamtvolumen von 16 µL RNase freiem Wasser aufgenommen. Anschließend werden 1/10 Vol 10x DNase Puffer, 0,05 U DNase I und 2 U RNase Inhibitor hinzugefügt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wird die aus der RNA-Extraktion verbliebene genomische DNA zerkleinert. Im nächsten Schritt wird dann die RNA durch eine Phenol/Chloroform Behandlung extrahiert. Zu diesem Zweck werden 4 Vol Wasser und 5 Vol Aqua Roti Phenol zugeführt, gevortext und anschliessend 5 Vol Chloroform zu dem Ansatz pipettiert. Durch einen Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 13.700 g

und 4°C wird die obere wässrige Phase von der unteren organischen Phase getrennt und ein Abnehmen der oberen wässrigen Schicht, die die RNA enthält, ermöglich. Die wässrige Phase wird dann mit ¼ Vol 3 M NaAcetat sowie 2 Vol 100% Ethanol p.a versetzt. Die RNA fällt für 20 Minuten bei -80°C oder über Nacht. Durch erneute Zentrifugation (30 Minuten, 13.700 g, 4°C) wird die RNA pelletiert und das Pellet mit 2 Vol 80% Ethanol gewaschen, bevor es in RNase freiem Wasser resuspendiert wird.

5.2.4 Synthese von cDNA

Die nach dem DNase Verdau durch Phenol/Chloroform extrahirte RNA wird zur cDNA-Synthese bei 70°C für 5 Minuten denaturiert und in einem Volumen von 20 µl unter Zugabe folgender Reagenzien revers transkribiert: 1/5 Vol 5x AMV-Puffer, 625 µM Desoxynukleotid-Triphosphate, 0,1 µg/µl Oligo dT Primer, 0,5 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 2 U RNase-Inhibitor RNasin. Der Ansatz wird 45 Minuten bei 41°C inkubiert und die Reaktion nachfolgend durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt, bevor die Reaktion bei 10°C zum Erliegen kommt. Der Reaktionsansatz wird dann mit ddH_2O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und bei -20°C gelagert. Für die anschließende Amplifikation per PCR werden 2 µl für die Mengenbestimmung der cDNA eingesetzt.

5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wird in speziellen dünnwandigen 0,5 ml Mikrogefäßen in einem Peltier Thermal Cycler PTC System der Firma MJ Research durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 25 µl werden 2µl c-DNA, 1/10 Vol 10x PCR Puffer, 250 µM dNTPs, 20 pMol jeden Primers und 0,63 U Taq-Polymerase hinzugefügt. Je nach Amplifikationsbedingungen kann dem Ansatz 1 mM $MgCl_2$ zugefügt werden. Der erste Schritt erzielt die vollständige Denaturierung der DNA bei 95°C für 2 Minuten dem die DNA Synthese in 23-33 Zyklen folgt. Dabei wird jeder Zyklus mit einer wiederholten Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden begonnen, dem das Anlagern der Primer an die einzelnen DNA-Stränge bei spezifischen Temperaturen für 1 Minute folgt. Die Dauer der Extension bei 72°C (optimale Extensionstemperatur der Taq-Polymerase) richtet sich nach der Länge des Amplifikats bei vorausgesetzter Syntheseleistung von 500 bp/Minute. Zum Abschluss der gesamten Reaktion wird eine

vollständige Synthese aller Doppelstränge durch eine 10-minütige Inkubation bei 72°C gewährleistet bevor der Ansatz auf 10°C heruntergekühlt wird. Die PCR-Produkte werden zur Qualitätskontrolle auf ein 1-2%iges Agarosegel in 1x-TBE aufgetragen.

5.2.5.1 Primer

Die Auswahl der spezifischen Primer erfolgte nach folgenden Kriterien mit dem Programm „Primer Select“ von DNA star:

- Durchschnitliche Länge von 16-24 Basenpaaren
- Mittlere Schmelztemperatur (Tm) von 60-80°C
- GC-Anteil von ca. 50-60%
- Maximal drei gleiche Basen hintereinander

Bei dem Design der Primer wird strengstens auf die Spezies-Spezifität geachtet. Die als human oder murin gekennzeichneten Primer erkennen ausschließlich die jeweilige Spezies.

Die Synthese der Primer wird am Deutschen Krebsforschungszentrum in der Abteilung Oligo-Synthese durchgeführt.

Oligonukleotid	Spezifität	Sequenz
BMP-4 for	murin	5′-AGGAGGGCCAAACGTAGTCCC-3′
BMP-4 rev	murin	5′-GGGACACAACAGGCCTTA-3′
BMP-4 for	human	5′-GCGCCACTCGCTCTATGTGG-3′
BMP-4 rev	human	5′-GTGGGTGAGTGGATGGGAA-3′
β–Tubulin	murin	5′GCGACCTGCAGCTGGACCGAATCT-3′
β–Tubulin	murin	5′-GGGCGAGGGCACCACACTGAAGG-3′
Filaggrin for	human	5′-CCGAGGGTCCAGTGGTAGTCAGGT-3′
Filaggrin rev	human	5′-CCGGCCCGAGTGGAAGGTT-3′
GRHL-3 for	human	5′-CTCCCCCAAAGCCATCCACATC-3′
GRHL-3 rev	human	5′-TGCCCAAGCCACAGTCATAGGT-3′
HPRT for	murin	5′-CTGGTTAAGCAGTACAGCCCC-3′
HPRT rev	murin	5′-CAAAAGTCTGGGGACGCAGC-3′
HPRT for	human	5′-GCCTATAGACTATCAGTTCCC-3′
HPRT rev	human	5′-CTTTTCTAACACACGGTGG-3′

Keratin 10 for	human	5′-GGGGGAGCCTCGTGACTACAGC-3′
Keratin 10 rev	human	5′-CGGGGCAGCATTCATTTCCACATT-3′
PEDF for	murin	5′-CGTCCCCAGCAGCTCTGAG-3′
PEDF rev	murin	5′-AAGCCACGCCAAGGAGAAGG-3′
PEDF for	murin	5′-TTCTCCGCGTGGCTTACTTCA-3′
PEDF rev	murin	5′-CTGCCCCCTCTTCATTCCACTCG-3′
PEDF for	human	5′-GCCCGACACCGAGAAGGAGA-3′
PEDF rev	human	5′-CCTGCCAGCCCCCCGGAGGAG-3′

5.2.6 Quantitative „Real-Time“ PCR

Für die quantitative „Real-Time“ PCR wird das MyQ Real-Time PCR Detektionssystem der Firma BioRad und das SYBR Green PCR Kit der Firma ABgene verwendet. Der Verlauf der Reaktion wird über ein entsprechendes Programm der Firma BioRad verfolgt und aufgezeichnet. In einem 25 µl Gesamtansatz werden 12,5 µl der „SYBR Green“-Lösung (SYBR Green PCR Kit; ABgene, Hamburg), 0,4 µM je Primer und die zu untersuchende cDNA eingestzt. Vor der eigentlichen Amplifikation, die 40 Zyklen beträgt, wird die in der „SYBR-Green“-Lösung enthaltene „Hot-Start“-Taq-Polymerase durch erhitzen auf 95°C für 15 Minuten aktiviert. Die Temperaturbedingungen richten sich nach den zuvor etablierten Standart-PCR-Bedingungen. Um eine quantitative Aussage über die Regulation eines Gens machen zu können, wird bei jeder Messung die Menge an *hprt* bei gleicher cDNA Menge mitbestimmt und bei der Auswertung mit der des Zielgens zur Normalisierung verrechnet. Die Menge des Zielgens im Verhältnis zu *hprt* wird für den Normalzustand (Wildtyp oder unverwundete Haut) gleich eins gesetzt. Die Werte der anderen Proben werden auf den auf eins gesetzten Wert bezogen, so dass über die restlichen Proben ausgesagt werden kann, um das wie viel-fache das Zielgen in der Probe vorliegt.

5.2.7 Allgemeine Klonierungstechniken

Sämtliche Klonierungen erfolgen entsprechend gängiger Protokolle. Restriktionsverdaus und Ligationen werden nach Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme durchgeführt. Die Aufreinigung von Restriktions- oder PCR-Fragmenten

erfolgt durch Phenol/Chloroform Extraktion oder durch Isolation aus einem Agarose Gel. Sequenzierungsreaktionen werden mit dem DYEnamic ET Terminal Sequenzierungskit (Amersham Biosciene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.8 Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen kommen sowohl bei der Herstellung von Plasmiden als auch analytisch zur Überprüfung von DNA-Fragmenten auf ihre Sequenz und Ausrichtung in einem Plasmid zum Einsatz. Um 1 µg Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen zu schneiden, wird die DNA mit der zwei- bis fünffachen Enzymmenge (2–5 U) für 1–2 Stunden oder über Nacht in der entsprechenden Verdünnung der Restriktionspuffer inkubiert. Die Inkubationstemperatur richtet sich dabei nach dem angegebenen Wirkungsoptimum der Restriktionsenzyme. Manchen Reaktionen wird nach Angaben des Herstellers zusätzlich BSA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Spaltprodukte gelelektrophoretisch untersucht.

5.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentlänge in 1-2%-igen Agarose-Gelen in 1x-TBE-Puffer versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Dazu werden die Proben zuerst in der entsprechenden Menge an 5x-Ladepuffer aufgenommen (Endkonzentration 1x-Ladepuffer) und dann in 1x-TBE-Puffer bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gel-Lauf werden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem ausgewertet. Ein DNA-Längenstandart dient der Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

5.2.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über präparative Gele

Die Aufreinigung von DNA aus flüssigen Ansätzen erfolgt nach der Phenol/Chloroform-Methode. Sie wird vor allem eingesetzt, wenn zwei Restriktionsendonukleasen mit unterschiedlichen Pufferpräferenzen zum Klonieren verwendet werden. Der erste Schritt besteht darin, der DNA-enthaltenen Lösung ein gleiches Volumen an Phenol und Chloroform zuzufügen, für 15 Sekunden zu vortexen

und anschließend für 5 Minuten bei 13700 g zu zentrifugieren. Im Anschluss an die Zentrifugation wird die wässrige Phase abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 100 µl frisches Chloroform zugeführt. Nach wiederholtem Vortexen und Zentrifugieren wird die DNA in der wässrigen Phase mit 1/10 des Volumens an 8 M LiCl und einem 3-fachen Vol an EtOH bei -80°C für 20 Minuten gefällt. Die DNA wird anschließend in einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 13700 g) gewonnen, mit 80%-igem EtOH gewaschen, bei RT getrocknet und in 30 µl H_2O resuspendiert.

5.2.11 Ligation von Plasmiden

Um kompatible Enden von Insert und Vektor zu ligieren, wird in einem Gesamtansatz von 15 µl ein dreifach molarer Überschuss von Insert zu Vektor (i.d.R. 50 ng) eingesetzt und zum Einstellen des benötigten Ionenmillieus 1x-Ligationspuffer (24 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM DTT; 0,8 mM ATP; 2,5% Polyethylen-Glyzol) sowie 0,5 U der T4 DNA-Ligase zugeführt. Die aus dem Agarose-Gel gewonnene DNA-Menge wird anhand der Bandenintensität von Probe und eingesetztem DNA-Standart abgeschätzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wird die Hälfte des Ligationsansatzes in chemisch kompetente Bakterien transformiert.

5.2.12 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien

100 ml TY-Medium wird mit dem Bakterienstamm *XL-1 blue* angeimpft und unter Schütteln bei 180 rpm und 37°C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5 inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension in zwei sterile 50 ml Röhrchen überführt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (3000 g; 10 Minuten; 4°C) werden die Sedimente in eiskalter Lösung I (100 mM $RbCl_2$; 50 mM $MnCl_2$; 30 mM KAc; 10 mM $CaCl_2$; 15% (v/v) Glyzerol; pH 5,8) resuspendiert und für 3 Stunden auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (3000 x g; 10 Minuten; 4°C) wird der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml eisgekühlter Lösung II (10 mM MOPS; 10 mM $RbCl_2$; 75 mM $CaCl_2$; 15% (v/v) Glyzerol; pH 7) resuspendiert. 100 µl Einheiten werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.13 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien

30 µl chemisch kompetente *E.coli* Bakterien werden zu der Hälfte des eisgekühlten DNA-Ligationsansatzes (50–100 ng DNA) gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 20 Minuten wird ein 90 Sekunden langer Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Bakterien 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 200 µl TY-Medium wird die Suspension 30 Minuten bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. 100 µl des Ansatzes werden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.14 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräp)

Zur Routine-Analyse von Klonierungen werden Bakterien in 2 ml TY-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin (TY-Amp-Medium) hinzugefügt werden, bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht angezogen. Die Resuspension der durch Zentrifugation (3700 g; 3 Minuten) sedimentierten Bakterien erfolgt in 200 µl Lösung I (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A). Die Bakterien werden anschließend durch 200 µl Lyse-Puffer (200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS) lysiert und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisierungspuffer (3 M Kaliumazetat pH 5,5) und sorgfältigem Mischen wird das Lysat bei 13700 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit Chloroform extrahiert. Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das durch Zentrifugation bei 13700 g für 10 Minuten erhaltene DNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl dH2O resuspendiert.

5.2.15 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräp)

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, werden 200 ml TY-Amp-Medium mit 1 ml einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden am darauf folgenden Tag bei 5000 g für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Quiagen-Plasmid Aufreinigungs-Kits nach den Vorschriften des Herstellers präpariert.

5.2.16 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt über Messung der optischen Dichte (OD) im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Da eine dsDNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml oder eine ssDNA mit einer Konzentration von 33 µg/ml bei einer Wellenlänge von 260 nm eine optische Dichte von 1 aufweist, errechnet sich die DNA Konzentration wie folgt:

$$c[\mu g/ml] = OD_{260} * V * F$$

c: Konzentration der Ausgangslösung

OD_{260}: optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge

V: Verdünnungsfaktor

F: Multiplikationsfaktor (50 µg/ml bei dsDNA; 33 µg/ml bei ssDNA)

Damit durch Proteine verursachte Verunreinigungen ausgeschlossen werden können, wird das Verhältnis OD_{260} : OD_{280} ebenfalls ermittelt. Bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung sollte das Verhältnis 1,8 betragen.

5.2.17 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Für den Nachweis von RNA auf Gewebeschnitten wird PEDF und BMP-4 in den pGEM(T) Vektor von Promega kloniert. Dieser Transkriptionsvektor besitzt zwei verschiedene Promotorsequenzen für Phagen-RNA-Polymerasen SP6 und T7. Zwischen den Promotorsequenzen liegt die „multiple cloning site“ (MCS), in welche die durch PCR amplifizierte cDNA kloniert wird. Die cDNA-Sequenz wird nach der Klonierung von beiden Seiten von den Promotoren flankiert, so dass eine „sense“- und eine „antisense“-Transkription möglich ist. Durch Linearisierung des Transkriptionsplasmids mittels Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungsstellen in der MCS distal von den Promotorsequenzen liegen, wird der nicht für die Transkription benötigte Promotor von der cDNA-Sequenz abgetrennt. Dadurch können durch zwei Linearisierungen eines Plasmids zwei Matrizen hergestellt werden, die jeweils für die „sense“ oder „antisense“ Transkription benutzt werden können. Das „sense“ Transkript wird als negative Kontrolle zur Abschätzung des Hintergrundsignals verwendet. Für die *in vitro* Transkription des pGEMT-PEDF wird der Vektor durch SalI (Sinnstrang = negativ Kontrolle) und NcoI (Antisinnstrang) im Fall von pGEM(T)-BMP-4 durch SalI

(Sinnstrang) und SphI (Antisinnstrang) linearisiert. Die Linearisierung wird über die Aufrennung auf einem 0,8%-igen Agarose-gel überprüft und das vollständig linearisierte Plasmid wird anschließend durch Phenol/Chloroform Extraktion gewonnen.

5.2.17.1 Radioaktiv-markierte *in situ* Hybridisierung

In vitro Transkription mit ^{35}S-UTP für radioaktive *in situ* Hybridisierung

0,5-0,75 µg der linearisierten Plasmid DNA werden in einem 20 µl Gesamtansatz mit 1x-Transkriptionspuffer, 2 U RNasin, 625 µM rNTPs, 50 µCi ^{35}S-UTP (Amersham) und 30 U µl T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase versetzt und für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Plasmid-„Template" für 15 Minuten durch 3 U DNaseI (RQ1) bei 37°C verdaut. Zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide wird der Transkriptionsansatz über eine Säule aufgereinigt. Diese wird 2 Mal mit 70 µl TNE-Puffer equilibriert. Die radioaktiv markierte RNA-Probe wird zur Aufreinigung in 40 µl TNE-Puffer auf die Säule gegeben, durch 140 µl TNE-Puffer eluiert und in dreifachem Vol 100% EtOH/NH_4Acetat gefällt. Der Einbau der radioaktiven ^{35}S-UTP wird dann über ein Szintillationsmeßgerät überprüft.

Prähybridisierung mit radioaktivier Probe

Vor der eigentlichen Hybridisierung werden die angefertigten Schnitte derart vorbereitet, dass die aufgetragene Probe in das Gewebe eindringen kann und dass unspezifische Bindungen vermieden werden. Bei allen folgenden Schritten werden die Objektträger mit den zu hybridisierenden Schnitten in einem Objektträgergestell in verschiedene Glaströge mit unterschiedlichen Lösungen transferiert. Gefrierschnitte werden nach Auftauen bei RT für 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und für 3 Minuten in PBS gewaschen. Proteine werden dann für 5 Minuten bei RT durch einen Verdau mit Proteinase K (10 mg/ml, Endkonzentration: 20 µg/ml) entfernt und erneut für 5 Minuten in 4% PFA/PBS nachfixiert. Die sich anschließende Acetylierung erfolgt für 10 Minuten mit Triethanolamin in DEPC-H_2O durch tropfenweise Zugabe von 500 µl Essigsäureanhydrid. Sie dient zur Neutralisierung positiver Ladungen und damit zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Nach erneutem Waschen für 5 Minuten in PBS werden die Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und getrocknet.

Hybridisierung

In der Zwischenzeit wird die benötigte Menge an radioaktiver RNA (150000 cpm/µl Hbridisierungsmix), die sich gefällt in EtOH befindet, entnommen, für 10 Minuten bei 13700 g zentrifugiert, mit 75% EtOH gewaschen, getrocknet und in 1/10 des Gesamtvolumens an Hybridisierungslösung in 100 mM DTT gelöst. Dabei wird die spezifische Aktivität der RNA-DTT-Lösung auf $1{,}5x10^6$ cmp/µl eingestellt (entspricht $1{,}5x10^5$ cmp/µl inder Gesamthybridlösung). Die Hybridisierungslösung enthält folgende Bestandteile: 1x Hyb-Salz (10x Hybsalz: 0,2% Polyvinylpurrolidone, 0,2% Ficoll, 0,38% $NaH_{2PO}4$ pH 6,8, 50 mM EDTA, 3M NaCl, 0,1 M Tris pH 8), 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 10 mM DTT, 10 µl tRNA (10mg/ml Stock) und 10% RNA-DTT-Lösung ($1{,}5x10^5$ cpm/µl). Bevor die radioaktive RNA-Probe auf den Schnitt aufgetragen wird, muss sie für 5 Minuten bei 80°C denaturiert werden. Sofortiges Abkühlen auf Eis verhindert die Renaturierung der RNA. Die radioaktive Probe (ca. 20 µl pro Schnitt) hybridisiert dann bei 55°C über Nacht in einem Wärmeschrank sequenzspezifisch an die RNA im Gewebe. Auf jedem Objektträger wurde parallel sowohl eine „sense"-Probe als auch eine „antisense"-Probe hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer mit Filterpapier, welches in 2xSSC/50% Formamid getränkt ist. Am nächsten Tag wird das Gewebe mit Waschpuffern unterschiedlicher Stringenz und bei unterschiedlichen Temperaturen gewaschen. Die hohe Formamid-Konzentration (50%) setzt den Schmelzpunkt der RNA-RNA-Duplexe herab, so dass die hybridisierte RNA stabilisiert wird. Durch das in den Lösungen enthaltene Mercaptoethanol wird der radioaktiv markierte Schwefel vor Oxidation geschützt und somit ebenfalls stabilisiert. Die Waschschritte sind wie folgt:

1) 15 Minuten mit 2xSSC/50%Formamid/20mM Mercaptoethanol bei 37°C
2) 30 Minuten mit 2xSSC/50%Formamid/20mM Mercaptoethanol bei 65°C
3) 2-3 Stunden mit 2xSSC/50%Formamid/20mM Mercaptoethanol bei 37°C
4) 15 Minuten mit NTE-Puffer bei 37°C
5)15 Minuten TNE/RNase bei 37°C
6) 15 Minuten mit NTE bei 37°C
7) 15 Minuten mit 2xSSC/50%Formamid/20mM Mercaptoethanol bei 37°C
8) 15 Minuten mit 2xSSC bei RT
9) 15 Minuten mit 0,1x SSC bei RT

10) je 2 Minuten in 30%, 50%, 70% EtOH in 0,25 M NH_4OAcetat bei RT
11) je 2 Minuten in 80%, 90%, 95% und 100% EtOH
Die Schnitte werden getrocknet und zur Überprüfung der Hybridisierung auf einem Röntgenfilm für 2-3 Tage exponiert.

Beschichten der Objektträger mit Photoemulsion und Entwicklung

Um die hybridisierte radioaktive RNA sichtbar zu machen, werden die Schnitte im Dunkeln in flüssige 42°C warme Photoemulsion (NTB-2 Photoemulsion von Kodak) in 0,6 M NH_4Acetat (1:1) gedippt, für 2 Stunden im Dunkeln getrocknet und für ca. 2 Wochen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, bevor sie entwickelt werden. Die Expositionsdauer wird von der Stärke des Signals, welches auf dem Röntgenfilm sichtbar wird, abhängig gemacht. Die Entwicklung geschieht durch Inkubation der Schnitte für 4 Minuten in Entwickler-Lösung (Kodak D-19 Entwickler: 50 ml + 200 ml Leitungswasser), 4 Minuten in Fixier-Lösung (Kodak-Fixierer: 250 ml + 250 ml Leitungswasser) und zweimaliges Waschen mit H_2O für 5 Minuten. Anschließend kann das Gewebe zusätzlich durch Hämatoxylin und Eosin angefärbt und für Dauerpräparate mit Entellan eingedeckelt werden.

5.2.17.2 Fluoreszenz-markierte *in situ* Hybridisierung

In vitro Transkription mit Digoxigenin-gekoppelten NTPs für Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Für *in vitro* Transkription des linearisierten Plasmids wurde das DIG RNA „Labeling“ Kit (Roche, Mannheim) verwendet. 1 µg jedes Plasmids wird durch T7 bzw. SP6 RNA Polymerase in 1x-Transkriptionspufer mit 2 µl NTP-Mix und in Anwesenheit von 1µl RNase Inhibitor für 2 Stunden bei 37°C transkribiert. Die erfolgreiche Transkription und somit die Anwesenheit von RNA wird anschließend auf einem 2%-igen Agarosegel überprüft, bevor das Plasmid für 15 Minuten bei 37°C durch DNaseI verdaut wird. Die Reaktion der DNase wird durch die Zugabe von 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die Ribonukleotid-Probe wird dann mit 60 µg tRNA und 2,5 M Ammoniumacetat in einem dreifachen Volumen an eiskaltem EtOH gefällt. Das Pellet wird in 50 µl RNase freiem H_2O aufgenommen.

„Dot Blot“ zur Qualitätskontrolle und Mengenbestimmung der Transkripte

Um quantitative Aussagen über die entstandenen Transkripte machen zu können wird eine Verdünnungsreihe mit bekannten RNA-Mengen (1 ng, 300 pg, 100 pg) und die *in vitro* transkribierten Proben auf eine Hybond N+ Membran aufgetragen und in einem UV Stratalinker 2400 (Stratagene) durch UV-Licht fest an die Membran gebunden („crosslinked“). Anschließend wird die Membran für 30 Minuten in 1% Blockierlösung (Boehringer Ingelheim) in B1DIG-Lösung (100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 2 mM Levamisol) inkubiert. Die Membran wird für 1 Stunde mit einem anti-Digoxigenin Antikörper, der an Peroxidase (POD) gekoppelt ist, behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wird die Membran mit ECL-Lösung benetzt, so dass die Transkripte auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können. Die Intensität der Transkripte wird zur Mengenbestimmung mit den bekannten RNA-Mengen vergleichen.

Hybridisierung mit DIG-markierter Probe

In Paraffin eingebettetes Gewebe wird mit Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe bis zu 30% EtOH rehydriert. Die Gewebe werden wie unter Prähybridisierung für die radioaktive ISH beschrieben (s.o.) behandelt. Die Digoxigenin-markierte Probe wird auf 5 µg/ml mit Hybridisierungslösung eingestellt und nach Denaturierung für 5 Minuten bei 80°C auf die Gewebe aufgebracht. Die Hybridisierung erfolgt wie bei der radioaktiven Probe bei 55°C über Nacht in einer feuchten Kammer mit 2xSSC/50% Formamid. Am nächsten Tag werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zweimal für 5 Minuten in 5x SSC inkubiert, bevor sie für eine halbe Stunde in 5xSSC/50% Formamid bei 37°C und erneut für 1 Stunde in 5xSSC/50% Formamid bei 37°C verweilen. Um unspezifische Bindungen des anti-Digoxigenin Antikörpers zu blockieren, werden die Schnitte nach dem Waschen für 30 Minuten mit 1% Blockierungslösung (Boehringer) bei 37°C inkubiert. Innerhalb einer Stunde bindet dann der Schaf anti-Digoxigenin Antikörper in Blockierungslösung (1:500) bei RT an das in die RNA-Probe eingebaute Digoxigenin. Die Schnitte werden dann 3 Mal mit 0,5% Tween 20 in PBS für 5 Minuten bei RT gewaschen, bevor der Zweitantikörper der gegen Immunoglobuline des Schafs gerichtet ist (anti-sheep-Alexa 555, 1:500) und Hoechstfarbstoff (1:1000) für eine weitere Stunde bei RT inkubiert

wird. Drei aufeinander folgende Waschschritte mit 0,5% Tween20/PBS reduzieren den Hintergrund der Fluoreszenz. Eingedeckelt werden die Präparate dann mit Mowiol. Die Lagerung findet bei 4°C statt.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für proteinbiochemische Methoden

Zur Unterbindung von Protease- und Phosphataseaktivitäten werden sämtliche Arbeiten mit Proteinen stets auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen bzw. in Gegenwart von Protease-Inhibitoren durchgeführt, sowie zur Zentrifugation stets eine Kühlzentrifuge bei 4°C verwendet. Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt; Roth Karlsruhe; Serva, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen bezogen.

Reagenzien	Hersteller
Acrylamid/N,N´-Methylenbisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chaps	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
ECL-Lösung	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Essigsäure	J.T. Baker, USA
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff (Urea)	Fluka Chemicals, Schweiz
In situ Block-Reagenz	Boehringer, Mannheim
Iodacetamid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumcarbonat	Sigma, Deisenhofen
Kaliumtetrathionat	Sigma, Deisenhofen
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Nonidet (NP-40)	Fluka Chemicals, Schweiz
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S Lösung	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Protein-Marker, vorgefärbt	New England Biolabs, USA
Quant-Kit (2D)	Amersham Bioscience, Freiburg
Silbernitrat	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-base	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton-x-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin Sequencing Grade Modified	Promega, Heidelberg
Tween 20	Fluka Chemicals, Schweiz

Lösungen	Ansatz
Laemmli-Puffer	25 mM Trizma
	192 mM Glycine
	0,1% SDS
Lyse-Puffer (Proteine)	100 mM Tris pH 7,9
	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1% Triton-X-100
	frisch: 1 mM DTT
	frisch: 1% Proteinase Inhibitor Mix
Rehydrierungs-Puffer	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	2% Chaps
	0,5% Ampholyte pH 3-11
	Bromphenolblau
	Frisch: 20 mM DTT
Sammelgel	4% Acrylamid
	0,1% N,N´-Methylenbisacrylamid
	125 mM Tris-HCl pH 6,8
	0,1% SDS
	0,1% APS
	0,05% TEMED
Sammelgel-Puffer	0,5 M Trizma/Tris Base

	0,4% SDS
	pH 6,8 mit HCl
„Strip“-Lösung	25% Sammelgel Puffer
	2% SDS
	0,1 M β-Mercaptoethanol
10x TBS	0,5 M Trizma/Tris Base
	1,5 mM NaCl
	pH 7,5 mit HCl
Trenngel	6-12% Acrylamid
	0,16-0,32% N,N´-Methylenbisacrylamid
	375 mM Tris-Hcl pH 8,8
	0,1% SDS
	0,1% APS
	0,05% TEMED
Trenngel-Puffer	1,5 M Trizma/Tris Base
	0,4 % SDS
	pH 8,8 mit HCl
WB-Blockierlsg	50 mM Tris-HCl pH 8
	150 mM NaCl
	0,1% Triton-X-100
	7,5% (w/v) Milchpulver
	1mM EDTA
WB-Transfer Puffer	20 mM Trizma
	154 mM Glycine
	0,08% SDS
	20% Methanol
WB-Wasch Puffer	1x-TBS
	0,05% Tween-20

<u>Geräte und Materialien</u>

Eismaschine	Scotsman, Ice Systems, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Elisa-96-wel Platte	Nuncbrand
Elisa-Reader	Titertek, USA
Eppendorf-Reaktionsgefässe	Greiner, Frickenhausen
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Geltrockner	cti, Idstein
Hamilton-Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz

Heizblock	Grant, UK
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Protein-Gelkammern	Sigma-Aldrich, München
Röntgenfilme Fuji RX	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Optimax Protec, Oberstenfeld
Spannungsgerät	BioRad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Whatman 3 mm Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge J2-HS	Beckman, München
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge 13	Hereaus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Hereaus, Hanau

5.3.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Isolierung von Gesamt-Proteinen werden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS von der Zellkulturschale vorsichtig abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 3700 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Sediment in 200 µl Protein Lyse-Puffer aufgenommen. Nach drei Gefrier-Tau-Zyklen bei -20°C, werden die Zellen bei 13700 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. 5 µl der Proteinsuspension werden anschließend zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry verwendet, der Rest bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinkonzentration wird entsprechend der klassischen Methode nach Lowry bestimmt (Lowry *et al.,* 1951). Dazu werden je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung auf 150 µl mit Lowry-Lösung I (2% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH) aufgefüllt und dann mit 250 µl einer frisch hergestellten Lowry-Lösung IV (2% Na-K-Tartrat/1% $CuSO_4x5H_2O$/ Lowry-Lösung I im Verhältnis von 1 : 1 : 100) gemischt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur werden 100 µl Lowry-Lösung III (50% Folin-Reagenz in Wasser verdünnt) zugegeben und für 30–90 Minuten

bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Quantifizierung wird parallel eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt (0, 5, 10, 20, 30, 40 und 60 µg). Je 100 µl des Reaktionsansatzes werden im Doppel in eine 96-„well"-Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 660 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgt anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

5.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Proteine werden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) analysiert. Dabei richtet sich die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins.

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wird die entsprechende Acrylamid-Lösung (Trenngel-Lösung: 10%-12% Acrylamid/Bisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED) zwischen zwei mit Abstandhaltern fixierten Glasplatten luftblasenfrei bis ca. 4 cm zum oberen Glasrand ausgegossen, mit Isopropanol überschichtet und bis zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Entfernen des Isopropanols wird das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid/Bisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt.

50 µg Proteinextrakt werden mit 1x-SDS-Protein-Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM DTT; 0,4% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 2% Glyzerin) mit 1,5% β-Mercaptoethanol versetzt und nach Aufkochen (95°C; 5 Minuten) in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Als Laufpuffer für die SDS-Gelelektrophorese dient 1x-SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-base; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS; pH 8,7). Der Sammelgellauf erfolgt bei konstanter Stromstärke von 20 mA, der anschließenden Trenngellauf bei einer Stromstärke von 30 mA. Die Länge des Trenngellaufs richtet sich nach Größe und Auftrennung des zu analysierenden Proteins.

5.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen („Western Blot")

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran Optitran BA-S 83 erfolgt mittels einer "semi-dry Western Blot"-Apparatur in der folgenden Weise: drei Lagen Whatman 3 MM-Papier, die

Nitrozellulose-Membran, Trenngel und wiederum drei Lagen Whatman 3 MM-Papier wurden mit „Western Blot"-Puffer (20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) getränkt und luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der elektrophoretische Transfer wird bei Raumtemperatur und bei einer Spannung von 18 V sowie einer entsprechenden Stromstärke, die sich aus der Größe des Gels ergab (pro cm^2 Gel: 2–3 mA), für etwa 1–2 Stunden durchgeführt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wird durch eine Färbung mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran 30 Minuten in Blockierungs-Puffer (5% (w/v) BSA; 0,1% Tween 20 in PBS bzw. 7,5% Milch in PBS mit 0,1% Tween 20) inkubiert. Die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers in Blockierungs-Puffer erfolgt entweder bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder über Nacht bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung. Im Anschluss wird die Membran mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) jeweils dreimal für 10 Minuten gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, ebenfalls in Blockierungs-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (1:2500 anti-Kaninchen; 1:2500 anti-Ziege; 1:2000 anti-Maus). Um die ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen, wird die Membran anschließen dreimal für 10 Minuten gewaschen. Zum Nachweis der Proteine wird die Membran für 1 Minute mit ECL-Lösung benetzt. Das Prinzip dieses Nachweises besteht in einer Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenden Luminols durch Wasserstoffperoxid, welches daraufhin einer Autodegradation ausgesetzt ist und bei Aussenden von Licht zerfällt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wird die Membran in Folie eingewickelt und in einer Filmkassette auf einem Fuji Röntgenfilm X exponiert. Die Exposition des Films richtet sich nach der jeweiligen Signalintensität.

5.3.6 „Strippen" einer Membran

Um unterschiedliche Proteine auf einer Membran zu analysieren, kann die Nitrozellulose-Membran nach Inkubation mit einem bestimmten Antikörper „gestrippt" werden. Das bedeutet, dass alle an die Membran gebundenen Antikörper entfernt werden und die Membran somit für eine weitere Inkubation mit einem unterschiedlichen Serum zur Verfügung steht. Dazu wird die Membran für 30 Minuten bei 60°C in einer Strip-Lösung inkubiert und anschließend ausgiebig mit 1x-TBS

gewaschen. Nach dem Strippen kann die Membran erneut gegen unspezifische Bindungen geblockt und mit Antikörpern behandelt werden.

5.3.7 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2D Gelelektrophorese)

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese ist eine Methode um ein komplexes Proteingemisch hoch auflösend aufzutrennen. Dazu macht man sich in zwei aufeinander folgenden Schritten unterschiedliche Eigenschaften der Proteine zu Nutze. In der ersten Dimension werden die Proteine durch eine isoelektrische Fokussierung aufgrund ihrer Fähigkeit aufgetrennt, in einem angelegten elektrischen Feld innerhalb eines pH Gradienten zu ihrem isoelektrischen Punkt zu wandern. Dieser Punkt ist dann erreicht, wenn die Nettoladung des Proteins Null ist. Die isoelektrische Fokussierung wurde auf käuflich erwerbbaren IPG Streifen von Amersham mit einer Länge von 18 cm und unterschiedlichen pH-Gradienten (pH 3-11, 4-7, 5-6) durchgeführt. Dazu wird jeder Streifen passiv, d.h. ohne elektrische Untersützung über Nacht in 340 µl Rehydrierungspuffer in einer speziellen Rehydrierungskammer von Amersham rehydriert. Der Rehydrierungspuffer enthält je nach Anforderung 50 µg der gelösten sezernierten Proteine für ein analytisches bzw. 250 µg Protein für ein präparatives 2D Gel, aus dem einzelne Proteinpunkte ausgeschnitten und nachfolgend mit Maldi Massenspektrometrie analysiert werden können. Um zu verhindern, dass der Rehydrierungspuffer über Nacht evaporiert, wird er mit 3 ml Mineralöl überschichtet. Die isoelektrische Fokussierung läuft dann in der IPGphor Fokussierungseinheit von Amersham mit folgendem Spannungsprofil ab: 1) ansteigende Spannung bis 500 V und stabile Spannung auf 500 V für eine Stunde 2) ansteigende Spannung bis 1000 V und stabile Spannung auf 1000 V für eine weiter Stunde 3) ansteigende Spannung bis 8000 V und stabile Spannung auf 8000 V für sieben Stunden. Nachdem ca. 45.000 Vhs (Vhs= Volthours=Gesamtvoltstunden) erreicht worden sind, ist die isoelektrische Fokussierung beendet. Die Streifen können an diesem Punkt bei -80°C eingefroren oder direkt in der zweiten Dimension weiter bearbeitet werden. Bei der zweiten Dimension handelt es sich um eine normale SDS-Gelelektrophorese, die jedoch in einer speziellen Ettan Dalt six Apparatur von Amersham durchgeführt wird, in der bis zu sechs Gele gleichzeitig laufen können. Doch bevor die Streifen auf ein SDS-Gel aufgesetzt werden können, müssen sie für die Gelelektrophorese in zwei Schritten equilibriert werden. Der erste

Schritt erfolgt für 15 Minuten in einer 10 mg/ml DTT-haltigen Equilibrierlösung um Polypeptidketten zu entfalten und Disulfidbrücken aufzubrechen. Damit eine klare Auflösung der Punkte gewährleistet ist, muss anschließend im zweiten Schritt überschüssiges DTT durch Iodacetamid (25 mg/ml) in Equilibrierlösung entfernt werden. Nachdem die equilibrierten Streifen horizontal auf die SDS-Gele aufgebracht worden sind, wird der Gellauf in normalem Standart Laemmli Puffer (Laemmli, 1970) bei 15 Watt pro Streifen durchgeführt.

5.3.8 Silberfärbung

2D Gele werden über Nacht bei 4°C in 30% EtOH/10% Essigsäure fixiert. Um die Gele für die Färbung zu sensitivieren, werden sie für 30 Minuten mit 0,3% w/v Kalium Tetrathionat, 0,5 M Kalium Acetat and 30% EtOH bei leichtem Schwenken behandelt. Anschließend erfolgt ein extensives Waschen für je 10 Minuten durch sechsmaliges Austauschen von H_2O, bevor die Gele in 2 mg/ml Silbernitrat in H_2O für 2 Stunden gefärbt werden. Um die Proteinpunkte innerhalb des Gels sichtbar zu machen, werden die Gele nach der Färbung kurz für 15 Sekunden mit Wasser gewaschen und für bis zu 30 Minuten in Entwicklungslösung (0,2 M Kaliumcarbonat, 1,25% Natrium-Thiosulfat, 0,01% Formaldehyd) geschwenkt. Die Dauer der Entwicklung richtet sich vor allem nach der entstehenden Hintergrundfärbung. Nachdem die gewünschte Färbeintensität erreicht worden ist, kann die Entwicklungsreaktion mit Tris/Essigsäure abgestoppt werden. Zum vollständigen Abstoppen der Reaktion sollten die Gele für 45 Minuten in dieser Lösung verweilen. Anschließend werden die Gele erneut 2 Mal für 30 Minuten mit H_20 gewaschen und können dann für wenige Tage in 30% EtOH/2% Glycerin Lösung bei 4°C aufbewahrt werden. Differenziell exprimierte Proteine können dann aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch analysiert werden.

5.3.9 Proteinverdau zur Vorbereitung der Maldi-MS-Sequenzierung

Differenziell exprimierte/sezernierte Proteine werden unter Einhaltung höchster Sauberkeit und vor dem Schutz von Keratinen (Handschuhe und Haarschutzhauben) mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel ausgeschnitten. Um das Gelstückchen, welches das zu analysierende Protein enthält, zu waschen und von anorganischen Bestandteilen aus der

Silberfärbung zu befreien, wird es für 5 Minuten bei 42°C im Thermomixer bei 600 rpm inkubiert und anschließen mit 100 µl Acetonitril/H_20 1:1 versetzt. Während der fünfminütigen Inkubation in Acetonitril bei 42°C, 600 rpm schrumpft das Gel, da ihm Wasser entzogen wird. Sekundärstrukturen innerhalb des Proteins werden durch Reduktion der Disulfidbrücken aufgebrochen, indem das Gelstücken für 1 Stunde bei 56°C in 10 mM DTT/40mM Bicarbonat inkubiert wird. Durch einen Waschschritt mit 100 µl H_2O für 5 Minuten wird überschüssiges DTT entfernt. Die anschließende Alkylierung des Proteins in 55 mM Iodacetamid in 40 mM Bicarbonat bei 25°C für 30 Minuten verhindert eine erneute Ausbildung der Sekundätstruktur. Es folgen 5 Waschschritte von je 5 Minuten bei 42°C und 600 rpm mit abwechselnd je 100 µl Bicarbonat und 100 µl EtOH. Da EtOH aktivitätsreduziernd auf Trypsin wirkt, wird der letzte Waschschritt mit Acetonitril durchgeführt. Das Gelstückchen wird dann für 15 Minuten bei RT getrocknet und mit 0,5 µg/µl Trypsin (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin) in 1 mM HCl bedeckt. Durch eine Inkubation von 15 Minuten bei 37°C wird das Protein im Gelstückchen zwischen Lysin und Arginin zu 8-9 Aminosäuren langen Peptidfragmenten verdaut, die aus dem Gel in die Lösung diffundieren. Die entstandenen Peptidfragmente werden dann in der Abteilung Proteinanalytik im DKFZ massenspektrometrisch analysiert.

5.3.10 Matrixunterstützte-Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Bei der matrixunterstützten Laserdesorptions-Massenspektrometrie wird die zu analysierende Substanz (Peptide oder Proteine) mit einem großen Überschuss an Matrixsubstanz gelöst und durch das Verdampfen des Lösungsmittels auf einem Probenträger kokristallisiert (Westman *et al.,* 1998). Nach dem Trocknen wird die feinkristalline Oberfläche mit einem UV-Laser beschossen. Dabei entstehen einfach, bei größeren Molekülen auch mehrfach, geladene Ionen. Der Beschuss der Kokristalle verursacht die Desorption der Matrix und der Untersuchungssubstanz. Die UV-absorbierenden Matrixmoleküle nehmen dabei den größten Teil der Laserenergie auf, wobei Radikalionen entstehen. In der Gasphase übertragen die Matrixionen ein Proton auf eine Akzeptorgruppe der Untersuchungssubstanz, die dabei ebenfalls ionisiert wird (Dey und Grotemeyer 1995). Die Ionen werden gegen ein Gitter beschleunigt und ihre

Flugzeit in einem feldfreien Flugrohr gemessen. Aufgrund der unterschiedlichen Flugzeit können die Ionen getrennt und analysiert werden.

5.4.1 Histologische Methoden

5.4.1 Chemikalien bzw. Geräte/Materialien und Bezugsquellen für histologische Methoden

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
Aceton	Fisher Scientific, Schwerte
Bisbenzimid H33342 Fluorochrom	Calbiochem, USA
Eosin	Merck, Darmstadt
In situ Cell Death Detection Kit	Roche, Mannheim
Fluoreszin 12-dUTP	Fermentas, St. Leon-Rot
Mayer's Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Terminale Deoxynukcleotidyltransferase (TdT)	Fermentas, St- Leon-Rot
Trypsin (Protein-Verdau)	Promega, Mannheim
Tween 20	Fluka Chemicals, Schweiz
Antikörper	
Esel anti-Ziege Alexa488	Invitrogen, Karlsruhe
Esel anti-Ziege Cy3	Dianova, Hamburg
Esel anti-Meerschwein Cy2	Dianova, Hamburg
Esel anti-Schaaf Alexa 555	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Maus Alexa488	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Maus Cy3	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Kaninchen Cy2	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen Cy3	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Ratte Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Ratte Cy3	Dianova, Hamburg
Kaninchen polyklonal anti-Gro-1	Abcam, Cambridge, UK
Meerschwein polyklonal anti-mVimentin	ProGen, Heidelberg
Schaf polyklonal anti-Digoxigenin	Roche, Mannheim
Maus monolonal anti-hK10	Chemicon, Hampshire, UK
Maus monoklonal anti-hInvolucrin	Sigma, Deishofen

Kaninchen polyklonal anti-m/hFilaggrin	Abcam, Cambridge, UK
Maus monoklonal anti-hK1/10 (Klon K8.60)	Sigma, Deishofen
Ziege polyklonal anti-m/hBMP-4	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege polyklonal anti-hBMPR-II	R&D Systems, Wiesbaden
Kaninchen polyklonal anti-hLoricrin	Convance, Denver, USA
Kaninchen polyklonal anti-PEDF	Upstate, Dundee, UK
Geräte und Materialien	
Einbettungsmaschine Tissue Tek TES	Vogel, Giessen
Fettstift	Kisker-Biotech, Mühlhausen
Hell-Dunkelfeld Mikroskop	Leica, Bensheim
Microtom RM 2155	Leica, Bensheim
MOM Immunodetektionskit	Laboratories, Burkingame, USA
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen

5.4.2 Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Zur Herstellung von Gewebeschnitten werden die Paraffinblöcke in die Halterung eines Mikrotoms (RM 2155, Leica) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es werden dann Schnitte von 6 µm angefertigt, die in einem 42°C Wasserbad geglättet und auf silanisierte Objektträger transferiert werden. Die Objektträger werden dann über Nacht bei 42°C getrocknet bevor sie zur Aufbewahrung bei 4°C gelagert werden.

5.4.3 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Diese histologische Färbung basiert auf der Oxidation von Hämatoxylin zu dem blauen Farbstoff Hämatein. Dieser Farbstoff ist in der Lage mit Aluminiumionen positiv geladene Komplexe zu bilden, die ihrerseits mit basophilen Strukturen, wie den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern, interagieren. Azidophile Zell- und Gewebestrukturen wie das Zytoplasma oder Interzellularsubstanzen werden rot gefärbt. Zum Anfärben von Gewebe auf einem Objektträger, auch nach einer radioaktiven *in situ* Hybridisierung, müssen die Schnitte in wässriger Umgebung vorliegen. Paraffinschnitte werden dazu durch zweimalige Behandlung mit Xylol für je 10 Minuten und einer absteigenden Alkoholreihe bis 30% EtOH entparaffiniert und rehydriert. Die Schnitte werden dann 8 Minuten in Hämatoxylin gefärbt, zweimal für 2

Minuten mit H_2O gewaschen, für 20 Sekunden in 70%EtOH/0,05% HCl getaucht und dann erneut für 10 Minuten mit H_2O gewaschen. Anschließend erfolgt die Färbung in Eosin für 20 Sekunden. Die Schnitte werden dann entwässert, indem sie kurz in 70%, 90% und 100% EtOH gedippt werden, bevor sie zweimal für 2 Minuten mit Xylol behandelt werden. Nachdem die Schnitte getrocknet sind, werden sie in Entellan eingedeckelt.

5.4.4 Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen innerhalb eines Gewebes werden Paraffinschnitte durch zweimalige Behandlung mit Xylol für 10 Minuten und eine absteigende Ethanolreihe für je 2 Minuten entparaffiniert und rehydriert. Zum Demaskieren des Antigens werden Paraffinschnitte für 20 Minuten in kochendem 0,01 M Natriumzitrat-Puffer pH 6,0 inkubiert und dann für 5 Minuten in PBS überführt. Die bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte werden bei Raumtemperatur aufgetaut und je nach Antikörper in 4% PFA für 20 Minuten oder in eiskaltem Aceton für 10 Minuten fixiert. „feeder layer“ Cokulturen werden für die indirekte Immunfluoreszenz auf Objektträger angesetzt und nach zweimaligem Waschen in PBS für 5 Minuten in 4°C kalte 80%-igem Methanol und 2-minütige Behandlung von -20°C kaltem Aceton fixiert. Danach werden die Objektträger 10 Minuten in PBS gewaschen und die Schnitte mit einem Fettstift (Pap Pen) umkringelt. Vor der Inkubation des primären Antikörpers werden die Schnitte für 30 Minuten mit Blockierlösung benetzt (1% BSA in PBS/0,5% Tween 20; Ausnahme Cokulturen: 2% BSA in PBS/0,5% Tween 20). Die Primärantikörper werden in Blockierlösung verdünnt auf die Schnitte gegeben und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur (Ki67 und K1/10 bei 37°C) inkubiert. Damit das Austrocknen der Schnitte verhindert wird, finden die Inkubationsschritte alle in einer feuchten Kammer statt. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit PBS wird der sekundäre Fluorochrom-gekoppelte Antikörper, der gegen die Herkunftsspezies des primären Antikörpers gerichtet ist, für eine weitere Stunde im Dunkeln inkubiert. Zum Färben der Zellkerne wird der Sekundärantikörper (1:500) zusammen mit Hoechst-Farbstoff (1:1000) in Blockierlösung verdünnt. Vor dem Eindecken der Schnitte mit dem Einbettmedium Mowiol, werden die Schnitte drei Mal für 5 Minuten im Dunkeln mit

PBS gewaschen. Bis zur Auswertung werden die Präparate im Dunklen bei 4°C aufbewahrt, damit das Ausbleichen des Fluorochroms verhindert.

6 Ergebnisse

Die interzelluläre Kommunikation zwischen Fibroblasten und Keratinozyten spielt eine wichtige Rolle für das Verhalten epidermaler Zellen während der Wundheilung. Im Wundheilungsmodell der organotypischen Cokulturen, die ein etabliertes Hautäquivalent darstellen (Bell *et al.,* 1981; Mackenzie und Fusenig, 1983), wird diese Interaktion durch die Sekretion von Interleukin-1 (IL-1) aus Keratinozyten initiiert (Maas-Szabowski *et al.,* 1999). In organotypischen Cokulturen mit c-Jun-defizienten Fibroblasten entsteht ein stark reduziertes Epithel. Dies kann auf die Abwesenheit von Jun-abhängigen dermalen Faktoren, darunter KGF, GM-CSF, Gro-1, HGF, SDF-1 und PTN zurückgeführt werden, die einen mitogenen Effekt auf epidermale Keratinozyten haben (Szabowski *et al.*, 2000; Florin *et al.,* 2004; Szabowski persönliche Mitteilung), während GM-CSF zusätzlich auch die terminale Differenzierung beeinflusst (Szabowski *et al.,* 2000). Interessanterweise reagieren Keratinozyten in Cokultur mit Fibroblasten, deren JNK-Aktivität durch homologe Rekombination gestört ist, anders als in Cokultur mit c-Jun-defizienten Fibroblasten. In „feeder layer" Cokulturen stratifizieren Keratinozyten, die zusammen mit *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten kultiviert werden, nicht mehr und zeigen eine starke Hyperproliferation (Abb. 6). Es wird deutlich, dass in diesen Kulturen die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung zugunsten der Proliferation verschoben ist. In organotypischen Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten ist die Expression der frühen Differenzierungsmarker K1/10 verspätet und reduziert. Das deutet darauf hin, dass der Eintritt in die Differenzierung nicht effizient ist und das Differenzierungsprogramm aufgrund mindestens eines Faktors, dessen Expression direkt oder indirekt durch JNK reguliert wird, nicht vervollständigt werden kann (Szabowski persönliche Mitteilung).

6.1 Experimentelle Bedingungen zum Nachweis sezernierter Proteine in konditionierten Medium

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung JNK-abhängiger und von Fibroblasten sezernierter Faktoren, die den Eintritt von Keratinozyten in die terminale Differenzierung regulieren. Mit Hilfe einer Proteom-Analyse, bei der das unterschiedliche Expressionsprofil sezernierter Proteine von Wildtyp- und JNK-

defizienten Fibroblasten mittels 2D Gelelektrophorese verglichen wurde, konnte die Anzahl potentieller Kandidatengene im Vergleich zu genomweiten Expressionsanalysen, wie der „Micro-Array"-Analyse, reduziert werden. Durch Supplementierung von konditioniertem Monokultur-Medium von Wildtyp-Fibroblasten zu JNK-Cokulturen und umgekehrt konditioniertem Monokultur-Medium von JNK-defizienten Fibroblasten zu Wildtyp-Cokulturen, sollte herausgefunden werden, ob Fibroblasten die Faktoren auch in Abwesenheit von Keratinozyten exprimieren oder ob ausschließlich das Cokultur-Medium die biologische Aktivität zur Induktion der terminalen Differenzierung von Keratinozyten enthält. Außerdem diente der Versuch der Aufklärung, ob Wildtyp-Fibroblasten eine aktivierende biologische Aktivität produzieren oder von JNK-defizienten Fibroblasten eine reprimierende Aktivität sezerniert wird, die die Differenzierung verhindert. In Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten führte die Addition von Monokultur-Medium von Wildtyp-Fibroblasten zu einer normalen Stratifizierung und einer reduzierten Proliferation (Abb. 6).

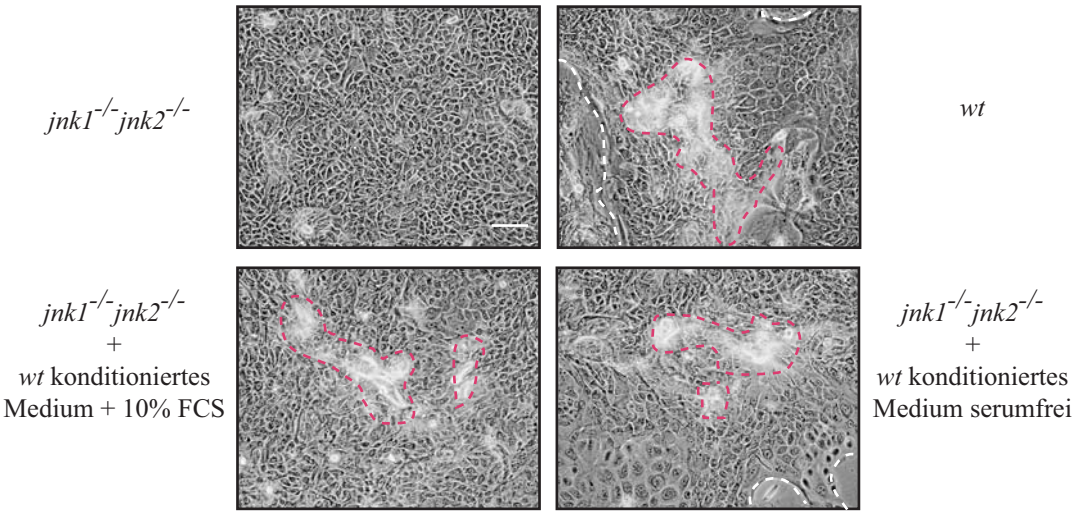

Abb. 6 **Die Faktoren, die die Stratifizierung einleiten, werden unter serumfreien Kulturbedingungen sezerniert.** 36 Stunden konditioniertes, serumfreies Medium von Wildtyp-Fibroblasten wurde durch eine Membran mit einer molekularen Ausschlussporengröße von 10 kDa mit Hilfe einer Rührzelle ultrafiltriert und somit ca. 100-fach aufkonzentriert. Die biologische Aktivität dieses serumfreien, aufkonzentrierten Mediums von *wt*-Fibroblasten, wurde mit der biologischen Aktivität von serumhaltigem nicht aufkonzentriertem Medium von *wt*-Fibroblasten in „feeder layer" JNK-Cokulturen bestimmt. Die weiße gestrichelte Linie

repräsentiert die Keratinozyteninsel, die rote gestrichelte Linie markiert die stratifizierten Bereiche. Balken entspricht 100 µm.

Das verdeutlicht, dass auch Fibroblasten in Abwesenheit von Keratinozyten die JNK-abhängigen, aktivierenden Faktoren exprimieren. Somit konnte für die Identifizierung der Faktoren Monokultur-Medium von Wildtyp-Fibroblasten genutzt werden, das in größeren Mengen verfügbar ist.

Das Mengenverhältnis von BSA, dem Hauptproteinbestandteil von Serum, zu löslichen Proteinen ist in konditioniertem, serumhaltigem Medium zu ungünstig, um lösliche Proteine mittels 2D Gelelektrophorese aufzutrennen. Da auch synthetisches Medium proportional zu viel BSA enthält, wurde überprüft, ob die Faktoren auch unter serumfreien Kulturbedingungen von Fibroblasten exprimiert und sezerniert werden. Im Vergleich zu serumhaltigem Medium stellt serumfreies konditioniertes Medium von Wildtyp-Fibroblasten im Cokultur-System den Eintritt in die Differenzierung und die Proliferationskontrolle nicht wieder her (Daten nicht gezeigt). Durch Konzentration (ca. 100-fach) der sezernierten Proteine in serumfreiem konditioniertem Medium von Wildtyp-Fibroblasten mittels Ultrafiltration konnte die biologische Aktivität jedoch wiederhergestellt werden (Abb. 6). Da der Grad der Anreicherung der Proteine in konditioniertem Medium aber nicht ausreichend war, um die Faktoren im SDS-Gel durch Silberfärbung nachzuweisen, wurde anstelle der Ultrafiltration die größtmögliche Konzentration der Proteine durch Fällung erreicht, wodurch der Nachweis sezernierter Proteine im SDS-Gel mittels Silberfärbung möglich wurde (Abb. 7). Die Ergebnisse zeigen, dass Fibroblasten die Faktoren auch in Abwesenheit von Keratinozyten sezernieren. Unter serumfreien Kulturbedingungen werden die Faktoren in geringeren Mengen als unter serumhaltigen Bedingungen exprimiert. Durch Konzentrierung der sezernierten Proteine kann jedoch die biologische Aktivität in serumfreiem Medium wiederhergestellt werden, wobei der Nachweis von sezernierten Proteinen mittels Silberfärbung nur nach weiterer Konzentrierung durch Fällung möglich ist.

6.2 Identifizierung JNK-abhängiger, sezernierter Proteine

Die Auftrennung sezernierter Proteine in konditioniertem Medium durch 2D Gelelektrophorese resultierte in mehreren hundert Proteinen (Abb. 7A). Der manuelle

Vergleich der Proteinmuster von konditioniertem Medium von Wildtyp- und JNK-defizienten Fibroblasten machte Unterschiede in der Expression bzw. Sekretion beider Genotypen deutlich.

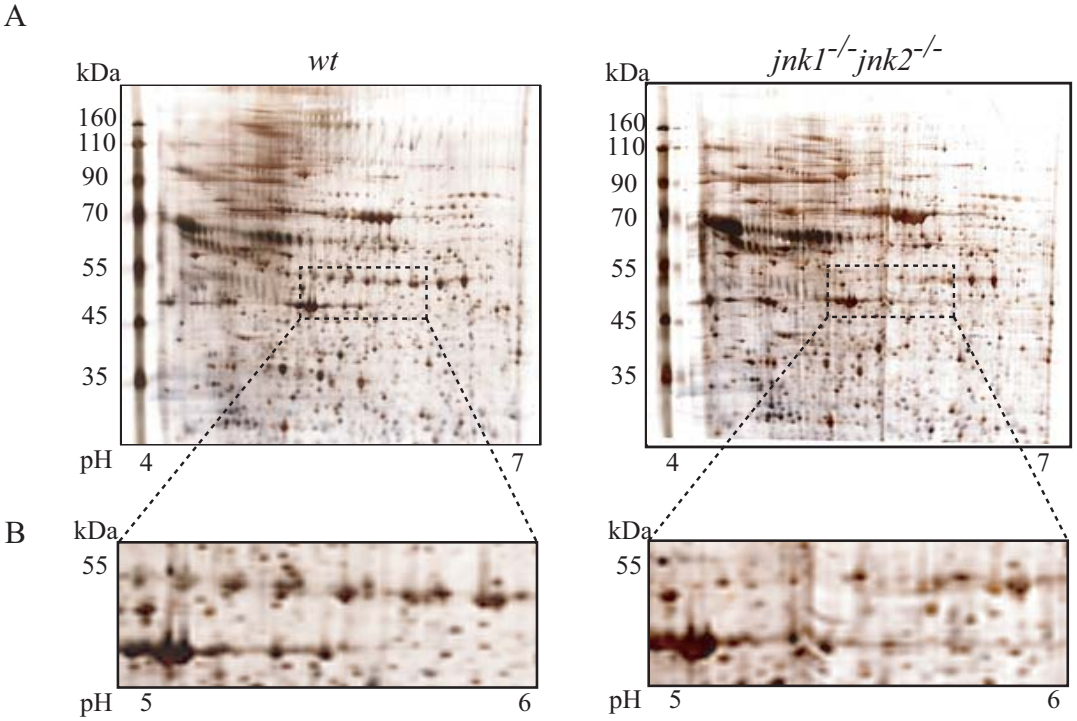

Abb. 7 **Genotypabhängige Unterschiede in 2D Gelen von aufgetrennten sezernierten Proteinen in konditioniertem Medium von Wildtyp und JNK-defizienten Fibroblasten.** 2D Gele von Proteinen in konditioniertem Medium von *wt*- und *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten. Die sezernierten Proteine in 36 Stunden konditioniertem Medium wurden durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) ungefähr 500-fach konzentriert. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem IPGphor (Amersham) auf 18 cm langen IPG-Streifen mit einem pH-Gradient von pH 4-7 durchgeführt. Die 2. Dimension erfolgte in 12,5%-igen SDS-Gelen. Differenziell exprimierte bzw. sezernierte Proteine, die in *wt*- jedoch nicht in *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten konditioniertem Medium auftraten, wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (A). Vergrößerung des 2D Gels im Bereichs von 50 kDa und pH 5-6 (B).

Besonders im Bereich von 50 kDa und einem pH-Bereich zwischen fünf und sechs konnten fünf „spots“ identifiziert werden, die differenziell nur von Wildtyp-Fibroblasten exprimiert wurden (Abb. 7B). Die Sequenzierung dieser differenziell exprimierten/sezernierten Proteine mit der MALDI-Tof massenspektrometrischen

Fingerabdruck Analyse identifizierte die fünf „spots“ mit gleichem Molekulargewicht jedoch unterschiedlichem isolektrischen Punkt als Isoformen des „pigment epithelial derived factor“ (PEDF) (Abb. 7C). Des Weiteren wurden „bone morphogenetic protein 4“ (BMP-4) und „collagen I alpha II“ (ColIαII) als JNK-abhängige extrazelluläre Proteine, ein unbekanntes Protein sowie intrazelluläre Proteine identifiziert. Bei den identifizierten intrazellulären Proteinen handelt es sich jedoch um Verunreinigungen, die vermutlich durch Zelllyse aufgrund der serumfreien Kulturbedingungen ins konditionierte Medium gelangt sind (Tab 1).

Tabelle 1: Differenziell sezernierte Proteine, die nicht von *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten exprimiert werden

Name	*Abkürzung*	*GeneID*
Pigment epithelium derived factor	Pedf	Mm.2044
Bone morphogenetic protein 4	Bmp-4	Mm.6813
Procollagen, typeI, alpha II	Col1aII	Mm.277792
Branched chain aminotransferase 1	Bcat1	Mm.4606
Eukaryotic translation elongation factor 2	Eef-2	Mm.326799
Riken cDNA	2310057D15	Mm.11311

Sequenz-Analysen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) der Riken mRNA-Sequenz (2310057D15Rik) klärte die Homologie zu dem metabolischen bifunktionalen Enolase/Phosphatase Enzym E-1 auf, das bereits als Zielgen von JNK2 identifiziert worden ist (Potapova *et al.,* 2002). Da aus Mediumtransfer-Versuchen (Abb. 6) jedoch bekannt war, dass es sich bei den „keratinocyte commitment factors“ um lösliche extrazelluläre Proteine handelt, lag der Fokus bei allen anschließenden Untersuchungen auf den beiden extrazellulären Proteinen PEDF und BMP-4. Die hochauflösende 2D Gelelektrophorese ist somit eine geeignete Methode, um genotypabhängig differenziell sezernierte Proteine in konditioniertem Medium zu identifizieren.

6.3 Charakterisierung der Expression von PEDF und BMP-4

Um die differenzielle Expression von PEDF und BMP-4 in JNK-defizienten Fibroblasten quantitativ zu bestimmen, wurde die Anwesenheit beider Faktoren in konditioniertem und aufkonzentriertem Monokultur-Medium von Wildtyp- und *jnk1*$^{-/-}$

jnk2$^{-/-}$-Fibroblasten mittels der „Western Blot“ Methode untersucht (Abb. 8A). Gro-1, ein von JNK unabhängig exprimiertes Protein (J. Lorenz, 2004), diente als Ladekontrolle für gleiche Gesamt-Protein-Mengen. PEDF und BMP-4 konnten in konditioniertem Medium von *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten nicht nachgewiesen werden, wodurch die JNK-abhängige Expression von PEDF und BMP-4 bestätigt wurde. Eine „Western Blot“ Analyse des 2D Gels mit einem PEDF-spezifischen Antikörper detektierte fünf verschiedene Proteine, die alle im Bereich von 50 kDa lagen aber unterschiedliche pI aufwiesen (Abb. 8B). Somit verifiziert der „Western Blot“ die Ergebnisse der MALDI-Sequenzierung und bestätigt das Vorkommen verschiedener Isoformen von PEDF.

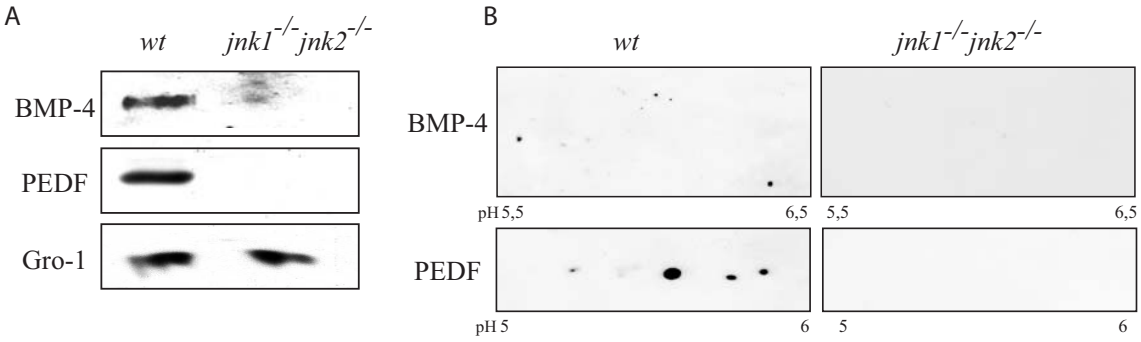

Abb. 8 **PEDF und BMP-4 werden nicht von JNK-defizienten Fibroblasten sezerniert.** Die JNK-abhängige Expression von PEDF (50 kDa) und BMP-4 (BMP-4 Proform 45 kDa) wurde durch „Western Blot“ Analyse von 36 Stunden konditioniertem Medium von Wildtyp- und JNK-Fibroblasten Monokultur bestätigt. Als interner Standard zur Überprüfung gleicher geladener Protein-Mengen diente die Expression des JNK-unabhängigen Proteins Gro-1 (A) „Western Blot“ des 2D Gels mit 250 µg Gesamt-Protein aus Zellüberständen und Behandlung mit PEDF und BMP-4-spezifischem Antikörpern machte Isoformen von PEDF nd BMP-4 sichtbar (B).

Da eine differentielle Regulation auf Protein-Ebene in konditioniertem Medium aufgrund unterschiedlicher Stabilitäten bzw. unterschiedlicher Sekretion von Proteinen nicht unbedingt die Situation auf RNA-Ebene widerspiegeln muss, wurde die Expression von *pedf* und *bmp-4* in Wildtyp-, *c-jun*$^{-/-}$- und *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten mittels der RT-PCR Methode mit sequenzspezifischen Primern analysiert (Abb. 9). Als interner Standard zur Verwendung gleicher c-DNA-Mengen aus beiden Genotypen wurde die c-DNA Menge über die Expression des

„housekeeping“ Gens *hprt* abgeglichen, das nicht durch JNK reguliert wird. Sowohl *pedf* als auch *bmp-4* werden im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten in JNK-defizienten Fibroblasten stark verringert exprimiert, wodurch die JNK-abhängige Expression von *pedf* und *bmp-4* verifiziert wird. Beide Faktoren werden in *c-jun*$^{-/-}$ Fibroblasten auf Wildtyp-Niveau exprimiert, was auf eine c-Jun-unabhängige Expression beider Faktoren hinweist.

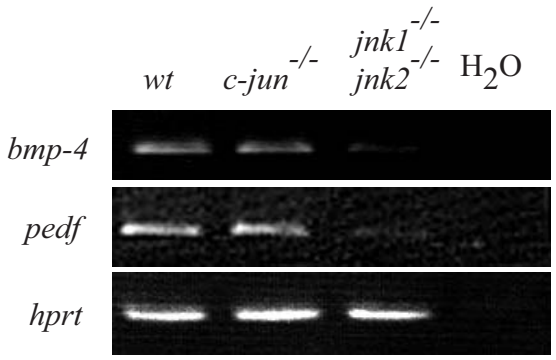

Abb. 9 **Die verminderte Expression von *pedf* und *bmp-4* in JNK-defizienten Fibroblasten basiert auf einer veränderten Transkription.** Die Expression von *pedf* und *bmp-4* in asynchron wachsenden *wt, c-jun*$^{-/-}$ *und jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten wurde mittels RT-PCR bestimmt. Dafür wurde die gesamte RNA aus den jeweiligen Zellen isoliert, in c-DNA umgeschrieben und das Expressionsprofil mit *pedf* und *bmp-4*- spezifischen Primern nachgewiesen. Als Kontrolle für gleiche c-DNA-Mengen diente *hprt*.

6.4 PEDF und BMP-4 werden *in vivo* von dermalen Fibroblasen exprimiert

Um den Beitrag von mesenchymalen und epithelialen Zellen zur Expression von PEDF und BMP-4 in der Haut *in vivo* zu analysieren, wurde RNA aus isolierter Dermis und Epidermis einer semi-quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen. PEDF wird ausschließlich im dermalen Kompartiment der Haut exprimiert, während BMP-4 in Epidermis und Dermis exprimiert wird (Abb. 10A). Um die genaue Lokalisation der Faktoren innerhalb der beiden Kompartimente zu bestimmen, wurde die Verteilung der RNA beider Faktoren in der Haut mittels *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 10B). Eine radioaktive Sonde für *pedf* detektierte das Transkript wie erwartet ausschließlich im dermalen Kompartiment. Coimmunfluoreszenz-Analysen gegen PEDF und gegen Vimentin, das spezifisch von Fibroblasten exprimiert wird, bestätigten die begrenzte Expression von PEDF in der Dermis und identifizierten

Fibroblasten als Hauptquelle der PEDF Expression *in vivo* (Abb. 10C). Der Nachweis der *bmp-4* Expression innerhalb der Haut erfolgte durch Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH). Parallel dazu wurden Fibroblasten wiederum durch die Färbung mit Vimentin sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass *bmp-4* nur vereinzelt von Fibroblasten exprimiert wird (Abb. 10B). Dabei befinden sich fast alle *bmp-4* exprimierenden Fibroblasten in der Nähe von Haarfollikel. In Haarfollikeln selbst wird *bmp-4* ebenfalls stark in dermalen Papillen, in der Haar Matrix sowie in proximalen „outer„ und „inner rot sheats“ exprimiert (Abb. 10B; Botchkarev *et al.*, 2001). In Keratinozyten der interfollikulären Epidermis wird *bmp-4* dagegen nur schwach exprimiert.

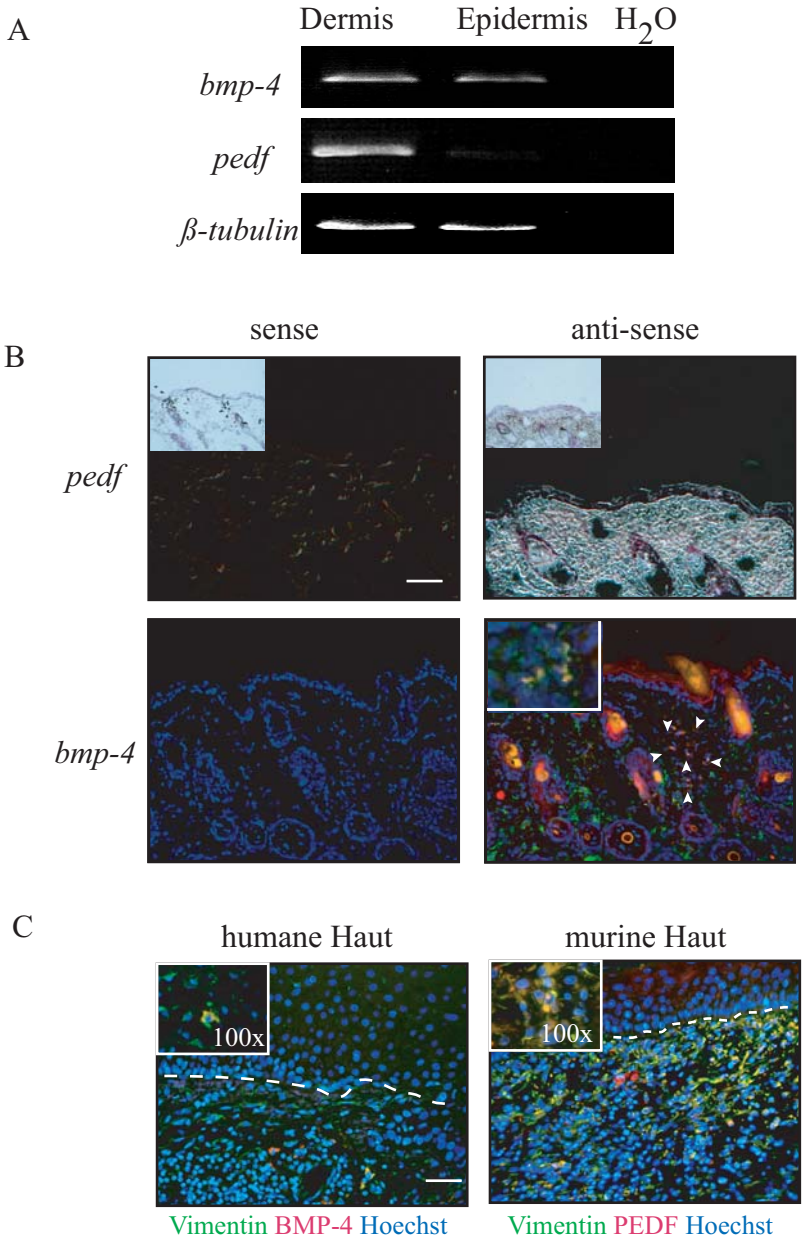

Abb. 10 **PEDF und BMP-4 werden von dermalen Fibroblasten *in vivo* exprimiert.** Durch Thermolysin-Behandlung von Schwanzhaut der Maus, wurde die Basalmembran aufgelöst, woraufhin Dermis und Epidermis mechanisch voneinander getrennt werden konnten. Die Expression von *pedf* und *bmp-4* wurde dann isoliert in Dermis und Epidermis mit RT-PCR bestimmt, wobei die c-DNA Mengen in den beiden Kompartimenten durch die Menge an *tubulin* c-DNA abgeglichen wurden (A) *In situ*-Hybridisierung diente dem Nachweis der *pedf* und *bmp-4* Expression in normaler Rückenhaut der Maus. Dafür wurde ein 492 Basenpaar langes *pedf*-spezifisches cDNA-Fragment aus dem offenen Leseraster für die Markierung mit ^{35}S-UTP eingesetzt. Die „anti-sense" Probe wurde durch SP6 *in vitro* Transkription des pGEM-T-Easy Plasmids, das die murine Seuquenz von *pedf* (Nukleotid 647-1139) enthält und durch

NcoI linearisiert wurde, hergestellt. Die Hybridisierung wurde mit der genspezifischen „anti-sense“ und der „sense“-Ribonukleotidsonde, die als negative Kontrolle diente, durchgeführt. Nach Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxylin und Eosin wurde die Schnitte unter Hell- und Dunkelfeld-Bedingungen photographisch festgehalten (Skalierung: 50 µm). Für BMP-4 wurde statt einer radioaktiven ^{35}S-UTP-markierten Sonde eine Digoxygenin-markierte RNA-Sonde eingesetzt, die im Gewebe nach Hybridisierung mit RNA durch Immunfärbung eines Digoxygenin-spezifischen Antikörpers nachgewiesen wurde. Die 262 bp lange BMP-4 „sense“ und „anti-sense“ c-RNA wurde durch *in vitro* Transkription des pGEM-T-Easy Plasmids, welches die Nukleotide 898-1160 der publizierten Maussequenz enthält, in Anwesenheit Digoxigenin-markierter dUTPs hergestellt. Der Nachweis der *bmp-4* RNA erfolgte durch einen Schaf α–DIG-spezifischen Antikörper und einen anti-Schaf Zweitantikörper, während die Lokalisation der *pedf* RNA im Gewebe durch Entwicklung mit Photoemulsionslösung sichtbar wurde (B). PEDF und BMP-4 (Protein) wurden durch Immunfluoreszenzen in muriner kryofixierter Haut (PEDF) und humaner, in Paraffin eingebetteter Haut (BMP-4) (5 µm Schnitte) analysiert. Dabei wurden der anti-PEDF-(rot) und der anti-BMP-4-Antikörper (rot) verwendet. Fibroblasten wurden gleichzeitig mit Vimentin (grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff gegengefärbt. Als Negativkontrolle wurde zur Hintergrundbestimmung nur der Sekundärantikörper eingesetzt. Balken 50 µm (C).

Da es sich bei dem zur Verfügung stehenden BMP-4 Anti-Serum um einen in der Maus generierten monoklonalen Antikörper handelt, ergab sich auf Maushaut eine starke Hintergrundfärbung, die eine eindeutige Zuordnung der exprimierenden Zellen nicht möglich machte. Deshalb fand der Nachweis des BMP-4 Proteins auf menschlicher Haut statt. Hier zeigte sich, dass parallel zum RNA Nachweis in der Maushaut BMP-4 nur vereinzelt in Fibroblasten exprimiert wird (Abb. 10C).

6.5 Expression von PEDF und BMP-4 während der Wundheilung

Da das Cokultur-Modell ein *in vitro* Wundheilungsmodell darstellt, und in diesem Modell PEDF und BMP-4 JNK-abhängig reguliert werden, sollte überprüft werden, ob sich die Expression von PEDF und BMP-4 im Verlauf der Wundheilung *in vivo* verändert. Durch Stanzwunden der Rückenhaut, die Epidermis und Dermis verletzten, wurde eine potentielle Regulation in Wunden *in vivo* untersucht. Zu unterschiedlichen Zeiten nach Verwundung wurde die Wund-RNA sowohl semi-quantitativen als auch quantitativen RT-PCR Analysen unterzogen (Abb. 11A und B). Die Transkription von *pedf* steigt im Verlauf der Wundheilung an, bis sie am siebten

Tag nach der Verwundung mit einer 15-fachen Induktion der Expression im Vergleich zu unverwundeter Haut ihr Maximum erreicht hat. Nach weiteren sieben Tagen ist die Transkription so vermindert, dass sie den Wert der basalen Expression erreicht. Ebenso wie bei *pedf* steigt auch die Expression von *bmp-4* im Verlauf der Wundheilung an und erreicht am siebten Tag der Wundheilung ihr Maximum (Abb. 11A).

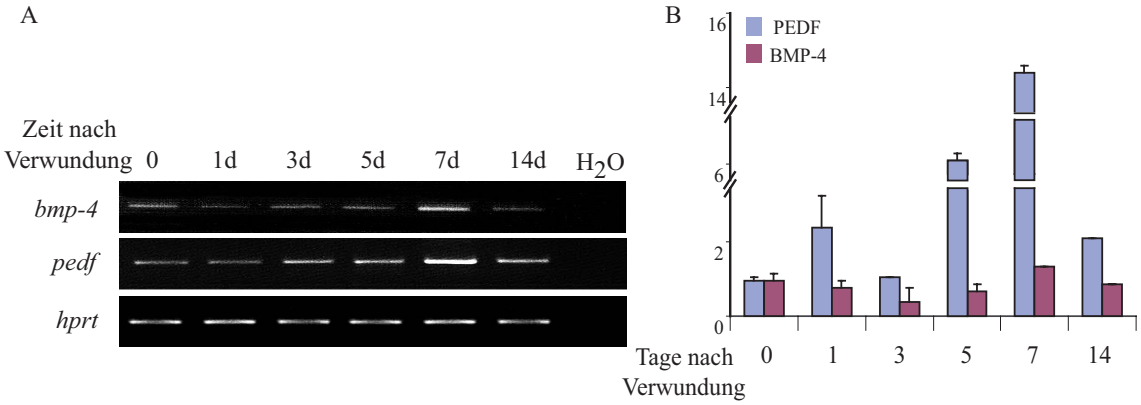

Abb. 11 **PEDF und BMP-4 werden während der Wundheilung *in vivo* reguliert.** Die Expression von *pedf* und *bmp-4* im Verlauf der Wundheilung der Haut wurde mit semi-quantitativer RT-PCR (26-28 Zyklen) (A) und quantitativer RQ-PCR (B) bestimmt. Die verwendete RNA stammte aus Rückenhautwunden der Maus, die mit Biopsiestempel gesetzt wurden. Die Mäuse wurden an den angegebenen Zeitpunkten (0, 1, 3, 5, 7 und 14 Tage) nach Verwundung getötet, die Wunde mitsamt wundangrenzendem Bereich (ca. 2 mm) präpariert und RNA isoliert. Maus-spezifische Oligonukleotid-Primer für *pedf* und *bmp-4* wurden eingesetzt um deren Expression im Verlauf der Heilung zu bestimmen. Als interner c-DNA-Standard diente murines *hprt*. Die Transkripte für PEDF und BMP-4 wurden im „Light Cycler" mit den gleichen Schmelztemperaturen der Primer wie bei der semi-quantitativen RT-PCR amplifiziert. Die x-fache Menge der Expression in Bezug auf unverwundete Rückenhaut ist aus Dreifachbestimmungen dargestellt.

Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde die genaue Lokalisation der Expression von PEDF und BMP-4 in Wunden aufgeklärt. Am siebten Tag nach Verwundung wird *pedf* stark im wundangrenzenden Bereich exprimiert, während nur eine geringe Menge an Transkript im Wundbett und unterhalb der aktivierten Keratinozyten nachgewiesen wurde (Abb. 12A). Die Intensität der *pedf* Expression im Wundbereich und im unverwundeten Bereich korreliert in umgekehrter Weise mit der Anzahl proliferierender

Keratinozyten in der Epidermis. Dies wird durch parallele Immunfluoreszenzstudien gegen das Protein Ki67, das mit der Proliferation assozziert exprimiert wird, deutlich. In dermalen Arealen unterhalb der „leading edge“ proliferierender Keratinozyten wird *pedf* vermindert exprimiert, während in unverwundeten, wundnahen Bereichen *pedf* überexprimiert wird. Die distinkte regionale Expression von *pedf* in der Wunde und den wundangrenzenden Bereichen spiegelt sich auch in der Proteinexpression von PEDF wider (Abb. 12C). *bmp-4* wird nur vereinzelt von Fibroblasten im unverwundeten Bereich exprimiert, während die Expression in Fibroblasten unterhalb des Wundrandes induziert wird (Abb. 12A). Die beobachtete Netto-Induktion der Expression *in vivo* setzt sich also aus Wundbereich und wundangrenzenden Bereichen zusammen. Die Daten demonstrieren, dass PEDF und BMP-4 *in vivo* wundregulierte Gene sind.

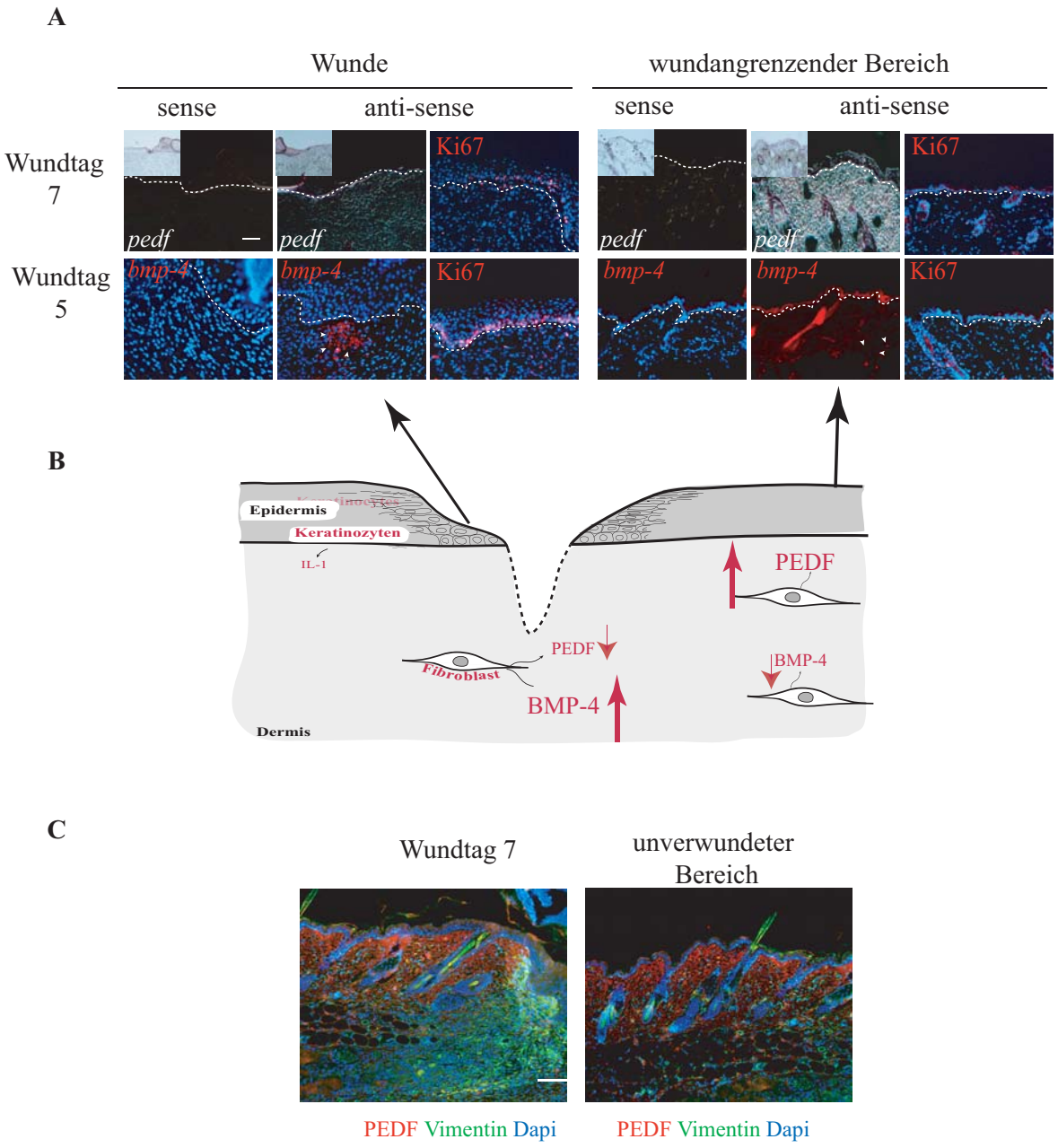

Abb. 12 **PEDF und BMP-4 weisen ein striktes spatio-temporales Expressionsmuster während der Wundheilung auf.** Die Lokalisation der *pedf* und *bmp-4* Expression in verwundeter Maushaut wurde durch *in situ*-Hybridisierung mit radioaktivmarkierter PEDF- und fluoreszenzmarkierter BMP-4 Probe ermittelt. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte im Fall von PEDF mittels H&E-Färbung, während die Zellkerne bei der BMP-4 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung durch Hoechstfarbstoff blau angefärbt wurden. Proliferierende Keratinozyten wurden in parallelen Gewebeschnitten durch eine Immunfluoreszenz-Analyse gegen das proliferationsassoziierte Protein Ki67 (rot) detektiert, wobei auch hier die Zellkerne mit Hoechstfarbstoff gegengefärbt wurden (blau). 6 µm Kryogewebeschnitte von Rückenhaut, die

am fünften bzw. siebten Tag nach Verwundung präpariert worden sind, wurden für diese Analysen eingesetzt. Balken 50 µm (A). Schemazeichnung einer Wunde mit eingezeichneter *pedf* und *bmp-4* Expression. Während am Wundrand, in der eine starke Proliferation der Keratinozyten stattfindet, *pedf* runterreguliert ist, kann im unverwundeten Bereich, in dem nur wenige homöostatische Keratinozyten proliferieren eine gesteigerte *pedf* Expression nachgewiesen werden. Für *bmp-4* kann man ein genau gegensätzliches Expressionsmuster mit einer vermehrten Expression in Fibroblasten im Wundbereich und moderater Expression im unverwundetem Bereich beobachten. Die Länge der Pfeile repräsentiert die Intensität der Expression (B). Immunfluoreszenz-Analyse von murinen Hautwunden an Tag sieben nach Verwundung. PEDF (rot), Vimentin (grün) und Kerne wurden mit Hoechst-Farbstoff gegengefärbt (blau). Balken 100 µm (C).

6.6 PEDF und BMP-4 induzieren durch eine gemeinsame Wirkungsweise eine Stratifizierung von Keratinozyten

Die stark reduzierte Expression von PEDF und BMP-4 in *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten legt die Vermutung nahe, dass der Ausfall eines oder beider Faktoren an den Veränderungen der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten in Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten beteiligt sein könnte. Daher war zu überprüfen, ob PEDF und BMP-4 die limitierenden Faktoren in der Initiierung der Differenzierung von Keratinozyten darstellen. Um den Einfluss von PEDF und BMP-4 auf das Verhalten der Keratinozyten zu untersuchen, wurde versucht, die verstärkte Proliferation und fehlende Differenzierung der Keratinozyten in „feeder layer" Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten durch Zugabe von rekombinantem PEDF und BMP-4 oder einer Kombination beider Faktoren wieder herzustellen. Primäre humane Keratinozyten in Cokultur mit postmitotischen murinen *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten, die weder PEDF noch BMP-4 sezernieren, zeichnen sich durch Hyperproliferation und fehlende Differenzierung aus, während Keratinozyten auf Wildtyp-Fibroblasten klar umgrenzte, kleine runde Inseln ausbilden, die im Verlauf der Differenzierung im Inselzentrum stratifizieren (Abb. 6 und 13). Die Zugabe von nur einem der beiden Faktoren zu JNK-Cokulturen verkleinert die Inselgröße ohne die Stratifizierung einzuleiten (Abb. 13). Sowohl PEDF als auch BMP-4 reduzieren die Proliferation der Keratinozyten. Dies wurde durch Immunfluoreszenz-Analysen gegen das proliferationsassoziierte Protein Ki67 in Cokulturen nach Faktorzugabe bekräftigt

(Abb. 14A und B). Die gemeinsame Zugabe von PEDF und BMP-4 zu JNK-Cokulturen führt nicht nur zu einer verminderten Proliferation um 40%, sondern induziert gleichzeitig die Stratifizierung. Des Weiteren wird in Immunfluoreszenz-Analysen die Expression des frühen Differenzierungsmarkers K1/10 wieder hergestellt (Abb. 14). Somit werden durch gleichzeitige Zugabe von PEDF und BMP-4 die JNK-abhängigen Veränderungen der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten aufgehoben. Der Einfluss von PEDF und BMP-4 ist spezifisch, da die Zugabe des JNK-abhängigen Mitogens SDF-1 (J. Lorenz, 2004) keinen Einfluss auf die Initiierung der Differenzierung hat und kein Proliferationsanstieg zu beobachten ist.

Neutralisierung der biologischen Aktivität von PEDF und BMP-4 durch Antikörper zeigen in „feeder layer" Cokulturen komplementäre Resultate: Die Supplementierung von Cokulturen mit Wildtyp-Fibroblasten mit neutralisierenden Antikörpern gegen PEDF oder BMP-4 führt zu einer vergrößerten Inselgröße (Abb. 13). In Immunfluoreszenz-Analysen führt die Zugabe eines Antikörpers zu einer erhöhten Anzahl Ki67-positiver Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und führt zu einer Steigerung der Proliferation um 8% (anti-PEDF) bzw. 14% (anti-BMP-4) (Abb. 14A und B). Eine reduzierte K1/10 Expression in Cokulturen mit Wildtyp-Fibroblasten, denen α–PEDF bzw. α–BMP-4 supplementiert wurden, illustriert, dass die Differenzierung der Keratinozyten durch die Zugabe eines einzelnen neutralisierenden Antikörpers zwar nicht vollständig blockiert, jedoch reduziert wird. Im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Cokulturen erhöht die gleichzeitige Inhibition von PEDF und BMP-4 durch neutralisierende Antikörper, ähnlich wie die Blockierung eines einzelnen Faktors, die Proliferationsrate der Keratinozyten. Dies verdeutlicht, dass PEDF und BMP-4 in Hinsicht auf die Proliferation redundante Funktionen ausüben.

Komplementär zu der gemeinsamen Stimulation von JNK-Cokulturen mit rekombinantem PEDF und BMP-4, führt die gleichzeitige Hemmung der Faktoren mit neutralisierenden Antikörpern zu einer vollständigen Abwesenheit stratifizierter Bereiche, die im Phasenkontrast-Mikroskop sichtbar werden, und einer kompletten Blockierung der Expression von K1/10 in Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 13 und 14). Dies deutet darauf hin, dass PEDF und BMP-4 negativ auf die Proliferation von Keratinozyten wirken und gemeinsam den Eintritt in die Stratifizierung regulieren. Auch die neutralisierenden Antikörper sind spezifisch, da die Addition des

neutralisierenden Antikörpers gegen das Mitogen Gro-1 (Rennekampff *et al.,* 1997) zwar die Proliferation leicht hemmt, jedoch keinen Einfluss auf die Differenzierung ausübt. Die Resultate zeigen, dass durch eine gemeinsame Wirkung von PEDF und BMP-4 nicht nur die Proliferation gehemmt, sondern auch die Stratifizierung von Keratinozyten gefördert wird.

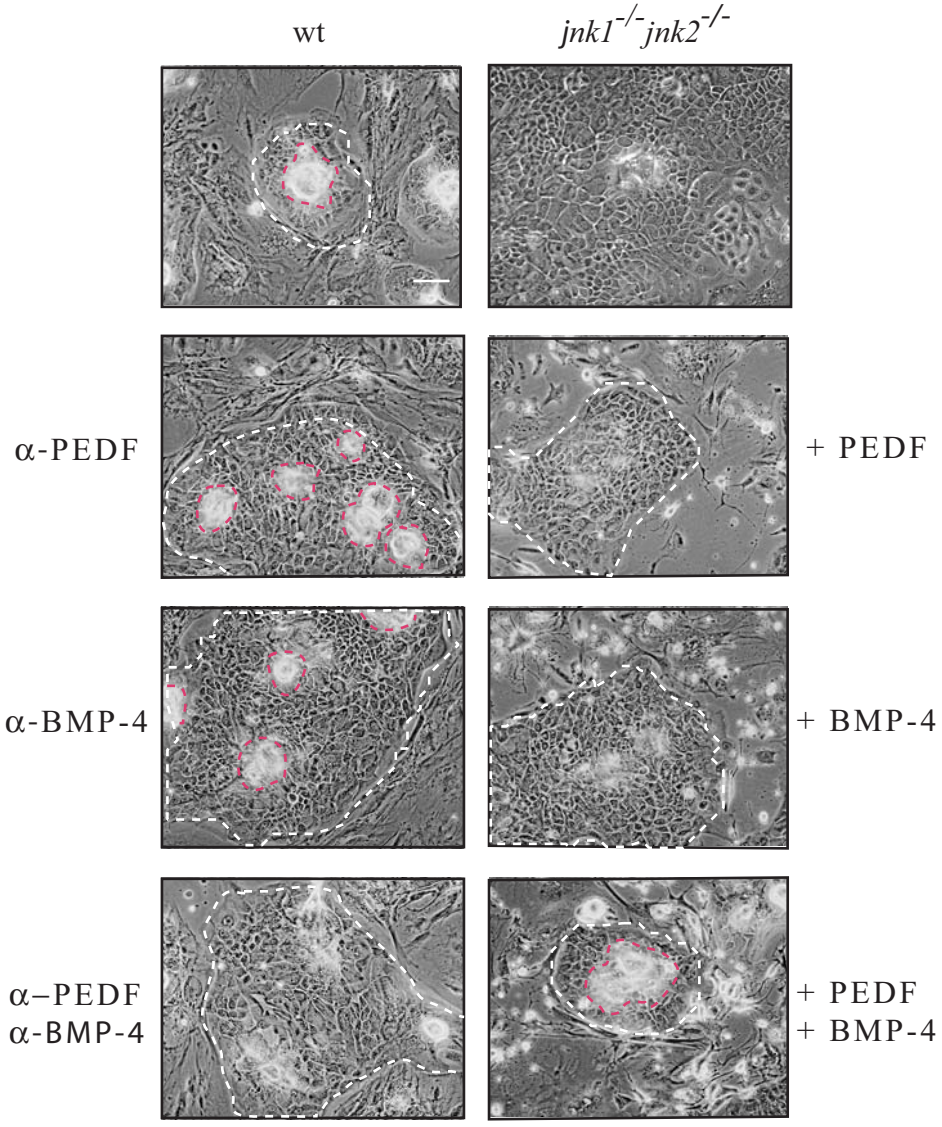

Abb. 13 **Die gemeinsame Wirkung von PEDF und BMP-4 induziert Statifizierung von Keratinozyten in „feeder layer" Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten.** Cokulturen von NEK und postmitotischen *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten wurden mit rekombinantem PEDF (100 µg/ml) bzw. BMP-4 (50 µg/ml) sowie PEDF und BMP-4 gemeinsam stimuliert. Unbehandelte Wildtyp- und JNK-Cokulturen dienten als Kontrolle. Parallel wurden die beiden Faktoren in *wt*/NEK-Cokulturen entweder einzeln oder in Kombination durch Antikörper neutralisiert (je 0,4 µg/ml). Das FAD-Medium sowie die Faktoren wurden alle zwei Tage erneuert. Nach vier

und fünf Tagen wurden die Kulturen fotografiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche einer 4 Tage alten Kultur. Die weiße gestrichelte Linie repräsentiert die Keratinozyteninsel, die rote gestrichelte Linie die stratifizierten Bereiche. Balken 100 µm.

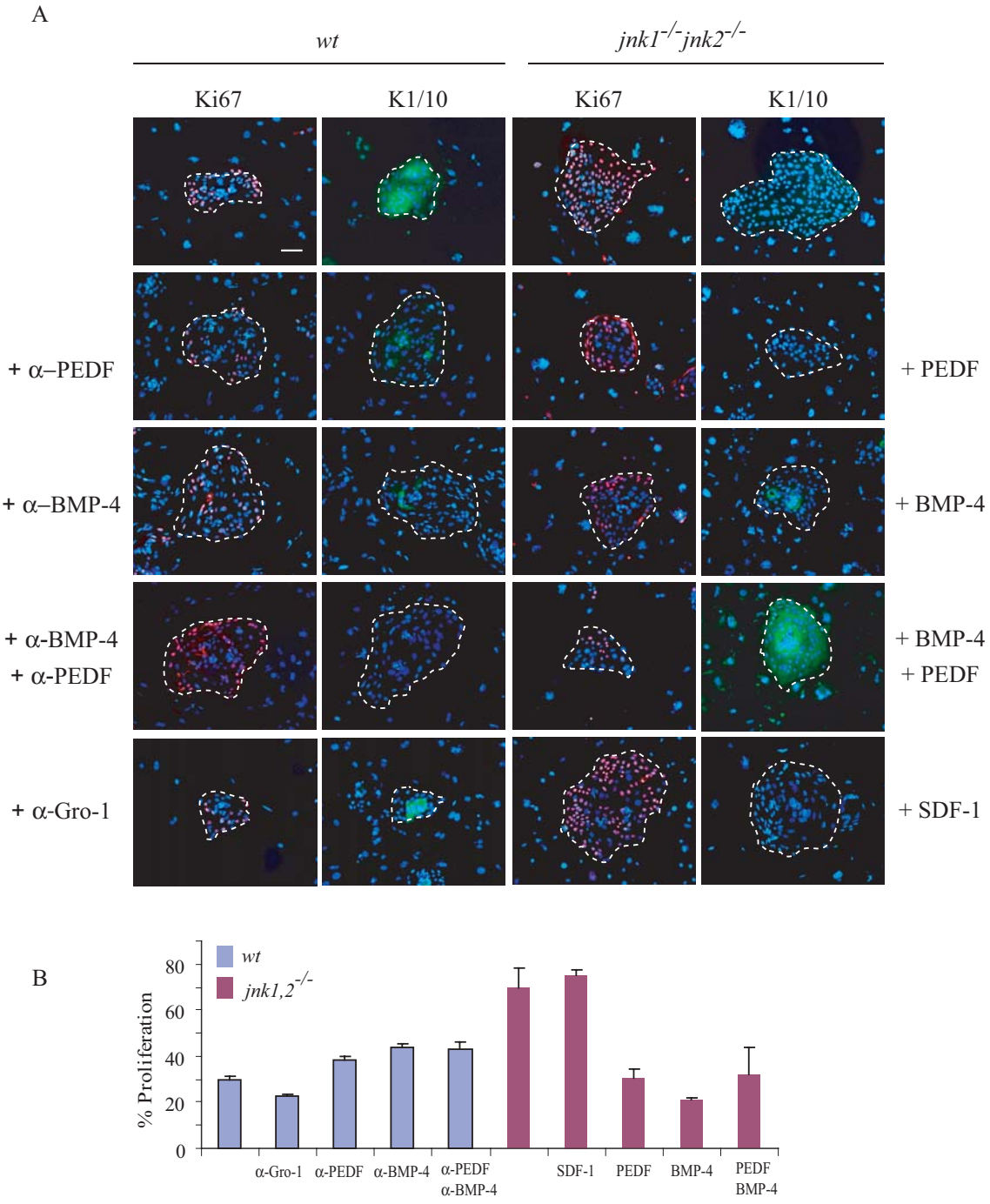

Abb. 14 **PEDF und BMP-4 haben individuell einen Effekt auf die Proliferation von Keratinozyten, während sie gemeinsam die Stratifizierung initiieren.** Humane epidermale

Keratinozyten wurden vier Tage lang zusammen mit postmitotischen Wildtyp- oder JNK-defizienten Fibroblasten kultiviert, deren Medium im Falle von JNK-Cokulturen mit PEDF bzw. BMP-4 oder beiden Faktoren supplementiert wurde. Medium von Wildtyp-Cokulturen wurde entweder neutralisierender Antikörper gegen PEDF bzw. BMP-4 oder gegen beide Faktoren zugesetzt. Während die rekombinanten Faktoren erst beim ersten Mediumwechsel nach 24-stündiger Cokultur zugesetzt wurden, wurden die neutralisierenden Antikörper gleichzeitig mit der Aussaat der Keratinozyten dem Medium zugeführt. Die Faktoren wurden alle 48 Stunden während eines Mediumwechsels neu supplementiert. Die Cokulturen wurden am dritten Tag mit MeOH/Aceton fixiert. Der Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 (rot) und des Keratinpaars K1/10, das während der frühen Phase der Differenzierung exprimiert wird, erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die weiße gestrichelte Linie repräsentiert die Keratinozyteninsel. Balken 100 µm (A). Proliferationsindex der unterschiedlich behandelten Wildtyp- und JNK-Cokulturen (B).

Um den Eintritt in die Differenzierung durch eine gemeinsame Wirkung von PEDF und BMP-4 detaillierter zu bestimmen, wurde die Expression sowohl des frühen Differenzierungsmarkers *keratin 10 (k10)* als auch des späten Differenzierungsmarkers *filaggrin* durch RT-PCR-Analysen von RNA aus Wildtyp- und JNK-Cokulturen bestimmt, die mit rekombinanten Proteinen bzw. neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Abb. 15). Die Expression sowohl von *keratin 10* als auch von *filaggrin* ist in JNK-Cokulturen im Vergleich zu Wildtyp-Cokulturen deutlich reduziert. Die gemeinsame Stimulation von JNK-Cokulturen mit PEDF und BMP-4 führt zu einer Induktion der Expression von *k10* und *filaggrin*, die dem Wildtyp-Niveau gleicht. Umgekehrt führt eine gleichzeitige Neutralisierung von PEDF und BMP-4 zu einer Reduktion der Expression von *k10* und *filaggrin* (Abb. 15). Die RT-PCR Daten bestätigen die zuvor durch Phasenkontrastmikroskopie und Immunfluoreszenz erlangten Ergebnisse, dass PEDF und BMP-4 gemeinsam die Stratifizierung epidermaler Keratinozyten und die terminale Differenzierung induzieren.

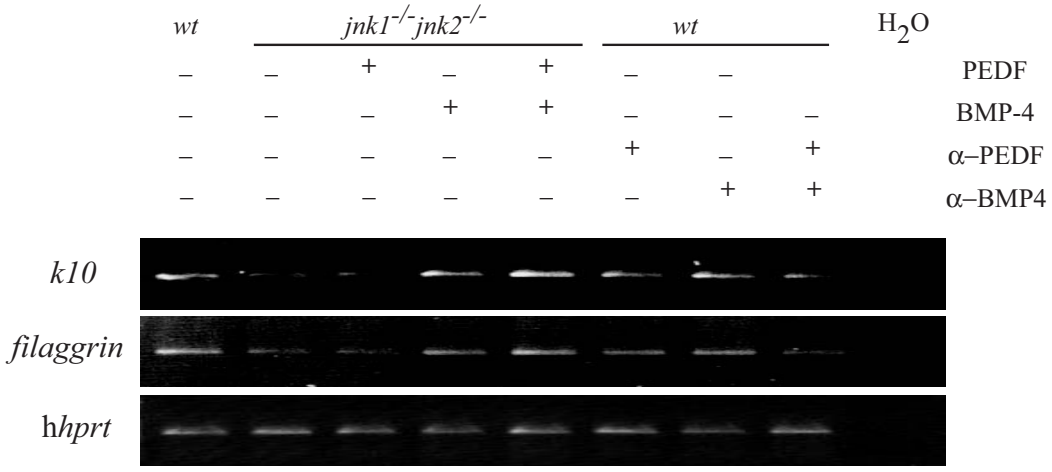

Abb. 15 **PEDF und BMP-4 induzieren gemeinsam den Eintritt in die terminale Differenzierung.** Cokulturen von Keratinozyten mit postmitotischen *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten wurden zusammen mit PEDF (100 µg/ml) bzw. BMP-4 (50 µg/ml) oder in Kombination dieser Faktoren, sowie wt/NEK Cokulturen mit den einzelnen neutralisierenden Antikörpern gegen diese Faktoren bzw. einer Kombination dieser kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte zusammen mit einer Faktor/Antikörper Supplementierung alle 48 Stunden. Nach 5 Tagen wurde die RNA isoliert und der Gehalt an *k10* und *filaggrin* mittels RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle für gleiche c-DNA-Mengen der Keratinozyten wurde der Gehalt von *hprt* mit humanspezifischen Primer bestimmt.

6.7 Eine kombinatorische Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 ist nötig, um das komplette terminale Differenzierungsprogramm in Keratinozyten zu initiieren

Detaillierte Differenzierungsvorgänge während der Epithelialisierung lassen sich in organotypischen Cokulturen unter physiologischen Bedingungen (balancierte Proliferation und Differenzierung) studieren. Die primären humanen Keratinozyten wachsen luftexponiert auf einer Matrix aus Kollagen Typ I, in die Fibroblasten, ähnlich wie in der natürlichen Dermis, eingebettet sind (Bell *et al.,* 1981; Stark *et al.,* 1999). Anders als in „feeder layer“ Cokulturen wird eine Schichtung der Keratinozyten in organotypischen Cokulturen bereits passiv durch die Kollagenkontraktion des dermalen Äquivalents unterstützt. Wenn immortalisierte murine Wildtyp-Fibroblasten in das Kollagengel eingebettet werden, bilden die humanen Keratinozyten nach ungefähr sieben Tagen ein dreidimensionales, gut strukturiertes Epithel aus (Abb. 5 und 16). Dieses entstandene Epithel weist die gleiche Morphologie und den gleichen

Differenzierungsstatus von menschlicher Haut auf. Werden *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten in den organotypischen Cokulturen verwendet, so sind die entstanden Epithelien mit maximal vier Zellschichten im Vergleich zu Wildtyp-Epithelien stark reduziert und die Expression sowohl des frühen Differenzierungsmarkers K1/10 als auch des späten Differenzierungsmarkers Loricrin fehlt, was auf eine völlständige Blockade des Eintritts in das Differenzierungsprogramm hinweist (Abb. 5 und 16).

Um die Funktion von PEDF und BMP-4 auf die Epithelentwicklung zu bestimmen wurden Keratinozyten mit JNK-defizienten Fibroblasten in organotypischen Cokulturen mit rekombinanten PEDF und/oder BMP-4 bzw. Cokulturen mit Wildtyp-Fibroblasten und den entsprechenden neutralisierenden Antikörpern behandelt (Abb. 16 und 17). Im Gegensatz zu „feeder layer" Cokulturen reicht die Addition eines rekombinanten Faktors in organotypischen Cokulturen mit humanen Keratinozyten und *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten aus, um die Bildung von Keratohyalingranula und eines *Stratum corneum* und somit ein differenziertes Epithel zu induzieren. Durch eine H&E-Färbung der organotypischen Kulturen wird deutlich, dass im Gegensatz zu unbehandelten Epithelien der *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$/NEK-Kulturen, die meist nur aus ein bis vier Zelllagen bestehen, die mit einem Faktor behandelten Kulturen bereits bis zu zehn Zelllagen aufweisen. Der Unterschied zwischen der reduzierten Proliferation in „feeder layer" Cokulturen nach Zugabe eines Faktoren und die gesteigerte Anzahl an Zelllagen in organotypischen Cokulturen ist dadurch zu erklären, dass die Faktoren in organotypischen Kulturen aufgrund der passiven Schichtung auf suprabasale Keratinozyten wirken können, die einen anderen Keratinozyten-Subtyp als basale Keratinozyten in „feeder layer" Cokulturen darstellen. Auffällig ist jedoch bei Epithelien von *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$/NEK-Kulturen, denen entweder PEDF oder BMP-4 zugesetzt wurde, dass im Vergleich zu Wildtyp-Epithelien das *Stratum corneum* verstärkt ausgeprägt ist und eine erhöhte Anzahl an nicht degradierten Zellkernen enthält (Parakeratose). Des Weiteren sind im *Stratum granulosum* dieser Epithelien mehr Keratohyalingranula im Vergleich zu Wildtyp-Epithelien zu beobachten. Sowohl PEDF als auch BMP-4 sind in der Lage in Epithelien von *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$/NEK-Kulturen eine schwache subrabasale K1/10 Expression und eine schwache Loricrin Expression im *Stratum granulosum* zu induzieren, die jedoch nicht dem Wildtyp-Niveau gleicht (Abb. 16). Das durch gleichzeitige Addition von PEDF und BMP-4 entstandene Epithel

von *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$/NEK-Kulturen weist ebenfalls ein ausgeprägtes *Stratum corneum* auf, das jedoch heterogen ist und in eine obere und eine untere Hälfte unterteilt werden kann. Während die obere Hälfte des *Stratum corneums* ähnlich wie bei JNK-Epithelien nach Einzelapplikation parakeratotisch ist, sind die Zellkerne in der unteren Hälfte des *Stratum corneums* bereits abgebaut. Da die Supplementierung von Wachstumsfaktoren bzw. Antikörpern zu organotypischen Kulturen erst 24 Stunden nach dem ersten Kontakt von Fibroblasten und Keratinozyten stattfindet, könnte die heterogene Ausbildung der Hornschicht darin begründet liegen. In dem durch gemeinsame Addition von PEDF und BMP-4 entstandenen Epithel entspricht die Expression früher und später Differenzierungsmarker dem Wildtyp-Epithel und übersteigt die Expressionsintensität von Epithelien, die durch Einzelapplikation von entweder PEDF oder BMP-4 entstanden sind. Somit ist die Anwesenheit von PEDF und BMP-4 hinreichend, um in Keratinozyten das Differenzierungsprogramm zu initiieren.

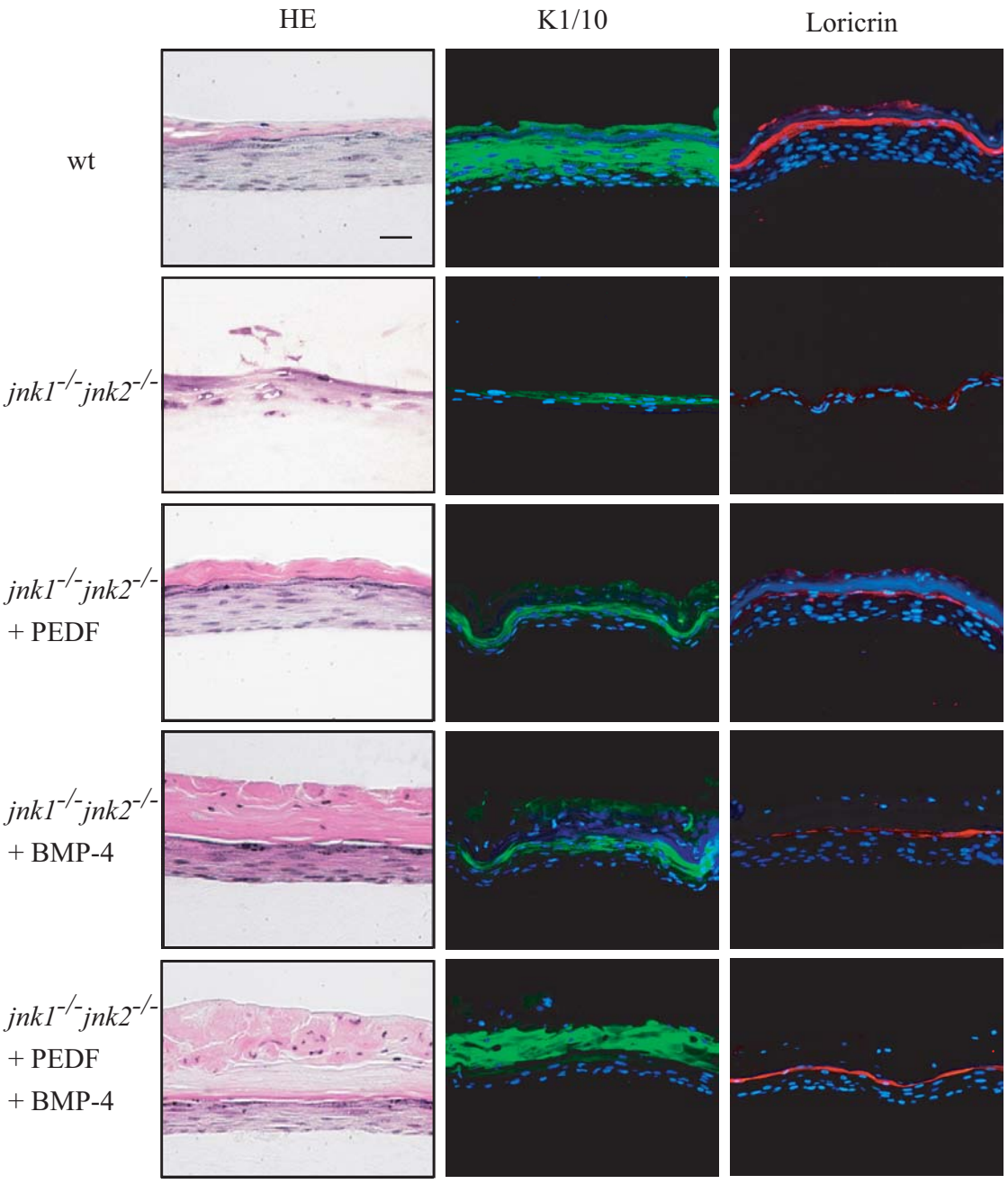

Abb. 16 **PEDF und BMP-4 sind hinreichend, um in organotypischen Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten den Eintritt in die terminale Differenzierung zu regulieren und ein mehrschichtiges normal differenziertes Epithel zu induzieren**. Primäre humane Keratinoyzten wurden luftexponiert auf Kollagengelen in einem Filter-Einsatz mit murinen *wt*- oder *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$-Fibroblasten kultiviert. Die Fibroblasten wurden unterhalb des Einsatzes ausgesät, damit sie alle 48 Stunden ausgetauscht werden können um die Zellzahl konstant zu halten. Dem Medium wurde ab Tag 1 (24 Stunden nach Aussaat der Keratinozyten) rekombinantes PEDF (100 µg/ml) oder BMP-4 (50 µg/ml) bzw. beide Faktoren gleichzeitig zugesetzt. Der Mediumwechsel und damit auch die Faktorzugabe erfolgten an Tag 1, 3, 5, 6, 7,

8, 9 und 10. Nach 11 Tagen wurden die Kulturen entnommen, die Epithelien in 4% PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinschnitte wurden mit H&E gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Keratinozytenspendern. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden Markerproteine des Differenzierungsprozesses (Keratin 1/10: grün; Loricrin: rot)) nachgewiesen Zellkerne mit Hoechst (blau) gegengefärbt. Balken 25 µm.

Um zu überprüfen, ob die Faktoren die limitierenden Komponenten zur Initiierung der Differenzierung von Keratinozyten darstellen, wurde durch Neutralisierung eines Faktors bzw. beider Faktoren die Notwendigkeit ihrer gemeinsamen Wirkungsweise bestimmt. Die Neutralisierung von entweder PEDF oder BMP-4 in organotypischen Cokulturen mit Wildtyp-Fibroblasten führt zu einem stark reduzierten Epithel, das nur aus wenigen Zelllagen besteht und keine Anzeichen von Keratohyalingranula aufweist (Abb. 17). Dieses reduzierte Epithel ähnelt histologisch dem Epithel von *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ /NEK-Kulturen. Um zu analysieren, ob die reduzierten Epithelien nach Addition neutralisierender Antikörper auf eine Blockade des Eintritts in die terminale Differenzierung zurückzuführen ist, wurden Immunfluoreszenzen gegen die Differenzierungsmarker K1/10 und Loricrin durchgeführt. In organotypischen Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten, die nur mit einem neutralisierenden Faktor behandelt wurden, wird sowohl K1/10 als auch Loricrin immer noch, wenn auch sehr schwach, exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass der Eintritt in die Differenzierung von Epithelien nach Einzelneutralisierung nicht vollständig blockiert ist. Auch die gleichzeitige Neutralisierung beider Faktoren führt zu einem reduzierten Epithel, das sich histologisch kaum von dem Epithel nach Einzelneutralisierung unterscheidet. Im Gegensatz dazu bleibt jedoch die Expression der Differenzierungsmarker K1/10 und Loricrin nach Doppelneutralisierung vollständig aus (Abb. 17). Die Expressionsanalysen in organotypischen Cokulturen bestätigen die Beobachtungen in „feeder layer“ Cokulturen, wobei eine gemeinsame Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 nötig ist um den Eintritt in die terminale Differenzierung effizient zu initiieren.
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine gemeinsame Wirkung von PEDF und BMP-4 nötig ist, um aktiv den Eintritt der Stratifizierung zu regulieren. Sobald eine Stratifizierung der Keratinozyten stattgefunden hat, unterstützen beide Faktoren eine effiziente Differenzierung.

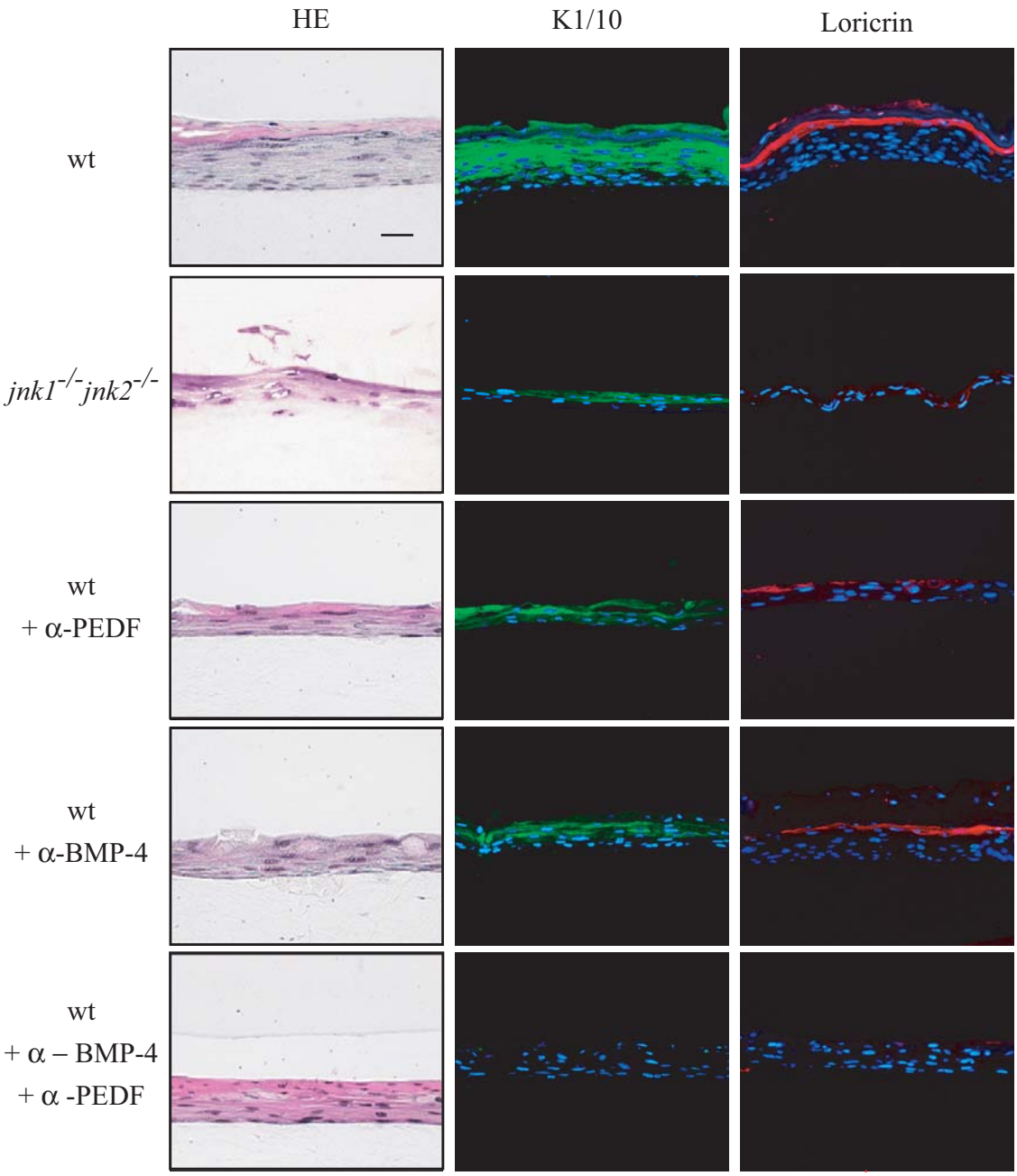

Abb. 17 **PEDF und BMP-4 sind nötig, um in organotypischen Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten den Eintritt in die terminale Differenzierung zu regulieren und ein mehrschichtiges normal differenziertes Epithel zu induzieren.** Heterologe organotypische Cokulturen wurden unter Zugabe von neutralisierenden α-PEDF und α–BMP-4 bzw. einer Kombination aus beiden Antikörpern 11 Tage kultiviert. Querschnitte wurden histologisch (H&E) gefärbt und die differenzierungsspezifischen Proteine K1/10 (grün) und Loricrin (rot) mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Die Kerne wurden mit Hoechst gegengefärbt (blau). Balken 25 µm.

7 Diskussion

7.1 PEDF und BMP-4 werden von Fibroblasten JNK-abhängig exprimiert und sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wundreguliert

Für die Entwicklung eines normalen Epithels in der Haut ist eine balancierte dermal-epidermale Interaktion essentiell, die vor allem auf der Zytokin-abhängigen Kommunikation zwischen Fibroblasten und Keratinozyten beruht. Eine funktionelle Inaktivierung von JNK1 und JNK2 in dermalen Fibroblasten führt im heterologen Cokultur System zu einer Differenzierungsblockade in Keratinozyten (Szabowski, persönliche Mitteilung). Da die ausbleibende Differenzierung in diesen Kulturen auf eine induktive Aktivität zurückzuführen ist, sollten in der vorliegenden Studie die verantwortlichen in „trans"-wirkenden JNK-abhängigen Faktoren identifiziert und funktionell charakterisiert werden.

Mit Hilfe einer Proteom-Analyse wurden die beiden löslichen JNK-abhängigen extrazellulären Faktoren PEDF und BMP-4 identifiziert. Die Suche nach diesen Faktoren in konditioniertem Medium durch den Vergleich der Muster von 2D Gelen von Wildtyp- und JNK-defizienten Fibroblasten hat gegenüber der genomweiten „Microarray"-Analyse den Vorteil, dass der Fokus nur auf lösliche, sezernierte Proteine gerichtet und somit die Anzahl potentieller Kandidaten stark eingeschränkt wird. Da die gelelektrophoretische Auftrennung und Detektion von sezernierten Proteinen durch Silberfärbung in konditioniertem Medium nur in Abwesenheit von BSA erfolgen kann, wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die im Screen identifizierten intrazellulären Proteine sind daher vermutlich durch apoptotische, lysierende Zellen ins Medium gelangt und stellen somit Kontaminationen dar, die die unerwartet hohe Anzahl an Proteinen im 2D Gel beider Genotypen erklärt. Um die Kontamination durch intrazelluläre Proteine möglichst gering zu halten, wurde anfänglich der Gehalt an Aktin in konditioniertem serumfreien Medium nach unterschiedlichen Konditionierungszeiten bestimmt wobei der Gehalt an Aktin nach 36 Stunden Serumentzug jedoch tolerierbar gering war (Daten nicht gezeigt).

„Pigment epithelium derived factor" (PEDF) wurde 1989 in konditioniertem Medium von fötalen humanen Pigment-Epithel Zellkulturen identifiziert (Tombran-Tink und

Johnson, 1989). Er wird in weiten Bereichen des Nervensystems (Tombran-Tink *et al.,* 1995; Bilak *et al.,* 1999; Tombran-Tink *et al.,* 1996) aber auch in nicht-neuronalen Geweben wie Skelettmuskulatur, Knochen, Herz, Plazenta, Leber, Hoden, Eierstöcke und Bauchspeicheldrüse exprimiert (Tombarn-Tink *et al.,* 1996). Er gehört zu der Familie der Serpin Protease-Inhibitoren (Steele *et al.,* 1993). Allerdings ist bisher keine inhibitorische Aktivität gegen eine bisher bekannte Protease bekannt. Als Überlebensfaktor übt PEDF neurotrophe Funktion aus (Houenou *et al.,* 1999; Taniwaki *et al.,* 1995; Araki *et al.,* 1998). Darüber hinaus wirkt PEDF stärker anti-angiogenetisch verglichen mit Angiostatin (Dawson *et al.,* 1999). In der Homöostase der menschlichen Haut wird PEDF Zellzyklus-abhängig verstärkt in Fibroblasten exprimiert, die sich in der G_0-Phase befinden (Di Paolo *et al.,* 1995). In der Rückenhaut der Maus wird PEDF ebenso gleichmäßig und sehr stark von dermalen Fibroblasten exprimiert (Abb. 10).

„Bone morphogenetic protein 4“ (BMP-4) gehört zu der TGF-β Über-Familie und zählt innerhalb dieser Proteinfamilie zu den „bone morphogenetic proteins“ (BMP). Erste Hinweise für eine knocheninduzierende Substanz lieferten Versuche mit demineralisierter Knochenmatrix, die in der Lage war Knochen *de novo* zu bilden (Urist, 1965). Für diese knocheninduzierende Wirkung sind diese „bone morphogenetic proteins“ verantwortlich, die derzeit mehr als 30 Mitglieder umfasst. Neben den BMPs gehören zu dieser Familie die „osteogenic proteins“ (OP), die „cartilage-derived morphogenic proteins“ (CDMP) und die „growth and differentiation factors“ (GDF) (Ducy und Karsenty, 2000; Balemans und van Hul, 2002). BMP-4 wird nur vereinzelt in dermalen Fibroblasten produziert. Dabei sind BMP-4-exprimierende Fibroblasten hauptsächlich in der Nähe von Haarfollikeln lokalisiert. Neben dermalen Fibroblasten stellen Keratinozyten und Zellen der Haarfollikelmatrix sowie des „outer“- und „inner root sheats“ eine Quelle für BMP-4 Expression dar (Wilson *et al.,* 1999). Während der Entwicklung der murinen Haut beschränkt sich die BMP-4 Expression hauptsächlich auf Epithelzellen der Haarfollikel sowie mesenchymale Zellen (Lyons *et al.*, 1990; Bitgood and McMahon, 1995; Laurikkala *et al.,* 2002). In der Embryonalentwicklung wird BMP-4 in vielen Organen und Regionen exprimiert, für die ein Einfluss von epithelialen-mesenchymalen Interaktionen bereits beschrieben wurde (Lyons *et al.,* 1989; Jones *et al.,* 1991).

In der Haut stellt die Wundheilung ein Prozess dar, bei dem mesenchymale-epitheliale Interaktionen eine große Rolle spielen. Da die fehlende Differenzierung von Keratinozyten mit JNK-defizienten Fibroblasten in dem Wundheilungsmodell der organotypischen Cokulturen (Bell *et al.,* 1981; Fusenig, 1992; Ponec *et al.,* 1997; Rikimaru *et al.,* 1997) beobachtet wurde und PEDF und BMP-4 in diesem Wundheilungsmodell reguliert werden, wurde eine Expressionskinetik während der Wundheilung *in vivo* aufgenommen. Nach Verwundung *in vivo* steigt die Expression von PEDF und BMP-4 langsam an, bis beide Faktoren ihre maximale Expression am 7. Tag nach der Verletzung erreichen. Während PEDF im unverwundeten Bereich stark und im Wundbereich deutlich schwächer exprimiert wird, zeigt BMP-4 im Vergleich zu wundnahen Arealen eine verstärkte Expression in Fibroblasten unterhalb der „leading edge" des Wundrandes. Da die Wunden für die RNA Isolierung zusammen mit unverwundeten Randbereichen präpariert wurden, ist der langsame Anstieg der Expression beider Faktoren im Verlauf der Heilung als eine Netto-Gesamtexpression aus Wundbereich und wundangrenzendem Bereich zu werten. Auch nach Verwundung des Auges steigt die Expression von PEDF in der inneren Netzhaut an (Stitt *et al.,* 2004). Es wird diskutiert, dass PEDF im Falle von Augenverletzungen als anti-angiogenetisch wirkender Faktor die Neovaskularisierung im Auge unterdrückt (Dawson *et al.,* 1999). PEDF ist ein multifunktionelles Protein, das neben seiner anti-angiogenetischen Funktion auch als neurotrophes und die Differenzierung induzierendes Protein bekannt ist (Tombran-Tink *et al.,* 1991; Dawson *et al.,* 1999; Araki *et al.,* 1998). Ob PEDF auch eine Rolle in der Angiogenese während der Wundheilung der Haut spielt ist bis jetzt noch nicht geklärt. In Knochenfrakturen wird *bmp-4* ähnlich wie in Wunden der Haut zeitlich und regional spezifisch exprimiert (Nakase *et al.,* 1994). Die Expression steigt bei Frakturen der Rippen im Vergleich zu unverletzten Rippen bereits 12-72 Stunden nach der Fraktur stark an. Dieser Zeitkorridor repräsentiert jedoch eine Phase, in der noch keine Knorpel- oder Knochenneubildung stattfindet. Im Knochen beschränkt sich die Expression von *bmp-4* auf gering differenzierte Vorläuferzellen der Osteoblasten innerhalb der Knochenschwiele (Callus). Daher wird ein Einfluss von *bmp-4* bei der frühen Bildung der Knochenschwiele diskutiert wird (Nakase *et al.,* 1994). Im weiteren Verlauf des Heilungsvorganges entsteht dann aus der Knochenschwiele ein differenziertes Gewebe.

BMP-4 könnte somit entweder die Differenzierung von Zellen der Knochenschwiele direkt initiieren oder dafür verantwortlich sein, dass die Zellen auf differenzierungsinduzierende Stimuli reagieren können. Während später Stadien der Wundheilung der Haut, nachdem die Wunde erfolgreich durch proliferierende und migrierende Keratinozyten geschlossen wurde, könnte eine Freisetzung von BMP-4 die Proliferation aktivierter Keratinozyten hemmen und für die Einleitung der terminalen Differenzierung verantwortlich sein. Man könnte daher postulieren, dass BMP-4 in späten Stadien der Wundheilung für die Wiederherstellung eines differenzierten funktionellen Integuments beiträgt.

Das zeitlich und räumlich distinkte Expressionsprofil von PEDF und BMP-4 während Wundheilungsprozessen liefert Hinweise darauf, dass beide Faktoren eine bedeutende Rolle in der Wundheilung spielen.

7.2 Regulation von PEDF und BMP-4 und initiierte Signalwege

Da Signalkaskaden durch externe Stimuli initiiert werden, stellt sich die Frage, welches extrazelluläre Signal die Expression von PEDF und BMP-4 während der Wundheilung reguliert. Il-1, ein in frühen Stadien der Wundheilung sezerniertes Zytokin, ist nicht für die Regulation von PEDF und BMP-4 verantwortlich (Daten nicht gezeigt). Es wird darüber diskutiert, ob TGF-β während der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle in initialen Ereignissen der mesenchymalen-epithelialen Interaktionen spielt (Schmid *et al.,* 1991). TGF-β aktiviert JNK in humanen Lungenfibroblasten und reguliert darüber den „connective tissue growth factor“ (CTGF) (Utsugi *et al.,* 2003). Ob TGF-β über die Aktivierung von JNK auch PEDF bzw. BMP-4 reguliert ist zu diesem Zeitpunkt ungeklärt. Eine verstärkte Expression von TGF-β in *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ Fibroblasten spricht jedoch gegen eine Regulation von PEDF und BMP-4 durch TGF-β (Ventura *et al.*, 2004). „Tumor necrosis factor alpha“ (TNF-α) ist ein weiterer löslicher, von Keratinozyten sezernierter Faktor, auf den Fibroblasten in einer parakrinen Weise reagieren können (Werner und Smola, 2001). In embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF) aktiviert TNF-α JNK, wobei die Aktivität von JNK essentiell für die TNF-induzierte Regulation von AP-1 ist (Ventura *et al.,* 2003). In

weiteren Versuchen müsste geklärt werden, ob TNF-α oder andere Zytokine die JNK-abhängige Regulation von PEDF und BMP-4 beeinflussen.

In *Drosophila* ist der dorsale Verschluss während der Embryogenese ein verwandter morphologischer Prozess zur embryonalen Wundheilung in Säugetieren, weswegen der dorsale Rückenschluss als Modell dieses Prozesses betrachtet wird (Noselli und Agnes, 1999). Inaktivierung des *Drosophila* JNK Signalweges verhindert die Schließung des dorsalen Abdomen (Sluss *et al.,* 1996). Somit wird JNK für eine effiziente embryonale Wundheilung in *Drosophila* benötigt (Ramet *et al.,* 2002), wobei in dieser Studie nicht zwischen einer mesodermalen und ektodermalen JNK-Aktivität unterschieden wurde.

Die Expressionsabhängigkeit von PEDF und BMP-4 von JNK1 und JNK2 in Fibroblasten wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl auf RNA-Ebene mit RT-PCR Analysen als auch auf Protein-Ebene durch immunologische „Western Blot" Untersuchungen bestätigt. Weder PEDF noch BMP-4 wurden in *jnk1*$^{-/-}$*jnk2*$^{-/-}$ Fibroblasten exprimiert, somit werden PEDF und BMP-4 JNK-abhängig exprimiert.

Im Gegensatz zu PEDF, dessen JNK-Abhängigkeit in dieser Studie zum ersten Mal gezeigt wurde, bestätigt Weston *et al*., dass JNK die Expression von BMP-4 während der Schließung des optischen Spalts („optic fissure") reguliert (Weston *et al.,* 2003). Die JNK-abhängige Expression von BMP-4 ist auch in *Drosophila* konserviert. Dort übernimmt „basket"-abhängiges „decapentaplegic" (dpp), die *Drosophila* Homologe zu JNK und BMP-4, eine entscheidende Rolle beim dorsalen Verschluss während der Embryogenese (Riesgo-Escovar *et al.,* 1996). Da JNK als aktivierende Kinase keine Gene direkt reguliert, sondern auf einen Stimulus hin Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, stellt sich die Frage, über welchen Transkriptionsfaktor JNK *pedf* und *bmp-4* reguliert. Das bisher am intensivsten untersuchte JNK-Substrat ist der Transktiptionsfaktor AP-1 mit seiner Komponente c-Jun (Derijard *et al.,* 1994). Da jedoch *pedf* und *bmp-4* in c-Jun-defizienten Fibroblasten exprimiert werden und konditioniertes Medium von c-Jun-defizienten Fibroblasten in der Lage ist, die Differenzierung in JNK-Cokulturen wiederherzustellen, spielt die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK keine Rolle bei der Initiierung der Differenzierung. In *Drosophila* reguliert „basket" (DJNK) die Expression von *dpp* in den dorsal liegenden Zellen über den ETS-Transkriptionsfaktor Aop/Yan und über DJun. Dabei wirkt sezerniertes Dpp auf näher ventral gelegene Zellen, die sich daraufhin ausweiten (Riesgo-Escovar und

Hafen, 1997). Da in dem System der heterologen Cokulturen BMP-4 unabhängig von c-Jun exprimiert wird, wäre zu überprüfen, ob BMP-4 in Cokulturen durch Aop/Yan reguliert wird. Funktionsverlust von Aop/Yan in *Drosophila* führt zu einer Hyperproliferation von Zellen im dorsalen Neuroektoderm und in der sich entwickelnden Augenscheibe. Interessanterweise ist Aop/Yan in einem enwicklungsabhängigen Kontext verantwortlich, ob eine Zelle proliferiert oder ausdifferenziert (Rogge *et al.,* 1995). Somit könnte der Transkriptionsfaktor Aop/Yan auch im System der heterologen Cokulturen *bmp-4* regulieren.

In *Xenopus* aktiviert heteromeres AP-1 aus c-Jun/c-Fos und homodimeres AP-1 aus c-Jun/c-Jun die Transkription von *bmp-4* in späten Stufen der Embryonalentwicklung (Knochel *et al.,* 2000). Promotorstudien deckten weiterhin responsive AP-1 Elemente in der 5´-flankierenden Region und im zweiten Intron von *bmp-4* auf (Knochel *et al.,* 2000). Weitere Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie, welche durch JNK phosphoryliert und somit aktiviert werden, sind ATF-2 und ATFa (Livingstone *et al.,* 1995; Bokko *et al.,* 1996). Es wäre daher möglich, dass JNK über ATF-2 die Expression von *bmp-4* reguliert. Die funktionelle Inaktivierung von ATF-2 in Mäusen führt zu einem Defekt in der endochondralen Ossifikation, der neuronalen Entwicklung und zu neonataler Atemnot, jedoch nicht zu einem offensichtlichen Hautphänotypen (Reimold *et al.,* 1996; Maekawa *et al.,* 1999). Um eine Aussage über die Funktion von ATF-2 und ATFa bei der Regulation von *pedf* und *bmp-4* treffen zu können, müsste entweder die Wirkung von ATF-2- bzw. ATFa-defizienten Fibroblasten auf Keratinozyten im Cokultur-System untersucht werden oder ATF-2/ATFa „knock-out" Mäuse dem Wundheilungsprotokoll unterzogen werden. Da JNK auch die Transkriptionsfaktoren Elk-1, c-Myc oder p53 aktiviert (Derijard et al., 1994; Gupta *et al.,* 1996; Kyriakis *et al.,* 1996, Cavigelli *et al.,* 1995; Milne *et al.,* 1995; Fuchs *et al.,* 1998; Noguchi *et al.,* 1999), wären auch diese potentielle transkriptionelle Regulatoren von PEDF und BMP-4. Doch weder p53- noch Elk-1-defiziente Mäuse zeigen einen offensichtlichen Hautphänotypen (Donehower *et al.,* 1992; Cesari *et al.,* 2004). In kolorektalen Tumor-Zelllinien wird PEDF jedoch spezifisch durch p63 und p73 jedoch nicht durch p53 induziert (Sasaki *et al.,* 2005). Die Überexpression von c-Myc *in vitro* in primären Keratinozyten inhibiert die Proliferation und stimuliert die terminale Differenzierung (Gandarillas und Watt, 1997). Des Weiteren reguliert c-Myc *in vivo* die

Adhäsion von Keratinozyten und deren Differenzierung durch eine komplexe Interaktion mit Miz1 (Gebhardt *et al.,* 2006). Daher könnte man vermuten, dass die Expression von PEDF und BMP-4 über die JNK-abhängige Aktivierung von c-Myc verläuft. Diese Hypothese müsste in weiterführenden Studien (c-Myc knock-out Fibroblasten oder RNAi) überprüft werden.

Untersuchungen an transgenen/„knock-out" Mäusen lieferten erste Hinweise auf die Funktion von PEDF und BMP-4 *in vivo*. Die vollständige Inaktivierung von *bmp-4* durch homologe Rekombination führt aufgrund fehlender Bildung des Mesoderm zu einer frühen embryonalen Letalität (E6.5-9.5) (Winnier *et al.,* 1995). Die Überexpression von Noggin, einem wichtigen extrazellulären Inhibitor von BMP-4, unter dem Einfluss des K5-Promotors, verzögert die epidermale Differenzierung des Lid-Epithels und führt zu einem verzögerten Öffnen des Augenlids (Sharov *et al.,* 2003). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von SMAD-7, einem intrazellulären Inhibitor des BMP-4-SMAD Signalweges, unter der Kontrolle des K14 Promotors, in basalen Keratinozyten neben offenen Augenlidern bei der Geburt zu abnormaler Haarfollikelmorphogenese und einer Hyperproliferation in der Epidermis (He *et al.,* 2002). Diese Untersuchungen machen deutlich, dass BMP-4 eine entscheidende Rolle in der epidermalen Morphogenese der Haut und ihren Anhängen spielt. Die funktionelle Inaktivierung von PEDF führt zu einer Hyperplasie in der Prostata und in der Bauchspeicheldrüse, jedoch zeigt die Haut keine Auffälligkeiten (Doll *et al.,* 2003). Dies könnte an der redundanten Funktion von PEDF und BMP-4 in Bezug auf die Stimulation der terminalen Differenzierung liegen.

Die in der vorliegenden Studie gewonnen Daten lassen auf eine neue Funktion von PEDF und BMP-4 in der Haut während des Wundheilungsprozesses schließen.

7.3 PEDF und BMP-4 induzieren durch eine gemeinsame Wirkungsweise die Stratifizierung epidermaler Keratinozyten und initiieren das terminale Differenzierungsprogramm

In „feeder layer" Cokulturen inhibieren PEDF und BMP-4 die Proliferation von Keratinozyten. BMP-6, ein epithelial exprimiertes Mitglied der „bone morphogenetic proteins", inhibiert ebenfalls die Proliferation der Keratinozyten in einer dosisabhängigen Weise (Blessing *et al.,* 1996). Ähnlich wie BMP-6 inhibiert auch

BMP-7 abhängig von der Dosis die Proliferation von Zellen der Nierentubuli in der sich entwickelnden Niere (Piscione *et al.,* 2001). PEDF und BMP-4 sind bezüglich der Proliferation von Keratinozyten redundant. Dies erklärt, warum die individuelle Deletion von PEDF in Mäusen nicht zu offensichtlichen Fehlbildungen der Haut führt (Doll *et al.,* 2003). Die einzige bisher generierte Haut-spezifische transgene BMP-4-Maus überexprimiert BMP-4 unter der Kontrolle des Zytokeratin IV-Promotors (Blessing *et al.,* 1993). Da Zytokerin IV während der Homöostase der Haut nur im „outer root sheet" der Haarfollikel und erst nach vorangegangenem Stress in interfollikulärer Epidermis exprimiert wird, gibt es derzeit keine *in vivo* Hinweise auf eine Funktion von BMP-4 in der Regulation der Homöostase der interfollikulären Epidermis. Werden diese Mäuse aber dem Protokoll der chemischen Hautkarzinogenese unterzogen, bilden sie im Gegensatz zu Kontroll-Mäusen keine Papillome oder Karzinome aus (Blessing *et al.,* 1995). Diese Daten sprechen ebenfalls für eine inhibierende Funktion von BMP-4 auf die Proliferation der Keratinozyten.

PEDF bzw. BMP-4 sind alleine nicht in der Lage die Differenzierung in „feeder layer" Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten wiederherzustellen. Interessanterweise reduziert die kombinierte Applikation von PEDF und BMP-4 in zweidimensionalen JNK-Cokulturen nicht nur die Proliferation der Keratinozyten, sondern induziert zusätzlich auch die Stratifizierung und stellt somit den Wildtyp-Phänotyp wieder her. In dreidimensionalen organotypischen Cokulturen mit JNK-defizienten Fibroblasten, in denen eine passive Stratifizierung bereits durch die Kontraktion des Kollagen-Gels unterstützt wird, induziert bereits ein einzelner Faktor (PEDF oder BMP-4) die Entstehung eines vollständig differenzierten Epithels mit allen Zelllagen. Trotz der Vollständigkeit der unterschiedlichen Zelllagen und der Expression früher und später Differenzierungsmarker ist das durch Einzelfaktorzugabe induzierte Epithel in JNK-Cokulturen parakeratotisch (Zellkerne im *Stratum corneum*) und daher nicht normal. Wie im „feeder layer" Cokultur-System findet auch in dem organotypischen Cokultur-System ein effizienter Eintritt und eine normale terminale Differenzierung nur in Anwesenheit beider Faktoren statt. Neutralisierende Antikörper gegen PEDF und BMP-4 verzögerten bei Einzelapplikation in „feeder layer" Cokulturen die Stratifizierung und erhöhen die Proliferationsrate. In organotypischen Cokulturen reichte die Zugabe von nur einem neutralisierenden Antikörper aus, um den Eintritt in die Differenzierung und

die Ausbildung eines *Stratum granulosums* und *Stratum corneums* zu blockieren. Obwohl die Einzelneutralisierung histologisch die Ausbildung eines vollständig differenzierten Epithels verhindert, deutet eine geringe suprabasale Expression des frühen Differenzierungsmarkers K1/10 auf eine ineffiziente und reduzierte terminale Differenzierung hin. Erst die Neutralisierung beider Faktoren unterdrückt die Expression von K1/10 vollständig. Die Wirkung von PEDF und BMP-4 auf das Verhalten der Keratinozyten ist spezifisch, da weder die Zugabe von rekombinantem „stromal derived factor" (SDF-1), ein weiteres JNK-abhängiges Zytokin (J. Lorenz, 2004), noch die Neutralisierung von „growth related protein 1" (Gro-1), trotz seines negativen Einflusses auf die Proliferation, einen Effekt auf die Differenzierung von Keratinozyten haben. Somit wird der effiziente Eintritt von Keratinozyten in die terminale Differenzierung durch die kombinierte Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 gesteuert, die beide von Fibroblasten sezerniert werden und parakrin auf Keratinozyten wirken.

Damit ein löslicher Faktor in einer parakrinen Weise wirken kann, muss der entsprechende Rezeptor von der interagierenden Zelle exprimiert werden. Expressionsanalysen des Rezeptors von BMP-4 zeigen, dass BMPR-II in humaner Haut suprabasal exprimiert wird (Botchkarev *et al.,* 1999; Hwang *et al.,* 2001). Bindungsstudien geben zwar Hinweise für die Existenz eines PEDF-Rezeptors (Alberdi *et al.,* 1999), der aber aktuell noch nicht identifiziert wurde.

Der identifizierte Mechanismus zur Regulation des Eintritts in die terminale Differenzierung über die dermalen Faktoren PEDF und BMP-4 erweitert das in der Literatur beschriebene Modell der Regeneration: Dieses besagt, dass epidermale Stammzellen mit hoher regenerativer Kapazität sogenannte „transit amplifying cells" produzieren, die nach einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen den Zellzyklus verlassen und in die terminale Differenzierung eintreten (Watt und Hogan, 2000). Ob der Eintritt in die terminale Differenzierung ein aktiver, regulierter Prozess darstellt, war nicht bekannt. Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass PEDF und BMP-4 individuell die Proliferation von Keratinozyten inhibieren, während sie gemeinsam agieren müssen, um in Keratinozyten die Stratifizierung zu initiieren. Nachdem eine Schichtung der Keratinozyten aktiv durch kombinierte Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 oder passiv durch mechanische Kräfte in organotypischen Cokulturen

stattgefunden hat, unterstützen PEDF und BMP-4 individuell den Prozess der terminalen Differenzierung (Abb. 18). Da der BMPR-II suprabasal exprimiert wird, kann man ausschließen, dass BMP-4 direkt auf epidermale Stammzellen wirkt.

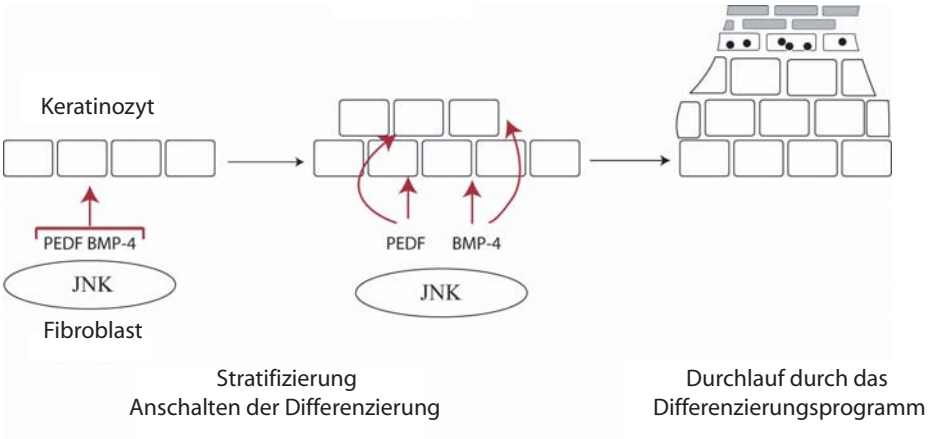

Abb. 18 **Schema der gemeinsamen und individuellen Wirkungsweise von PEDF und BMP-4.**

Das Ablösen der Keratinozyten von der Basalmembran ist ein wichtiger Bestandteil der terminalen Differenzierung (Hotchin *et al.,* 1995; Adams und Watt, 1989). Terminale Differenzierung von Keratinozyten kann auch induziert werden, wenn Keratinozyten in Methylzellulose in Suspension kultiviert werden (Morrissey und Green, 1978). Integrine sind an der Adhäsion der Keratinozyten an die Basalmembran beteiligt und spielen somit in der Regulation der Differenzierung eine bedeutende Rolle (Adams und Watt, 1990).

Während der frühen Gastrulation, bei der Differenzierung des Ektoderms in Epidermis und neuronales Gewebe, induziert BMP-4 die Bildung einer Epidermis und inhibiert die Entstehung neuronalen Gewebes (Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995). Darüber hinaus differenzieren embryonale Stammzellen, die mit BMP-4 behandelt werden, zu Keratinozyten, die in der Lage sind ein vielschichtiges Epithel aufzubauen (Aberdam *et al.,* 2004). Dabei unterscheidet sich diese als „keratinocyte lineage commitment" bezeichnete Funktion von in dieser Studie beschriebenen Funktion des „keratinocyte commitment to differentiation", da die Keratinozyten selbst (und nicht embryonale Stammzellen) zu toten Hornschuppen ausdifferenzieren. In *Xenopus* ist eine BMP-4-

abhängige Expression des epidermal exprimierten Trankriptionsfaktors „grainyhead-like 1“ (XGrhl1) essentiell für die terminale Differenzierung (Tao *et al.,* 2005). Die Funktion von „grainyhead“ scheint in niederen und höheren Organismen konserviert. In *Drosophila* ist „grainyhead“ in Wundheilungsprozesse der Cuticula involviert (Mace *et al.,* 2005), während ein Homolog des *Drosophila* „grainyhead“ bei Mäusen für die epidermale Integrität verantwortlich ist (Ting *et al.,* 2005). In JNK-Cokulturen wird grainyhead-like-3 (GRHL-3) in Keratinozyten im Vergleich zu Wildtyp-Cokulturen vermindert exprimiert (preliminäre Daten). Somit könnte BMP-4 die Expression des Transkriptionsfaktors GRHL-3 in Keratinozyten steuern, welcher wiederum andere mit der Differenzierung assoziierte Gene anschaltet. Das epidermale Keratin K81A1 wurde in *Xenopus* als direktes Zielgen von Grainyhead-like 1 identifiziert (Dawid *et al.,* 1985; Jonas *et al.,* 1985). Somit liefern diese Ergebnisse einen ersten Erklärungsansatz für die Wirkung von BMP-4 auf Keratinozyten, vernachlässigen aber völlig die kombinierte Wirkungsweise von PEDF und BMP-4. Auch PEDF ist als Faktor beschrieben, der Differenzierung induzieren kann. In der Suspensions-Retinoblastoma Zelllinie Y79 bewirkt PEDF einen Proliferationsstopp, die Anheftung an ein Substrat und das Auswachsen von Neuriten (Seigel *et al.,* 1994). Zusätzlich stimuliert PEDF die Expression von Genen, die mit einer neuronalen Differenzierung assoziiert werden (Tombran-Tink *et al.,* 1991). Die Coexpression von PEDF und BMP-4 in weiteren Geweben neben der Haut wie dem retinalen Pigmentepithel, Neuronen, Fettzellen und Knochen unterstützen unsere Daten von einer gemeinsamen Wirkungsweise und geben Hinweise auf die Allgemeingültigkeit dieses Mechanismus (Tombran-Tink und Johnson, 1989; Kratchmarova *et al.,* 2002; Quan *et al.,* 2005; Vogt *et al.,* 2006; Taha *et al.,* 2006). Es existieren aber auch Prozesse, bei denen PEDF und BMP-4 nicht koordiniert reguliert werden. Während die Expression von PEDF in Retinoblastoma-, Endothel- und in retinalen Pigment-Epithelzellen durch die Behandlung von „all-trans-retinoic acid“ (ATRA) deutlich erhöht wird (Tombran-Tink *et al.,* 2004), unterdrückt ATRA in embryonalen F9-Karzinomzellen die Expression von BMP-4 (Rogers *et al.,* 1992). Diese Regulation von PEDF durch ATRA könnte durch direkte Interaktion stattfinden, da der PEDF Promotor ein funktionelles Retinolsäure-Rezeptorelement enthält.

Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch der Notch-Rezeptor und das durch ihn reprimierte p63 in das „keratinocyte commitment“ involviert sein könnten (Nguyen *et al.*, 2006). Interessanterweise liefern Untersuchungen zur Zahnmorphogenese Hinweise darauf, dass mesenchymales BMP-4 den Notch-Signalweg im Epithel regulieren kann (Mustonen *et al.*, 2002). Mäuse mit einer Deletion der Retinoblastoma Gene *p107* und *p130* weisen eine abormale epidermale Differenzierung auf, die durch eine gestörte dermal-epidermale Interaktion hervorgerufen wird. Diese veränderte Kommunikation wird durch eine verminderte Expression von BMP-4 und p63 begleitet, was ein weiterer Hinweis für eine regulatorische Funktion von BMP-4 auf p63 darstellen könnte (Ruiz *et al.*, 2003). In Zebrafischen stellt *ΔNp63* ein direktes Zielgen von BMP-4 dar, das als transkriptioneller Repressor die neurale Spezifikation des ventralen Ektoderms hemmt (Bakkers *et al.*, 2002). Ein weiteres Indiz dafür, dass p63 an der Regulation der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt ist, liefern $p63^{-/-}$-Mäuse, die nicht in der Lage sind eine stratifizierte Epidermis aufzubauen (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Daher legt p63 während der embryonalen Entwicklung fest, wann aus dem ursprünglich einlagigen Oberflächenektoderm ein mehrlagiges stratifiziertes Epithel entsteht (Koster *et al.*, 2004). Diese Daten geben Anlass zur Spekulation, dass mesenchymales BMP-4 die Expression von epithelialem p63 reguliert, wodurch die Stratifizierung von Keratinozyten eingeleitet wird.

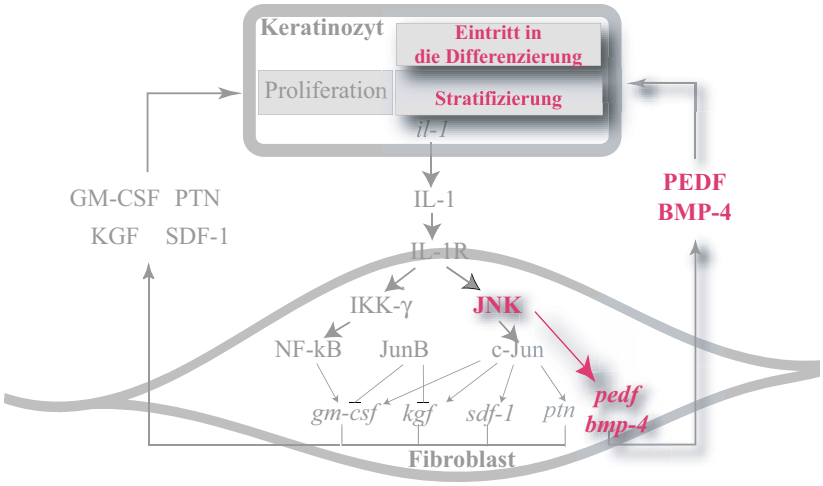

Abb. 19 **Regulation der Keratinozytenproliferation durch dermale Zytokine.** Die in dieser Arbeit identifizierten Faktoren sind in roter, bekannte Mediatoren der dermal-epidermalen Interaktion in grauer Schrift dargestellt (verändert nach Szabowski *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse erweitern das Wissen über das komplexe Interaktionsnetzwerk zwischen dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten

(Abb. 19). Der in der vorliegenden Studie aufgeklärte Mechanismus zeigt, dass die Proliferation und der Eintritt in die terminale Differenzierung von Keratinozyten zwei entkoppelte Prozesse darstellen, die über die Faktoren PEDF und BMP-4 getrennt reguliert werden können. Mit diesem Mechanismus kann zum ersten Mal erklärt werden, wie die Epitheldicke unabhängig von der Proliferationsrate verändert werden kann. Um die *in vivo* Relevanz des identifizierten Mechanismus zu klären, müssten PEDF und BMP-4 gemeinsam mittels einer Dermis-spezifischen Cre-Mauslinie (Sakai *et al.,* 2001; Florin *et al.,* 2004) deletiert werden. Aufschluss über die gemeinsame Wirkungsweise von PEDF und BMP-4 in Keratinozyten könnten derzeit auch kombinatorische „Microarray"-Analysen liefern. Dabei würden Keratinozyten sowohl durch die individuellen Faktoren PEDF und BMP-4, als auch durch die Kombination beider Faktoren stimuliert werden. Die Ergebnisse könnten genetische Programme aufdecken, die an der gemeinsamen Wirkung von PEDF und BMP-4 beteiligt sind.

Es stellt sich die Frage, ob PEDF und BMP-4 auch in anderen Geweben, in denen mesenchymale-epitheliale Interaktionen beschrieben wurden, gemeinsam das den Eintritt der Keratinozyten in die terminale Differenzierung zu initiieren und somit der beschriebene Mechanismus allgemeingültig ist.

Mesenchymale-epitheliale Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle in der Wundheilung der Haut (Clark, 2003), in der Entwicklung der Haut und seinen Anhangsgebilden (Yamaguchi *et al.,* 2004), während der Entwicklung der Brustdrüse (Robinson *et al.,* 1999), in der embryonalen Lungenmorphogenese (Warburton *et al.,* 1999; Shannon und Hyatt, 2004), während der Entwicklung und des Wachstums der Prostata (Cunha und Donjacour, 1989) und in der Zahnentwicklung (Jowett *et al.,* 1993). Während der Zahnentwicklung werden die am BMP-Signalweg beteiligen SMAD-1-7 exprimiert (Xu *et al.,* 2003). Daraufhin ist eine Beteiligung von BMP-4 an mesenchymalen-epithelialen Interaktionen nicht auszuschließen. Außerdem wird BMP-4 temporal-spezifisch im Rachenbogen während der Zahnentwicklung exprimiert, wobei am Tag E10/E11 ein Wechsel von epithelial-exprimiertem BMP-4 zu einer mesenchymalen Expression stattfindet. Dabei induziert epithelial-exprimiertes BMP-4 sich selbst im unterliegenden Mesenchym (Ohazama *et al.,* 2005; Dassule und McMahon, 1998). PEDF wird wie BMP-4 in Zähnen exprimiert (Kozaki *et al.,* 1998). Dies liefert einen weiteren Hinweis für eine mögliche gemeinsame Wirkungsweise

beider Faktoren. Auch während der Lungenentwicklung ist BMP-4 in mesenchymale-epitheliale Interaktionen involviert (Bellusci *et al.,* 1996). PEDF wird ebenfalls in Lungengewebe exprimiert, wobei die Expression von PEDF in Fibroblasten und Myofibroblasten bei der Lugenkrankheit idiopathische pulmonale Fibrose erhöht ist (Cosgrove *et al.,* 2004). Diese Krankheit zeichnet sich durch chronische Entzündungen der Lunge aus. Das entzündete Lungengewebe wird in Bindegewebe umgebaut und vernarbt dabei. Dadurch steht bei fortschreitender Krankheit immer weniger funktionstüchtiges Lungengewebe für die Sauerstoffaufnahme zur Verfügung. Da eine Beteiligung von PEDF und BMP-4 während der Wundheilung der Haut in dieser Studie und für PEDF eine Beteiligung an der Wundheilung von Okularwunden (Stitt *et al.,* 2004) gezeigt worden ist, könnte eine veränderte Expression von BMP-4 und damit ein verändertes Zusammenspiel von PEDF und BMP-4 bei den chronischen Verletzungen der Lunge bei idiopathisch pulmonaler Fibrose eine Rolle spielen.

7.4 Ausblick

Die antiproliferative Funktion von PEDF und BMP-4 auf Keratinozyten und deren gemeinsame Wirkungsweise bezüglich der Initiierung der Differenzierung von Keratinozyten wirft die Frage auf, ob eine veränderte Expression von PEDF und BMP-4 eine pathologische Relevanz hat. Man könnte vermuten, dass die Expression von PEDF und BMP-4 in hyperplastischen Hautkrankheiten dereguliert ist. Schuppenflechte (Psoriasis) stellt eine Autoimmunkrankheit dar, die durch eine veränderte epidermale Differenzierung mit Hypo- und Parakeratose und eine erhöhte Proliferationsrate der Keratinozyten charakterisiert ist. Die vorliegenden Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass die Expression von PEDF und BMP-4 in Fibroblasten in dieser Hautveränderung dereguliert sein könnte. Expressionsstudien von PEDF und BMP-4 in Psoriasis könnten daher zu einem besseren Verständnis des komplexen pathologischen Zytokin-Netzwerkes in dieser Krankheit beitragen und neue Ansätze für Therapien liefern. Gleichzeitig ermöglicht der Erkenntnisgewinn dieser Arbeit die Kultivierung von primären humanen Keratinozyten unter nicht-differenzierenden Bedingungen (z.B. durch ein definiertes Medium ohne die Faktoren PEDF und BMP-4 oder durch Zugabe inhibierender Proteine). Dies könnte zu einer Anwendung in der Wundversorgung großflächiger Wunden durch Eigenhauttransplantation von *in vitro* kultivierten

Keratinozyten führen. Durch molekularbiologische und gentechnische Methoden ist es möglich geworden, einerseits eine große Anzahl von Mediatoren der Wundheilung neu zu entdecken und zu charakterisieren, anderseits ihre funktionelle Bedeutung näher zu beschreiben. Somit ist denkbar, dass es in Zukunft in therapeutischer Absicht gelingen wird, den Ablauf der Wundheilung spezifischer und damit effizienter zu beeinflussen. Neue Therapiekonzepte der Wundheilung bestehen darin, die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten zugunsten der Proliferation zu verschieben und damit den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Eingriffe in das komplexe Zytokin-Netzwerk sind allerdings nicht unproblematisch, da bei antiinflammatorischer Therapie das Infektionsrisiko erhöht werden kann. Aufgrund der Redundanz vieler Zytokine wird die Wundheilung durch die Hemmung oder Blockierung eines einzelnen Zytokins oft ungenügend beeinflusst. Die gleichzeitige Blockierung von PEDF und BMP-4 könnte sich somit positiv auf den Verlauf der Wundheilung auswirken.

8 Literaturverzeichnis

Aberdam, D. (2004). Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells. Int J Dev Biol *48*, 203-206.

Adams, J. C., and Watt, F. M. (1989). Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. Nature *340*, 307-309.

Adams, J. C., and Watt, F. M. (1990). Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. Cell *63*, 425-435.

Alberdi, E., Aymerich, M. S., and Becerra, S. P. (1999). Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. J Biol Chem *274*, 31605-31612.

Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta *1072*, 129-157.

Angel, P., Szabowski, A., and Schorpp-Kistner, M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. Oncogene *20*, 2413-2423.

Ansel, J., Perry, P., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., Luger, T., and Hefeneider, S. (1990). Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. J Invest Dermatol *94*, 101S-107S.

Ansel, J. C., Tiesman, J. P., Olerud, J. E., Krueger, J. G., Krane, J. F., Tara, D. C., Shipley, G. D., Gilbertson, D., Usui, M. L., and Hart, C. E. (1993). Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. J Clin Invest *92*, 671-678.

Araki, T., Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J., and Schwartz, J. P. (1998). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. J Neurosci Res *53*, 7-15.

Arkonac, B. M., Foster, L. C., Sibinga, N. E., Patterson, C., Lai, K., Tsai, J. C., Lee, M. E., Perrella, M. A., and Haber, E. (1998). Vascular endothelial growth factor induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular endothelial cells. J Biol Chem *273*, 4400-4405.

Asahina, K., Sato, H., Yamasaki, C., Kataoka, M., Shiokawa, M., Katayama, S., Tateno, C., and Yoshizato, K. (2002). Pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule as a mitogen of rat hepatocytes and its role in regeneration and development of liver. Am J Pathol *160*, 2191-2205.

Ashkenas, J., Muschler, J., and Bissell, M. J. (1996). The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla. Dev Biol *180*, 433-444.

Asselineau, D., and Prunieras, M. (1984). Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. Br J Dermatol *111 Suppl 27*, 219-222.

Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M., and Hammerschmidt, M. (2002). Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. Dev Cell *2*, 617-627.

Balemans, W., and Van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. Dev Biol *250*, 231-250.

Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 2302-2306.

Behrens, A., Sibilia, M., and Wagner, E. F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. Nat Genet *21*, 326-329.

Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., and Nakatsuji, T. (1981a). Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science *211*, 1052-1054.

Bell, E., Ehrlich, H. P., Sher, S., Merrill, C., Sarber, R., Hull, B., Nakatsuji, T., Church, D., and Buttle, D. J. (1981b). Development and use of a living skin equivalent. Plast Reconstr Surg *67*, 386-392.

Bellusci, S., Henderson, R., Winnier, G., Oikawa, T., and Hogan, B. L. (1996). Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. Development *122*, 1693-1702.

Bickenbach, J. R. (1981). Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. J Dent Res *60 Spec No C*, 1611-1620.

Bikle, D. D., Ng, D., Tu, C. L., Oda, Y., and Xie, Z. (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. Mol Cell Endocrinol *177*, 161-171.

Bilak, M. M., Corse, A. M., Bilak, S. R., Lehar, M., Tombran-Tink, J., and Kuncl, R. W. (1999). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. J Neuropathol Exp Neurol *58*, 719-728.

Billingham, R. E., and Silvers, W. K. (1967). Studies on the conservation of epidermal specificies of skin and certain mucosas in adult mammals. J Exp Med *125*, 429-446.

Bitgood, M. J., and McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. Dev Biol *172*, 126-138.

Blessing, M., Nanney, L. B., King, L. E., and Hogan, B. L. (1995). Chemical skin carcinogenesis is prevented in mice by the induced expression of a TGF-beta related transgene. Teratog Carcinog Mutagen *15*, 11-21.

Blessing, M., Nanney, L. B., King, L. E., Jones, C. M., and Hogan, B. L. (1993). Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles. Genes Dev *7*, 204-215.

Blessing, M., Schirmacher, P., and Kaiser, S. (1996). Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions. J Cell Biol *135*, 227-239.

Bocco, J. L., Bahr, A., Goetz, J., Hauss, C., Kallunki, T., Kedinger, C., and Chatton, B. (1996). In vivo association of ATFa with JNK/SAP kinase activities. Oncogene *12*, 1971-1980.

Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Nakamura, M., Huber, O., Funa, K., Lauster, R., Paus, R., and Gilchrest, B. A. (2001). Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. Faseb J *15*, 2205-2214.

Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Roth, W., Nakamura, M., Chen, L. H., Herzog, W., Lindner, G., McMahon, J. A., Peters, C., Lauster, R., *et al.* (1999). Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. Nat Cell Biol *1*, 158-164.

Boukamp, P., Breitkreutz, D., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (1990). Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites. Differentiation *44*, 150-161.

Bowden, P. E., Stark, H. J., Breitkreutz, D., and Fusenig, N. E. (1987). Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis. Curr Top Dev Biol *22*, 35-68.

Bowler, P. G. (2002). Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. Ann Med *34*, 419-427.

Boxman, I. L., Ruwhof, C., Boerman, O. C., Lowik, C. W., and Ponec, M. (1996). Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. Arch Dermatol Res *288*, 391-398.

Cammarano, M. S., and Minden, A. (2001). Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. J Biol Chem *276*, 25876-25882.

Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X., and Karin, M. (1995). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. Embo J *14*, 5957-5964.

Cesari, F., Brecht, S., Vintersten, K., Vuong, L. G., Hofmann, M., Klingel, K., Schnorr, J. J., Arsenian, S., Schild, H., Herdegen, T.*, et al.* (2004). Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. Mol Cell Biol *24*, 294-305.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature *410*, 37-40.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem *162*, 156-159

Clark, R. A. (1993). Biology of dermal wound repair. Dermatol Clin *11*, 647-666.

Clark, R. A. (2003). Epithelial-mesenchymal networks in wounds: a hierarchical view. J Invest Dermatol *120*, ix-xi.

Constant, S. L., Dong, C., Yang, D. D., Wysk, M., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2000). JNK1 is required for T cell-mediated immunity against Leishmania major infection. J Immunol *165*, 2671-2676.

Cosgrove, G. P., Brown, K. K., Schiemann, W. P., Serls, A. E., Parr, J. E., Geraci, M. W., Schwarz, M. I., Cool, C. D., and Worthen, G. S. (2004). Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. Am J Respir Crit Care Med *170*, 242-251.

Cui, W., Fowlis, D. J., Cousins, F. M., Duffie, E., Bryson, S., Balmain, A., and Akhurst, R. J. (1995). Concerted action of TGF-beta 1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. Genes Dev *9*, 945-955.

Cunha, G. R., and Donjacour, A. A. (1989). Mesenchymal-epithelial interactions in the growth and development of the prostate. Cancer Treat Res *46*, 159-175.

Dale, B. A., Resing, K. A., and Lonsdale-Eccles, J. D. (1985). Filaggrin: a keratin filament associated protein. Ann N Y Acad Sci *455*, 330-342.

Dassule, H. R., and McMahon, A. P. (1998). Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. Dev Biol *202*, 215-227.

Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell *103*, 239-252.

Dawid, I. B., Haynes, S. R., Jamrich, M., Jonas, E., Miyatani, S., Sargent, T. D., and Winkles, J. A. (1985). Gene expression in Xenopus embryogenesis. J Embryol Exp Morphol *89 Suppl*, 113-124.

Dawson, D. W., Volpert, O. V., Gillis, P., Crawford, S. E., Xu, H., Benedict, W., and Bouck, N. P. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. Science *285*, 245-248.

Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell *76*, 1025-1037.

Dey, M. , Grotemeyer J. (1995) Cluster Formation of Biomolecules in the Gas Phase. European Mass Spectrom. 1(1), 22.

Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., and Davis, R. J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. Science *277*, 693-696.

DiPaolo, B. R., Pignolo, R. J., and Cristofalo, V. J. (1995). Identification of proteins differentially expressed in quiescent and proliferatively senescent fibroblast cultures. Exp Cell Res *220*, 178-185.

Doll, J. A., Stellmach, V. M., Bouck, N. P., Bergh, A. R., Lee, C., Abramson, L. P., Cornwell, M. L., Pins, M. R., Borensztajn, J., and Crawford, S. E. (2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. Nat Med *9*, 774-780.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature *356*, 215-221.

Dong, C., Yang, D. D., Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Xu, J., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. Nature *405*, 91-94.

Dong, C., Yang, D. D., Wysk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. Science *282*, 2092-2095.

Dover R. (1994) Cell kinetics of keratinocytes. In: *The Keratinocyte Handbook.* (Leigh I.M.; Lane E.B.; Watt F.M.; Eds.) Cambridge: Cambridge University Press; 203-21.

Ducy, P., and Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. Kidney Int *57*, 2207-2214.

Efron, J. E., Frankel, H. L., Lazarou, S. A., Wasserkrug, H. L., and Barbul, A. (1990). Wound healing and T-lymphocytes. J Surg Res *48*, 460-463.

Eitel, F., and Sklarek, J. (1988). [Wound healing and wound dressing]. Tierarztl Prax *16*, 1-12.

Elias, P. M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. J Invest Dermatol *125*, 183-200.

Falanga, V. (1993). Growth factors and wound healing. Dermatol Clin *11*, 667-675.

Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (1996). Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. Faseb J *10*, 1002-1013.

Florin, L., Alter, H., Grone, H. J., Szabowski, A., Schutz, G., and Angel, P. (2004a). Cre recombinase-mediated gene targeting of mesenchymal cells. Genesis *38*, 139-144.

Florin, L., Hummerich, L., Dittrich, B. T., Kokocinski, F., Wrobel, G., Gack, S., Schorpp-Kistner, M., Werner, S., Hahn, M., Lichter, P., *et al.* (2004b). Identification of novel AP-1 target genes in fibroblasts regulated during cutaneous wound healing. Oncogene *23*, 7005-7017.

Florin, L., Maas-Szabowski, N., Werner, S., Szabowski, A., and Angel, P. (2005). Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. J Cell Sci *118*, 1981-1989.

Fuchs, E. (1990a). Epidermal differentiation. Curr Opin Cell Biol *2*, 1028-1035.

Fuchs, E. (1990b). Epidermal differentiation: the bare essentials. J Cell Biol *111*, 2807-2814.

Fuchs, E. (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. J Cell Sci Suppl *17*, 197-208.

Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell *19*, 1033-1042.

Fuchs, S. Y., Adler, V., Pincus, M. R., and Ronai, Z. (1998). MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 10541-10546.

Fusenig N. E. (1994) Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro. (Leigh I.M.; Lane E.B.; Watt F.M.; Eds.) Cambridge: Cambridge University Press; 71-94.

Gailit, J., and Clark, R. A. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol *6*, 717-725.

Gallo, K. A., and Johnson, G. L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 663-672.

Gandarillas, A., and Watt, F. M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. Genes Dev *11*, 2869-2882.

Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr Opin Cell Biol *11*, 211-218.

Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S. A., Braun, K., Samans, B., Watt, F. M., Elsasser, H. P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. J Cell Biol *172*, 139-149.

Gerstein, A. D., Phillips, T. J., Rogers, G. S., and Gilchrest, B. A. (1993). Wound healing and aging. Dermatol Clin *11*, 749-757.

Gillitzer, R., and Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol *69*, 513-521.

Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Abdullah, A., and Abdullah, K. M. (2003). Wound healing: the role of growth factors. Drugs Today (Barc) *39*, 787-800.

Gunzel, S., Weidenthaler, B., Hausser, I., and Anton-Lamprecht, I. (1991). Keratohyalin granules are heterogeneous in ridged and non-ridged human skin: evidence from anti-filaggrin immunogold labelling of normal skin and skin of autosomal dominant ichthyosis vulgaris patients. Arch Dermatol Res *283*, 421-432.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. Embo J *15*, 2760-2770.

Hall, P. A., and Watt, F. M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development *106*, 619-633.

Hardy, M. H. (1992). The secret life of the hair follicle. Trends Genet *8*, 55-61.

He, W., Li, A. G., Wang, D., Han, S., Zheng, B., Goumans, M. J., Ten Dijke, P., and Wang, X. J. (2002). Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues. Embo J *21*, 2580-2590.

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.

Hentzer, B., and Kobayasi, T. (1980). Adult human skin maintained in organ culture. II. The ultrastructure of the cellular compartment of connective tissue. Acta Derm Venereol *60*, 465-476.

Hotchin, N. A., Gandarillas, A., and Watt, F. M. (1995). Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. J Cell Biol *128*, 1209-1219.

Houenou, L. J., D'Costa, A. P., Li, L., Turgeon, V. L., Enyadike, C., Alberdi, E., and Becerra, S. P. (1999). Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. J Comp Neurol *412*, 506-514.

Hunt, T. K., Hopf, H., and Hussain, Z. (2000). Physiology of wound healing. Adv Skin Wound Care *13*, 6-11.

Hwang, E. A., Lee, H. B., and Tark, K. C. (2001). Comparison of bone morphogenetic protein receptors expression in the fetal and adult skin. Yonsei Med J *42*, 581-586.

Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol *10*, 205-219.

Jahoda, C. A., Horne, K. A., and Oliver, R. F. (1984). Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. Nature *311*, 560-562.

Jahoda, C. A., and Reynolds, A. J. (1996). Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. Dermatol Clin *14*, 573-583.

Javaherian, A., Vaccariello, M., Fusenig, N. E., and Garlick, J. A. (1998). Normal keratinocytes suppress early stages of neoplastic progression in stratified epithelium. Cancer Res *58*, 2200-2208.

Jonas, E., Sargent, T. D., and Dawid, I. B. (1985). Epidermal keratin gene expressed in embryos of Xenopus laevis. Proc Natl Acad Sci U S A *82*, 5413-5417.

Jones, C. M., Lyons, K. M., and Hogan, B. L. (1991). Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. Development *111*, 531-542.

Jowett, A. K., Vainio, S., Ferguson, M. W., Sharpe, P. T., and Thesleff, I. (1993). Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx 1 and msx 2 gene expression in the developing murine molar tooth. Development *117*, 461-470.

Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., and Karin, M. (1996). c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. Cell *87*, 929-939.

Knochel, S., Schuler-Metz, A., and Knochel, W. (2000). c-Jun (AP-1) activates BMP-4 transcription in Xenopus embryos. Mech Dev *98*, 29-36.

Kohase, M., May, L. T., Tamm, I., Vilcek, J., and Sehgal, P. B. (1987). A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1. Mol Cell Biol *7*, 273-280.

Koli, K., Myllarniemi, M., Vuorinen, K., Salmenkivi, K., Ryynanen, M. J., Kinnula, V. L., and Keski-Oja, J. (2006). Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Pathol *169*, 61-71.

Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J., and Roop, D. R. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. Genes Dev *18*, 126-131.

Kozaki, K., Miyaishi, O., Koiwai, O., Yasui, Y., Kashiwai, A., Nishikawa, Y., Shimizu, S., and Saga, S. (1998). Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, caspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells. J Biol Chem *273*, 15125-15130.

Kratchmarova, I., Kalume, D. E., Blagoev, B., Scherer, P. E., Podtelejnikov, A. V., Molina, H., Bickel, P. E., Andersen, J. S., Fernandez, M. M., Bunkenborg, J., *et al.* (2002). A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. Mol Cell Proteomics *1*, 213-222.

Kuan, C. Y., Yang, D. D., Samanta Roy, D. R., Davis, R. J., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. Neuron *22*, 667-676.

Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. Nature *358*, 417-421.

Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. Bioessays *18*, 567-577.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Laurikkala, J., Pispa, J., Jung, H. S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., Galceran, J., Grosschedl, R., and Thesleff, I. (2002). Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. Development *129*, 2541-2553.

Lavker, R. M., and Sun, T. T. (1982). Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. Science *215*, 1239-1241.

Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., and Cohen, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. Curr Biol *8*, 1387-1390.

Leigh I. M., Watt F. M. (1994) The culture of human epidermal keratinocytes. In: *The Keratinocyte Handbook.* Cambridge: Cambridge University Press; 43-52, 1994.

Lever W. F. (1984). Histopathology of the skin. (Lever W.F.; Schaumberger-Lever G.). Philadelphia.

Levy, L., Broad, S., Diekmann, D., Evans, R. D., and Watt, F. M. (2000). beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. Mol Biol Cell *11*, 453-466.

Li, G., Gustafson-Brown, C., Hanks, S. K., Nason, K., Arbeit, J. M., Pogliano, K., Wisdom, R. M., and Johnson, R. S. (2003). c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. Dev Cell *4*, 865-877.

Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. Embo J *14*, 1785-1797.

Lonai, P. (2003). Epithelial mesenchymal interactions, the ECM and limb development. J Anat *202*, 43-50.

Lorenz, J. (2004). Diplomarbeit: Identifizierung von spezifischen und gemeinsamen Zielgenen der IKK/NFκB und JNKSignalwege mittels kombinatorischem DNA-Microarray Screen.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem *193*, 265-275.

Luger, T. A., and Schwarz, T. (1995). The role of cytokines and neuroendocrine hormones in cutaneous immunity and inflammation. Allergy *50*, 292-302.

Lyons, K. M., Pelton, R. W., and Hogan, B. L. (1989). Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. Genes Dev *3*, 1657-1668.

Lyons, K. M., Pelton, R. W., and Hogan, B. L. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). Development *109*, 833-844.

Maas-Szabowski, N., Shimotoyodome, A., and Fusenig, N. E. (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. J Cell Sci *112 (Pt 12)*, 1843-1853.

Maas-Szabowski, N., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (2000). Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. J Invest Dermatol *114*, 1075-1084.

Mace, K. A., Pearson, J. C., and McGinnis, W. (2005). An epidermal barrier wound repair pathway in Drosophila is mediated by grainy head. Science *308*, 381-385.

Mackenzie, 1994: Leigh I. E., Lane E. B., Watt F. M. 8ed: Epithelial-mesenchymal interactions in the development and maintenance of epithelial tissues. The Keratinocyte Handybook. Cambridge:Cambridge University Press, 1994; p243-257.

Mackenzie, I. C., and Fusenig, N. E. (1983). Regeneration of organized epithelial structure. J Invest Dermatol *81*, 189s-194s.

Mackenzie, I. C., and Hill, M. W. (1984). Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. Cell Tissue Res *235*, 551-559.

Maekawa, T., Bernier, F., Sato, M., Nomura, S., Singh, M., Inoue, Y., Tokunaga, T., Imai, H., Yokoyama, M., Reimold, A.*, et al.* (1999). Mouse ATF-2 null mutants display features of a severe type of meconium aspiration syndrome. J Biol Chem *274*, 17813-17819.

Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science *276*, 75-81.

Martin, P., Hopkinson-Woolley, J., and McCluskey, J. (1992). Growth factors and cutaneous wound repair. Prog Growth Factor Res *4*, 25-44.

Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol *6*, 597-641.

Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M., and et al. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. Cell *61*, 1103-1112.

Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature *398*, 708-713.

Milne, D. M., Campbell, L. E., Campbell, D. G., and Meek, D. W. (1995). p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. J Biol Chem *270*, 5511-5518.

Morley S. M., Lane E. B. (1994) The keratinocyte cytoskeleton. The Keratinocyte Handbook. (Leigh I.M.; Lane E.B.; Watt F.M.; Eds.) Cambridge: Cambridge University Press; 293-322.

Morrissey, J. H., and Green, H. (1978). Differentiation-related death of an established keratinocyte line in suspension culture. J Cell Physiol *97*, 469-476.

Mustonen, T., Tummers, M., Mikami, T., Itoh, N., Zhang, N., Gridley, T., and Thesleff, I. (2002). Lunatic fringe, FGF, and BMP regulate the Notch pathway during epithelial morphogenesis of teeth. Dev Biol *248*, 281-293.

Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K., and Takaoka, K. (1994). Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. J Bone Miner Res *9*, 651-659.

Nguyen, B. C., Lefort, K., Mandinova, A., Antonini, D., Devgan, V., Della Gatta, G., Koster, M. I., Zhang, Z., Wang, J., di Vignano, A. T., *et al.* (2006). Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. Genes Dev *20*, 1028-1042.

Noguchi, K., Kitanaka, C., Yamana, H., Kokubu, A., Mochizuki, T., and Kuchino, Y. (1999). Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem *274*, 32580-32587.

Noselli, S., and Agnes, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in Drosophila morphogenesis. Curr Opin Genet Dev *9*, 466-472.

Nowinski, D., Lysheden, A. S., Gardner, H., Rubin, K., Gerdin, B., and Ivarsson, M. (2004). Analysis of gene expression in fibroblasts in response to keratinocyte-derived factors in vitro: potential implications for the wound healing process. J Invest Dermatol *122*, 216-221.

O'Guin, W. M., Galvin, S., Schermer, A., and Sun, T. T. (1987). Patterns of keratin expression define distinct pathways of epithelial development and differentiation. Curr Top Dev Biol *22*, 97-125.

Ohazama, A., Tucker, A., and Sharpe, P. T. (2005). Organized tooth-specific cellular differentiation stimulated by BMP4. J Dent Res *84*, 603-606.

Oliver, R. F., and Jahoda, C. A. (1988). Dermal-epidermal interactions. Clin Dermatol *6*, 74-82.

Pettet, G., Chaplain, M. A., McElwain, D. L., and Byrne, H. M. (1996). On the role of angiogenesis in wound healing. Proc Biol Sci *263*, 1487-1493.

Piscione, T. D., Phan, T., and Rosenblum, N. D. (2001). BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and -independent pathways. Am J Physiol Renal Physiol *280*, F19-33.

Ponec, M., Gibbs, S., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A., and Mommaas, A. M. (1997). Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. Arch Dermatol Res *289*, 317-326.

Potapova, O., Anisimov, S. V., Gorospe, M., Dougherty, R. H., Gaarde, W. A., Boheler, K. R., and Holbrook, N. J. (2002). Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulation revealed by serial analysis of gene expression. Cancer Res *62*, 3257-3263.

Quan, G. M., Ojaimi, J., Li, Y., Kartsogiannis, V., Zhou, H., and Choong, P. F. (2005). Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. Calcif Tissue Int *76*, 146-153.

Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., and Manfruelli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in Drosophila. Dev Biol *241*, 145-156.

Reimold, A. M., Grusby, M. J., Kosaras, B., Fries, J. W., Mori, R., Maniwa, S., Clauss, I. M., Collins, T., Sidman, R. L., Glimcher, M. J., and Glimcher, L. H. (1996). Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. Nature *379*, 262-265.

Reinhard, C., Shamoon, B., Shyamala, V., and Williams, L. T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. Embo J *16*, 1080-1092.

Rennekampff, H. O., Hansbrough, J. F., Woods, V., Jr., Dore, C., Kiessig, V., and Schroder, J. M. (1997a). Role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA/gro) on keratinocyte function in wound healing. Arch Dermatol Res *289*, 204-212.

Rennekampff, H. O., Kiessig, V., Griffey, S., Greenleaf, G., and Hansbrough, J. F. (1997b). Acellular human dermis promotes cultured keratinocyte engraftment. J Burn Care Rehabil *18*, 535-544.

Reynolds, A. J., Oliver, R. F., and Jahoda, C. A. (1991). Dermal cell populations show variable competence in epidermal cell support: stimulatory effects of hair papilla cells. J Cell Sci *98 (Pt 1)*, 75-83.

Rheinwald, J. G., and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell *6*, 331-343.

Rice, R. H., and Green, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. Cell *18*, 681-694.

Riesgo-Escovar, J. R., and Hafen, E. (1997). Drosophila Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. Genes Dev *11*, 1717-1727.

Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A., and Hafen, E. (1996). The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. Genes Dev *10*, 2759-2768.

Rikimaru, K., Moles, J. P., and Watt, F. M. (1997). Correlation between hyperproliferation and suprabasal integrin expression in human epidermis reconstituted in culture. Exp Dermatol *6*, 214-221.

Robinson, G. W., Karpf, A. B., and Kratochwil, K. (1999). Regulation of mammary gland development by tissue interaction. J Mammary Gland Biol Neoplasia *4*, 9-19.

Robinson, M., Reynolds, A. J., Gharzi, A., and Jahoda, C. A. (2001). In vivo induction of hair growth by dermal cells isolated from hair follicles after extended organ culture. J Invest Dermatol *117*, 596-604.

Rogers, M. B., Rosen, V., Wozney, J. M., and Gudas, L. J. (1992). Bone morphogenetic proteins-2 and -4 are involved in the retinoic acid-induced differentiation of embryonal carcinoma cells. Mol Biol Cell *3*, 189-196.

Rogge, R., Green, P. J., Urano, J., Horn-Saban, S., Mlodzik, M., Shilo, B. Z., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (1995). The role of yan in mediating the choice between cell division and differentiation. Development *121*, 3947-3958.

Ruiz, S., Segrelles, C., Bravo, A., Santos, M., Perez, P., Leis, H., Jorcano, J. L., and Paramio, J. M. (2003). Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. Development *130*, 2341-2353.

Sabapathy, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M., and Wagner, E. F. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. Mech Dev *89*, 115-124.

Sakai, K., Hiripi, L., Glumoff, V., Brandau, O., Eerola, R., Vuorio, E., Bosze, Z., Fassler, R., and Aszodi, A. (2001). Stage-and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. Matrix Biol *19*, 761-767.

Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M., and Zon, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature *372*, 794-798.

Sasaki, Y., Naishiro, Y., Oshima, Y., Imai, K., Nakamura, Y., and Tokino, T. (2005). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. Oncogene *24*, 5131-5136.

Sato, T., Kirimura, Y., and Mori, Y. (1997). The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts. J Invest Dermatol *109*, 334-339.

Schmid, P., Cox, D., Bilbe, G., Maier, R., and McMaster, G. K. (1991). Differential expression of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 genes during mouse embryogenesis. Development *111*, 117-130.

Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin. 2000. 28. Auflage. ISBN 3-540-66733-4

Schroder, J. M. (1995). Cytokine networks in the skin. J Invest Dermatol *105*, 20S-24S.

Seigel, G. M., Tombran-Tink, J., Becerra, S. P., Chader, G. J., Diloreto, D. A., Jr., del Cerro, C., Lazar, E. S., and del Cerro, M. (1994). Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. Growth Factors *10*, 289-297.

Sengel, P. (1990). Pattern formation in skin development. Int J Dev Biol *34*, 33-50.

Shannon, J. M., and Hyatt, B. A. (2004). Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. Annu Rev Physiol *66*, 625-645.

Sharov, A. A., Weiner, L., Sharova, T. Y., Siebenhaar, F., Atoyan, R., Reginato, A. M., McNamara, C. A., Funa, K., Gilchrest, B. A., Brissette, J. L., and Botchkarev, V. A. (2003). Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation. Embo J *22*, 2992-3003.

Simon, M., and Green, H. (1984). Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. Cell *36*, 827-834.

Singer, A. J., and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. N Engl J Med *341*, 738-746.

Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J., and Ip, Y. T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila. Genes Dev *10*, 2745-2758.

Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. E. (1993). Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. J Cell Biol *122*, 417-429.

Stadnyk, A. W. (1994). Cytokine production by epithelial cells. Faseb J *8*, 1041-1047.

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.

Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V., and Tombran-Tink, J. (1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 1526-1530.

Stitt, A. W., Graham, D., and Gardiner, T. A. (2004). Ocular wounding prevents pre-retinal neovascularization and upregulates PEDF expression in the inner retina. Mol Vis *10*, 432-438.

Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., and Yamada, G. (2000). Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf10 gene. FEBS Lett *481*, 53-56.

Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E., and Angel, P. (2000). c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. Cell *103*, 745-755.

Taha, M. F., Valojerdi, M. R., and Mowla, S. J. (2006). Effect of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on adipocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. Anat Histol Embryol *35*, 271-278.

Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J., and Schwartz, J. P. (1995). Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. J Neurochem *64*, 2509-2517.

Tao, J., Kuliyev, E., Wang, X., Li, X., Wilanowski, T., Jane, S. M., Mead, P. E., and Cunningham, J. M. (2005). BMP4-dependent expression of Xenopus Grainyhead-like 1 is essential for epidermal differentiation. Development *132*, 1021-1034.

Tibbles, L. A., and Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. Cell Mol Life Sci *55*, 1230-1254.

Tindberg, N., Porsmyr-Palmertz, M., and Simi, A. (2000). Contribution of MAP kinase pathways to the activation of ATF-2 in human neuroblastoma cells. Neurochem Res *25*, 527-531.

Ting, S. B., Caddy, J., Hislop, N., Wilanowski, T., Auden, A., Zhao, L. L., Ellis, S., Kaur, P., Uchida, Y., Holleran, W. M.*, et al.* (2005). A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice. Science *308*, 411-413.

Tomasek, J. J., GAbb.iani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 349-363.

Tombran-Tink, J., Chader, G. G., and Johnson, L. V. (1991). PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. Exp Eye Res *53*, 411-414.

Tombran-Tink, J., and Johnson, L. V. (1989). Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci *30*, 1700-1707.

Tombran-Tink, J., Lara, N., Apricio, S. E., Potluri, P., Gee, S., Ma, J. X., Chader, G., and Barnstable, C. J. (2004). Retinoic acid and dexamethasone regulate the expression of PEDF in retinal and endothelial cells. Exp Eye Res *78*, 945-955.

Tombran-Tink, J., Mazuruk, K., Rodriguez, I. R., Chung, D., Linker, T., Englander, E., and Chader, G. J. (1996). Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. Mol Vis *2*, 11.

Tombran-Tink, J., Shivaram, S. M., Chader, G. J., Johnson, L. V., and Bok, D. (1995). Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. J Neurosci *15*, 4992-5003.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. Science *288*, 870-874.

Tuan, T. L., Keller, L. C., Sun, D., Nimni, M. E., and Cheung, D. (1994). Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. J Cell Sci *107 (Pt 8)*, 2285-2289.

Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. Science *150*, 893-899.

Utsugi, M., Dobashi, K., Ishizuka, T., Masubuchi, K., Shimizu, Y., Nakazawa, T., and Mori, M. (2003). C-Jun-NH2-terminal kinase mediates expression of connective tissue growth factor induced by transforming growth factor-beta1 in human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol *28*, 754-761.

Ventura, J. J., Kennedy, N. J., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2004). JNK regulates autocrine expression of TGF-beta1. Mol Cell *15*, 269-278.

Ventura, J. J., Kennedy, N. J., Lamb, J. A., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2003). c-Jun NH(2)-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. Mol Cell Biol *23*, 2871-2882.

Vogt, R. R., Unda, R., Yeh, L. C., Vidro, E. K., Lee, J. C., and Tsin, A. T. (2006). Bone morphogenetic protein-4 enhances vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelial cells. J Cell Biochem.

Waelti, E. R., Inaebnit, S. P., Rast, H. P., Hunziker, T., Limat, A., Braathen, L. R., and Wiesmann, U. (1992). Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6. J Invest Dermatol *98*, 805-808.

Wang, X. J., Greenhalgh, D. A., Bickenbach, J. R., Jiang, A., Bundman, D. S., Krieg, T., Derynck, R., and Roop, D. R. (1997). Expression of a dominant-negative type II transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF-beta-mediated growth inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 2386-2391.

Warburton, D., Zhao, J., Berberich, M. A., and Bernfield, M. (1999). Molecular embryology of the lung: then, now, and in the future. Am J Physiol *276*, L697-704.

Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *353*, 831-837.

Watt, F. M., and Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. Science *287*, 1427-1430.

Weiss, L. W., and Zelickson, A. S. (1975). Embryology of the epidermis: ultrastructural aspects. II. Period of differentiation in the mouse with mammalian comparisons. Acta Derm Venereol *55*, 321-329.

Werner, S. (1998). Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. Cytokine Growth Factor Rev *9*, 153-165.

Werner, S., Breeden, M., Hubner, G., Greenhalgh, D. G., and Longaker, M. T. (1994a). Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. J Invest Dermatol *103*, 469-473.

Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev *83*, 835-870.

Werner, S., and Smola, H. (2001). Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. Trends Cell Biol *11*, 143-146.

Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M. T., Krieg, T., Hofschneider, P. H., and Williams, L. T. (1994b). The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. Science *266*, 819-822.

Westman,A., Karlsson,G. and Ekman,R. (1998) Proc. 14th Intern. Mass Spectrom. Conference, Tampere, Finland, August 25–29, TuOr17. In Karjalainen *et al.* (eds.), *Adv. Mass Spectrom.*, 14. Elsevier Sci.B.V. Amsterdam

Weston, C. R., and Davis, R. J. (2002). The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Genet Dev *12*, 14-21.

Weston, C. R., Wong, A., Hall, J. P., Goad, M. E., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2003). JNK initiates a cytokine cascade that causes Pax2 expression and closure of the optic fissure. Genes Dev *17*, 1271-1280.

Weston, C. R., Wong, A., Hall, J. P., Goad, M. E., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2004). The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 14114-14119.

Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R. J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. Science *281*, 1671-1674.

Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med *74*, 589-607.

Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. Trends Biochem Sci *23*, 481-485.

Wilson, N., Hynd, P. I., and Powell, B. C. (1999). The role of BMP-2 and BMP-4 in follicle initiation and the murine hair cycle. Exp Dermatol *8*, 367-368.

Wilson, P. A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. Nature *376*, 331-333.

Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., and Hogan, B. L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. Genes Dev *9*, 2105-2116.

Wisdom, R. (1999). AP-1: one switch for many signals. Exp Cell Res *253*, 180-185.

Xu, X., Jeong, L., Han, J., Ito, Y., Bringas, P., Jr., and Chai, Y. (2003). Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGF-beta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. Int J Dev Biol *47*, 31-39.

Yamaguchi, Y., Itami, S., Watabe, H., Yasumoto, K., Abdel-Malek, Z. A., Kubo, T., Rouzaud, F., Tanemura, A., Yoshikawa, K., and Hearing, V. J. (2004). Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. J Cell Biol *165*, 275-285.

Yamaguchi, Y., and Yoshikawa, K. (2001). Cutaneous wound healing: an update. J Dermatol *28*, 521-534.

Yamasaki, M., Miyake, A., Tagashira, S., and Itoh, N. (1996). Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem *271*, 15918-15921.

Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R., and Templeton, D. J. (1994). Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. Nature *372*, 798-800.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., and McKeon, F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature *398*, 714-718.

Yang, D. D., Kuan, C. Y., Whitmarsh, A. J., Rincon, M., Zheng, T. S., Davis, R. J., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature *389*, 865-870.

Zenz, R., Scheuch, H., Martin, P., Frank, C., Eferl, R., Kenner, L., Sibilia, M., and Wagner, E. F. (2003). c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. Dev Cell *4*, 879-889.

Zhang, J. Y., Green, C. L., Tao, S., and Khavari, P. A. (2004). NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. Genes Dev *18*, 17-22.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.
Die Arbeit wurde weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Heidelberg, den 20.12.2006

_____
Julia Knebel

Curriculum Vitae

Julia Knebel
Rottmannstr. 42
69121 Heidelberg
Telefon: +49 – 6221 – 40 84 69
Mobile: +49 – 176 – 22 76 01 30
E-mail: j.knebel@dkfz.de
geboren: 12 September, 1978 in Limburg/Lahn

Ausbildung

Juli 2003 – heute	**Dissertation** (D. rer. nat.) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg, Abteilung Signaltransduktion und Wachstumskontrolle (Prof. Dr. P. Angel) zum Thema: „mesenchymal-epitheliale Interaktion: Identifizierung JNK-abhängiger löslicher Proteine, die von Fibroblasten sezerniert werden und in Keratinozyten die terminale Differenzierung initiieren“
Okt. 1998 – Feb. 2003	**Studium** der Biologie an der Justus-Liebig Universität, Giessen; Studienschwerpunkte in Genetik, Biochemie, Tierphysiologie (Diplom mit Auszeichnung: Gesamtnote 1,0; Vordiplom mit Note 1,0)
Juni 2002 – Feb. 2003	**Diplomarbeit** an der Mayo Clinic, Rochester, USA; Department of Biochemistry and Molecular Biology (Prof. Janknecht); Thema: „Charakterisierung des transkriptionellen Regulators TSGA“
Sep. 1986 – Juni 1998	**Fürst-Johann-Ludwig-Schule**, gymnasialer Zweig; Juni 1998 Abitur (Abschlussnote 2,2)

Praktika

Okt. 2001 – Dez. 2001	**Laborpraktikum** an der Mayo Clinic, Rochester, MN, USA im Labor von Prof. Janknecht; Thema: “Sind ER71 and PINK-1 Interaktionspartner? “
Nov. 2000 – Feb. 2001	**Wissenschaftliche Hilfskraft** an der zentralen biotechnischen Zentraleinheit der Universität Giessen: Elektronenmikroskopische Auswertung immunogold-gefärbter Gehirne von *Carassius auratus*
Sep. 2000 – Okt. 2000	**Praktikum** bei Henkel KGaA in der Abteilung VTB/Biochemie Haut: "*In vivo* Studien zur Bewertung der lokalen Verträglichkeit von Fertigprodukten und Rohstoffen und Wirksamkeitsnachweis von Kosmetikprodukten" unter Anleitung von Dr. Maienschein
Aug. 1998 – Sep. 1998	**Praktikum** im St. Vincent-Krankenhaus, Limburg

Stipendien

Jan. 2003 – Juli 2006	**Boehringer Ingelheim Fonds**, Graduiertenstipendium
Juni 2002 – Dez. 2002	**Deutscher Akademischer Austauschdienst,** Stipendium zur Durchführung einer Abschlussarbeit im Ausland

Fortbildungen

Posterplanung und Gestaltung, DKFZ, 2004, Heidelberg
Boehringer Ingelheim Fonds Präsentationskurs: Erfolgreich Präsentieren (Vorträge, wissenschaftliche Texte und Abb.ildungen), 2005, Blaubeuren
Betriebswirtschaftliches Know-how, DKFZ, 2005, Heidelberg
Projektmanagement für Naturwissenschaftler, DKFZ, 2006, Heidelberg
Konflikte erkennen, verstehen und lösen, DKFZ, 2006, Heidelberg

Sonstige Qualifikationen

Sprachen	Englisch: verhandlungssicher in Wort und Schrift Portugiesisch (Brasilien): Volkshochschule Stufe 2 Französisch: Grundkenntnisse
EDV-Kenntnisse	sicherer Umgang mit allen gängigen Microsoft Office Anwendungen, Internet, Adobe Illustrator, Photoshop, DNA-Star und End Note

Patente

Erfindungsmeldung „Cultivation of primary human keratinocytes under non differentiating conditions“ (eingereicht am 12.9.2006)

Veröffentlichungen und Preise

Knebel J, Maas-Szabowsi N, Schnölzer M, Angel P, Szabowski A. (in preparation) „The combined action of the JNK-dependent fibroblast-derived factors PEDF and BMP-4 regulates keratinocyte commitment“

Knebel J, De Haro L, Janknecht R. (2006). „Repression of transcription by TSGA/Jmjd1a, a novel interaction partner of the ETS protein ER71.“ J Cell Biochem 99(1):319-29

Knebel, J., Szabowski A., Angel, P. Erfindungsmeldung „Cultivation of primary human keratinocytes under non differentiating conditions“ (eingereicht 12.09.2006)

Florin L, Knebel J, Zigrino P, Vonderstrass B, Mauch C, Schorpp-Kistner M, Szabowski A, Angel P. (2006). „Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin.“ J Invest Dermatol 126(4): 902-11

Knebel J. (2004). „Identification and characterization of a keratinocyte commitment factor“ B.I.F. FUTURA 10 (2)

Talkpreis des Graduiertenforums für den Beitrag „PEDF is a JNK-reglated, c-Jun independent soluble protein modulating keratinocyte proliferation“. IX Graduiertenseminar in Weil der Stadt, 22-25 Mai, 2005