

Funktionelle Insulin Rezeptor Signalkomplexe und ihre Funktion in humanen Epidermiszellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im
Fachbereich Biologie und Chemie

vorgelegt von Sofia Depner

Angefertigt am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität
Gießen und am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. P.R. Schreiner
Erst Gutachter: Prof. Dr. A. Dorresteijn
Zweit Gutachter: PD Dr. D. Breitkreutz

Gießen, im Juni 2006

Die praktische Arbeit für diese Dissertation wurde zwischen Oktober 2002 und Juni 2006 in der Arbeitsgruppe „Tumor und Mikroumgebung“ des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 Diabetes mellitus	14
1.1.1 Komplikationen bei Diabetes mellitus	15
1.1.2 Dermatologische Komplikationen bei Diabetes mellitus	16
1.2 Die Menschliche Haut	17
1.2.1 Die Basalmembran	20
1.2.2 Integrine	21
1.2.2.1 Integrine in der Epidermis	23
1.2.2.2 Integrine und Signaltransduktion	24
1.3 Insulin-IGF-Familie	26
1.3.1 Struktur des Insulin Rezeptors	28
1.3.2 Insulin Rezeptor Signaltransduktion	29
1.4 Protein-Kinase C	33
1.4.1 PKC in der Haut	33
1.4.2 PKC und Insulin-Signaltransduktion	34
1.4.3 PKC und Integrine	34
1.5 HaCaT als Modellsystem	35
2 Zielsetzung	37
3 Material und Methoden	39
3.1 Zellkultivierung	40
3.1.1 Medien und Lösungen	40
3.1.2 Verwendete Zellen	41
3.1.2.1 HaCaT-Keratinocyten	41
3.1.2.2 Primäre humane Fibroblasten	41
3.1.2.3 Passagierung der Zellen	41
3.1.2.4 Einfrieren von Zellen	42
3.1.2.5 Test auf Mykoplasmenkontamination	42
3.1.3 Herstellung von <i>in vitro</i> -Hautäquivalenten	43
3.1.3.1 Isolierung von Kollagen für die Gele der organotypischen Kokultur	43
3.1.3.2 Standardprotokoll für organotypische Kokulturen (OTK)	43

3.2 „Knock down“ von Insulin Rezeptor und IGF-1 Rezeptor mit der siRNA-Methode	44
.....	
3.2.1 Design von Insulin Rezeptor (IR) und IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) siRNA	45
3.2.2 Herstellung von IR und IGF-1R siRNA	45
3.2.3 Transiente Transfektion von HaCaT K6 Zellen mit IR und IGF-1R siRNA	46
3.2.4 Stabile Transfektion von HaCaT K6 Zellen mit IR siRNA	47
3.2.4.1 Design von Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA	48
3.2.4.2 Klonieren von Haarnadelschleifen-shRNA-Inserts in Expressions-Vektor (p <i>Silencer</i> TM 2.1-H1 neo)	49
3.2.4.3 Transfection von HaCaT K6 Zellen mit p <i>Silencer</i> Plasmid	50
3.2.5 Analyse der Apoptose bei HaCaT K6 Zellen transient transfiziert mit IR oder IGF- 1R siRNA	51
Lösung/Chemicalien	52
3.2.6 Analyse von Zellzahl, Proliferation und Differenzierung bei HaCaT K6 Zellen transient transfiziert mit IR oder IGF-1R siRNA	53
3.2.7 Migrations-Assay („Wund-Assay“)	54
3.2.8 Proliferations-Assay	55
3.3 Protein-Analyse	56
3.3.1 Lyse der Zellen	56
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	57
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	57
3.3.4 Western Blot	59
3.3.5 Immundetektion	59
3.4 Nachweis der mRNA-Expression	60
3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA	60
3.4.2 Reverse Transkription	60
3.4.3 Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion	61
3.4.3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen	61
3.4.3.2 Verwendete Primer und PCR-Bedingungen	63
3.4.4 DNA-Gelelektrophorese	63
3.5. Gewebeaufarbeitung	64
3.5.1 Histologie	64
3.5.2 Gefrierschnitte	64
3.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz	64

3.5 Nachweis von Proteinkomplexen	66
3.5.1 Lyse der Zellen.....	66
3.5.2 Kopräzipitation.....	67
3.6 Dichte-Gradienten-Zentrifugation	67
3.6.1 Zell-Lyse und Zentrifugation	68
3.6.2 Protein Fällung	68
4 Ergebnisse	70
4.1 Transiente Transfektion von HaCaT K6 Keratinozyten mit IR und IGF-1R siRNA	71
4.1.1 Reduktionseffekt von verschiedenen siRNA Sequenzen auf IR und IGF-1R Expression	71
4.1.2 Beeinflussung der Zell-Zahl durch transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit IR oder IGF-1R siRNA	74
4.1.3 Analyse der Proliferation bei HaCaT-Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNA	75
4.1.4 Analyse der Apoptose bei HaCaT-Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNA	78
4.1.5 Beeinflussung der Differenzierung durch transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit IR oder IGF-1R siRNA	81
4.2 Stabile Transfektion von HaCaT K6 Keratinozyten mit Insulin Rezeptor (IR) siRNA.....	88
4.2.1 Analyse der mRNA- und Protein-Expression bei stabil transfizierten IR-„Knock Down“ (IR-KD) Zell-Klonen	88
4.2.2 Analyse der Proliferation bei stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen	90
4.2.3 Analyse der Migration bei stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen	92
4.3 Organotypische Kokulturen (OTK)	97
4.3.1 Histologie	97
4.3.2 Analyse von Proliferation, Differenzierung, Basalmembran- und Hemidesmosomen-Komponenten in 3D Kokultur	101
4.3.2.1 Proliferation in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen.....	101
4.3.2.2 Differenzierung in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen	102
4.3.2.3 Basalmembran-Komponenten in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen	105

4.3.2.4 Komponenten der Hemidesmosomen in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen	110
4.4 Bildung von Membran-Komplexen bei HaCaT K6 und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen.....	114
4.4.1 Immunkopräzipitation mit IR.....	114
4.4.2 Immunkopräzipitation mit Phosphotyrosinen	116
4.4.3 Immunkopräzipitation mit IGF-1R	117
4.4.3.1 Komplex-Bildung mit PKC α und PKC δ	117
4.4.3.2 Komplex-Bildung mit Caveolin-1	118
4.4.3.3 Komplex-Bildung mit Integrin $\alpha 6\beta 4$	119
4.5 Dynamik von Membran-Komplexen bei HaCaT K6 und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen.....	120
5 Diskussion	123
5.1 Suppression von Proteinen mittels siRNA-Methode.....	124
5.2 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf das Verhalten von HaCaT-Zellen in zweidimensionalen (2D) Kulturen.....	126
5.2.1 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf die Proliferation von HaCaT-Zellen	126
5.2.2 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf Apoptose von HaCaT-Zellen.....	128
5.2.3 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf Differenzierung von HaCaT-Zellen	130
5.2.4 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf Zellwachstum	132
5.2.5 Einfluss der stabilen IR-Suppression auf Gen-Expressionsmuster in HaCaT-Zellen	133
5.2.6 Einfluss der stabilen IR-Suppression auf Migration von HaCaT-Zellen	135
5.3 Einfluss von IR-Suppression auf Wachstumsverhalten und Differenzierung in dreidimensionalen Kokulturen.....	136
5.3.1 Epithelbildung und Struktur	136
5.3.2 Proliferation von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen in OTKs	138
5.3.3 Differenzierung von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen in OTKs.....	139
5.3.4 Basalmembran in OTKs von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen	140
5.3.5 Hemidesmosomen in OTKs von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen	141
5.4 Einfluss der IR-Suppression auf die Bildung von Membran-Komplexen in HaCaT-Zellen	142

5.4.1 Interaktionen zwischen IR und anderen Proteinen in Kontroll-HaCaT-Zellen.....	142
5.4.2 Interaktionen zwischen IGF-1R und anderen Proteinen in HaCaT-Zellen und IR- KD Klonen.....	145
6 Zusammenfassung.....	147
7 Summary.....	150
8 Literatur.....	153
9 Anhang.....	174

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Regulation des Glucose-Metabolismus.....	14
Abbildung 2: Häufige dermatologische Komplikationen bei Diabetes mellitus.....	16
Abbildung 3: Aufbau der humanen Haut.. ..	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Epidermisschichten	19
Abbildung 5: Vorkommen und Assoziation der verschiedenen α - und β -Integrinketten.....	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung von Fokalkontakten und Hemidesmosomen.	23
Abbildung 7: Bindungsaffinitäten von Rezeptoren aus IR-IGF-Familie zu verschiedenen Liganden und Bindungsaffinitäten von Hybrid-Rezeptoren.....	27
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Insulin Rezeptors.....	28
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des IR (MAP-Kinase-Weg und PI-3-Kinase abhängiger Weg).....	30
Abbildung 10: Schematische Darstellung der IR Signaltransduktion (PI-3-Kinase- unabhängiger Weg);	32
Abbildung 11: HaCaT-Modell der epidermalen Tumor-Progression.	36
Abbildung 12: Herstellung von siRNAs mit dem „ <i>Silencer Construction Kit</i> “	46
Abbildung 13: p <i>Silencer</i> Vektor-Karte.	47
Abbildung 14: „Haarnadelschleifen“-siRNA.....	48
Abbildung 15: Design von Haarnadelschleifen-shRNA Matrize.....	49
Abbildung 16: Protein-Expression in HaCaT-Zellen nach der transienten Transfektion mit IR und IGF-1R siRNAs.....	73
Abbildung 17: Die Veränderung der Zell-Zahl in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.	75
Abbildung 18: Proliferierende Zellen in Kontrollen und transient transfizierten Zellen.....	76
Abbildung 19: Analyse der Intensität der Proliferations-Signale in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs.....	77
Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der Proliferation in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.....	78
Abbildung 21: Apoptotische Signale in Kontrollen und transient transfizierten Zellen.....	79
Abbildung 22: Analyse der Intensität der apoptotischen Signale in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs.....	80
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Apoptose in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.....	81

Abbildung 24: Ansammlungen von parakeratotischen Kernen bei den IR transient supprimierten Zellen.	82
Abbildung 25: Die Expression des Keratins 1/10 in Kontrollen und transient transfizierten Zellen.	83
Abbildung 26: Analyse der K1/10-Expression in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs.	83
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Keratin 1/10-Expression in Kontrollen und IR oder IGF- 1R transient supprimierten Zellen.	84
Abbildung 28: Die Expression des Filaggrins in Kontrollen und transient transfizierten Zellen	85
Abbildung 29: Analyse der Filaggrin-Expression in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs	86
Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Filaggrin-Expression in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.....	86
Abbildung 31: PCR und Western Blots von den stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen.	90
Abbildung 32: Proliferations-Raten bei den Kontroll-Zellen und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen.	91
Abbildung 33: Migrationsassay für Kontroll- Zellen sowie IR-KD Zell-Klone.....	93
Abbildung 34: Quantitative Analyse der Migration von Kontrollen und IR-KD Zell-Klonen.	94
Abbildung 35: Quantitative Analyse der Migration von Kontrollen und IR-KD Zell-Klonen bei der Anwendung des blockierenden Antikörpers gegen IGF-1R.	96
Abbildung 36: Histologie von 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen (OTK) mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen.	100
Abbildung 37: Proliferation in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen.....	102
Abbildung 38: Differenzierung (früh Marker) in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen	103
Abbildung 39: Differenzierung (späte Marker) in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.	104
Abbildung 40: Kollagen IV in den OTKs mit Kontroll-Zellen und mit IR-KD Klonen	105
Abbildung 41: Laminin in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.	106
Abbildung 42: Laminin-5 in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.....	107
Abbildung 43: Perlecan in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.....	108
Abbildung 44: Nidogen in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.....	109

Abbildung 45: Integrin $\alpha 6$ in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.	110
Abbildung 46: CD 151 in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.	111
Abbildung 47: BP 180 in den OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Klonen.....	112
Abbildung 48: HD 1 in den OTKs mit Kontroll-Zellen und mit IR-KD Klonen.....	113
Abbildung 49: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IR und anderen Proteinen in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen.	115
Abbildung 50: Dynamik der Tyrosin-Phosphorylierung in Abhängigkeit von Insulin- Behandlung bei HaCaT-Zellen.....	116
Abbildung 51: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und PKC δ in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen.	118
Abbildung 52: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und Caveolin-1 in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und IR-KD Zell- Klonen	119
Abbildung 53: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und Integrin $\beta 4$ -Kette in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und IR-KD Zell- Klonen	119
Abbildung 54: Verlagerung der IR-Verteilung in unterschiedliche Membran-Domänen in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen	121
Abbildung 55: Verlagerung von Caveolin-1 in unterschiedliche Membran-Domänen in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und IR-KD Zell- Klon.....	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale von Typ 1 und Typ 2 Diabetes	15
Tabelle 2: Verwendete Standardmedien	40
Tabelle 3: Lösungen und Zusätze.....	40
Tabelle 4: Standardkultivierung der Zellen.....	42
Tabelle 5: Zusammensetzung des Kollagengels	44
Tabelle 6: Ausgewählten siRNA Sequenzen	47
Tabelle 7: Konvertierten siRNA Sequenzen	48
Tabelle 8: Verwendeten Lösungen.....	50
Tabelle 9: Restriktion-Ansatz.....	50
Tabelle 10: Verwendeten Lösungen und Chemikalien	52
Tabelle 11: Verwendeten Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	52
Tabelle 12: Verwendeten Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz	53
Tabelle 13: Verwendeten Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	54
Tabelle 14: Verwendeten Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz	54
Tabelle 15: Stimulationsfaktoren für Migrations-Assay	55
Tabelle 16: Antikörper für Migrations-Assay	55
Tabelle 17: Erster Versuchsaufbau für Migrations-Assay	55
Tabelle 18: Zweiter Versuchsaufbau für Migrations-Assay	55
Tabelle 19: Verwendeten Chemikalien zur Lyse der Zellen.....	57
Tabelle 20: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	58
Tabelle 21: Zusammensetzung der bei der Elektrophorese verwendeten Lösungen	58
Tabelle 22: Primäre Antikörper für den Western Blot.....	59
Tabelle 23: Sekundäre Antikörper für den Western Blot.....	60
Tabelle 24: Verwendeten Chemikalien für die Reverse Transkription.....	61
Tabelle 25: Verwendeten Chemikalien zur Polymerase-Ketten-Reaktion	61
Tabelle 26: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen	63
Tabelle 27: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz	65
Tabelle 28: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	66
Tabelle 29: Zusammensetzung von IP-Lysepuffer	67
Tabelle 30: Primäre Antikörper für Immun-Kopräzipitation.....	67
Tabelle 31: Lösungen und Chemikalien für Dichte Gradienten Zentrifugation	68
Tabelle 32: Verwendeten Chemikalien für Protein Fällung.....	69
Tabelle 33: Reduktion der IR Expression bei Anwendung verschiedener siRNA Sequenzen	72

Tabelle 34: Reduktion der IGF-1R Expression bei Anwendung verschiedener siRNA Sequenzen.....	72
Tabelle 35: Effekt des IR und des IGF-1R Signalwegs auf die Expression der Differenzierungsmarker	87
Tabelle 36: mRNA- und Protein-Expression von verschiedenen Proteinen bei den stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen	89
Tabelle 37: Epithel-Architektur von Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen in OTK	100

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Die Homeostase von Glucose ist normalerweise abhängig von der Balance zwischen hepatischer Glucose-Produktion und Glucose-Verwertung durch die wichtigsten insulin-abhängigen Organe, wie Leber, Fettgewebe und Muskeln, aber auch insulin-unabhängigen Organe, wie Gehirn und Nieren. Diese Balance ist sehr genau reguliert durch das pankreatische Hormon **Insulin**. Normale Individuen reagieren auf die Erhöhung des Glucosespiegels in Blutplasma mit einer Steigerung der Insulin-Sekretion der pankreatischen β -Zellen. Die Erhöhung von zirkulierendem Insulin stimuliert die Glucose-Aufnahme und -Speicherung in peripheren Geweben und inhibiert die hepatische Gluconeogenese (Cheatham & Kahn, 1995). Außerdem reguliert Insulin den Lipid-Metabolismus, indem es die Synthese von Fettsäuren in Leber und Triacylglycerinen im Fettgewebe stimuliert. Schließlich fördert Insulin die Aufnahme der Aminosäuren im Muskel und stimuliert somit die Proteinsynthese (Abb. 1).

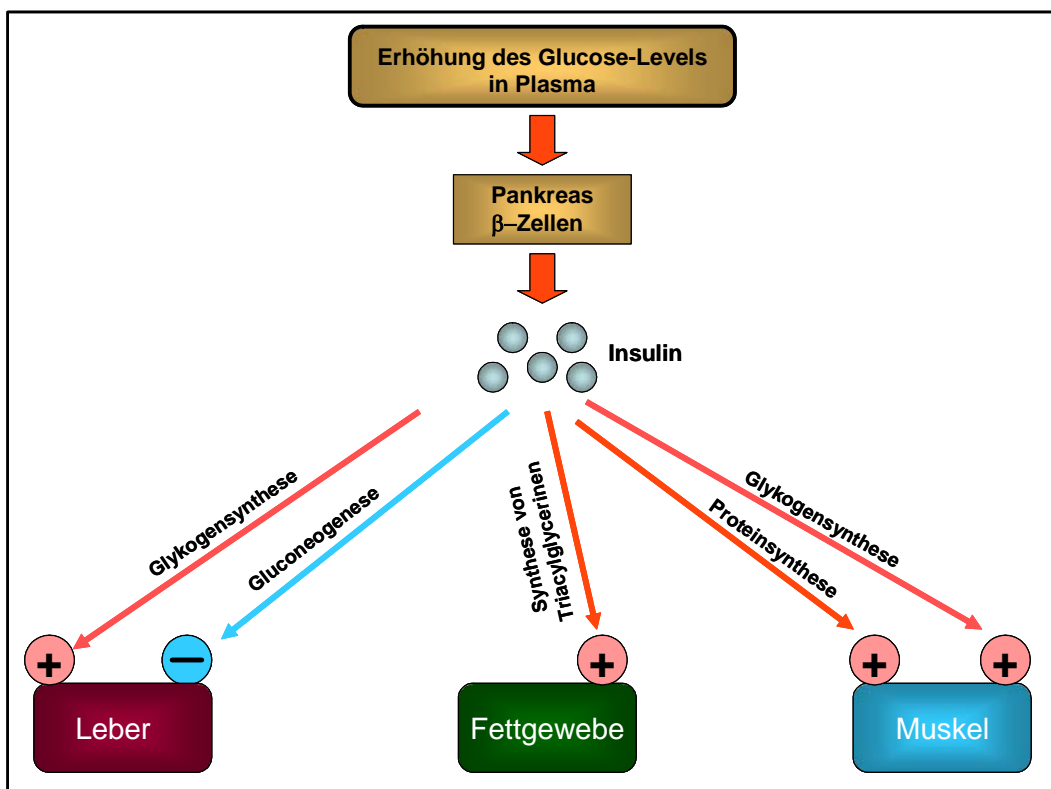


Abbildung 1: Die Regulation des Glucose-Metabolismus. Als Reaktion auf die Erhöhung des Plasma-Glucosespiegels wird Insulin von den pankreatischen β -Zellen sekretiert. Das Hormon unterdrückt die Gluconeogenese in Leber, stimuliert der Glykogensynthese in Leber und Muskel, beschleunigt Protein- und Triacylglycerine-Synthese in Muskel und Fettgewebe.

Störungen der Balance in der Glucose-Homeostase führen meistens zu **Diabetes mellitus**, einer weitverbreiteten heterogenetischen Stoffwechsel-Krankheit, die in manchen ethnischen Gruppen bei mehr als 10 % der Bevölkerung diagnostiziert wird (Baumann & Saltiel, 2001).

Beim Diabetes Typ 1 werden die insulin-produzierenden β -Zellen im Pankreas durch einen Autoimmun-Prozess zerstört, sodass die Patienten auf eine regelmäßige Applikation exogenen Insulins angewiesen sind. Typ 2 Diabetes wird überwiegend bei Erwachsenen diagnostiziert und ist durch zwei fundamentale Defekte charakterisiert: eine gestörte Funktion der β -Zellen, die zu einer anhaltenden Hyperglykämie führt, und Insulin Resistenz, eine verminderte Reaktion der peripheren Geweben auf endogenen Insulin. Die wichtigsten Merkmale von Typ 1 und Typ 2 Diabetes sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Merkmale von Typ 1 und Typ 2 Diabetes

Merkmal	Typ 1 Diabetes	Typ 2 Diabetes
Erblichkeit	gering	stark
Gene	HLA assoziiert	nicht bekannt
Pathogenetische Hauptprinzipien	Insulinitis mit Insulinmangel	Insulinresistenz, gestörte Insulinsekretion
Metabolisches Syndrom	in der Regel fehlend	in der Mehrzahl vorliegend
Stoffwechsel	oft labil, zur Ketose neigend	meist stabil mit Dyslipoproteinämie, Ketoseneigung gering
Manifestationsalter	etwa zur Hälfte Kinder und Jugendliche	mittleres und höheres Erwachsenenalter, in zunehmendem Maße auch bei Kindern und Jugendlichen

1.1.1 Komplikationen bei Diabetes mellitus

Die chronischen Komplikationen des Diabetes können in drei Kategorien zusammengefasst werden:

- a. **Makroangiopathie** – Erkrankungen von großen Blutgefäßen (Arteriosklerose), die zu myokardialen Infarkten und Schlaganfällen führen können;
- b. **Mikroangiopathie** – Veränderungen von kleinen Blutgefäßen, die retinale und renale Vaskularisation beeinflussen und häufig Blindheit und schwere Nierenschäden verursachen;
- c. **Neuropathie** – Veränderungen an motorischen, sensorischen, kranialen und autonomen Nerven (Ejigu, 2000; Huntley & Drugge, 2005).

1.1.2 Dermatologische Komplikationen bei Diabetes mellitus

Alle der drei oben genannten Gruppen der diabetischen Komplikationen können sich in der Haut manifestieren. Mehr als ein Drittel der an Diabetes erkrankten Menschen leiden an unterschiedlichen dermatologischen Läsionen. Manche Hautprobleme treten auch bei Patienten ohne Diabetes auf, werden aber bei Diabetikern viel häufiger diagnostiziert. Dazu gehören beispielsweise bakterielle sowie mykotische Infektionen und Juckreiz (American Diabetes Association, 2005). Andere dermatologische Komplikationen sind zum größten Teil mit der Erkrankung an Diabetes assoziiert. Dazu gehören beispielsweise solche Läsionen wie die Verdickung der Haut (*Scleredema diabeticorum*), das Auftreten von mehreren hyperpigmentierten atrophischen Hautflecken (*diabetische Dermopathie*), spontane Bildung von Blasen (*diabetic Bullae*), nekrotische Veränderungen in der Dermis (*Necrobiosis lipoidica*) und verschiedene Formen von Neuropathie in der Haut (Huntley & Drugge, 2005) (Abb. 2).



Abbildung 2: Häufige dermatologische Komplikationen bei Diabetes mellitus (von Huntley & Drugge 2005).

Viele pathogene Mechanismen können an der Entwicklung diabetischer dermatologischer Komplikationen beteiligt sein. Sowohl vorzeitige Alterung und aberrante Proliferation als auch eine verminderte Produktion von Wachstumsfaktoren und begrenzte Migrationsfähigkeit von dermalen Fibroblasten können eine große Rolle bei der Entstehung von Haut-Läsionen und anormaler Wundheilung spielen. Außerdem wurden bei den diabetischen Haut-

Komplikationen Veränderungen in der Struktur und Funktion der Basalmembran (BM), anormale Synthese von BM-Komponenten und Disregulation der Integrin-Expression festgestellt (Kjellstrom & Malmquist, 1984; Trevisan et al., 1997; Wertheimer et al., 1998; Loots et al., 1999; Black et al., 2003; Lerman et al., 2003).

Ursprünglich war angenommen worden, dass die meisten diabetischen Komplikationen durch einen erhöhten Level von Plasma-Glucose, der für diese Krankheit charakteristisch ist, induziert werden. Neuere Untersuchungen allerdings ergaben, dass eine diabetische Umgebung nicht nur Hyperglykämie sondern auch eine abnormale Insulin-Signaltransduktion einschließt. So wird inzwischen vermutet, dass die Abnormalitäten der Insulin-Signalwegen direkt zur Entstehung von diabetischen Komplikationen beitragen können (Wertheimer et al., 2001).

1.2 Die Menschliche Haut

Die Haut stellt die äußerste Barriere des Körpers zur Umwelt dar und schützt ihn vor mechanischen, chemischen und physikalischen Einwirkungen. Sie besteht aus drei funktionellen Schichten: (1) aus einer sich ständig erneuernden Oberschicht, der **Epidermis**; (2) einer mechanisch stabilen Unterschicht, der **Dermis**; und (3) der darunterliegenden **Hypodermis** (Abb. 3). Epidermis und Dermis sind voneinander durch die **Basalmembran (BM)** getrennt.

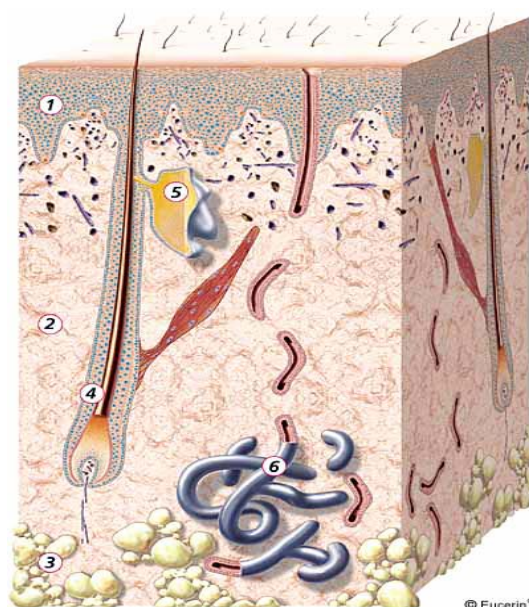


Abbildung 3: Aufbau der humanen Haut. 1 – Epidermis; 2 – Dermis; 3 – Hypodermis; 4 – Haarschaft mit Haarwurzel; 5 – Talgdrüse; 6 – Schweißdrüse (von Eucerin).

Die **Epidermis** ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das überwiegend aus Keratinozyten besteht. Die Epidermis enthält auch Melanozyten zur Bildung von Melanin, der für die UV-Absorption verantwortlich ist, Langerhans-Zellen zur Immunabwehr und Merkel-Zellen als Sensoren für mechanische Einwirkungen.

Die epidermalen Keratinozyten befinden sich in einem ständigen Erneuerungs- und Abstoßungsprozeß und sind in vier Schichten organisiert, die sich sowohl durch die Zellform als auch durch die Expression spezifischer Proteine voneinander unterscheiden (Holbrook, 1994) (Abb. 4).

Die basale Schicht, das *Stratum basale*, ist die proliferative Schicht in der Epidermis und besteht aus rundlichen Zellen, die palisadenartig an der BM über Hemidesmosomen verankert sind. In der basalen Schicht befinden sich die Stammzellen mit unbegrenztem Proliferationsvermögen und „transient amplifying cells“, die nach wenigen Teilungszyklen in die terminale Differenzierung eintreten. Charakteristisch für die Basalzellen ist die Expression des Keratinpaars K5/14. Keratine sind Cytoskelett-Proteine, die Tonofilamente in den epithelialen Zellen ausbilden (Moll et al., 1982; Steinert et al., 1985; Steinert & Roop, 1988).

Die 3-4 Zell-Schichten über der basalen Schicht bilden das *Stratum spinosum*. Die Zellen verändern ihre Form und werden mit wachsendem Abstand vom *Stratum basale* immer flacher. Charakteristisch für die Zellen im *Stratum spinosum* ist die Expression des Keratinpaars K1/10, das ein dichtes Netzwerk von stabilen Tonofilamenten ausbildet und neben den Desmosomen für die mechanische Stabilisierung der Epidermis verantwortlich ist (Garrod et al., 2002). Somit ist K1/10 einer der wichtigsten Marker für die frühen Stadien der Differenzierung (Purkis et al., 1990). Im *Stratum spinosum* beginnt auch die Expression des Enzyms Transglutaminase, das die Quervernetzung der Strukturproteine, wie Loricrin, Keratolinin und des Hüllproteins Involucrin katalysiert.

Das *Stratum granulosum* stellt den Übergang von vitalen zu synthetisch inaktiven Zellschichten dar und ist durch das Auftreten von Keratohyalin granula in den Zellen charakterisiert, die vor allem Filaggrin enthalten und das Keratinfilamentnetz verstärken. An der Innenseite der Plasmamembran beginnt die Ablagerung und Quervernetzung mehrerer Strukturproteine, wie Loricrin und Keratolinin, die zum Aufbau spezieller chemisch resistenter Strukturen, „cornified envelopes“, führt. Filaggrin und Loricrin fungieren somit als Marker für späte Differenzierungsstadien (Steinert et al., 1981; Magnaldo et al., 1990; Hohl et al., 1991).

In den obersten Lagen des *Stratum granulosum* werden Zellkerne und Organellen abgebaut, sowie Proteine und Lipide über sekretorische Vesikel in den Interzellulärraum abgegeben. So

wird der Übergang zum *Stratum corneum* geschaffen, einer mehrschichtigen Zone aus terminal differenzierten Keratinozyten, die in einer extrazellulären Lipid-Matrix eingebettet sind. Nach der Einstellung der metabolischen Aktivität werden die desmosomalen Kontakte gelöst und die Hornzellen abgeschilfert.

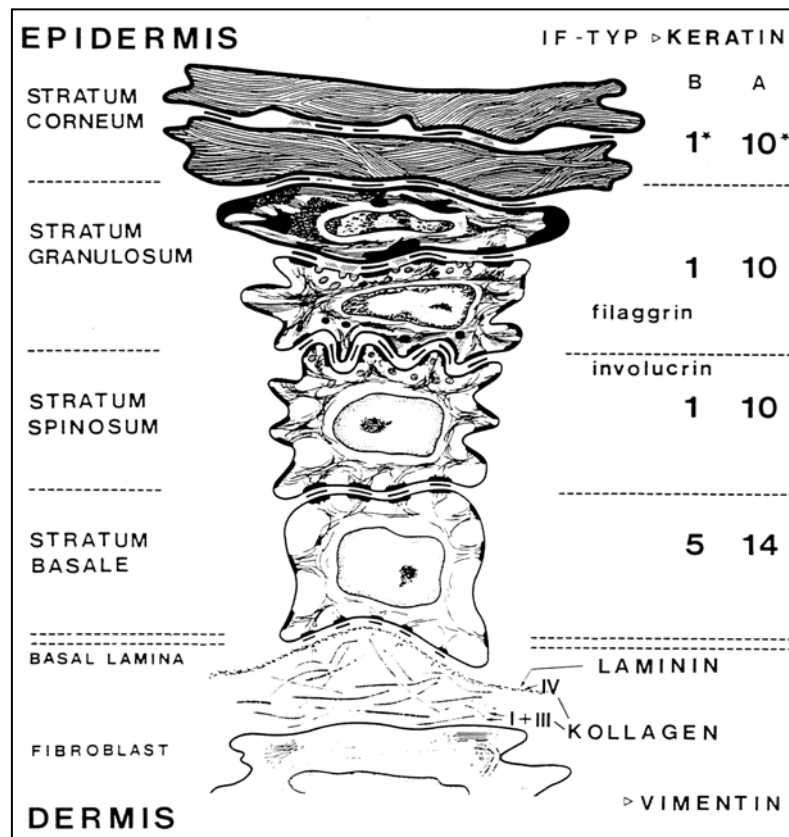


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Epidermisschichten und der Verankerung an die Dermis.

Die Versorgung der Zellen in der Epidermis, die selbst keine Blutgefäße enthält, erfolgt ausschließlich durch Diffusion von Nährstoffen etc. aus der darunter liegenden, gefäßreichen Dermis.

Die **Dermis** ist von der Epidermis durch eine definierte Zone extrazellulärer Matrix (ECM), die sogenannte **Basalmembran** (Basal Lamina), getrennt, während der Übergang von Dermis zu Hypodermis eher diffus ist. Das Bindegewebe der Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen (Typ I und III Kollagen), Reticulinfasern und Proteoglykanen. Dieses ECM-Gerüstsystem wird überwiegend von den eingelagerten Fibroblasten synthetisiert. Daneben enthält die Dermis auch Mastzellen, Blut- und Lymphgefäße, Haarwurzeln und Nervenendigungen.

Die **Hypodermis** verbindet die Haut mit dem darunterliegenden Fettgewebe und besteht aus Bindegewebe, in das energiespeichernde Adipozyten eingelagert sind. Sie ist stark von

Blutgefäßen durchzogen, was eine schnelle Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet. Des Weiteren isoliert das Fettgewebe den Körper und schützt so vor Wärmeverlust.

1.2.1 Die Basalmembran

Basalmembranen (BM) sind flexible dünne (40-120 nm) Schichten hochspezialisierter extrazellulärer Matrix, die das Substrat für die Anheftung von basalen epithelialen sowie endothelialen Zellen bilden. Weiterhin umgeben BM Nerven- und Muskelfasern, glatte Muskeln, Fettzellen und Perizyten und trennen diese Zellen und Gewebe vom umgebenden Bindegewebe. BM dienen nicht nur als Struktur- und Filter-Elemente, sondern spielen eine große Rolle bei der Determinierung der Zellpolarität, Regulation von Zellmetabolismus und Kontrolle von Proliferation und Differenzierung. Schließlich fungieren BM auch als selektive Barrieren oder Leitstrukturen bei Zellbewegungen. So wird der Kontakt zwischen den Fibroblasten der Bindegewebe und den epithelialen Zellen durch die BM verhindert. Andererseits werden Makrophagen oder Lymphozyten nicht gestoppt und können die BM passieren. Auch bei der Geweberegeneration spielen BM eine große Rolle. In der Wundsituation dienen BM als ein Gerüst-Substrat, auf dem die Zellen aus umliegenden Gewebe migrieren können um die Wunde zu schließen.

Die Ultrastruktur der BM-Zone zeigt zwei Schichten, die elektronendurchlässige *Lamina lucida*, die unmittelbar an der Plasmamembran der Zellen liegt, und die elektronendichte *Lamina densa*.

Die BM der Haut ist hauptsächlich aus den Glycoproteinen Laminin, Nidogen, Typ IV Kollagen und dem Heparan-Sulfat-Proteoglycan Perlecan aufgebaut (Yurchenco et al., 1992; Marinkovich, 1993; Timpl & Brown, 1996; Chan, 1997; McMillan et al., 2003).

Laminine sind heterotrimere Moleküle, die aus drei langen, assymetrisch-kreuzförmig angeordneten Polypeptidketten bestehen. Laminin-Moleküle verbinden sich miteinander über ihre N-terminalen Enden und bilden ein hochmolekulares Netzwerk in BM. Laminin, in der adulten Haut überwiegend Laminin-10, assoziiert zusätzlich mit Perlecan und über Nidogen indirekt mit Typ IV Kollagen. Außer Laminin-5, eine kurzkettige Isoform die weitgehend für epidermale Keratinozyten spezifisch ist, werden Laminine sowohl von Keratinozyten als auch von dermalen Fibroblasten synthetisiert.

Typ IV Kollagen kommt fast ausschließlich in Basalmembranen vor und stellt dort neben Laminin das wichtigste Strukturelement dar. Die Typ IV Kollagen-Moleküle bestehen aus der für Kollagen typische dreisträngige Triple-Helix, die hier mehrfach unterbrochen ist, was die Flexibilität des Moleküls bedeutend erhöht. Typ IV Kollagen-Moleküle verbinden sich

miteinander über N- und C-Terminus und bilden ein zweites Netzwerk der BM. Typ IV Kollagen kann sowohl von Fibroblasten als auch von Keratinozyten synthetisiert werden.

Nidogen ist ein integraler Bestandteil der BM. Es assoziiert sowohl mit Laminin als auch mit Typ IV Kollagen und verbindet die zwei Netzwerke miteinander. Nidogen wird in der Haut ausschließlich von Fibroblasten synthetisiert.

Perlecan spielt neben Stabilisierung der Struktur eine wichtige Rolle für regulatorische Funktionen der BM. Seine Heparansulfat-Seitenketten verleihen der BM eine negative Ladung, die für die selektiven Ultrafiltration-Fähigkeiten der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. So interagiert Perlecan mit Laminin, Typ IV Kollagen und Nidogen, aber auch mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren (Sher et al., 2005). Perlecan wird von verschiedenen Zelltypen der Haut (Keratinozyten und Fibroblasten) synthetisiert (Fox et al., 1991; Yurchenko et al., 1992; Timpl & Brown, 1996; Aumailley & Smyth, 1998).

1.2.2 Integrine

Um die Integrität eines Epithels aufrecht zu erhalten, ist es notwendig, dass die Zellen einen stabilen Kontakt mit der darunterliegenden Basalmembran bewahren. Bei den Interaktionen zwischen Bestandteilen der BM und epithelialen Zellen spielen Matrix-Rezeptoren, vornehmlich Integrine, eine entscheidende Rolle, indem sie eine Verknüpfung zwischen der extrazellulären Matrix (ECM) und dem intrazellulären Cytoskelett herstellen (Etzioni, 1999).

Integrine sind Transmembran-Glycoproteine, die aus zwei nicht kovalent verbundenen Untereinheiten (α und β) bestehen. Beide Untereinheiten tragen zur Bindung der Matrixproteine bei. Außerdem besitzt die Kopf-Region der α -Kette einige Bindungsstellen für zweiwertige Ionen (Ca^{2+} oder Mg^{2+} , je nach Integrin-Typ), welche die Bindungen zwischen Integrinen und ihren Liganden beeinflussen (Alberts et al., 1995). Bisher wurden 16 α - und 8 β -Ketten beschrieben, die zusammen 22 Heterodimere bilden (Abb. 5).

Integrine besitzen unterschiedliche Spezifitäten zur Bindung bestimmter Liganden. Manche Integrine dienen als Rezeptoren nur für ein Matrixprotein der ECM, z.B. Laminin oder Kollagen, andere dagegen verbinden sich mit mehreren Matrixproteinen.

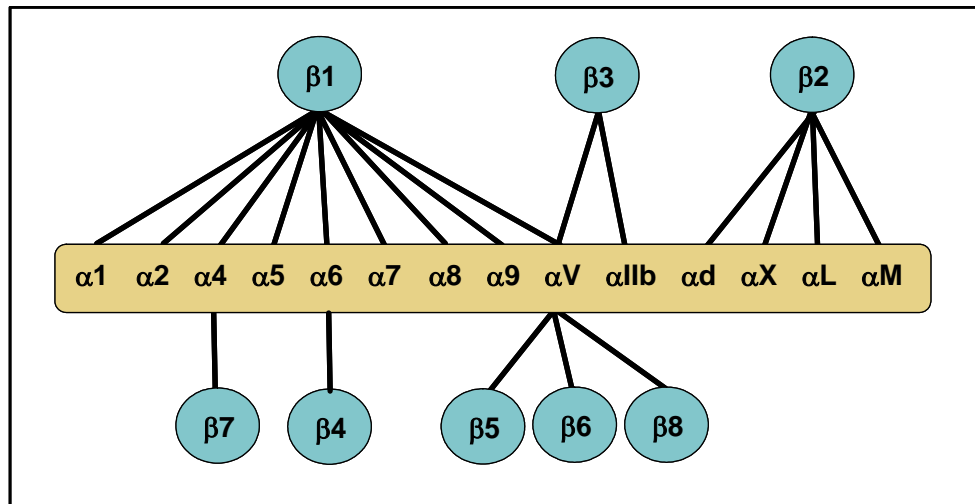


Abbildung 5: Vorkommen und Assoziation der verschiedenen α - und β -Integrinketten.

Nach Interaktion eines Integrins mit seinem Liganden erfolgt die Bindung der cytoplasmatischen β -Kette an Talin, α -Actinin und Vinculin, was zur Bildung eines intrazellulären Adhäsionskomplexes führt (Hemler, 1998; Liu et al., 2000). Diese Komplexe, Fokalkontakte („focal adhesions“) genannt, verbinden Integrine mit den Aktin-Filamenten des Cytoskeletts (Abb. 6, A).

Die einzige Ausnahme bildet das Integrin $\alpha6\beta4$, das eine Verbindung zu den Keratin-Filamenten herstellt. Integrin $\alpha6\beta4$ ist durch eine besonders lange cytoplasmatische Domäne der $\beta4$ -Kette charakterisiert und fungiert als Adhäsionsrezeptor für die meisten Laminine. Als zentraler Bestandteil der Hemidesmosomen hat Integrin $\alpha6\beta4$ die höchste Affinität zu Laminin-5. Laminin-5 dient als Komponente der Anker-Filamenten („anchoring filaments“) und verankert die Hemidesmosomen an der Basalmembran (Borradori & Sonnenberg, 1999).

Hemidesmosomen (HD) sind Multiprotein-Komplexe, welche die Adhäsion der epidermalen Basalzellen an der Basalmembran gewährleisten, indem sie eine Verknüpfung zwischen dem intrazellulärem Keratin-Cytoskelett und den Proteinen der extrazellulären Matrix herstellen. Außerdem determinieren die HD die Gewebe-Architektur, sowie räumliche Organisation und Polarität der Epidermiszellen (Koster et al., 2004). HD bestehen aus einem inneren Plaque, direkt mit den Keratin-Filamenten verknüpft, einem äußeren Plaque, unmittelbar auf der Plasmamembran aufliegend, und Verankerungsfilamente („anchoring filaments“), die hauptsächlich aus Laminin 5 bestehen. Der innere Plaque enthält hauptsächlich zwei Proteine aus der Plakin-Familie, Plectin (auch HD1 genannt, hemidesosomales Protein 1) und das bullöse Pemphigoid Antigen 1 (BPAG1 oder BP230). Beide Proteine stellen die Verbindung zwischen Keratin-Filamenten und Integrin $\alpha6\beta4$ her. Der äußere Plaque beinhaltet außer

Integrin $\alpha 6\beta 4$ noch das bullöse Pemphigoid Antigen 2 (BPAG2 oder BP180, auch Kollagen XVII genannt), ein Transmembran-Protein mit Typ II molekularer Orientierung (N-Terminus im Cytoplasma). Intrazellulär interagiert BP180 mit Integrin $\alpha 6\beta 4$ und BP230; seine große extrazelluläre Domäne (unterbrochene Kollagen-Tripelhelix) dient als Rezeptor für ECM-Proteine. Im äußeren Plaque ist auch das Tetraspanin CD151 lokalisiert, dessen Rolle in den HD bisher noch nicht völlig geklärt ist. Es wird aber vermutet, dass CD151 eine Aufgabe bei der Stabilisierung der HD übernimmt, indem es die räumliche Organisation und die lateralen Interaktionen zwischen den hemidesmosomalen Proteinen reguliert (Abb. 6, B) (McMillan et al., 2003; Koster et al., 2004).

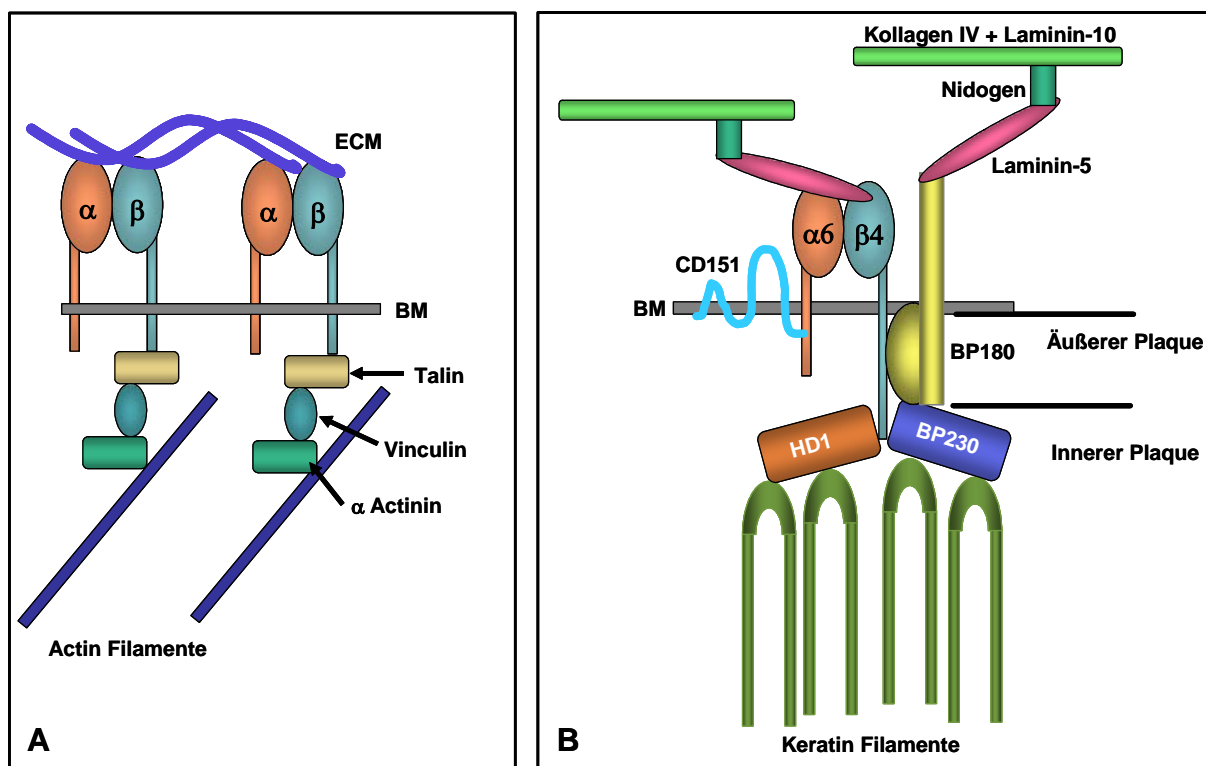


Abbildung 6: Schematische Darstellung von: A – Fokalkontakten („focal adhesions“); B – Hemidesmosomen.

1.2.2.1 Integrine in der Epidermis

In der humanen Epidermis werden hauptsächlich die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ exprimiert (Hertle et al., 1991). Die Integrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ sind überwiegend über apikale und laterale Membranbereiche basaler Zellen verteilt. Zum Teil sind diese Integrine in den perizellulären Bereichen der untersten suprabasalen Zellschichten lokalisiert. Beide Integrine, assoziiert mit dem Aktin-Cytoskelett, binden verschiedene Matrixmoleküle, wie Kollagen und Laminin, und sind für eine transiente Adhäsion der Zellen verantwortlich (Belkin & Stepp, 2000). Integrin $\alpha 6\beta 4$ dagegen ist hauptsächlich am basalen Pol der Basalzellen

lokalisiert und mit Keratin-Filamenten assoziiert. Dieses Integrin dient ausschließlich als Rezeptor für Laminine und spielt als Komponente der Hemidesmosomen eine wichtige Rolle bei der stabilen Adhäsion der Zellen (Breitkreutz et al., 1994; Sonnenberg et al., 1999).

Die Prozesse der Keratinozyten-Reifung und terminalen Differenzierung, die mit der Ablösung der Zellen von der Basalmembran verbunden sind, initiieren einige Veränderungen beim Expressionsmuster der Integrine. So wird die Expression von Integrin $\alpha 6\beta 4$ sehr früh herunterreguliert, wobei die Zell-Zell-Kontakte durch Cadherine und $\beta 1$ -assoziierte Integrine, sowie Desmosomen gewährleistet werden. Bei der Ausbildung von „cornified envelopes“ (siehe 1.2) werden die Integrine internalisiert, proteolytisch abgebaut und ihre Expression stark herunterreguliert (Tennenbaum et al., 1996).

In epithelialen Tumoren ändern sich die Integrin-Expressionsmuster drastisch, wobei individuelle Integrine hoch- oder herunterreguliert werden. Außerdem geht die ursprünglich polarisierte Anordnung der Integrine während der Tumorgenese üblicherweise verloren (Tomakidi et al., 1999). Außerdem wird in Tumor- wie auch in Wundsituationen die Expression mancher Integrine *de novo* induziert, z.B. von $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, 3, 5, 6 (Adams & Watt, 1991; Herold-Mende et al., 2001). Ähnliche Vorgänge konnten auch bei der epidermalen Regeneration im Transplantationsmodell von Humanzellen auf die Nacktmaus beobachtet werden (Breitkreutz et al., 1997; Breitkreutz et al., 1998).

1.2.2.2 Integrine und Signaltransduktion

Integrine fungieren nicht nur als Adhäsionsrezeptoren, sondern nehmen aktiv an der Signaltransduktion teil. Dabei wird einerseits die extrazelluläre Bindungsaffinität der Integrine intern von der Zelle reguliert („Inside-Out-Signaling“) und andererseits löst die Bindung von Matrixmolekülen Signale aus, die ins Innere der Zelle übertragen werden („Outside-In-Signaling“) (Schwarz et al., 1990; Giancotti & Ruoslahti, 1999; Miranti & Brugge, 2002; Humphries et al., 2003). Die Bindung von Matrix-Proteinen führt meistens zu einer Zusammenlagerung von Integrin-Molekülen in der Zellmembran („integrin clustering“), was für die Formation der Signal-Komplexe notwendig ist (Giancotti & Ruoslahti, 1999). Integrine aktivieren mehrere Signalwege, u.a. den Ras-MAP-Kinase-Weg und den PI-3-Kinase-Weg, und interagieren mit vielen Elementen aus Signaltransduktionsketten, wie beispielweise FAK (focal adhesion kinase), Src-Kinasen, Rho und SHC (SH2-containing protein).

Da die meisten dieser Signalwege auch durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, ist es unerlässlich, dass die Signaltransduktion durch Integrine und Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch Interaktionen und gegenseitige Regulation präzise koordiniert wird. Diese Interaktionen spielen eine große Rolle bei solchen zellulären Prozessen wie Adhäsion und Migration, Proliferation, Apoptose und Angiogenese somit auch bei Tumorentstehung, Zell-Invasion und Metastasierung (Eliceiri, 2001).

Die große Bedeutung der Interaktionen zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren wurde in mehreren Studien demonstriert. Beispielweise war eine optimale Stimulation der Zellen mit EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) und Insulin von der Zell-Adhäsion abhängig, die durch Integrine reguliert wurde (Schneller et al., 1997; Woodard et al., 1998; Soldi et al., 1999; Borges et al., 2000). Andererseits, benötigte eine von Vitronectin abhängige Zell-Adhäsion und -Migration in manchen Zell-Linien eine vorherige Stimulation mit IGF-1 oder Insulin (Brooks et al., 1997). Auch an *in vivo* Modellen konnte demonstriert werden, dass die α v β 5-Integrin-abhängige Metastasierung von Melanoma-Zellen eine Stimulation mit IGF-1 benötigte (Brooks et al., 1997).

Die molekularen Mechanismen der Interaktionen zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind noch nicht restlos geklärt. Offensichtlich können manche Integrine direkt mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren assoziieren, z.B. α v β 3 mit PDGF-Rezeptor, VEGF-Rezeptor-2 und mit dem Insulin Rezeptor, α 6 β 1 mit ErB-2-Rezeptor und α 6 β 4 mit IRS-1 (Falcioni et al., 1997; Schneller et al., 1997; Borges et al., 2000; Shaw, 2001). Weiterhin können Interaktionen zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren auch auf der Ebene von intrazellulären Signal-Molekülen, wie FAK oder Src, stattfinden (Eliceiri, 2001).

Zwei unterschiedliche Mechanismen werden diskutiert, wie Integrine die Signaltransduktion der Wachstumsfaktor-Rezeptoren regulieren können. Bei einer kollaborativen Aktivierung wird die lokale Anhäufung („clustering“) von Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch Bindung an Matrixproteine induziert. Der entstandene Komplex rekrutiert verschiedene Adapter-Proteine und Tyrosinkinase, wie FAK und Src. Die Simulation der Tyrosin-Phosphorylierungen des Wachstumsfaktor-Rezeptors und somit die Verstärkung der Signaltransduktion findet dabei nur statt, wenn der Wachstumsfaktor an seinen Rezeptor bindet. Als alternativer Mechanismus wird eine direkte Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch Integrine in der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren postuliert. Dabei wird die Assoziation von Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch den Integrin-Liganden moduliert. Dieser Komplex rekrutiert Tyrosinkinase (wie z.B. Src und Crk), die

eine Phosphorylierung des Wachstumsfaktor-Rezeptors induzieren (Yamada & Even-Ram, 2002). Das Phosphorylierungsmuster des Rezeptors unterscheidet sich bei den beiden Aktivierungs-Mechanismen und erlaubt somit die Koordination und synergetische Kooperation bei den wichtigen Signaltransduktion-Systemen.

Die Integrin-Signaltransduktion wird darüber hinaus von den lateralen Interaktionen in der Zellmembran beeinflusst. Integrine interagieren mit Membran-Komponenten wie Syndecanen, Tetraspaninen und Caveolin-1. Tetraspanine, eine Protein-Familie mit vier charakteristischen Transmembran-Domänen, interagieren direkt mit mehreren Integrinen und stellen die Verbindung zum PI-3-Kinase-Weg her. Caveolin-1, ein wichtiger Bestandteil der Caveolae (siehe unten), fungiert als Adapter-Protein für die SHC-Rekrutierung und die Aktivierung von Ras. Außerdem verknüpft Caveolin-1 Integrine mit Src-Kinasen (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Giancotti, 2000; Woods & Couchman, 2000).

1.3 Insulin-IGF-Familie

Die Insulin-IGF-Familie von Faktoren und entsprechenden Rezeptoren beinhaltet Insulin und IGF (IGF-1 und IGF-2, insulin-like growth factors 1 and 2) Liganden sowie die Zelloberflächen-Rezeptoren IR (Insulin Rezeptor), IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor), IGF-2R (Insulin-like growth factor 2 receptor) und IRR (Insulin receptor-related receptor).

IR und IGF-1R gehören zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren und sind in ihrer Struktur stark homolog. Beide sind $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimere, die aus jeweils zwei durch Disulfid-Brücken verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen (Cheatham & Kahn, 1995). Beim IR existieren zusätzlich zwei Isoformen, die durch alternatives Splicing des Exons 11 entstehen (IR-A: kein Exon 11; IR-B: mit Exon 11).

Nur wenig ist bekannt über IRR. Der Rezeptor ist ebenfalls ein Heterodimer und seine Tyrosin-Kinase-Domäne ist homolog zu den entsprechenden Domänen von IR und IGF-1R. Im Gegensatz zu den beiden anderen Rezeptoren fehlt IRR die C-terminale Domäne der β -Untereinheiten (Itoh et al., 1993; LeRoith et al., 1995).

IGF-2R ist ein Monomer mit einer großen extrazellulären Domäne und hat keine Funktionen bei der Signaltransduktion. IGF-2R dient auch als Mannose-6-phosphat (M6P) Rezeptor und spielt eine Rolle bei der Endozytose und dem intrazellulären Transport von M6P-markierten Proteinen; des Weiteren fungiert IGF-2R als Internalisationsrezeptor für IGF-2 (LeRoith & Roberts Jr., 2003).

Die Komplexität der Insulin-IGF Signaltransduktions-Wege wird noch erhöht durch die Bildung von Hybrid-Rezeptoren. Sie entstehen durch Dimerisierung der Insulin- und IGF-1-Hemirezeptoren in Zellen, die beide Proteine exprimieren. In genetisch manipulierten Zellen wurden auch Hybride zwischen IR und IRR beschrieben, nur der Nachweis von IGF-1R/IRR Hybriden ist bisher noch ausgeblieben (LeRoith & Roberts Jr., 2003).

IR bindet hauptsächlich Insulin, dagegen IGF-1 nur mit geringer Affinität. Zusätzlich fungiert die IR-A Isoform als Hoch-Affinität-Rezeptor für IGF-2. IGF-1R interagiert am stärksten mit IGF-1, aber auch IGF-2 wird mit relativ hoher Affinität gebunden. Umgekehrt hat IGF-1R nur eine niedrige Affinität zu Insulin. Im Vergleich zu den IR und IGF-1R interagiert IGF-2R nur mit IGF-2. IRR bindet kein Insulin oder IGFs und sein Ligand (oder Liganden) ist immer noch unbekannt (Abb. 7, A).

Die IGF-1R/IR Hybrid-Rezeptoren behalten ihre hohe Affinität zu IGF-1, zeigen aber eine dramatische Abnahme der Affinität für Insulin. Die Affinität der Hybrid-Rezeptoren zu verschiedenen Liganden ist auch von der IR-Isoform abhängig. IGF-1R/IR-A-Hybrid-Rezeptor bindet IGF-1, IGF-2 und Insulin. Dagegen hat IGF-1R/IR-B-Hybrid eine hohe Affinität für IGF-1, eine niedriger Affinität für IGF-2 und keine messbare für Insulin (Nakae et al., 2001; LeRoith & Roberts Jr., 2003) (Abb 7, B).

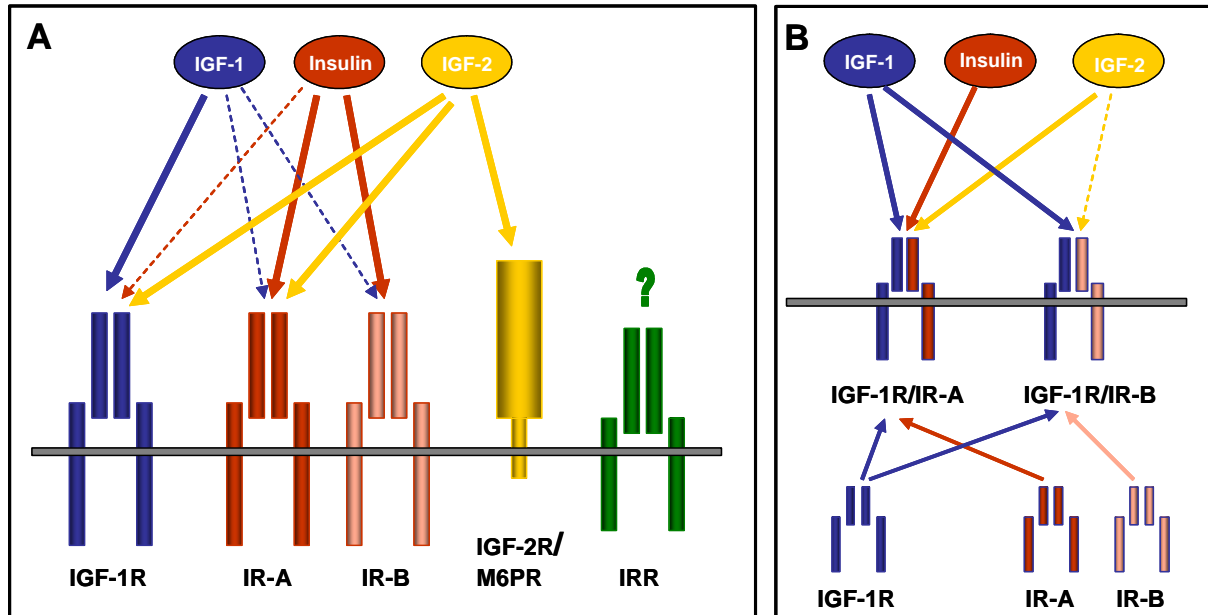


Abbildung 7: A – Bindungsaffinitäten von Rezeptoren aus IR-IGF-Familie zu verschiedenen Liganden; B – Bindungsaffinitäten von Hybrid-Rezeptoren.

1.3.1 Struktur des Insulin Rezeptors

IR (Insulin Rezeptor) gehört zu einer Subfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren der Klasse II (nach Klassifizierung von Ullrich und Schlessinger (1990)). Derartige Rezeptoren bestehen aus zwei mit Disulfid-Brücken verbundenen α - und β -Untereinheiten und bilden $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimere. Jede Untereinheit hat eine spezifische Funktion. Die α -Untereinheit, die komplett extrazellulär positioniert ist, beinhaltet die Insulinbindungsdomäne (N-Terminus). Die C-terminale Domäne der α -Untereinheit enthält das Exon 11, das alternativem Splicing unterliegt. Diese Region spielt auch eine Rolle bei der Liganden-Erkennung und -Bindung und ist zusätzlich an den kovalenten Interaktionen mit der β -Untereinheit beteiligt.

Die β -Untereinheit des IR besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Domäne, die eine tyrosin-spezifische Protein-Kinase enthält. Außerdem enthält die β -Untereinheit eine Juxtamembran-Domäne, die für die reguläre Internalisierung des IR verantwortlich ist, einige ATP-Bindungsstellen und die C-terminale Domäne mit den Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen (Cheatham & Kahn, 1995; Kido et al., 2001) (Abb. 8).

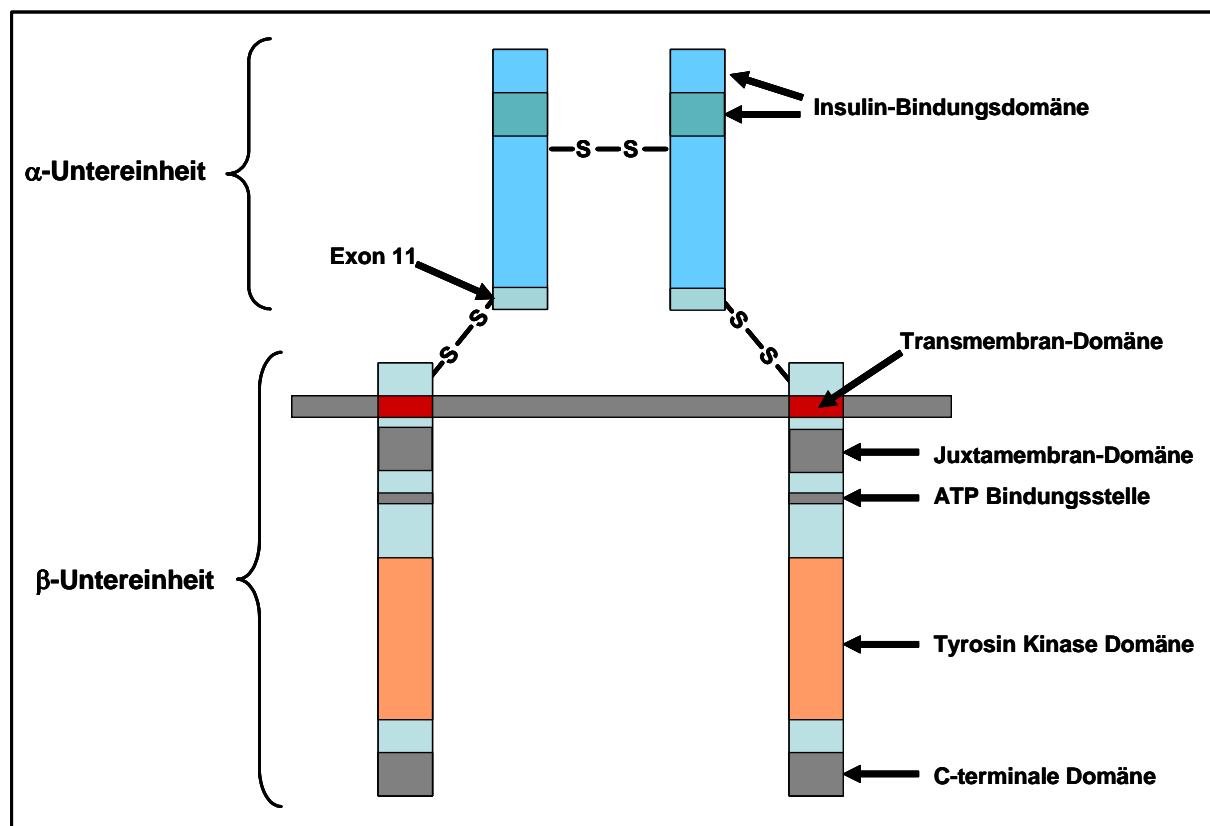


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Insulin Rezeptors.

1.3.2 Insulin Rezeptor Signaltransduktion

Die Bindung von Insulin an seinem Rezeptor bewirkt die Aktivierung der Tyrosin-Kinasen in den β -Untereinheiten und eine schnelle Autophosphorylierung des Rezeptors. Der aktivierte IR rekrutiert mehrere Proteine, die durch das Vorhandensein der SH2-Domänen (Src Homologie 2 Domäne) charakterisiert sind. Dazu gehören unter anderem vier IRS-Proteine (IRS 1-4, insulin rezeptor substrate proteins), drei SHC-Proteine (Src-Homology-Collagen) und Gab-1 (Grb-2 associated binder-1) (Virkamäki et al., 1999; Pessin & Saltiel, 2000; Van Obberghen et al., 2001).

IRS-Proteine sind cytoplasmatische Adapter-Moleküle, die andere Proteine zu den Zellmembranrezeptoren rekrutieren und somit die Signal-Komplexe organisieren. IRS-1 und IRS-2 sind ubiquitär exprimiert, wobei IRS-3 und IRS-4 nur in bestimmten Geweben vorkommen. Die wichtigsten Proteine bei der Insulin Signaltransduktion sind IRS-1 und IRS-2. Die rekrutierten IRS-Proteine werden an mehreren Tyrosin-Resten phosphoryliert und generieren dadurch mehrere Bindungsstellen für die anderen SH2-Domäne-Proteine (Cheatham & Kahn, 1995; Virkamäki et al., 1999; Saltiel & Pessin, 2002).

MAP-Kinase-Weg

Nach der Insulin Stimulation interagiert IRS-1 unter anderem mit einem Adapter-Protein Grb-2 (growth factor receptor bound-2). Grb-2 rekrutiert mSOS (mammalian homolog to the Drosophila son-of-sevenless protein) und dieser Komplex aktiviert Ras, ein GTP-Bindungsprotein mit GTPase-Aktivität. Die GTP-gebundene Form von Ras bildet Komplexe und aktiviert Raf-1 Kinase, die ihrerseits phosphoryliert wird und die MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) aktiviert. Über diesen Signalweg kann Insulin Wachstum und Differenzierungsprozesse beeinflussen.

Bei einem alternativen Weg, der auch zur Aktivierung der MAP-Kinase führt, wird zunächst SHC-Protein direkt zum aktivierten IR rekrutiert. Phosphoryliertes SHC generiert Bindungsstellen für Grb-2, das seinerseits mit mSOS interagiert. Der Komplex SHC/Grb-2/mSOS aktiviert Ras und dadurch ebenfalls die MAP-Kinase (Abb. 7) (Cheatham & Kahn, 1995).

PI-3-Kinase abhängiger Weg

Eines der wichtigsten Proteine, das durch Interaktionen mit IRS-1 aktiviert wird, ist die p85 regulatorische Untereinheit der PI-3-Kinase (phosphatidylinositol-3-kinase). Das Enzym PI-3-

Kinase katalysiert die Phosphorylierung von PI-4,5-P₂ (phosphatinositol-4,5-biphosphate) an D-3 Position des Inositol-Rings und generiert PI-3,4,5-P₃ (phosphatinositol-3,4,5-triphosphate). PI (3,4,5)-triphosphate dienen als allosterische Regulatoren von PDK (phosphoinositide-dependent kinase). PDK ihrerseits phosphoryliert und aktiviert Akt (oder PKB, protein kinase B) sowie einige Isoformen von PKC (protein kinase C). PI (3,4,5)-triphosphate regulieren die Translokation von Akt und PKCs zur Plasmamembran, wo sie von PDK aktiviert werden. Dieser Signalweg führt zu der insulin-abhängigen Translokation von GLUT-4 (glucose transport protein) zur Plasmamembran und zur Stimulation der Glukose-Aufnahme in die Zelle (Pessin & Saltiel, 2000; Kido et al., 2001; Saltiel & Kahn, 2001) (Abb. 9).

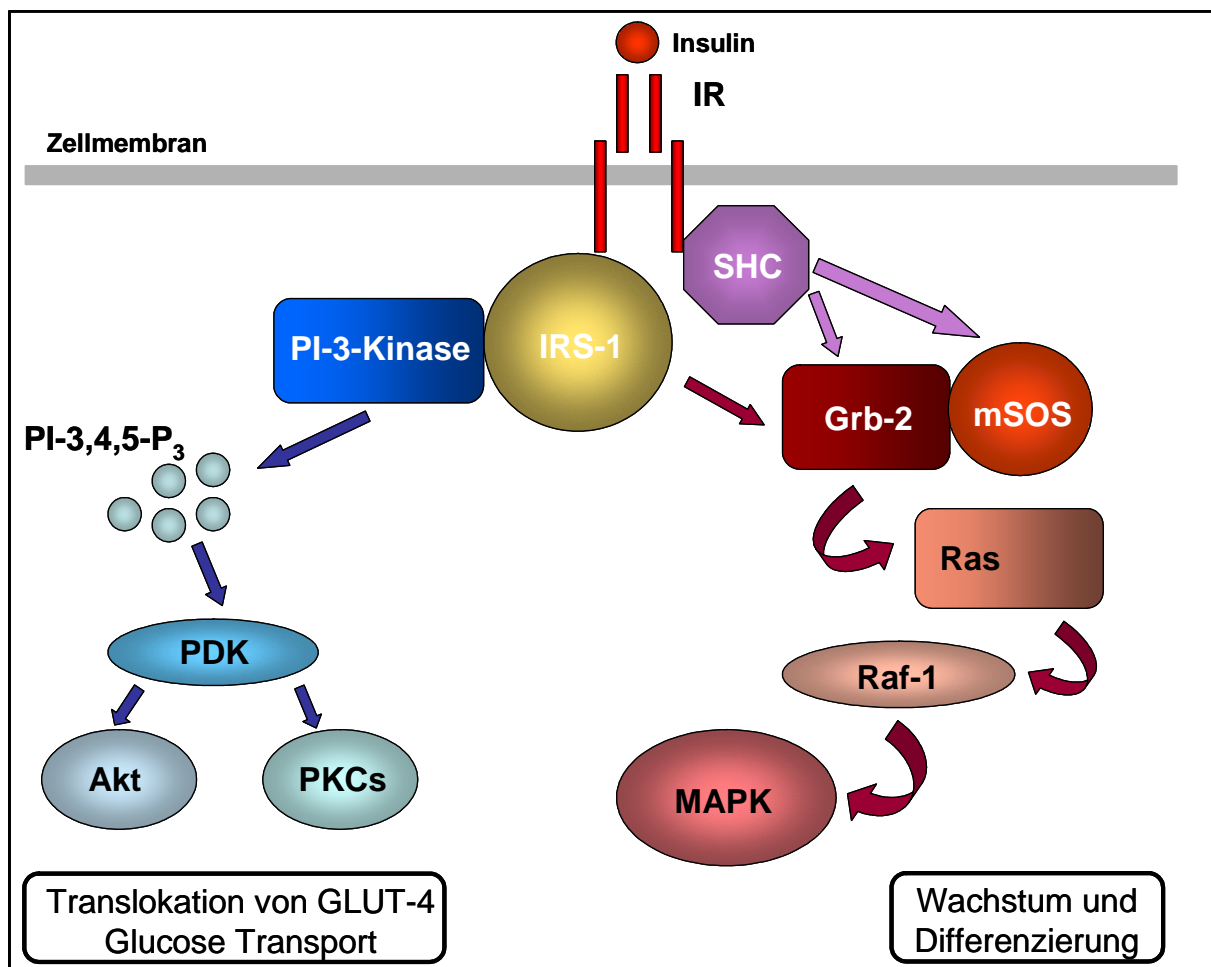


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des IR (MAP-Kinase-Weg und PI-3-Kinase abhängiger Weg).

PI-3-Kinase unabhängiger Weg

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der PI-3-Kinase-abhängige Signalweg zwar notwendig, aber nicht ausreichend ist für die volle Entfaltung der Insulin-Stimulation des Glucose-Transports (Bickel, 2002; Saltiel & Pessin, 2003). Außerdem vermögen andere

Rezeptoren, wie PDGF- und EGF-Rezeptoren, ebenso die PI-3-Kinase zu aktivieren, doch nur Insulin übt einen spezifischen Effekt auf den Glucose-Transport aus. Mehrere Hypothesen werden diskutiert, um diese Signal-Spezifität bei der Insulin-Wirkung zu erklären, unter anderem Unterschiede in der Stärke und Dauer des Signals, kombinatorische Vielfalt der Signale oder andere spezifische Eigenheiten der Signalwege in insulin-abhängigen Zellen (Mastick et al., 1998). Ein anderer potentieller Regulationsmechanismus ist die räumliche Kompartimentalisierung sowohl bei der Initiierung des Signals an der Oberfläche als auch beim Empfang des Signals im Inneren der Zelle. Nach diesem Mechanismus sollen die Signal-Moleküle durch spezialisierte Struktur-, Anker- und Adapter-Proteine in spezifische zelluläre Kompartimente segregiert werden (Pawson & Scott, 1997). Plattformen einer solchen räumlichen Organisation in der Plasmamembran sind „Lipid Rafts“ und Caveolae.

„**Lipid Rafts**“ sind Mikrodomänen in der Plasmamembran, die mit Glycolipiden, Sphingolipiden und Cholesterin angereichert sind (Binder et al., 2003; Rajendran & Simons, 2005). Eine der Unterstrukturen von „Lipid Rafts“ sind **Caveolae**, kleine Invaginationen in der Plasmamembran, die zusätzlich hohe Konzentrationen der Strukturproteine Caveolin-1 und -2 enthalten. Caveoline und Caveolae sind in mehreren zellulären Prozessen, wie vesikulärer Transport, Cholesterin-Homeostase und Signaltransduktion, involviert. Viele Signal-Moleküle wurden in Caveolae nachgewiesen, einschließlich der Familie von Src Tyrosinkinase, G Protein-gebundene Rezeptoren, Elemente der Ras-MAP-Kinase Kaskade, NOS (nitric oxide synthase), PKCs und verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren. Caveolin-1 dient nicht nur als Struktur-Protein, sondern greift aktiv in Signaltransduktion ein und zwar als Inhibitor oder aber als Verstärker (Cohen et al., 2003; Ishikawa et al., 2005). Interessanterweise fungiert Caveolin-1 normalerweise als Inhibitor von Signalprozessen und nur beim IR konnte eine stimulierende Wirkung des Caveolins-1 nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1998).

Die Membranlokalisation des IR wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Mehrere Studien zeigen, dass IR stark in den Caveolae angereichert ist (Smith et al., 1998; Gustavsson et al., 1999; Parpal et al., 2001). Auch physische Interaktionen zwischen Caveolin und IR, sowie die insulin-spezifische Phosphorylierung des Caveolins-1 durch IR sind berichtet worden (Yamamoto et al., 1998; Nystrom et al., 1999; Kimura et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnten andere Gruppen IR nicht in den Caveolae nachweisen (Souto et al., 2003; Gonzalez et al., 2004). Zur Lösung dieses Widerspruchs wurde, neben direkten Interaktionen zwischen IR und Caveolin-1, folgender Mechanismus für die Regulation der Insulin-Signaltransduktion

durch Caveolin 1 vorgeschlagen: Insulin stimuliert die Phosphorylierung eines weiteren IR-Substrats, dem Proto-Onkogen c-Cbl (Casitas B lineage lymphoma). Für die Phosphorylierung von Cbl ist die Rekrutierung der Adapter-Proteine APS und CAP (Cbl-associated protein) notwendig (Abb. 10, A). Nach Cbl Phosphorylierung dissoziiert der CAP-Cbl-Komplex vom IR und assoziiert mit einem hydrophoben Protein aus „Lipid Rafts“ Flotillin. Es wird weiterhin vermutet, dass phosphoryliertes Cbl die Kinase Fyn, die in Caveolae lokalisiert ist, aktiviert. Aktiviertes Fyn soll für die insulin-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung des Caveolins verantwortlich sein (Mastick et al., 1995; Ishikawa et al., 2005) (Abb. 10, B). Phosphoryliertes Cbl rekrutiert ein SH2-Domäne Adapter-Protein Crk II und C3G (GTPase exchange factor) zu „Lipid Rafts“. Dadurch wird ein Mitglied der Familie von Rho GTPasen, TC10, aktiviert. Die Aktivierung von TC10 führt zur Stimulation des Glukose-Transports unabhängig von den Aktivierung der PI-3-Kinase (Saltiel & Pessin, 2003; Ishikawa et al., 2005) (Abb. 10, C).

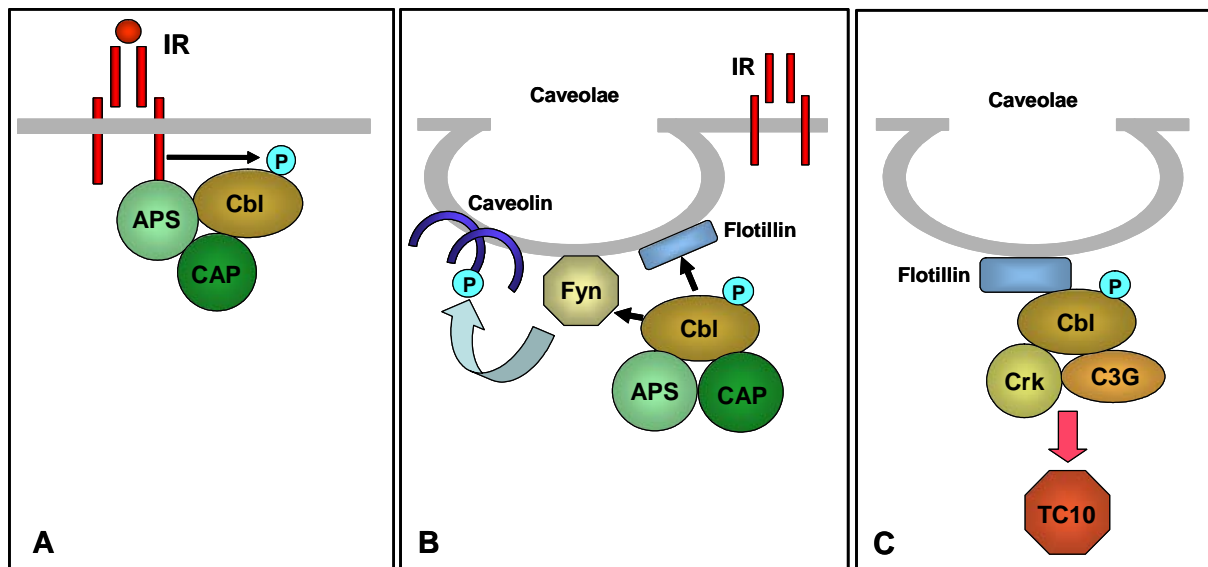


Abbildung 10: Schematische Darstellung der IR Signaltransduktion (PI-3-Kinase-unabhängiger Weg);
A – Aktiviertes IR rekrutiert Cbl (zusammen mit Adapter-Proteinen APS und CAP) und phosphoryliert Cbl;
B – Der Cbl-APS-CAP Komplex dissoziiert von IR und assoziiert mit Flotillin sowie Protein-Kinase Fyn;
C – Phosphoryliertes Cbl rekrutiert Crk und C3G, was zur Aktivierung von TC10 führt.

Zusammenfassend ist unbestreitbar, dass Caveolin-1 und Caveolae eine wichtige Rolle bei der Regulation des Glucose-Metabolismus spielen. Entscheidend für die Stabilisierung des IR und für den Schutz gegen Degradation sind direkte Interaktionen zwischen IR und Caveolin-1. Trotz dieser Befunde bleiben jedoch noch viele Fragen bezüglich der Rolle des Caveolin-1 bei der Insulin-Signaltransduktion offen. So ist die Funktion der insulin-abhängigen Phosphorylierung des Caveolin-1 noch ebenso ungeklärt, wie die genaue Rolle von Caveolin-1 bei der Translokation von GLUT4-Proteinen. Auch die klinische Relevanz der Beteiligung

von Caveolin-1 an der Insulin-Signalkette muss noch evaluiert werden (Cohen et al., 2003; Ishikawa et al., 2005).

1.4 Protein-Kinase C

Die Protein-Kinase C-Familie (PKC) repräsentiert spezifische Serin-Threonin-Kinasen, die eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion spielen und an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose, Signaltransduktion und Tumorgenese beteiligt sind (Kanashiro & Khalil, 1998; Miranti et al., 1999).

Die PKC-Familie, die aus mindestens 11 Isoenzymen besteht, wird entsprechend deren Struktur und Abhängigkeit von Cofaktoren in drei Gruppen unterteilt. Die **konventionellen** PKCs (cPKC: α , β I, β II, γ) sind Ca^{2+} -abhängig und werden von DAG (Diacylglycerin) und Phorbolestern, die funktionelle Analoge von DAG darstellen, aktiviert. Die **neuen** PKCs (nPKC: δ , ϵ , η , θ) werden ebenfalls von DAG oder Phorbolestern aktiviert, sind aber Ca^{2+} -unabhängig. Die dritte Gruppe, die **atypischen** PKCs (aPKC: ζ , λ , ι), sind Ca^{2+} -unabhängig und reagieren weder auf DAG noch auf Phorbolster (Gschwendt, 1999).

PKC Isoenzyme werden in gewebe-spezifischen Mustern exprimiert, haben überwiegend unterschiedliche Substrate und können in verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sein. Außerdem werden zelluläre Prozesse von PKC Isoenzymen auf unterschiedliche, sogar manchmal auf antagonistische Weise beeinflusst. So führt z.B. die Überexpression von PKC α zu einer Stimulation des Zellwachstums, Veränderung der Zellmorphologie und Progression von Tumorgenese. Im Gegensatz dazu retardiert PKC δ das Wachstum und begünstigt die Zell-Differenzierung (Housey et al., 1988; Mischak et al., 1993).

1.4.1 PKC in der Haut

Untersuchungen mit murinen und humanen Keratinozyten *in vitro* zeigten, dass ihr Wachstum und Differenzierung durch extrazelluläre Calcium Konzentration und durch die Zell-Dichte reguliert werden können (Denning et al., 1995; Li et al., 1995; Bikle et al., 2001). Diese Studien dienten als Grundstein für das Konzept, dass PKC α , als klassische, Calcium-sensitive Isoform, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Haut-Differenzierung spielt. Auch andere PKC-Isoformen, wie PKC δ , η , ϵ und ζ , wurden in Keratinozyten nachgewiesen. Die PKC Isoformen können sowohl in basalen als auch in differenzierenden Keratinozyten nachgewiesen werden, unterscheiden sich jedoch in der subzellulären Lokalisation. Die neuen

Studien demonstrierten die spezifischen Funktionen von PKC Isoformen in den Signalwegen, die Proliferation und Differenzierung in der Epidermis regulieren (Denning et al., 1995; Ohba et al., 1998; Shen et al., 2001; Li et al., 2002).

1.4.2 PKC und Insulin-Signaltransduktion

Die Mitglieder der PKC-Familie zählen zu den wichtigsten Elementen der Insulin-Signaltransduktion, die sowohl an der Weiterleitung als auch an der Modulation der Signale beteiligt sind (Braiman et al., 1999; Braiman et al., 2001; Pillay et al., 2004; Rosenzweig et al., 2004). Wie bereits erwähnt, zeichnen sich auch hierbei PKC-Isoenzyme durch unterschiedliche Aktivierungsmuster und Wirkungsmechanismen aus.

Einige PKC-Isoenzyme, wie z.B. α , β I, β II und ζ , werden von Insulin durch den PI-3-Kinase-abhängigen Signalweg aktiviert (Braiman et al., 1999). Diese Enzyme sind fähig den Insulin Rezeptor, sowie IRS-1, an Serin-Resten zu phosphorylieren, wodurch deren Aktivität inhibiert wird, und dienen somit als negative Regulatoren der Insulin-Signaltransduktion (Kellerer et al., 1998; Pillay et al., 2004; Zick, 2004; Oriente et al., 2005).

Im Gegensatz dazu erfolgt die insulin-abhängige Stimulation von PKC δ völlig unabhängig von PI-3-Kinase. Diese Stimulation von PKC δ ist mit der Phosphorylierung definierter Tyrosinreste verknüpft und moduliert die PKC δ -Aktivität für bestimmte Substrate (Gschwendt, 1999). Neben den anderen Proteinen vermag auch der Insulin Rezeptor PKC δ zu phosphorylieren und dadurch dessen Aktivität zu stimulieren (Li et al., 1994; Braiman et al., 2001). Im Gegenzug phosphoryliert PKC δ den Insulin Rezeptor an Serin-Resten, was zu der Termination des Signals beiträgt und die Internalisierung des Rezeptors initiiert (Braiman et al., 2001).

1.4.3 PKC und Integrine

Die PKC-Isoenzyme spielen außerdem eine Schlüssel-Rolle bei den Integrin-Funktionen sowohl hinsichtlich der Adhäsion als auch der Signaltransduktion. Die Aktivierung von PKCs beeinflusst die Bindung von Integrinen zu ihren Liganden und damit Adhäsion, Migration und Verteilung von Zellen an bestimmten ECM, wobei alle diese Effekte durch spezifische PKC-Inhibitoren blockiert werden können (Vuorio & Ruoslahti, 1993; Chun & Jacobson, 1993).

PKCs können die Zell-Adhäsion beeinflussen indem sie die Bildung von Fokalkontakten steuern und Interaktionen zwischen Integrinen und dem Cytoskelett regulieren (Defilippi et al., 1999; Disatnik & Rando, 1999; Besson et al., 2002).

Eine indirekte Stimulation von PKCs über Aktivierung von PI-3-Kinase als Reaktion auf eine Integrin-Aktivierung wurde sowohl bei der „Inside-Out“ als auch bei der „Outside-In“ Signaltransduktion nachgewiesen (Kolanus & Seed, 1997). Auch bei der Regulation des durch Integrine aktivierenden MAPK-Signalweges sind PKCs maßgeblich beteiligt (Miranti et al., 1999). Allerdings haben PKC-Isoenzyme bei Interaktionen mit Integrinen unterschiedliche Wirkungen auf integrin-regulierende Prozesse. Beispielsweise phosphoryliert PKC δ die β 4-Untereinheit des α 6 β 4-Integrins an Serin-Resten und diese Phosphorylierung führt zu einer Verminderung von α 6 β 4 in Hemidesmosomen und reduziert dadurch die Zell-Adhäsion an Laminin. PKC α hingegen stabilisiert die α 6 β 4 in Hemidesmosomen und erhöht die Adhäsion an Laminin (Alt et al., 2001; Alt et al., 2004).

Zusammenfassend stellen PKC-Isoenzyme ein wichtiges Bindeglied bei den Interaktionen zwischen Integrinen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und anderen Signal-Elementen dar.

1.5 HaCaT als Modellsystem

Die spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Linie HaCaT wurde ausgehend von einer normalen Primärkultur menschlicher Epidermiszellen etabliert. Die entsprechende Gewebeprobe stammte aus direkter Nachbarschaft eines Melanoms eines 62-jährigen männlichen Patienten (Boukamp et al., 1988). Die Keratinozyten wurden zunächst in Medium mit niedrigem Calciumgehalt (0,2 mM) kultiviert, was die terminale Differenzierung reduzierte (Breitkreutz et al., 1984; Breitkreutz et al., 1993; Li et al., 1995). Außerdem wurde die Kultivierungstemperatur anfangs auf 38,5°C erhöht, was ein Anstieg der Proliferation zur Folge hatte. Dem entsprechend erhielt die generierte Zell-Linie den Namen HaCaT (Human, aadult, niedrig Ca²⁺, erhöhte Temperatur).

Die Hauptursache für die Immortalisierung der HaCaT-Zellen war höchst wahrscheinlich die genetische Instabilität verursacht durch die UV-spezifischen Mutationen in beiden Allelen des Tumorsupressor-Gens p53, was zur Inaktivierung der Suppressorfunktion von p53 führte (Lehman et al., 1993). Die erhöhte Kultivierungstemperatur verursachte vermutlich eine Zunahme nicht-reparierter DNA-Schäden und chromosomaler Aberrationen, was sich durch das Auftreten charakteristischer Markerchromosomen in HaCaT manifestierte (Lehmann et al., 1993).

In dieser Arbeit wurde der HaCaT-Subklon 6 (HaCaT K6) verwendet, eine hochgradig differenzierende HaCaT-Variante. Sie stammt aus einer Population von Standard-HaCaT-Zellen, die in der zehnten Passage kloniert und in der 16. Passage rekloniert wurden.

Trotz ihrer genetischen Veränderungen haben HaCaT-Keratinocyten viele morphologische und biochemische Kriterien mit normalen Epidermiszellen gemeinsam (Ryle et al., 1989; Breitkreutz et al., 1993; Breitkreutz et al., 1998). In unserer Arbeitsgruppe wurden durch Klonierung oder Transfektion (z.B. mutiertes Ha-ras) viele Varianten der ursprünglichen Standard-HaCaT-Zellen etabliert, die verschiedene Grade der Tumorigenität aufweisen und somit sehr gut für Studien der Haut-Carcinogenese geeignet sind (Abb. 11).

HaCaT Zellen bilden in organotypischen Kokulturen ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, dessen Aufbau überwiegend dem der normalen Epidermis entspricht. Die Epithelentwicklung erfolgt im Vergleich zu normalen Keratinocyten verzögert und die terminale Differenzierung wird in vitro nicht komplett abgeschlossen, was zu der Ausbildung eines parakeratotischen *Stratum corneum* führt (Baur, 1995; Steinstrasser et al., 1997; Schoop et al., 1999; Boelsma et al., 1999). Eine fast vollständige Normalisierung findet andererseits unter geeignetem mesenchyalem Einfluss statt, das heißt nach Transplantation von HaCaT-Zellen auf die immun-supprimierten Nacktmäuse (Breitkreutz et al., 1998).

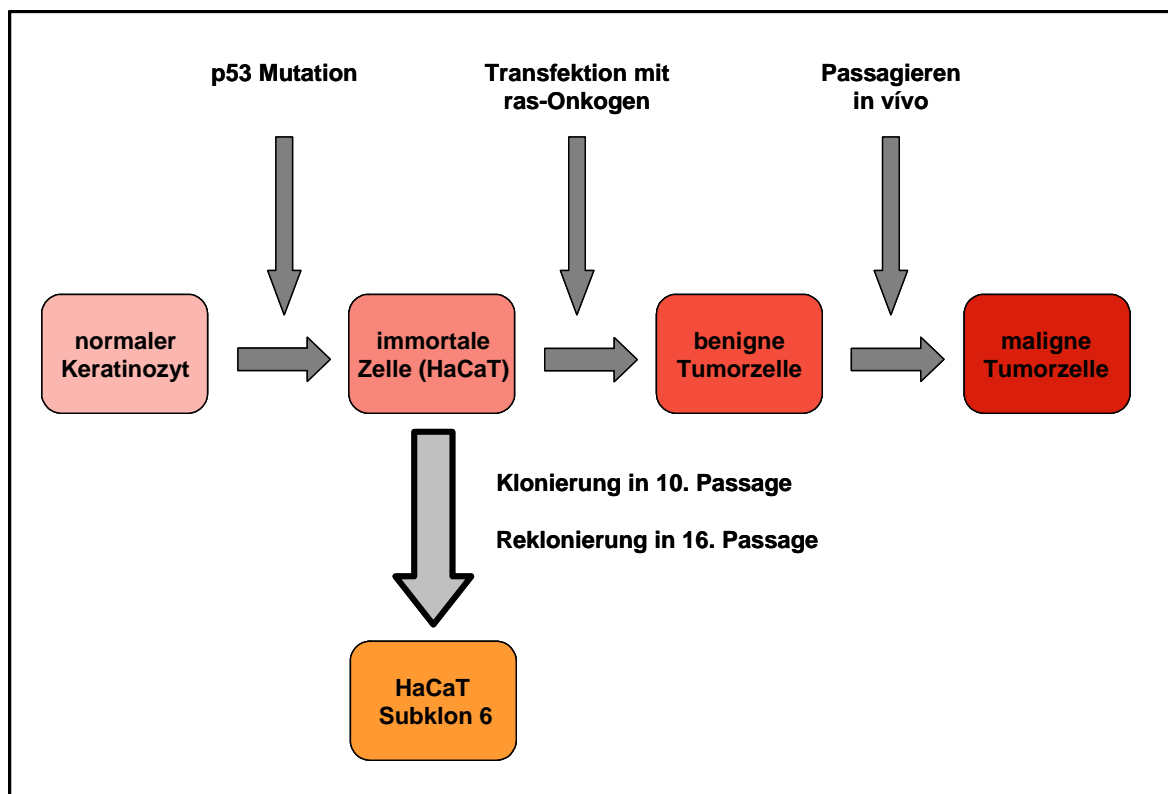


Abbildung 11: HaCaT-Modell der epidermalen Tumor-Progression.

2 Zielsetzung

Bei der Entstehung von chronischen dermatologischen Komplikationen in Diabetes, die u.a. mit einem erhöhten Risiko für Haut-Krebs assoziiert sind, spielen nicht nur Metabolismus und inflammatorische Prozesse sondern auch Insulin Signaltransduktion eine bedeutende Rolle. Eines der Schlüsselemente im Insulin Signalweg ist Insulin Rezeptor (IR), dessen Rolle in der Epidermis noch nicht völlig geklärt ist. IR aktiviert mehrere wichtige Signaltransduktionsketten, wie beispielsweise den MAP-Kinase- oder PI-3-Kinase Weg. Kritisch für Insulin Signaltransduktion ist die räumliche Organisation von IR-Molekülen in der Zell-Membran, das heißt ihre Segregation in spezifische Membran-Domänen wie „Lipid Rafts“. Außerdem kann IR mit Zellmatrix-Rezeptoren vornehmlich den Integrinen, die eine große Rolle bei der Epidermis-Organisation spielen, interagieren. Diese Interaktionen können sowohl auf der Membran-Ebene als auch auf der Ebene von den nachgeordneten Signal-Elementen erfolgen.

Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der Insulin Signaltransduktion in epidermalen Keratinozyten sowie deren mögliche Bedeutung bei der Tumorentstehung aufzuklären. Dabei sollte die Funktion von Insulin Rezeptor und IGF-1 Rezeptor bei der Regulation solcher zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration sowie Zell-Matrix Interaktionen untersucht werden. Hierfür wurde in der humane, immortale Keratinozyten-Linie HaCaT, als Paradigma für normale Zellen, die Expression von den beiden Rezeptoren mittels siRNA-Technik weitgehend supprimiert. Folgende Aspekte sollten dabei im Einzelnen bearbeitet werden:

1. Etablierung der siRNA-Methode in HaCaT-Keratinozyten, Suche nach geeigneten siRNA-Sequenzen und Optimierung der Suppression.
2. Einfluss der transienten IR- und IGF-1R-Suppression auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung von HaCaT-Zellen in konventionellen 2D Kulturen.
3. Generation von stabilen IR-„Knock Down“ Zell-Klonen für Langzeit-Untersuchungen.
4. Einfluss der stabilen IR-Suppression auf die Expressionsmuster anderer Genen und das Verhalten von HaCaT-Zellen in 2D Kulturen.
5. Effekte der IR-Suppression auf Wachstum und Differenzierung in 3D organotypischen Kokulturen.
6. Analyse physischer Interaktionen zwischen IR und anderen Membran-Proteinen.
7. Einfluss der IR-Suppression auf Dynamik von „Lipid Rafts“.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultivierung

Die verschiedenen Zell-Linien wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 6, 10 oder 15 cm Zellkulturschalen (Falcon, Becton Dickinson) kultiviert. Routinemäßig wurde als Standardmedium DMEM mit 10 % FCS (siehe Tabelle 2) eingesetzt, der Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.1.1 Medien und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Standardmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM	Dulbecco´s MEM Medium 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin	Cambrex Biochrom Biochrom
DMEM Selektionsmedium	Dulbecco´s MEM Medium 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,6 mg/ml G418	Cambrex Biochrom Biochrom PAA
DMEM für OTKs	Dulbecco´s MEM Medium 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 50 µg/ml Ascorbinsäure	Cambrex Biochrom Biochrom Sigma
KGM2	Keratinocytes Growth Medium 2 1 % FCS 1 % BSA	PromoCell Biochrom Sigma
KGM2 Selektionsmedium	Keratinocytes Growth Medium 2 1 % FCS 1 % BSA 0,6 mg/ml G418	PromoCell Biochrom Sigma PAA
Einfriermedium	70 % DMEM 20 % FCS 10 % Glycerin	Cambrex Biochrom Merck

Tabelle 3: Lösungen und Zusätze

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Ascorbinsäure	50 µg/ml	Sigma
Phenolrot	0,5 % in PBS	Biochrom
EDTA	0,05 % in PBS-, 1 µg/ml Phenolrot	Serva
Trypsin	0,1 % in PBS-, 1 µg/ml Phenolrot	Boehringer MA
FCS		Biochrom
Hank´s	Mit 8 mg/ml Phenolrot, ohne NaHCO ₃	Seromed
PBS-	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Serva
PBS+	PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Serva

3.1.2 Verwendete Zellen

3.1.2.1 HaCaT-Keratinocyten

Die spontan immortalisierte humane Keratinocyten-Zell-Linie HaCaT (Human, aadult, niedrig Calcium, hohe Temperatur) war in unserer vormaligen Abteilung „Differenzierung und Carcinogenese“ (Norbert E. Fusenig) aus einer normalen Primärkultur menschlicher Epidermiszellen generiert worden. Das primäre Zellisolat stammte aus direkter Nachbarschaft eines Melanoms eines 62-jährigen männlichen Patienten (Boukamp et al., 1988). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten HaCaT Klon 6, im Folgenden kurz als HaCaT K6 bezeichnet, handelt es sich um eine hochgradig differenzierende HaCaT-Variante. Sie stammt aus einer „Standard“-HaCaT-Population, die in der 10. Passage kloniert und in der 16. Passage rekloniert wurde. HaCaT K6-Zellen wurden in dieser Arbeit in den Passagen 9-25 verwendet.

3.1.2.2 Primäre humane Fibroblasten

Primäre Human-Fibroblasten wurden aus dermalen Hautanteilen isoliert, die nach der Keratinocyten-Isolierung übrig blieben. Das Gewebe wurde in 0,1 cm² große Stücke zerteilt, auf eine Zellkulturschale gesetzt und nach dem Anheften mit DMEM (20 % FCS) überschichtet. Der Mediumwechsel erfolgte alle 4 Tage. Die Fibroblasten wuchsen innerhalb von 2 bis 3 Wochen aus den Explantaten aus. Sobald die Kulturen konfluent waren, wurden die Fibroblasten von den Schalen abtrypsiniert. In Medium suspendierte Fibroblasten wurden in einer Dichte von 6x 10³/cm² ausgesät und über einen Zeitraum von 7 bis 14 Tagen weiter vermehrt. Nach erneuter Trypsinierung wurden sie in Passage 3 eingefroren (1x 10⁶/ml) und nach Reaktivierung in den hier vorgenommenen Experimenten bis zur Passage 9 eingesetzt (Smola et al., 1993).

3.1.2.3 Passagierung der Zellen

Für die Passagierung konfluenter HaCaT-Keratinocyten wurden die Zellen zunächst kurz mit EDTA gespült um das restliche Medium zu entfernen, anschließend 10 bis 20 min mit EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert um Calcium-abhängige Zellkontakte zu lösen. Durch die anschließende Trypsin-EDTA-Behandlung (im Verhältnis 1:1) wurden die Zellen von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst und durch vorsichtiges wiederholtes Pipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt. Nach dem Abstoppen der Trypsin-EDTA-Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Zellzahl mittels eines CASY-Zellzählgerätes (Schärfe Systems) bestimmt. Nach Abzentrifugieren (250 g, 5 min, Laborfuge 400, Heraeus)

und vorsichtigem Abziehen des Überstandes erfolgte die Aussaat der passagierten Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro cm^2 .

Primäre Fibroblasten wurden mit EDTA gespült, 3 min mit Trypsin behandelt, wie beschrieben suspendiert und in einer Zelldichte von 1×10^5 pro cm^2 ausgesät.

Tabelle 4: Standardkultivierung der Zellen

Zelltyp	Medium	Serum	Passagieren
HaCaT K6	DMEM	10 % FCS	1:10, alle 10 Tage
HaCaT K6 transfiziert	DMEM	10 % FCS	1:10, alle 10-15 Tage
HaCaT K6	KGM2	1 % FCS	1:10, alle 10 Tage
HaCaT K6 transfiziert	KGM2	1 % FCS	1:10, alle 10-15 Tage
Fibroblasten	DMEM	10 % FCS	1:4, alle 7 Tage

3.1.2.4 Einfrieren von Zellen

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte nach Kryokonservierung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff (-160°C). Für die Kryokonservierung wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt (siehe 3.1.2.3) und abzentrifugiert (250 g, 5 min, Laborfuge 400, Heraeus). Das Überstandsmedium wurde entfernt und die Zellen wurden im Einfriermedium (DMEM mit Zusatz von 10 % Glycerin und 20 % FCS) in einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Einfriereröhrchen mit Schraubdeckel abgefüllt, mindestens eine Stunde bei 4°C abgekühlt und danach im Einfrierautomaten (Nunc) mit festgelegter Abkühlrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ eingefroren.

Das Auftauen erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Die aufgetauten Zellen wurden sofort in einer 10 cm-Schale mit Medium ausgesät und der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.1.2.5 Test auf Mykoplasmenkontamination

Alle hier verwendeten Zell-Linien wurden standardmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Hierzu wurden die Zellen für zwei Passagen in antibiotika-freiem Medium kultiviert und anschließend in Kulturschalen auf Objektträger ausgesät. Nachdem die Zellen 70 bis 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min in frischer Carnoy-Lösung fixiert (Methanol + Eisessig im Verhältnis 3:1). Die luftgetrockneten Zellen wurden mit DNA-Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS mit 0,1 % BSA) für 30 min im Dunkeln gefärbt. Nach dreimaligem Waschen in deionisiertem Wasser wurden die gefärbten Zellen in Permafluor

(Immunotech) eingebettet, mit einem Deckglas versehen und im UV-Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-R) auf positive DNA-Färbung im Zytoplasma analysiert.

3.1.3 Herstellung von *in vitro*-Hautäquivalenten

Organotypische Kokulturen (OTK) sind *in vitro*-Kultursysteme, die in Aufbau und Funktion Organen oder komplexen Geweben nachempfunden sind. Für *in vitro*-Hautäquivalente werden Fibroblasten in eine Kollagenmatrix eingebettet, auf der epitheliale Zellen luftexponiert wachsen und ein mehrschichtiges Epithel ausbilden können.

3.1.3.1 Isolierung von Kollagen für die Gele der organotypischen Kokultur

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung des Kollagens für organotypische Kokultur wurden Rattenschwänze verwendet, die vom Tierlabor des DKFZ zur Verfügung gestellt wurden. Die bei -20°C konservierten Rattenschwänze wurden nach dem Auftauen zunächst in 70 % Ethanol desinfiziert. Nach mehrmaligem Spülen in destilliertem Wasser wurde die Haut der Rattenschwänze eingeschnitten und abgezogen. Die gehäuteten Schwänze wurden mit Hilfe von zwei Klammern in kleinere Segmente gebrochen, die überwiegend aus Kollagen Typ I bestehenden Sehnen frei präpariert und in einem mit sterilem PBS gefüllten Gefäß gesammelt. Die restlichen Gewebsanteile wie Blutgefäße und Nervenscheiden wurden vorsichtig entfernt und die Sehnenstränge auf Filterpapier getrocknet. Die getrockneten Kollagenfasern wurden gewogen, in der 100-fachen Menge steriler 0,1 %iger Essigsäure (Riedel-de Haen) aufgenommen und bei 4°C bis zur Auflösung des Kollagens gerührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 10000 g für 30 min abzentrifugiert und der Überstand aus gelöstem Kollagen in sterilen Gefäßen lyophilisiert (Refrig, Fa. Schrader, Friedland). Zur Herstellung der Gebrauchslösung von Kollagen wurde das Trockengewicht des Lyophilisates mit 0,1 % Essigsäure in einer Endkonzentration von 4 mg/ml gelöst. Die Lagerung der Kollagenlösung erfolgte bei 4°C .

3.1.3.2 Standardprotokoll für organotypische Kokulturen (OTK)

Die Fibroblasten wurden trypsiniert, abzentrifugiert und in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in FCS aufgenommen. 8 Teile Kollagen und 1 Teil 10x Hank's (mit Phenolrot als Indikator) wurden auf Eis zusammen pipettiert und das Gemisch mit NaOH bis zum Umschlagpunkt des Indikators neutralisiert. Die Zellsuspension wurde mit der neutralisierten Kollagenlösung

vorsichtig vermischt und luftblasenfrei in Volumina von jeweils 2,5 ml in Filterinserts pipettiert.

Die Filterinserts (3 µm Porengröße, Becton Dickenson) wurden ihrerseits in spezielle 6-well Platten (*Deep-Well-Plates*, BioCoat, Becton Dickenson) eingesetzt. Die Platten wurden zum Ausgelieren 1 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und auf die festen Kollagengele wurden sterile Glasringe mit einem Innendurchmesser von 18 mm aufgesetzt. Nach weiteren 15 min Inkubation bei 37°C waren die Gele durch das Gewicht der Ringe komprimiert und die ausgetretene Flüssigkeit wurde abgesaugt. Anschließend wurde in die Vertiefungen der 6-Well-Platten und die Filterinserts so viel Medium (DMEM + 50 µg/ml Ascorbinsäure) gegeben, dass die Gele vollständig bedeckt waren. 24 h später wurde das Medium innerhalb der Glasringe abgesaugt und durch die epitheliale Zellsuspension (1×10^6 Zellen/Well) ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium über den Zellen vorsichtig abgesaugt, die Glasringe entfernt und frisches Medium bis zur Höhe des Filterinserts zugegeben (ca. 10ml Endvolumen). Dieser Zeitpunkt, von dem an die Zellen luftexponiert kultiviert wurden, entsprach nach Konvention dem Tag 0 der organotypischen Kokultur. Während der Laufzeit der OTK's wurde das Medium (DMEM + 50 µg/ml Ascorbinsäure) alle 2 Tage gewechselt. Dabei sollte der Mediumspiegel der Unterseite des Filterinserts gerade berühren. Die Kulturen wurden im Zeitraum zwischen Tag 7 und 21 entnommen und nachfolgend für die Histologie bzw. für Gefrierschnitte weiterpräpariert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Kollagengels

Bestandteil	Zusammensetzung	Herkunft
Kollagen-Lösung	80 %	Rattenschwänze
Hank's Lösung (10x konzentriert)	10 %	Biochrom
NaOH (5M)	Etwa 150 µl	J. T. Baker
FCS mit Zellen	10 %	-----

3.2 „Knock down“ von Insulin Rezeptor und IGF-1 Rezeptor mit der siRNA-Methode

Die siRNA-Methode ist eine der neusten Methoden für eine gezielte Suppression der spezifischen Gene, die sich auf dem zellulären Phänomen der RNA Interference (RNAi) basiert. RNAi ist eine sequenz-spezifische post-transkriptionelle Gen-Suppression, bei der die doppelsträngigen dsRNA-Moleküle (double-strand RNA) als ein Signal für die Degradation der homologen mRNA benutzt werden (Sharp, 2001; Hannon, 2002; Persengiev et al., 2004). Allerdings führt die Applikation langer dsRNA-Moleküle in Säugertier-Zellen zu einer nicht-spezifischen Suppression der Gen-Expression. Deswegen werden für die gezielte Suppression

von Genen in Säugertier-Zellen kurz-kettige (21-25 nt lang) dsRNAs, die als „small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet werden, verwendet. siRNAs binden an „ihre“ komplementäre mRNAs und dienen somit als „Primer“ für die Aktivierung eines Enzym-Komplex (RISC, RNA-induced silencing complex), der zur Degradation von entsprechenden mRNAs führt (Holen et al., 2002).

3.2.1 Design von Insulin Rezeptor (IR) und IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) siRNA

Als Grundlage für das Design von IR und IGF-1R siRNA diente die entsprechende Internet Seite der Firma Qiagen (<http://sirna.qiagen.com>). Dieses Software-Programm ermittelt siRNA Sequenzen mit 21 Basenpaaren basierend auf dem elektronischen Zugriff auf das interessierende Gen (NCBI Datenbank: IGF-1R - NM_00875 und IR - NM_000208). Dabei werden folgende Kriterien für die Ermittlung der siRNA berücksichtigt:

1. Die Ziel-Sequenz sollte mit zwei Adenin-Basen (AA) beginnen;
2. Der Gehalt an Guanin-Cytosin (GC) Basen sollte nicht 50 % überschreiten;
3. Mehr als drei Guanine oder Cytosine in Reihe sollten vermieden werden;
4. Die Ziel-Sequenz sollte nicht mehr als vier Thyminе oder Adenine pro Einzelstrang besitzen, da poly(T)-Nukleotid-Reihen als Terminationssignal für RNA Polymerase III dienen.

Die Suche mit Qiagen-Programm lieferte für IGF-1R 120 und für IR 200 Sequenzen, die den genannten Kriterien entsprachen. Um zu gewährleisten, dass die gefundenen Sequenzen keine Homologie zu anderen Genen aufwiesen, wurden sie mit dem menschlichen Genom verglichen (Nukleotid-Nukleotid Blast Programm, NCBI). Nach diesem Vergleich zeigten 45 Sequenzen für IR und 32 Sequenzen für IGF-1R keine weitere Homologie im Human-Genom. Aus diesen Sequenzen wurden je 10 Sequenzen pro Gen, die am Anfang, in der Mitte und am Ende der Zielgene lagen, nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und hergestellt.

3.2.2 Herstellung von IR und IGF-1R siRNA

Die siRNA Oligonucleotide wurden mit Hilfe des „*Silencer* siRNA Construction Kits“ (Ambion) hergestellt. Im ersten Schritt wurden zwei DNA Oligonukleotide synthetisiert. Diese 29 nt langen Matrizen bestanden aus einer 21 nt langen Region, die für siRNA kodierte, und einem 8 nt langen Abschnitt, komplementär zum T7 Promotor Primer. In separaten Reaktionen wurden 2 Matrizen-Oligonukleotide mit dem T7 Promotor Primer hybridisiert und die 3` Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase verlängert, sodass doppel-

strängige siRNA Transkriptionsmatrizen entstanden. Die „sense“ und „antisense“ siRNA Matrizen wurden mit Hilfe der T7 RNA Polymerase transkribiert. Anschließend wurden die hergestellten RNA Transkripte hybridisiert um doppel-strängige (ds) RNAs zu produzieren. Nach Behandlung der dsRNA mit einer Ribonuclease entstanden doppel-strängigen siRNAs mit UU Dinukleotid-Überhängen (Abb. 12). Die siRNA Konzentration wurde spektrometrisch (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) bestimmt.

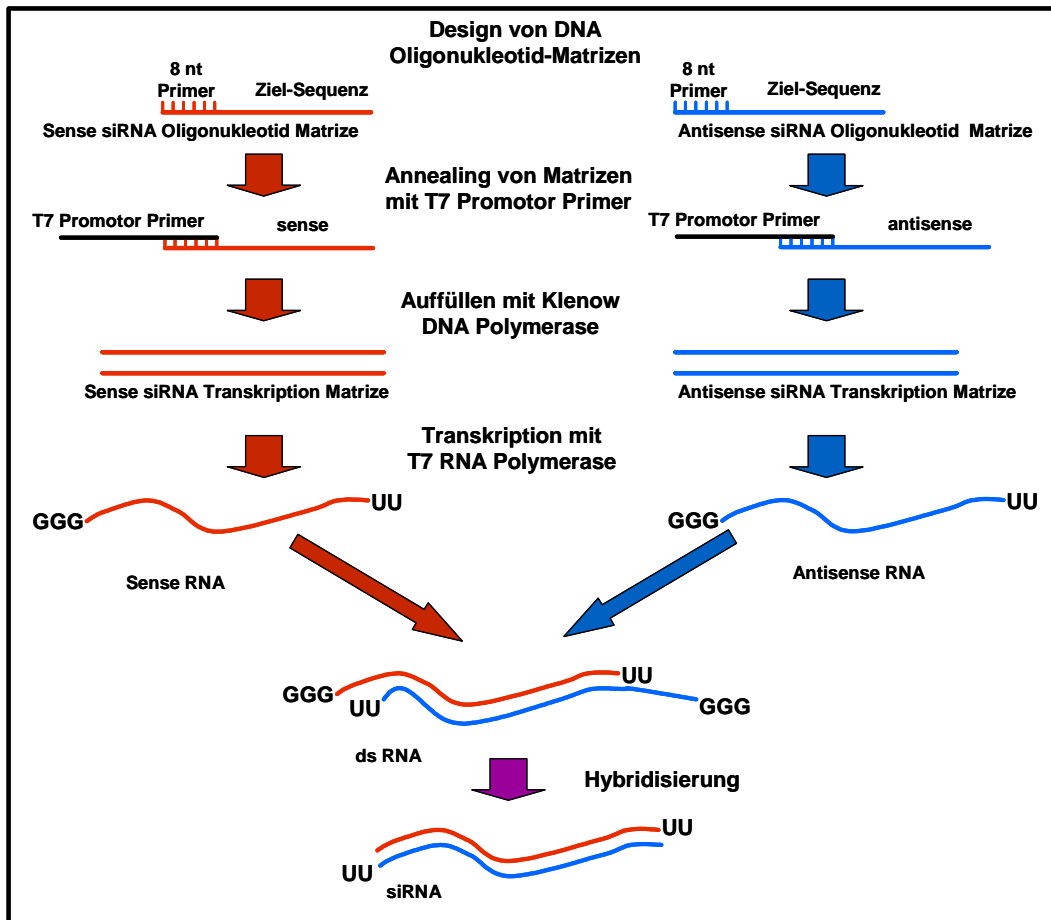


Abbildung 12: Herstellung von siRNAs mit dem „Silencer Construction Kit“.

3.2.3 Transiente Transfektion von HaCaT K6 Zellen mit IR und IGF-1R siRNA

24 Stunden vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro 6 cm Schale ausgesät. Die entsprechenden siRNAs wurden in serum-freiem Medium (DMEM) auf eine Endkonzentration von 20 nM oder 100 nM verdünnt und anschließend mit dem Transfektionsreagenz (OligofectamineTM, Invitrogen) inkubiert. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium durch neues serum- und antibiotika-freies DMEM ersetzt (ein Drittel des Endvolumen), das Transfektionsgemisch

wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und 4 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die restlichen zwei Drittel des DMEM mit 30 % FCS zu den Zellen gegeben. Bei der transienten Transfektion wurden für jede einzelne siRNA Sequenz zwei Konzentrationen (20 nM und 100 nM) getestet und zusätzlich zwei negative Kontrollen (ohne siRNA, mit und ohne Oligofectamine) für jedes Experiment angesetzt. Nach drei Zeitpunkten (24h, 48h, 72h) wurde jeweils ein Satz der transfizierten Zellen lysiert und die Rezeptor-Protein-Expression mit der Western Blot Analyse überprüft. Insgesamt wurden je 10 verschiedenen siRNA Sequenzen für IR und IGF-1R getestet. Die Sequenzen, die am stärksten die Protein-Expression reduziert hatten und für die weiteren Versuche verwendet wurden, sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Ausgewählten siRNA Sequenzen

Name der Sequenz	Richtung	Sequenz
IR_200	sense	5'-AAGGAAATCTTCGGGCCTCGT-3'
	antisense	5'-AAACGAGGCCCGAAGATTTCC-3'
IR_604	sense	5'-AATCGTTTCGACAAACTGCCCG-3'
	antisense	5'-AACGGGCAGTTTGTCGAACGA-3
IGF-1R_1503	sense	5'-AAGAATCGCATCATCATAACC-3'
	antisense	5'-AAGGTTATGATGATGCGATTC-3'
IGF-1R_1585	sense	5'-AAGCACCTTTAAGAATGTCA-3'
	antisense	5'-AATGACATTCTTAAAGGGTGC-3'

3.2.4 Stabile Transfektion von HaCaT K6 Zellen mit IR siRNA

Für die stabile Transfektion von HaCaT-Zellen wurde ein spezieller siRNA exprimierender Vektor mit Neomycin Resistenz verwendet (pSilencerTM 2.1-H1 neo, Ambion) (Abb. 13).

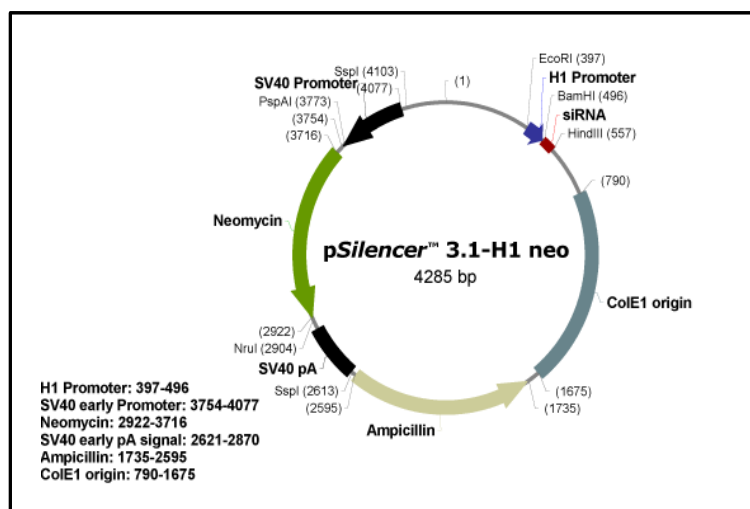


Abbildung 13: pSilencer Vektor-Karte.

Anhand der konvertierten Sequenzen wurden anschließend komplementäre DNA-Oligonukleotid-Matrizen für die Haarnadelschleife-shRNAs synthetisiert (ThermoHybaid).

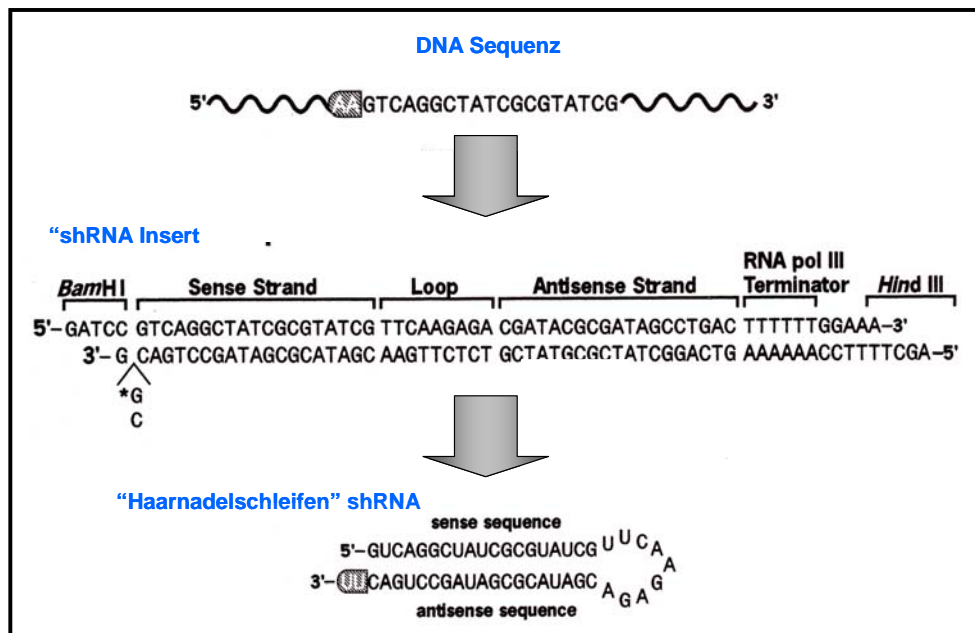


Abbildung 15: Design von Haarnadelschleifen-shRNA Matrize.

3.2.4.2 Klonieren von Haarnadelschleifen-shRNA-Inserts in Expressions-Vektor (pSilencerTM 2.1-H1 neo)

Die Haarnadelschleifen-shRNA Oligonukleotid-Matrizen wurden „aufgeschmolzen“ (annealing) und in den linearisierten Vektor ligiert. Alle Prozeduren erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Im Anschluss wurden *E.coli* Zellen (XL10-Gold Ultracompetent Cells, Stratagene) mit den Ligation-Produkten transformiert. Als negative Kontrolle wurde ein Aliquot von *E.coli* Zellen mit Minus-Insert (Vektor ohne Insert) Ligation transformiert. Die transformierten Zellen (mit Plus-Insert und Minus-Insert Ligation) wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die nicht transformierten Zellen wurden als negative Kontrolle ausplattiert.

Nach der Inkubation wurden die Klone gepickt, in LB-Medium mit Ampizillin (50 µg/ml) überführt und über Nacht geschüttelt (37°C, 245 rpm, ISF-4-V Adolf Kühner AG). Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep^R Spin Miniprep Kit (Quiagen) isoliert und die DNA Konzentrationen spektrometrisch (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) bestimmt.

Tabelle 8: Verwendeten Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller	
LB-Medium, pH 7,0	Trypton Hefe Extrakt NaCl auf 1 Liter H ₂ O	10 g 5 g 10 g	AppliChem Gerbu Merck
LB-Agar	LB-Medium Bacto-Agar Ampizillin	1 L 15 g 50 µg/ml	Fluka

Um zu kontrollieren, ob das shRNA Insert in den Vektor aufgenommen wurde, wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Die Restriktion-Produkte wurden dann an 2 % Agarose Gelen aufgetrennt um das Vorhanden der Insert-Bande (64 bp) zu überprüfen.

Tabelle 9: Restriktion-Ansatz

Material	Konzentration	Hersteller
Plasmid DNA	100 ng Insert	
Hind III	40 U	Boehringer Mannheim
BamHI	40 U	BioLabs
Puffer B	1/10 vom Gesamtvolumen	Roche
Wasser	Auf Gesamtvolumen auffüllen	
2 Stunden Inkubation bei 37°C		

Mit den Klonen, die das siRNA Insert enthielten, wurden größere Kulturen angesetzt (500 ml LB-Medium mit Ampizillin) und über Nacht schüttelnd inkubiert (37°C, 245 rpm, ISF-4-V Adolf Kühner AG). Die Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Maxi Kit (Quiagen) isoliert und die DNA Konzentrationen spektrometrisch bestimmt.

3.2.4.3 Transfection von HaCaT K6 Zellen mit p*Silencer* Plasmid

Optimierung der Antibiotikum-Selektion

Um die optimale Selektion von transfizierten Zellen zu gewährleisten wurde eine Neomycin Titration durchgeführt. Pro 6 cm Schale wurden 2×10^5 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium durch DMEM mit Neomycin in Konzentrationen von 200-1000 µg/ml ersetzt. Die Zellen wurden 14 Tage kultiviert, wobei der Medium-Wechsel mit Neomycin alle drei Tage erfolgte. Jeden 2. Tag wurde die Vitalität der Zellen untersucht. Diejenige Neomycin-Konzentration galt als optimal, bei der nach 8 Tagen ein massiver Zelltod eingesetzt hatte und nach 14 Tagen keine vitalen Zellen mehr beobachtet werden konnten. Die entsprechende Dosis kann je nach Zelltyp beträchtlich schwanken und muss

daher in jedem Fall experimentell ermittelt werden. Für HaCaT K6 Zellen wurden eine optimale Neomycin-Konzentration von 650 µg/ml bestimmt.

Stabile Transfektion der Zellen

24 Stunden vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro 6 cm Schale ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde die Plasmid-DNA mit dem Transfektionsreagenz (GeneJammer, Stratagene) und DMEM (serum- und antibiotikum-frei) inkubiert. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Als Negativ-Kontrolle dienten Ansätze ohne DNA mit und ohne Transfektionsreagenz. Das Medium wurde durch frisches serum- und antibiotika-haltiges DMEM ersetzt (die Hälfte des Endvolumens), das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und 3 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die zweite Hälfte des DMEM (mit 2-facher FCS-Konzentration) zu den Zellen gegeben. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und in 15 cm Zell-Schalen überführt. 24 Stunden nach Passagierung wurde das Selektionsmedium (650 µg/ml G418) dazu gegeben. Nach einigen Tagen waren die nicht transfizierten Zellen abgestorben, während die transfizierten neomycin-resistenten Zellen kleine Kolonien bildeten. Die Position der Kolonien wurde markiert und das Medium abgesaugt. Rund um die einzelnen Kolonien wurden Plastikringe plaziert, deren unterer Rand eingefettet war, so dass die Kolonien flüssigkeitsdicht umschlossen waren. Verschiedene Kolonien wurden in diesen Klonierungsringen abtrypsiniert und in separate Schalen überführt, vermehrt und analysiert. Die Analyse des „Knock-Down“ des Insulin Rezeptors erfolgte sowohl auf mRNA (RT-PCR) als auch auf Protein Ebene (Western Blot).

3.2.5 Analyse der Apoptose bei HaCaT K6 Zellen transient transfiziert mit IR oder IGF-1R siRNA

Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät (2×10^5 Zellen/Objektträger) und nach 24 Stunden mit 100 nM IR oder IGF-1R siRNA transient transfiziert (siehe 3.2.3). Folgende siRNAs wurden für Transfektion verwendet:

IR:	siRNA_IR_604
	siRNA_IR_200
IGF-1R:	siRNA_IGF1R_1503
	siRNA_IGF1R_1585

Zusätzlich wurden zwei Negativ-Kontrollen (ohne siRNA mit und ohne Oligofectamine) für jedes Experiment angesetzt. Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach der Transfektion) wurden die Objektträger entnommen, zweimal mit PBS- gewaschen, an der Luft getrocknet und 1 h in 4 % PFA (Paraformaldehyd) bei RT fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 2x 5 min mit PBS- gespült und an der Luft getrocknet. Die fixierten Objektträger wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Für die Identifizierung der apoptotischen Zellen wurde das „In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red“ (Roche) verwendet. Hiermit werden die Brüche in DNA-Strängen detektiert, die während der Apoptose generiert werden. Diese Detektion basiert auf der TUNEL-Reaktion (TdT-mediated dUTP nick end Labeling), bei der das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) die markierten Nukleotide in den Bruchstellen der DNA-Stränge einbaut.

Alle Prozeduren erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen nur mit Markierungslösung (ohne terminale Transferase) behandelt. Als positive Kontrolle wurden die Zellen vor der Markierung mit DNase I inkubiert (10 min, bei RT) um künstlich Brüche in DNA-Strängen zu erzeugen.

Nach der TUNEL-Färbung wurde eine Gegenfärbung mit dem Pan-Keratin-Antikörper (Meerschweinchen pk, 1:50, Progen Klon GP14) durchgeführt, um die Zellen besser sichtbar zu machen. Alle Prozeduren entsprachen dem Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz (siehe 3.5.3).

Anschließend wurde die Intensität der positiven Signale mit dem Programm „AnalySIS“ gemessen (zehn Felder pro Objektträger) und in Bezug auf Kernfärbung ausgewertet.

Tabelle 10: Verwendeten Lösungen und Chemikalien

Lösung/Chemikalien	Zusammensetzung	Hersteller	
PFA 4 %	4 % PFA in PBS, pH 7,4 PBS- PFA 45 min bei 70°C lösen	Serva Merck	
Permeabilisierungslösung	NaCitrat Triton-X-100 Wasser	0,1 % 0,1 %	Fluka Sigma
DNase I	1000 U/ml	Roche	

Tabelle 11: Verwendeten Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antigen	Typ	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Pankeratin	Meerschweinchen pk	1:50	Progen	Klon GP14

Tabelle 12: Verwendeten Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Spezifität	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Esel-anti-Meerschweinchen	DTAF	1:100	Dianova	706-015-148

3.2.6 Analyse von Zellzahl, Proliferation und Differenzierung bei HaCaT K6 Zellen transient transfiziert mit IR oder IGF-1R siRNA

Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät (2×10^5 Zellen/Objektträger) und nach 24 Stunden mit 100 nM IR oder IGF-1R siRNA transient transfiziert (siehe 3.2.3). Folgende siRNAs wurden für Transfektion verwendet:

IR: siRNA_IR_604
 siRNA_IR_200

IGF-1R: siRNA_IGF1R_1503
 siRNA_IGF1R_1585

Zusätzlich wurden zwei Negativ-Kontrollen (ohne siRNA mit und ohne Oligofectamine) für jedes Experiment angesetzt. Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach der Transfektion) wurden die Objektträger entnommen, zweimal mit PBS- gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 % Methanol bei 4°C für 1 min, danach bei -20°C für 2 min in Aceton fixiert und anschließend in PBS- rehydriert. Alle weiteren Prozeduren entsprachen dem Protokoll für die indirekte Immunofluoreszenz (siehe 3.5.3).

Für die Differenzierungsanalyse wurde die Expression vom Keratin 1/10, als früher, und Filaggrin, als später Differenzierungs-Marker untersucht.

Für die Proliferationsanalyse wurde die Verteilung mitotischer Zellen mit einem Antikörper gegen Ki67 untersucht. Das Ki67-Antigen ist hauptsächlich während den aktiven Phasen des Zell-Zyklus (G1, S, G2 und M-Phasen) exprimiert und ist nicht in den ruhenden Zellen in der G0-Phase vorhanden (Traut et al., 2002).

Für die Analyse der Zellzahl wurden die Kerne mit dem Kern-Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst; 20 µg/ml) gefärbt. Die Anzahl der gefärbten intakten Kerne entsprach dabei der Zellzahl.

Die Intensität der positiven Signale wurde bei allen Experimenten mit dem Programm „AnalySIS“ gemessen (zehn Felder pro Objektträger) und im Bezug auf Kernfärbung ausgewertet.

Tabelle 13: Verwendeten Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antigen	Typ	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Keratin 1/10	Maus, mk	1:100	Sigma	C7284
Filaggrin	Maus, mk	1:300	Cell Systems	5002
Ki67	Maus, mk	1:20	Dianova	Dia 505

Tabelle 14: Verwendeten Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Spezifität	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Ziege-Anti-Maus	Alexa 488(grün)	1:800	Molecular Probes	A-11029
Ziege-Anti-Maus	Alexa 568(rot)	1:800	Molecular Probes	A-11031

3.2.7 Migrations-Assay („Wund-Assay“)

Die HaCaT K6 und Zellen der stabil transfizierten Klone wurden auf 6-Well Platten ausgesät (100.000 Zellen/Well) und 7 – 10 Tage bis zur Postkonfluenz in KGM2-Medium mit 1 % FCS kultiviert. Für die Bestimmung der Zell-Migration wurden in jedem Well mit einer Pipettenspitze zwei dünne Linien in den Zellrasen gekratzt. Das Medium mit den abgelösten Zellen wurde abgesaugt und die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde das serum-freie KGM2-Medium mit den Stimulationsfaktoren zugegeben (2 ml Medium/Well). Um die Zell-Proliferation zu verhindern wurde Mitomycin C (500 ng/ml) ins Medium gegeben. Die Zellfronten wurden auf der Unterseite der 6-Well-Platte mit einem wasserfesten Filzstift markiert und zur Orientierung mit Querstrichen gekennzeichnet. Die markierten Stellen wurden dann zum Zeitpunkt 0 (direkt nach der Stimulation) und nach 24 Stunden fotografiert. Die Bilder wurden mit dem Computer-Programm „Photoshop“ übereinander gelegt und die wieder besiedelten Flächen, als Maß für die Migration, mit dem Computer-Programm „Analysis“ gemessen.

Für die erste Reihe der Versuche wurden die Zellen nach folgendem Behandlungs-Schema stimuliert:

1. nur mit Insulin,
2. nur mit IGF-1,
3. mit beiden Faktoren.

Als Negativ-Kontrolle wurde der Ansatz ohne Stimulation mit Insulin und IGF-1 verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten die Zellen, die im KGM2 mit 1 % FCS weiter kultiviert worden waren.

Für die zweite Versuchsreihe wurde noch zusätzlich eine Gruppe der Ansätze (wie oben) (a) entweder mit einem blockierenden Antikörper gegen IGF-1R (Block. AK) oder (b) als Kontrolle mit einem irrelevanten Antikörper (Irrel. AK) behandelt.

Tabelle 15: Stimulationsfaktoren für Migrations-Assay

Faktor	Konzentration	Hersteller
Insulin	100 nM	Sigma
IGF-1	10 nM	R&D

Tabelle 16: Antikörper für Migrations-Assay

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Anti-IGF-1R, mAb (α IR3)	2 μ g/ml	Calbiochem
Irrelevanter Antikörper	2 μ g/ml	Sigma

Tabelle 17: Erster Versuchsaufbau für Migrations-Assay

Stimulation mit	Ohne Insulin Ohne IGF-1	Mit Insulin Ohne IGF-1	Ohne Insulin Mit IGF-1	Mit Insulin Mit IGF-1	Kontrolle 1 %FCS

- ✓ Wachstums-Medium für alle Ansätze – KGM2 + 1 % FCS
- ✓ Stimulations-Medium für alle Ansätze – KGM2 (FCS-frei)
- ✓ Bei allen Ansätzen Zusatz von 500 ng/ml Mitomycin (Proliferations-Inhibitor)

Tabelle 18: Zweiter Versuchsaufbau für Migrations-Assay

Stimulation mit	Ohne Insulin Ohne IGF-1	Mit Insulin Ohne IGF-1	Ohne Insulin Mit IGF-1	Mit Insulin Mit IGF-1	Kontrolle 1 %FCS
	Ohne Insulin Ohne IGF-1 + Block AK	Mit Insulin Ohne IGF-1 + Block AK	Ohne Insulin Mit IGF-1 + Block AK	Mit Insulin Mit IGF-1 + Block AK	Kontrolle 1 %FCS + Block AK
	Ohne Insulin Ohne IGF-1 + Irrel. AK	Mit Insulin Ohne IGF-1 + Irrel. AK	Ohne Insulin Mit IGF-1 + Irrel. AK	Mit Insulin Mit IGF-1 + Irrel. AK	Kontrolle 1 %FCS + Irrel. AK

- ✓ Wachstums-Medium für alle Ansätze – KGM2 + 1 % FCS
- ✓ Stimulations-Medium für alle Ansätze – KGM2 (FCS-frei)
- ✓ Bei allen Ansätzen Zusatz von 500 ng/ml Mitomycin (Proliferations-Inhibitor)

3.2.8 Proliferations-Assay

Die HaCaT K6 und Zellen der stabil transfizierten Klone wurden auf 24-Well Platten (20.000 Zellen/Well) in KGM2-Medium mit 1 % FCS ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Eine Platte pro Zell-Linie wurde eingefroren und als Aussaat-Kontrolle (0-Wert) verwendet. Bei den anderen Platten wurde das Medium durch serum-freies KGM2 mit Stimulationsfaktoren ersetzt. Die Zellen wurden wie folgt stimuliert:

1. nur mit Insulin (100 nM),

2. nur mit IGF-1 (10 nM),
3. mit beiden Faktoren.

Als Negativ-Kontrolle wurde der Ansatz ohne Stimulation mit Insulin und IGF-1 verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten die Zellen, die im KGM2 mit 1 % FCS weiter kultiviert worden waren. Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach dem Stimulationsanfang) wurde je eine Platte pro Zell-Linie entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren, um die Zellmembran aufzubrechen. Nach mindestens 24 h wurden die Platten bei RT aufgetaut und mit dem DNA-Farbstoff SYBR^R Green I (Molecular Probes, 1:2500 in PBS mit 0,1 % Triton-X-100) 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion mit dem Fluoroscanner *Ascent* (Labsystems) gemessen.

3.3 Protein-Analyse

Proteine lassen sich in einem SDS-Acrylamidgel nach ihrer Molekularmasse auftrennen und anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie immobilisiert vorliegen. Die aufgetrennten Proteine lassen sich auf der Membran durch Bindung spezifischer Antikörper nachweisen, indem diese ihrerseits durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper detektiert werden. Die Umsetzung des entsprechenden Enzym-Substrats macht das betreffende Protein sichtbar und erlaubt außerdem die relative Konzentration der Proteine somit semiquantitativ zu bestimmen.

3.3.1 Lyse der Zellen

Zur biochemischen Untersuchung der Proteine war es erforderlich, die Zellen mittels Lysepuffer (RIPA) in Anwesenheit von Detergenzien aufzuschließen. Um einer Proteindegradation durch Proteasen vorzubeugen, wurden Protease-Inhibitoren zugesetzt und alle Schritte zur Lyse der Zellen auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt.

Dazu wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS gespült und die adhären Zellen mechanisch mit einem Zellschaber in 0,5 ml PBS abgelöst. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 g, 4°C, Biofuge 15R, Heraeus) wurde das Zellpellet im RIPA-Lysepuffer erneut resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Das Zell-Lysat wurde durch weitere Zentrifugation (10 min, 10000 g, 4°C, Biofuge 15R, Heraeus) von verbleibenden Zelltrümmern abgetrennt, der klare Überstand abgenommen und für die nachfolgenden Experimente weiterverwendet. Die Lagerung des Lysates erfolgte bei -80°C.

Tabelle 19: Verwendeten Chemikalien zur Lyse der Zellen

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller	
RIPA-Puffer	Tris-HCl pH 7,2	10 mM	Sigma
	NaCl	150 mM	Merck
	EDTA	5 mM	Gerbu
	Triton X-100	1 %	Sigma
	SDS	0,1 %	Gerbu
	Natriumdesoxycholat	1 %	Sigma
Protease-Inhibitoren	Leupeptin	1 µg/ml	Roche
	Pepstatin	1µg/ml	Roche
	Aprotinin	1 µg/ml	Roche
	Natriumorthovanadat	100 mM	Serva
	Pefablock	10 mM	Roche

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976), der einer Coomassie-Blau-Färbung zu Grunde liegt. Coomassie Blau bindet in seiner anionischen Form spezifisch an Arginin-, Tryptophan-, Tyrosin-, Histidin- und Phenylalanin-Resten der Proteine und hat ein Absorptionsmaximum von 595 nm (blau). Der ungebundene Farbstoff in Lösung liegt in der kationischen Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) vor.

Die Lysate wurden im Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 2 und 4 µl mit 200 µl Bradfordlösung (BioRad, 1:5 in Wasser) vermischt. Die Lösung wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch Extrapolation anhand einer Eichgeraden, die jeweils parallel aus BSA Lösungen bekannter Konzentration erstellt wurde.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Es wurden vertikale Gelapparaturen (Hoefler und Amersham) verwendet, wobei in einem niedrigprozentigen Sammelgel zunächst die Aufkonzentration der Proteine zu einer schmalen Schicht erfolgt. Im unteren Trenngel, in dem andere Pufferbedingungen herrschen, werden die Proteine dann entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Sammel- und Trenngel wurden durch Mischen der jeweiligen Gelpuffer mit Acrylamid/Bisacrylamid (BioRad) hergestellt. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von TEMED (Sigma) als Katalysator und APS (Serva) als Radikalstarter eingeleitet.

Tabelle 20: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel				Sammelgel
Konzentration	6 %	7,5 %	10 %	12 %	2,8 %
Glycerin (50% v/v)	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	-----
Wasser	5,25 ml	4,90 ml	4,25 ml	3,75 ml	2,6 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-----
Sammelgelpuffer	-----	-----	-----	-----	0,95 ml
Acrylamid (T40%-3,7%)	1,50 ml	1,90 ml	2,50 ml	3,00 ml	0,30 ml
APS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	22,5 µl
Temed	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	7,5 µl

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und direkt nach dem Gießen mit Isobutanol (Merck) überschichtet, um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu gewährleisten. Die Polymerisation erfolgte für etwa 20 min bei RT, dann wurde das restliche Isobutanol mit Wasser entfernt und schließlich das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel aufgegossen. Durch das Einsetzen von Kämmen entstanden dabei Ladetaschen, mit einem Probevolumen von maximal 40 µl. Nach vollständiger Polymerisation des Geles (ca. 15 min) wurden die Kämmen vorsichtig entfernt.

Tabelle 21: Zusammensetzung der bei der Elektrophorese verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung		Hersteller
Sammelgelpuffer	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M	Sigma
	SDS	0,4 %	Gerbu
Trenngelpuffer	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M	Sigma
	SDS	0,4 %	Gerbu
2x-Probenpuffer (reduzierend)	Tris-HCl pH 6,8	130 mM	Sigma
	SDS	6 %	Gerbu
	Glycerin	20 %	Roth
	β-Mercaptoethanol	10 %	Serva
2x-Probenpuffer (nicht reduzierend)	Bromphenolblau	0,1 %	Sigma
	Siehe reduzierender 2x-Probenpuffer ohne Zusatz von β-Mercaptoethanol		
Laufpuffer	Tris	33 mM	Sigma
	Glycin	194 mM	Roth
	SDS	0,1 %	Gerbu
Transferpuffer	Tris	33 mM	Sigma
	Glycin	194 mM	Roth
	Methanol	20 %	Baker
Blockierlösung	PBS-		Serva
	Milch (1,5 % Fett)	10 %	Roth
	Tween-20	0,1 %	Merck

Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit Probenpuffer versetzt (nicht reduzierend für den Integrin-Nachweis, reduzierend für die restlichen Proteine), für 5 min bei 95°C inkubiert und in die Ladetaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde pro

Gel ein Regenbogen-Proteinmarker (Amersham Bioscience) aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte in Laufpuffer für etwa 2-3 Stunden bei Raumtemperatur bei 70-90 V und 45 mA.

3.3.4 Western Blot

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Schleicher und Schüll, BA-85). Die Gele wurden mit Hilfe einer Kassette auf der Membran fixiert und in eine Transferkammer (BioRad) gesetzt. Der Transfer erfolgte bei 48 V für 3 Stunden bei RT oder bei 20 V über Nacht bei 4°C. Die Transfereffizienz wurde durch Färben der Membran mit essigsaurer Ponceau-Rot-Lösung (Sigma) überprüft; die Ponceau-Färbung wurde nach der Dokumentation des Bandenmusters durch Waschen mit Blockierlösung komplett entfernt.

3.3.5 Immundetektion

Um auf der Membran gebundene Proteine nachzuweisen, wurden in der Blockierlösung gelöste spezifische Primärantikörper verwendet. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung und dann mit den Primärantikörpern für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Membranen mit Blockierlösung (fünfmal je 5 min bei RT) wurden die Membranen mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit Blockierlösung (fünfmal je 5 min bei Raumtemperatur) erfolgte die Nachweisreaktion basierend auf Chemolumineszenz nach Angaben des Herstellers (Amersham Bioscience). Dabei wird das Detektionsreagenz Luminol durch die Peroxidase oxidiert und so in einen angeregten Zustand überführt. Unter Lichtemission fällt Luminol anschließend in seinen Grundzustand zurück, wobei das emittierte Licht durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm) detektiert wird.

Tabelle 22: Primäre Antikörper für den Western Blot

Antigen	Typ	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Insulin Receptor β	Maus, mk	2 μ g/ml	Chemicon	MAB1139
IGF-1 Receptor β	Kaninchen, pk	1:350	Santa Cruz	sc-713
Caveolin-1	Maus, mk	1:1000	BD Transduction Lab.	610406
Integrin α 6	Ratte, mk	1:500	Chemicon	MAB1378
Integrin β 4	Ratte, mk	1:500	85Cymbus	CBL 545
PKC δ	Maus, mk	1:500	BD Transduction Lab.	610397
PKC α	Maus, mk	1:500	BD Transduction Lab.	610107
Cytokeratine Typ I&II	Maus, mk	1:1000	Progen	61835

Tabelle 23: Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Spezifität	Detektion	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Anti-Kaninchen	POX	1:10000	Dianova	711-035-152
Anti-Maus	POX	1:10000	Dianova	800-367-5296
Anti-Ratte	POX	1:10000	Dianova	112-035-003

3.4 Nachweis der mRNA-Expression

Die reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode zum Nachweis von mRNA. Dabei wird zunächst RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung eines Oligo-dT-Primers und eines Random-Hexamer-Primergemisches werden beliebige mRNA – Moleküle unspezifisch in cDNA umgeschrieben. Dagegen kann durch Amplifikation einzelner cDNA-Stränge über PCR mit spezifischen Primern und anschließender Gelelektrophorese diese cDNA und damit die mRNA-Expression der untersuchten Proteine nachgewiesen werden.

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebekultur Zellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidin-Thiocyanat-Methode in Kombination mit einer spezifischen RNA-bindenden Säule. Bei dieser Methode werden RNA-Moleküle mit mindestens 200 Nukleotiden isoliert, wodurch neben ribosomaler RNA vor allem mRNA-Moleküle angereichert werden, da die kleineren Moleküle (tRNAs, 8S rRNA, 5S rRNA) abgetrennt werden.

90 – 100 % konfluente Zellen in Einzellschicht wurden nach Angaben des Herstellers direkt in der Zellkulturschale mittels Lysepuffer und Zellschaber lysiert. Die weiteren Schritte erfolgten ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Die RNA Konzentration wurde anschließend spektrometrisch (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) bestimmt.

3.4.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA aus Zellen wurde mittels „OmniscriptTM Reverse Transcriptase Kit“ (Qiagen) in cDNA umgeschrieben.

Gemäß des Protokolls wurden 5 µg RNA in 1x RT-Puffer mit 0,5 mM Nukleotid-Mix (dNTP-Mix), 2,5 units/µl Omniscript Reverse Transkriptase, 1 µM Oligo-dT Primern und Random-Hexameren, 1 U/µl RNase Inhibitor sowie RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 min. Danach wurden die Produkte 5 min bei 93°C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und bei -20°C eingefroren oder direkt für die PCR eingesetzt.

Tabelle 24: Verwendeten Chemikalien für die Reverse Transkription

Chemikalien	Konzentration im Endvolumen (50 µl)	Hersteller
RNA	5 µg	
RT-Puffer (10x)	1x	Qiagen
dNTP-Mix (5 mM/NTP)	0,5 mM	Qiagen
Omniskript Reverse Transkriptase (50 U/µl)	2,5 U/µl	Qiagen
Oligo dT Primer (100 µM)	1 µM	ThermoHybaid
Random Hexamer (50 µM)	1,25 µM	ThermoHybaid
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 U/µl	Roche
Wasser, Rnase-frei		Qiagen

3.4.3 Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurden 2,25 µl der RT-Produkte mit 0,1 mM dNTPs, 0,05 U/25 µl Taq-Polymerase (Qiagen), 1x PCR-Puffer, MgCl₂ optimiert je nach Primer, jeweils 0,2 µM upstream und downstream Primer mit H₂O auf 25 µl eingestellt. Die Bedingungen für die PCR wurden Primer-abhängig optimiert.

Tabelle 25: Verwendeten Chemikalien zur Polymerase-Ketten-Reaktion

Chemikalien	Konzentration im Endvolumen (25 µl)	Hersteller
cDNA	2,25 µl	
Puffer (10x)	1x	Qiagen
5`Primer (10 µM)	0,2 µM	ThermoHybaid
3`Primer (10µM)	0,2 µM	ThermoHybaid
dNTPs (2,5 mM/dNTP)	0,1 mM	Qiagen
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,05 U/µl	Qiagen
Wasser		Qiagen

3.4.3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die Auswahl geeigneter Primerpaare zur Amplifikation spezifischer cDNAs erfolgte nach mehreren Kriterien. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, die als Verunreinigung in der RNA-Präparation vorhanden sein kann, wurden die Primer so gewählt,

dass sie Exon-übergreifend binden. Die zu amplifizierende cDNA-Sequenz sollte zwischen 200 und 700 bp lang sein, da Fragmente dieser Länge elektrophoretisch gut auftrennbar sind. Die Primer sollten zwischen 18 und 25 Nukleotiden lang sein, damit eine Annealing-Temperatur unterhalb des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase gegeben ist. Die Annealing-Temperatur sollte allerdings auch nicht zu niedrig sein, da sich sonst Sekundärstrukturen innerhalb des cDNA-Templates und der Primer bilden können, die zur Beeinträchtigung der Primerbindung führen. Die Primerauswahl nach diesen Kriterien wurde mit Hilfe des Software-Programms „Oligo“ (National Bioscience, Inc.) vorgenommen. Die Spezifität der Primer wurde dann mit Hilfe der Sequenzdatenbank „Blast-Search“ (PubMed) überprüft. Synthetisiert wurden die so ausgesuchten und überprüften Primer von der Firma Thermohybid.

Die theoretische Annealing-Temperatur der einzelnen Primer wurde von der Oligo-Software berechnet. Diese Angabe diente als Ausgangswert für die Optimierung mittels Gradientencycler (PTC-200, MJ Research). Es wurden insgesamt 12 Temperaturwerte getestet, die in einem Temperaturbereich von 5°C unter bis 5°C über dem theoretischen Wert lagen.

Neben der Annealing-Temperatur spielt auch die Konzentration an divalenten Kationen im Reaktionsgemisch eine große Rolle. Mg^{2+} stabilisiert doppelsträngige DNA und erhöht damit deren Schmelzpunkt. Daneben stimuliert es aber auch die Aktivität der Taq-Polymerase und bildet lösliche Komplexe mit den Desoxynukleotiden, die deren Einbau durch die Polymerase ermöglichen. Eine zu niedrige Mg^{2+} -Konzentration führt daher zu geringer Ausbeute, eine zu hohe Konzentration zu unspezifischen Produkten. Daraus wird ersichtlich, dass Annealing-Temperatur und $MgCl_2$ -Konzentration nicht unabhängig voneinander optimiert werden können, da sich mit der $MgCl_2$ -Konzentration auch die optimale Annealing-Temperatur ändert. Daher wurden $MgCl_2$ -Konzentrationen von 1,5 bis 2,5 mM bei jeder der 12 ausgewählten Annealing-Temperaturen getestet. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und die optimalen Bedingungen dementsprechend bestimmt. Die Anzahl an amplifizierten Kopien einer cDNA steigt während der PCR theoretisch exponentiell. Daher hängt die Kopienzahl nach einem beliebigen Zyklus von der Ausgangsmenge an Template-Molekülen und der Zykluszahl ab. Tatsächlich ist jedoch die Ausbeute in jedem Zyklus kleiner als 100 %. Denn mit steigender Zykluszahl nimmt die Aktivität der Polymerase ab. Darüber hinaus bilden sich während des Annealings zunehmend Dimere zwischen den Einzelsträngen des Produkts. Diese Reaktion konkurriert mit steigender

Kopienzahl des Produktes immer stärker mit dem Primer-Annealing. Daher erreicht die Kopienzahl, die durch die PCR erzeugt werden kann, bei höheren Zykluszahlen ein Plateau.

3.4.3.2 Verwendete Primer und PCR-Bedingungen

Die in diesem Projekt verwendeten Primer und die dazu ermittelten optimalen Bedingungen, die standardmäßig für alle Versuche verwendet wurden, sind in der Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen

mRNA	Länge	Sequenz	Produkt	Bedingungen
Insulin Receptor	19 bp	F: 5'-GATTACTTGCTGCTCTTCC-3'	295 bp	1,5mM MgCl ₂ 52°C, 27 Zyklen
	17 bp	R: 5'-CTCCACACTCCTCGTTG-3'		
IGF-1 Receptor	20 bp	F: 5'-CGTGGGGCCAAGACTGAGAT-3'	396 bp	1,7mM MgCl ₂ 56,8°C, 27 Zyklen
	21 bp	R: 5'-GGGCACGAAGATGGAGTTGTG-3'		
Caveolin-1	21 bp	F: 5'-ATCTACAAGCCCAACAACAAG-3'	167 bp	1,5mM MgCl ₂ 54,3°C, 27 Zyklen
	18 bp	R: 5'-CAAATGCCGTCAAAACTG-3'		
Integrin α6	23 bp	F: 5'-CTTTGGGCGGTGTTATGTCCTGA-3'	546 bp	1,5mM MgCl ₂ 58°C, 27 Zyklen
	23 bp	R: 5'-TCTTGCCACCCATCCTTGTTGAG-3'		
Integrin β4	20 bp	F: 5'-CACTCCACCACCATCATCAT-3'	544 bp	1,7mM MgCl ₂ 58,2°C, 25 Zyklen
	21 bp	R: 5'-TGTCACCAGCACTTTCTTCA-3'		
Integrin β1	20 bp	F: 5'-TGTAACCAACCGTAGCAAAG-3'	256 bp	2,0mM MgCl ₂ 52°C, 30 Zyklen
	20 bp	R: 5'-GTCCGAAGTAATCCTCCTCA-3'		
PKCδ	20 bp	F: 5'-CAGGCCAAGGTGTTGATGTC-3'	243 bp	2,0mM MgCl ₂ 56,8°C, 22 Zyklen
	19 bp	R: 5'-TGTGGATGGCAGCGTTACA-3'		
PKCα	20 bp	F: 5'-TGCAACCCCAACACCCACAA-3'	388 bp	2,0mM MgCl ₂ 57,4°C, 27 Zyklen
	20 bp	R: 5'-CCCCTCGCCACCATCTCATT-3'		
IRS-1	20 bp	F: 5'-TGCATCTTCGCTCCTTCCTG-3'	471 bp	1,7mM MgCl ₂ 63°C, 30 Zyklen
	20 bp	R: 5'-GCCGCCACTTCTTCTCGTTC-3'		
GAPDH	22 bp	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3'	240 bp	1,5mM MgCl ₂ 62°C, 25 Zyklen
	22 bp	R: 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3'		

3.4.4 DNA-Gelelektrophorese

Von dem 25 µl der PCR-Reaktion wurden jeweils 10 µl mit 2 µl 6x-Probenpuffer (Novagen) verdünnt, auf ein 2 %-iges, ausgeliertes Agarose-TAE-Gel (Cambrex) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) aufgetragen und elektrophoretisch bei 100 V für 30 min in TAE (Tris-Essigsäure 40 mM, EDTA 1 mM) getrennt. Als DNA-Marker diente dabei ein 100

Basenpaar-Standard (Novagen). Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht mittels eines Chemi-Imagers 4000 (Alpha Innotech Corporation).

3.5. Gewebeaufarbeitung

Zur weiteren morphologischen Analyse der organotypischen Kokulturen wurden die Filterinserts entnommen und die Kulturen mit einem Skalpell aus dem Filter ausgeschnitten. Für die weitere Analyse wurden die Proben in zwei gleiche Hälften geteilt und folgendermaßen weiterverarbeitet.

3.5.1 Histologie

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Proben für 24 h in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert, in Agar eingebettet und erneut für 24 h in der gleichen Lösung fixiert. Danach wurden die Präparate in Kapseln eingeschlossen (Medim, Giessen), durch eine Alkoholreihe entwässert (70 %, 80 %, 90 %, 96 % Ethanol in H₂O, Xylol) und in Paraffin (Medim) eingebettet. Die eingebetteten Proben wurden geschnitten (Schnittdicke 4 µm) und mit Hämalaun (15 min) und Eosin (5 min) gefärbt. Die HE-Färbung ist eine der Übersichtsfärbungen in der Histologie. Hämalaun als basischer Farbstoff färbt im alkalischen Milieu basophile Strukturen wie Zellkerne intensiv blau. Das azidophile Cytoplasma wird anschließend mit einer Eosin-haltigen, sauren Lösung rot gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Eukitt (Medim) und einem Deckglas versiegelt.

3.5.2 Gefrierschnitte

Gewebestückchen der Kulturen wurden in „Tissue-Tec“-Einbettmedium langsam in der Gasphase von flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Präparate wurden an einem Kryomikrotom (Leica) in 6 µm Schnittdicke geschnitten, auf Objektträger aufgezogen (Superfrost, Neolab), luftgetrocknet und ebenfalls bei -80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

3.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Untersuchungen zur subzellulären und gewebespezifischen Expression und Lokalisation von Proteinen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei werden Zellen im Gewebe permeabilisiert und alle Komponenten fixiert. Ausgesuchte Proteine werden von

spezifischen Primärantikörpern erkannt und diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden ihrerseits mit Fluorochrom-markierten, sekundären Antikörper detektiert, die gegen den entsprechenden Primärantikörper gerichtet sind.

Die Objektträger mit Gefrierschnitten wurden in 100 % Methanol bei 4°C für 1 min, danach bei -20°C für 2 min in Aceton fixiert und anschließend in PBS- rehydriert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Objektträger für 15 min in PBS- (0,1 % BSA) inkubiert. Überschüssiges Salz und Protein wurden durch kurze Inkubation in Wasser entfernt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit 30 µl der Primärantikörper-Mischung benetzt und in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Präparate mit Wasser abgespült und erneut zur Blockierung für 15 min in PBS- (5 % Milchpulver, 0,02 % Tween) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten, sekundären Antikörpern erfolgte schließlich lichtgeschützt für 40 min bei RT. Die Zellkerne wurden gleichzeitig zur Sekundärantikörper-Reaktion mit Bisbenzimid (Hoechst, 20 µg/ml) gefärbt. Nach erneutem Waschen in PBS (dreimal je 10 min im Dunkeln) wurden die Objektträger kurz in Wasser gespült, die Schnitte mit Permafluor (Immunotech) eingebettet, mit einem Deckglas versehen und nach dem Trocknen bei 4°C gelagert.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoresmikroskop (Leica DM-R).

Tabelle 27: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antigen	Typ	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Ki67	Maus, mk	1:20	Dianova	Dia 505
Keratin 1/10	Maus, mk	1:100	Sigma	C7284
Filaggrin	Maus, mk	1:300	Cell Systems	5002
Involucrin	Maus, mk	1:100	Sigma	I9018
Loricrin	Kaninchen, pk	1:400	D. Hohl	-----
Repetin	Kaninchen, pk	1:100	M. Huber	-----
Kollagen Typ IV	Kaninchen, pk	1:500	Heyl	302002000
Laminin (EHS)	Kaninchen, pk	1:100	Progen	10765
Laminin-5	Kaninchen, pk	1:500	Dr. Burgeson	-----
Perlecan	Maus, mk	1:50	Chemicon	MAB 458
Nidogen	Kaninchen, pk	1:300	Calbiochem	481978
Integrin $\alpha 6$	Ratte, mk	1:50	A. Sonnenberg	-----
CD 151	Maus, mk	1:50	Serotec	MCA1856
BP 180	Kaninchen, pk	1:40	J.C.R. Jones	-----
HD1	Maus, mk	1:100	K. Owaribe	-----

Tabelle 28: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Spezifität	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Ziege-Anti-Maus	Alexa 488(grün)	1:800	Molecular Probes	A-11029
Ziege-Anti-Maus	Alexa 568(rot)	1:800	Molecular Probes	A-11031
Esel-Anti-Ratte	Cy3	1:800	Dianova	712-166-153
Ziege-Anti-Kaninchen	Alexa 546	1:800	Molecular Probes	A11018
Ziege-Anti-Kaninchen	TXR	1:100	Dianova	111-076-045

3.5 Nachweis von Proteinkomplexen

Die Immunkopräzipitation ist eine Methode, die erlaubt nicht nur separate Proteine, sondern auch Protein-Komplexe aus einem Zell-Lysat zu isolieren und damit Protein-Interaktionen nachzuweisen. Die Methode basiert auf der Bindung zwischen Proteinen und spezifischen Antikörpern. Die gebildeten Antikörper-Antigen Komplexe können dann durch Inkubation mit unlöslichen Formen von Antikörper-Bindungsproteinen, wie Protein A oder G, aus dem Lysat entfernt werden. Gängige Träger sind Agarose- oder Sepharose-„Beads“ (Mikro-Kügelchen) als Gel-Suspension. Durch Verwendung von Lyse-Puffern mit schwachen Detergenzien kann zudem erreicht werden, dass die Bindungen in Komplexen mehrerer Proteine intakt bleiben und somit auch kompliziertere Strukturen isoliert werden können.

3.5.1 Lyse der Zellen

Die konfluenten, in Monolayer gewachsenen Zellen wurden direkt vor der Lyse für 15 und 30 Minuten mit Insulin (8,41 mM, Sigma) stimuliert. Als Kontrolle (0-Wert) wurden die Zellen ohne Stimulation verwendet. Die Kulturschalen wurden zweimal mit eis-kaltem PBS abgespült und die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber in 400 – 500 µl IP-Lysepuffer abgelöst. Das Zell-Lysat wurde durch Pipettieren in eine Zell-Suspension überführt, direkt im Anschluss 1 h auf Eis inkubiert und danach abzentrifugiert (10000 g, 30 min, 4°C, Biofuge 15R, Heraeus). Der klare Überstand wurde abgenommen und bei –80°C gelagert oder sofort weiter verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Bradford-Methode (siehe 3.3.2). Proteinmengen von 200 – 400 µg wurden für die Immunkopräzipitation eingesetzt.

Tabelle 29: Zusammensetzung von IP-Lysepuffer

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
IP-Lysepuffer	PBS	Serva
	EDTA	1 mM Gerbu
	Triton X-100	10 % Sigma
Protease-Inhibitoren	Leupeptin	1 µg/ml Roche
	Pepstatin	1 µg/ml Roche
	Aprotinin	1 µg/ml Roche
	Natriumorthovanadat	100 mM Serva
	Pefablock	10 mM Roche

3.5.2 Kopräzipitation

Für die Präzipitation der gewünschten Protein-Komplexe aus dem Zell-Lysat wurden die entsprechenden primären Antikörper verwendet, die an die nativen Proteinstrukturen binden. Die notwendige Menge des Zell-Lysates wurde entnommen und anschließend mit 3 – 5 µl des entsprechenden Antikörpers für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die eingesetzte Antikörper-Konzentration richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Tabelle 30: Primäre Antikörper für Immun-Kopräzipitation

Antigen	Typ	Eingesetzte Menge (pro 300 mg Protein)	Hersteller	Katalog-Nr.
Insulin Rezeptor	Kaninchen, pk	4 µl	Biomol	06-492
IGF1-Rezeptor	Kaninchen, pk	4 µl	Biomol	06-429
Phosphotyrosine	Maus, mk	4 µl	Biomol	05-321

Für die Präzipitation der Antikörper-Protein-Komplexe aus dem Zell-Lysat wurden A/G Plus Agarose-„Beads“ (Santa Cruz) verwendet. Eine entsprechende Menge dieser Suspension (5 % des Endvolumens) wurde entnommen und einmal mit IP-Lysepuffer mit 0,1 % BSA und dreimal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Diese „Beads“ wurden zu den Proben gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert (rotieren über Kopf). Nach der Inkubation wurden die Protein-Agarose-Aggregate abzentrifugiert (1000 g, 3 min, 4°C, Biofuge 15R, Heraeus) und einmal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Die präzipitierten Protein-Komplexe wurden durch Aufkochen im 1x-Probenpuffer (5 min) eluiert, mit der SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Einzelkomponenten mit Western Blot detektiert (siehe 3.3.3).

3.6 Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation lassen sich Zellkomponenten nach ihrer Schwebedichte auftrennen. Hierbei wird die Probe in einem steilen Gradienten sedimentiert, der häufig aus hochkonzentrierter Zuckerlösung aufgebaut ist. Im Gradienten wandern die einzelnen

Komponenten bis zu dem Punkt, der ihrer eigenen Dichte entspricht. Die unten beschriebene Natrium-Carbonat Methode wurde etabliert für die Isolierung der „Lipid Rafts“ aus den Zellmembranen unter Vermeidung von Detergenzien.

3.6.1 Zell-Lyse und Zentrifugation

Die konfluenten, in Monolayer gewachsenen Zellen wurden direkt vor der Lyse für 30 Minuten mit Insulin (8,41 mM, Sigma) stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Insulin Stimulation verwendet. Die Kulturschalen wurden zweimal mit eis-kaltem PBS gespült und mechanisch mit einem Zellschaber in 2 ml DG-Lysepuffer abgelöst, anschließend mit einem Ultraschal-Sonicator (Sonifer cell disrupter B15, 6 Pulse je 20 s) homogenisiert und 30 min auf Eis inkubiert. Ein Volumen von 2 ml der homogenisierten Proben wurde mit dem gleichen Volumen 90 %-iger Sucrose (in MBS) gemischt (Sucrose-Endkonzentration 45 %). Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben (Polyclear, 14 x 95mm, Beckmann) und mit einem 5-35 % diskontinuierlichem Sucrose-Gradient überschichtet (4 ml 35 % Sucrose in MBS + 0,25 M Na₂CO₃ und 4 ml 5 % Sucrose in MBS + 0,25 M Na₂CO₃). Die Zentrifugation erfolgte in einem SW-40 Rotor (Beckmann) bei 36.000 rpm und 4°C für 24 Stunden. Nach der Zentrifugation wurden 12 Fraktionen (je 1 ml) gesammelt und die Proteinkonzentration für jede Fraktion wurde mittels der Bradford-Methode gemessen (s. 3.3.2).

Tabelle 31: Lösungen und Chemikalien für Dichte Gradienten Zentrifugation

Lösungen/Chemikalien	Zusammensetzung		Hersteller
DG-Lysepuffer	Na ₂ CO ₃ , pH 11 Protease-Inhibitoren: Leupeptin Pepstatin Aprotinin Natriumorthovanadat Pefablock	0,5 M 1 µg/ml 1µg/ml 1 µg/ml 100 mM 10 mM	AppliChem Roche Roche Roche Serva Roche
MBS (Mes-buffered saline)	Mes, pH 6,5 NaCl	25 mM 0,15 M	Sigma Fluca
Sucrose			Merck
Na ₂ CO ₃			AppliChem

3.6.2 Protein Fällung

Die Menge von 20 – 40 µg Protein wurde von jeder Fraktion entnommen und mit Trichloracetic Säure (TCA)-Methode gefällt. Zu jeder Probe wurde 12,5 % TCA gegeben, die Mischung 1 h bei -20°C inkubiert und anschließend 20 min bei 4°C und 15000 rpm

zentrifugiert (Biofuge 15R, Heraeus). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit -20°C kaltem Aceton gewaschen. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (15 min, 4°C, 15000 rpm). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 µl von 1x Probenpuffer gelöst. Die Proteine wurden durch Aufkochen (97°C, 5 min) denaturiert, mit der SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert (siehe 3.3.3).

Tabelle 32: Verwendeten Chemikalien für Protein Fällung

Chemikalien	Zusammensetzung	Hersteller
TCA, 6,1N		Sigma
Aceton		Fisher Scientific
1x Probenpuffer	2x Probenpuffer (s. 3.3.3) 1:2 mit Wasser verdünnt	

4 Ergebnisse

4.1 Transiente Transfektion von HaCaT K6 Keratinozyten mit IR und IGF-1R siRNA

4.1.1 Reduktionseffekt von verschiedenen siRNA Sequenzen auf IR und IGF-1R Expression

Die siRNA-Methode ist eine der neusten Methoden, die eine gezielte Suppression der spezifischen Gene ermöglicht. Die kleinen, meistens 21 nt langen siRNA-Moleküle dienen dabei als Primer, die komplementäre mRNAs markieren und dadurch ihre Degradation verursachen. Da siRNAs sehr kurz sind, existieren innerhalb eines Gens viele mögliche Sequenzen, die den Kriterien für die siRNAs entsprechen (siehe 3.2.1). Verschiedene siRNA Sequenzen haben eine unterschiedliche Effizienz bei der Reduktion des mRNA Levels. So ist laut Ambion nur die Hälfte der theoretisch möglichen siRNA Sequenzen in der Lage, die Konzentration der entsprechenden mRNA um mindestens 50 % zu senken und nur ein Viertel der siRNAs um 75-90 %.

Aus 45 Sequenzen für IR und 32 siRNA Sequenzen für IGF-1R, die allen Kriterien (siehe 3.2.1) entsprachen und keine Homologie zu anderen Genen des humanen Genoms aufwiesen, wurden nach dem Zufallsprinzip je 10 Sequenzen pro Gen ausgewählt und synthetisiert. Bei der Auswahl der siRNA Sequenzen musste auch ihre Position auf den RNA Molekülen berücksichtigt werden. Mehrere mRNA-Abschnitte können schwer zugänglich für siRNA-Moleküle sein, einmal wegen einer komplexen Struktur oder potentieller Bindungsstellen für regulatorische Proteine. So wurden siRNA Sequenzen ausgewählt, die am Anfang, in der Mitte und am Ende der Zielgene lagen. Um die Effektivität dieser Sequenzen zu überprüfen, wurden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt. Die Suppression-Effizienz wurde durch die Analyse der Rezeptor-Protein-Expression nachgewiesen. An drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion) wurden die transfizierten Zellen lysiert und IR und IGF-1R Expression mittels Western Blot analysiert. Als Expressions- und Ladungskontrolle diente bei allen Blots der Proteinnachweis der Cytokeratine mittels spezifischer Antikörper. Die Intensität der Western Blot-Banden wurde mit dem Programm ChemiImager 4400 (Alpha Innotech) gemessen und in Prozent umgerechnet, wobei der Wert der Kontrollen als 100 % genommen wurde.

Die Transfektionsexperimente mit den 10 ausgewählten IR siRNA Sequenzen zeigten, dass vier Sequenzen keinen Effekt auf die Rezeptor-Expression hatten (Tabelle 33, Gruppe A). Bei den vier anderen Sequenzen (Tabelle 33, Gruppe B) konnte nach 24 h Behandlung keine Reduktion der IR Expression festgestellt werden, nach 48 und 72 h aber jeweils um 30 %

(bei 20 nM) und 70 % (bei 100 nM). Bei den zwei restlichen Sequenzen (siRNA_IR_200 und siRNA_IR_604) ergab sich ein praktisch identischer Verlauf (Tabelle 33, Gruppe C). So wurde die IR Expression nach 24 h sowie 48 h Behandlung mit 20 nM siRNA um ca. 25 % und erst nach 72 h um 70 % reduziert. Auch bei 100 nM siRNA war der Effekt zunächst moderat (50 % nach 24 h), aber nach 48 h und 72 h sehr stark ausgeprägt mit einer Reduktion um 70 %, beziehungsweise 90 % (Tabelle 33, Abb. 16, A).

Tabelle 33: Reduktion der IR Expression bei Anwendung verschiedener siRNA Sequenzen

Reduktion der IR Expression, %						
Zeit nach Transfektion	24 h		48 h		72 h	
siRNA Konzentration	20 nM	100 nM	20 nM	100 nM	20 nM	100 nM
Gruppe A: 4 siRNA Sequenzen	0	0	0	0	0	0
Gruppe B: 4 siRNA Sequenzen	0	0	30 %	70 %	30 %	70 %
Gruppe C: siRNA_IR_200 siRNA_IR_604	25 %	50 %	25 %	70 %	70 %	90 %

Tabelle 34: Reduktion der IGF-1R Expression bei Anwendung verschiedener siRNA Sequenzen

Reduktion der IGF-1R Expression, %						
Zeit nach Transfektion	24 h		48 h		72 h	
siRNA Konzentration	20 nM	100 nM	20 nM	100 nM	20 nM	100 nM
Gruppe A: 2 siRNA Sequenzen	0	0	0	0	0	0
Gruppe B: 3 siRNA Sequenzen	0	0	0	0	0	50 %
Gruppe C: 3 siRNA Sequenzen	65 %	65 %	65 %	70 %	65 %	75 %
Gruppe D: siRNA_IGF-1R_1503 siRNA_IGF-1R_1585	20 %	70 %	95 %	95 %	95 %	95 %

Die Auswertung der Transfektionsexperimenten mit IGF-1R siRNA Sequenzen zeigte, dass von den 10 ausgewählten Sequenzen zwei siRNAs keinen Effekt auf die Rezeptor-Expression hatten (Tabelle 34, Gruppe A). Bei den anderen drei Sequenzen (Tabelle 34, Gruppe B) konnte eine Reduktion um ca. 50 % festgestellt werden, allerdings erst 72 h nach der Transfektion mit höchster siRNA Konzentration von 100 nM. Eine niedrigere siRNA Konzentration (20 nM) hatte keinen messbaren Effekt. Drei weitere siRNA Sequenzen (Tabelle 34, Gruppe C) zeigten eine deutlich stärkere Reduzierung der IGF-1R Expression und zwar schon nach 24 h sowohl mit 20 nM als auch 100 nM siRNA um ca. 65 %. Lediglich bei der hohen siRNA Konzentration (100 nM) kam es zu einer noch stärkeren Reduktion, und zwar nach 48 h um 70

% und nach 72 h um 75 %. Zwei Sequenzen (siRNA_IGF-1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585) (Tabelle 34, Gruppe D) zeigten eine besonders hohe Effizienz. Zwar zeigte sich nach 24 h Behandlung mit 20 nM siRNA eine Reduktion um 20 %, wobei 100 nM siRNA zu einer 70%-igen Reduktion führte. Zu späteren Zeitpunkten kam es bei beiden Konzentrationen zu einem sehr starken „Knock-Down“ von IGF-1R (Tabelle 34, Abb. 16, B).

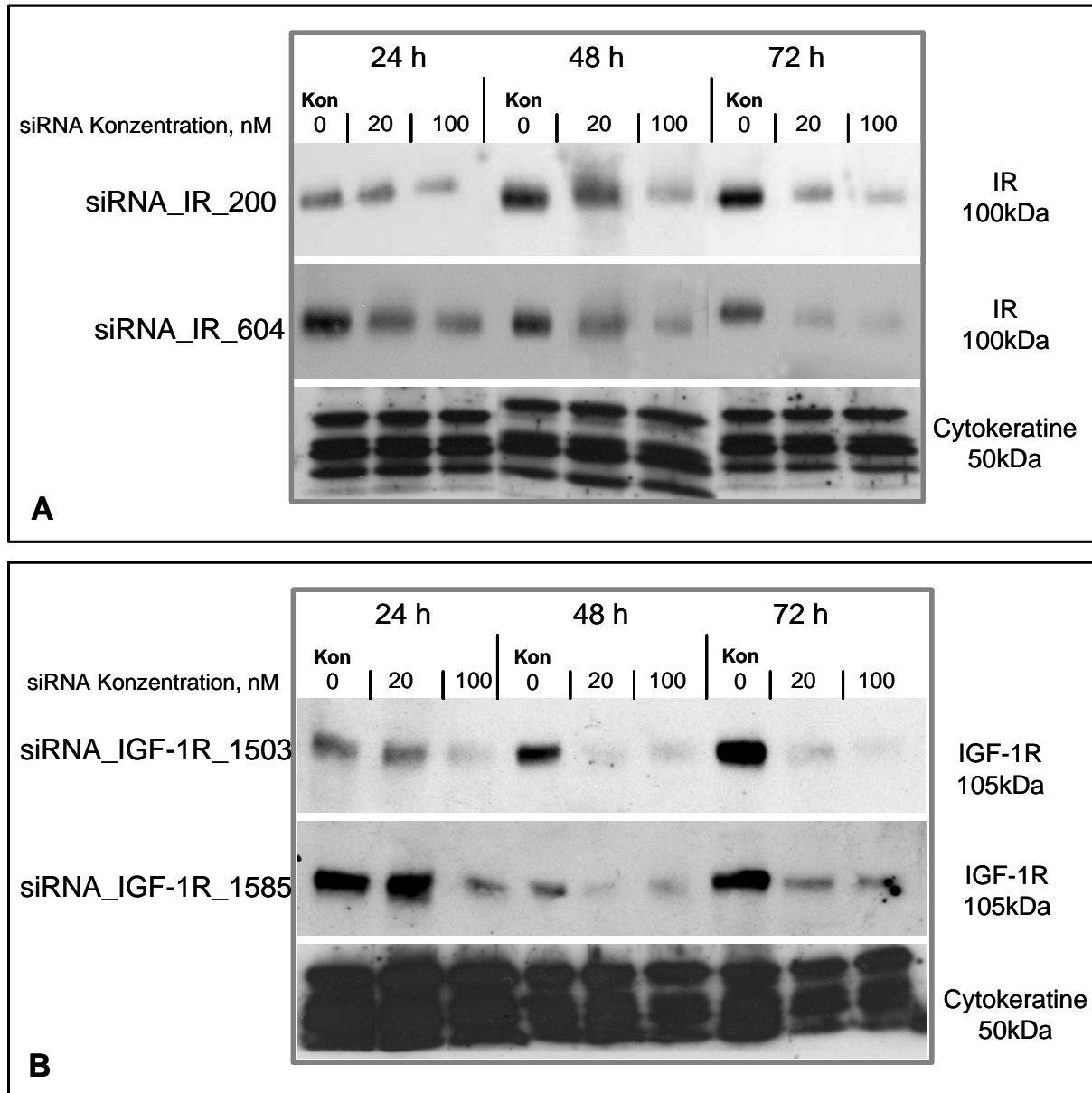


Abbildung 16: Protein-Expression in HaCaT-Zellen nach der transienten Transfektion mit IR (A) und IGF-1R (B) siRNAs. Kontrollen mit nicht transfizierten Zellen (Kon) bei den drei Zeitpunkten. Ladungskontrolle mittels Bestimmung der Cytokeratine-Expression.

Die in den Transfektionsexperimenten eingesetzten siRNA Sequenzen zeigten eine große Divergenz in ihrer Suppression-Effizienz. So zeigten manche Sequenzen keinen Effekt auf die Protein-Expression, wobei die anderen Sequenzen fast den kompletten „Knock-Down“ des Proteins bewirkten. Auch der Zeitpunkt, an dem die siRNAs ihre Wirkung optimal

entfalten konnten, variierte sehr stark innerhalb der untersuchten Sequenzen. Die Behandlung der Zellen mit einigen Sequenzen führte schon nach 24 h zu einer signifikanten Reduktion der Protein-Expression, wobei andere Sequenzen nur nach 72 h einen Suppressions-Effekt hervorriefen. Gemeinsam für alle Sequenzen führte die Anwendung der höheren siRNA Konzentration zu einer stärkeren Herunterregulation der Protein-Expression.

4.1.2 Beeinflussung der Zell-Zahl durch transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit IR oder IGF-1R siRNA

IR und IGF-1R spielen eine große Rolle bei vielen metabolischen und mitogenen zellulären Prozessen. Die Suppression dieser Rezeptoren kann dazu führen, dass die transfizierten Zellen auf die Dauer nicht überleben und für die Langzeit-Versuche nicht geeignet sind. Auch die Tatsache, dass bei den transienten Transfektionsexperimenten eine große Zahl von absterbenden Zellen beobachtet werden konnte, sprach dafür, dass der „Knock-Down“ von IR und, insbesondere, IGF-1R stark das Wachstumsverhalten und Proliferationsvermögen der Zellen beeinflusste. Um diesen Effekt genauer zu bestimmen, wurde daher zunächst die Wachstumskinetik der transient supprimierten Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät (2×10^5 Zellen/Objektträger) und nach 24 h mit 100 nM IR (siRNA_IR_200 und siRNA_IR_604) oder IGF-1R (siRNA_IGF-1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585) siRNA transient transfiziert (siehe 3.2.3 und 3.2.6). Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Transfektion) wurden die Objektträger entnommen, fixiert und mit dem Kern-Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst) inkubiert (siehe 3.2.6). Die Anzahl der gefärbten intakten Kerne entsprach dabei der Zell-Zahl. Der Intensität der positiven Fluoreszenz-Signale wurde mit dem Programm „AnalySIS“ gemessen (zehn Felder pro Objektträger) und ausgewertet.

Die erhaltenen Werte von Kontroll- und transient transfizierten Zellen wurden in Prozent umgerechnet und in Bezug zum „24 h-Wert“ der Kontrollen (100 %) gesetzt.

Schon nach 24 h Behandlung mit IR und IGF-1R siRNAs war die Zell-Zahl bei allen Ansätzen deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Am stärksten war die Reduktion bei den mit IR siRNAs transfizierten Zellen. Nach 48 h stieg die Zahl der Kontroll-Zellen auf 117 %. Dagegen zeigten alle vier Transfektionsansätze eine erneute Reduktion der Zell-Zahl. Und wieder waren es die mit IR siRNA transfizierten Zellen, deren Zell-Zahl am stärksten gesunken war. Nach 72 h erhöhte sich die Zell-Zahl der Kontroll-Zellen auf 140 %. Im Gegensatz dazu sank die Zell-Zahl der transfizierten Zellen auf 20-40 %, wobei die Reduktion bei den beiden mit IGF-1R siRNAs behandelten Ansätzen am stärksten ausgeprägt war. Auch die Zell-Zahl bei den mit siRNA_IR_200 transfizierten Zellen war erheblich

gesunken. Nur bei den mit siRNA_IR_604 transfizierten Zellen hat sich die Zell-Zahl kaum verändert (Abb. 17).

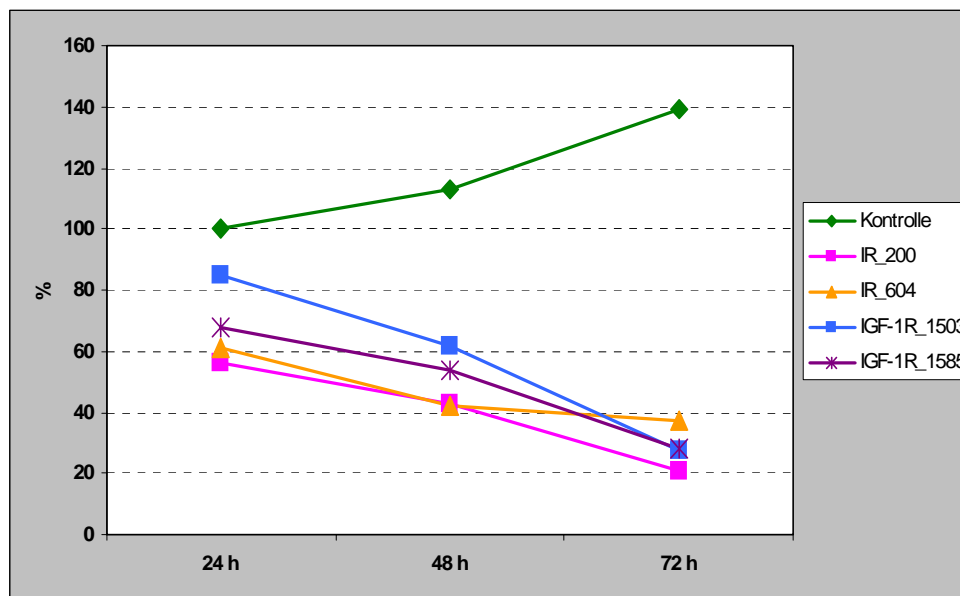


Abbildung 17: Die Veränderung der Zell-Zahl in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.

Das Wachstum einer Zell-Population ist ein komplizierter Prozess, der nicht durch Zell-Zahl allein charakterisiert werden kann. Viel mehr spielt die Balance zwischen Proliferation und Absterben der Zellen eine entscheidende Rolle. Eine sinkende Zell-Zahl bedeutet nicht immer eine Reduktion der Proliferation, sondern kann auch auf steigende Apoptose oder, im Fall von Keratinozyten, auf die Erhöhung der terminalen Differenzierung hindeuten.

Um diese Fragen zu klären wurden bei den Zellen mit transient supprimiertem IR oder IGF-1R Proliferation, Apoptose und Differenzierung untersucht.

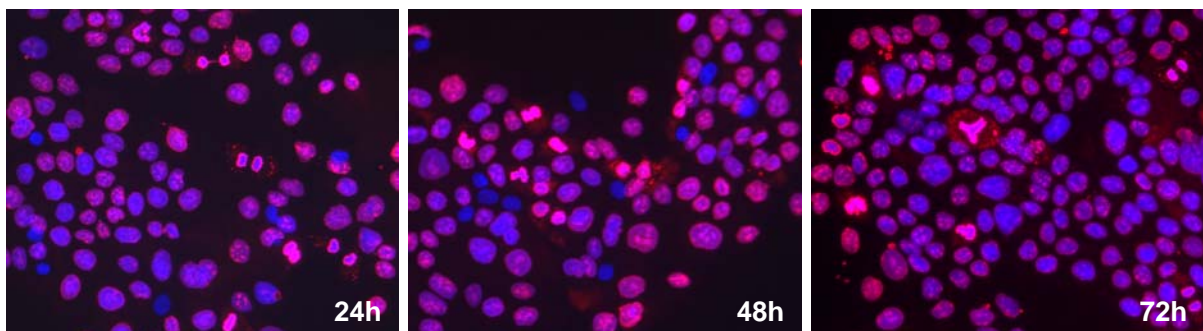
4.1.3 Analyse der Proliferation bei HaCaT-Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNA

Insulin und besonders IGF-1 wirken als positive Regulatoren der Proliferation (Tsao et al., 1982; Neely et al., 1991; Edmondson et al., 2001). Um festzustellen ob der „Knock-Down“ des IR oder IGF-1R in den HaCaT-Zellen die proliferativen Prozesse beeinflusst, wurde Immunofluoreszenz-Analyse mit dem Antikörper Ki-67 durchgeführt (siehe 3.2.6). Das Ki67-Antigen ist hauptsächlich während den aktiven Phasen des Zell-Zyklus (G1, S, G2 und M-Phasen) exprimiert und ist nicht in den ruhenden Zellen in der G0-Phase vorhanden (Traut et al., 2002). Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät (2×10^5 Zellen/Objektträger) und nach 24 h mit 100 nM IR (siRNA_IR_200 und siRNA_IR_604) oder IGF-1R (siRNA_IGF-

1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585) siRNAs transient transfiziert (siehe 3.2.3 und 3.2.6). Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Transfektion) wurden die Objektträger entnommen, fixiert und mit den entsprechenden Primär- und Sekundär-Antikörpern inkubiert (siehe 3.2.6 und 3.5.3). Die Intensität der positiven Fluoreszenz-Signale wurde dann mit dem Programm „AnalySIS“ gemessen (zehn Felder pro Objektträger) und in Bezug zur Kenfärbung ausgewertet.

Um die Proliferations-Raten zwischen verschiedenen Ansätzen zu vergleichen, wurden die Werte für jeden Zeitpunkt zusammengefasst, in Prozent umgerechnet und auf die Werte der jeweiligen Kontrollen (100 %) bezogen. Nach 24 h Behandlung mit IR siRNAs blieb die Proliferations-Rate bei den beiden Ansätzen vergleichbar zu den Kontroll-Zellen. Die Transfektion mit IGF-1R siRNAs bewirkte nur eine relativ leichte Abnahme der Proliferation nach 24 h und zwar auf 75 % bei siRNA_IGF-1R_1503 und auf 55 % bei siRNA_IGF-1R_1585. 48 h nach der Transfektion waren die Proliferations-Raten sowohl bei den mit IR siRNAs als auch mit IGF-1R siRNAs behandelten Zellen stark reduziert und zwar auf 20-40 % der Kontroll-Werte (Abb. 18 und 19).

HaCaT K6-Kontrolle



siRNA_IR_604

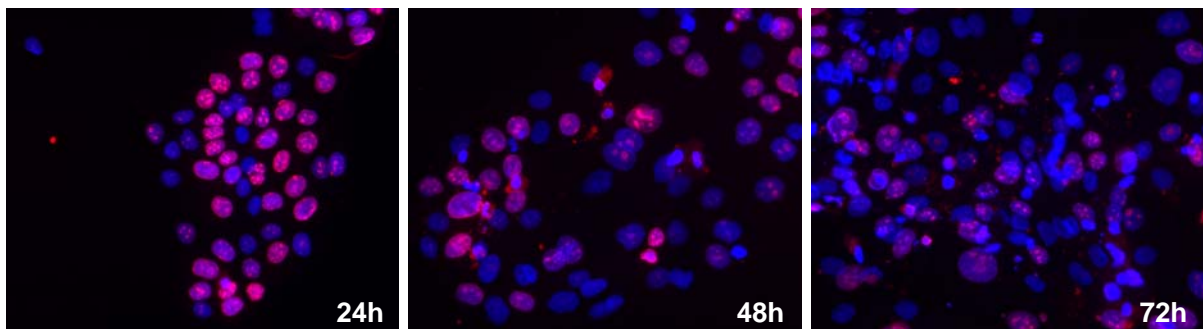


Abbildung 18: Proliferierende Zellen in Kontrollen und transient transfizierten Zellen (siRNA_IR_604) 24, 48 und 72 h nach der Transfektion. Immunfluoreszenz-Färbung auf proliferierende Zellen (Ki-67-Färbung, rot) und Kerne (blau). Proliferierende Zellen sind intensiv rosa gefärbt. 20x Vergrößerung.

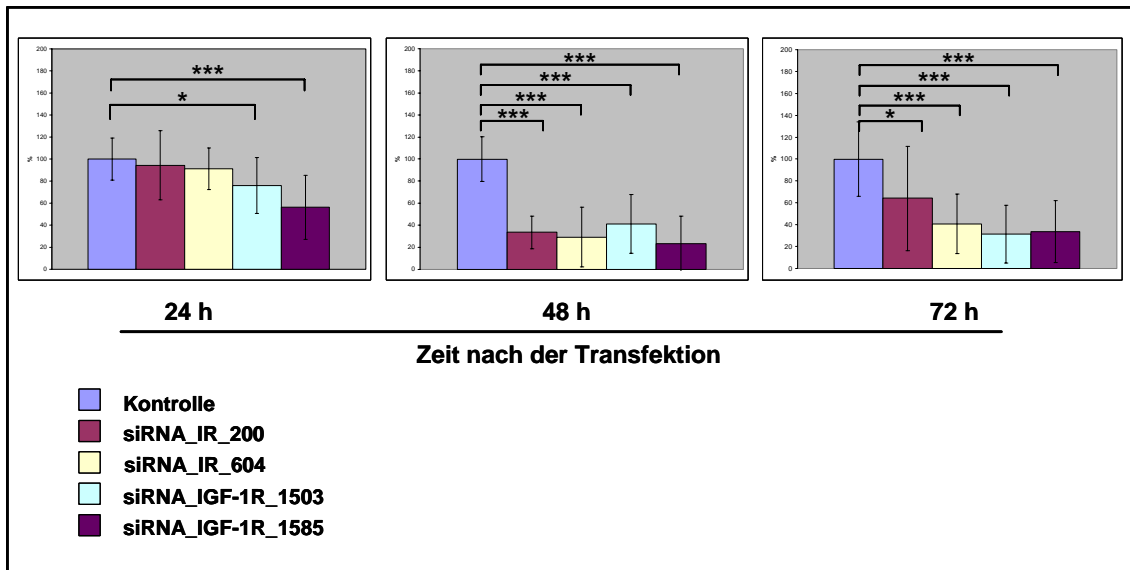


Abbildung 19: Analyse der Intensität der Proliferations-Signale in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs an drei verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Transfektion). Mann-Whitney Test: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Nach 72 h Behandlung sank der Zahl der proliferierenden Zellen bei siRNA_IR_200 nur auf 60 %, wobei die Transfektion mit siRNA_IR_604 einen Abstieg der Proliferation auf 40 % bewirkte. Die mit IGF-1R siRNAs transfizierten Zellen zeigten in den beiden Ansätzen eine drastische Abnahme der Proliferations-Raten auf ca. 30 % (Abb. 18 und 19).

Um den zeitlichen Verlauf der Proliferation bei den Kontroll- und transient transfizierten Zellen darzustellen, wurden alle Werte in Prozent umgerechnet und in Bezug auf den „24 h-Wert“ bei den Kontrollen gesetzt, der als 100 % betrachtet wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass in den Kontrollen die Zahl der proliferierenden Zellen nach 48 h Kultivierung unverändert blieb und erst nach 72 h deutlich auf ca. 140 % anstieg (Abb. 20).

Die Transfektion mit den beiden IR siRNA hatte nach 24 h noch keinen Einfluss auf die Proliferations-Rate und führte nach 48 h zu einer starken Reduktion der Proliferation auf ca. 40 %. Allerdings stieg nach 72 h Behandlung die Proliferations-Rate bei siRNA_IR_200 wieder auf 60 %, wogegen die Proliferation bei siRNA_IR_604 leicht gesunken war (Abb. 20).

Die Transfektion mit siRNA_IGF-1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585 führte schon nach 24 h zu einer Reduktion der Proliferations-Rate und zwar auf ca. 80 % bei siRNA_IGF-1R_1503 und auf ca. 60 % bei siRNA_IGF-1R_1585. Auch nach 48 h Behandlung konnte eine deutliche Abnahme der Proliferation auf 60 % bei siRNA_IGF-1R_1503 und auf ca. 30 % bei siRNA_IGF-1R_1585 festgestellt werden. Nach 72 h sank schließlich die Zahl der positiven

Signale bei siRNA_IGF-1R_1503 auf ca. 30 %, wogegen sich die Proliferations-Raten bei siRNA_IGF-1R_1585 nicht verändert hatten (Abb. 20).

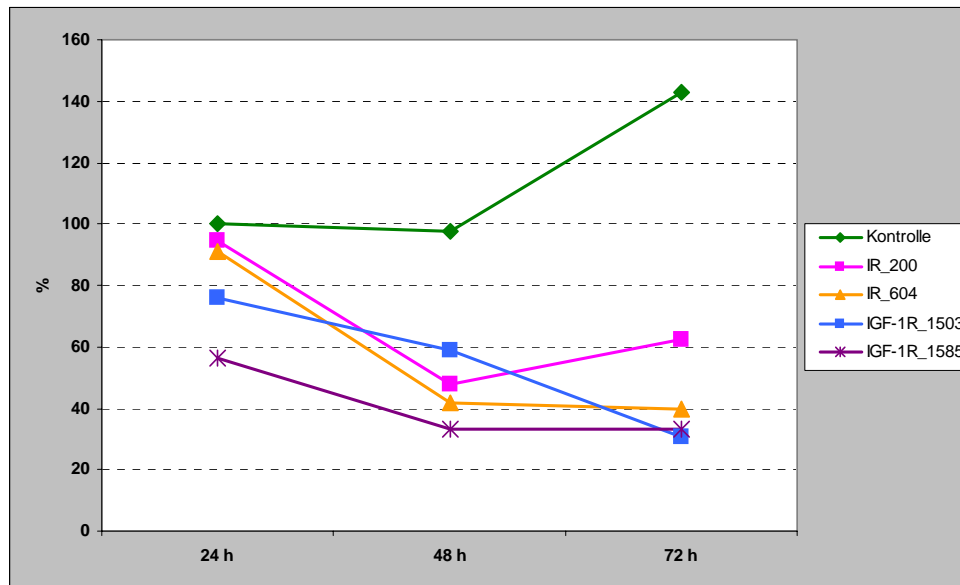


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der Proliferation in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.

Zusammengefasst, führt der „Knock-Down“ des IR und mehr noch des IGF-1R in HaCaT-Zellen zu einer starken Reduktion der Proliferation. Die Suppression des IR mit siRNA_IR_200 führte zu einem Minimum der Proliferations-Rate nach 48 h und zu einem Anstieg der Proliferation nach 72 h Behandlung. Dagegen führte die Transfektion mit siRNA_IR_604 zu einer starken Reduktion der Proliferation, allerdings erst nach 48 h.

Der „Knock-Down“ des IGF-1R führte bei den beiden siRNA Sequenzen schon nach 24 h zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation. Auch zu den späteren Zeitpunkten fiel die Zahl der proliferierenden Zellen weiter ab.

Die erhaltenen Befunde deuten darauf hin, dass in HaCaT-Zellen unter diesen experimentellen Bedingungen IR und besonders IGF-1R eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation spielen.

4.1.4 Analyse der Apoptose bei HaCaT-Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNA

Insulin und besonders IGF-1 spielen eine große Rolle bei Apoptose, wobei die beiden Faktoren als apoptotische Inhibitoren fungieren (Baserga et al., 2003; Plum et al., 2005). Um festzustellen ob der „Knock-Down“ des IR oder IGF-1R in den HaCaT-Zellen die apoptotischen Prozesse beeinflusst, wurden Apoptose-Assays durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät (2×10^5 Zellen/Objektträger) und nach 24 h mit 100 nM

IR (siRNA_IR_200 und siRNA_IR_604) oder IGF-1R (siRNA_IGF-1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585) siRNAs transient transfiziert (siehe 3.2.3 und 3.2.5). Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Transfektion) wurden die Objektträger entnommen, fixiert und mit dem TUNEL-Assay auf den Gehalt an apoptotischen Zellen untersucht (siehe 3.2.5). Das TUNEL-Assay detektiert Brüche in DNA-Strängen, die während der Apoptose generiert werden, und basiert sich auf einer Reaktion, bei der das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) die markierten Nukleotide in den Bruchstellen der DNA-Stränge einbaut. Die Intensität der positiven Signale wurde mit dem Programm „AnalySIS“ gemessen (zehn Felder pro Objektträger) und in Bezug zur Kernfärbung ausgewertet.

Um die Apoptose-Raten zwischen verschiedenen Ansätzen zu vergleichen, wurden die Werte für jeden Zeitpunkt zusammengefasst, in Prozent umgerechnet und auf die Werte der jeweiligen Kontrollen (100 %) bezogen. Nach 24 h Behandlung mit IR siRNAs zeigten beide Ansätze erhöhte Apoptose-Raten. Dabei stieg die Intensität der positiven Signale auf 370 % bei siRNA_IR_200 und auf 170 % bei siRNA_IR_604. Auch die Transfektion mit IGF-1R siRNAs bewirkte eine Erhöhung der Apoptose schon nach 24 h und zwar auf 270 % bei siRNA_IGF-1R_1503 und auf 440 % bei siRNA_IGF-1R_1585.

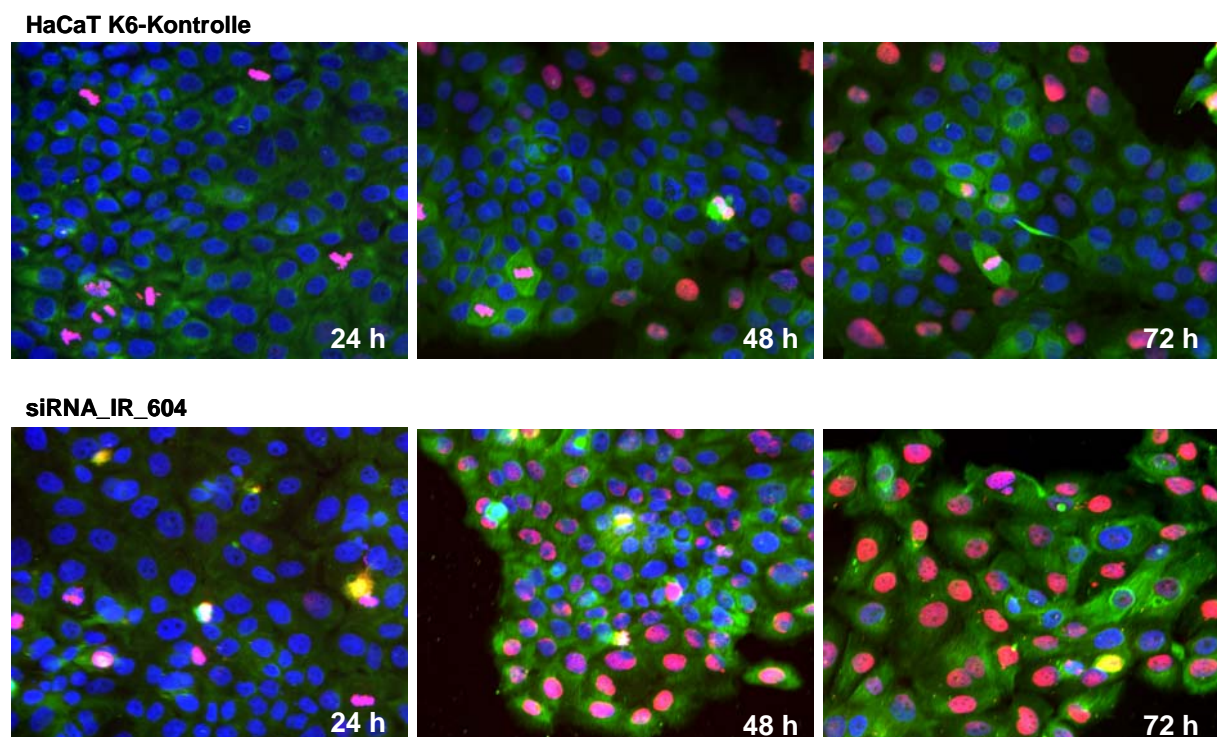


Abbildung 21: Apoptotische Signale in Kontrollen und transient transfizierten Zellen (siRNA_IR_604) 24, 48 und 72 h nach der Transfektion. Immunfluoreszenz-Färbung auf apoptotische Zellen (TUNEL-Färbung, rot), Pan-Keratin (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

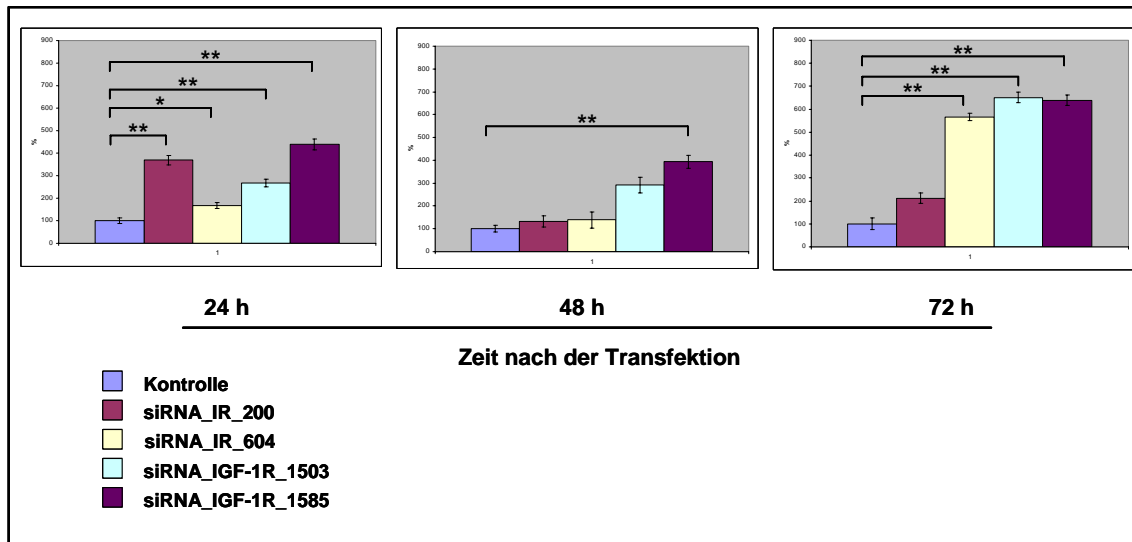


Abbildung 22: Analyse der Intensität der apoptotischen Signale in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs an drei verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Transfektion). Mann-Whitney Test: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

48 h nach der Transfektion waren die Apoptose-Raten bei den mit IR siRNAs behandelten Zellen vergleichbar mit den Kontrollen. Bei den mit IGF-1R siRNAs transfizierten Zellen wurde die Zahl der apoptotischen Zellen auf 300 % (siRNA_IGF-1R_1503) und 400 % (siRNA_IGF-1R_1585) erhöht. Nach 72 h Behandlung stieg die Apoptose-Rate bei siRNA_IR_200 nur auf 200 %, wogegen bei den mit siRNA_IR_604 behandelten Zellen die Apoptose auf 570 % anstieg. Die mit IGF-1R siRNAs transfizierten Zellen zeigten in den beiden Ansätzen eine drastische Erhöhung der Apoptose auf ca. 650 % (Abb. 21 und 22).

Um den zeitlichen Verlauf der Apoptose bei den Kontroll- und transient transfizierten Zellen darzustellen, wurden alle Werte in Prozent umgerechnet und in Bezug auf den „24 h-Wert“ bei den Kontrollen (100 %) gesetzt.

Die Ergebnisse zeigten, dass in den Kontrollen die ursprünglich geringe Zahl der apoptotischen Zellen nach 48 und 72 h Kultivierung nur leicht zunahm (Abb. 23).

Die Transfektion mit siRNA_IR_200 führte schon nach 24 h zu einer erheblichen Steigerung der Apoptose-Rate auf 350 %. Dieser Wert stieg nach 48 h nur leicht und nach 72 h auf 800 % an (Abb. 23). Bei der Behandlung der Zellen mit siRNA_IR_604 war die Zahl der positiven Signale nach 24 h vergleichbar mit den Kontrollen, stieg nach 48 h auf 400 % und nach 72 h auf 2200 % an (Abb. 23). Die Transfektion mit siRNA_IGF-1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585 führte nach 24 h zu einer Erhöhung der Apoptose-Rate auf 250 % und 450 %, nach 48 h auf 920 % und 1200 %, nach 72 h Behandlung schließlich auf ca. 2500 % (Abb. 23).

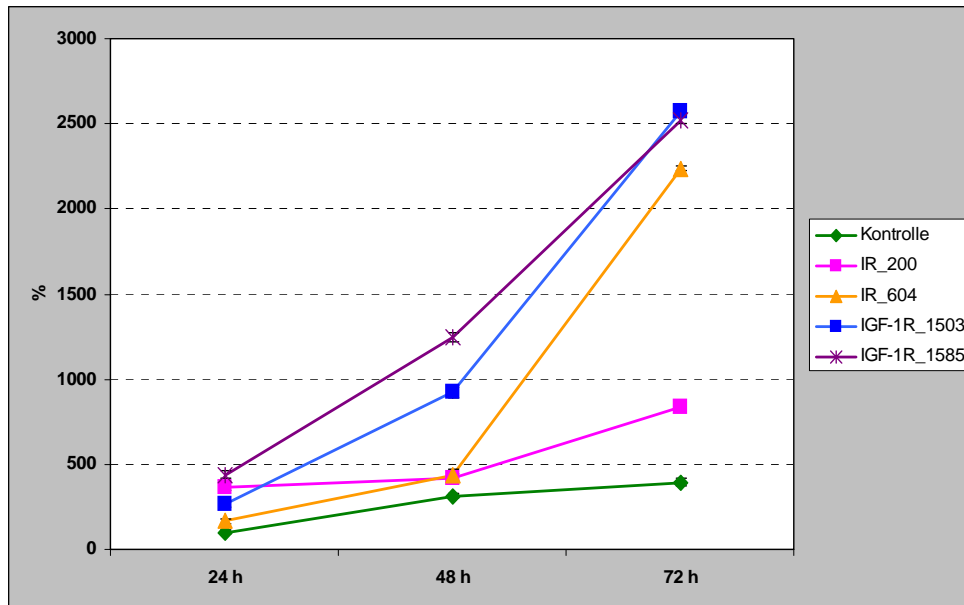


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Apoptose in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.

Zusammengefasst, führt der „Knock-Down“ des IR und mehr noch des IGF-1R in HaCaT-Zellen zu einer starken Erhöhung der Apoptose.

Die Suppression des IR mit siRNA_IR_200 bewirkte nur eine milde Steigerung des apoptotischen Prozesses. Dagegen führte die Transfektion mit siRNA_IR_604 zu einer starken Erhöhung der Apoptose, allerdings erst im späteren Stadium (72 h).

Der „Knock-Down“ des IGF-1R führte bei den beiden siRNA Sequenzen schon nach 24 h zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptose. Zu den späteren Zeitpunkten stieg die Zahl der apoptotischen Zellen stetig weiter an.

Daraus folgt, dass in HaCaT-Zellen unter diesen experimentellen Bedingungen IR und besonders IGF-1R als starke apoptotische Inhibitoren fungieren.

4.1.5 Beeinflussung der Differenzierung durch transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit IR oder IGF-1R siRNA

Die Differenzierung epidermaler Zellen ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der durch viele Wachstumsfaktoren reguliert wird, unter anderem durch Insulin und IGF-1 (Wertheimer et al., 2000; Sadagurski et al., in press). Jedes Stadium im Differenzierungsprozess ist durch Expression bestimmter Proteine charakterisiert. So wird Keratin 1/10 mit Einsetzen des Differenzierungsprozesses exprimiert, wogegen die Expression beispielweise von Loricrin und Filaggrin in späteren Stadien erfolgt.

Im Fall der HaCaT-Zellen, transient supprimiert mit IR oder IGF-1R siRNAs, wurde Keratin 1/10, als früher, und Filaggrin, als später Differenzierungs-Marker analysiert.

Hierzu wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät (2×10^5 Zellen/Objektträger) und nach 24 h mit 100 nM IR (siRNA_IR_200 und siRNA_IR_604) oder IGF-1R (siRNA_IGF-1R_1503 und siRNA_IGF-1R_1585) siRNA transient transfiziert (siehe 3.2.3 und 3.2.6). Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Transfektion) wurden die Objektträger entnommen, fixiert und mit den entsprechenden Primär- und Sekundär-Antikörpern inkubiert (siehe 3.2.6 und 3.5.3). Die Intensität der positiven Fluoreszenz-Signale wurde dann mit dem Programm „AnalySIS“ gemessen (zehn Felder pro Objektträger) und in Bezug zur Kenfärbung ausgewertet.

Schon die Beobachtungen der Immuno-Fluoreszenz-Färbung der Kerne zeigten deutliche Unterschiede in dem Differenzierungsablauf bei den Kontrollen und IR-supprimierten Zellen. Bei den mit IR siRNA transfizierten Zellen konnten oft die Ansammlungen von kleinen Kernen, welche sich über den angehefteten Zellen befanden, beobachtet werden (Abb. 24). Die Bildung von solchen „Schuppen“ ist für die Zellen in der terminalen Differenzierung charakteristisch und deutet auf eine starke Parakeratose hin. Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den IGF-1R-supprimierten Zellen konnten solche Kern-Ansammlungen nur selten festgestellt werden.

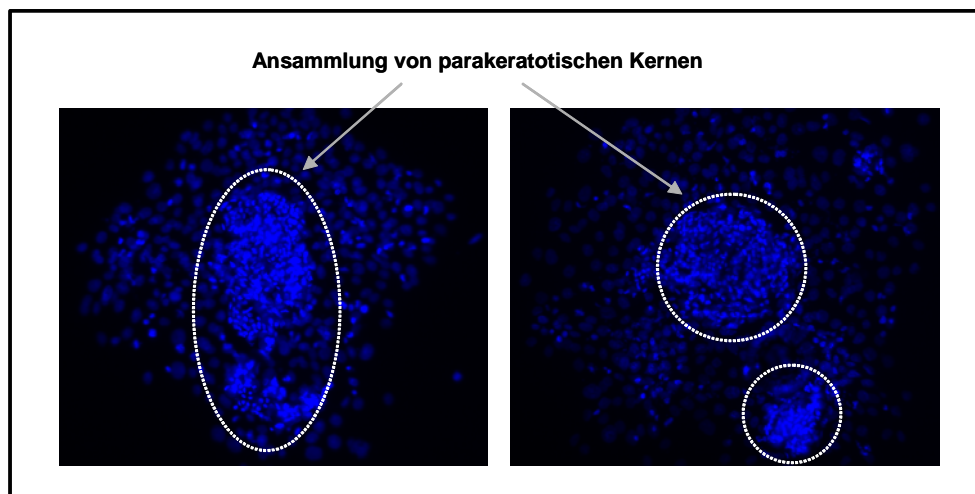


Abbildung 24: Ansammlungen von parakeratotischen Kernen bei den IR transient supprimierten Zellen. 10x Vergrößerung.

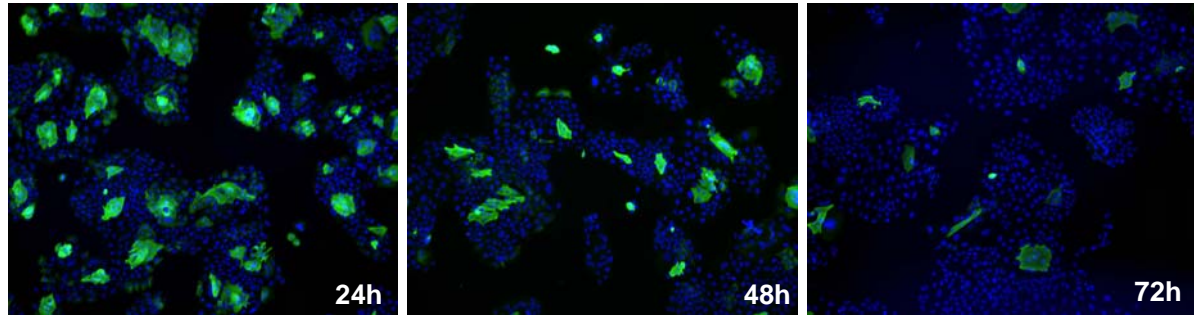
Expression des Keratins 1/10

Um den Veränderungen vom Keratin 1/10 (K1/10) in den Kontrollen und transfizierten Zellen Rechnung zu tragen, wurde der K1/10-Gehalt an den drei Zeitpunkten direkt verglichen.

Hierbei wurden die Werte für jeden Zeitpunkt in Prozent umgerechnet und zwar in Bezug zu den Werten der jeweiligen Kontrollen, die zu 100 % gesetzt wurden.

Nach 24 h Behandlung zeigten alle IR und IGF-1R supprimierten Zellen eine ca. 50 %-ige Reduktion des K1/10-Gehalts (Abb. 25 und 26).

HaCaT K6-Kontrolle



siRNA_IR_604

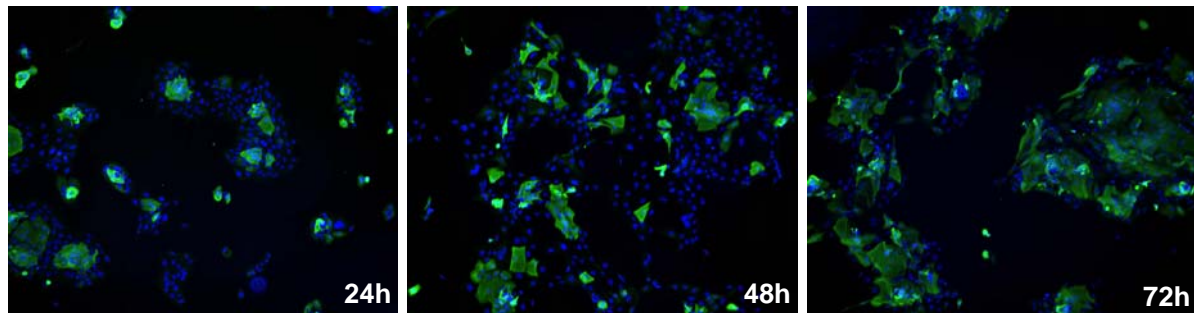


Abbildung 25: Die Expression des Keratins 1/10 in Kontrollen und transient transfizierten Zellen (siRNA_IR_604) 24, 48 und 72 h nach der Transfektion. Immunfluoreszenz-Färbung auf K1/10 (grün) und Kerne (blau). 10x Vergrößerung.

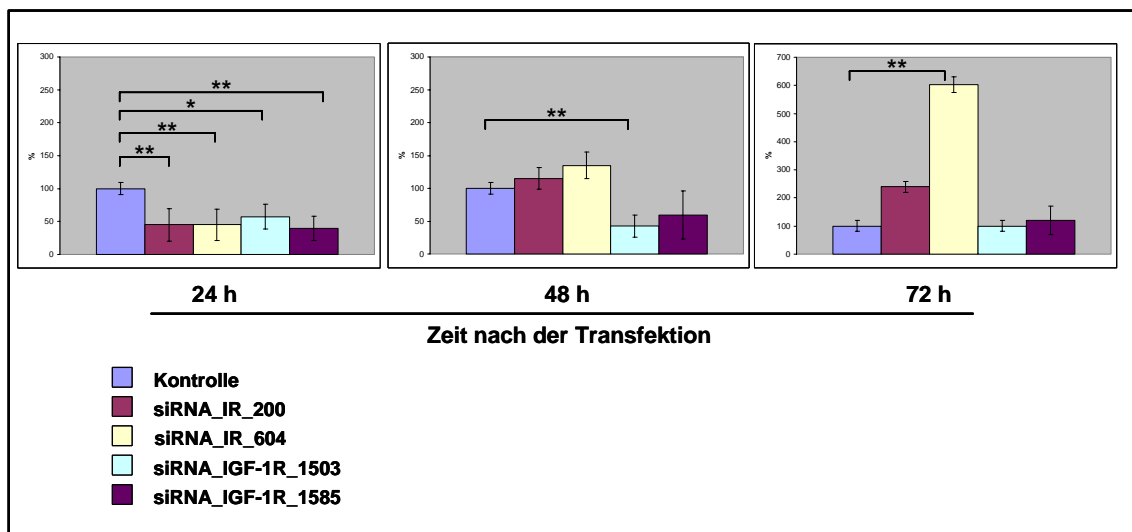


Abbildung 26: Analyse der K1/10-Expression in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs an drei verschiedenen Zeitpunkten. Mann-Whitney Test: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

48 h nach Transfektion war der K1/10-Gehalt in den IR supprimierten Zellen leicht angestiegen. Dagegen enthielten die IGF-1R supprimierten Zellen ca. 50 % weniger K1/10 als die Kontroll-Zellen.

Nach 72 h erhöhte sich der K1/10-Wert in den mit IR siRNAs transfizierten Zellen auf 400 % (siRNA_IR_200) und auf 600 % (siRNA_IR_604). Dagegen enthielten die IGF-1R supprimierten Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen, entweder die gleiche (siRNA_IGF-1R_1503) oder leicht erhöhte (siRNA_IGF-1R_1585) Menge an K1/10 (Abb. 25 und 26).

Alternativ wurde für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der K1/10-Expression bei den Kontrollen und transient transfizierten Zellen alle erhaltenen Werte in Prozent umgerechnet und zwar in Bezug auf den 24 h-Wert der Kontrollen (gesetzt als 100 %). Der zeitliche Verlauf der K1/10-Expression in den Kontroll-Zellen zeigte ein Maximum positiver Zellen nach 24 h und reduzierte sich nach 48 h auf 70 % und nach 72 h auf 20 % des Ausgangswerts (Abb. 25 und 27). In den IR-supprimierten Zellen war die K1/10-Expression 24 h nach der Transfektion um ca. 50 % geringer als in den Kontroll-Zellen. Nach 48 h Behandlung stieg der Wert auf 85 % bei siRNA_IR_200 und auf 100 % bei siRNA_IR_604. Nach 72 h erhöhte sich K1/10 auf 140 % bei siRNA_IR_200 und auf 200 % bei siRNA_IR_604 (Abb. 25 und 27). Auch die IGF-1R supprimierten Zellen exprimierten nach 24 h ca. 50 % weniger K1/10 als Kontroll-Zellen. Nach 48 h Behandlung reduzierte sich der K1/10-Gehalt auf 30 % (siRNA_IGF-1R_1503) und 40 % (siRNA_IGF-1R_1585) und blieb nach 72 h praktisch konstant (Abb. 27).

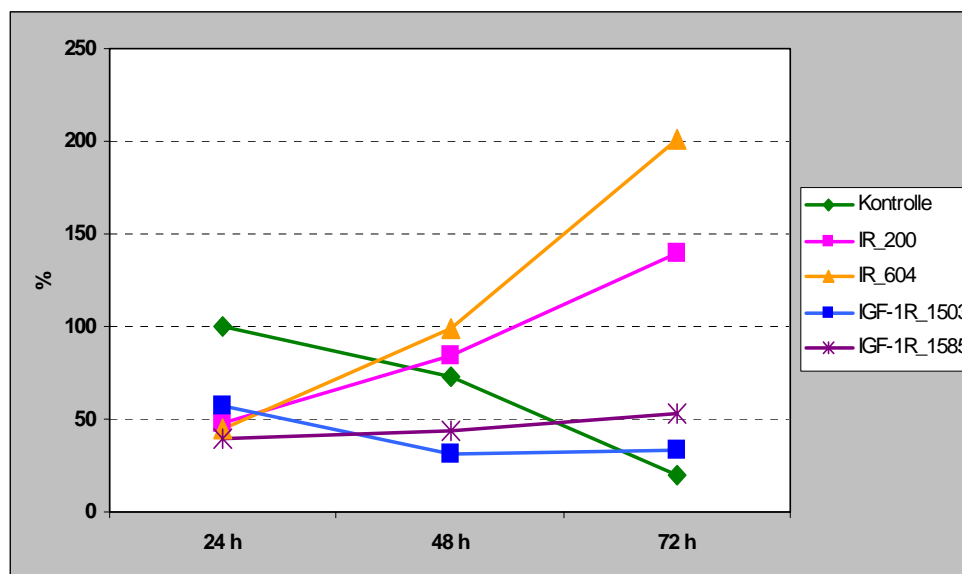


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Keratin 1/10-Expression in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.

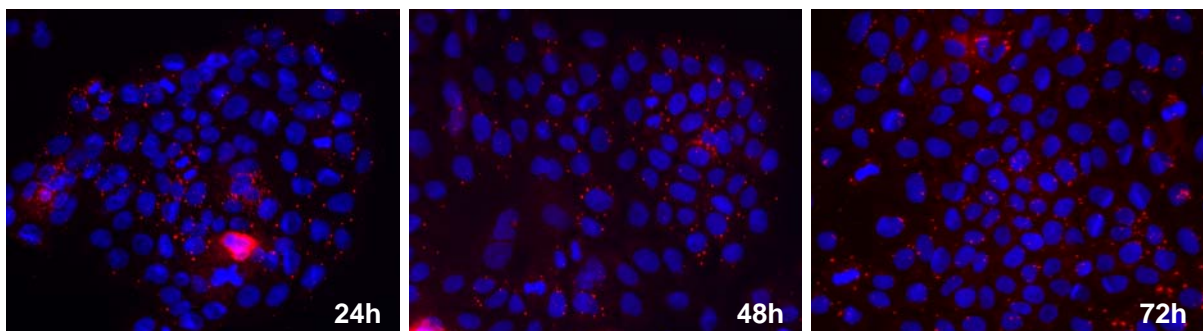
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Blockade von IR eindeutig den frühen Marker K1/10 begünstigt. Dagegen hat die Suppression von IGF-1R nur einen marginalen positiven Effekt.

Expression des Filaggrins

Der Vergleich des Filaggrin-Gehalts zwischen Kontroll- und transfizierten Zellen wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, wobei die Werte für jeden Zeitpunkt in Prozent umgerechnet wurden, und zwar bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte (jeweils 100 %). Nach 24 h war bei den mit IR-siRNAs transfizierten Zellen Filaggrin um ca. 100 % erhöht, bei den IGF-1R supprimierten Zellen dagegen nur um ca. 20 % (Abb. 28 und 29).

Nach 48 h stieg Filaggrin bei den IR supprimierten Zellen auf ca. 230 % und bei IGF-1R supprimierten Zellen auf ca. 150 % an. Bei den IR supprimierten Zellen blieb dieser Wert auch nach 72 h relativ stabil (160-200 % der Kontrollen), sank aber bei den IGF-1R supprimierten Zellen etwa auf das Niveau der Kontroll-Zellen ab (siRNA_IGF-1R_1503) oder wurde lediglich leicht erhöht (siRNA_IGF-1R_1585) (Abb.28 und 29).

HaCaT K6-Kontrolle



siRNA_IR_604

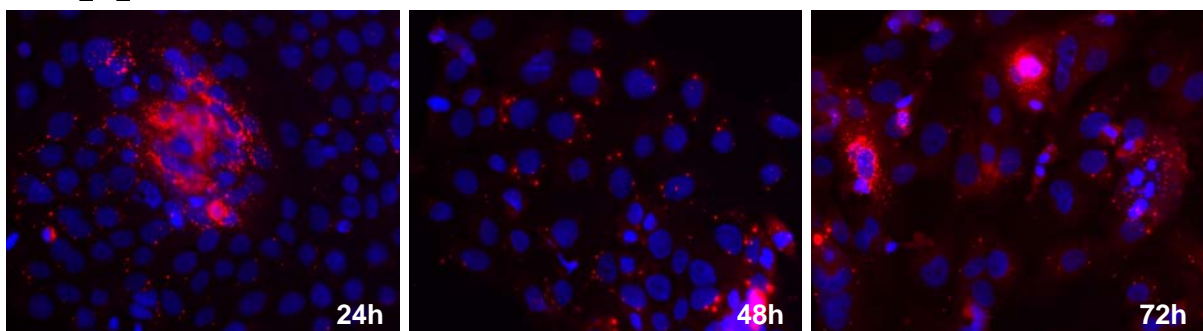


Abbildung 28: Die Expression des Filaggrins in Kontrollen und transient transfizierten Zellen (siRNA_IR_604) 24, 48 und 72 h nach der Transfektion. Immunfluoreszenz-Färbung auf Filaggrin (rot) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

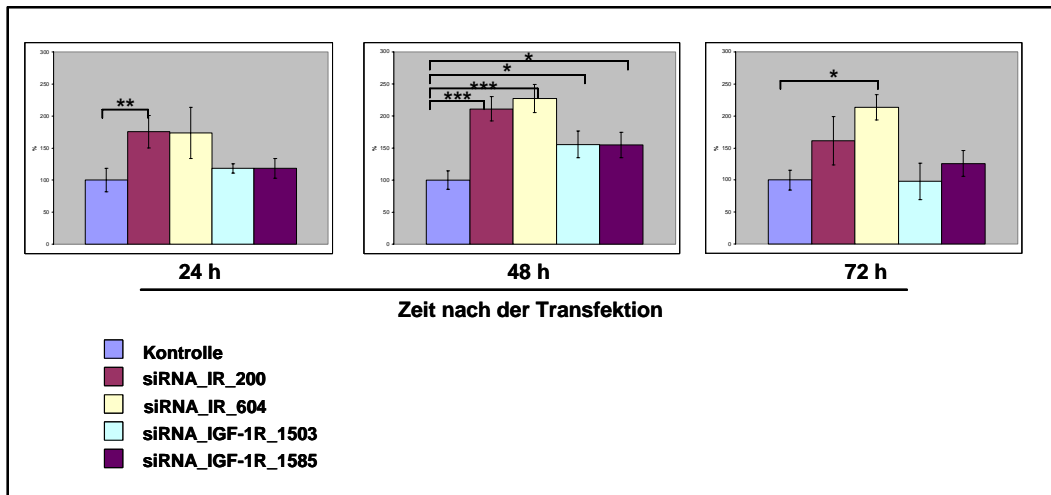


Abbildung 29: Analyse der Filaggrin-Expression in Kontrollen und Zellen transient transfiziert mit IR und IGF-1R siRNAs an drei verschiedenen Zeitpunkten. Mann-Whitney Test: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Filaggrin-Expression bei den Kontrollen und transient transfizierten Zellen wurden alle erhaltene Werte in Prozent in Bezug auf den 24 h-Wert der Kontrollen (100 %) umgerechnet.

Die Analyse der Kontroll-Zellen zeigte, dass während der untersuchten Zeitperiode der Filaggrin-Gehalt sich nur unwesentlich verändert hat, mit leichtem Absinken auf 80 % nach 48 h und auf 90 % nach 72 h Kultivierung (Abb. 28 und Abb. 30).

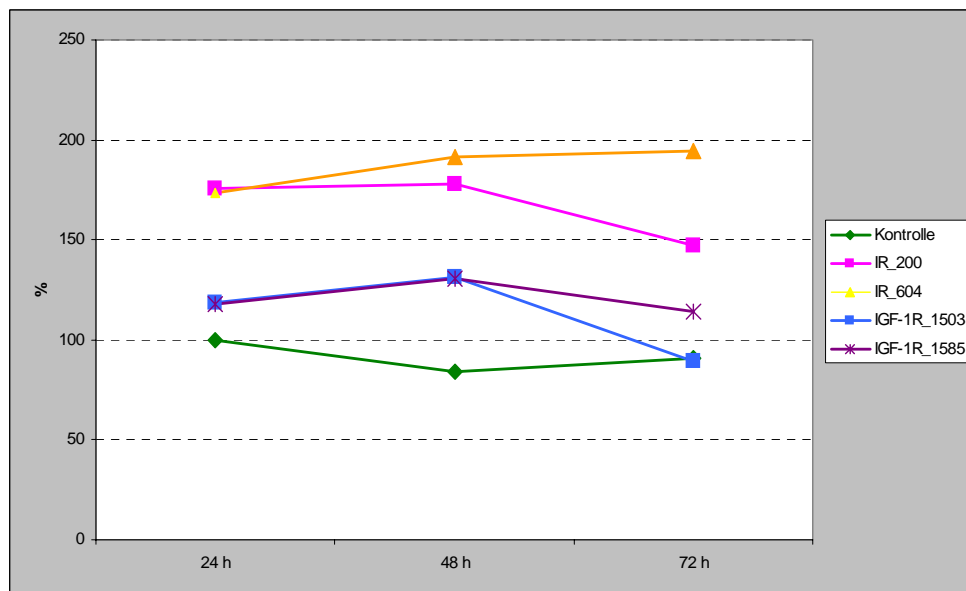


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Filaggrin-Expression in Kontrollen und IR oder IGF-1R transient supprimierten Zellen.

Die IR supprimierten Zellen exprimierten 24 h nach der Transfektion ca. 200 % Filaggrin bezogen auf die Kontroll-Zellen. Nach 48 h blieb der Filaggrin-Gehalt entweder unverändert (siRNA_IR_200) oder war leicht gestiegen (siRNA_IR_604). Nach 72 h schließlich waren die

Filaggrin-Werte etwas gesunken (siRNA_IR_200) oder fast unverändert geblieben (siRNA_IR_604) (Abb. 28 und Abb. 30). Im Gegensatz hierzu exprimierten die IGF-1R supprimierten Zellen 24 h nach der Transfektion lediglich ca. 120 % Filaggrin verglichen mit den Kontroll-Zellen. Nach 48 h war der Filaggrin-Gehalt bei den beiden IGF-1R-siRNAs leicht gestiegen (auf 130 %), reduzierte sich aber nach 72 h fast auf das Niveau der Kontroll-Zellen (Abb. 30).

Zusammengefasst nimmt K1/10-Expression in HaCaT-Zellen bei steigender Dauer der Kultivierung stetig ab. Da in den IR und IGF-1R supprimierten Zellen die Keratin-Expression nach 24 h um 50 % reduziert war, kann angenommen werden, dass unter diesen Kulturbedingungen sowohl IR als auch IGF-1R die Expression von frühen Differenzierungsmarker positiv beeinflussen. Im Laufe der Zeit verliert IGF-1R seinen Einfluss auf die Expression des K1/10. Im Gegensatz dazu steigt der K1/10-Gehalt in den IR supprimierten Zellen zu späteren Zeitpunkten stark an. Das deutet darauf hin, dass unter diesen Kulturbedingungen der Signalweg über IR eine inhibierende Rolle bei der Regulation der K1/10-Expression spielen könnte.

Bei diesem Versuchsaufbau exprimieren HaCaT-Zellen an allen untersuchten Zeitpunkten fast die gleiche Menge des späten Differenzierungsmarkers Filaggrin. Im Kontrast dazu, enthielten die IR supprimierten Zellen an allen Kultivierungsstadien fast die doppelte Menge des Filaggrins. So kann angenommen werden, dass unter diesen Kulturbedingungen IR einen blockierenden Einfluss auf die Filaggrin-Expression ausübt. Die Suppression von IGF-1R führte dagegen nur zu einem leichteren Anstieg des Filaggrin-Gehalts im frühen Kultivierungsstadium (24 und 48 h) und war nach 72 h kaum erhöht oder vergleichbar mit Kontroll-Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter diesen experimentellen Bedingungen IGF-1R nur wenig die Regulation der Filaggrin-Expression beeinflusst (Tabelle 35).

Tabelle 35: Effekt des IR und des IGF-1R Signalwegs auf die Expression der Differenzierungsmarker

Expression	Expressionsmuster in Kontroll-Zellen	Effekt auf die Expression	
		IR-Effekt	IGF-1R-Effekt
Keratin 1/10			
24 h	Expression mässig	positiv	positiv
48 h	niedriger	negativ	kein Effekt
72 h	gering	stark negativ	kein Effekt
Filaggrin			
24 h	gering	stark negativ	leicht negativ
48 h	gering	stark negativ	leicht negativ
72 h	gering	stark negativ	kein Effekt

4.2 Stabile Transfektion von HaCaT K6 Keratinozyten mit Insulin Rezeptor (IR) siRNA

Für die Herstellung stabiler Zell-Linien mit dauerhafter Suppression der IR-Expression, wurden die HaCaT-Zellen mit einem siRNA exprimierenden Vektor (mit Neomycin Resistenz) transfiziert und anschließend selektiert (siehe 3.2.4). Insgesamt konnten 81 Zell-Klone separiert und expandiert werden. Hiervon waren 33 Klone mit der Sequenz siRNA_IR_604, 38 Zell-Klone mit siRNA_IR_200 und 10 Klone, als Negativ-Kontrolle, mit siRNA_IR_scr („scrambled“) transfiziert. Die Suppression der IR-Expression wurde bei allen stabil transfizierten Klonen mittels Western Blot überprüft. Als Expressions- und Ladungskontrolle diente bei allen Blots der Nachweis von Cytokeratinen mittels spezifischer Antikörper. Die Intensität der Western Blot- und PCR-Banden wurde mit dem Programm ChemiImager 4400 (Alpha Innotech) gemessen und in Prozent umgerechnet, wobei der Wert der Kontrollen als 100 % genommen wurde.

4.2.1 Analyse der mRNA- und Protein-Expression bei stabil transfizierten IR-„Knock Down“ (IR-KD) Zell-Klonen

Die Analyse der IR Protein-Expression bei den Zell-Klonen ergab, dass von 33 mit siRNA_IR_604 transfizierten Klonen nur 8 eine mehr als 50 %-ige Reduktion in der Protein-Expression zeigten und von 38 mit siRNA_IR_200 transfizierten Klonen nur 10. Bei allen mit siRNA_IR_scr transfizierten Klonen war die IR-Expression vergleichbar zu nicht transfizierten Kontroll-Zellen. Von IR-KD Klonen wurden je zwei Klone mit der stärksten Suppression pro siRNA Sequenz ausgewählt und für weitere Versuche verwendet:

Ausgewählte Klone:	Suppressionseffekt:
200_1	ca. 50 %
200_2	ca. 70 %
604_1	ca. 70 %
604_2	ca. 50 %

Die nachfolgende Charakterisierung der ausgewählten Klone beinhaltete die Analyse der Expression folgender Proteine auf mRNA (RT-PCR) und Protein (Western Blot) Ebene:

- IGF-1 Rezeptor (IGF-1R), der eines der wichtigsten Elemente im IGF-1/Insulin-Signaltransduktionssystem darstellt und strukturell dem IR sehr ähnlich ist;
- IRS-1, ein wichtiges Adapter-Molekül, das durch den aktivierten IR phosphoryliert wird und andere Moleküle zum IR rekrutiert;

- PKC α und PKC δ , die Serin-Threonin Kinasen, die unter anderem als nachgeordnete („downstream“) Elemente der Insulin-Signalkette agieren;
- Integrin β 1, ein in der Epidermis exprimierter Zellmembran-Rezeptor, der die Verbindung zwischen dem intrazellulären Aktin-Cytoskellet und Komponenten der extrazellulären Matrix herstellt;
- Integrin α 6 β 4, das als Teil der Hemidesmosomen an der Verknüpfung der Epidermis-Basalzellen mit der darunter liegenden Basalmembran beteiligt ist;
- Caveolin-1, ein wichtiger Bestandteil der Caveolae und „Lipid Rafts“ in der Zellmembran.

Die Analyse der mRNA-Expression des IGF-1R zeigte bei den Klonen 200_1, 200_2 und 604_1 eine moderate Überexpression, wogegen bei dem Klon 602_2 die IGF-1R Expression durch IR-„Knock-Down“ nicht beeinflusst wurde (Tabelle 36, Abb. 31). Die IRS-1-Expression blieb bei allen Zell-Klonen unverändert auf dem Level der Kontroll-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurden PKC α und PKC δ in allen Klonen deutlich herunter reguliert (Tabelle 36, Abb. 31). Bei den Zellmembrankomponenten wurde die Expression von Integrin β 1 und Caveolin-1 durch IR-„Knock-Down“ nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Bei Integrin α 6 β 4, das normalerweise in der Epidermis als Heterodimer vorliegt, wurde die Expression der Untereinheiten getrennt untersucht. Während bei Integrin β 4 die Expression unverändert war (Daten nicht gezeigt), wurde Integrin α 6 bei den Klonen 200_1 und 604_1 stärker und bei den Klonen 200_2 und 602_2 schwächer im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert (Tabelle 36, Abb. 31). Alle Ergebnisse der Expressionsanalyse auf mRNA Ebene mittels RT-PCR wurden auf der Protein-Ebene überprüft (Western Blot) und bestätigt (Abb. 31).

Tabelle 36: mRNA- und Protein-Expression von verschiedenen Proteinen bei den stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen

Klone	200_1	200_2	604_1	604_2
Insulin Rezeptor	↓ (50%)	↓ (30%)	↓ (30%)	↓ (50%)
IGF-1R	↑ (200%)	↑ (155%)	↑ (220%)	=
IRS-1	=	=	=	=
PKC α	↓ (17%)	↓ (30%)	↓ 30%)	↓ (15%)
PKC δ	↓ (64%)	↓ (80%)	↓ (47%)	↓ (77%)
Integrin β 1	=	=	=	=
Integrin β 4	=	=	=	=
Integrin α 6	↑ (120%)	↓ (40%)	↑ (190%)	↓ (50%)
Caveolin-1	=	=	=	=

= : mRNA- und Protein-Expression vergleichbar mit den Kontrollen

↑: Hochregulation; ↓: Herunterregulation

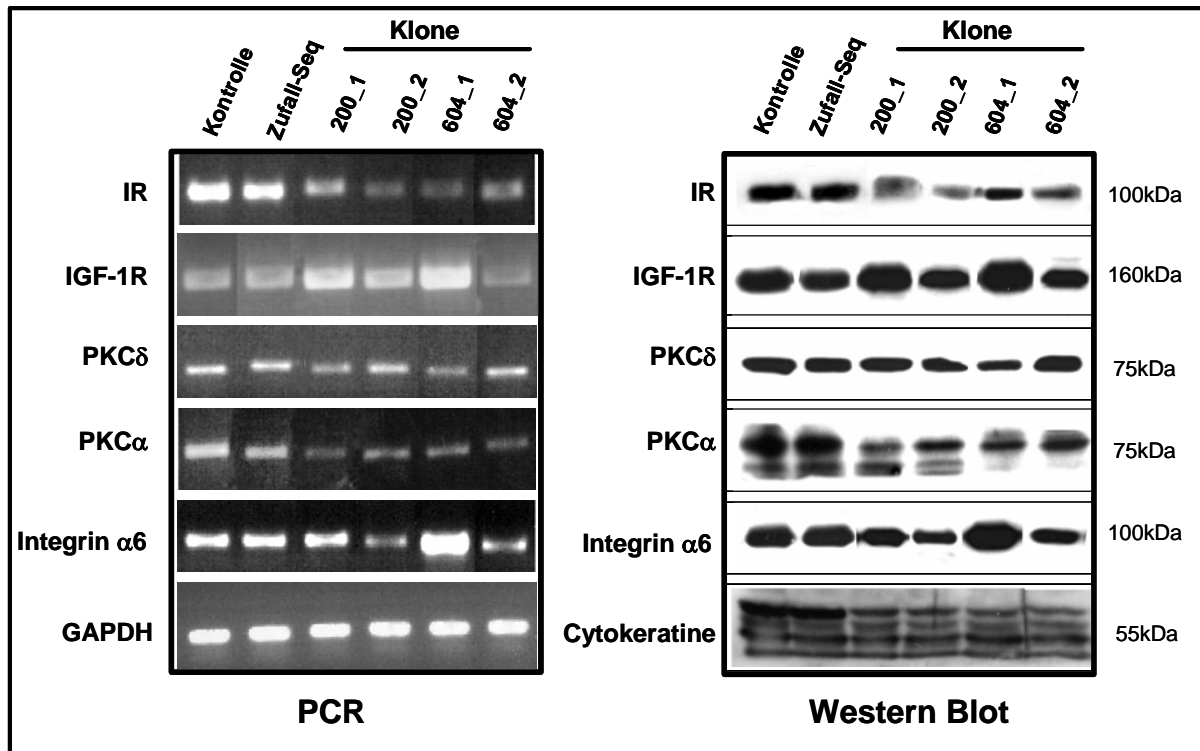


Abbildung 31: PCR (links) und Western Blots (rechts) von den stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen.

4.2.2 Analyse der Proliferation bei stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen

Der Einfluss der permanenten IR-Suppression auf die Wachstumsprozesse wurde mit einer Proliferationsanalyse basierend auf Kernfärbung untersucht. Dafür wurden die Zellen auf 24-Well Platten (20.000 Zellen/Well) ausgesät und nach 24 h auf unterschiedliche Weise stimuliert: nur mit Insulin (100 nM), nur mit IGF-1 (10 nM) und mit beiden Faktoren. Als Negativ-Kontrolle fungierten Ansätze ohne Stimulation mit Insulin und IGF-1. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die in KGM2 mit 1 % FCS weiter kultiviert wurden. Nach drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h nach Beginn der Stimulation) wurde je eine Platte entnommen und bei -20°C eingefroren. Die aufgetauten Platten wurden mit dem DNA-Farbstoff SYBR^R Green I gefärbt. Anschließend wurde die Extinktion mit dem Fluoroscan Ascent (Labsystems) gemessen und ausgewertet (siehe 3.2.8).

Folgende Zell-Varianten wurden für Proliferationsanalyse ausgewählt:

- HaCaT-Kontroll-Zellen
- IR_scr
- Klon 604_1
- Klon 200_2

Die Analyse der Proliferation der Kontroll-Zellen zeigte, dass auch in der Abwesenheit beider Faktoren die Zell-Proliferation stetig anstieg (auf 280 % nach 72 h Behandlung). Die Stimulation mit Insulin hatte keinen bedeutenden Einfluss, so war die Proliferations-Rate zu jedem untersuchten Zeitpunkt vergleichbar mit den nicht stimulierten Zellen. Auch IGF-1 bewirkte nach 24 h Behandlung nur eine leichte Proliferations-Erhöhung, wobei nach 48 und 72 h die Proliferation auf 260 % beziehungsweise 390 % anstieg (im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen). Sowohl bei der Stimulation mit beiden Faktoren als auch bei der Kultivierung in Medium mit 1 % FCS ergaben sich fast keine Unterschiede zu nicht stimulierten Zellen. Lediglich nach 72 h Kultivierung stieg die Proliferations-Rate bei den beiden Ansätzen leicht an (Abb. 32, A).

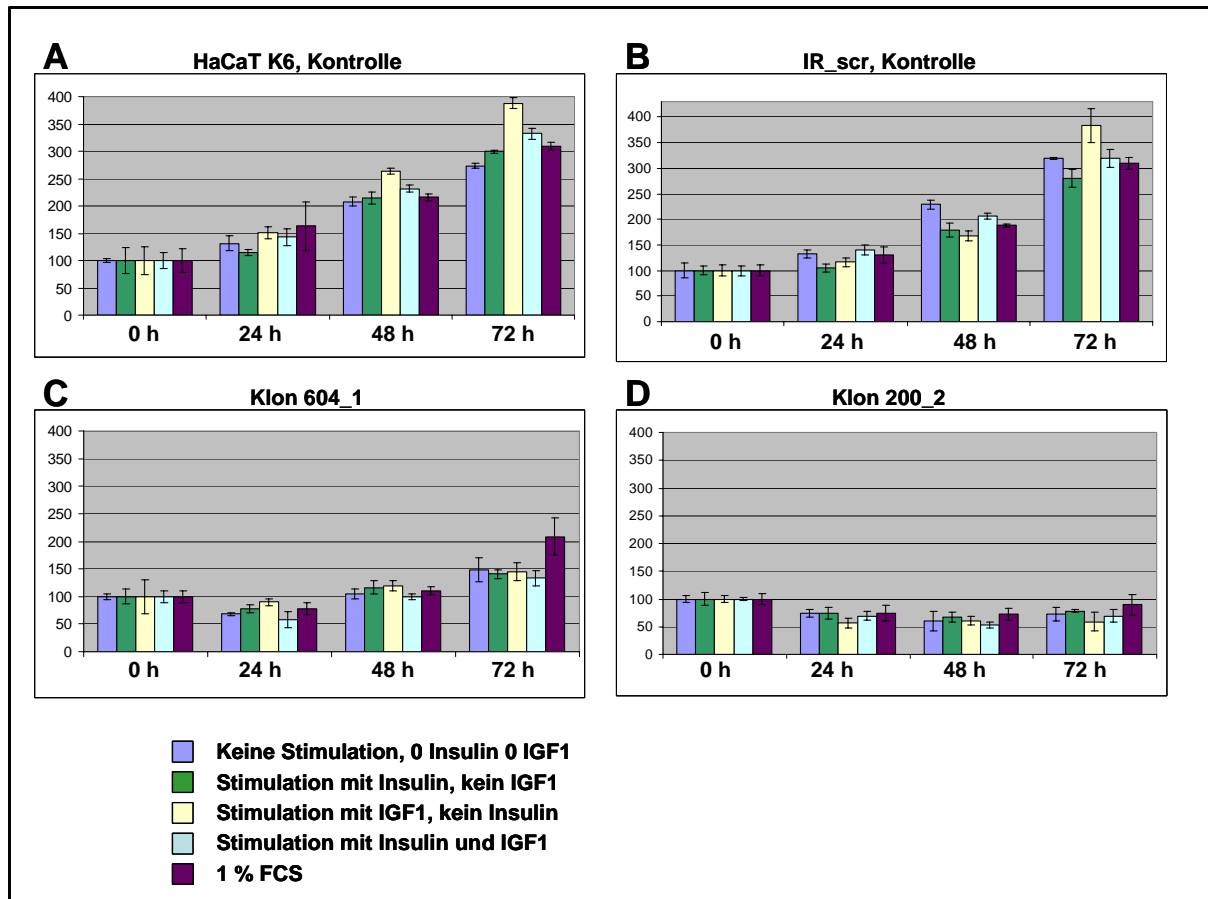


Abbildung 32: Proliferations-Raten bei den Kontroll-Zellen und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen.

Die IR_scr Zellen zeigten fast das gleiche proliferative Verhalten wie Kontroll-Zellen. Auch hier führte die Stimulation mit Insulin oder mit beiden Faktoren zu keiner Erhöhung der Proliferation. Auch bei mit 1 % FCS kultivierten Zellen war die Proliferation vergleichbar mit den nicht stimulierten Zellen. Die Stimulation mit IGF-1 zeigte erst nach 72 h einen deutlich positiven Effekt auf die Proliferation im Vergleich zu den anderen Ansätzen (Abb. 32, B).

Generell war das Wachstum der Zell-Klone bedeutend niedriger als bei den Kontroll-Zellen. Bei dem Klon 604_1 konnte nach 24 h Behandlung bei allen Ansätzen eine leichte Abnahme der Zellzahl beobachtet werden. Diese nahm nach 48 und 72 h wieder leicht zu, aber ohne jegliche Unterschiede zwischen stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen. Nur bei den mit 1 % FCS kultivierten Zellen konnte nach 72 h ein deutlicher Proliferationsanstieg festgestellt werden (Abb. 32, C).

Beim Klon 200_2 war die Zellzahl nach 24 h bei allen Ansätzen um ca. 30 % gesunken, mit abfallender Tendenz nach 48 h. Erst nach 72 h konnte eine leichte Zunahme festgestellt werden. Auch beim Klon 200_2 waren keine gravierenden Unterschiede zwischen stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen vorhanden (Abb. 32, D).

Die Ergebnisse der Proliferationsanalyse zeigten, dass in den Kontroll-Zellen Stimulation mit Insulin keine Erhöhung der Proliferationsraten bewirkte. Nur IGF-1 vermochte die Proliferation der Zellen deutlich positiv zu beeinflussen. Die Behandlung der Zellen mit beiden Faktoren hatte wiederum keinen messbaren Einfluss auf das Zellwachstum.

Die Suppression von IR führte zu einer deutlichen Blockade der Proliferation. Auch der stimulierende Effekt des IGF-1 wurde durch die Suppression von IR unterdrückt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Stimulation der Proliferation durch IGF-1 unter anderem auch IR notwendig ist, zumindest unter den gewährten Kulturbedingungen.

4.2.3 Analyse der Migration bei stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen

Der Einfluss des IR „Knock-Down“ auf Migrationssfähigkeit der IR-KD Zell-Klone wurde mit einem Migrationsassay („Wund-Assay“) unter verschiedenen Stimuli untersucht. Für die erste Versuchsreihe wurden HaCaT-Zellen und die stabil transfizierten Klone auf 6-Well Platten ausgesät (100.000 Zellen/Well) und bis zur Postkonfluenz kultiviert. In den Zellrasen wurde eine Spur gekratzt und die Zellen wurden auf unterschiedliche Weise stimuliert, einmal nur mit Insulin (100 nM), nur mit IGF-1 (10 nM) oder mit beiden Faktoren. Die markierten Zellfronten wurden direkt nach der Stimulation und nach 24 h fotografiert. Die Bilder wurden überarbeitet und die besiedelten Flächen, als Maß für die Migration, mit dem Computer-Programm „AnalySIS“ ausgemessen. Als Negativ-Kontrolle wurde der Ansatz ohne Stimulation mit Insulin und IGF-1 verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten die Zellen, die im KGM2 mit 1 % FCS weiter kultiviert worden waren (siehe 3.2.7).

Folgende Zell-Varianten wurden für den Migrationsassay ausgewählt:

- HaCaT-Kontroll-Zellen
- IR_scr

- Klon 604_1
- Klon 200_2

Schon die erste morphologische Untersuchung zeigte deutliche Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen Kontrollen und IR-supprimierten Zellen. Die Kontroll-Zellen, HaCaT und IR_scr, bildeten stets eine geschlossene Migrationsfront. Innerhalb der untersuchten Zone bewegten sich die Zellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, wobei die am schnellsten migrierten Zellen charakteristische „Zungen“ bildeten (Abb. 33, A, B). Im Gegensatz dazu migrierten die Zellen des Klons 604_1 meist einzeln. Nach 24 h war die zellfreie Fläche mit einzelnen Zellen relativ dicht besiedelt (Abb. 33, C). Der Klon 200_2 fiel durch sein ambivalentes Migrationsverhalten auf. Die Stellen mit intensiver migratorischer Aktivität waren relativ selten und bildeten große „Zell-Zungen“. Dagegen war in den ausgedehnten dazwischen liegenden Bereichen praktisch keine Migration feststellbar (Abb. 33, D).

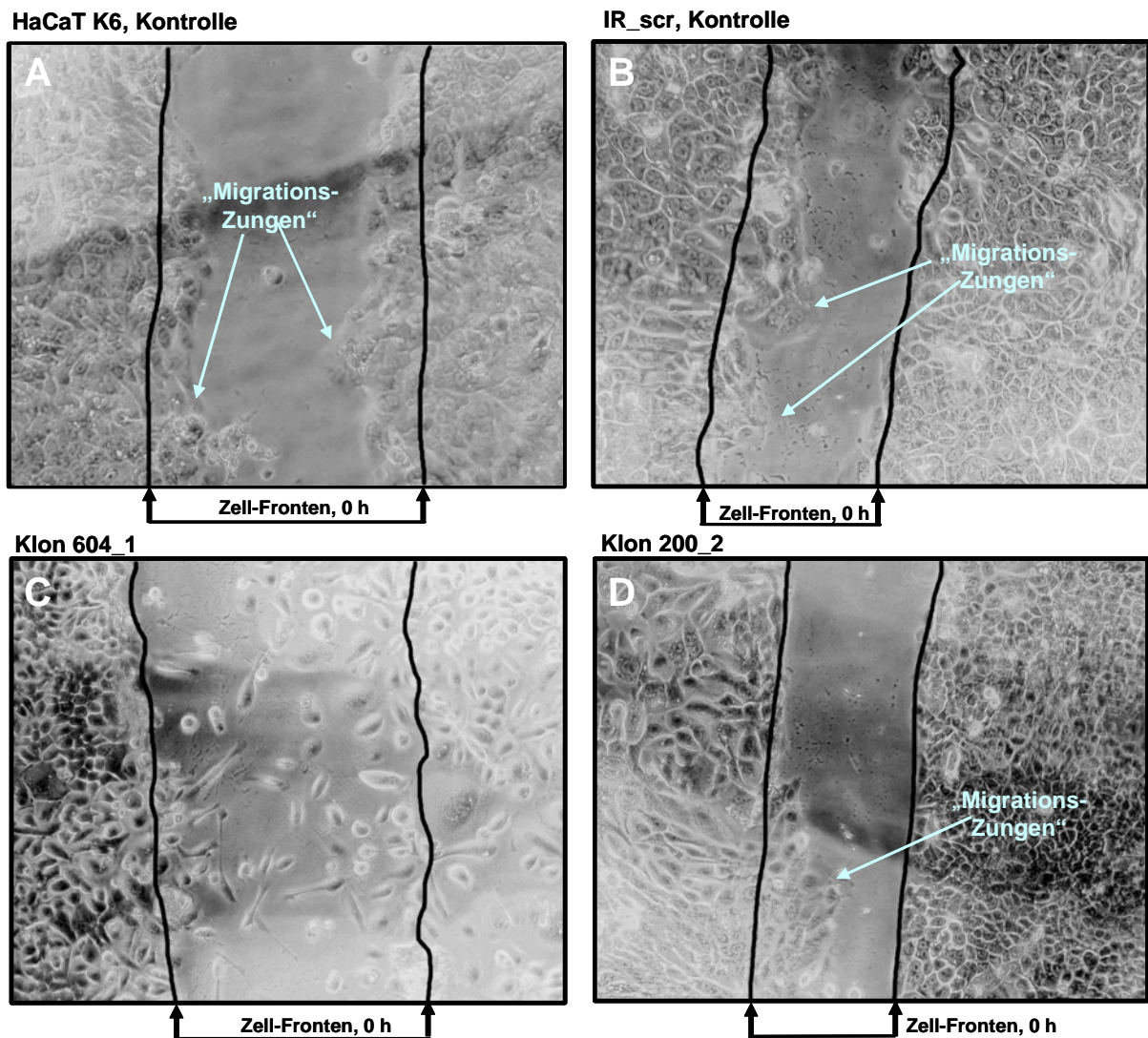


Abbildung 33: Migrationsassay nach 24 h für Kontroll- Zellen sowie IR-KD Zell-Klone. 10x Vergrößerung.

Die quantitative Analyse der Migration in Kontroll-HaCaT-Zellen zeigte, dass die Zellen ohne Stimulation nur wenig migrierten. Sowohl Stimulation mit Insulin als auch die Kultivierung der Zellen in 1 % FCS führte zu einer Erhöhung der Migration fast auf das Doppelte. Noch stärker war die Auswirkung von IGF-1 auf die Migration (Anstieg auf 260 %) und beider Faktoren zusammen (Anstieg auf 280 %) (Abb. 34, A).

Die IR_scr Zellen zeigten fast das gleiche Migrationsverhalten wie HaCaT-Zellen. Auch hier migrierten die Zellen am stärksten, wenn sie mit IGF-1 oder mit den beiden Faktoren gleichzeitig stimuliert wurden, und der Effekt von Insulin oder 1 % FCS war deutlich schwächer (Abb. 34, B).

Bei Klon 604_1 stimulierte weder Insulin noch IGF-1 die Migration. Auch Kultivierung der Zellen in 1 % FCS hatte keinen positiven Einfluss, wogegen die Applikation beider Faktoren zu einem Migrationsanstieg auf ca. 200 % führte (Abb. 34, C).

Bei Klon 200_2 hatten IGF-1 oder Kultivierung mit 1 % FCS keinen Einfluss auf die Migration der Zellen. Hier führte Stimulation mit Insulin oder mit beiden Faktoren zu einer leichten Erhöhung der Migration (Abb. 34, D).

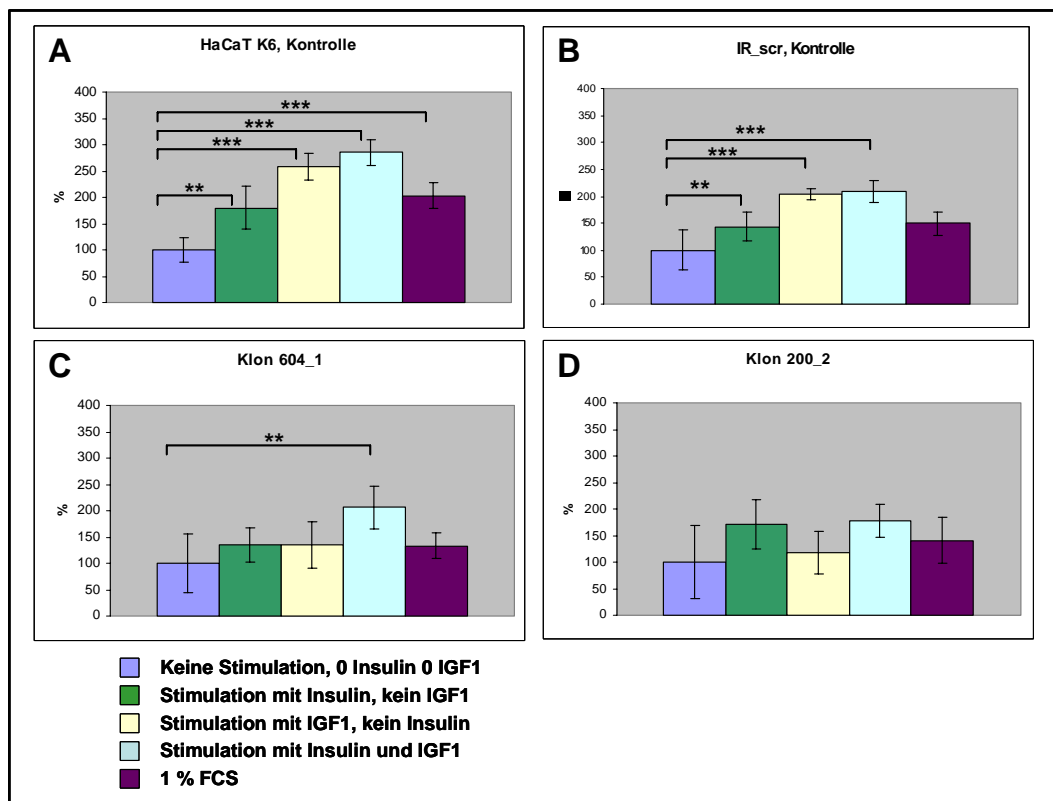


Abbildung 34: Quantitative Analyse der Migration von Kontrollen und IR-KD Zell-Klonen. Mann-Whitney Test: *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Die erhaltenen Daten demonstrieren deutlich, dass Insulin und vor allem IGF-1 die Migration der HaCaT-Zellen zu stimulieren vermögen. Bei der Applikation beider Faktoren konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden. Die Suppression von IR führte zur Aufhebung der stimulierenden Wirkung nicht nur von Insulin sondern auch größtenteils von IGF-1. Dieser Befund deutet darauf hin, dass zur vollen Entfaltung der stimulierenden Wirkung von IGF-1 auf die Migration nicht nur IGF-1R sondern auch IR vorhanden sein muss.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurden bei gleichem Stimulations-Schema noch zusätzlich blockierende Antikörper gegen IGF-1R eingesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze mit einem irrelevanten Antikörper und ohne Antikörper (siehe 3.2.7).

Da die Migrationsraten bei beiden Kontroll-Ansätzen keine Unterschiede aufwiesen, wurden bei der graphischen Darstellung nur die Werte der entsprechenden Ansätze ohne Antikörper und mit blockierenden Antikörpern aufgetragen.

Bei HaCaT-Zellen, die ohne blockierenden Antikörper gegen IGF-1R kultiviert wurden, zeigte sich der gleiche Migrationsverlauf wie schon oben beschrieben. Wiederum führte Stimulation mit Insulin, IGF-1, beiden Faktoren und 1 % FCS zu einer deutlichen Erhöhung der Zellmigration. Die Applikation des blockierenden Antikörpers beim Ansatz ohne Stimulation (-Ins/-IGF-1), zeigte keine Wirkung, interessanterweise wurde aber der stimulierende Effekt von Insulin durch Inhibition des IGF-1R zum Teil aufgehoben. Noch deutlicher war die Blockierung beim Ansatz mit IGF-1 Stimulation (-Ins/+IGF-1), wo die Migration fast auf das Niveau der nicht stimulierenden Zellen absank. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der Stimulation mit beiden Faktoren beobachtet werden (+Ins/+IGF-1), allerdings nicht ganz so ausgeprägt wie beim IGF-1-Ansatz. Schließlich wurde die Zellmigration auch beim Ansatz mit 1 % FCS durch die Blockierung des IGF-1R noch deutlich reduziert (Abb. 35, A).

Auch bei IR_scr Zellen führte die Blockierung des IGF-1R fast zur kompletten Aufhebung des stimulierenden Effekts von Insulin, IGF-1 oder beiden Faktoren. Allerdings erwies sich die Wirkung von IGF-1R- Inhibition auf die Zellen des 1 % FCS Ansatzes als sehr gering (Abb. 35, B).

Die Analyse der Migration der Zellen vom Klon 604_1 ohne Anwendung des blockierenden Antikörpers bestätigte nochmals die bereits beschriebenen Daten. Insulin, IGF-1 und 1 % FCS hatten somit nur eine geringe Auswirkung auf die Migration der Zellen und die Applikation beider Faktoren führte zu einem weiteren Anstieg. Während die Blockierung des IGF-1R keinen signifikanten Effekt auf die Ansätze ohne Stimulation (-Ins/-IGF-1) hatte, war die

Migration mit 1 % FCS oder Insulin nur leicht reduziert, mit IGF-1 oder beiden Faktoren aber deutlich (Abb. 35, C).

Bei Klon 200_2 führte, wie in der ersten Versuchsreihe, nur die Stimulation mit Insulin oder beiden Faktoren zu einer leichten Erhöhung der Migration. Die Blockierung des IGF-1R hatte keinerlei Einfluss auf die Migration bei den Ansätzen ohne (-Ins/-IGF-1) oder mit Stimulation durch Insulin sowie 1 % FCS, dagegen einen leicht reduzierenden Effekt bei den Ansätzen mit IGF-1 oder beiden Faktoren (Abb. 35, D).

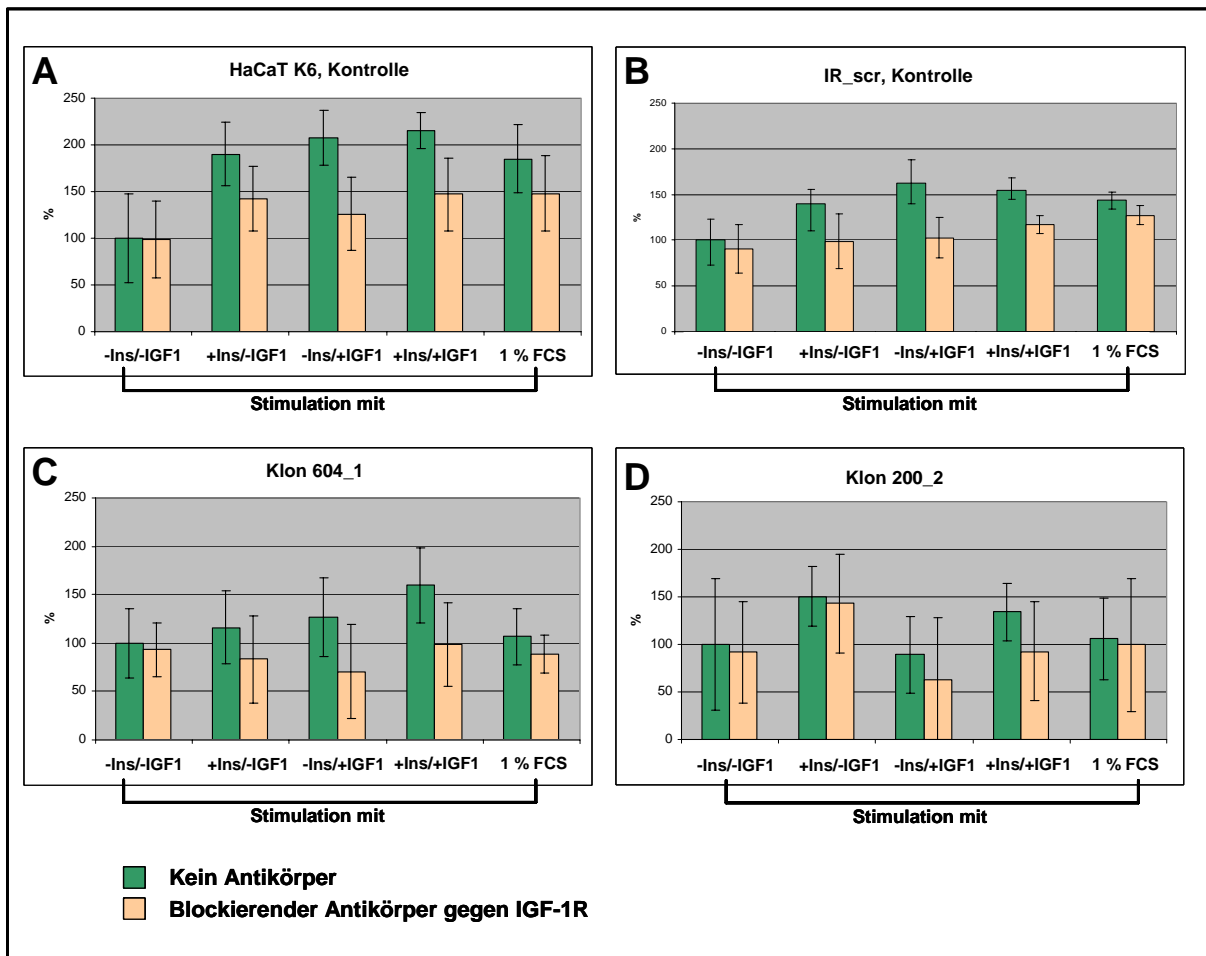


Abbildung 35: Quantitative Analyse der Migration von Kontrollen und IR-KD Zell-Klonen bei der Anwendung des blockierenden Antikörpers gegen IGF-1R.

Zusammenfassend führte die Suppression von IR zur weitgehenden Aufhebung der Stimulation durch Insulin und IGF-1. Die nachfolgende Blockierung des IGF-1R bei den IR-KD Zell-Klonen hatte nur eine leichte oder gar keine Auswirkung auf die restliche migratorische Aktivität. Diese Befunde deuten darauf hin, dass IR eine zentrale Rolle bei der Koordination der stimulierenden Signale durch Insulin und IGF-1 auf die Zellmigration spielt.

4.3 Organotypische Kokulturen (OTK)

Die organotypische Kokulturen (OTK) wurden in dieser Arbeit eingesetzt um das Verhalten der IR-supprimierten Zellen in einem haut-ähnlichen System zu studieren. Dabei wuchsen sowohl normale HaCaT-Zellen als auch stabil transfizierte IR-KD Zell-Klone luftexponiert auf einer Kollagenmatrix mit eingebetteten Fibroblasten. Nach 3 Wochen wurden die Kulturen entnommen und für die Histologie und für die Gefrierschnitte präpariert.

Folgende Zell-Linien wurden für OTKs verwendet:

Kontrolle	HaCaT-Zellen
Kontrolle („scrambled“)	IR_scr
Stabil transfizierte Zell-Klone	604_1
	604_2
	200_1
	200_2

4.3.1 Histologie

Um den Einfluss des IR „Knock-Down“ auf die Epithel-Architektur in OTKs zu analysieren, wurden Paraffinschnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt.

Die HaCaT-Zellen bildeten ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, dessen Aufbau überwiegend dem der normalen Epidermis entsprach. Dies erfolgte jedoch im Vergleich zu normalen Keratinozyten (NHK) verzögert, das heißt während in OTKs von NHK dieser Prozess bereits nach einer Woche weitgehend abgeschlossen ist, entwickelten HaCaT-Zellen erst nach 2-3 Wochen ein vergleichbares Epithel. In dem nach 3 Wochen gut strukturierten Epithel (Abb. 36, A, Tabelle 37) waren eine Basalschicht aus palisadenartig angeordneten Zellen und das *Stratum spinosum* mit mehreren Schichten unregelmäßig geformter, zunehmend abgeflachter Zellen gut erkennbar. Die Zellen des *Stratum granulosum* waren durch ihre äußerst flache Form und das Auftreten von Keratohyalin-Granula charakterisiert. Diese Granula waren auch vereinzelt im *Stratum corneum* vorhanden. Des Weiteren deutete das Vorhandensein von Kernresten in den verhornten Zellschichten auf einen Übergangszustand zwischen parakeratotischer und orthokeratotischer Differenzierung hin. In OTKs normaler Keratinozyten gehen (wie in Epidermis) die Kerne bei der terminalen Differenzierung im *Stratum corneum* vollständig verloren. Charakteristisch für parakeratotische Epithelien sind das Fehlen von Übergangszellen mit Keratohyalin-Granula und das Verbleiben der Kernreste in den Hornschichten.

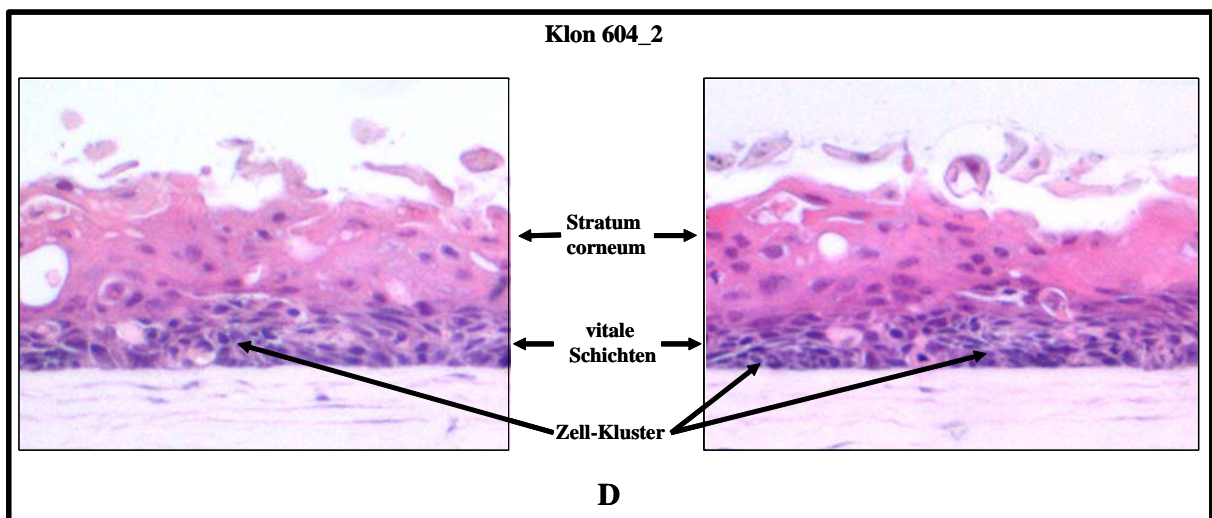
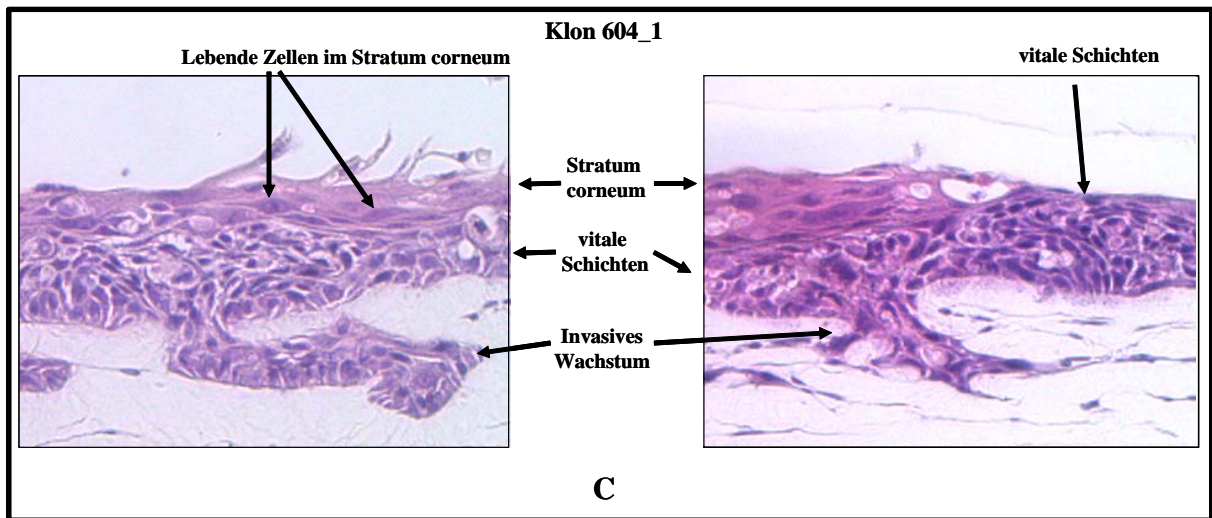
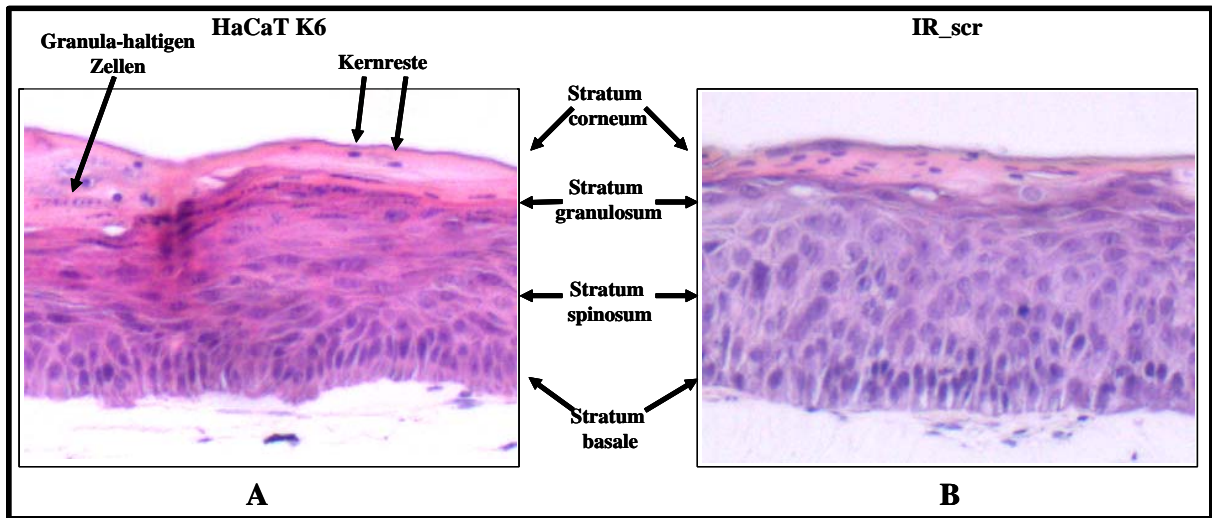
Die mit der Zufalls-Sequenz („scrambled“) transfizierten Zellen (IR_scr) bildeten nach 3 Wochen ebenfalls ein mehrschichtiges Epithel, das in Struktur und Differenzierung dem „Kontroll-Epithel“ der nicht transfizierten Zellen sehr ähnlich war (Abb. 36, B). Verschieden dagegen war ein dickeres *Stratum spinosum*, dessen Zellen keine abgeflachte, sondern eher eine rundliche Form besaßen. Das *Stratum granulosum* war im Vergleich zum Kontroll-Epithel dünner und enthielt wesentlich weniger Keratohyalin granula. Zusätzlich deutete die größere Zahl von Kernresten im *Stratum corneum* auf einen mehr parakeratotischen Charakter hin.

Dagegen entwickelten die IR-KD Zell-Klone nach 3 Wochen Epithelien, die in wesentlichen Kriterien stark von der normalen Epidermis abwichen (Abb. 36, C-F). So waren die vitalen Schichten in den Epithelien aller Klone sehr viel dünner als bei Kontroll-Zellen.

Die Epithel-Architektur der Klone 604_1, 604_2 und 200_2 zeigte eine deutlich verminderte Polarisierung. Unterschiede zwischen verschiedenen epithelialen Schichten waren häufig kaum noch zu erkennen. In mehreren Bereichen des Epithels bildeten sich kleinzellige Ansammlungen (oder Zell-Kluster), was bei einer prä-neoplastischen Epithel-Entwicklung oft beobachtet wird. Ein deutliches *Stratum corneum* wurde nur bei dem Klon 200_1 ausgebildet, wogegen bei 604_1 und 200_2 morphologische Differenzierungskriterien weitgehend oder völlig fehlten. Klon 604_2 zeigte eine starke parakeratotische, aberrante Differenzierung mit schwammigen Strukturen (Abb. 36, C-F, Tabelle 37).

Im Unterschied zu den anderen drei Zell-Klonen bildete Klon 200_1 ein gut differenzierendes Epithel (Abb. 36, E). Auf die basale Schicht folgten die abgeflachten Zellen vom *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum*. Allerdings waren diese vitalen Schichten extrem dünn, während das parakeratotische *Stratum corneum* sehr dick war, durchsetzt mit vereinzelt Hornperlen (Abb. 36, E). Weiterhin ungewöhnlich bei 200_1 war das häufige „Einknospen“ des Epithels in die Kollagenmatrix, möglicherweise ein Übergang zu invasivem Wachstum.

Ein deutlich invasives Verhalten wurde beim Klon 604_1 festgestellt. Bis auf einige isolierte Bereiche mit abgeflachten Zellen war das Epithel äußerst unregelmäßig und weitgehend apolar. An mehreren Stellen wuchsen die Zellen weit in das Kollagengel ein, wo sie teilweise isolierte „Zell-Inseln“ unterhalb des regulären Epithels bildeten (Abb. 36, C).



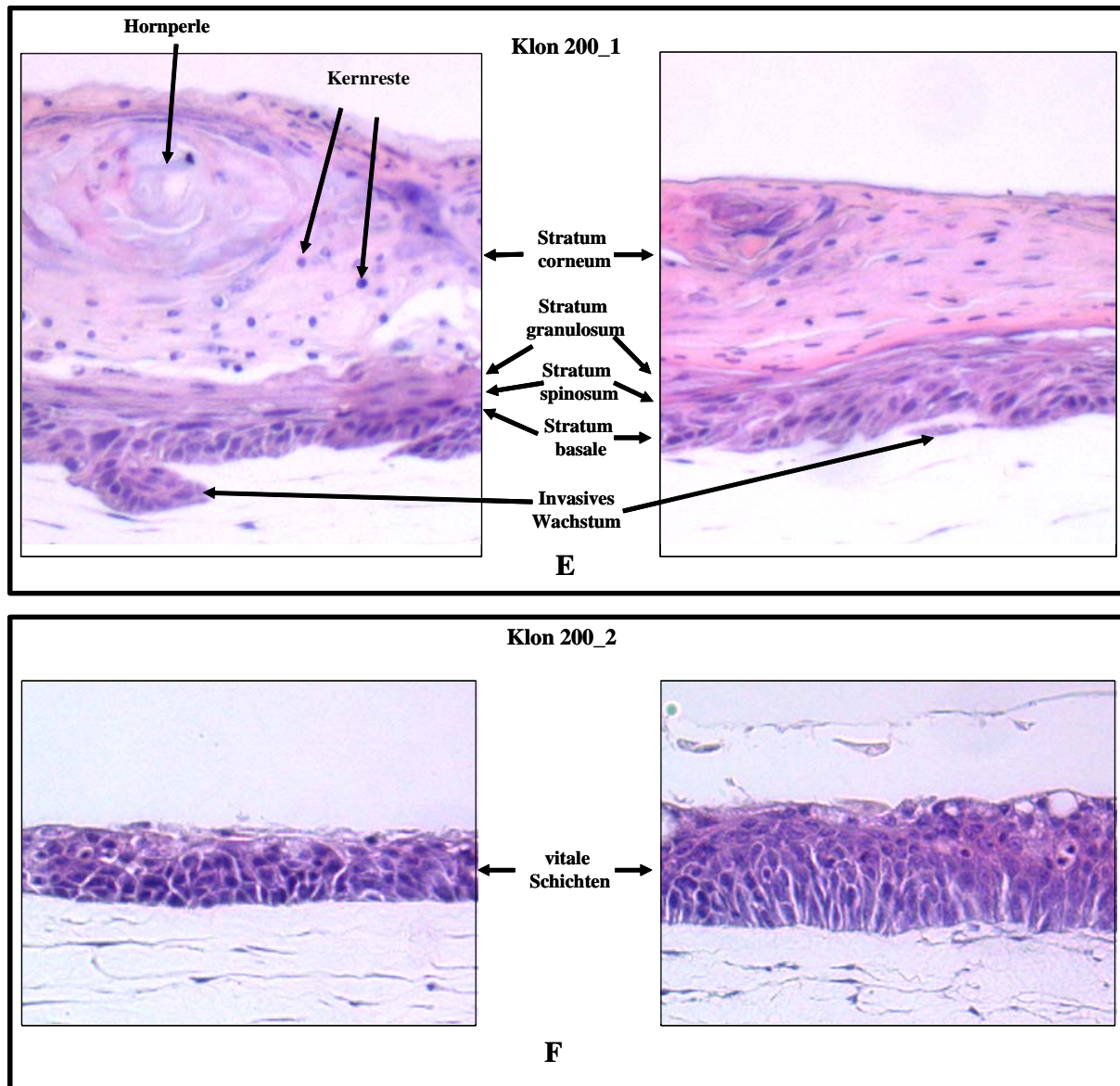


Abbildung 36: Histologie von 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen (OTK) mit Kontroll-Zellen (A und B) und mit IR-KD Zell-Klonen (C, D, E und F).

Tabelle 37: Epithel-Architektur von Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen in OTK

	HaCaT	IR_scr	200_1	200_2	604_1	604_2
<i>Stratum basale</i>	+	+	+	nicht identifizierbar		
<i>Stratum spinosum</i>	+	+	+ sehr dünn	nicht identifizierbar		
<i>Stratum granulosum</i>	+	+	+ sehr dünn	nicht identifizierbar		
<i>Stratum corneum</i>	+ nur zum Teil parakeratotisch	+ parakeratotisch	+ parakeratotisch	-	+ parakeratotisch	+ parakeratotisch
Invasion	-	-	(+)	-	+	-

4.3.2 Analyse von Proliferation, Differenzierung, Basalmembran- und Hemidesmosomen-Komponenten in 3D Kokultur

Um den Einfluss des IR „Knock-Down“ auf Wachstum und gewebsspezifische Verteilung verschiedener Proteine in Kokulturen zu analysieren, wurden die 3 Wochen alten OTKs für die Gefrierschnitte präpariert und mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) untersucht.

Folgende Zell-Linien wurden für IIF-Analyse verwendet:

Kontrolle	HaCaT
Stabil transfizierte Zell-Klone	604_1
	200_1
	200_2

4.3.2.1 Proliferation in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen

Die Proliferationsfähigkeit und Verteilung mitotischer Zellen in OTK wurde mit einem Antikörper gegen Ki67 untersucht. Das Ki67-Antigen wird hauptsächlich während den aktiven Phasen des Zell-Zyklus (G1, S, G2 und M-Phasen) exprimiert und ist nicht in den ruhenden Zellen in der G0-Phase vorhanden (Traut et al., 2002a).

In OTKs der Kontroll-HaCaT-Zellen war die Proliferationsaktivität auf einige Zellen hauptsächlich der basalen Schicht beschränkt, was auch in einer normalen Epidermis der Fall ist (Abb. 37, A). Auch bei Klon 200_1, der ein gut differenzierendes Epithel mit extrem dünnen vitalen Schichten ausbildete (siehe 4.3.1), befanden sich die proliferierenden Zellen fast ausschließlich in der basalen Schicht (siehe Abb. 37, B).

Dagegen waren bei Klon 200_2 die mitotischen Zellen im ganzen Epithel verstreut, was auf eine starke Störung der Epithel-Polarisierung hinweist. Die kleinzelligen Ansammlungen, die schon bei der histologischen Untersuchung in mehreren Bereichen des Epithels beobachtet wurden (siehe 4.3.1), erwiesen sich zum größten Teil als Zell-Kluster proliferierender Zellen (Abb. 37, C).

Eine aberrante Proliferation konnte auch beim Klon 604_1 festgestellt werden. Hier konnten ebenfalls die im Zell-Zyklus befindenden Zellen in allen Bereichen des weitgehend apolaren Epithels beobachtet werden. Mehrere mitotische Zellen befanden sich zusätzlich in den invasiven „Zell-Inseln“ unterhalb des regulären Epithels (siehe auch 4.3.1) (Abb. 37, D).

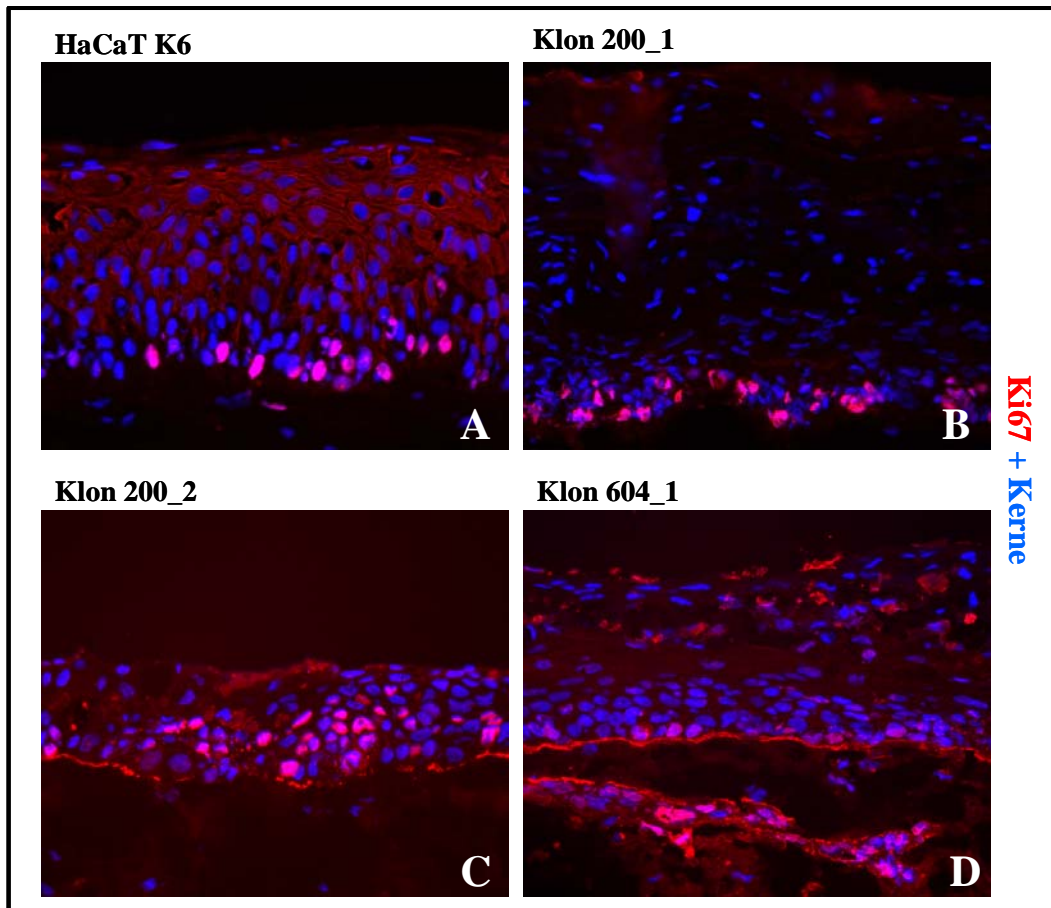


Abbildung 37: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontroll-Zellen (A) und mit IR-KD Zell-Klonen (B, C, D). Färbung auf Ki67 (rot, pink) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

4.3.2.2 Differenzierung in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen

Der Einfluss der IR-Suppression auf den Differenzierungsgrad der Kokulturen wurde mit Antikörpern gegen frühe und späte Differenzierungsmarker untersucht.

Als typischer früher Differenzierungsmarker wurde Keratin 1/10 (K1/10) ausgewählt. In normaler Epidermis wird K1/10 suprabasal im *Stratum spinosum* exprimiert, ist aber auch im *Stratum granulosum* und im *Stratum corneum* nachweisbar.

Sowohl die Kontroll-OTKs der HaCaT-Zellen als auch der Klon 200_1 zeigten eine normale Lokalisation von K1/10 in suprabasalen Epiethelschichten (Abb 38, A, B). Im Gegensatz dazu konnte K1/10 bei den Klonen 200_2 und 604_1 nur in höheren Schichten nachgewiesen werden (Abb. 38, C, D). Diese Ergebnisse weisen auf eine Störung des Differenzierungsprozesses in den IR-supprimierten Kokulturen hin, die zu einer verspäteten Expression des K1/10 führt.

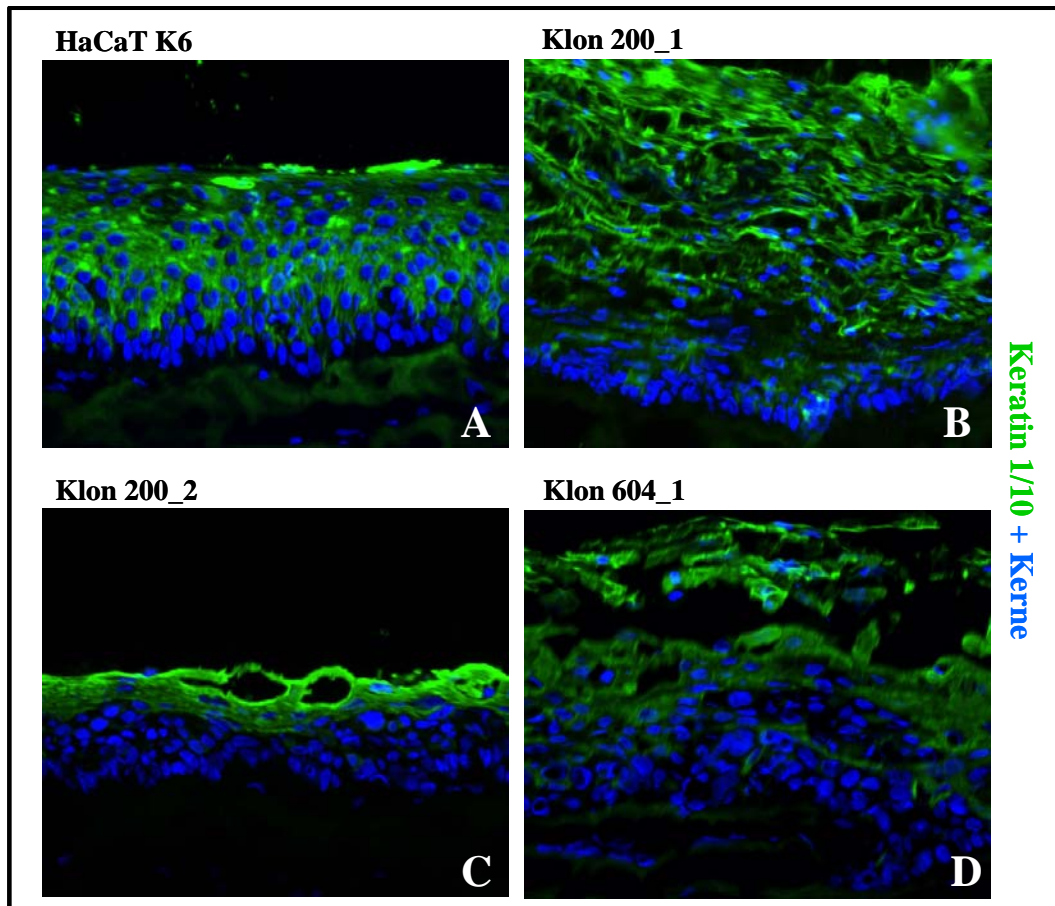


Abbildung 38: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontroll-Zellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Keratin 1/10 (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Des Weiteren wurden folgende späte Differenzierungsmarker getestet:

Protein	Expressionsmuster in der normalen Epidermis
Involucrin	beginnend im <i>Stratum spinosum</i> , wird auch im <i>Stratum granulosum</i> und <i>Stratum corneum</i> exprimiert
Filaggrin	
Loricrin	im <i>Stratum granulosum</i> und im <i>Stratum corneum</i>
Repetin	

Sowohl die OTKs von HaCaT als auch der Klone 200_1 und 604_1 zeigten eine normale Lokalisation für alle untersuchten späten Differenzierungsmarker, demonstriert am Beispiel von Filaggrin (Abb. 39, A, B, D). Dagegen wies Klon 200_2 eine aberrante Verteilung der Differenzierungsmarker auf, die sich im Fall von Filaggrin über alle Schichten erstreckte (Abb. 39, C).

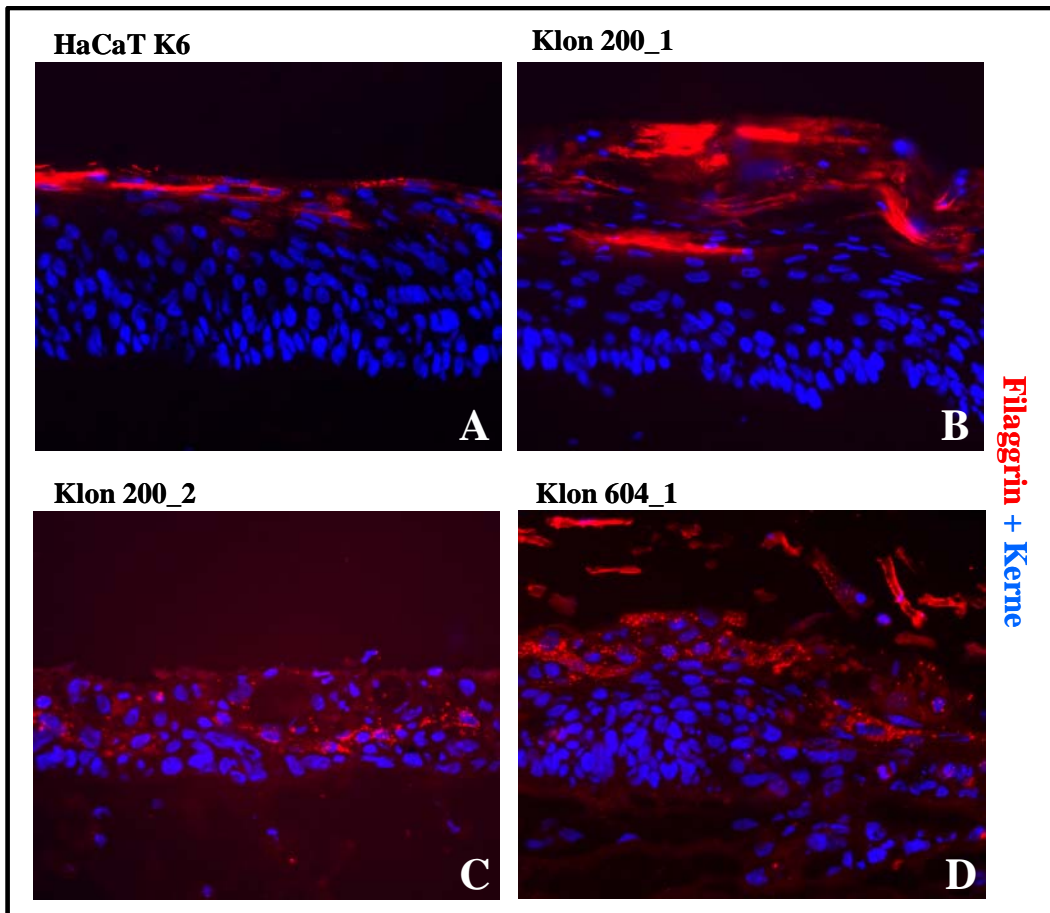


Abbildung 39: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontrollzellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Filaggrin-Färbung (rot) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

4.3.2.3 Basalmembran-Komponenten in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen

Zur Analyse der Basalmembran-Zone in OTKs der Kontrollen und stabil transfizierten Zell-Klone wurden Antikörper gegen Kollagen IV, Laminine, Laminin 5, Perlecan und Nidogen eingesetzt. Diese Proteine sind die Bestandteile der Basalmembran (BM) in der Haut und sind in normaler Epidermis ausschließlich direkt unterhalb der basalen Zell-Schicht lokalisiert.

In den Kokulturen der IR-KD Klone wurde Kollagen IV, eines der wichtigsten Strukturelemente der BM, etwas schwächer und unregelmäßiger exprimiert als in den Kontrollen (Abb. 40).

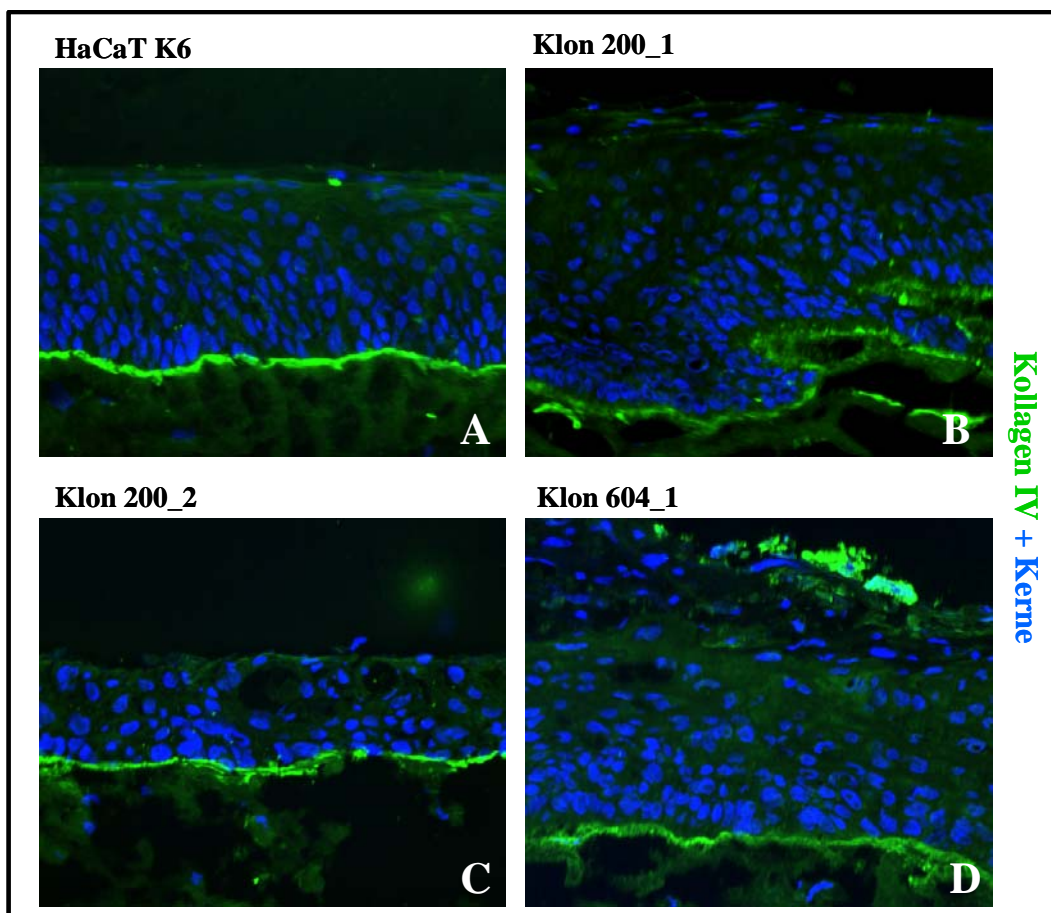


Abbildung 40: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontroll-Zellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Kollagen IV (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Der Antikörper, der für die Detektion der Laminine verwendet wurde (Laminin EHS (Engelbreths Holm Sarcoma)), erkennt alle Laminine in der BM, hauptsächlich Laminin 1 und 10. In den OTKs des Klons 604_1 und 200_2 wurden diese Proteine vergleichbar zu Kontrollen regulär exprimiert und lokalisiert (Abb. 41, A, C, D). Dagegen war die Laminin-Reaktion in den Kokulturen des Klons 200_1 deutlich schwächer und unregelmäßiger als in den Kontrollen (Abb. 41, B). Die schwache Färbung im gesamten Epithel könnte auf eine Störung der Sekretion hinweisen.

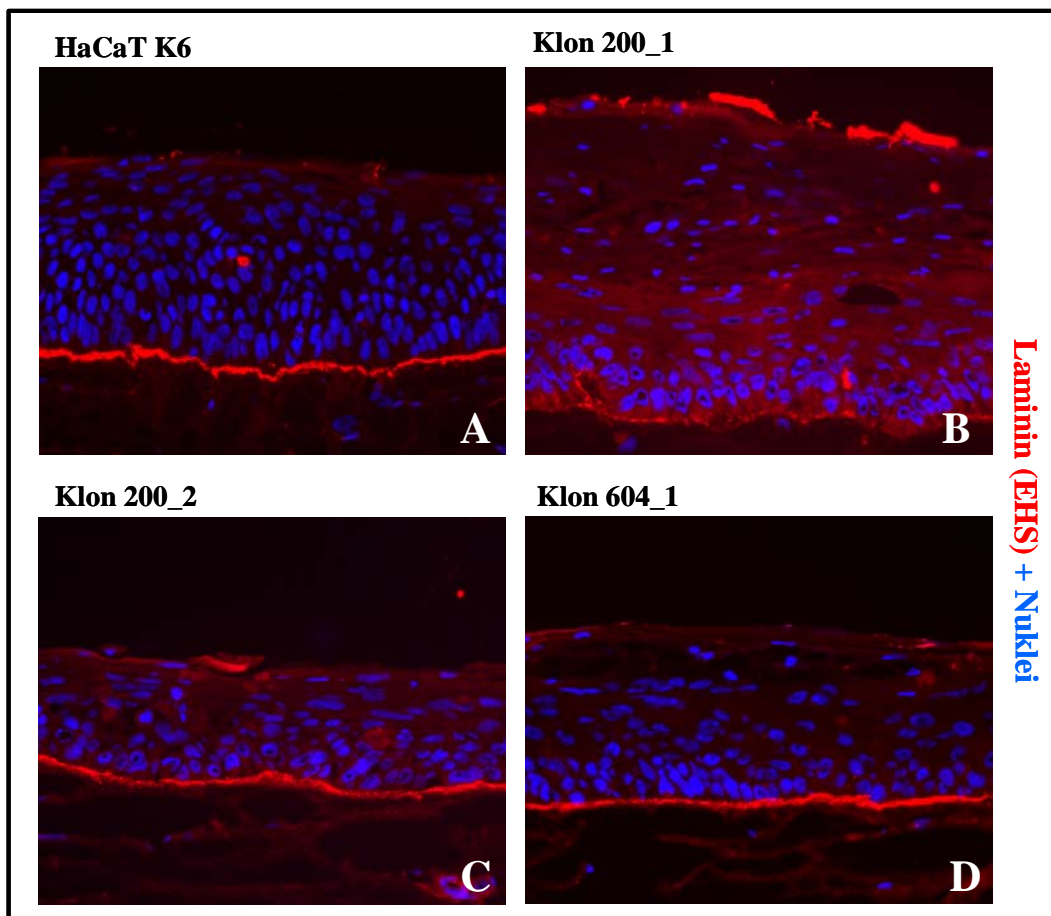


Abbildung 41: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontrollzellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Laminin (rot) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

In den Kokulturen der Zell-Klone wurde Laminin 5, einer der Hauptbestandteile der Verankerungsfilamente, die eine Verknüpfung der Hemidesmosomen zur Basalmembran gewährleisten, deutlich unregelmäßiger exprimiert als in den Kontroll-OTKs. Die positiven Fluoreszenz-Signale in den oberen Schichten des Epithels können auf einen gestörten Transport des Proteins, das normalerweise ausschließlich von Keratinozyten der Basalschicht gebildet wird, in die BM-Zone hindeuten (Abb. 42). Dies deutet vor allem auf einen Verlust der Gewebe-Polarität, die bei Klon 200_2 besonders ausgeprägt ist. Vermutlich behält ein Teil der Zellen in höheren Schichten ihren Basalzellcharakter bei.

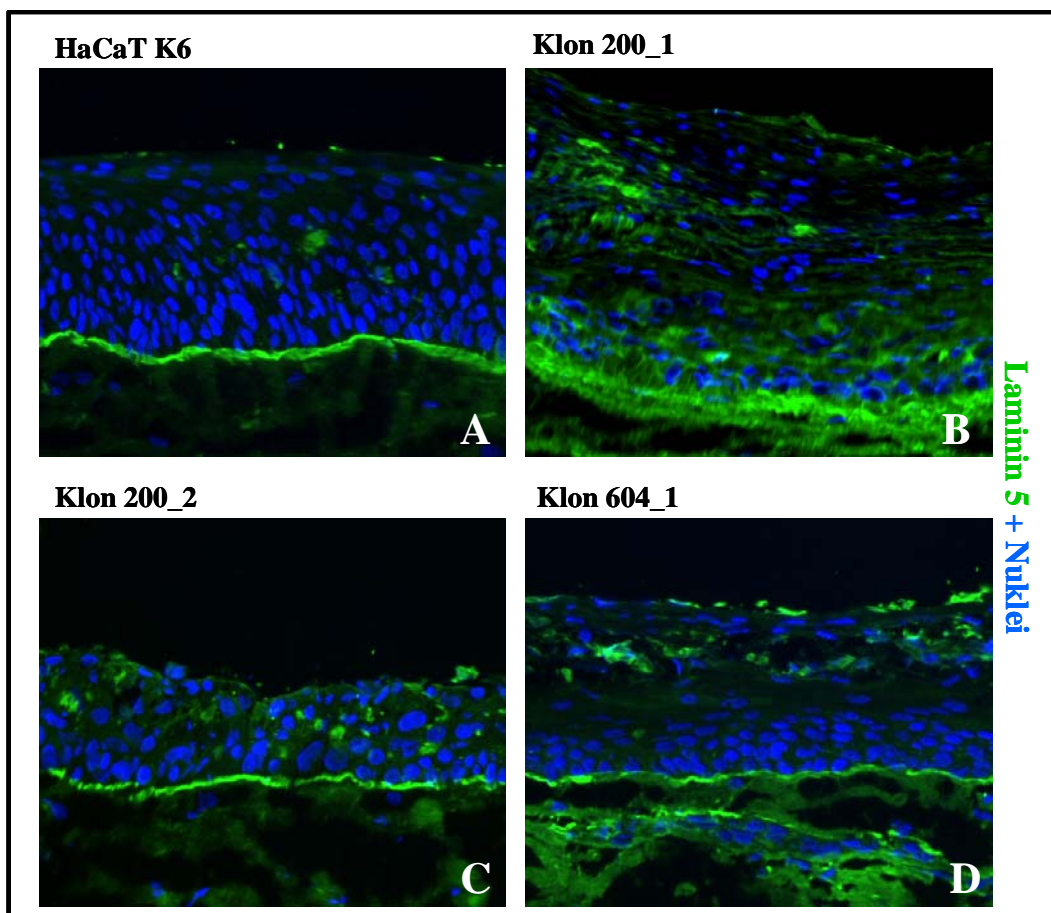


Abbildung 42: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontroll-Zellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Laminin 5 (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Die stärksten Veränderungen im Expressionsmuster in den OTKs der Zell-Klone wurden bei Perlecan beobachtet, dem prominentesten Proteoglykan der BM. Bereits in den Kokulturen des Klons 604_1 war die Perlecan-Färbung deutlich schwächer und unregelmäßiger als in den Kontrollen (Abb. 43, A, D). Diese Abnahme war noch ausgeprägter in den OTKs des Klons 200_2 (Abb. 43, C) und bei Klon 200_1 war schließlich Perlecan kaum nachweisbar (Abb. 43, B).

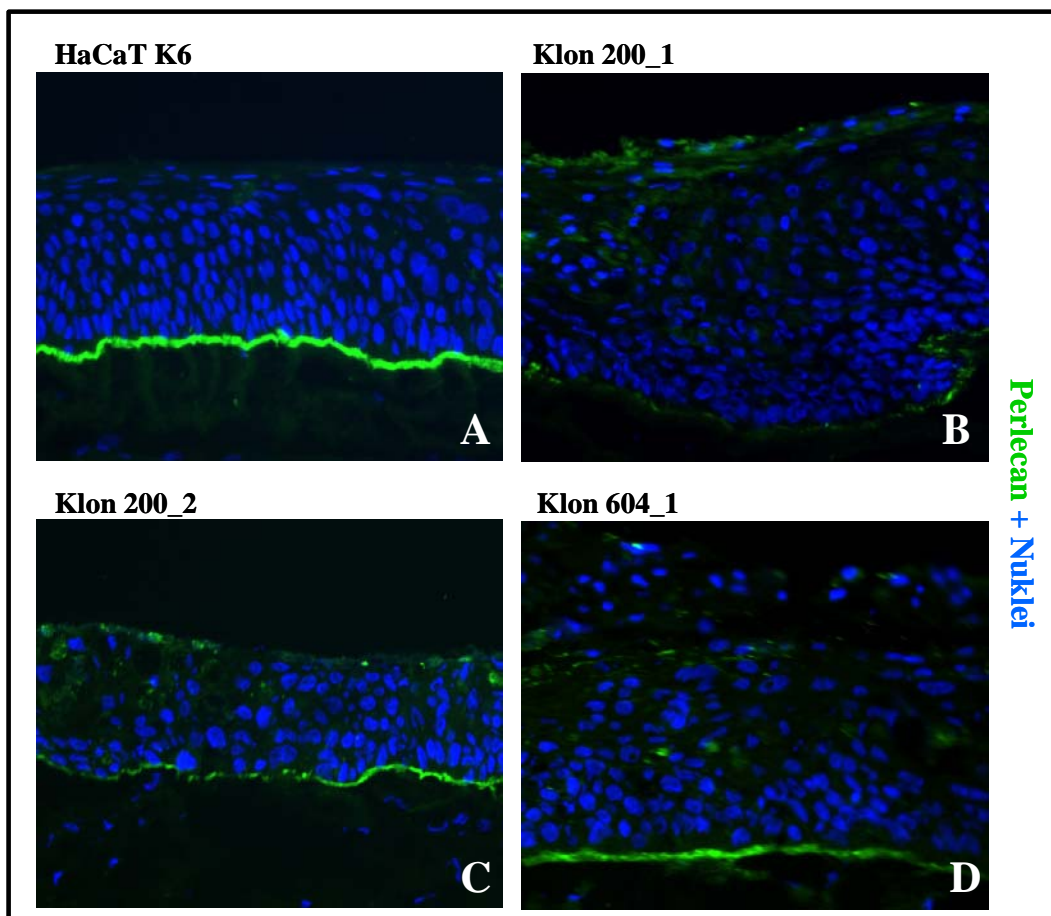


Abbildung 43: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontrollzellen (A) und IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Perlecan (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Die Expression von Nidogen, einem BM-Element, das die Netzwerke des Kollagens IV und der Laminine miteinander verbindet, blieb unverändert bei Klon 200_2, wurde schwächer bei Klon 604_1 und sehr diffus bei Klon 200_1 (Abb. 44). Während Keratinozyten selbst kein Nidogen synthetisieren, kann Nidogen an Basalzell-Rezeptoren binden (spezifische Integrine), was eine ähnliche Verteilung wie Laminin 5 erklären würde.

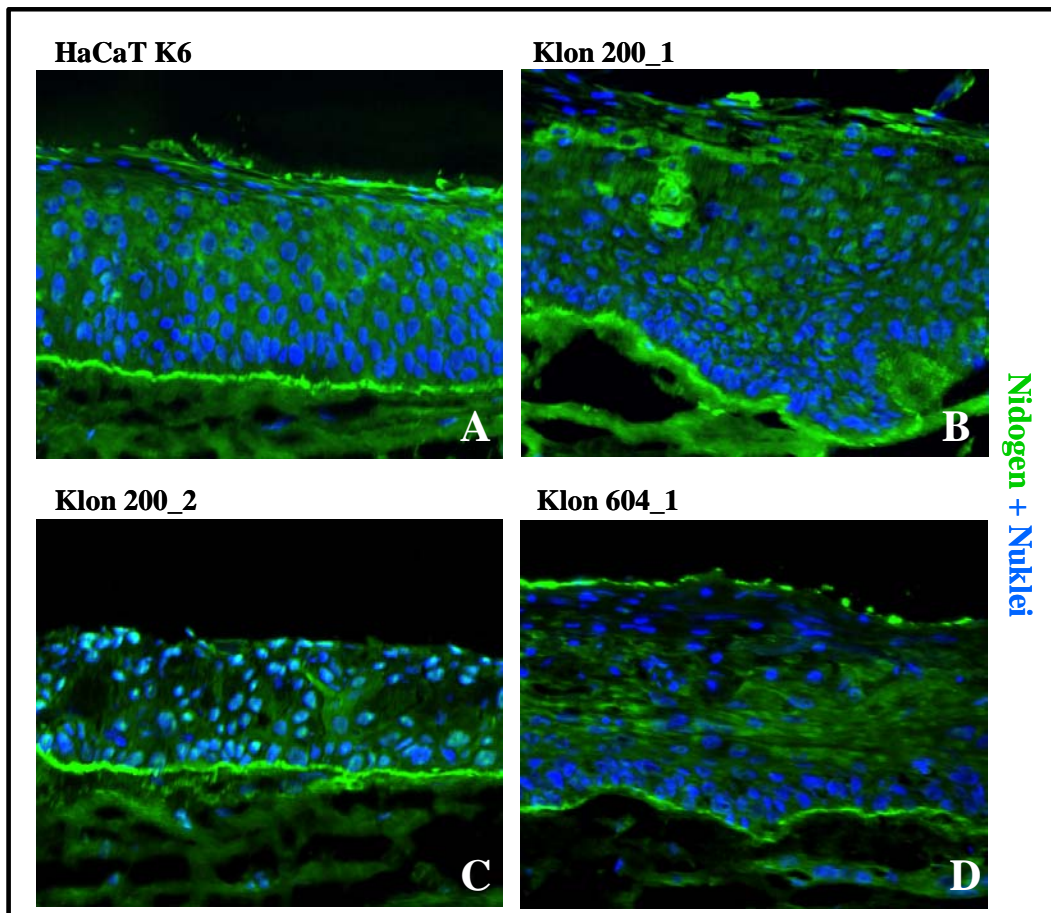


Abbildung 44: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontrollzellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Nidogen (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

4.3.2.4 Komponenten der Hemidesmosomen in OTKs mit Kontroll-Zellen und IR-KD Zell-Klonen

Um die Expression und Lokalisation von hemidesmosomalen Proteinen in OTKs der Kontrollen und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen zu untersuchen wurde IIF-Färbung mit Antikörpern gegen Integrin $\alpha6\beta4$, BP 180, CD 151 und HD 1 durchgeführt. Diese Elemente der Hemidesmosomen werden in der Epidermis am stärksten am basalen Pol der Basalzell-Schicht und viel schwächer apikal-lateral exprimiert (Abb. 45, A).

Das Verteilungsmuster von Integrin $\alpha6\beta4$ (hier gezeigt $\alpha6$), eines zentralen Elements der Hemidesmosomen, zeigte bei allen IR-KD Klonen eine verstärkte perizelluläre Verteilung in den unteren Schichten. Zusätzlich wurde bei Klon 200_2 eine relativ gleichmäßige Verteilung über alle epitheliale Schichten festgestellt (Abb. 45, B, C, D).

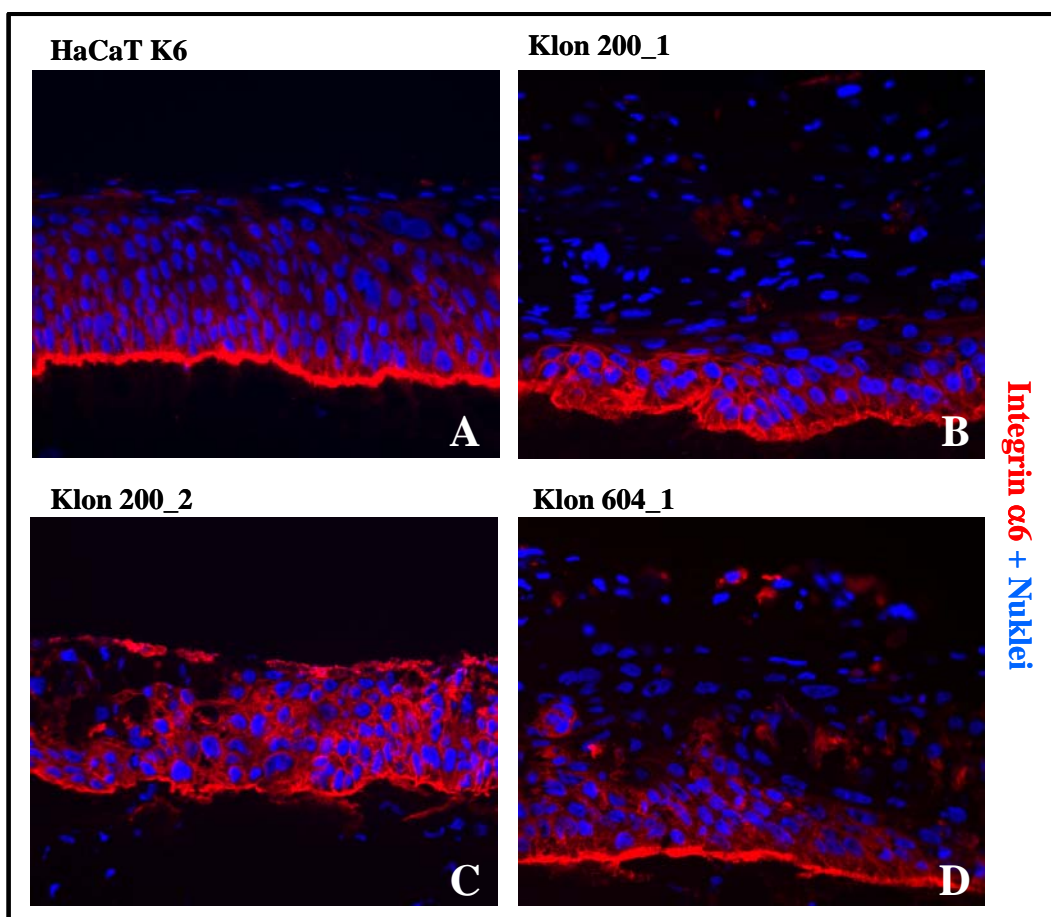


Abbildung 45: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontroll-Zellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf Integrin $\alpha6$ (rot) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Die Verteilung von CD 151, einem Tetraspanin, das in Hemidesmosomen mit Integrin $\alpha 6\beta 4$ assoziiert ist, hat sich in OTKs von Klon 604_1 im Vergleich zu Kontrollen nicht verändert (Abb. 46, A, D). In den Kokulturen des Klons 200_1 war die Zone wieder verbreitert und bei Klon 200_2 war CD 151 wiederum irregulär in allen epithelialen Schichten präsent (Abb. 46, B, C).

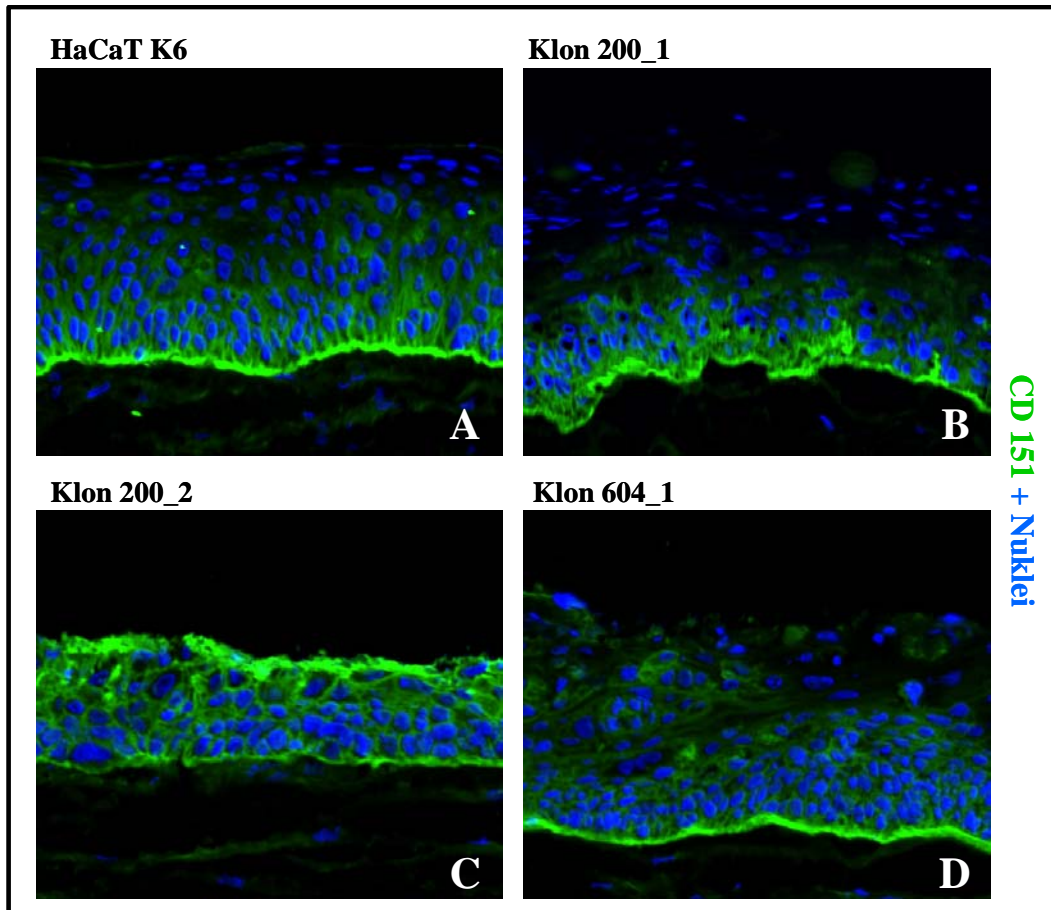


Abbildung 46: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontrollzellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf CD 151 (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Bullous Pemphigoid 180 (BP 180 oder Kollagen XVII), ein weiteres Transmembran-Element der Hemidesmosomen, wurde in den Kokulturen von Klon 200_1 weitgehend regulär und bei Klon 200_2 sowie 604_1 in der Basalmembranzzone leicht reduziert exprimiert (Abb. 47). Bei allen IR-KD Klonen war allerdings die perizelluläre Reaktion deutlich erhöht.

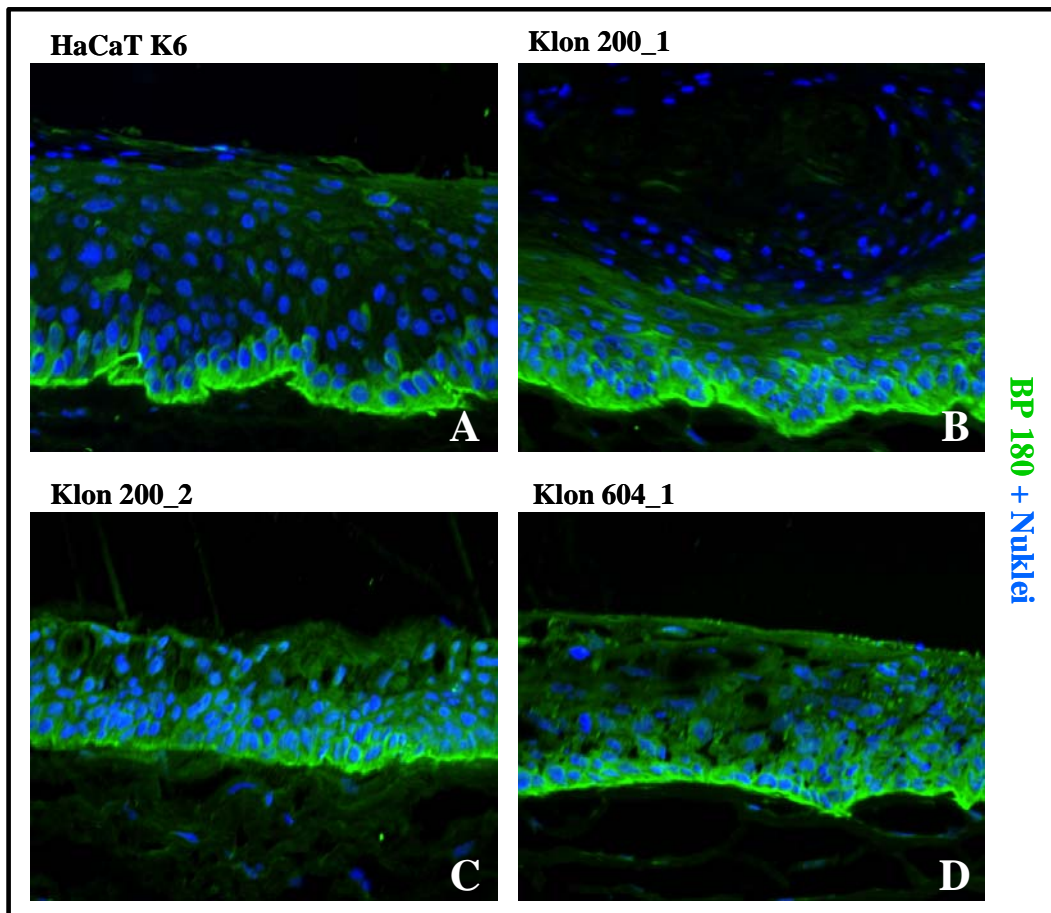


Abbildung 47: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontroll-Zellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf BP 180 (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Plektin (HD 1), in Hemidesmosomen ein Verbindungsglied zwischen Integrin $\alpha6\beta4$ und Keratinfilamenten, wurde in den Kokulturen aller Zell-Klone sehr unterschiedlich exprimiert (Abb. 48). Die Intensität der Signale in der Basalmembranzzone war bei Klon 200_2 vergleichbar zu den Kontrollen, deutlich erhöht bei Klon 200_1 und vermindert bei Klon 604_1 (aber auch um „invasive“ Inseln vorhanden).

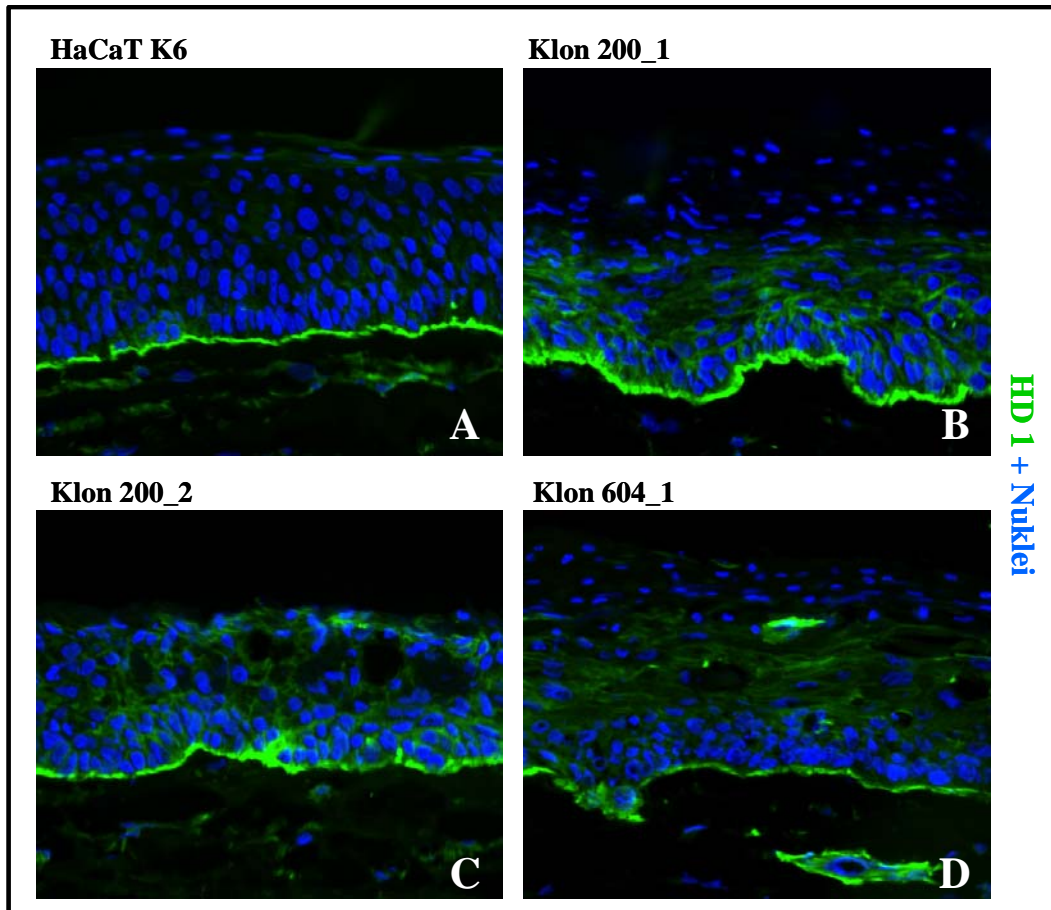


Abbildung 48: Immunfluoreszenz der 3 Wochen alten organotypischen Kokulturen mit Kontrollzellen (A) und mit IR-KD Klonen (B, C, D). Färbung auf HD 1 (grün) und Kerne (blau). 20x Vergrößerung.

Zusammengefasst, zeigen sowohl die Komponenten der Basalmembran als auch der Hemidesmosomen je nach IR-KD Klon eine deutliche Reduzierung der Gewebepolarität. Bei den hemidesmosomalen Proteinen ist zusätzlich, abgesehen von aberranten Verteilungsmustern, die Balance untereinander merklich gestört, was Veränderungen in der Adhäsion und dem Migrationsverhalten bedingen sollte.

4.4 Bildung von Membran-Komplexen bei HaCaT K6 und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen

Wie viele andere Wachstumsrezeptoren bilden IR und IGF-1R Membran-Komplexe mit unterschiedlichen Proteinen und zwar nicht nur mit den Elementen ihrer Signaltransduktionsketten und Adapter-Proteinen, sondern auch mit Adhensionsmolekülen, wie Integrine (Clemmons & Maile, 2005), und Strukturproteinen, wie Caveolin-1 (Saltiel & Pessin, 2003; Cohen et al., 2003). Die Formation solcher Membran-Komplexe in HaCaT-Zellen und stabil transfizierten Zell-Klonen wurde mittels Immunkopräzipitation untersucht.

4.4.1 Immunkopräzipitation mit IR

Um die Dynamik der Interaktionen zwischen IR und anderen Proteinen zu analysieren wurden Immunkopräzipitations-Experimente mit Insulin-Stimulation durchgeführt. Dafür wurden nahezu konfluente, Monolayer-Kulturen von HaCaT-Zellen direkt vor der Lyse für 15 und 30 Minuten mit Insulin (8,41 mM) stimuliert. Als Kontrolle (0-Wert) wurden die Zellen ohne Stimulation verwendet. Die Zellen wurden abgelöst, in IP-Puffer lysiert und Proteinmengen von 200 – 400 µg für die Immunkopräzipitation eingesetzt. Für die Präzipitation der Protein-Komplexe aus dem Zell-Lysat wurden primäre Antikörper gegen IR verwendet. Die präzipitierten Protein-Komplexe wurden eluiert, mittels SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Einzelkomponenten mittels Western Blot detektiert. Um festzustellen, ob vergleichbare Menge von IR präzipitiert wurde, fand nachfolgend eine Inkubation der Membranen mit dem Antikörper gegen IR statt (siehe 3.5). Die Präzipitate wurden auf folgende Proteine untersucht:

IRS-1
PKC δ
PKC α
PKC ζ
Integrin α 2
Integrin α 3
Integrin α 6
Integrin α v
Integrin β 1
Integrin β 4
Integrin β 5
Caveolin-1
Tetraspanin CD 151

Die Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, αv , $\beta 1$ und $\beta 5$ sowie $PKC\zeta$ konnten in den Präzipitaten nicht detektiert werden. Die Detektion von CD 151 ergab nur ein sehr schwaches Signal.

IRS-1, eines der wichtigsten Adapter-Moleküle bei der Insulin-Signaltransduktion, wurde wie erwartet erst nach der Applikation des Insulins zu IR rekrutiert und die Zahl der gebildeten Komplexe stieg dabei mit Dauer der Behandlung.

$PKC\delta$ interagiert mit IR bereits ohne Einwirkung des Insulins. Die Behandlung mit Insulin bewirkte einen deutlichen Anstieg der Komplexbildung, die sich mit steigender Behandlungsdauer weiter erhöhte. Im Gegensatz dazu wurde $PKC\alpha$ am stärksten ohne Insulin zum IR rekrutiert. Die Applikation des Hormons führte zur partiellen Auflösung der vorhandenen Komplexe, die mit der Behandlungszeit weiter fortschritt (Abb. 49).

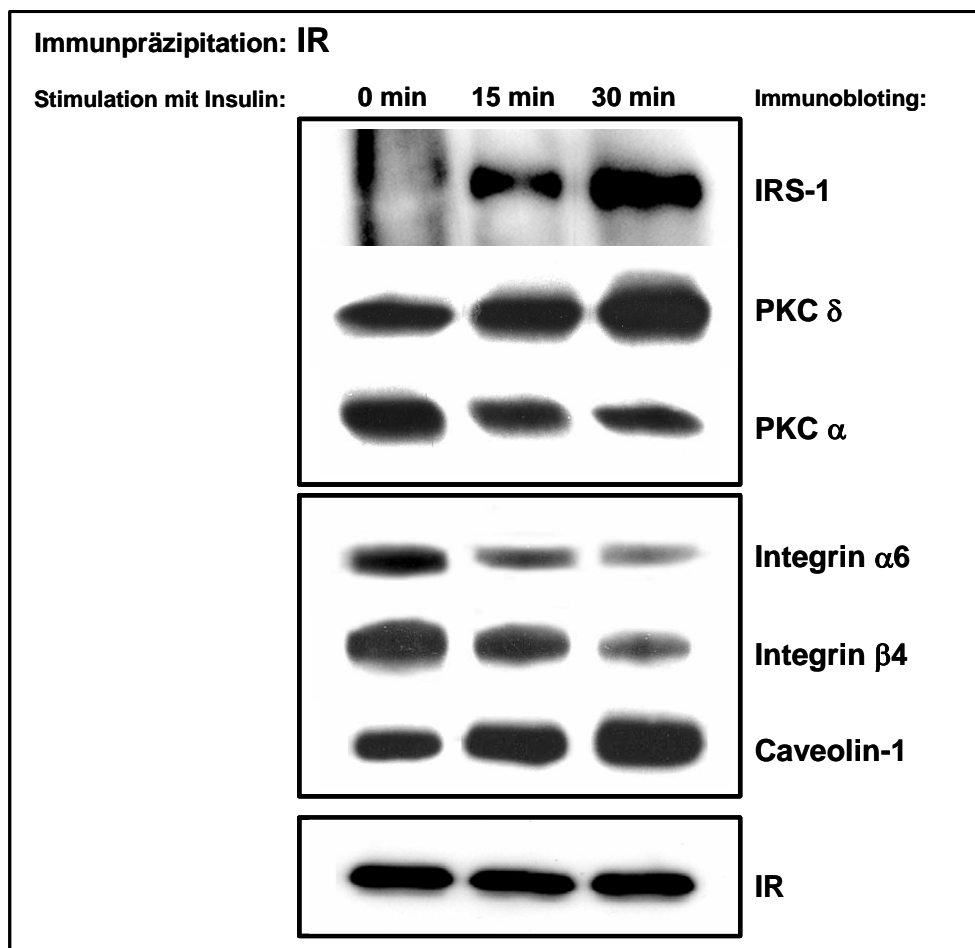


Abbildung 49: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IR und anderen Proteinen in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen.

Von allen getesteten Integrinen präzipitierten nur $\alpha 6$ und $\beta 4$ mit IR. Dabei wurden die meisten Komplexe ohne Einwirkung von Insulin gebildet. Die Applikation des Insulins führte zu einer Dissoziation, die nach 30 min Behandlung besonders ausgeprägt war (Abb. 49).

Caveolin-1 interagiert mit dem IR auch ohne Einwirkung von Insulin. Die Applikation des Hormons führte zu einer deutlichen Zunahme der Zahl der Komplexe mit einem Maximum nach 30 min Behandlung (Abb. 49).

4.4.2 Immunkopräzipitation mit Phosphotyrosinen

Um festzustellen, in wieweit Insulin nicht nur die Komplex-Formation, sondern auch die Aktivierung der entsprechenden Proteine beeinflusst, wurde nach Immunkopräzipitation mit einem entsprechenden Antikörper der Gehalt an Phosphotyrosin analysiert. Veränderungen im Phosphotyrosin-Gehalt wurden in folgenden Proteinen untersucht:

IR
PKC δ
PKC α
Integrin α 6
Integrin β 4
Caveolin-1

In den Kopräzipitaten von PKC α , Integrinen α 6 und β 4 konnte keine Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Wie erwartet zeigte IR ohne Insulin-Stimulation nur sehr wenig Tyrosin-Phosphorylierung. Die Applikation des Insulins führte zu einem drastischen Anstieg der Phosphorylierung mit einem Maximum nach 30 min Behandlung. PKC δ und Caveolin-1 waren dagegen bereits ohne Insulin Einwirkung deutlich an den Tyrosin-Resten phosphoryliert. Die Behandlung mit Insulin führte bei beiden Proteinen zu einer Erhöhung der Phosphorylierung (Abb. 50).

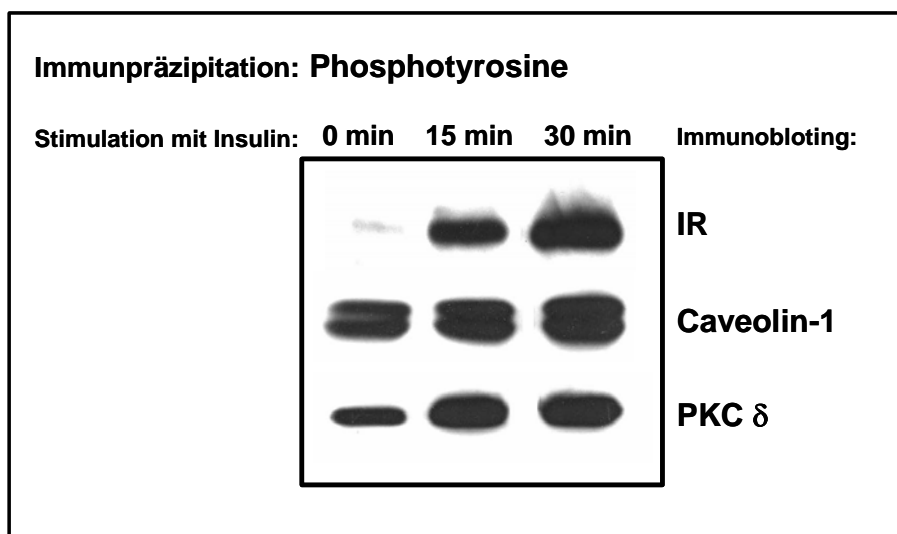


Abbildung 50: Dynamik der Tyrosin-Phosphorylierung in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen.

4.4.3 Immunkopräzipitation mit IGF-1R

In den stabil transfizierten Zell-Klonen waren die IR-Level erwartungsgemäß so niedrig, dass keine Präzipitation mit IR-Antikörper möglich war. Stattdessen wurde der Einfluss von IR-Suppression auf die Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und anderen Proteinen bei stabil transfizierten Zell-Klonen untersucht. Lysate folgender Zell-Varianten wurden für die Immunkopräzipitation mit dem Antikörper gegen IGF-1R verwendet:

- HaCaT-Kontroll-Zellen
- IR_scr
- Klon 604_1
- Klon 200_2

Die Präzipitate wurden auf folgende Proteine untersucht:

PKC δ
PKC α
Integrin β 4
Caveolin-1

4.4.3.1 Komplex-Bildung mit PKC α und PKC δ

Die Interaktionen zwischen PKC α und IGF-1R konnten weder in Kontroll-Zellen noch bei den Zell-Klonen nachgewiesen werden.

Dagegen bildete PKC δ in allen getesteten Zell-Varianten Komplexe mit IGF-1R. Sowohl in Kontroll-Zellen als auch in den Zell-Klonen interagierte PKC δ mit IGF-1R auch ohne Behandlung mit Insulin. Insulin bewirkte bei allen Zell-Varianten nur einen leichten Anstieg in der Komplex-Bildung. Am stärksten war die Zunahme bei Klon 200_2 nach 30 min Behandlung (Abb. 51).

Zur Überprüfung der präzipitierten und geladenen Proteinmenge wurden die Western Blot Membrane routinemäßig mit dem Antikörper gegen IGF-1R inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen Experimenten vergleichsweise ähnliche Proteinmengen präzipitiert wurden, wobei allerdings bei Klon 200_2 generell viel weniger IGF-1R isoliert werden konnte (Abb. 51).

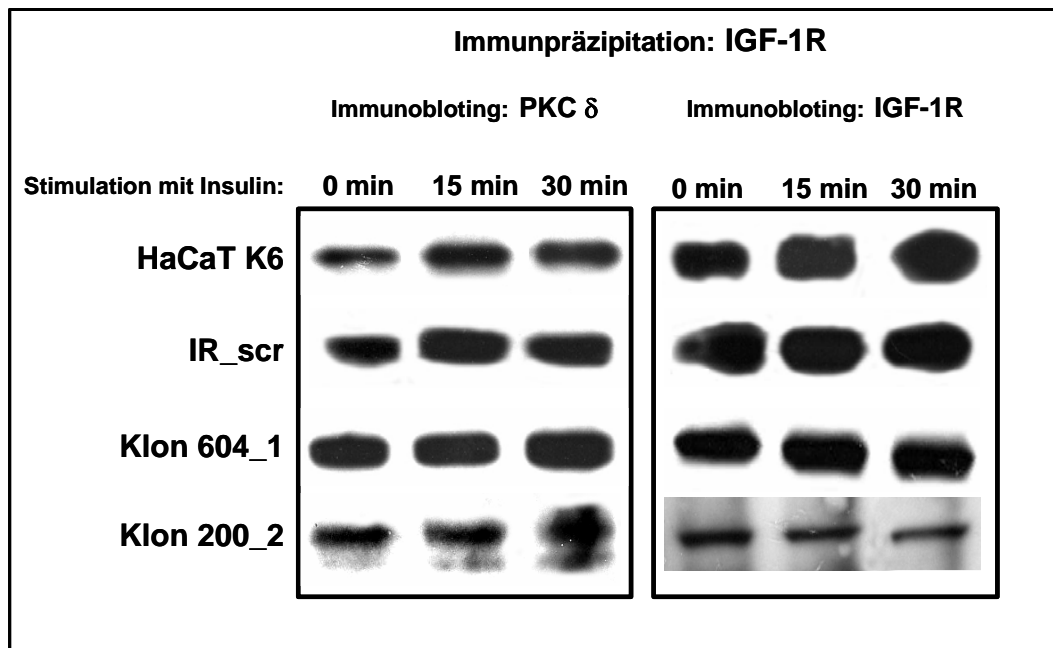


Abbildung 51: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und PKC δ in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und stabil transfizierten Zell-Klonen.

4.4.3.2 Komplex-Bildung mit Caveolin-1

In den Kontroll-Zellen HaCaT und IR_scr interagierte Caveolin-1 mit IGF-1R auch ohne Einwirkung von Insulin. Insulin führte bei beiden Zell-Varianten zu einer deutlichen Erhöhung der Komplex-Bildung nach 15 min Behandlung, wogegen nach 30 min die Zahl der Komplexe wieder reduziert wurde.

Beim Klon 604_1 konnten ohne Insulin Behandlung nur wenige Caveolin-1/IGF-1R Komplexe detektiert werden. Die Applikation des Insulins führte zu einem deutlichen Anstieg der Komplex-Bildung.

Bei Klon 200_2 interagierten Caveolin-1 und IGF-1R auch ohne Insulin, das in diesem Fall keinen Einfluss auf die Komplex-Bildung hatte.

Wenn man die Menge an präzipitierten Caveolin-1/IGF-1R Komplexen mit der präzipitierten Menge des IGF-1R vergleicht, ist festzustellen, dass im Präzipitat des Klons 604_1 erheblich weniger Caveolin-1 und IGF-1R gebunden war, trotz vergleichbarer Ausbeute an IGF-1R in den Kontroll-Zellen. Im Fall von Klon 200_2 entsprach das Verhältnis Caveolin-1/IGF-1R den Kontrollen, nur war die Menge insgesamt drastisch erniedrigt (Abb. 52).

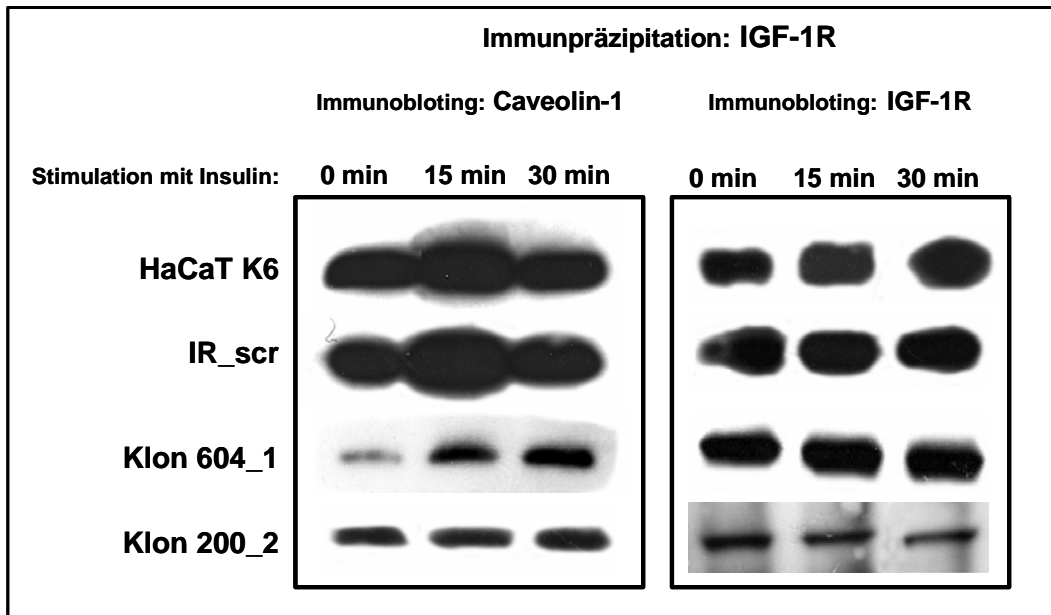


Abbildung 52: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und Caveolin-1 in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und stabil transfizierten Zell-Klonen.

4.4.3.3 Komplex-Bildung mit Integrin $\alpha 6\beta 4$

Sowohl bei HaCaT und IR_scr Zellen als auch bei Klon 200_2 bildete IGF-1R Komplexe mit der Integrin $\beta 4$ -Kette und zwar unabhängig von Insulin-Applikation.

Dagegen stieg bei Klon 604_1 die Zahl der Komplexe deutlich nach 15 min und weiter nach 30 min Insulin-Behandlung an. Generell waren die Reaktionen mit der Integrin $\alpha 6$ -Kette vergleichbar, so dass von Komplexen mit $\alpha 6\beta 4$ ausgegangen werden kann (Abb. 53).

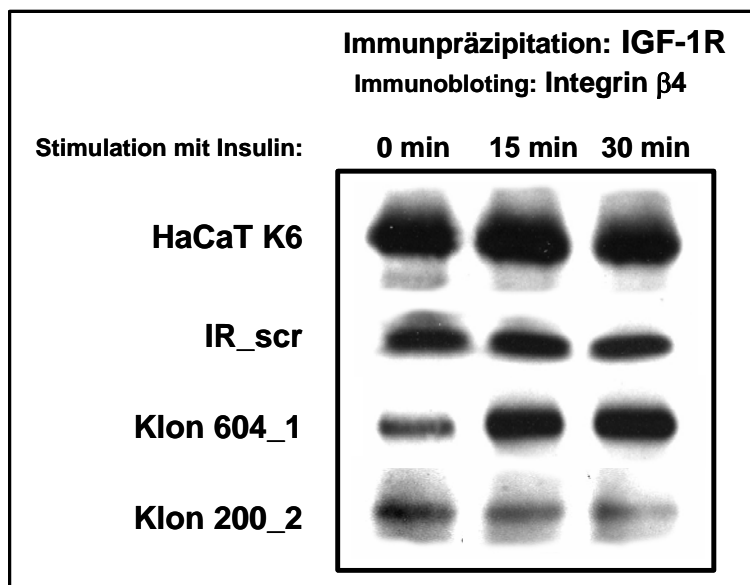


Abbildung 53: Dynamik der Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und Integrin $\beta 4$ -Kette in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen und stabil transfizierten Zell-Klonen.

4.5 Dynamik von Membran-Komplexen bei HaCaT K6 und stabil transfizierten IR-KD Zell-Klonen

Bei der Signaltransduktion von IR und IGF-1R spielt die Kompartimentalisierung der Rezeptormoleküle eine große Rolle. Spezifität der Signalwege wird durch Segregation der Rezeptoren in spezifische Membrandomänen gewährleistet, zu denen auch „Lipid Rafts“ gehören, die eine modifizierte Lipid-Zusammensetzung aufweisen (z.B. erhöhter Anteil an Cholesterin, Glycolipiden, Sphingolipiden, sowie verschiedene Signal-Moleküle) (Balbis et al., 2000; Balbis et al., 2004).

Um den Einfluss von Insulin auf die Dynamik der „Lipid Rafts“ in Kontroll-Zellen und in IR-KD Zell-Klonen zu untersuchen, wurden diese Membran-Domänen aus Zell-Lysaten mit Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dafür wurden die konfluenten Zell-Kulturen direkt vor der Lyse für 30 Minuten mit Insulin (8,41 nM) stimuliert. Als Kontrolle dienten Kulturen ohne Insulin-Stimulation. Die Zellen wurden in Lyse-Puffer abgelöst, homogenisiert und in einem diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine in den gesammelten 12 Fraktionen mit SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert (siehe 3.6.2).

Als Marker für „Lipid Rafts“ diente Caveolin-1, ein Hauptbestandteil der Caveolae, die kleine Invaginationen in der Plasmamembran darstellen und als Unterstrukturen von „Lipid Rafts“ definiert sind.

Die Analyse der Fraktionen in den Kontroll-Zellen zeigte, dass ohne Insulin-Behandlung der überwiegende Teil von Caveolin-1 in „Lipid Rafts“ (Fraktion 5) enthalten war. Insulin bewirkte die Verlagerung der Hauptmenge des Caveolins-1 in Fraktionen höherer Dichte (Fraktionen 6, 7 und 8) (Abb. 54).

Ohne Insulin befand sich IR zum größten Teil in „Lipid Rafts“-Fraktionen (5 und 6, niedrige Dichte), konnte aber auch in den Fraktionen mit höherer Dichte detektiert werden (9, 10 und 11). Die Applikation von Insulin bewirkte folgende Veränderungen in der IR-Lokalisation: Erstens, verlagert sich der größte Teil des Proteins (Caveolin und IR) aus Fraktion 5 in die dichtere Fraktion 6; zweitens, konnte IR in den Fraktionen hoher Dichte (9, 10 und 11; caveolin-frei) nicht mehr nachgewiesen werden und wurde vermutlich in die leichteren Fraktionen verlagert (Abb. 54).

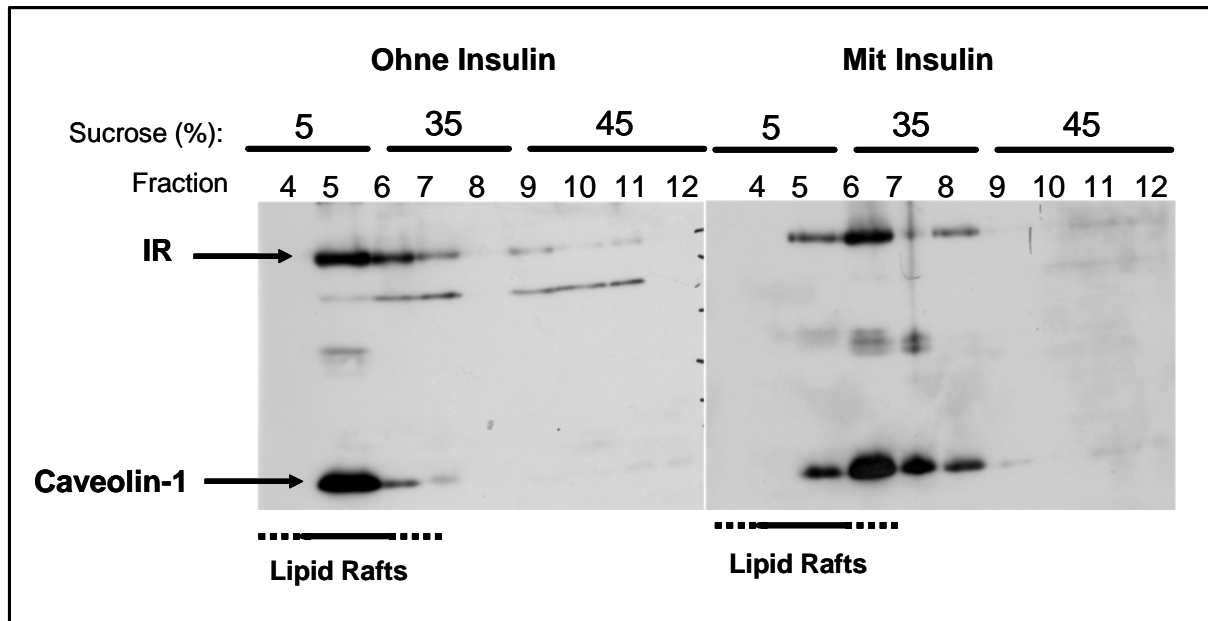


Abbildung 54: Verlagerung des IR in unterschiedliche Membran-Domänen in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen.

Die Analyse der Caveolin-1-Lokalisation in den IR-supprimierten Zell-Klonen zeigte ein völlig anderes Verlagerungsmuster als bei den Kontrollen.

Ohne Insulin-Behandlung befand sich Caveolin-1 in den Kontroll-Zellen fast ausschließlich in den leichten „Lipid Rafts“-Fraktionen (Fraktionen 5 und 6). Im Gegensatz dazu konnte Caveolin-1 bei den IR-supprimierten Zell-Klonen auch in den dichteren Fraktionen (Fraktionen 5-11) nachgewiesen werden (Abb. 55).

Die Insulin-Stimulation in den Kontrollen bewirkte die Verlagerung des Caveolins-1 in die Bereiche mit höherer Dichte. In Gegensatz dazu bewirkte Insulin in den IR-supprimierten Zellen eine Verlagerung des Caveolins-1 sowohl in die leichteste „Lipid Raft“-Fraktion als auch in die Fraktionen mit sehr hohe Dichte (Fraktionen 11 und 12) (Abb. 55). Diese aberrante Dynamik der Caveolin-1-Verlagerung deutet auf eine Störung in der Struktur der „Lipid Rafts“ in IR-KD Zellen.

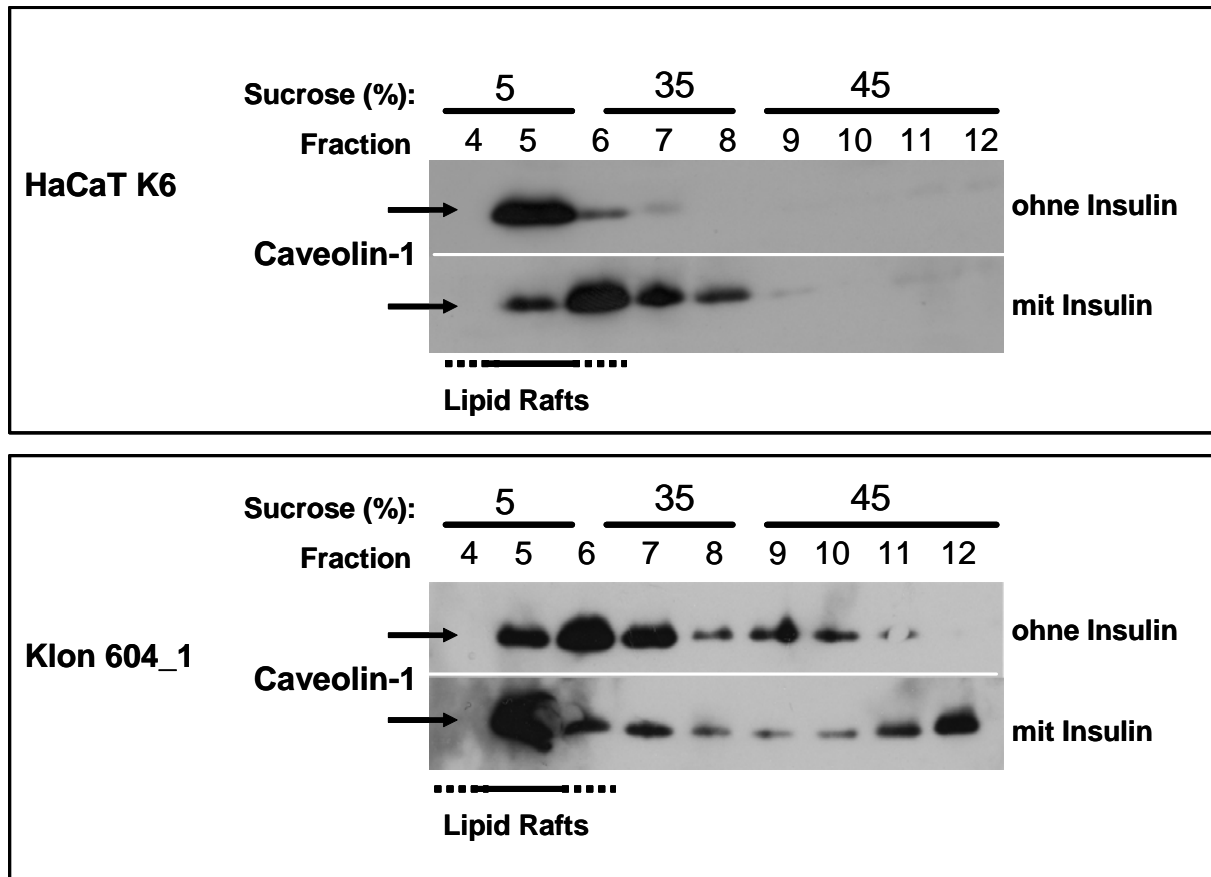


Abbildung 55: Verlagerung von Caveolin-1 in unterschiedliche Membran-Domänen in Abhängigkeit von Insulin-Behandlung bei HaCaT-Zellen (oben) und dem IR-supprimierten Klon 604_1 (unten).

5 Diskussion

5.1 Suppression von Proteinen mittels siRNA-Methode

Die Gen-Funktion in Säugertier-Zellen kann mit mehreren traditionellen Methoden erforscht werden, u.a. mittels Applikation von Transgenen, homologer Rekombination, molekularer Charakterisierung von menschlichen Erbkrankheiten, sowie Herunterregulation von Genen mit Ribozyme- oder Antisense-Techniken (Elbashir et al., 2002; Agrawal et al., 2003). Allerdings haben all diese Methoden ihre Vor- und Nachteile und können somit nicht universell eingesetzt werden. Eine neuere Alternative für die Gen-Funktionsanalyse bietet das erst seit wenigen Jahren bekannte Phänomen der RNA-Interference (RNAi) und die darauf basierende siRNA-Technologie (small interfering RNA). RNAi stellt eine sequenz-spezifische post-transkriptionelle Gen-Suppression dar, bei der doppelsträngige dsRNA-Moleküle (double-strand RNA) als Signal für die Degradation homologer mRNA dienen (Sharp, 2001; Hannon, 2002; Persengiev et al., 2004).

Der Einsatz von dsRNA für die Initiierung von RNAi hat sich als ein universelles Werkzeug für die funktionellen genomischen Analysen in Organismen wie *C. elegans* und *Drosophila* schnell etabliert. Sogar ein „Screening“ ganzer Chromosomen von *C. elegans* wurde mittels dsRNA durchgeführt (Fraser et al., 2000). Dagegen führte die Applikation langer dsRNA-Moleküle in Säugertier-Zellen zu einer nicht-spezifischen Suppression der Gen-Expression, die auf eine Induktion der Interferon-Synthese und nachfolgender Aktivierung verschiedener interferon-abhängiger Enzyme zurückzuführen ist (Stark et al., 1998; Holen et al., 2002). Die bahnbrechenden Studien von Elbashir (2002) demonstrierten aber, dass kurz-kettige dsRNAs mit weniger als 30 Nukleotiden, die als siRNA bezeichnet werden, keine Interferon-Antwort verursachen und somit erfolgreich für die gezielte Suppression von Genen benutzt werden können.

In dieser Arbeit wurde IR- und IGF-1R-Expression in HaCaT-Zellen mittels der siRNA-Technik herunterreguliert. Für die transienten Transfektionsexperimente wurden synthetische siRNAs, bestehend aus zwei komplementären Strängen mit den UU-Dinukleotid-Überhängen, verwendet (siehe 3.2.2). Allerdings zeigten verschiedene siRNA Sequenzen (je 10 Sequenzen für jedes Gen) eine große Divergenz in ihrer Effizienz. Einige Sequenzen hatten gar keinen oder nur einen moderaten Einfluss auf die Protein-Expression, andere dagegen zeigten einen sehr starken „Knock-Down“-Effekt. So wurde bei den ausgewählten Sequenzen, die in dieser Arbeit für alle weiteren Experimente benutzt wurden, eine Suppressions-Effizienz von 95 % erreicht. Solche Unterschiede in der Effizienz von siRNA-Sequenzen wurden auch in anderen Studien festgestellt (Elbashir et al., 2002) und können durch mehrere Faktoren verursacht

werden. So muss beispielsweise berücksichtigt werden, dass die von siRNAs initiierte Degradation der Ziel-mRNA hochgradig sequenz-spezifisch ist. Besonders kritisch sind dabei die Nukleotide auf den zentralen Positionen im siRNA-Duplex (Elbashir et al., 2001; Hamada et al., 2002). Diese Abhängigkeit des Degradations-Prozesses von der siRNA-Sequenz wird allerdings durch die Diversität der genomischen Sequenzen stark beeinflusst. Polymorphismen einzelner Nukleotide (SNP, single nucleotide polymorphismus) treten im menschlichen Genom alle 300-500 Basen-Paare auf und haben somit einen großen Einfluss auf die Effizienz der siRNA-Sequenzen (Cargill et al., 1999; Nelson et al., 2004; Huppi et al., 2005).

Ein anderer wichtiger Faktor, der die Effektivität der mRNA-Degradation beeinflusst, ist die Bildung des siRNA/RISC-Komplexes (RISC, RNA induced silencing complex) (siehe 3.2). Biochemische und funktionelle Studien haben gezeigt, dass die beiden Stränge eines siRNA-Moleküls eine unterschiedliche Affinität zum RISC-Komplex haben. Abhängig davon welcher Strang in den RISC-Komplex inkorporiert wird, verändert sich die Effizienz von siRNAs (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

So könnten alle oben genannten Faktoren auch in den Experimenten dieser Arbeit für die unterschiedliche Suppressions-Effizienz bei der Applikation verschiedener siRNAs verantwortlich sein.

Die Transfektionsexperimente mit ausgewählten siRNA-Sequenzen, die für alle weiteren Experimente in dieser Arbeit benutzt wurden, zeigten im Verlauf der transienten Suppression den stärksten Effekt nach 72 h. Dagegen hatten andere Autoren (Holen et al., 2003; Devling et al., 2005), die in HaCaT-Zellen humanen „Tissue Factor“ (TF) und Protein Keap1 mittels siRNA supprimierten, eine maximale Suppression bereits nach 24 h Behandlung beobachtet. Andererseits konnte in anderen Zell-Linien, wie HeLa-Zellen, 3T3 Maus-Zellen und Ratten-Fibroblasten, der „Knock-Down“-Phänotyp im Zeitraum von 1-3 Tagen nach der Transfektion detektiert werden (Harborth et al., 2001; Elbashir et al., 2002; Vickers et al., 2003). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der Zeitverlauf der Suppression sowohl von der Effizienz der siRNA-Sequenzen als auch von der Konzentration und dem Umsatz des Ziel-Proteins abhängt. Auch die kinetische Balance zwischen der siRNA-induzierten mRNA-Degradation einerseits, sowie Transkription und mRNA-„Processing“ andererseits, spielt dabei eine große Rolle (Holen et al., 2003). All diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der Verlauf der siRNA-induzierten Suppression von mehreren Faktoren abhängt und für jedes ausgewählte Protein individuell ermittelt werden muss.

Auch die Konzentration der siRNA bei den Transfektionsexperimenten erwies sich als ein kritischer Faktor. In einigen Studien wurde festgestellt, dass ebenso die kurzen siRNA-Moleküle, die eigentlich eine Interferon-Antwort vermeiden sollten, potentiell mit anderen dsRNA-bindenden Proteinen interagieren, was zu unspezifischer Suppression führen kann (Persengiev et al., 2004; Rao & Sockanathan, 2005). Deswegen ist es besonders wichtig die siRNA Konzentration so niedrig wie möglich zu halten. Im Einklang mit den Berichten anderer Forschergruppen betrug die optimale siRNA-Konzentration bei meinen Experimenten 100 nM.

Eine ernsthafte Einschränkung beim Einsatz von siRNA-Molekülen für die gezielte Gen-Suppression stellt allerdings die Transienz des inhibierenden Effekts dar, der maximal 3-5 Tage anhält. Um Langzeit-Effekte dieser Suppression zu untersuchen, wurden daher spezielle Vektoren für die Expression von shRNA (short hairpin RNA) benutzt (siehe 3.2.4). In ihrem Mechanismus und ihrer Effizienz sind shRNA von siRNA nicht zu unterscheiden. Sie werden daher erfolgreich für die Generation stabiler Zell-Linien und transgener Tieren für die gezielte Suppression individueller Genen benutzt (Hannon & Conklin, 2004; Rao & Sockanathan, 2005). Auch in dieser Arbeit wurden mit dieser Methode die stabilen IR-„Knock-Down“ (IR-KD) Zell-Klone generiert, die eine Suppression von 50-70 % aufwiesen.

5.2 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf das Verhalten von HaCaT-Zellen in zweidimensionalen (2D) Kulturen

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Suppression von IR oder IGF-1R auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung der HaCaT-Zellen in der konventionellen zweidimensionalen (2D) Kultur ausübt.

5.2.1 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf die Proliferation von HaCaT-Zellen

Die Analyse der Proliferation bei den unbehandelten HaCaT-Zellen zeigte eine stetige Zell-Zunahme innerhalb der untersuchten Zeitperiode (3 Tage) und zwar nicht nur bei der Kultivierung in serum-haltigem (DMEM) sondern auch in serum-freiem KGM2-Medium ohne Insulin-Zusatz. Offensichtlich reichte das in KGM-Medium vorhandene EGF (epidermal growth factor), das eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Keratinozyten spielt (Tsuboi et al., 1992; Bhora et al., 1995), für die anhaltende Proliferation der HaCaT-Zellen aus.

Die Ergebnisse der Proliferationsanalyse bei den transient supprimierten HaCaT-Zellen belegten die äußerst wichtige Rolle von IR und IGF-1R bei der Regulation proliferativer

Prozesse in 2D-Kulturen. So zeigten die Befunde dieser Arbeit, dass die transiente Suppression von IGF-1R in HaCaT-Zellen eine drastische Reduktion der Proliferation bewirkt. Diese Daten bekräftigen die etablierte Rolle von IGF-1R als einen der wichtigsten Regulatoren der Zell-Proliferation (Adams et al., 2000; Le Roith, 2000). Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass die transiente Suppression von IR in HaCaT-Zellen ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der Proliferation führt, die durch den intakten IGF-1R nicht kompensiert werden kann. Auch bei den stabilen IR-„Knock-Down“ (IR-KD) Zellen konnte diese ausgeprägte Proliferations-Blockade eindeutig festgestellt werden. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass in HaCaT-Zellen nicht nur IGF-1R sondern auch IR als positiver Regulator der Proliferation fungiert. Auch in anderen Zell-Linien, wie murinen Keratinozyten, 3T3-L1 Präadipozyten und C2 Muskelzellen, konnte die wichtige Rolle des IR bei der Regulation der Proliferation nachgewiesen werden (Pinset et al., 1988; Sorisky, 1999; Wertheimer et al., 2001).

In einem weiteren Versuch sollte der Einfluss von Insulin und IGF-1 auf proliferative Prozesse bei normalen und stabilen IR-KD Zellen untersucht werden. Um definierte Stimulationsbedingungen zu gewährleisten, sollte die Wirkung von allen anderen Wachstumsfaktoren minimiert werden. Dafür wurden die entsprechenden Experimente in serum-freiem KGM2-Medium durchgeführt. Überraschenderweise bewirkte die Behandlung der Kontroll-HaCaT-Zellen mit IGF-1, dessen stimulierenden Einfluss auf die Proliferation für eine Reihe von Zell-Linien dokumentiert ist (Ristow & Messmer, 1988; Neely et al., 1991; Edmondson et al., 2001), nur einen moderaten und verzögerten Anstieg der Proliferation erst nach 72 h. Allerdings zeigten die Untersuchungen von normalen Keratinozyten sowie von HaCaT-Zellen, dass für die volle Entfaltung der stimulierenden IGF-1-Wirkung auf die Proliferation einige zusätzliche Faktoren, wie IGF-1-Bindungsproteine (IGFBP) und das ECM-Protein Vitronectin, nötig sind (Hollier et al., 2005). Somit sollte der eher moderate Effekt von IGF-1 auf die Proliferation der HaCaT-Zellen in diesen Experimenten auf die geringen Konzentrationen von IGFBP und Vitronectin im Medium zurückzuführen sein.

Die Stimulation der Kontroll-HaCaT-Zellen mit Insulin, das neben IGF-1 auch eine wichtige Rolle beim Wachstum von Keratinozyten spielen kann (Tsao et al., 1982), hatte in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Proliferations-Raten. Einige Autoren konnten zeigen, dass IGF-1 in relativ niedrigen Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Proliferation ausübt, wohingegen Insulin die Zell-Proliferation meistens in supraphysiologischen Konzentrationen (5 µg/ml) stimuliert (Zendegui et al., 1988; Neely et al., 1991; Baur, 1995). Im Einklang mit diesen Befunden übte Insulin, in meinen Experimenten in physiologischen

Konzentrationen (100 nM) verabreicht, keinen Einfluss auf die Proliferation der HaCaT-Zellen aus. Auch die Kombination von Insulin und IGF-1 zeigte keinen Effekt auf die proliferativen Prozesse. Somit konnte der synergistische Effekt beider Faktoren auf die Zellproliferation, beschrieben für murinen Keratinozyten (Shen et al., 2001), für HaCaT-Zellen nicht belegt werden.

Die Proliferationsanalysen, bei denen die stabilen IR-KD Zell-Klone mit Insulin/IGF-1 stimuliert wurden, demonstrierten, dass die stimulierende Wirkung von IGF-1 auf die Kontroll-HaCaT-Zellen durch den „Knock-Down“ von IR aufgehoben wird. Die Befunde wiesen ferner darauf hin, dass für die Entfaltung der stimulierenden Wirkung von IGF-1 auf die Proliferation nicht nur IGF-1R sondern auch IR notwendig ist. Es muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass IR in zwei Isoformen vorkommt. IR-A und IR-B Isoformen entstehen durch alternatives Splicing des Exons 11, haben unterschiedliche Affinität zu Insulin-IGF-Liganden und können zelluläre Prozesse auf unterschiedliche Weise beeinflussen (siehe 1.3). Entsprechend zeigen auch Hybrid-Rezeptoren, die zwischen IGF-1R und IR-Isoformen gebildet werden können, unterschiedliche Liganden-Affinitäten. So wird IGF-1R/IR-A-Hybrid durch IGF-1, IGF-2 und Insulin aktiviert, wogegen IGF-1R/IR-B eine starke Affinität für IGF-1, schwache für IGF-2 und gar keine für Insulin aufweist. Je nach IR-Isoform haben auch die Hybrid-Rezeptoren unterschiedliche Wirkungen auf zelluläre Prozesse. So wurde für manche Zell-Linien, wie Maus-Fibroblasten und humane Hepatoblastoma-Zellen, demonstriert, dass IGF-1R/IR-A Hybrid-Rezeptoren im Vergleich zu IGF-1R/IR-B, einen besonders starken stimulierenden Effekt auf Proliferation und Zellmigration ausüben (Pandini et al., 2002). Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass solche Hybrid-Rezeptoren, die eindeutig in Keratinozyten nachweisbar sind (Wertheimer et al., 2000), auch in HaCaT-Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation spielen können.

5.2.2 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf Apoptose von HaCaT-Zellen

Die mikroskopischen Untersuchungen von HaCaT-Zellen mit transient supprimiertem IR oder IGF-1R belegten, dass der Verlust von IGF-1R verheerende Folgen für die Vitalität der Zellen hatte, was nach ca. 5 Tagen zum kompletten Absterben der Kulturen führte. Im Gegensatz dazu überlebten die IR-supprimierten Zellen zu einem beträchtlichen Teil, wobei die Kulturen trotz erhöhter Differenzierung (siehe unten) weiter expandierten.

Die Analyse der IGF-1R-supprimierten Zellen (TUNEL-Assay) zeigte einen starken Anstieg der Apoptose innerhalb des untersuchten Zeitraums (3 Tage). Dabei machte die TUNEL-Färbung eine große Anzahl von fragmentierten Kernen sichtbar, was für apoptotische Zellen charakteristisch ist. Die erhaltenen Daten bekräftigen wiederum die postulierte Rolle von IGF-1R als wichtigen anti-apoptotischen Faktor. So war in mehreren anderen Studien gezeigt worden, dass die Suppression von IGF-1R sowohl in verschiedenen Zell-Linien als auch *in vivo* zu einem starken Anstieg der Apoptose und zur Wachstum-Inhibierung führt (Resnicoff et al., 1995a; Resnicoff et al., 1995b; Baserga et al., 2003).

Allgemein wurde bisher angenommen, dass IR im Vergleich zum IGF-1R eine eher untergeordnete Rolle bei der Regulation von mitogenen und anti-apoptotischen Prozessen spielt. Jedoch mehren sich in letzter Zeit Befunde, dass auch IR als starker anti-apoptotischer Faktor fungieren kann, u.a. im Gehirn, im peripheren Nervensystem und in der Retina (Rajala et al., 2005; Plum et al., 2005). Die Apoptose-Analyse bei IR-supprimierten HaCaT-Zellen demonstrierte eine große Divergenz in der Apoptose-Reaktion zwischen den Ansätzen mit den unterschiedlichen IR-siRNA-Sequenzen. So zeigte die TUNEL-Analyse bei den mit siRNA_IR_604 transfizierten Zellen einen starken Anstieg der positiven Signale, wogegen bei den mit der anderen Sequenz (siRNA_IR_200) behandelten Zellen nur ein moderater Anstieg beobachtet werden konnte. Außerdem waren nur wenige fragmentierte Kerne sichtbar, in klarem Gegensatz zu den IGF-1R-supprimierten Zellen.

Dies ließ Zweifel an der Verlässlichkeit des Apoptose-Nachweises unter bestimmten *in vitro* Bedingungen aufkommen. In diesem Sinn legten die nachfolgenden Untersuchungen offen, dass bei den mit siRNA_IR_604 behandelten Zellen die Expression von Keratin 1/10 (K1/10) stark erhöht war (siehe unten, 5.2.3). Diese Keratine dienen als Marker für epidermale Differenzierung und werden verstärkt in den Zellen exprimiert, die in die terminale Differenzierung eingeschleust werden. Der Prozess der terminalen Differenzierung beinhaltet u.a. den Abbau von Zellkernen und ist mit der Degradation von DNA und RNA verbunden. Dies führt dazu, dass die dabei entstandenen DNA-Bruchstücke im TUNEL-Assay erkannt und positiv markiert werden, was eine erhöhte Apoptose-Rate vortäuschen dürfte. Diese Vermutung wurde weiter durch die Immunfluoreszenz-Analyse der auf Apoptose getesteten Zellen belegt, die noch zusätzlich mit einem Pan-Keratin-Antikörper gefärbt wurden. Dies machte deutlich, dass bei den mit siRNA_IR_604 behandelten Zellen die positiv markierten „apoptotischen“ Kerne zum größten Teil zu differenzierenden Zellen gehörten, was anhand der verstärkten Keratin-Expression gut zu erkennen war. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass für die Apoptose-Untersuchung in HaCaT-Zellen der TUNEL-Assay nur bedingt

geeignet ist, da nicht nur apoptotische, sondern offensichtlich auch differenzierende Zellen positiv markiert sein können. Somit beruhte die registrierte „starke Erhöhung der Apoptose-Rate“ bei den mit siRNA_IR_604 behandelten Zellen offensichtlich auf einen hohen Anteil von differenzierenden Zellen, die durch den TUNEL-Assay fälschlich als apoptotisch erkannt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in HaCaT-Zellen IGF-1R als starker anti-apoptotischer Faktor fungiert, während IR eher eine untergeordnete Rolle bei der Regulation apoptotischer Prozesse spielt.

5.2.3 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf Differenzierung von HaCaT-Zellen

Die Differenzierung epidermaler Zellen ist ein komplexer und dynamischer Prozeß, der von vielen Faktoren bestimmt wird. Der reguläre Ablauf der epidermalen Differenzierung, *in vivo* sowie in 3D-Kokulturen, hängt u.a. vom Kontakt der Keratinozyten zur extrazellulären Matrix, sowie dem koordinierten Einfluss autokriner und parakriner Faktoren ab. Hierzu ist die kooperative Wirkung von Fibroblasten unerlässlich. Bei den im zweidimensionalen (2D) System kultivierten Zellen sind diese Parameter nicht gegeben, aber andere Faktoren kommen ins Spiel. So hängt der Differenzierungsgrad einer Keratinozyten-Population in der 2D-Kultur unter anderem von der Zell-Dichte, der Ca^{2+} - sowie der Retinoid-Konzentration im Medium ab, woraus sich eine Balance zwischen Proliferation, Migration und Differenzierung ergibt. Somit stellen die 2D-Kulturen eine heterogene Population von Zellen dar, die zu einem gegebenen Zeitpunkt unterschiedliche Differenzierungsgrade aufweisen.

Trotz der Unterschiede zu den Bedingungen in 3D-Kokulturen, bietet die Analyse der HaCaT-Zellen in 2D-Kultur Aufschlüsse über den Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf das Differenzierungsverhalten der epidermalen Zellen. Die epidermalen Keratinozyten sind fähig in 2D-Kulturen zu stratifizieren und somit manche *in vivo*-Aspekte der Differenzierung zu imitieren (Breitkreutz et al., 1981; Breitkreutz et al., 1986; Bowden et al., 1987). So können beispielsweise die kultivierten Keratinozyten „cornified envelopes“ ausbilden und „Schuppen“ formen, was die Bildung des *Stratum corneum in vivo* nachahmt. Dies gilt auch für HaCaT-Zellkulturen, die beim Erreichen hoher Zell-Dichten zu stratifizieren beginnen, wobei differenzierte Zellen in oberen Schichten akkumulieren (Breitkreutz et al., 1993).

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Suppression von IR, nicht aber von IGF-1R, in HaCaT-Zellen zu einigen deutlichen Abweichungen vom regulären

Differenzierungsmuster führt. So beginnt die Stratifizierung bei den kultivierten IR-supprimierten Zellen bei sehr geringer Zell-Dichte in einzelnen Zellinseln, so dass die terminal differenzierenden Zellen schon nach 24 h in den oberen Schichten detektiert werden können. Ein derart abnormales Verhalten, charakteristisch für alle untersuchten IR-supprimierten Zellen, aber besonders stark ausgeprägt bei siRNA_IR_604, deutet auf starke parakeratotische Prozesse hin, die zusätzlich durch aberrante Expression von Differenzierungsmarkern begleitet sind.

Als Differenzierungsmarker dienten in dieser Arbeit hauptsächlich die Proteine Keratin 1/10 (K1/10) für ein frühes sowie Filaggrin für ein spätes Stadium der Differenzierung. Diese Proteine werden nicht nur *in vivo* sondern auch in 2D-Kulturen nach einem charakteristischen Muster exprimiert.

Frühere Untersuchungen an normalen HaCaT-Zellen hatten gezeigt, dass die Expression dieser Proteine, insbesondere von Keratin 1/10, in 2D-Kulturen unter anderem sehr stark von der Zell-Dichte abhängt (Ryle et al., 1989). So konnte anfangs (in ersten 3-5 Tagen) nur wenig K1/10 detektiert werden, wogegen nach 10-16 Tagen beim Erreichen hoher Zell-Dichte sehr viel K1/10 exprimiert wurde. Da sich meine Untersuchungen nur auf die Anfangsphase der 2D-Kulturen von 1-3 Tagen beschränkten, konnten in den Kontroll-HaCaT-Zellen nur kleine K1/10-Mengen detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Analyse der IR-supprimierten Zellen einen starken Anstieg der K1/10-Expression schon nach 72 h Kultivierung, besonders auffallend bei den mit siRNA_IR_604 behandelten Zellen.

Auch der „späte“ Marker Filaggrin, in Kontrollen nur in kleinen Mengen produziert, wurde in IR-supprimierten Zellen (besonders bei den mit siRNA_IR_604 behandelten Zellen) verstärkt exprimiert und zwar überwiegend in den parakeratotischen Bereichen terminal differenzierter Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Kultivierung normaler HaCaT-Zellen die Aktivierung von IR-„Signaling“ einen inhibierenden Einfluss auf die K1/10- und Filaggrin-Expression ausübt. Umgekehrt führt die Suppression von IR zu einer fehlerhaften Aktivierung des Differenzierungsprogramms und damit zu einem stark parakeratotischen Phänotyp. Diese Befunde belegen somit, dass in HaCaT-Zellen unter diesen experimentellen Bedingungen IR eine sehr wichtige Rolle bei der Koordination der Differenzierungsprozesse spielt. Dagegen hat IGF-1R nach diesen Ergebnissen nur wenig Einfluss auf die Differenzierung von HaCaT-Zellen. Ein Grund dafür könnte allerdings die Regulation des konkurrierenden Apoptose-Wegs durch IGF-1R sein. Da die IGF-1R-Suppression zu einer starken Initiation der

Apoptose führt (siehe oben), kann anscheinend bei den betroffenen Zellen das Differenzierungsprogramm nur bedingt ablaufen.

Allerdings zeigen die Untersuchungen von murinen Keratinozyten, dass bei der Ca^{2+} -induzierten Differenzierung Insulin einen stimulierenden, IGF-1 dagegen einen inhibierenden Effekt auf die Zellen ausübt (Wertheimer et al., 2000). Auch kultivierte Keratinozyten, die aus einer IR-„Knock Out“ Maus isoliert werden, weisen eine Reduktion von K1/10-Expression auf. Der Widerspruch zwischen diesen Befunden und meinen Ergebnissen weist darauf hin, dass die Effekte von IR und IGF-1R auf die Differenzierungs-Prozesse hochgradig zell- und/oder spezies-spezifisch sind. Außerdem kann diese Diskrepanz nicht nur auf generelle Unterschiede zwischen primären Maus-Keratinozyten und humanen HaCaT-Zellen sondern auch auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zurückgeführt werden. Während in der Gruppe von E. Wertheimer die Zell-Differenzierung gezielt mit dem Ca^{2+} induziert wird, wurde hier die spontane Differenzierung in HaCaT-Zellen untersucht, die auch sehr stark von der Zell-Dichte abhängig ist. Letzteres setzt auch einen Erhalt des Zellwachstums voraus.

5.2.4 Einfluss von IR- und IGF-1R-Suppression auf Zellwachstum

Die Wachstumskinetiken sowohl von unbehandelten als auch von transient transfizierten HaCaT-Zellen wurden in dieser Arbeit durch Ermittlung der Zellzahl analysiert. Innerhalb der untersuchten Periode (3 Tage) stieg die Zellzahl in Kontroll-Kulturen stetig an. Im Kontrast dazu führte die Suppression von IR und IGF-1R zu einer deutlichen Reduktion des Wachstums. Allerdings ist das Wachstum einer Zell-Population ein komplizierter Prozess, der nicht allein durch die Zellzahl charakterisiert werden kann. Vielmehr spielt die Balance zwischen Proliferation und Absterbe-Rate, bzw. Differenzierung der Zellen eine entscheidende Rolle. So bedeutet eine sinkende Zellzahl nicht immer eine Reduktion der Proliferation, sondern kann auch auf steigender Apoptose oder, im Fall von Keratinozyten, auf einer Erhöhung der terminalen Differenzierung beruhen.

Das stetig ansteigende Wachstum der Kontroll-HaCaT-Zellen beruht auf einer hohen Proliferationsrate, konstant niedriger Apoptose und einem geringen Level an differenzierenden Zellen. Die hier erlangten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Abnahme des Wachstums bei den IGF-supprimierten Zellen in erster Linie auf eine Reduktion der Proliferation und eine starke Erhöhung der Apoptose beruhte. Bei den IR-supprimierten Zellen war die Reduktion des Wachstums mit einer niedrigen Proliferationsrate und erhöhten

terminalen Differenzierung assoziiert, wobei Apoptose (soweit von Differenzierung unterscheidbar) eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte.

5.2.5 Einfluss der stabilen IR-Suppression auf Gen-Expressionsmuster in HaCaT-Zellen

Die Pathogenese von Diabetes ist eng verbunden mit Veränderungen der Gen-Expression (Sreekumar et al., 2002; Yechoor et al., 2002). Einerseits können diese Veränderungen durch die verminderte Aktivität des Insulins und folglich durch die Abschwächung der Signaltransduktion via IR verursacht sein. Andererseits spielen auch die indirekten Einflüsse der metabolischen und humoralen Störungen bei Diabetes eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gen-Expression.

Die Analyse der stabil transfizierten IR-„Knock-Down“ (IR-KD) Zell-Klone ermöglichte die Untersuchung direkter Effekte der Insulin-Signaltransduktion auf die Gen-Expression in HaCaT-Zellen. Dabei bestätigen sich alle auf mRNA-Ebene festgestellte Veränderungen im Expressionsmuster auch auf Protein-Ebene.

So wurde in dieser Arbeit der Einfluss der IR-Suppression auf die Expression einiger Proteine, die in der Insulin-Signaltransduktion sowie in IR-Membran-Interaktionen involviert sind, analysiert. Die Ergebnisse der RT-PCR und Western Blot Analysen zeigten, dass die Expression von Caveolin-1, Integrinen $\beta 1$ und $\beta 4$ sowie von IRS-1 vom IR-„Knock-Down“ nicht beeinflusst wurde. Dagegen waren PKC α und PKC δ in allen Klonen herunterreguliert und IGF-1R in fast allen Klonen überexprimiert. Integrin $\alpha 6$ wurde in manchen Klonen herunter- in anderen dagegen hochreguliert und zeigte dadurch eine deutliche Divergenz im Expressionsmuster.

Auch in mehreren anderen Studien war gezeigt worden, dass die IR-Signaltransduktion einen Einfluss auf die Expression vieler verschiedener Gene ausübt. So demonstrierten die Untersuchungen an der FIRKO Maus (fat-specific insulin receptor knock-out mice), dass der „Knock-Out“ von IR in Adipozyten zu Veränderungen der Expression von 48 Genen führt. Dabei bleibt der Expressionslevel von IRS-1, IRS-2 und PI-3-Kinase weitgehend unverändert, wogegen MAP-Kinase und PKC δ herunterreguliert und IGF-1R signifikant überexprimiert wird (Blüher et al., 2004). Vergleichbare Befunde ergaben sich auch in dieser Arbeit in IR-KD HaCaT-Zell-Klonen. Entsprechend zeigten die Untersuchungen an der MIRKO Maus (muscle insulin receptor knock-out mice), dass im Skelettmuskel 67 Gene direkt durch Insulin-Signaltransduktion reguliert werden (Yechoor et al., 2004). Darunter sind mehrere Gene, die für die Elemente der verschiedenen Signaltransduktions-Ketten kodieren, wie z.B.

cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4 und Akt-2, des weiteren Gene für membrangebundene oder metabolische Proteine sowie für verschiedene Transkriptions- und Translationsfaktoren. Die genauen Mechanismen, wie IR die Gen-Expression reguliert, sind nicht völlig geklärt. Wichtige Einblicke bieten Studien, die sich mit dem Einfluss von IR auf Aktivierung oder Inhibition verschiedener Transkriptionsfaktoren beschäftigten. Einer der Transkriptionsfaktoren in Muskelzellen, der durch den „Knock-Out“ von IR stärker exprimiert wird, ist DR-1 (down-regulator of transcription) (Yechoor et al., 2004). DR-1 ist ein Phosphoprotein, das mit dem TATA-Box-Bindungsprotein (TBT) interagiert und dadurch die Transkription inhibiert (White et al., 1994). Einige andere wichtige Transkriptionsfaktoren aus der Familie der FOXO-Proteine (fork-head-related proteins) werden vom IR über die Akt Kinase beeinflusst. Die Phosphorylierung von FOXO-Proteinen an Serin/Threonin Resten führt zu ihrer Inaktivierung im Cytoplasma und dadurch zur Herunterregulation von spezifischen Ziel-Genen, die u.a. in der Zell-Zyklus Progression und in Apoptose-Mechanismen involviert sind (Brunet et al., 1999; Alvarez et al., 2001; Puig & Tjian, 2005).

Die Suppression von IR führte in meinen Experimenten zu gewissen Veränderungen im Integrin-Expressionsmuster. Die Expression von $\beta 1$ -Integrin, das in der Epidermis über $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ den Kontakt zwischen Aktin-Cytoskelett und ECM herstellt, blieb unverändert. Im Gegensatz dazu wurde Integrin $\alpha 6\beta 4$, das ein zentrales Element der Hemidesmosomen darstellt, stark beeinflusst und in manchen IR-KD Klonen herunter- in anderen dagegen hochreguliert. Auch andere Studien ergaben, dass der Einfluss von IR auf die Gen-Expression innerhalb einer Zell-Linie unterschiedlich sein kann. So variiert beispielsweise der Einfluss des IR-„Knock-Out`s“ auf die Gen-Expression im adipösen Gewebe der FIRKO Maus in Abhängigkeit von der Subklasse der Adipozyten (Bluher et al., 2002; Bluher et al., 2004). Analog zu diesen Befunden kann der unterschiedliche Gehalt an Integrin $\alpha 6\beta 4$, der in IR-KD Klonen festgestellt wurde, auf anderen Parametern, wie z.B. dem Differenzierungszustand der gesamten Zell-Population beruhen.

Die nachfolgenden Untersuchungen von dreidimensionalen (3D) organotypischen Kokulturen (siehe unten) belegten, dass sich nicht nur Expression und Synthese sondern auch die Lokalisation von Integrin $\alpha 6\beta 4$ in IR-KD Klonen veränderte. Solche Veränderungen in der Integrin-Verteilung sind oft mit einem Übergang zum malignen Phänotyp assoziiert. So zeigt $\alpha 6\beta 4$, das normalerweise am stärksten am basalen Pol basaler Zellen lokalisiert ist, eine deutliche perizelluläre und suprabasale Umverteilung in Transplantaten maligner HaCaT-ras Klone (Tomakidi et al., 1999).

Störungen im Integrin-Muster können die betroffenen Zellen stark beeinflussen. Sie treten in vielen „Stress-Situationen“ des Gewebes auf, z.B. in der Wundsituation oder in Psoriasis, und sind meist mit einem hyperplastischen Status bzw. einer erhöhten Zellmotilität innerhalb des Gewebes verbunden (Grinnell, 1992; Hertle et al., 1992). Auch in HaCaT IR-KD-Klonen führte die IR-„Knock-Down“ bedingte Überexpression von Integrin $\alpha6\beta4$ zu Veränderungen im Migrationsverhalten in 2D-Kulturen (siehe unten).

5.2.6 Einfluss der stabilen IR-Suppression auf Migration von HaCaT-Zellen

Zell-Migration ist ein wichtiger Vorgang, der für die verschiedensten Prozesse, wie Wundheilung, Angiogenese, Embryonal-Entwicklung sowie Tumorinvasion und Metastasierung eine Schlüsselrolle spielt (Choma et al., 2004). Das Migrationsverhalten sowie entsprechende stimulierende Faktoren unterscheiden sich sehr stark in Abhängigkeit vom Zelltyp. Allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus der Migration bei allen Zellen gleich und umfasst u.a. die Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts, gekennzeichnet durch eine polarisierte Polymerisation und Bildung von Lamellipodia. Weiter kommt es zu Veränderungen in Interaktionen zwischen Integrinen und ECM sowie molekularen Schaltvorgängen, an denen Rho und Rac GTPasen maßgeblich beteiligt sind.

Die Aufgabe war zu klären, welchen Einfluss die IR-Suppression auf das Migrationsverhalten der HaCaT-Zellen ausübt.

Die beobachtete Migration von Kontroll-HaCaT-Zellen war typisch für epidermale Keratinozyten (Choma et al., 2004). Die Zellen migrierten in der „Wundregion“ (in Kultur auf Plastik) in einem zusammenhängenden Verband und bildeten so genannte „Migrationszungen“. Auch die Zellen des IR-KD Klons 200_2 migrierten nach diesem Muster, allerdings deutlich langsamer und unregelmäßiger als in den Kontrollen. Da wie oben beschrieben bei Klon 200_2 neben IR auch Integrin $\alpha6\beta4$ stark reduziert war, liegt ein Zusammenhang zur reduzierten Migration nahe. Im Gegensatz dazu zeigte IR-KD Klon 604_1 ein grundsätzlich anderes Migrationsverhalten. Bei diesem Klon ist IR ebenfalls stark reduziert, umgekehrt aber $\alpha6\beta4$ überexprimiert. Die Zellen vom Klon 604_1 verloren ihren epithelialen Charakter und migrierten verstreut als Einzelzellen. Solche Einzelzell-Migration ist sowohl für Keratinozyten mit gestörter Integrin-Funktion (Russell et al., 2003; Choma et al., 2004) als auch für neoplastische Zellen charakteristisch.

Die Ergebnisse der Migrationsanalyse deuten darauf hin, dass die Reduktion der IR-Expression alleine keine signifikanten Veränderungen im Migrationsverhalten der HaCaT-Zellen verursacht. Vielmehr ist die verstreute Migration von IR-KD Zellen, diesen

Experimenten zufolge, mit einem erhöhten Level von Integrin $\alpha 6\beta 4$ assoziiert. Da der Expressionslevel der $\beta 1$ -Integrine sich dabei nicht verändert, liegt die Vermutung nahe, dass die IR-KD-bedingte Störung der Balance zwischen $\beta 1$ -Integrinen und $\alpha 6\beta 4$ das normale Migrationsverhalten stark beeinträchtigt.

Eine weitere wichtige Frage war, welchen Einfluss Insulin bzw. IGF-1 auf die Migration der HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klone ausüben.

Die quantitative Untersuchung von Kontroll-HaCaT-Zellen hatte gezeigt, dass ihre Migration am stärksten durch IGF-1 allein oder in Kombination mit Insulin stimuliert wird. Entsprechend war in anderen Studien gezeigt worden, dass IGF-1 die Migration von Keratinozyten stimuliert und zwar indem es die Aktin-Polymerisation und die Bildung von Lamellipodia beeinflusst (Tsuboi et al., 1992; Ando & Jensen, 1993; Haase et al., 2003; Hyde et al., 2004). Für Insulin wurde gefunden, dass es die Zell-Migration beeinflusst indem es die Aktivität von Rho-GTPasen stimuliert, was zur Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts führt (Nobes et al., 1995). In meinen Experimenten hatte Insulin allerdings einen eher moderaten Effekt auf die Migration von HaCaT-Zellen. Interessanterweise führte die Inhibition von IGF-1R durch blockierende Antikörper zu einer Aufhebung der Stimulation nicht nur durch IGF-1 sondern auch durch Insulin oder beide Faktoren in Kombination. Zusätzlich demonstrierte die Analyse der Migration von IR-KD Zell-Klonen, dass die Suppression von IR zu einer Aufhebung des stimulierenden Effekts von Insulin sowie IGF-1 führt. Die Daten deuten darauf hin, dass in HaCaT-Zellen beide Rezeptoren bzw. Hybrid-Rezeptoren IGF-1R/IR notwendig sind, um den stimulierenden Einfluss von Insulin und IGF-1 zu gewährleisten. In der Literatur ist dokumentiert, dass in verschiedenen Zell-Linien die Hybrid-Rezeptoren, besonders IGF-1R/IR-A Hybride, einen starken Einfluss auf die Regulation von der Proliferation und Migration ausüben (Pandini et al., 2002). Entsprechend scheinen diese Hybrid-Rezeptoren auch in HaCaT-Zellen nicht nur bei der Regulation von Proliferation sondern auch bei Migrationsprozessen eine wichtige Rolle zu spielen.

5.3 Einfluss von IR-Suppression auf Wachstumsverhalten und Differenzierung in dreidimensionalen Kokulturen

5.3.1 Epithelbildung und Struktur

Der Einfluss der Suppression von IR auf Stratifizierung und Differenzierung des Epithels wurde mit Hilfe des dreidimensionalen (3D) organotypischen Kokultursystems (OTK)

untersucht. Hierbei bildet die Keratinozyten-Linie HaCaT ähnlich wie normale humane Keratinozyten (NHK) ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, dessen Aufbau überwiegend dem der normalen Epidermis entspricht. Allerdings erfolgt die Entwicklung des Epithels im Vergleich zu NHK verzögert, da HaCaT-Zellen auf einer Kollagengel-Matrix wesentlich schlechter als NHK wachsen und in 3D-Kokulturen noch stärker von der Präsenz dermalen Fibroblasten abhängig sind. So bilden NHK bereits nach einer Woche ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, während sich mit HaCaT-Zellen erst nach 2-3 Wochen ein vergleichbares Epithel entwickelt. Zudem generieren HaCaT-Zellen unter diesen Kulturbedingungen (OTK) im Gegensatz zu NHK ein parakeratotisches *Stratum corneum*, d.h. die epidermale terminale Differenzierung erfolgt nur unvollständig (Baur, 1995; Schoop et al., 1999). Diese Defizite in der epidermalen Struktur bleiben auch bei längerer Kultivierungszeit in 3D-Kokulturen bestehen. Entsprechende Störungen in vergleichbaren *in vitro*-Hautäquivalenten wurden auch von anderen Gruppen beobachtet (Syrjanen et al., 1996; Boelsma et al., 1999). Dagegen werden diese Mängel in Transplantaten von HaCaT-Zellen auf immun-defiziente Nacktmäuse, wo sie epidermis-ähnliche Epithelien bilden, weitgehend behoben (Breitkreutz et al., 1997; Breitkreutz et al., 1998). Dies macht die Rolle der Mikro-Umgebung besonders deutlich. Offensichtlich ist in HaCaT-OTKs die Interaktion mit den Fibroblasten im Dermisäquivalent nicht ausreichend für die Ausbildung einer normalen Gewebestruktur.

Die OTKs von IR-KD Zell-Klonen zeigten starke Abweichungen von HaCaT Kontroll-Epithelien. Nur Klon 200_1, bei dem die IR-Suppression lediglich ca. 50 % betrug, bildete ein vergleichbar gut strukturiertes Epithel, allerdings mit extrem dünnen vitalen Schichten. Die Klone mit einer starken IR-Suppression bildeten Epithelien mit einer äußerst aberranten Struktur und deutlich verminderter Polarisierung, so dass die Unterschiede zwischen epithelialen Schichten nicht mehr zu erkennen waren. Das *Stratum corneum*, wenn vorhanden, war in allen Fällen stark parakeratotisch.

Normalerweise ist die Ausbildung der Epithel-Strukturen von einem koordinierten Einfluss verschiedener Faktoren abhängig. Der fehlerhafte Aufbau der IR-KD Epithelien deutet darauf hin, dass durch den „Knock-Down“ von IR diese Koordination stark gestört wird. Einer der wichtigsten Parameter, welcher den Epithel-Aufbau in organotypischen Kokulturen beeinflusst, ist die Interaktion zwischen Keratinozyten (HaCaT-Zellen) und Fibroblasten, die nach einem doppelt parakrinen Mechanismus erfolgt (Maas-Szabowski et al., 2001). Dabei sezernieren die Keratinozyten Interleukin-1, was zur vermehrten Synthese von KGF (keratinocyte growth factor) und FGF-7 (fibroblast growth factor 7) in den Fibroblasten führt.

Diese Faktoren ihrerseits stimulieren die Proliferation von Keratinozyten und somit auch den Epithel-Aufbau. Nach mehreren Studien wird die Expression von Interleukin-1 (IL-1) in Keratinozyten u.a. durch den MAP-Kinase-Signalweg reguliert (Henley et al., 2003). Bereits früher war die Beteiligung der PKC-Signalwege an der Stabilisierung von IL-1 mRNA in Zell-Linien, wie humanen Fibrosarkom-Zellen, diskutiert worden (Gorospe et al., 1993). Generell konnte die bedeutende Rolle von PKCs bei der Epithelbildung auch in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden (Daum, 2004). So führte die Überexpression von PKC α und δ in OTKs von HaCaT-Zellen zu doppelt so dicken, mehrschichtigen und gut ausdifferenzierten Epithelien. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse zeigte, dass die beiden wichtigen PKC-Isoformen α und δ in allen untersuchten IR-KD Klonen stark reduziert sind. Höchstwahrscheinlich führen die Veränderungen und Störungen in der PKC-Signaltransduktion zu einer Beeinträchtigung der Interaktionen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten, was als einer der Gründe für aberrante Epithelbildung anzusehen ist.

Ein zusätzliches Merkmal des aberranten Verhaltens mancher IR-KD Klone in Kokulturen ist ein invasives Wachstum. Bei diesem Phänomen wachsen die epidermalen Zellen massiv in die Kollagenmatrix ein. Allerdings wurde diese Art von Wachstum nur bei den Klonen mit Überexpression von Integrin $\alpha 6\beta 4$ festgestellt. Übereinstimmend war mehrfach gezeigt worden, dass dieses Integrin in vielen Karzinomen überexprimiert ist, beziehungsweise das invasive Potential verschiedener Zell-Linien durch die Überexpression erhöht werden kann (Savoia et al., 1993; Rossen et al., 1994).

Die histologischen OTK-Präparate von Klon 604_1, bei dem $\alpha 6\beta 4$ erhöht ist, besitzen große Ähnlichkeit mit den OTKs von malignen HaCaT-ras Klonen, die zum Teil im Kokultur-Modell aber besonders ausgeprägt *in vivo* invasives Verhalten demonstrieren (Baur, 1995; Tomakidi et al., 1999). Bei diesen malignen HaCaT-ras Klonen ist das invasive Potential mit einer erhöhten proteolytischen Aktivität (Baumann et al., 2000) sowie mit einer generellen Erhöhung der Integrine ($\alpha 6\beta 4$ und $\beta 1$ - Integrine) assoziiert (Baur, 1995, Tomakidi et al., 1999). Zusammenfassend zeigt die Analyse der OTKs von IR-KD Klonen, dass in manchen Fällen der Verlust von IR zum Erwerb von Kriterien führt, die für maligne Zell-Linien charakteristisch sind.

5.3.2 Proliferation von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen in OTKs

Starke IR-Suppression beeinträchtigt deutlich die Proliferation von HaCaT-Zellen in OTKs. Im Vergleich zu Kontroll-OTKs, bei denen die Proliferation auf einige Zellen hauptsächlich

der basalen Schicht beschränkt war, zeigten IR-KD Klone eine erhebliche Reduktion in der Zahl proliferierender Zellen. Zusätzlich waren proliferierende Zellen nicht nur auf die basale Schicht beschränkt, sondern befanden sich auch in den oberen Epithel-Schichten, was die Störung der Epithel-Polarisierung weiter verdeutlicht. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass IR eine wichtige Rolle bei der Regulation proliferativer Prozesse in HaCaT-Zellen spielt. Somit werden meine Untersuchungen an 2D-Kulturen sowie die Daten anderer Gruppen durch die Befunde in 3D-Kokulturen bestätigt. Zudem ist auch *in vivo* der Einfluss von IR auf die Proliferation der Keratinozyten hinreichend belegt, zumindest in der Maus. So zeigt die IR-„Knock Out“ Maus ebenfalls eine deutliche Reduktion der Proliferation von basalen Zellen in der Haut (Wertheimer et al., 2001).

5.3.3 Differenzierung von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen in OTKs

Zur Charakterisierung der Differenzierung in OTKs wurden typische Marker untersucht und zwar Keratin 1 und 10 (K1/10) für frühe sowie Filaggrin, Involucrin, Loricrin und Repetin für späte Stadien der Differenzierung.

In OTKs von Klon 200_1, der eine niedrigere IR-Suppression (ca. 50 %) aufweist, war das K1/10 Expressionsmuster praktisch unverändert, das heißt deutlich erkennbar in suprabasalen Schichten wie in HaCaT-Kontrollen. Dagegen zeigten die Klone mit starker IR-Suppression eine verspätete Expression von K1/10, die somit auf die oberen Zellschichten beschränkt war. Im Vergleich zur K1/10-Expression wurden die späten Differenzierungsmarker in OTKs von IR-Suppression nur wenig beeinflusst und wurden in fast allen Klonen normal in den äußersten Epithel-Schichten exprimiert. Lediglich Klon 200_2 mit hoher IR-Suppression zeigte starke Abweichungen in der Verteilung des Filaggrins, das in suprabasalen Schichten lokalisiert war. Dies unterstreicht den weitgehenden Verlust epithelialer Polarität, was sich somit, entsprechend den histologischen Untersuchungen, nicht nur durch eine abnormale Proliferation, sondern auch durch den Verlust der koordinierten Differenzierung manifestierte. Zusammenfassend erlauben die erhaltenen Daten die Schlussfolgerung, dass IR eine wichtige Rolle beim regulären Ablauf des Differenzierungsprogramms epidermaler Keratinozyten spielt und am stärksten die Muster von frühen Differenzierungsmarkern beeinflusst.

Andererseits stellen die Ergebnisse der 3D-Kokulturen die Relevanz bezüglichlicher Daten in konventionellen 2D-Kulturen für die Hautphysiologie in gewissem Umfang in Frage. Zwar hatten die Untersuchungen an 2D-Kulturen belegt, dass IR die Differenzierungsprozesse beeinflussen kann (Wertheimer et al., 2000; eigene Daten, Diskussion siehe oben), doch stimmen die Befunde im 2D-System nicht immer mit den Ergebnissen von 3D OTKs überein.

Es wäre zu erwarten, dass die IR-Suppression im Einklang mit den 2D-Daten auch in OTKs zu einem deutlichen Anstieg der Keratin 1/10-Expression führt. Das war allerdings nicht der Fall. Auch die starke Erhöhung der Filaggrin-Expression, die bei den kultivierten HaCaT-Zellen festgestellt wurde, konnte im 3D-System nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Die kultivierten HaCaT-Zellen stellen, wie bereits oben erwähnt, eine heterogene Population dar, die zu einem gegebenen Zeitpunkt unterschiedliche Fähigkeiten zur Differenzierung aufweisen. Somit ist anzunehmen, dass bei Klonen mit starker IR-Suppression bei der Langzeit-Kultivierung ein Großteil der stark differenzierenden Zellen eliminiert und eine Subpopulation mit vermindertem Potential zur Differenzierung begünstigt wurde.

5.3.4 Basalmembran in OTKs von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen

Basalmembranen (BM) sind essentielle Strukturen für Integrität, Polarität und Homeostase der Epidermis. Die BM der Haut besteht hauptsächlich aus den Proteinen Typ IV Kollagen und Laminin, die zwei getrennte hochmolekulare Netzwerke bilden, Nidogen, das beide Netzwerke miteinander verbindet und Perlecan, einem Heparan-Sulfat-Proteoglycan, das mit allen oben genannten Proteinen interagiert (Chan, 1997; McMillan et al., 2003). Diese BM-Elemente werden sowohl von Keratinozyten als auch von Fibroblasten synthetisiert, mit der Ausnahme von Nidogen, das ausschließlich von Fibroblasten produziert wird.

In den OTKs von Kontroll-Zellen konnten die Bestandteile der BM, vergleichbar zu NHKs, fast ausschließlich in der Interphase von Epithel und Matrix, direkt unterhalb der Basalzellen detektiert werden. Bei den IR-KD Klonen dagegen traten deutliche Veränderungen in Synthese und Verteilungsmuster von BM-Proteinen auf.

So wurde Kollagen IV bei allen IR-KD Klonen schwächer und unregelmäßiger in der Interphase deponiert als in den Kontrollen. Bei Laminin war dagegen die Markierung linear wie bei Kontrollen und nur bei dem histologisch unauffälligsten Klon 200_1 äußerst schwach und durchbrochen. Am stärksten wirkte sich die IR-Suppression auf Perlecan aus. Alle IR-KD Klone zeigten ein sehr schwaches und unregelmäßiges Muster, besonders auffällig bei Klon 200_1. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass in HaCaT-Zellen die IR-Suppression einen deutlich negativen Einfluss auf den Aufbau der Basalmembran ausübt.

Die Ergebnisse der BM-Analyse in IR-KD OTKs zeigen darüber hinaus, dass IR nicht nur die Struktur der BM sondern auch die Synthese und den Transport mancher BM-Proteine beeinflusst. In der Epidermis werden diese Proteine von Basal-Zellen synthetisiert und in die dermal-epidermale Interphase-Region polar sezerniert und deponiert. In manchen IR-KD Klonen konnten dagegen Kollagen IV, Perlecan und Laminin 1/10 nicht nur in der BM-Zone

sondern auch in den höheren epithelialen Schichten detektiert werden, was auf eine Störung von Sekretion und Transport hindeutet. Die Befunde an IR-KD Klonen und HaCaT-Zellen lassen demzufolge vermuten, dass IR in der Epidermis eine wichtige Rolle bei der Regulation von Synthese und Transport einiger BM-Komponenten spielt. Vergleichbar konnte auch in anderen Zell-Linien, wie CHO-Zellen, C2 Maus-Fibroblasten, sowie Embryoid-Körperchen (embryoid bodies) demonstriert werden, dass die Synthese von Kollagen IV und Laminin 1/10 außer von Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) auch von Insulin reguliert wird. Diese Regulation erfolgt über den PI-3-Kinase-Signalweg und die Aktivierung von Akt-Kinase (Li et al., 2001).

Nidogen wurde am wenigsten von der IR-Suppression in HaCaT-Zellen beeinflusst. Im Prinzip war dies nicht überraschend, da dieses Protein ausschließlich von Fibroblasten synthetisiert wird. Allerdings war die Verteilung von Nidogen in der BM-Zone von IR-KD Klonen etwas schwächer und diffuser als in den Kontrollen. Dies ist in Einklang mit Daten, die belegen, dass für die reguläre Nidogen-Lokalisation die Interaktion mit BM-Laminin sowie die epitheliale Polarität bedeutsam sind.

Zusammenfassend erlauben diese Ergebnisse den Schluss, dass IR in HaCaT-Zellen einen deutlichen Einfluss auf die Expression und Verteilung von BM-Komponenten ausübt.

5.3.5 Hemidesmosomen in OTKs von HaCaT-Zellen und IR-KD Zell-Klonen

Hemidesmosomen (HD) sind Multiprotein-Komplexe, welche die Adhäsion der epidermalen Basalzellen an die Basalmembran gewährleisten, indem sie eine Verknüpfung zwischen dem intrazellulären Keratin-Cytoskelett und den Proteinen der extrazellulären Matrix herstellen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der IR-Suppression auf Expression und Lokalisation verschiedener Schlüssel-Komponenten in Hemidesmosomen überprüft.

So ist ein zentrales Element der Hemidesmosomen Integrin $\alpha6\beta4$ normalerweise am stärksten am basalen Pol der Basalzell-Schicht und viel schwächer apikal-lateral lokalisiert. Im Gegensatz dazu war bei den IR-KD Klonen Integrin $\alpha6\beta4$ nicht nur basal, sondern auch perizellulär in suprabasalen Schichten nachweisbar. Bei Klon 200_2 war dieses Integrin schließlich über alle epitheliale Schichten verteilt. Derartige Störungen der Integrin-Muster sind auch in benignen und malignen HaCaT-ras Klonen in 3D-Kulturen nachgewiesen worden und dienen als Hinweis auf einen zunehmenden epithelialen Polaritätsverlust (Baur, 1995). Entsprechend wurde eine aberrante Verteilung von $\alpha6\beta4$ Integrin in verschiedenen humanen Karzinomen und experimentellen Tumoren festgestellt (Tomakidi et al., 1999; Alt et

al., 2001). Auch CD151, ein Tetraspanin, das in Hemidesmosomen mit Integrin $\alpha6\beta4$ assoziiert ist, zeigte die gleiche irreguläre Verteilung. Die beiden anderen hemidesmosomalen Komponenten BP180 und HD1 traten zwar überwiegend in der BM-Zone auf, konnten aber ebenfalls in höheren epithelialen Schichten detektiert werden.

Die Verknüpfung der Hemidesmosomen zur Basalmembran erfolgt über Verankerungsfilamente mit der Hauptkomponente Laminin-5, das ausschließlich von Keratinozyten synthetisiert wird. Während normalerweise Laminin-5 auf die Basalmembran-Zone beschränkt ist, war bei den IR-KD Klonen Laminin-5 deutlich unregelmäßiger verteilt und in Zellen aller Schichten zu finden. Andere Studien hatten gezeigt, dass Synthese und Verteilung von Laminin-5 in OTKs von NHK durch epidermale Wachstumsfaktoren, wie EGF, KGF und GM-CSF positiv beeinflusst werden können (El Ghalbzouri et al., 2004). In Ergänzung dazu machen meine Ergebnisse deutlich, dass in HaCaT-Zellen IR ebenfalls einen starken Effekt auf die Synthese und Transport von Laminin-5 ausübt.

Die insgesamt aberrante Lokalisation von hemidesmosomalen Proteinen macht deutlich, dass die Suppression von IR zum Verlust oder zumindest zu einer drastischen Reduktion von Hemidesmosomen in HaCaT-Zellen führt.

5.4 Einfluss der IR-Suppression auf die Bildung von Membran-Komplexen in HaCaT-Zellen

Die Plasmamembran enthält dynamische Strukturen, das heißt molekulare Komplexe und Domänen, die stochastisch in einem zeitlich unbestimmten räumlichen Rahmen existieren und somit kontinuierlich neu geformt und wieder aufgelöst werden. Viele dieser Domänen stellen spezielle Plattformen für die Interaktion von Signal- und Mechano-Rezeptoren dar. Dazu gehören „Lipid Rafts“, cholesterin- und sphingolipid-reiche Mikrodomänen, die in einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Protein- und Lipid-Transport und Signaltransduktion involviert sind.

5.4.1 Interaktionen zwischen IR und anderen Proteinen in Kontroll-HaCaT-Zellen

Anhand von Immunkopräzipitation wurde ersichtlich, dass in HaCaT-Zellen IR sowohl mit den Elementen seiner etablierten Signaltransduktionsketten, wie IRS-1, PKC δ und PKC α als auch mit $\alpha6\beta4$ Integrin und dem „Lipid Raft“-Marker Caveolin-1 Komplexe bildet.

Viele Studien belegen, dass die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor eine Assoziation von IR und IRS-1 via SH-2 Domänen bewirkt, was zu Phosphorylierung von IRS-1 an Tyrosin-Resten führt. Aktiviertes IRS-1 fungiert dabei als ein Adapter-Molekül, das andere Proteine zum IR rekrutiert und somit die Signaltransduktionskette initiiert (Cheatham & Kahn, 1995). In Einklang hiermit zeigten die Befunde hier, dass ebenso in HaCaT-Zellen IR nach Insulin-Stimulation Komplexe mit IRS-1 bildet.

Auch PKC α und δ , wichtige Elemente der Insulin-Signaltransduktion, bilden Komplexe mit IR in HaCaT-Zellen. Allerdings führte die Insulin-Stimulation in diesem Fall zu unterschiedlichen Effekten auf die Komplex-Bildung zwischen IR und PKC-Isoformen. So steigerte Insulin einerseits die Bindung von PKC δ an IR, reduzierte aber die Assoziation mit PKC α . Es wird angenommen, dass die Aktivierung von einigen PKC-Isoformen mit der Translokation zur Membran und einer Veränderung des Phosphorylierungs-Status verbunden ist (Braiman et al., 1999). Weiterhin wurde berichtet, dass in verschiedenen Zell-Linien PKC δ mit IR kopräzipitiert und diese Assoziation mit einer Tyrosin-Phosphorylierung von PKC δ einhergeht (Braiman et al., 2001). Dem entsprechend wurde in meinen Experimenten PKC δ als Antwort auf Insulin-Stimulation phosphoryliert und bildete nach Translokation zur Membran Komplexe mit IR.

Die Interaktionen zwischen PKC α und IR werden dagegen in der Literatur kontrovers diskutiert. So kopräzipitierte beispielsweise in NIH-3T3 Zellen PKC α mit IR nach Insulingabe (Formisano et al., 1998), wogegen in anderen Zelltypen, z.B. in Skelettmuskel-Zellen, keine Interaktionen zwischen PKC α und IR gefunden wurden (Braiman et al., 2001). Die hier erlangten Befunde belegten, dass in HaCaT-Zellen zwar Komplexe zwischen IR und PKC α vorhanden sind, die aber unter Insulin-Einfluss zum wesentlichen Teil dissoziieren. Folglich war auch die insulin-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung von PKC α in den Experimenten mit HaCaT-Zellen nicht nachzuweisen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass PKC Isoenzyme in gewebe-spezifischen Mustern exprimiert werden und in verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind. Auch zelluläre Prozesse können von PKC Isoenzymen unterschiedlich, manchmal sogar antagonistisch beeinflusst werden. Der gegensätzliche Einfluss von Insulin auf die Komplex-Bildung zwischen IR und PKC α oder δ in HaCaT-Zellen deutet jedenfalls darauf hin, dass die beiden PKC-Isoenzyme eine konträre Rolle bei der Insulin-Signaltransduktion einnehmen.

Direkte physische Interaktionen zwischen IR und verschiedenen Integrinen sind in einigen Studien untersucht worden. So assoziiert beispielsweise aktivierter IR mit dem Integrin $\alpha v \beta 3$

in NIH-3T3 Zellen (Schneller et al., 1997). Außerdem können auch die Proteine aus der IR-Signaltransduktionsketten mit Integrinen assoziieren, wie etwa IRS-Proteine mit Integrin $\alpha\beta4$ in MDA-MB-435 Zellen (Shaw et al., 2001). Meinen Ergebnissen zufolge bildete IR in HaCaT-Zellen Komplexe nur mit Integrin $\alpha\beta4$ aus und Insulin-Stimulation führte zu einer partiellen Dissoziation dieser Komplexe.

Außerdem konnte hier nachgewiesen werden, dass in HaCaT-Zellen IR mit Caveolin-1 interagiert. Dabei stieg die Zahl der Komplexe proportional zur Dauer der Insulin-Behandlung an. Weiterhin erhöhte Insulin die Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1, was auf eine insulin-abhängige Aktivierung dieses Proteins hindeutet. Auch in anderen Zell-Linien, wie z.B. Adipozyten, war eine direkte Interaktion von IR und Caveolin-1 mit nachfolgender Phosphorylierung gefunden worden (Gustavsson et al., 1999; Kimura et al., 2002).

Die Befunde über der Komplex-Bildung zwischen IR, $\alpha\beta4$ Integrin und Caveolin-1 ließen vermuten, dass in HaCaT-Zellen IR-Moleküle sowohl in Caveolin-1-assoziierten „Lipid Rafts“ als auch in Integrin-haltigen Membran-Domänen vorhanden sein können. Die nachfolgende Analyse der Membran-Domänen bestätigte, dass Integrine in HaCaT-Zellen nicht in „Lipid Rafts“ vorkommen und andere Membran-Bereiche okkupieren. Die Aktivierung der Insulin-Signaltransduktion bewirkt anscheinend die Verlagerung von IR-Molekülen zwischen diesen beiden Membran-Kompartimenten.

Diese Vermutung wurde durch die Analyse der isolierten „Lipid Rafts“-Membrandomänen bestätigt. Auch ohne Insulin-Behandlung befand sich ein großer Teil der IR-Moleküle in den „Lipid Rafts“-Fraktionen. Stimulation mit Insulin bewirkte eine Verlagerung des Großteils von IR in eine dichtere Zone innerhalb der „Lipid Rafts“-Fraktion. Dieser Befund weist darauf hin, dass als Antwort auf die Aktivierung der Insulin-Signaltransduktion die Organisation von Signal-Komplexen initiiert wurde. Dieser Prozess ist mit der Rekrutierung von anderen Proteinen zum IR und als Folge hiervon mit einer Dichte-Erhöhung der entsprechenden Membrandomänen verbunden. Gleichzeitig bewirkte die Insulin-Stimulation eine Verlagerung der meisten IR-Molekülen aus den caveolin-freien zu caveolin-haltigen „Lipid Rafts“-Fraktionen.

Diese Daten bestätigen, dass in HaCaT-Zellen die Insulin-Stimulation zu einer Relokalisation von IR-Molekülen in der Plasmamembran führt. Dabei werden die IR/ $\alpha\beta4$ Integrin-Komplexe, die sich nicht in „Lipid Rafts“-Kompartimenten befinden, zum Teil dissoziiert und IR-Moleküle in die „Lipid Rafts“-Domänen verlagert.

Die Analyse der Membrandomänen zeigte, dass sich der Verlust von IR sehr stark auf die Dynamik der „Lipid Rafts“ auswirkt. In den Kontroll-Zellen befand sich der „Lipid Rafts“-Marker Caveolin-1 fast ausschließlich in den leichtesten Fraktionen. Im Gegensatz dazu konnte Caveolin-1 bei den IR-supprimierten Zell-Klonen auch in noch dichteren Fraktionen, die nicht zu den „Lipid Rafts“ gehören, nachgewiesen werden. Die Insulin-Stimulation bewirkte in den Kontroll-Zellen eine umfangreiche Verlagerung des Caveolin-1 in die Bereiche mit höherer Dichte, ein sicheres Indiz für die Organisation der Signal-Komplexe. Im Gegensatz dazu bewirkte Insulin in den IR-supprimierten Zellen eine Verlagerung des Caveolins-1 teils lediglich in die leichteste „Lipid Raft“-Fraktion teils in Fraktionen mit sehr hoher Dichte.

Eine derartig aberrante Membran-Umverteilung des Caveolins-1 in IR-KD Klonen deutet darauf hin, dass der Verlust von IR eine gravierende Störung in der Struktur der „Lipid Rafts“-Membran-Domänen verursacht.

5.4.2 Interaktionen zwischen IGF-1R und anderen Proteinen in HaCaT-Zellen und IR-KD Klonen

Wie bereits erwähnt überschneiden sich die Effekte von IGF und Insulin. Darüber hinaus sind die entsprechenden Rezeptoren stark homolog und fähig durch Dimerisierung der Insulin- und IGF-1-Hemirezeptoren Hybrid-Rezeptoren zu bilden. Diese Erkenntnisse legten nahe, auch das Zusammenspiel zwischen IGF-1R und den IR-Interaktionspartnern, wie PKC δ , Integrin $\alpha 6\beta 4$ sowie Caveolin-1, sowohl in HaCaT-Zellen als auch in IR-KD Klonen zu untersuchen.

Nur wenig ist bekannt über Interaktionen zwischen IGF-1R und PKC-Isoenzymen. So wurde die Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und PKC α in Ratten-Kardiomyozyten nachgewiesen (Maniar et al., 2005) und in NIH 3T3 Zellen die Assoziation von IGF-1R mit PKC δ , was zur Tyrosin-Phosphorylierung von PKC δ führt (Li et al., 1998). In HaCaT-Zellen konnten hier allerdings keine Komplexe zwischen IGF-1R und PKC α nachgewiesen werden. Dafür zeigte die Immunkopräzipitation, dass sowohl in HaCaT-Zellen als auch in IR-KD Zell-Klonen IGF-1R mit PKC δ assoziiert und diese Assoziation in geringem Maße durch Insulin stimuliert wird.

Demzufolge wurden die IGF-1R Komplexe mit PKC δ durch den IR-„Knock-Down“ nicht messbar beeinflusst. Der leichte Anstieg der Zahl der Komplexe bei Insulin-Stimulation in beiden Fällen (HaCaT und IR-KD) bestätigt weiterhin, dass IGF-1R auch in diesem Zellsystem durch Insulin aktiviert werden kann.

Direkte zell-spezifische Interaktionen zwischen IGF-1R und Integrinen wurden in mehreren Studien demonstriert. So war z.B. die Bildung von Integrin $\alpha 6$ /IGF-1R-Signalkomplexen in embryonalen Augen-Linsen-Zellen nachgewiesen worden (Walker et al., 2002). Die Kopräzipitation von IGF-1R mit den Integrinen $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ konnte in Chondrozyten demonstriert werden (Shakibaei et al., 1999). Schließlich wurde in Prostata-Karzinomzellen IGF-1R in den Fokalkontakten identifiziert, die hoch spezialisierte Adhäsionskomplexe darstellen und auch an Integrin-Signaltransduktion beteiligt sind (Goel et al., 2005).

In meinen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass in HaCaT-Zellen IGF-1R mit Integrin $\alpha 6\beta 4$ Komplexe bildet, unabhängig von der Insulin-Stimulation. Im Kontrast dazu stieg bei dem IR-KD Klon 604_1 die Zahl der IGF-1R/ $\alpha 6\beta 4$ Komplexe nach Insulin-Behandlung deutlich an. Dieser Befund deutet darauf hin, dass in den IR-KD Zell-Klonen die Bildung von IGF-1R/ $\alpha 6\beta 4$ -Komplexen insulin-sensitiv geworden war.

Weitgehend unbekannt ist bislang die Rolle von Caveolin-1 bei der IGF-1-Signaltransduktion, obschon gezeigt werden konnte, dass in manchen Zellen IGF-1R mit Caveolin-1 in „Lipid-Rafts“-Fraktionen kolokalisiert ist und die Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1 induzieren kann (Maggi et al., 2002). Meinen Ergebnissen zufolge bildet in HaCaT-Zellen IGF-1R mit Caveolin-1 Komplexe und zwar abhängig von der Insulin-Stimulation. Diese Befunde bestätigen wiederum, dass in HaCaT-Zellen IGF-1R durch Insulin aktiviert werden kann, was schon bei der Komplex-Bildung mit PKC δ beobachtet werden konnte. Die Suppression des IR beeinflusst deutlich die Komplex-Bildung zwischen IGF-1R und Caveolin-1, wobei einmal die Zahl der Komplexe (Klon 604_1) reduziert und andererseits der stimulierende Effekt von Insulin aufgehoben werden kann (Klon 200_2). Die Befunde machen deutlich, dass in HaCaT-Zellen IR nicht nur die Dynamik der Membrandomänen sondern auch die Lokalisation anderer Rezeptoren beeinflusst.

6 Zusammenfassung

Bei der Entstehung von chronischen Haut-Komplikationen bei Diabetes, die u.a. mit einem erhöhten Risiko für Haut-Krebs assoziiert sind, spielen neben gestörten metabolischen und inflammatorischen Prozessen vermutlich auch gewebe-spezifische Veränderungen in der Insulin Signal-transduktion eine bedeutende Rolle. Eines der Schlüsselemente im Insulin Signalweg ist Insulin Rezeptor (IR), dessen Funktion in der Epidermis noch nicht völlig geklärt ist. Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der Insulin Signaltransduktion in epidermalen Keratinozyten aufzuklären auch im Hinblick auf ihre Bedeutung bei der Tumorentstehung. Dabei sollte die Funktion von Insulin Rezeptor und IGF-1 Rezeptor bei der Regulation solcher zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration sowie Zell-Matrix Interaktionen untersucht werden. Hierfür wurde in der immortalen Human-Keratinozyten-Linie HaCaT, als Paradigma für normale Zellen, die Expression beider Rezeptoren mittels siRNA-Technik weitgehend supprimiert.

Die Untersuchungen in konventionellen 2D HaCaT-Kulturen zeigten, dass der „Knock Down“ von IR zu einer Suppression des Zell-Wachstums führte, die auf einer Reduktion der Proliferation sowie einer starken Erhöhung der terminalen Differenzierung beruhte, begleitet von einem moderaten Anstieg der Apoptose. Dagegen basierte bei Suppression von IGF-1R die weitaus stärkere Abnahme des Wachstums hier in erster Linie auf einer Reduktion der Proliferation und einer dramatischen Erhöhung der Apoptose. Demzufolge, und im Gegensatz zu IR, hatte IGF-1R lediglich einen geringen Einfluss auf Differenzierungsprozesse im 2D-System.

Die stabile Suppression von IR in HaCaT-Zellen beeinflusste deutlich die Expression einiger anderer Proteine. So war IGF-1R fast bei allen Klonen leicht erhöht, PKC α und δ in allen Klonen deutlich erniedrigt, während Integrin $\alpha 6\beta 4$ in manchen Klonen überexprimiert und in anderen herunterreguliert war. Die Überexpression von Integrin $\alpha 6\beta 4$ hatte starke Auswirkungen auf den migratorischen Phänotyp bei den betroffenen Zellen, die unter Verlust ihres epithelialen Charakters verstreut als Einzelzellen migrierten, was generell für die Keratinozyten mit gestörter Integrin-Funktion sowie für neoplastische Zellen charakteristisch ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass für die Entfaltung der stimulierenden Wirkung von Insulin und IGF-1 auf solche zelluläre Prozesse wie Proliferation und Migration sowohl IR als auch IGF-1R, bzw. Hybrid-Rezeptoren, notwendig sind.

Das Verhalten von IR-KD Klonen in einem haut-relevanten System wurde mit Hilfe von dreidimensionalen organotypischen Kokulturen untersucht. HaCaT-Zellen bildeten Epithelien, die im Allgemeinen vergleichbar zur Epidermis waren, abgesehen von geringeren Differenzierungs-Defiziten. Im Kontrast dazu entwickelten die IR-KD Klone Epithelien mit

deutlich verminderter Polarisierung, sodass keine klaren Unterschiede zwischen verschiedenen epithelialen Schichten zu erkennen waren.

Zusätzlich zeigten die IR-KD Klone in OTKs eine abnormale Proliferation, abberante Differenzierung (vor allem frühe Differenzierungsmarker besonders verzögert) und erhebliche Abweichungen in der Lokalisation von BM- und hemidesmosomalen Komponenten, was den drastischen Verlust der Polarität und des Differenzierungspotentials unterstreicht. Die IR-KD Klone mit Überexpression von Integrin $\alpha6\beta4$ wiesen zusätzlich ein deutlich invasives Verhalten auf, vergleichbar zu etablierten malignen HaCaT-Klonen. Zusammenfassend zeigt die Analyse der OTKs von IR-KD Klonen, dass in manchen Fällen der Verlust von IR zum Erwerb von Kriterien führt, die für maligne Zell-Linien charakteristisch sind.

Die Analyse der Interaktionen zwischen IR und anderen Proteinen machte deutlich, dass in HaCaT-Zellen IR mit IRS-1, PKC α und δ , Integrin $\alpha6\beta4$ und Caveolin-1 interagiert, wobei die Komplex-Bildung von Insulin sowohl positiv (IRS-1, PKC δ , Caveolin-1) als auch negativ (PKC α , Integrin $\alpha6\beta4$) beeinflusst werden kann.

Schließlich belegte die Analyse der isolierten „Lipid Rafts“-Domänen, dass in HaCaT-Zellen IR in „Lipid Rafts“ angereichert ist. Außerdem führte die Aktivierung des Insulin-Signalwegs zu einer Verlagerung der IR-Moleküle von caveolin-freien zu caveolin-haltigen „Lipid Rafts“-Membrandomänen, was höchstwahrscheinlich mit der Organisation von Signal-Komplexen in der Zellmembran assoziiert ist. Der Verlust von IR verursachte eine gravierende Störung in der Struktur der „Lipid Rafts“-Membrandomänen. Solche Störungen haben vermutlich eine starke negative Auswirkung auf die Organisation von Signal-Komplexen und beeinflussen somit nicht nur klassische Insulin-Signalwege, sondern auch die Signaltransduktion von anderen Rezeptoren, die normalerweise in „Lipid Rafts“ lokalisiert sind.

7 Summary

Chronic diabetic skin lesions are often associated with an increasing risk for skin cancer. Such dermatological complications depend not only on disordered metabolic and inflammatory processes, but also on tissue-specific changes in insulin signal transduction. The insulin receptor (IR) is one of the key elements of insulin signal transduction and its function in the epidermis is not completely understood. The purpose of this thesis was to elucidate the role of insulin signalling in epidermal keratinocytes with regard to its importance in tumour development. In this context we investigated the role of IR and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) on the regulation of proliferation, differentiation, migration, and cell-matrix interactions in epidermal cells. As a paradigm for normal epidermal cells the immortal human keratinocytes cell line HaCaT was used. Both receptors were suppressed by establishing stable HaCaT-clones using siRNAs.

The analysis of conventional 2D HaCaT-cultures showed that IR knock-down led to a decrease of cell growth, which was basically caused by a reduction of proliferation and strong increase of terminal differentiation. These effects were accompanied only by a moderate rise of apoptosis. In contrast to IR, the suppression of IGF-1R led to even stronger decrease of cell growth due to reduction of proliferation and dramatic enhancement of apoptosis. The differentiation processes in the 2D-system were only slightly affected.

The stable suppression of IR in HaCaT cells also affected the expression of other proteins. Thus IGF-1R for example was slightly increased, while PKC α and δ were down regulated in all clones. Integrin $\alpha 6\beta 4$ was overexpressed in some of the clones and down regulated in others. The overexpression of integrin $\alpha 6\beta 4$ led to a change in the migratory phenotype of affected IR-KD cell clones. The cells lost their epithelial character and migrated widespread as single cells. Such migration behaviour is typical for keratinocytes with impaired integrin function as well as for neoplastic cells.

Furthermore we could show that both receptors, and probably the hybrid-receptors between IR and IGF-1R, are necessary to mediate the stimulation of proliferation and migration through insulin and IGF-1.

The behaviour of IR-KD clones was analysed by using a three-dimensional organotypic coculture model (OTC) to mimic the *in vivo* situation of normal skin. Generally, HaCaT cells generated epithelia, which are similar to normal epidermis, except for slight deficits in differentiation. In contrast, the IR-KD clones developed epithelia revealing no distinct epidermal layers and clear loss of polarity. Additionally we observed abnormal proliferation, aberrant differentiation (delayed expression of early markers) and abnormal localisation of BM- and hemidesmosomal components. Taken together these findings underline a profound

loss of polarity and differentiation potential. In addition, the IR-KD clones with overexpression of integrin $\alpha6\beta4$ showed invasive behaviour, which is characteristic for malignant HaCaT-clones. The results of the analysis of IR-KD clones grown in OTCs demonstrate that in some cases the loss of IR leads to the accumulation of criteria characteristic for malignant cell lines.

The analysis of interactions between IR and other proteins demonstrate that in HaCaT cells IR interacts with IRS-1, PKC α and δ , Integrin $\alpha6\beta4$, and Caveolin-1. The complex formation can be affected by insulin either in a positive (IRS-1, PKC δ , Caveolin-1) or negative ways (PKC α , Integrin $\alpha6\beta4$).

Finally the analysis of isolated lipid raft domains showed that in HaCaT cells IR is enriched in lipid rafts. Furthermore we could demonstrate that the activation of insulin signalling leads to the relocation of IR molecules from caveolin-free to caveolin-containing membrane domains. Such relocation is probably associated with the reorganisation of signalling complexes in the cell membrane. The loss of IR leads to serious disturbance of microdomain structure of the lipid rafts. Such disturbances exert negative influence not only on classic insulin signalling, but also on the signal transduction of other receptors, which are normally located in lipid raft domains.

8 Literatur

Adams J.C. & Watt F.M. (1991)

Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes.
J. Cell Biol. 115:829-841.

Adams T.E., Epa V.C., Garrett T.P., Ward C.W. (2000)

Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor.
Cell Mol. Life Sci. 57(7):1050-93.

Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. (2003)

RNA interference: biology, mechanism, and applications.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(4):657-85.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995)

Molekularbiologie der Zelle.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Alt A., Gartsbein M., Ohba M., Kuroki T., Tennenbaum T. (2004)

Differential regulation of $\alpha 6 \beta 4$ integrin by PKC isoforms in murine skin keratinocytes.
Biochem. Biophys. Res. Com. 314:17-23.

Alt A., Ohba M., Li L., Gartsbein M., Belanger A., Denning M.F., Kuroki T., Yuspa S.H., Tennenbaum T. (2001)

Protein Kinase C δ -mediated phosphorylation of $\alpha 6 \beta 4$ is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment.
Cancer Res. 61:4591-4598.

Alvarez B., Martinez-A. C., Burgering B.M., Carrera A.C. (2001)

Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals.
Nature. 413(6857):744-7.

Ando Y. & Jensen P.J. (1993)

Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration.
J. Invest. Dermatol. 100(5):633-9.

Aumailley M. & Smyth N. (1998)

The role of laminins in basement membrane function.
J. Anat. 193 (Pt 1):1-21.

Balbis A., Baquiran G., Bergeron J.J., Posner B.I. (2000)

Compartmentalization and insulin-induced translocations of insulin receptor substrates, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase B in rat liver.
Endocrinology. 141(11):4041-9.

Balbis A., Baquiran G., Mounier C., Posner B.I. (2004)

Effect of insulin on caveolin-enriched membrane domains in rat liver.
J. Biol. Chem. 279(38):39348-57.

Baserga R., Peruzzi F., Reiss K. (2003)

The IGF-1 receptor in cancer biology.

Int. J. Cancer. 107(6):873-7.

Baumann C.A. & Saltiel A.R. (2001)

Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action.
BioEssays, 23: 215-222.

Baumann P., Zigrino P., Mauch C., Breitkreutz D., Nischt R. (2000)

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase-mediated progelatinase A activation in non-tumorigenic and tumorigenic human keratinocytes.
Br. J. Cancer. 83(10):1387-93.

Baur M. (1995)

Charakterisierung von Proliferation und Differenzierung humaner Keratinozyten mit unterschiedlichem Transformationsgrad unter definierten Bedingungen: Effekte mesenchymaler Zellen und modulierender Faktoren.
Universität Hohenheim. Dissertation.

Belkin A.M. & Stepp M.A. (2000)

Integrins as receptors for laminins.
Microsc. Res. Tech. 51:280-301.

Besson A., Wilson T.L., Yong V.W. (2002)

The anchoring protein RACK1 links protein kinase C epsilon to integrin beta chains. Requirement for adhesion and motility.
J. Biol. Chem. 277: 22073-22084.

Bhora F.Y., Dunkin B.J., Batzri S., Aly H.M., Bass B.L., Sidawy A.N., Harmon J.W. (1995)

Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin.
J. Surg. Res. 59(2):236-44.

Bickel P.E. (2002)

Lipid rafts and insulin signaling.
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282:E1-E10.

Bikle D.D., Ng D., Tu C.L., Oda Y., Xie Z. (2001)

Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation.
Mol. Cell. Endocrinol. 177:161-171.

Binder W.H., Barragan V., Menger F.M. (2003)

Domains and rafts in lipid membranes.
Angew. Chem. Int. Ed. 42:5802-5827.

Black E., Vibe-Petersen J., Jorgensen L.N., Madsen S.M., Agren M.S., Holstein P.E., Perrild H., Gottrup F. (2003)

Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control.

Arch. Surg. 138(1):34-40.

Bluher M., Michael M.D., Peroni O.D., Ueki K., Carter N., Kahn B.B., Kahn C.R. (2002)

Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance.
Dev. Cell. 3(1):25-38.

Bluher M., Patti M.E., Gesta S., Kahn B.B., Kahn C.R. (2004)

Intrinsic heterogeneity in adipose tissue of fat-specific insulin receptor knock-out mice is associated with differences in patterns of gene expression.
J. Biol. Chem. 279(30):31891-901.

Boelsma E., Verhoeven M.C., Ponc M. (1999)

Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT).
J. Invest. Dermatol. 112:489-498.

Borges E., Jan Y., Ruoslahti E. (2000)

Platelet-derived growth factor receptor β and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the $\beta 3$ integrin through its extracellular domain.
J. Biol. Chem. 275:39867-39873.

Borradori L. & Sonnenberg A. (1999)

Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes.
J. Invest. Dermatol. 112:411-418.

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. (1988)

Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.
J. Cell Biol. 106: 761-771

Bowden P.E., Stark H.J., Breitkreutz D., Fusenig N.E. (1987)

Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis.
Curr. Top. Dev. Biol. 22:35-68.

Bradford M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72:248-54.

Braiman L., Alt A., Kuroki T., Ohba M., Bak A., Tennenbaum T., Sampson S.R. (2001)

Insulin induces specific interactions between insulin receptor and protein kinase C δ in primary cultured skeletal muscle.
Mol. Endocrin. 15:565-574.

Braiman L., Sheffi-Friedman L., Bak A., Tennenbaum T., Sampson S.R. (1999)

Tyrosine phosphorylation of specific protein kinase C isoenzymes participates in insulin stimulation of glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle.
Diabetes. 48:1922-1929.

Breitkreutz D., Bohnert A., Herzmann E., Bowden P.E., Boukamp P., Fusenig N.E. (1984)

Differentiation specific functions in cultured and transplanted mouse keratinocytes: environmental influences on ultrastructure and keratin expression.
Differentiation. 26:154-169.

Breitkreutz D., Boukamp P., Lueder M., Fusenig N.E. (1981)

Morphological and biochemical criteria for keratinization in primary and permanent mouse epidermal cell cultures.
Front. Matrix Biol. 9:57-82.

Breitkreutz D., Hornung J., Pohlmann J., Brown-Bierman L., Bohnert A., Bowden P.E., Fusenig N.E. (1986)

Environmental induction of differentiation-specific keratins in malignant mouse keratinocyte lines.
Eur. J. Cell Biol. 42(2):255-67.

Breitkreutz D., Schoop V.M., Mirancea N., Baur M., Stark H.J., Fusenig N.E. (1998)

Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants.
Eur. J. Cell Biol. 75:273-286.

Breitkreutz D., Stark H.J., Baur M., Fusenig N.E. (1994)

Differentielle Veränderungen epidermaler Integrinmuster in Modellepithelien transformierter benignen und malignen Keratinozyten (HaCaT-ras).
Fortschritte der operativen und onkologischen Dermatologie (Ed. By G. Mahrle, H.J. Schulze und T. Krieg). Springer Verlag, Heidelberg.

Breitkreutz D., Stark H.J., Mirancea N., Tomakidi P., Steinbauer H., Fusenig N.E. (1997)

Integrin and basement membrane normalisation in mouse grafts of human keratinocytes-implications for epidermal homeostasis.
Differentiation. 61:195-209.

Breitkreutz D., Stark H.J., Plein P., Baur M., Fusenig N.E. (1993)

Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺.
Differentiation. 54:201-217.

Brooks P.C., Klemke R.L., Schon S., Lewis J.M., Schwartz M.A., Cheresch D.A. (1997)

Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin $\alpha v \beta 5$ to promote tumor cell dissemination in vivo.
J. Clin. Invest. 99:1390-1398.

Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. (2002)

A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.
Science. 296(5567):550-3.

Brunet A., Bonni A., Zigmund M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E. (1999)

Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.
Cell. 96(6):857-68.

Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C.R., Lim E.P., Kalyanaraman N., Nemesh J., Ziaugra L., Friedland L., Rolfe A., Warrington J., Lipshutz R., Daley G.Q., Lander E.S. (1999)

Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat. Genet.* 22(3):231-8.

Chan L.S. (1997)

Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front. Biosci.* 2:d343-d352.

Cheatham B & Kahn CR (1995)

Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16(2):117-42.

Choma D.P., Pumiglia K., DiPersio C.M. (2004)

Integrin $\alpha3\beta1$ directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J. Cell Sci.* 117(Pt 17):3947-59.

Chun J.S. & Jacobson B.S. (1993)

Requirement for diacylglycerol and protein kinase C in HeLa cell-substratum adhesion and their feedback amplification of arachidonic acid production for optimum cell spreading. *Mol. Biol. Cell* 4:271-281.

Clemmons D.R. & Maile L.A. (2005)

Interaction between insulin-like growth factor-I receptor and $\alpha5\beta3$ integrin linked signaling pathways: cellular responses to changes in multiple signaling inputs. *Mol. Endocrinol.* 19(1):1-11.

Cohen A.W., Combs T.P., Scherer P.E., Lisanti M.P. (2003)

Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285(6):E1151-60.

Daum N. (2004)

Integrin $\alpha6\beta4$ und Proteinkinase C in epidermaler Differenzierung und Haut-Carcinogenese. Universität Keiserslautern. Dissertation.

Defilippi P., Olivo C., Venturino M., Dolce L., Silengo L., Tarone G. (1999)

Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Micros. Res. Tech.* 47:67-78.

Denning M.F., Dlugosz A.A., Williams E.K., Szallasi Z., Blumberg P.M., Yuspa S.H. (1995)

Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ.* 6:149-157.

Devling T.W., Lindsay C.D., McLellan L.I., McMahan M., Hayes J.D. (2005)

Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(20):7280-7285A.

Disatnik M.H. & Rando T.A. (1999)

Integrin-mediated muscle cell spreading. The role of protein kinase c in outside-in and inside-out signaling and evidence of integrin cross-talk.
J. Biol. Chem. 274:32486-32492.

Edmondson S.R., Werther G.A., Wraight C.J. (2001)

Calcium regulates the expression of insulin-like growth factor binding protein-3 by the human keratinocyte cell line HaCaT.
J. Invest. Dermatol. 116(4):491-7.

Ejigu A. (2000)

Patterns of chronic complications of diabetic patients in Menelik II Hospital, Ethiopia
Ethiop. J. Health Dev. 14(1):113-116

Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. (2002)

Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs.
Methods. 26(2):199-213.

Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T. (2001)

Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate.
EMBO J. 20(23):6877-88.

Eliceiri B.P. (2001)

Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk.
Circ. Res. 89:1104-1110.

El Ghalbzouri A., Jonkman M.F., Dijkman R., Ponc M. (2005)

Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 124(1):79-86.

Etzioni A. (1999)

Integrins – the glue of life.
Lancet. 353:341-343.

Falcioni R., Antonini A., Nistico P., Di Stefano S., Crescenzi M., Natali P.G., Sacchi A. (1997)

$\alpha\beta 4$ and $\alpha\beta 1$ integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines.
Exp. Cell Res. 236:76-85.

Formisano P., Oriente F., Miele C., Caruso M., Auricchio R., Vigliotta G., Condorelli G., Beguinot F. (1998)

In NIH-3T3 fibroblasts, insulin receptor interaction with specific protein kinase C isoforms controls receptor intracellular routing.
J. Biol. Chem. 273(21):13197-202.

Fox J.W., Mayer U., Nischt R., Aumailley M., Reinhardt D., Wiedemann H., Mann K., Timpl R., Krieg T., Engel J. (1991)

Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV.
EMBO J. 10:3137-3146.

Fraser A.G., Kamath R.S., Zipperlen P., Martinez-Campos M., Sohrmann M., Ahringer J. (2000)

Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference.
Nature. 408(6810):325-30.

Garrod D.R., Merritt A.J., Nie Z. (2002)

Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation.
Mol. Membr. Biol. 19:81-94.

Giancotti F.G. (2000)

Complexity and specificity of integrin signaling.
Nat. Cell Biol. 2:E13-E14.

Giancotti F.G. & Ruoslahti E. (1999)

Integrin signaling.
Science. 285: 1028-1032.

Goel H.L., Breen M., Zhang J., Das I., Aznavoorian-Cheshire S., Greenberg N.M., Elgavish A., Languino L.R. (2005)

beta1A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts.
Cancer Res. 65(15):6692-700.

Gonzalez E., Nagiel A., Lin A.J., Golan D.E., Michel T. (2004)

Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells.
J Biol Chem. 279(39):40659-69.

Gorospe M., Kumar S., Baglioni C. (1993)

Tumor necrosis factor increases stability of interleukin-1 mRNA by activating protein kinase C.
J. Biol. Chem. 268(9):6214-20.

Grinnell F. (1992)

Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation.
J. Cell Sci. 101 (Pt 1):1-5.

Gschwendt M. (1999)

Protein kinase C δ .
Eur. J. Biochem. 259:555-564.

Gustavsson J., Parpal S., Karlsson M., Ramsing C., Thorn H., Borg M., Lindroth M., Peterson K.H., Magnusson K.E., Stralfors P. (1999)

Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane.
FASEB J. 13(14):1961-71.

Haase I., Evans R., Pofahl R., Watt F.M. (2003)

Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways.
J. Cell Sci. 116(Pt 15):3227-38.

Hadden J. W., Galy A., Chen H., Hadden E. M. (1989)

A pituitary factor induces thymic epithelial cell proliferation in vitro.
Brain Behav. Immun. 3:149-159.

Hamada M., Ohtsuka T., Kawaida R., Koizumi M., Morita K., Furukawa H., Imanishi T., Miyagishi M., Taira K. (2002)

Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 12(5):301-9.

Hannon G.J. (2002)

RNA interference.
Nature. 418(6894):244-51.

Hannon G.J., Conklin D.S. (2004)

RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells.
Methods Mol. Biol. 257:255-66.

Harborth J., Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T., Weber K. (2001)

Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs.
J. Cell Sci. 114(Pt 24):4557-65.

Hemler M.E. (1998)

Integrin associated proteins.
Curr. Opin. Cell Biol. 10:578-585.

Henley D.V., Bellone C.J., Williams D.A., Ruh M.F. (2004)

MAPK signaling pathways modulate IL-1beta expression in human keratinocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 424(1):112-8.

Herold-Mende C., Kartenbeck J., Tomakidi P., Bosch F.X. (2001)

Metastatic growth of squamous cell carcinomas is correlated with upregulation and redistribution of hemidesmosomal components.
Cell Tissue Res. 306:399-408.

Hertle M.D., Adams J.C., Watt F.M. (1991)

Integrin expression during human epidermal development in vivo and in vitro.
Development. 112:193-206.

Hertle M.D., Kubler M.D., Leigh I.M., Watt F.M. (1992)

Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis.
J. Clin. Invest. 89(6):1892-901.

Hohl D., Mehrel T., Lichti U., Turner M.L., Roop D.R., Steinert P.M. (1991)

Characterization of human loricerin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins.
J. Biol. Chem. 266:6626-6636.

Holbrook K.A. (1994)

The Keratinocyte Handbook.
Cambridge.

Holen T., Amarzguioui M., Babaie E., Prydz H. (2003)

Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway.
Nucleic Acids Res. 31(9):2401-7.

Holen T., Amarzguioui M., Wiüger M.T., Babaie E., Prydz H. (2002)

Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor.
Nucleic Acids Res. 30(8):1757-66.

Hollier B., Harkin D.G., Leavesley D., Upton Z. (2005)

Responses of keratinocytes to substrate-bound vitronectin: growth factor complexes.
Exp. Cell Res. 305(1):221-32.

Housey G.M., Johnson M.D., Hsiao W.L., O'Brian C.A., Murphy J.P., Kirschmeier P., Weinstein I.B. (1988)

Overexpression of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts.
Cell. 52:343-354.

Humphries M.J., Mcewan P.A., Barton S.J., Buckley P.A., Bella J., Paul M.A. (2003)

Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble.
Trends Biochem. Sci. 28:313-320.

Huntley A. & Drugge R. (2005)

Diabetes in skin disease.
The electronic Textbook of Dermatology (<http://www.telemedicine.org/dm/dmupdate.htm>)

Huppi K., Martin S.E., Caplen N.J. (2005)

Defining and assaying RNAi in mammalian cells.
Mol. Cell. 17(1):1-10.

Hyde C., Hollier B., Anderson A., Harkin D., Upton Z. (2004)

Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration.
J. Invest. Dermatol. 122(5):1198-206.

Ishikawa Y., Otsu K., Oshikawa J. (2005)

Caveolin; different roles for insulin signal?
Cell. Signal. 17:1175-1182.

Itoh N., Jobo K., Tsujimoto K., Ohta M., Kawasaki T. (1993)

Two truncated forms of rat insulin receptor-related receptor.
J. Biol. Chem. 268:17983-17986.

Kanashiro C.A. Khalil R.A. (1998)

Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25(12):974-85.

Kellerer M., Mushack J., Seffer E., Mischak H., Ullrich A., Häring H.U. (1998)
Protein kinase C isoforms α , δ and ζ require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells).
Diabetologia. 41:833-838.

Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. (2003)
Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias.
Cell. 115(2):209-16.

Kjellstrom T. & Malmquist J. (1984)
Insulin effects on collagen and protein production in cultured human skin fibroblasts from diabetic and non-diabetic subjects.
Horm. Metab. Res. 16(4):168-171.

Kido Y., Nakae J., Accili D. (2001)
The insulin receptor and its cellular targets.
J. Clin. Endocr. & Metab. 86:972-979.

Kimura A., Mora S., Shigematsu S., Pessin J.E., Saltiel A.R. (2002)
The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1.
J. Biol. Chem. 277:30153-30158.

Kolanus W. & Seed B. (1997)
Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP₃.
Curr. Opin. Cell Biol. 9:725-731.

Koster J., Borradori L., Sonnenberg A. (2004)
Hemidesmosomes: Molecular organization and their importance for cell adhesion and disease.
HEP. 165:243-280.

Lee Y.S., Yuspa S.H., Dlugosz A.A. (1998)
Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C pathway.
J. Invest. Dermatol. 111:762-766.

Lehman T.A., Modali R., Boukamp P., Stanek J., Bennet W.P., Welsh J.A., Metcalf R.A., Stampfer M.R., Fusenig N.E., Rogan E.M. (1993)
p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines.
Carcinogenesis. 14:833-839.

Lerman O.Z., Galiano R.D., Armour M., Levine J.P., Gurtner G.C. (2003)
Cellular Dysfunction in the diabetic fibroblasts.
Am. J. of Pathol. 162(1): 303-312.

Le Roith D. (2000)
Regulation of proliferation and apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor.
Growth Horm. IGF Res. 10 Suppl A:S12-3.

LeRoith D. & Roberts C.T. Jr. (2003)

The insulin-like growth factor system and cancer.
Cancer Letters. 195:127-137.

LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., Roberts C.T. Jr. (1995)

Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.
Endocr. Rev. 16:143-163

Li L., Tucker R.W., Hennings H., Yuspa S.H. (1995)

Chelation of intracellular Ca²⁺ inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro.
J. Cell Physiol. 163:105-114.

Li W., Mischak H., Yu J.C., Wang L.M., Mushinski J.F., Heidaran M.A., Pierce J.H. (1994)

Tyrosine phosphorylation of protein kinase C- δ in response to its activation.
J. Biol. Chem. 269:2349-2352.

Li W., Nadelman C., Gratch N.S., Li W., Chen M., Kasahara N., Woodley D.T. (2002)

An important role for protein kinase C-delta in human keratinocyte migration on dermal collagen.
Exp. Cell Res. 273(2):219-28.

Li W., Jiang Y.X., Zhang J., Soon L., Flechner L., Kapoor V., Pierce J.H., Wang L.H. (1998)

Protein kinase C-delta is an important signaling molecule in insulin-like growth factor I receptor-mediated cell transformation.
Mol. Cell Biol. 18(10):5888-98.

Li X., Talts U., Talts J.F., Arman E., Ekblom P., Lonai P. (2001)

Akt/PKB regulates laminin and collagen IV isotypes of the basement membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 98(25):14416-21.

Liu S., Calderwood D.A., Ginsberg M.H. (2000)

Integrin cytoplasmic domain-binding proteins.
J. Cell Sci. 113 (PT 20):3563-3571.

Loots M.A., Lamme E.N., Mekkes J.R., Bos J.D., Middelkoop E. (1999)

Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non insulin dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation.
Arch. Dermatol. Res. 291:93-99.

Maas-Szabowski N., Szabowski A., Stark H.J., Andrecht S., Kolbus A., Schorpp-Kistner M., Angel P., Fusenig N.E. (2001)

Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation.
J. Invest. Dermatol. 116(5):816-20.

Maas-Szabowski N., Starker A., Fusenig N.E. (2003)

Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α .
J. Cell Sci. 116(Pt 14):2937-48.

Maggi D., Biedi C., Segat D., Barbero D., Panetta D., Cordera R. (2002)

IGF-I induces caveolin 1 tyrosine phosphorylation and translocation in the lipid rafts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 295(5):1085-9.

Magnaldo T., Pommès L., Asselineau D., Darmon M. (1990)

Isolation of a GC-rich cDNA identifying mRNA present in human epidermis and modulated by calcium and retinoic acid in cultured keratinocytes. Homology with murine loricrin mRNA.

Mol. Biol. Rep. 14:237-246.

Maniar R., Pecherskaya A., Ila R., Solem M. (2005)

PKC alpha-dependent regulation of the IGF1 receptor in adult and embryonic rat cardiomyocytes.

Mol. Cell Biochem. 275(1-2):15-24.

Marinkovich M.P. (1993)

The molecular genetics of basement membrane diseases.

Arch. Dermatol. 129:1557-1565.

Mastick C.C., Brady M.J., Saltiel A.R. (1995)

Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin.

J. Cell Biol. 129(6):1523-31.

Mastick C.C., Brady M.J., Printen J.A., Ribon V., Saltiel A.R. (1998)

Spatial determinants of specificity in insulin action.

Mol. Cell Biochem. 182(1-2):65-71.

McMillan J.R., Akiyama M., Shimizu H. (2003)

Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions.

J. Dermatol. Sci. 31:169-177.

Miranti C.K. & Brugge J.S. (2002)

Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction.

Nat. Cell Biol. 4:E83-E90.

Miranti C.K., Ohno S., Brugge J.S. (1999)

Protein Kinase C regulates integrin-induced activation of the extracellular regulated kinase pathway upstream of Shc.

J. Biol. Chem. 274:10571-10581.

Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny-Baron G., Scaechtle C., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Pierce J.H., Mushinski J.F. (1993)

Overexpression of protein kinase C- δ and $-\epsilon$ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity.

J. Biol. Chem. 268:6090-6096.

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R. (1982)

The catalog of human cytokeratins: pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.

Cell. 31:11-24.

Nakae J., Kido Y., Accili D. (2001)

Distinkt and overlapping functions of insulin and IGF-1 receptors.
Endoc. Rev. 22:818-835.

Neely E.K., Morhenn V.B., Hintz R.L., Wilson D.M., Rosenfeld R.G. (1991)

Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocytes and a squamous cell carcinoma.
J. Invest. Dermatol. 96(1):104-10.

Nelson M.R., Marnellos G., Kammerer S., Hoyal C.R., Shi M.M., Cantor C.R., Braun A. (2004)

Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions.
Genome Res. 14(8):1664-8.

Nobes C.D., Hawkins P., Stephens L., Hall A. (1995)

Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors.
J. Cell Sci. 108 (Pt 1):225-33.

Nystrom F.H., Chen H., Cong L.N., Li Y., Quon M.J. (1999)

Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells.
Mol. Endocrinol. 13(12):2013-24.

Ohba M., Ishino K., Kashiwagi M., Kawabe S., Chida K., Huh N.H., Kuroki T. (1998)

Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C.
Mol. Cell Biol. 18(9):5199-207.

Oriente F., Andrezzi F., Romano C., Perruolo G., Perfetti A., Fiory F., Miele C., Beguinot F., Formisano P. (2005)

Protein kinase C- α regulates insulin action and degradation by interacting with insulin receptor substrate-1 and 14-3-3 ϵ .
J. Biol. Chem. 280: 40642-40649.

Pandini G., Frasca F., Mineo R., Sciacca L., Vigneri R., Belfiore A. (2002)

Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved.
J. Biol. Chem. 277(42):39684-95.

Papp H., Czifra G., Bodo E., Lazar J., Kovacs I., Aleksza M., Juhasz I., Acs P., Sipka S., Kovacs L., Blumberg P.M., Biro T. (2004)

Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes.
Cell. Mol. Life Sci. 61:1095-1105.

Papp H., Czifra G., Lazar J., Boczan J., Gönczi M., Csernoch L. et al. (2003)

Protein kinase C isoenzymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes.
Exp. Dermatol. 12:811-824.

Parpal S., Karlsson M., Thorn H., Stralfors P. (2001)

Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* 276(13):9670-8.

Pawson T. & Scott J.D. (1997)

Signaling through scaffold, anchoring, and adapter proteins. *Science* 278: 2075-2080

Persengiev S.P., Zhu X., Green M.R. (2004)

Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10(1):12-8.

Pessin J.E. & Saltiel A.R. (2000)

Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:165-169.

Pillay T.S., Xiao S., Keranen L., Olefsky J.M. (2004)

Regulation of the insulin receptor by protein kinase C isoenzymes: preferential interactions with β isoenzymes and interaction with the catalytic domain of β II. *Cell. Signal.* 16:97-104.

Pinset C., Montarras D., Chenevert J., Minty A., Barton P., Laurent C., Gros F. (1988)

Control of myogenesis in the mouse myogenic C2 cell line by medium composition and by insulin: characterization of permissive and inducible C2 myoblasts. *Differentiation.* 38(1):28-34.

Plum L., Schubert M., Bruning J.C. (2005)

The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* 16(2):59-65.

Puig O. & Tjian R. (2005)

Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev.* 19(20):2435-46.

Purkis P.E., Steel J.B., Mackenzie I.C., Nathrath W.B., Leigh I.M., Lane E.B. (1990)

Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell Sci.* 97 (Pt 1):39-50.

Rao M. & Sockanathan S. (2005)

Molecular mechanisms of RNAi: implications for development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75(1):28-42.

Rajala R.V., Chan M.D., Rajala A. (2005)

Lipid-protein interactions of growth factor receptor-bound protein 14 in insulin receptor signaling. *Biochemistry.* 44(47):15461-71.

Rajendran L. & Simons K. (2005)

Lipid rafts and membrane dynamics.
J. Cell Sci. 118:1099-1102.

Resnicoff M., Abraham D., Yutanawiboonchai W., Rotman H.L., Kajstura J., Rubin R., Zoltick P., Baserga R. (1995)

The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo.
Cancer Res. 55(11):2463-9.

Resnicoff M., Burgaud J.L., Rotman H.L., Abraham D., Baserga R. (1995)

Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors.
Cancer Res. 55(17):3739-41.

Ristow H.J. & Messmer T.O. (1988)

Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes.
J. Cell Physiol. 137(2):277-84.

Rosenzweig T., Aga-Mizrachi S., Bak A., Sampson S.R. (2004)

Src tyrosine kinase regulates insulin-induced activation of protein kinase C (PKC) δ in skeletal muscle.
Cell. Signal. 16:1299-1308.

Rossen K., Dahlstrom K.K., Mercurio A.M., Wewer U.M. (1994)

Expression of the alpha 6 beta 4 integrin by squamous cell carcinomas and basal cell carcinomas: possible relation to invasive potential?
Acta Derm. Venereol. 74(2):101-5.

Russell A.J., Fincher E.F., Millman L., Smith R., Vela V., Waterman E.A., Dey C.N., Guide S., Weaver V.M., Marinkovich M.P. (2003)

Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin.
J. Cell Sci. 116(Pt 17):3543-56.

Ryle C.M., Breitkreutz D., Stark H.J., Leigh I.M., Steinert P.M., Roop D., Fusenig N.E. (1989)

Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones.
Differentiation. 40:42-54.

Saltiel A.R. & Kahn C.R. (2001)

Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism.
Nature. 414:799-806.

Saltiel A.R. & Pessin J.E. (2002)

Insulin signaling pathways in time and space.
Trends Cell Biol. 12:65-71.

Saltiel A.R. & Pessin J.E. (2003)

Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane.
Traffic. 4(11):711-6.

Savoia P., Trusolino L., Pepino E., Cremona O., Marchisio P.C. (1993)

Expression and topography of integrins and basement membrane proteins in epidermal carcinomas: basal but not squamous cell carcinomas display loss of alpha 6 beta 4 and BM-600/nicein.

J. Invest. Dermatol. 101(3):352-8.

Schneller M., Vuori K., Ruoslahti E. (1997)

$\alpha\beta 3$ integrin associates with activated insulin und PDGF β receptors and potentiates the biological activity of PDGF.

EMBO J. 16:5600-5607.

Schoop V.M., Mirancea N., Fusenig N.E. (1999)

Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts.

J. Invest. Dermatol. 112:343-353.

Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. (2003)

Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.

Cell. 115(2):199-208.

Schwarz M.A., Owaribe K., Kartenbeck J., Franke W.W. (1990)

Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components.

Annu. Rev. Cell Biol. 6:461-491.

Shakibaei M., John T., De Souza P., Rahmanzadeh R., Merker H.J. (1999)

Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor.

Biochem. J. 342 Pt 3:615-23.

Sharp P.A. (2001)

RNA interference--2001.

Genes Dev. 15(5):485-90.

Shaw L.M. (2001)

Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the $\alpha 6\beta 4$ integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion.

Mol. and Cell. Biol. 21:5082-5093.

Shen S., Alt A., Wertheimer E., Gartsbein M., Kuroki T., Ohba M., Braiman L., Sampson S.R., Tennenbaum T. (2001)

PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes.

Diabetes. 50(2):255-64.

Sher I., Zisman-Rozen S., Eliahu L., Whitelock J.M., Maas-Szabowski N., Yamada Y., Breitkreutz D., Fusenig N.E., Arikawa-Hirasawa E., Iozzo R.V., Bergman R., Ron D. (2005)

Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation.

J. Biol. Chem. Nov 2; [Epub ahead of print]

Smith R.M., Harada S., Smith J.A., Zhang S., Jarett L. (1998)

Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain.
Cell Signal. 10(5):355-62.

Smola H., Thiekotter G., Fusenig N.E. (1993)

Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction.
J. Cell Biol. 122(2):417-29.

Soldi R., Mitola S., Strasly M., Defilippi P., Tarone G., Bussolino F. (1999)

Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2.
EMBO J. 18:882-892.

Sonnenberg A., Nievers M., Schaapveld R., Geerts D., Niessen C., Borradori L. (1999)

Interaction of BP180 and $\alpha 6 \beta 4$.
J. Invest. Dermatol. 112:830-832.

Sorisky A. (1999)

From preadipocyte to adipocyte: differentiation-directed signals of insulin from the cell surface to the nucleus.
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 36(1):1-34.

Souto R.P., Vallega G., Wharton J., Vinten J., Tranum-Jensen J., Pilch P.F. (2003)

Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling.
J. Biol. Chem. 278(20):18321-9.

Sreekumar R., Halvatsiotis P., Schimke J.C., Nair K.S. (2002)

Gene expression profile in skeletal muscle of type 2 diabetes and the effect of insulin treatment.
Diabetes. 51(6):1913-20.

Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D. (1998)

How cells respond to interferons.
Annu Rev Biochem. 67:227-64.

Steinert P.M., Cantieri J.S., Teller D.C., Lonsdale-Eccles J.D., Dale B.A. (1981)

Characterisation of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:4097-4101.

Steinert P.M., Steven A.C., Roop D.R. (1985)

The molecular biology of intermediate filaments.
Cell. 42:411-420.

Steinert P.M. & Roop D.R. (1988)

Molecular and cellular biology of intermediate filaments.
Annu. Rev. Biochem. 57:593-625.

Steinstrasser I., Koopmann K., Merkle H.P. (1997)

Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model.

J. Pharm. Sci. 86:378-383.

Sui G., Soohoo C., Affar el B., Gay F., Shi Y., Forrester W.C., Shi Y. (2002)

A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99(8):5515-20.

Swope V.B., Medrano E.E., Smalara D., Abdel-Malek Z.A. (1995)

Long-term proliferation of human melanocytes is supported by the physiologic mitogens α -melanotropin, endothelin-1, and basic fibroblast growth factor.

Exp. Cell Res. 217:453-459.

Syrjanen S., Mikola H., Nykanen M., Hukkanen V. (1996)

In vitro establishment of lytic and nonproductive infection by herpes simplex virus type 1 in three-dimensional keratinocyte culture.

J. Virol. 70(9):6524-8.

Tennenbaum T., Belanger A.J., Quaranta V., Yuspa S.H. (1996)

Differential regulation of integrins and extracellular matrix binding in epidermal differentiation and squamous tumor progression.

J. Invest. Dermatol. 1:157-161.

Timpl R. & Brown J.C. (1996)

Supramolecular assembly of basement membranes.

BioEssays. 18:123-132.

Tomakidi P., Mirancea N., Fusenig N.E., Herold-Mende C., Bosch F.X., Breitkreutz D. (1999)

Defects of basement membrane and hemidesmosome structure correlate with malignant phenotype and stromal interactions in HaCaT-Ras xenografts.

Differentiation. 64:263-275.

Traut W., Endl E., Garagna S., Scholzen T., Schwinger E., Gerdes J., Winking H. (2002)

Chromatin preferences of the perichromosomal layer constituent pKi-67.

Chromosome Res. 10(8):685-94.

Trevisan R., Yip J., Sarika L., Li L.K., Viberti G. (1997)

Enhanced collagen synthesis in cultured skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with nephropathy.

J. Am. Soc. Nephrol. 8(7):1133-1139.

Tsao M.C., Walthall B.J., Ham R.G. (1982)

Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium.

J. Cell Physiol. 110(2):219-29.

Tsuboi R., Sato C., Shi C.M., Ogawa H. (1992)

Stimulation of keratinocyte migration by growth factors.

J. Dermatol. 19(11):652-3.

Ullrich A. & Schlessinger J. (1990)

Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.
Cell. 61:203-212

Van Obberghen E., Baron V., Delahaye L., Emanuelli B., Filippa N., Giorgetti-Peraldi S., Lebrun P., Mothe-Satney I., Peraldi P., Rocchi S., Sawka-Verhelle D., Tartare-Deckert S., Giudicelli J. (2001)

Surfing the insulin signaling web.
J. Clin. Invest. 31:966-977.

Vickers T.A., Koo S., Bennett C.F., Crooke S.T., Dean N.M., Baker B.F. (2003)

Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis.
J. Biol. Chem. 278(9):7108-18.

Virkamäki A., Ueki K., Kahn C.R. (1999)

Protein-protein interactions in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance.
J. Clin. Invest. 103:931-943.

Vuorio E. & Ruoslahti E. (1993)

Activation of protein kinase C precedes $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated cell spreading on fibronectin.
J. Biol. Chem. 268:21459-21462.

Walker J.L., Zhang L., Zhou J., Woolkalis M.J., Menko A.S. (2002)

Role for alpha 6 integrin during lens development: Evidence for signaling through IGF-1R and ERK.
Dev Dyn. 223(2):273-84.

Wang H., Joseph J.A. (1999)

Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader.
Free Radic. Biol. Med. 27:612-616.

Wertheimer E., Spravchikov N., Trebicz M., Gartsbein M., Accili D., Avinoah I., Nofeh-Moses S., Sizyakov G., Tennenbaum T. (2001)

The regulation of skin proliferation and differentiation in the IR Null Mouse: implication for skin complications of diabetes.
Endocrinology. 142(3):1234-1241.

Wertheimer E., Taylor S.I., Tennenbaum T. (1998)

Insulin receptor regulation of cell surface integrins: a possible mechanism contributing to the development of diabetic complications.
Proc. Assoc. Am. Physicians. 110(4):333-339.

Wertheimer E., Trebicz M., Eldar T., Gartsbein M., Nofeh-Moses S., Tennenbaum T. (2000)

Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 115(1):24-9.

White R.J., Khoo B.C., Inostroza J.A., Reinberg D., Jackson S.P. (1994)

Differential regulation of RNA polymerases I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science*. 266(5184):448-50.

Woodard A.S., Garcia-Cardena G., Leong M., Madri J.A., Sessa W.C., Languino L.R. (1998)

The synergistic activity of $\alpha v\beta 3$ integrin and PDGF receptor increases cell migration. *J. Cell Sci.* 111:469-478.

Woods A. & Couchman J.R. (2000)

Integrin modulation by lateral association. *J. Biol. Chem.* 275:24233-24236.

Yamada K.M. & Even-Ram S. (2002)

Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat. Cell Biol.* 4:E75-E76.

Yamamoto M., Toya Y., Schwencke C., Lisanti M.P., Myers M.G. Jr, Ishikawa Y. (1998)

Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273(41):26962-8.

Yechool V.K., Patti M.E., Saccone R., Kahn C.R. (2002)

Coordinated patterns of gene expression for substrate and energy metabolism in skeletal muscle of diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(16):10587-92.

Yechool V.K., Patti M.E., Ueki K., Laustsen P.G., Saccone R., Rauniyar R., Kahn C.R. (2004)

Distinct pathways of insulin-regulated versus diabetes-regulated gene expression: an in vivo analysis in MIRKO mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(47):16525-30.

Yurchenco P.D., Cheng Y.S., Colognato H. (1992)

Laminin forms an independent network in basement membranes. *J. Cell Biol.* 117:1119-1133.

Zendegui J.G., Inman W.H., Carpenter G. (1988)

Modulation of the mitogenic response of an epidermal growth factor-dependent keratinocyte cell line by dexamethasone, insulin, and transforming growth factor-beta. *J. Cell Physiol.* 136(2):257-65.

Zick Y. (2004)

Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem. Soc. Transact.* 32:812-816.

9 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Amper
APS	Ammoniumpersulfat
BM	Basalmembran
bp	basenpaare
BP180	bullöse Pemphigoid Antigen 2 (BPAG2 oder Kollagen XVII genannt)
BP230	bullöse Pemphigoid Antigen 1 (auch BPAG1 genannt)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Ca ²⁺	Calciumionen (zweiwertig)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CAP	Cbl-associated protein
c-Cbl	<u>C</u> asitas <u>B</u> lineage lymphoma
cDNA	complementary DNA (komplementär zu mRNA)
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco`s MEM
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein (Fluorochrom)
dNTP	Desoxynukleotid 5`-triphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<u>E</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum (fötales Kalbserum)
Gab-1	<u>G</u> rb-2 <u>a</u> ssociated <u>b</u> inder-1
GLUT-4	<u>g</u> lucose <u>t</u> ransport protein -4
Grb-2	<u>g</u> rowth factor <u>r</u> eceptor <u>b</u> ound-2
h	Stunde(n)
HaCaT	Human, adult, niedrig Calcium, hohe Temperatur

HaCaT K6	HaCaT Subklon 6
HD	Hemidesmosomen
HD1	hemidesmosomales Protein 1 (auch Plectin genannt)
IGF-1	Insulin-like growth factors 1
IGF-2	Insulin-like growth factors 2
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF-2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
IR	Insulin Rezeptor
IRR	Insulin receptor-related receptor
IRS	insulin receptor substrate proteins
kDa	Kilo Dalton
K1/10	Keratinpaar 1 und 10
KGM2	Keratinocytes Growth Medium 2
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
M6P	Mannose-6-phosphat
Mg ²⁺	Magnesiumionen
µg, µm, µl, µM	Mikro-Gramm, -meter, -liter, -Molar
mg, mm, ml, mM	Milligramm, -meter, -liter, -Molar
min	Minute
mk	monoklonal
mRNA	Messenger RNA
mSOS	mammalian homolog to the Drosophila <i>son-of-sevenless</i> protein
NaOH	Natriumhydroxid
ng, nM	Nanogramm, -Molar
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PFA	Paraformaldehyd
PI-3-Kinase	phosphatidylinositol-3-kinase
PI-4,5-P ₂	phosphatinositol-4,5-biphosphate
PI-3,4,5-P ₃	phosphatinositol-3,4,5-triphosphate
pk	Polyklonal
PKB = Akt	protein kinase B
PKC	protein kinase C

RIPA	Radio immuno precipitation assay
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SHC	<u>SH2</u> -containing protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Maß für biologische Aktivität)
UV	Ultraviolet
VEGF	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
V	Volt

Danksagung

Ich danke von ganzem Herzen Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der Universität Gießen.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Dirk Breitzkreutz danke ich für die Aufnahme in seine Gruppe, für lange Diskussionen und für alles, was die Fertigstellung meiner Arbeit ermöglicht hat.

Besonders danke ich Frau PD Dr. Margareta Müller für ihre ständige Unterstützung, finanzielle Absicherung bis zum Ende dieser Arbeit und auch für die Zukunftsperspektiven.

Vom ganzen Herzen danke ich Silvia Vosseler, die dieser Arbeit korrigiert hat und nicht nur mit dem wissenschaftlichen Inhalt sondern auch mit meinen falschen Artikeln kämpfen musste. Ich danke Eva C. Wönne für ihre Freundschaft, Unterstützung und Gespräche, die mich ständig an die Laune hielten. Vielen dank auch für Sabine Rosenberger, die mir viele tolle Tips für meine Arbeit gegeben hat. Ich danke auch allen Mitgliedern der Mensa-Gruppe – Hans-Jürgen, Willi, MaKo, MaO, Aga, Claudia, Holger, Karsten – für gute Gesellschaft während Mittagspausen und viele interessante Gespräche. Auch bei Iris, Alex, Regina, Heinrich, Angelika und Silke, mit denen es viel Spaß gemacht hat zusammen zu arbeiten, möchte ich mich bedanken.

Besonders danke ich meiner Mutter, die Betreuung meiner Tochter zum größten Teil übernommen hat und somit dieser Arbeit überhaupt ermöglichte. Ich danke auch meinem Mann, der immer an mich geglaubt und mich immer unterstützt hat. Auch vielen Dank an meine Tochter, die mein Leben viel schöner gemacht hat und auf ihre Weise mich ständig unterstützte. Nicht zu vergessen, dass sie auch Biologie-Forscherin werden möchte, was ein Indiz dafür ist, dass ich meine Begeisterung für Biologie an der nächste Generation weiter gegeben habe.

CURRICULUM VITAE

SOFIA DEPNER

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 13. September 1968

Geburtsort: Moskau, Rußland

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSSBILDUNG

1975 – 1985 Allgemeine Mittelschule Nr.61 der Stadt Moskau, Rußland

HOCHSCHULAUSSBILDUNG

1985 – 1990 Ausbildung im Technischen Institut für Forstwesen in Moskau

Fachgebiet: „Forstwirtschaftswesen“

Abschluss: Diplom-Forstingenieurin (FH)

10/1994 – 02/2002 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abschluss: Diplom-Biologin, Gesamtnote: sehr gut
Diplomarbeit beim Institut für Zoologie, Abt. I, Entwicklungsbiologie
und Fortpflanzungsphysiologie

BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

06/1990 – 10/1991 Arbeit als Ingenieur im Staatliches Projektierungs- und
Forschungsinstitut in Moskau

04/1999 – 09/1999 Assistentin im zoologischen Praktikum des Instituts für Zoologie der
Johannes Gutenberg-Universität

DISSERTATION

10/2002 – dato Vorbereitung zur Dissertation am Deutschen Krebsforschungszentrum
(DKFZ) in Heidelberg, Abteilung Tumor und Mikroumgebung, zum
Thema „ Funktionelle Insulin Rezeptor Signalkomplexe und ihre
Funktion in humanen Epidermiszellen“

Eidesstattliche Erklärung

Depner Sofia
Schwalbenweg 6
67454 Haßloch

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt und verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Gießen, im Juni 2006

Sofia Depner