

Regulierte Expression von PTPIP51 in der Epidermis und in den Hautanhangsgebilden

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Pfeiffer, Thorsten
aus Siegen

Gießen 2006

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Leiter: Prof. Dr. med. W. Kummer
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. M. Wimmer

Gutachter: Prof. Dr. P. Mayser

Tag der Disputation: 22.11.2006

„Der Erwerb von Weisheit ist besser als Silber
und wertvoller als Gold ist ihr Gewinn.“

Sprüche 3, 14 – Die Bibel –

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Ort,

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	01
1.1 Protein Tyrosin Phosphatase Interagierendes Protein 51	01
1.2 Die Haut, Integumentum commune	02
1.2.1 Die Epidermis	04
1.2.1.1 Stratum basale	04
1.2.1.2 Stratum spinosum	06
1.2.1.3 Stratum granulosum	08
1.2.1.4 Stratum corneum	09
1.2.1.5 Regulation von Proliferation und Differenzierung in der Epidermis	10
1.2.2 Hautanhangsgebilde	11
1.2.2.1 Haare	11
1.2.2.2 Talgdrüsen	13
1.2.2.3 Schweißdrüsen	13
1.2.2.3.1 Ekkrine Schweißdrüsen	13
1.2.2.3.2 Apokrine Schweißdrüsen	14
1.3 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Gewebegewinnung und Gewebeverarbeitung	16
2.2 Lichtmikroskopische Immunhistochemie	17
2.2.1 Einfache Immunofluoreszenz	17
2.2.2 Doppelimmunofluoreszenz	18
2.2.3 Primärantikörper	18
2.2.4 Sekundärantikörper	19
2.2.5 Spezifitätskontrollen	21
2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie	21
2.2.7 Dokumentation	22
2.3 In Situ Hybridisierung	22
2.3.1 Gewebevorbereitung	22
2.3.2 Prähybridisierung	23
2.3.3 Hybridisierung	23
2.3.4 Posthybridisierung	23

2.3.5 Immunhistochemie	23
2.4 Zellkultur	24
2.4.1 Zelllinie	24
2.4.2 Kulturbedingungen	24
2.4.3 Splitting	24
2.4.4 Kryokonservierung	25
2.4.5 Auftauen	25
2.5 Zellversuch mit EGF	25
2.5.1 Durchführung	25
2.5.2 Auswertung	26
2.6 Western Blot	28
2.6.1 Durchführung	28
3. Ergebnisse	30
3.1 Einfache Immunofluoreszenz	30
3.1.1 Lokalisation des PTPIP51 in der Haut	30
3.1.1.1 Epidermis	30
3.1.1.2 Lokalisation des PTPIP51 Anhangsgebilden der Haut	33
3.1.1.2.1 Ekkrine Schweißdrüsen	33
3.1.1.2.2 Apokrine Schweißdrüsen	33
3.1.1.2.3 Talgdrüsen	33
3.1.1.2.4 Haarfollikel	34
3.1.2 Lokalisation des PTPIP51 in anderen Epithelien	35
3.1.2.1 Mehrschichtig verhorntes Plattenepithel	35
3.1.2.2 Mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel	36
3.1.2.3 Mehrreihiges Epithel (Urothel)	37
3.2 Doppelimmunofluoreszenz	37
3.2.1 PTPIP 51 und K5/14 Immunreaktivität	37
3.2.2 PTPIP51 und K1/10 Immunreaktivität	38
3.2.3 Doppelimmunofluoreszenz mit Antikörpern gegen TCPTP und PTP1B	40
3.2.3.1 PTPIP51 und TCPTP Immunreaktivität	40
3.2.3.2 PTPIP51 und PTP1B Immunreaktivität	40
3.3 In Situ Hybridisierung	41
3.3.1 Lokalisation der mRNA von PTPIP51 in der Epidermis	42

3.3.2 Lokalisation der mRNA von PTPIP51 in den Hautanhangsgebilden	42
3.4 Zellkultur	43
3.4.1 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von PTPIP51 in HaCaT-Keratinocyten	44
3.4.2 Doppelimmunofluoreszenz mit Anti-PTPIP51 und Antikörpern zur Detektion von K1/10 bzw. K5/14	46
3.3.3 In Situ Hybridisierung an PTPIP51-mRNA mit HaCaT-Keratinocyten	47
3.3.4 EGF-Zellversuch mit HaCaT-Keratinocyten	48
3.3.4.1 Auswertung des Versuchs	48
3.3.4.2 mRNA Nachweis des PTPIP51 an mit EGF behandelten Keratinocyten	50
3.3.4.3 Western Blot an mit EGF behandelten HaCaT Keratinocyten und an humaner Haut	52
4. Diskussion	54
4.1 Einfache Immunofluoreszenz	54
4.1.1 Epidermis	54
4.1.2 Hautanhangsgebilde	55
4.1.3 Andere untersuchte Epithelien	57
4.2 Doppelimmunofluoreszenz	58
4.2.1 Proliferationsmarker K5/14, Differenzierungsmarker K1/10	58
4.2.2 TCPTP	58
4.2.3 PTP1B	58
4.3 In Situ Hybridisierung	59
4.3.1 Epidermis	59
4.3.2 Hautanhangsgebilde	60
4.4 Zellkultur	60
4.4.1 Immunofluoreszenz und In Situ Hybridisierung an HaCaT Keratinocyten	60
4.4.2 Doppelimmunofluoreszenz mit K1/10 bzw. K5/14	61
4.4.3 Stimulation von Keratinocyten mit EGF	61
4.4.4 In Situ Hybridisierung an mit EGF behandelten Keratinocyten	62
4.4.5 Immunblotting an mit EGF behandelten Keratinocyten	62
5. Zusammenfassung	64

6. Summary	65
-------------------	-----------

7.Literaturverzeichnis	66
-------------------------------	-----------

Anhang	87
---------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis	87
-----------------------	----

Publikationen und Poster	89
--------------------------	----

Danksagung	90
------------	----

Lebenslauf	91
------------	----

1. Einleitung

1.1 Protein Tyrosin Phosphatase Interagierendes Protein 51

Reversible Proteintyrosinphosphorylierung ist ein zentraler Mechanismus zur Regulation verschiedenster zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Stoffwechsel, Migration, Adhäsion, Apoptose und Differenzierung. Deshalb ist es zwingend notwendig, den zellulären Phosphotyrosinspiegel präzise zu kontrollieren. Dies erfolgt nicht über die durch Protein Tyrosin Kinasen (PTK) katalysierte Phosphorylierungsreaktion, sondern über die Kontrolle der Dephosphorylierung mittels Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP), da deren Aktivität die der Kinasen um mehrere Potenzen übersteigt. Dies impliziert eine genaue Kontrolle der Aktivität der verschiedenen PTP. Aufgrund ihrer zentralen Stellung in der Signaltransduktion sind natürlich die Substrate der PTPs von großem Interesse. Bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern bzw. Substraten der Non Rezeptor PTP PTP1B und der ihr sehr ähnlichen T-Zell-PTP (TCPTP), wurde in einem Yeast Two Hybrid Screen aus einer Jurkat Zell DNA Bibliothek ein bisher noch nicht beschriebenes Protein identifiziert: Tyrosin Phosphatase interagierendes Protein 51 (PTPIP51: SwissProt Accession code Q96SD6, EMBL: HAS 24271) (Welte 2000, Porsche 2001). Eine vollständigere cDNA Sequenz wurde später aus einer humanen Brain Library gewonnen (Ota et al. 2004; EMBL accession No. AK001441). Das entsprechende Protein besteht aus 470 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 52118 Dalton (Porsche 2001). Das Protein ist beim Menschen auf Chromosom 15 (15q15.1) kodiert.

Biochemische Analysen zeigten, dass das Protein außer mit den Non Rezeptor PTPs mit dem C-terminalen Anteil eines hypothetischen Proteins FLJ36029 interagiert. Dieses Protein ist verwandt mit dem Nuf2 Protein, das am Zentromer lokalisiert ist und essentiell ist für die Progression der Mitose in Vertebratenzellen (Hori et al. 2003). Ein weiterer Interaktionspartner ist das hypothetische CHG6 Protein, das verwandt ist mit dem Chicken Homebox Genprodukt Prox1, einem Transkriptionsfaktor, der essentiell für normale Entwicklung ist (Tomarev et al. 1996, Büttel 2000).

Wie quantitative Untersuchungen zeigten, ist die Interaktion des PTPIP51 mit der PTP1B stärker als mit der TCPTP (Bürklen 2001).

Durch weitere Analysen, sowohl der DNA- als auch der Aminosäuresequenzen, wurde eine Wahrscheinlichkeit von 57,4% für α -Helices, 12,1% für β -Faltblattstrukturen und 30,5% für Loops ermittelt (Welte 2000).

Die Sequenz von P51 zeigte weiterhin 5 Sequenzmotive für potentielle Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen. Sie lagen an den Positionen 51-53, 91-93, 166-168, 181-183, 272-274 und 324-326. 10 Sequenzmotive in P51 deuten auf mögliche Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen an folgenden Positionen hin: 143-146, 145-148, 160-163, 166-169, 202-205, 210-213, 249-252, 324-327, 357-360, 375-378, 428-431. Mit welcher Wahrscheinlichkeit diese Abschnitte auch wirklich Phosphorylierungsstellen darstellen ist nicht zu sagen, da die dreidimensionale Struktur des Proteins noch nicht bekannt ist (Welte 2000, Bürklen 2001).

Potentielle Transmembrandomänen konnten nach Durchführung von Hydrophobizitätsanalysen nicht beschrieben werden (Welte 2000).

Das Protein wird in vitro durch src Kinase tyrosinphosphoryliert, wahrscheinlich jedoch nur an einer Aminosäure (Welte 2000). Die Dephosphorylierung in vitro erfolgt durch Zellextrakte, die PTP1B oder src Kinase überexprimieren. Außerdem wurde eine hypothetische Phosphorylierungsstelle durch cAMP-abhängige Proteinkinasen an der Position 186-189 beobachtet (Bürklen 2001).

Die PTPIP51 ist auf Grund ihrer Struktur zu einer Dimerisierung (Region 77 – 176) und eventuell auch zur Trimerisierung mit sich selbst befähigt (Büttel 2000).

Die Größe des P51-Transkripts von 3 kB bei der Spezies Schwein entspricht der Größe des humanen Transkripts aus Jurkat-T-Lymphomzellen, was auf einen einheitlich verteilten Genotyp des Proteins unter den verschiedenen Spezies hinweist (Welte 2000).

Biochemische Analysen zeigten, dass PTPIP51 ein relativ leicht lösliches und cytoplasmatisch lokalisiertes Protein darstellt (Welte 2000).

Vorläufige Untersuchungen zeigten sowohl die Expression als auch das Protein in verschiedenen Säugetiergeweben: Muskel, Hoden, Kinozilien tragende Flimmerzellen, Nervengewebe und Haut (Stenzinger et al. 2005).

Dabei fand es sich in Geweben, die einer präzise Regulation der Proliferation und Differenzierung unterworfen sind wie Keimepithelien und Epidermis (Stenzinger et al. 2005).

1.2 Die Haut, Integumentum commune

Das Integumentum commune ist ein flächenhaftes Organ, das eine physikalische Abgrenzung zur Außenwelt bildet und das Körperinnere schützt, sowie Temperatur-, Salz- und Wasserhaushalt reguliert. Ferner beherbergt es Sinnesorgane und spielt eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen.

Einleitung

Die Haut gliedert sich in:

- **Cutis**, im engeren Sinne
- **Tela subcutanea**, Subcutis, Unterhaut
- **Hautanhangsgebilde** (z. B. Haare und Drüsen)

Die Cutis wiederum besteht aus mehreren Schichten, die in der Regel gut voneinander absetzbar sind:

- **Epidermis**, Oberhaut, ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel
- **Dermis**, Corium, Lederhaut ein straffes faserreiches Bindegewebe mit einem Stratum papillare und einem Stratum reticulare

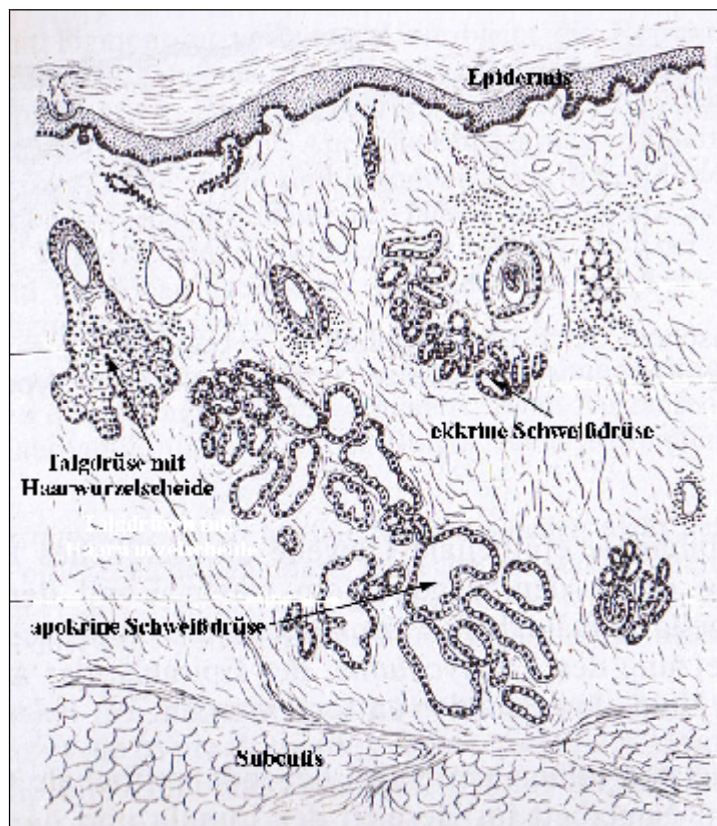


Abb. 1 Übersichtszeichnung von Achselhöhlenhaut eines Menschen mit ihren verschiedenen Drüsen (Abbildung modifiziert nach Leonhardt 1990)

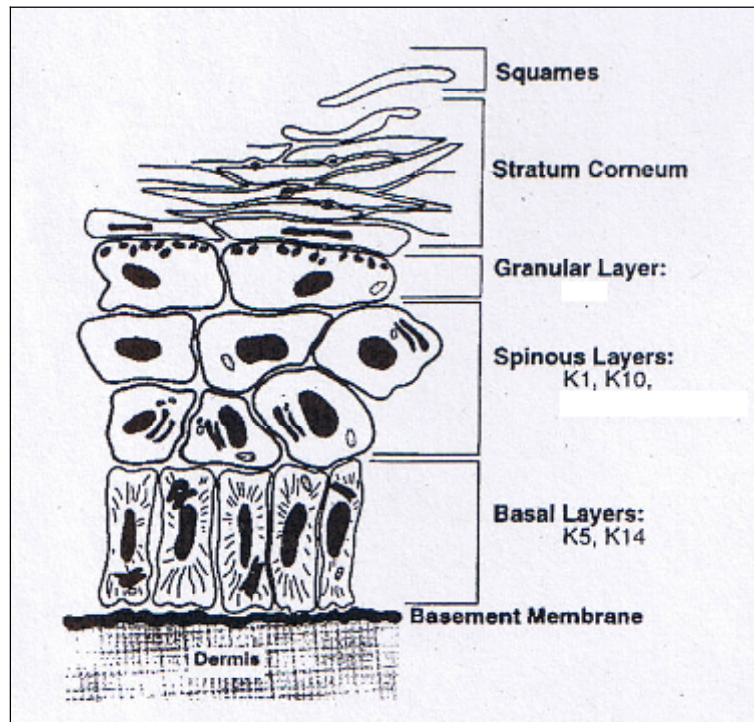


Abb. 2 Epidermis. Mitotisch aktive Zellen des Stratum basale exprimieren die K5 und 14. Beim Eintritt ins Stratum spinosum induzieren die Keratinocyten die Expression von K1 und 10 (Schema nach Fuchs 1996).

1.2.1 Die Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel, das sowohl aus epidermalen Symbionten (Melanocyten, Langerhans- und Merkelzellen) und Keratinocyten, die etwa 90% der epidermalen Zellpopulation stellen, besteht. Die Keratinocyten durchlaufen komplexe Differenzierungsvorgänge, um sich am Ende zu toten, aber funktionstragenden Corneozyten (Hornzellen) umwandeln.

Der Verhornungsprozess der Keratinocyten lässt sich durch die deutlich abgrenzbaren Schichten der Epidermis charakterisieren. Dabei enthält jede Schicht Zellen, die sich im gleichen Stadium der Differenzierung befinden.

- **Stratum basale**
- **Stratum spinosum**
- **Stratum granulosum**
- **(Stratum lucidum)**
- **Stratum corneum**

1.2.1.1 Stratum basale

Die Keratinocyten des Stratum basale liegen der Basallamina auf und sorgen für eine mechanische Befestigung der Epidermis an das Substratum. Die Basalzellen sind die Vorläufer der sich differenzierenden Zellen der suprabasalen Schichten. Sie produzieren charakteristische Proteine wie hemidesmosomale Komponenten, Integrine und die Keratine K5 und K14 (Eckert 1989, Fuchs 1990, Blumenberg 1993), die als Marker für diese Zellart dienen können.

Integrine sind transmembranäre Proteine, die jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Keratine sind die überwiegende cytoskelettale Komponente von stratifizierenden Epithelien. Etwa 30 Vertreter stellt diese multigen codierte Familie von Intermediärfilamenten.

Keratinproteine werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenz und Zusammensetzung von Aminosäuren in zwei Familien unterteilt: Eine Typ-I-Familie mit aciden Proteinen (Keratin 9-20) und eine Typ-II-Familie mit basischen bis neutralen Proteinen (Keratin 1-8). In jedem möglichen epithelialen Zelltyp werden zumindest 2 Keratinproteine (ein Mitglied der Typ-I- und eines der Typ-II-Familie) coexprimiert. Diese beiden Proteine lagern sich zu Heteropolymeren zusammen und bilden die Keratinintermediärfilamente.

Hemidesmosome stellen als eine prominente Struktur des Stratum basale physikalische Hälften der Desmosomen dar, unterscheiden sich biochemisch jedoch erheblich von diesen. Wichtig ist, dass sowohl Desmosomen wie Hemidesmosomen über das Keratincytoskelett mit dem Cytoplasma verbunden sind (Schwarz et al. 1990). Hemidesmosomen enthalten desweiteren ein spezifisches Integrin, das eine α_6 - und eine β_4 -Untereinheit beinhaltet. Die β_4 -Integrin-Untereinheit enthält einen außerordentlich langen cytoplasmatischen Schwanz, den man für Interaktionen zwischen Hemidesmosomen und Keratin-Intermediärfilamenten verantwortlich macht (Jones et al. 1991).

Die Zelloberfläche der basalen Keratinocyten enthalten mehrere verschiedene Integrine, die als Rezeptoren für extracelluläre Matrixkomponenten, wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und Kalinin, dienen (Hynes 1992). Binden die Integrine an ihre Liganden, so stellt das eine wesentliche Komponente der Verankerung der basalen Keratinocyten an die Basalmembran dar. Einige dieser Integrine, zum Beispiel die β_1 -Familie sind bevorzugt in lateralen Oberflächen der basalen Keratinocyten lokalisiert, während andere, wie das oben erwähnte $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, primär basal lokalisiert sind (Grinnell 1992, Tennenbaum et al. 1996).

Die Basalzellen sind nicht nur an der Basallamina befestigt, sondern können auch aktiv einige ihrer Proteinkomponenten, wie zum Beispiel Laminin, Heparansulfat, Fibronectin und TypIV-Kollagen, produzieren (O`Keefe et al. 1987).

Zu einem bestimmten Zeitpunkt verlassen die Basalzellen die Basalmembran und starten die Differenzierung. Das Signal zur Differenzierung ist noch unbekannt, jedoch ist das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, der Fibronectinrezeptor, ein sehr wahrscheinlicher Kandidat für diesen Vorgang (Adams and Watt 1989). Ist der Ligand gebunden, so hält dieses Integrin den Kontakt zur Basalmembran. Kommt es zur Freisetzung des Liganden verändert sich die Konformation des Integrins derart, dass dies von der Zelle als Signal zur Differenzierung registriert wird. Spezifische Antikörper, die das Integrin $\alpha_5\beta_1$ binden und den Effekt von Fibronectin simulieren, konservieren den Rezeptor in seiner ursprünglichen Konformation und inhibieren damit das Signal zur Differenzierung (Blumenberg and Tomic-Canic 1997).

1.2.1.2 Stratum spinosum

Beim Übergang vom Stratum basale ins Stratum spinosum kommt es zur Abflachung der Keratinocyten mit Ausbildung polygonal kubischen Form. Charakteristisch sind die Cytoplasmaausläufer, an deren Ende Desmosomen lokalisiert sind, die die benachbarten Zellen mechanisch miteinander verbinden. Im Stratum spinosum kommt es erstmalig zur Exprimierung sogenannter früher Differenzierungsmarker.

So exprimieren alle suprabasalen Keratinocyten das Keratinpaar K1 und K10, statt dem für das Stratum basale charakteristische K5 und K14. K1 ist der früheste Marker terminaler Differenzierung und geht der Exprimierung von K10 voraus, sodass K1 gelegentlich auch in den Zellen vorzufinden ist, die noch Kontakt zur Basalmembran haben (Roop et al. 1987).

Die Keratine K1 und K10 besitzen sehr lange glycinreiche terminale Domänen mit Subdomänen, die aus kurzen Segmenten mit 4 bis 10 Aminosäuren bestehen und sich drei- bis fünfzehnmal wiederholen. Durch Analyse dieser glycinreichen Segmente erkannte man, dass diese Wiederholungen durch hintereinander liegende Duplikationen hervorgerufen werden. Aufgrund der Hydrophobizität des Glycins ist dem Polyglycin möglich sich in extrem dicht gepackten hydrophoben Aggregaten anzuordnen, die resistent gegenüber Proteolyse sind und ein ideales Material zur Bildung des schützenden Stratum corneum bilden (Crick and Rich, 1955).

Obwohl K1 und K10 sehr charakteristisch für die suprabasalen Schichten der Epidermis ist, wird es, wenn auch in wesentlich geringeren Konzentrationen, in nicht verhornendem Plattenepithel nachgewiesen (Presland and Dale 2000).

Gewisse Keratinocyten-Proteinmarker sind dafür bestimmt in den verhornten Envelope eingebaut zu werden. Es handelt sich dabei um eine hüllenartige, vernetzte Struktur, die direkt unterhalb der Zellmembran lokalisiert ist und einen entscheidenden Teil zur Barrierefunktion der verhornenden Plattenepithelien beiträgt (Presland and Dale 2000). Der wahrscheinlich bekannteste Vertreter ist das polymorphe, 68 kDa schwere, gertenförmige Involucrin (Yaffe et al. 1992). Involucrin besitzt eine hoch repetitive Struktur, die aus einer Sequenz von 10 Aminosäuren besteht, wobei jeweils dreimal die Aminosäure Glutamin vorliegt (Yaffe et al. 1992). Glutamin ist ein Substrat für die Quervernetzung zweier Proteine durch die epidermale Transglutaminase. Die Gertenstruktur erlaubt es dem Involucrin der Quervernetzung mit anderen Proteinen des verhornten Envelopes zu dienen, da diese in der Lage sind, Lysylgruppen zu den Lysyl-Glutamyl-Bindungen beizusteuern. Die große Zahl und gleichmäßige Verteilung von Glutamin gestattet es, dass Involucrin relativ ausgiebig mit anderen Proteinen quervernetzt werden kann. Dabei geht das Protein von einer löslichen in eine unlösliche Form über (Blumenberg and Tomic-Canic 1997). Die Exprimierung von Involucrin hängt von einer hohen Ca^{2+} -Konzentration, Freisetzung des Keratinocyts von der Basalmembran und einem Rückzug aus dem Zellzyklus ab (Carroll et al. 1993).

Ein weiteres Protein, das relativ früh, während der epidermalen Differenzierung erscheint, ist das Loricrin (Hohl et al. 1993). Loricrin ist sehr reich an Glycin und Serin, die nicht weniger als 47 bzw. 23% der Gesamtmasse des Proteins ausmachen. In den verhornten Envelopes kommen diese beiden Aminosäuren ebenfalls sehr häufig vor. Es wird angenommen, dass auch Loricrin grundlegend am Aufbau des Envelopes beteiligt ist (Blumenberg and Tomic-Canic 1997). Loricrin enthält außerdem viele Cysteine, die über das ganze Molekül verteilt sind. Deshalb nimmt man an, dass es auch eine Hauptkomponente der Granula des Stratum granulosum (s. u.) repräsentiert. Zwischen den glycin- und serinreichen Domänen befinden sich lysin- und glutaminreiche Verbindungsstücke. Wie oben erwähnt sind diese beiden Aminosäuren Substrate von Transglutaminasen, die Loricrin während der Formation des Envelopes miteinander quervernetzen. Aufgrund seiner ungewöhnlichen Aminosäurezusammensetzung ist Loricrin auch schon vor der Quervernetzung und Einbau in den Envelope ein höchst unlösliches Protein (Blumenberg and Tomic-Canic 1997).

In der Epidermis wird Loricrin immer begleitend mit Filaggrin (s.u.), jedoch zeitlich nach Involucrin exprimiert. Die Transkription wird durch Retinoide supprimiert und durch Ca^{2+} , einen Promoter der Differenzierung, induziert (Blumenberg and Tomic-Canic 1997).

1.2.1.3 Stratum granulosum

Beim Übertritt der Keratinocyten vom Stratum spinosum ins Stratum granulosum kommt es zu einer weiteren starken Abflachung der Zellen. Diese Schicht ist etwa 3 bis 5 Zelllagen stark.

Auch auf dem Gebiet der Proteinexprimierung kommt es zu einer deutlichen Veränderung. Die Keratinocyten beenden die Exprimierung früher Differenzierungsmarker, wie K1 und 10 und beginnen damit, späte Marker wie Loricrin, Profilaggrin/Filaggrin, Transglutaminase usw. zu synthetisieren.

Filaggrin ist ein basisches, relativ kleines Protein, das man assoziiert mit Keratinintermediärfilamenten im Stratum granulosum und corneum vorfindet (Dale et al. 1985). Seine namensgebende Funktion ist die Aggregation verschiedener Filamente in dicke lateral assoziierte Bündel. Filaggrin wird im Stratum corneum zu freien Aminosäuren abgebaut, die eine Rolle in der Regulation der Osmolarität des Stratum corneums spielen könnten (Dale et al. 1990). In der granulären Schicht wird Filaggrin aus einem großem Precursor, dem Profilaggrin, synthetisiert. Die Transkription von Profilaggrin wird supprimiert durch Retinoide und ist streng beschränkt auf die sich differenzierenden Schichten der Keratinocyten. Profilaggrin enthält ungefähr 10 bis 12 identische Kopien eines reifen Filaggrinproteins, die aufeinander folgend angeordnet, durch Linkersequenzen voneinander getrennt und umschlossen sind von den amino- und carboxyterminalen Polypeptiden. Profilaggrin ist reichlich phosphoryliert und in Keratohyalin granula (s. u.) verpackt. Die Phosphorylierung schützt Profilaggrin vor Proteolyse bis Filaggrin für die Aggregation der Filamente benötigt wird. Die Dephosphorylierung der Linkerregionen setzt das Protein der Proteolyse aus, was schließlich in Filaggrinmonomeren resultiert. Die Prozessierung von Profilaggrin benötigt die Anwesenheit von Calcium (Blumenberg and Tomic-Canic 1997). Interessanterweise enthält die aminoterminal Domäne 2 Segmente, die homolog sind zu calciumbindenden Sequenzen in anderen Domänen (Presland et al. 1995). Die Funktion dieser calciumbindenden Domänen ist momentan noch unbekannt. Da jedoch eine der involvierten Phosphatasen und die proteolytische Prozessierung zu Filaggrin von Calcium beeinflusst werden, vermutet man, dass es sich bei diesen Domänen um calciumabhängige Trigger für die Profilaggrinprozessierung handelt (Presland et al. 1995).

Spezifische Proteine, die im Stratum granulosum synthetisiert werden, ordnen sich direkt unterhalb der Zellmembran an und werden in einem unlöslichen verhornten Envelope quervernetzt. Dieser Vorgang wird durch ein Enzym, die epidermale Transglutaminase, katalysiert. Dieser Envelope ist Teil, einer sich verhärtenden Zelloberfläche und

zunehmenden Barrierefunktion im Laufe einer irreversibel ablaufenden terminalen Differenzierung von mehrschichtig verhornenden Epithelien wie Epidermis und verhornender oraler Schleimhaut (Reichert et al. 1993). Die Querbindungen sind resistent gegenüber proteolytischen und peptidolytischen Enzymen. Es resultiert somit eine stabile Hüllstruktur gegenüber Umwelteinflüssen. Die Transglutaminase, die im Zusammenhang mit epidermaler Verhornung eine wichtige Rolle spielt, ist die keratinocyten-spezifische und membrangebundene Transglutaminase K. Diese wird ganz spezifisch im Stratum granulosum exprimiert (Nonomura et al. 1993). Posttranslationale Acylierung mit Palmitin- oder Myristinsäuren verankern Transglutaminase mit der Plasmamembran und bringen sie damit in geradezu perfekte Position, Proteine an der Zellmembran anzuordnen und miteinander zu vernetzen (Blumenberg and Tomic-Canic 1997).

Ein sehr markantes Charakteristikum der suprabasalen Schichten sind die protein- und lipidreichen Granula (Manabe and O'Guin 1992). Die proteinreichen Granula sind vorwiegend aus Profilaggrin zusammengesetzt und werden Keratohyalingranula genannt. Sie vereinigen sich im weiteren Verlauf der Differenzierung zu größeren sternförmigen Granula. Im Stratum corneum lösen sie sich auf. Kleinere, glatte und fast sphärische Granula werden oft assoziiert mit Keratohyalingranula vorgefunden. Sie enthalten Loricrin und werden L-Granula genannt, um sie von den Profilaggrin enthaltenden F-Granula zu unterscheiden. Die Funktion dieser kleineren Granula scheint darin zu liegen, Loricrin zu speichern, bis es im Laufe der Verhornung benötigt wird (Blumenberg and Tomic-Canic 1997).

Im Gegensatz zu den proteinreichen Keratohyalingranula tragen die Lamellengranula vorwiegend zur Lipidzusammensetzung des Stratum corneum bei. Sie werden auch Odlandbodies genannt und besitzen eine Phospholipidmembran. Diese fusioniert mit der Plasmamembran und extrudiert ihren Inhalt in den Interzellularraum. Einmal extrazellulär bildet sich aus dem ausgestossenen Lipiden und Material der apikalen Zellmembran kontinuierliche Scheiden, die die Lipidpermeabilitätsbarriere des Stratum corneum darstellen.

1.2.1.4 Stratum corneum

Das sich an das Stratum granulosum anschließende Stratum corneum besteht je nach Körperregion aus unterschiedlich vielen Zellschichten. Die Hornschicht ist in sich uneinheitlich. Sie kann in zwei Zonen unterteilt werden, von denen die mehr basal liegende noch eher dem Stratum granulosum gleicht, die mehr apikal liegende zu Hornschuppen umgestaltete Zellen aufweist.

Es kommt zum Abbau der Nuclei und der Zellorganellen. Die bereits miteinander vernetzten Keratinintermediärfilamente (Tonofilamente) fusionieren weiter unter Mithilfe des aus den Keratoyalingranula stammenden Filaggrin zu einer homogenen Masse. Auch die anderen oben angesprochenen Vorgänge der Differenzierung kommen in dieser Schicht zum Abschluss.

1.2.1.5 Regulation von Proliferation und Differenzierung in der Epidermis

Proliferation und Differenzierung in der Epidermis werden von verschiedenen Hormonen gesteuert.

Vitamin $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$, die biologisch aktive Form des Vitamin D, induziert Keratinozytendifferenzierung und unterdrückt die Proliferation (Hosomi et al. 1983, Matsumoto et al. 1990, Bikle and Pillai 1993). Itin et al. (1994) und Gniadecki (1996) jedoch beschrieben einen mitogenen Effekt von Vitamin $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ auf Keratinocyten. Die Wirkung ist in vitro konzentrationsabhängig: Konzentrationen geringer als 10^{-9}M stimulierten das Wachstum bzw. Proliferation in definiertem Serum freien Medium, wohingegen Konzentrationen von 10^{-8}M das Wachstum supprimieren (Gurlek et al. 2002).

Retinolsäure, die biologisch aktive Form des Vitamin A, stimuliert die Proliferation der Keratinozyten in der Epidermis und supprimiert die terminale Differenzierung in kultivierten Keratinozyten, was sich in einer Inhibition der Expression von Differenzierungsmarkern wie K1 und 10 (Fuchs et al. 1981, Fisher et al. 1996) oder Filaggrin (Asselineau et al. 1990) darstellt.

Ein weiterer Faktor stellt der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) dar (Cohen et al. 1963). Er ist ein im Organismus weit verbreitetes kleines Polypeptid, das weitestgehend die Proliferation stimuliert und die Expression von Differenzierungsmarkern in Zellkulturen von Keratinozyten (Marchese et al. 1990; Cha et al. 1996; Wakita and Takigawa 1999; Hashimoto 2000, De Potter et al. 2001) inhibiert. Es gibt eine Reihe EGF-ähnlicher Moleküle wie z. B. humaner Transforming Growth Factor- α (TGF- α), der Poxvirus Growth Factor, Heparinbinding Growth Factor, Amphiregulin, Epiregulin und Betacellulin. Sie zeichnen sich, genau wie EGF selbst, durch eine hohe Affinität zum EGF Rezeptor (EGFR, HER1 oder ErbB-1), ihre proliferative bzw. mitogene Wirkung und eine hohe strukturelle Homologie untereinander aus (Todaro et al. 1980, Cohen et al. 1990, Wujcik et al. 2006). Einige Autoren haben aber auch einen differenzierenden Effekt des EGFR über eine mögliche Tyrosinphosphorylierung einer Proteinkinase C δ (PKC δ) beschrieben (Denning et al. 2000). Der EGFR besitzt eine hydrophobe Transmembrandomäne, die eine extrazelluläre Bindungsstelle für den Liganden

von einer cytoplasmatischen Domäne trennt, die für die vom EGF regulierte Tyrosinkinase kodiert (Ullrich et al. 1984, Carpenter et al. 1978, Ushiro et al. 1980). Nach Bindung des Liganden kommt es zunächst über die Transmembrandomäne zur Dimerisierung des Rezeptors und zu einer Autophosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne. Verschiedene Pfade der Signaltransduktion werden nun besprochen. Der am besten charakterisierte ist wohl die Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) mit anschließender Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP $_3$) (Wahl et al. 1989, Wang et al. 2006). Mit Hilfe von Adapterproteinen wie Grb2 und SOS kommt es zur Ras-Aktivierung. Dabei handelt es sich um ein kleines G-Protein, dessen Aktivierung eine ganze Kaskade von Proteinkinasen (z. B. mitogenassoziierte Proteinkinase (MAPK) anstößt (Carpenter et al. 1990, Yarden et al. 2001, Fickova 2002, Wujcik 2006). Über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI $_3$ K) wird schließlich die Proteinkinase B (PKB, Akt) aktiviert (Hanada et al. 2004, Wang et al. 2006). Die verschiedenen ausgelösten Mechanismen führen zu Zellproliferation, Mobilität einzelner Zellen, Apoptose oder auch Angiogenese (Yarden and Slikowski 2001). An anderer Stelle wurde gezeigt, dass Inaktivierung des EGFR, der hauptsächlich in den Basalzellschichten der Epidermis und auch in der äußeren Wurzelscheide des Haarapparates exprimiert wird (Nanney et al. 1984, Fukuyama et al. 1991), die Proliferation der humanen Keratinocyten *in vitro* inhibiert und die terminale Differenzierung initiiert (Peus et al. 1997).

1.2.2 Hautanhangsgebilde

1.2.2.1 Haare

Haare sind Keratinfäden, die aus spezifischen Einstülpungen, den Haarfollikeln (Haarbälgen) entstehen. Grundsätzlich lässt sich das Haar in einen freien Haarschaft und eine Haarwurzel, die in einer röhrenförmigen Wurzelscheide steckt, unterteilen. Man unterscheidet die epitheliale Wurzelscheide, welche innen zu liegen kommt, von der bindegewebigen Wurzelscheide, die die epitheliale umgibt. Die epitheliale Wurzelscheide kann als eine röhrenförmige Einstülpung der Epidermis verstanden werden. Sie ist in einen kompliziert gebauten inneren und in äußeren Anteil unterteilt. Die innere epitheliale Wurzelscheide wird nochmals in Henlesche und Huxlesche Schicht unterteilt. Beide exprimieren K1 und 10 und sind mit dem sich differenzierenden Stratum spinosum zu vergleichen (Stark et al. 1990, Fuchs 1990). Die Zellen der äußeren epithelialen Wurzelscheide transkribieren die Gene von K5 und 14 und stammen aus dem Stratum basale der Epidermis (Fuchs 1996)

Einleitung

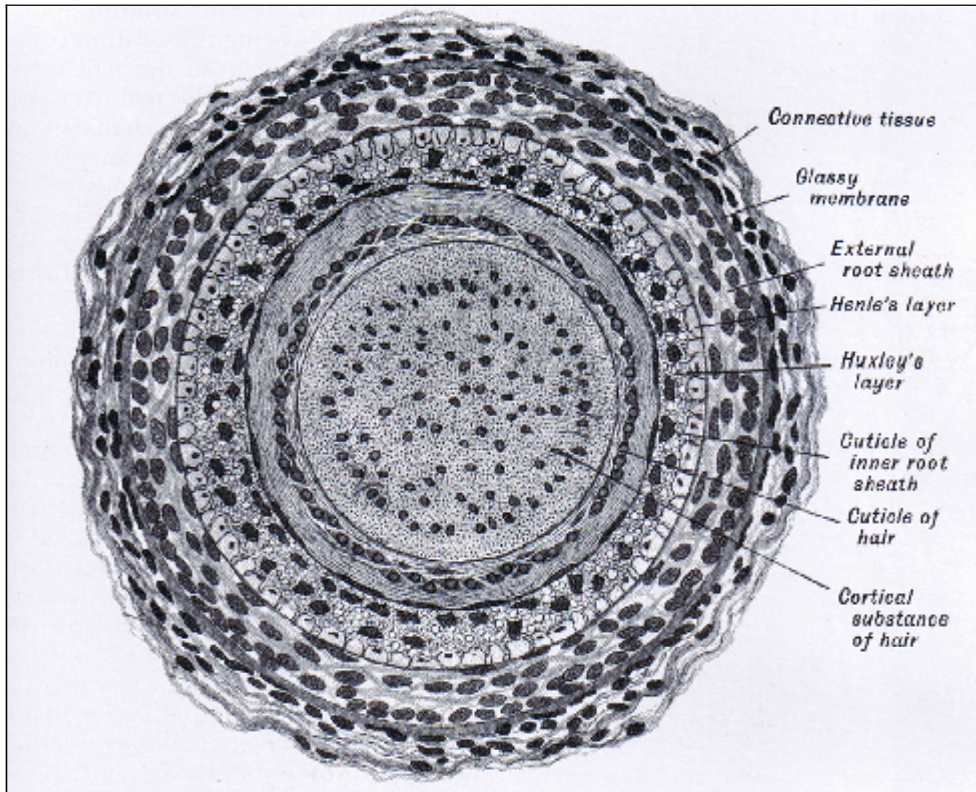


Abb. 3 Zeichnung eines Querschnitts durch den Haarfollikel in Schweinehaut (Schema nach Bloom and Fawcett 1994)

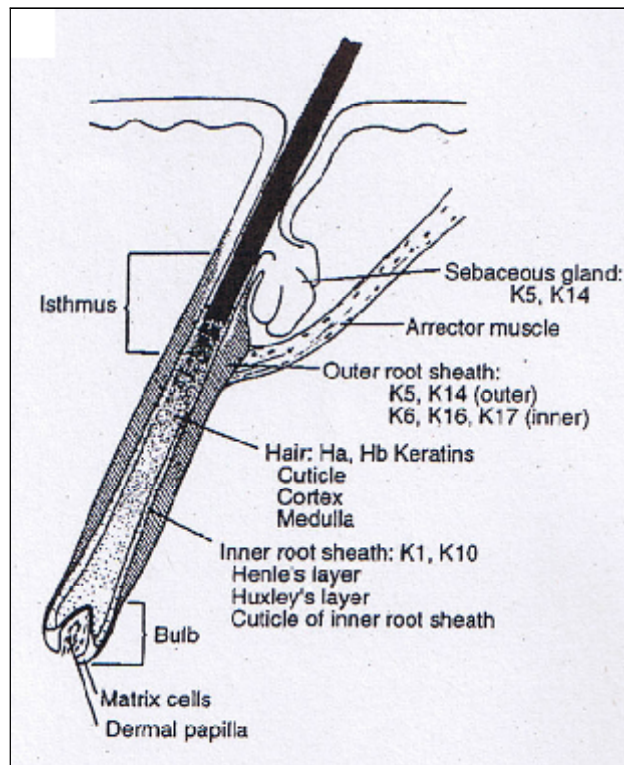


Abb. 4 Haarfollikel. In der Wachstumsphase des Haarzyklus interagieren Zellen der dermalen Papille mit den proliferierenden Matrixzellen des Bulbus. Ein bisher unbekannter Trigger

bewegt diese Zellen zur Zellteilung und Migration isthmuswärts. Dabei formen sie konzentrische Ringe mit unterschiedlich differenzierten Stadien: das Haar mit haarspezifischen Keratinen, die innere epitheliale Wurzelscheide (IRS) mit den Keratinen K1 und 10 und die äußere Wurzelscheide (ORS) mit den Keratinen K5 und 14 (Fuchs 1996).

1.2.2.2 Talgdrüsen

Talgdrüsen sind bis auf wenige Ausnahmen an Haare gekoppelt (Glandulae sebaceae pilorum).

Talgdrüsen sind holokrine Drüsen, die ihr Sekret durch das Zugrundegehen der Drüsenzellen produzieren. Deswegen müssen ständig neue Zellen gebildet werden. Dies erfolgt in basalen Schichten von Epithelzellen, die der Basalmembran der Glandula aufliegen. Als Sekrete werden eine Mischung von Triacylglycerinen, freien Fettsäuren, Cholesterin und anderen Arten von Estern in Form von Lipidtropfen ins Cytoplasma eingelagert. Während dieses Prozesses wandern die Zellen ins Zentrum der Drüse, werden pyknotisch und platzen schließlich, wobei ihr Sekret (Talg, Sebum) freigegeben wird. Über den Ductus sebaceus gelangt der Talg in den Haarfollikel. Spezifische Keratine für Talgdrüsen sind K 5 und 14 (s. Abb. 4)

1.2.2.3 Schweißdrüsen

Im menschlichen Organismus finden wir zwei unterschiedliche Arten von Schweißdrüsen vor: Die ersteren liegen vorwiegend in Achsel- und Perianalgegend und sind an Haarfollikel gekoppelt. Ihr Sekretionsmechanismus ist *apokriner* Art. Die letzteren verteilen sich über den ganzen Körper und sind von Haarfollikeln unabhängig. Ihr Sekretionsmechanismus ist *ekkriner* Art. Die Funktion der apokrinen Drüsen wird hinsichtlich kommunikativer Aspekte gedeutet. Die ekkrinen Drüsen haben eine wichtige Rolle in der Regulation des Wärme Gleichgewichts inne. Das Stratum corneum wird durch ihr Zutun in einem hydrierten Zustand gehalten und damit widerstandsfähig gegenüber Reibungstraumen.

1.2.2.3.1 Ekkrine Schweißdrüsen

Bei den ekkrinen Schweißdrüsen handelt sich um einfache tubuläre Drüsen. Sie bestehen aus einem Drüsenendstück, die als unregelmäßiges Knäuel in der tiefen Dermis oder Subkutis lokalisiert sind, und einem senkrecht nach oben ziehenden Ausführungsgang. Das Drüsenendstück ist einschichtig mit relativ weiteren Lumen als die Ausführungsgänge. Der Basallamina der Drüsenendstücke anliegend befinden sich die Myoepithelzellen. Sie haben

keine sekretorische Funktion, sondern dienen dem Schutz vor Sekretstau durch Kontraktion der Endstücke.

Das Epithel des Ausführungsganges ist ein zwei- bis dreischichtiges. Die Zellen der Ausführungsgänge sind untereinander durch Desmosomen verbunden und verhörnen in ihren intrakornealen Portionen. Das Epithel der ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert verschiedene Cytokeratine. Die K5 und K14 werden von den Drüsenendstücken exprimiert. Einige Autoren berichten auch von K10 und K11 in Epithelzellen der Endstücke (Yamamoto et al. 2000). Die basalen Zellen der Ausführungsgänge synthetisieren die K5 und 14, genau wie das Stratum basale der Epidermis (Moll et al. 1992, Fuchs 1996). Die luminalen Zellen der Ausführungsgänge exprimieren neben K14 noch u. a. K1, 10, und 11 (Stark et al. 1990, Eckert et al. 1992, Yamamoto et al. 2000)

1.2.2.3.2 Apokrine Schweißdrüsen

Apokrine Schweißdrüsen kommen gehäuft in Achsel- und Genitoanalregion sowie auf den Mamillen vor. Bezüglich des Aufbaus liegen ganz ähnlich wie bei den ekkrinen auch bei den apokrinen Schweißdrüsen einfache tubuläre Drüsen vor. Sie haben ebenfalls als sekretorischen Anteil ein knäueliges Konvolut, das in tiefer Dermis bzw. Subkutis liegt und in einen senkrecht aufsteigenden Ausführungsgang mündet. Der mündet, im Unterschied zu den ekkrinen Drüsen, im infundibulären Teil des Haarfollikels, entspricht vom Aufbau aber den Ausführungsgängen der ekkrinen Schweißdrüsen.

Ein weites Lumen und einschichtiges Epithel kennzeichnen den sekretorischen Anteil, der nur aus einer Zellart besteht. Die zipfeligen Fortsätze des Epithels ragen in das Lumen hinein und erwecken bei ungünstiger Schnittführung den Eindruck, dass Zellfortsätze frei im Lumen liegen. Daraus wurde auf die apokrine Sekretion dieser Drüsen geschlossen.

Nach heutiger Ansicht wird das Sekret jedoch in elektronendichten, PAS-positiven Sekretgranula produziert, die durch Exocytose an das Lumen abgegeben werden.

Die Keratinexpression entspricht in Struktur und Qualität dem der ekkrinen Schweißdrüsen (s. o., Fuchs 1996, Yamamoto et al. 2000).

1.3 Fragestellung

Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit war einerseits die morphologische Analyse des PTPIP51 in der Haut verschiedener Spezies. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das Protein in Beziehung zu epidermalen Differenzierungsmarkern steht. Dies erfolgte am

Beispiel von K5 und 14 als Marker für die Basalzellen und K1 und 10 als Beispiel für früh differenzierende Keratinocyten.

Die Genexpression wird in den basalen und suprabasalen Zellschichten der Epidermis durch Faktoren beeinflusst, die Proliferation bzw. Differenzierung induzieren (Jetten 1990, Denning et al. 1996). Diese Faktoren wirken über Signaltransduktionswege, bei denen Tyrosinphosphorylierung von zentraler Bedeutung ist (Filvaroff et al. 1990). Deshalb war es von Interesse am Beispiel von EGF den Effekt eines solchen Faktors auf die Expression des PTPIP51 zu untersuchen. Hierzu wurde eine immortalisierte Linie humaner Keratinocyten (HaCaT) verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebegewinnung und Gewebverarbeitung

Die zu untersuchenden Gewebe wurden von AVB-Mäusen (Harlan–Winkelmann, Borcheln; n=5) mit einem Gewicht von 25-30g und Wistar-Ratten (Tierstall des Physiologischen Instituts, Universität Gießen; n=5) mit einem Gewicht von 200-300g entnommen. Zusätzlich stellte und das Physiologische Institut der Universität Gießen unterschiedliche Hautproben von Meerschweinchen zur Verfügung. Nach Tötung der Tiere durch Inhalation von Halothan (Rüsch, Böblingen) wurden die Tiere thorakotomiert und der Herzbeutel eröffnet. Für histologische Untersuchungen wurde der linke Ventrikel kanüliert und das Blut mit Vorspüllösung (25g/l Polyvinylpyrrolidon MW 40000, 9g/l NaCl, 5g/l Procainhydrochlorid in aq. bidest., eingestellt auf pH 7,4) aus dem Kreislauf gewaschen. Zuvor wurde über einen kleinen Schnitt im rechten Vorhof ein Abfluss geschaffen, um so die orthograde Durchströmung und die retrograde Durchströmung des kleinen Kreislaufs zu ermöglichen. Anschließend wurde das Tier durch die liegende Kanüle mit Zamboni-Fixativ (150ml/l gesättigte Pikrinsäure; Merck, Darmstadt), 50ml/l Formaldehyd (37%; Roth, Karlsruhe), 500ml/l Phosphatpuffer (0,2M, pH 7,4), mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt) perfundiert und die benötigten Gewebe entnommen. Anschließend wurden die Gewebeproben in Zamboni-Lösung für durchschnittlich 3-4h bei Raumtemperatur nachfixiert. Dann wurden die Proben mindestens viermal für eine Stunde in 0,1M Phosphatpuffer (PB) pH 7,4 gewaschen. Zur Kryoprotektion wurden die Proben anschließend über Nacht in Saccharose-Lösung (PB + 18% Saccharose; Merck, Darmstadt) überführt, in dem Gefriereinbettmedium Tissue Tek (Sarkura, Zoeterwoude, Niederlande) orientiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Gewebe wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Humane Hautproben wurden mir freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schulz und von Leichenmaterial des Instituts für Anatomie und Zellbiologie des Universitätsklinikums Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Kummer zur Verfügung gestellt. Für weitere histologische Untersuchungen wurden die entnommenen humanen Hautproben in Zamboni-Fixativ für durchschnittlich 4-6h bei Raumtemperatur fixiert und anschließend im gleichen Procedere wie die Gewebeprobe von Maus und Ratte weiterverarbeitet.

Hautproben, die nach dem Western Blot-Verfahren weiterverarbeitet werden sollten, wurden in schmelzendem Isopentan schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2 Lichtmikroskopische Immunhistochemie

Um das Protein P51 in der Epidermis und in anderen Epithelien in situ zu lokalisieren, wurden die Methoden der lichtmikroskopischen Immunhistochemie verwendet.

2.2.1 Einfache Immunfluoreszenz

Es wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz gewählt, bei der im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz der Primärantikörper nicht mit einem Fluorochrom markiert ist.



Abb. 5 Kryostat (Leica Modell 1900M, Nussloch)

Dadurch wurden eine größere Sensitivität und eine höhere Flexibilität beim Einsatz der Detektionssysteme ermöglicht.

Gefrierschnitte mit einer Dicke von $7-10\mu\text{m}$ wurden am Kryostat (Leica Modell 1900M, Nussloch; Boxtemperatur je nach Gewebe $-18- -22^{\circ}\text{C}$, Präparattemperatur je nach Gewebe –

21- -25°C, s. Abb. 5) angefertigt und auf mit Chromalaun/Gelatine beschichtete Objektträger (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat; Riedel-de-Haen, Seelze) aufgenommen.

Nach einer Stunde Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit einem Pap Pen (SCI Sciences Sevices, München) umfahren. Die immunhistochemische Inkubation begann mit der Zugabe des Primärantikörpers gegen das Protein PTPIP51 in der optimal ausgetesteten Verdünnung (Menge ca. 20µl pro Schnitt, Verdünnung s. unten). Verdünnt wurde der Antikörper in Blocklösung (10% normales Ziegen Serum, 5% Rinderserumalbumin (BSA, Serva, Heidelberg), 0,1% Cold Water Fish Skin Gelatine in PB mit 9g/l NaCl), um zusätzlich unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken (Hauri and Bucher 1986). Die Inkubation der Schnitte erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in PB mit 9g/l NaCl (PBS) gewaschen. Anschließend wurde der Flüssigkeitsrest abgesaugt und der Sekundärantikörper gelöst in Inkubationspuffer (PB mit 18g/l NaCl) in geeigneter Verdünnung (s. Tab. 1) aufgetragen. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer und bei Bedarf in Dunkelheit) wurde erneut dreimal zehn Minuten mit PBS gespült. Alle Schnitte wurden mit gepuffertem Glycerol (pH 8,6) als Medium eingedeckelt und zur Stabilisierung der Immunofluoreszenz im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Doppelimmunofluoreszenz

Zur simultanen Darstellung von zwei Antigenen in einem Schnitt wurde das Doppelimmunofluoreszenzverfahren durchgeführt. Das grundsätzliche Vorgehen entspricht dem zuvor beschriebenen. Jedoch wird zusätzlich zu dem PTPIP51 Antikörper ein weiterer Primärantikörper der Inkubationslösung hinzugefügt. Voraussetzung ist, dass der weitere Primärantikörper aus einer unterschiedlichen Spezies stammt. Seine verwendete Endkonzentration entspricht dem jeweiligen Verdünnungsoptimum bei einfacher Immunofluoreszenz. Zur Detektion kamen Cy3- und FITC-markierte Sekundärantikörper zeitgleich zum Einsatz. Wurden biotinierte Sekundärantikörper eingesetzt, verwendete man diesen zunächst allein und schloss anschließend die Inkubation mit einem Gemisch aus dem FITC-markierten Sekundärantikörper und dem Streptavidin-Texas-Rot-Komplex ab.

2.2.3 Primärantikörper

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete polyklonale Antikörper gegen PTPIP51 wurde in dem Labor von Herrn Prof. Dr. W. Hofer hergestellt (Welte 2000) und wurde bereits in der Studie von Frau Welte eingesetzt und charakterisiert. Zur Herstellung verwendete man ein gereinigtes und rekombinantes Proteinfragment von PTPIP51. Zur Immunisierung wurde einem Kaninchen über einen Zeitraum von 35 Tagen hinweg in steigenden Dosen das entsprechende Antigen injiziert.

Es zeigte sich, dass die Immunisierung zu einer Zunahme von anti-P51-IgG führte.

In eigenen Versuchsreihen mit den Antisera konnte eine optimale Verdünnung des PTPIP51-Antikörpers für die Immunhistochemie von 1:250 ermittelt werden.

Um eine eventuelle Kolokalisation zwischen PTPIP51 und spezifischen Keratinen aus der Epidermis nachweisen zu können, wurde ein zweiter Primärantikörper verwendet. Es handelte sich hierbei um einen monoklonalen Antikörper Anti-Cytokeratin 8.60 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), der mit den Cytokeratinen K10 und 11, mit geringerer Reaktivität auch mit K1, reagiert. Der Antikörper markiert somit die suprabasalen, sich differenzierenden Schichten der Epidermis, aber auch individuelle Zellen anderer Plattenepithelien. Als Arbeitsverdünnung wurde die vom Hersteller empfohlene Verdünnung von 1:20 verwendet, womit zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden.

Außerdem wurde ein weiterer monoklonaler Antikörper Anti-Cytokeratin 37 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) verwendet, der die basalen Zellen (K5 und 14) von verhornenden Plattenepithelien identifiziert, verwendet. Eingesetzt wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:400, die wiederum vom Hersteller empfohlen worden waren.

Zur Untersuchung von Kolokalisationen der PTP1B bzw. der TCPTP mit dem potentiellen Interaktionspartner des PTPIP51 zu untersuchen, wurden die beiden monoklonalen Antikörper gegen diese beiden Phosphatasen (Oncogene Research Products, Cambridge/England) jeweils in einer Verdünnung von 1:20 verwendet.

Weitere Antikörper kamen bei der Markierung subzellulärer Strukturen zum Einsatz:

Das Endoplasmatische Retikulum wurde mit Hilfe von Anti-PDI (Abcam, Cat.# ab5484, Chicago, Illinois/USA) markiert. Die verwendete Verdünnung betrug 1:100. Der Golgi-Apparat ließ sich mit dem Marker Anti-Golgin-97 (MoBiTeC, Cat.# A-21270, Göttingen, Deutschland) detektieren. Die Arbeitsverdünnung betrug 1:200. Mitochondrien wurden mit Hilfe einer Färbung von Cytochrom Komplex V (Molecular Probes, Cat# 70B 1-3, Leiden/Niederlande) identifiziert. Dieser Antikörper reagiert mit der Untereinheit α des Komplexes und wurde mit einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

2.2.4 Sekundärantikörper

Eine genaue Liste der verwendeten Sekundärantikörper, der Wirtsspecies, ihrer Hersteller und der eingesetzten Verdünnungen findet sich in Tab. 1.

Sekundärantikörper

<i>Erkannte Spezies</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Wirtsspecies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Quelle</i>
Kaninchen	Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Ziege	1:500	Organon Teknika, Eppelheim
Kaninchen	Indocarbocyanin (Cy 3)	Ziege	1:250	Dianova, Hamburg
Kaninchen	Biotin	Schaf	1:100	Amersham- Buchler, Braunschweig
Kaninchen	Alexa Fluor 555	Ziege	1:1000	Molecular Probes, Leiden/ Niederlande

Tabelle 1. Liste der verwendeten Sekundärantikörper und Immunreagenzien.

Material und Methoden

Maus	Alexa Fluor 488	Ziege	1:500	Molecular Probes, Leiden/ Niederlande
Maus	Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Esel	1:400	Dianova, Hamburg
Maus	Indocarbocyanin (Cy 3)	Esel	1:1000	Dianova, Hamburg
Maus	Biotin	Schaf	1:400	Amersham- Buchler, Braunschweig

Tertiärreagenz

<i>Erkanntes Molekül</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Bindendes Molekül</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Quelle</i>
Biotin	Texas-Rot	Streptavidin	1:200	Amersham- Buchler, Braunschweig

Tabelle 1.(Fortsetzung) Liste der verwendeten Sekundärantikörper und Immunreagenzien.

2.2.5 Spezifitätskontrollen

Kontrollen auf unspezifische Bindungen wurden durch eine Präabsorption des polyklonalen PTPIP51-Antiserums über Nacht bei 4°C mit korrespondierenden PTPIP51-Protein (Konzentration: 20µg Antigen/ml Antiserum) durchgeführt. Danach erfolgte eine weitere immunhistochemische Bearbeitung wie oben beschrieben. Eine Positivkontrolle ohne Antigenzugabe wurde mitgeführt.

Als weitere Kontrolle wurde der Primärantikörper unter Beibehaltung aller anderen Schritte ausgelassen, um somit unspezifische Bindungen durch die Sekundärantikörper nachzuweisen.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Gewebe, die mit den Methoden der Immunfluoreszenz markiert worden waren erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopen (Fotofluoreszenzmikroskop BX 60 F der Firma Olympus, Hamburg, Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS SP2 der Firma

Leica Microsystems GmbH, Heidelberg und Universalmikroskop Axioplan 2 imaging der Firma Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, s. Abb. 6).

Diese Methode der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Prinzip, dass verschiedene Fluorochrome, durch Bestrahlung mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht angeregt werden und in Folge Licht einer längeren Wellenlänge emittieren. Zur Kontrolle autofluoreszierender Strukturen wurden Sperrfilter und Anregungsfilter mit unterschiedlichen Wellenlängen verwendet (s. Tab. 2).

Je nach Filterkombination passiert emittiertes Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs den Sperrfilter und kann wahrgenommen werden.

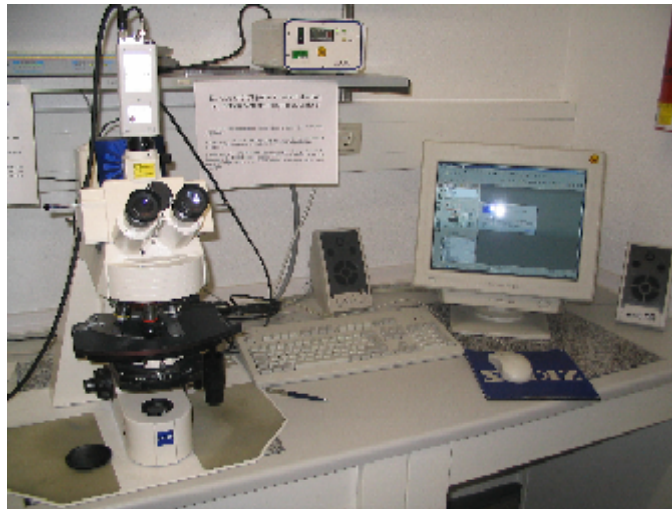


Abb. 6: Universalmikroskop Axioplan 2 imaging der Firma Carl Zeiss Jena GmbH, Jena.

<i>Filterkombination</i>	<i>Fluorchrom</i>	<i>Erregerfilter</i>	<i>Sperrfilter</i>
U-MNIB	FITC	band pass 470-490 nm	Bandpass 515-550 nm
U-MWIY	Texas-Rot	band pass 545-580 nm	long pass 610 nm
U-M41007A	Cy-3	band pass 525-560 nm	band pass 420-460 nm
U-M41007A	UV-Filter	band pass 390-560nm	475nm longpass

Tab. 2 Liste der verwendeten Filterkombinationen

2.2.7 Dokumentation

Zur Dokumentation und Auswertung der Untersuchungsreihe wurden Schwarz-Weiß-Fotos und Farbdia mittels eines an das Mikroskop angeschlossenen Fotoapparates angefertigt. Für Schwarz/Weiss-Aufnahmen wurden 400 ASA-Filme (Kodak TMY 400) und für Farbdia positive 64 ASA-Filme (AGFA EPY 64) verwendet.

Zusätzlich wurden die mikroskopischen Bilder mit einem Videodokumentationssystem (Scion-Image, Jena) als TIFF-Dateien gespeichert. Diese Bilder wurden mit einer Bildverarbeitungssoftware (Adobe Photo-Shop 2.0) nachgearbeitet und konnten über einen Fotodrucker (Codonics Modell NP-1660M) ausgegeben werden.

Bereits fotografisch dokumentierte Befunde wurden eingescannt und ebenfalls als TIFF-Dateien gespeichert.

2.3 In Situ Hybridisierung

2.3.1 Gewebepreparation

Die Hautproben, die der In Situ Hybridisierung unterzogen wurden, wurden wie oben beschriebenen entnommen, fixiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden Kryostatschnitte mit einer Schnittdicke von 5-10µm angefertigt und auf Superfrost-Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Deutschland) aufgenommen. Es folgte eine einstündige Antrockenzeit.

Um HaCaT-Zellen, die auf Culture Slides gewachsen waren, nach der Methodik der In Situ Hybridisierung zu untersuchen, wurden diese für 10min in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die

weitere Verarbeitung erfolgte analog der oben beschriebenen Methode für Kryostatschnitte. Verwendete Lösungen wurden bis einschließlich dem Schritt der Hybridisierung in RNase freiem aq. bidest. (0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)) angesetzt bzw. verdünnt.

2.3.2 Prähybridisierung

Um die Zellmembranen im Gewebe zu permeabilisieren, wurden die Objektträger 10 min in PBS mit 0,25% Triton-X-100+ 0,25% Nodidet P-40 gegeben.

Anschließend folgte eine einstündige Inkubation in 20 % Glycerol.

2.3.3 Hybridisierung

Nach der Prähybridisierung wurden die Schnitte mit DIG-markierten Sense- bzw. Antisense cRNA-Proben in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Dazu wurde ein Sondengemisch mit den cRNA, 10 µg/ml Salmon-Sperm-DNA und 10µg/ml Yeast tRNA zusammengegeben. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 50% deionisiertem Formamid, 10% Dextransulfat, 2x SSC (300mM NaCl, 30mM Natriumzitat, pH 7.0), 1x Denhardt-Reagenz (2% BSA, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon). Sondengemisch und Hybridisierungspuffer wurden zusammenpipettiert und auf die Schnitte gegeben (ca. 50µl pro Schnitt).

Die Objektträger wurden für 10min auf einer Heizplatte bei 70°C abgelegt, um anschließend auf einem Kühlakku abgeschreckt zu werden. Es folgte eine Inkubation in einer Hybridisierungskammer bei 42°C über Nacht.

2.3.4 Posthybridisierung

Zu Beginn der Posthybridisierung wurden die Objektträger viermal 10-15min in 4fachem SSC-Puffer bei 42°C gewaschen. Dann folgte ein 15-20min Waschen in 2fachem SSC-Puffer bei 60°C gefolgt 15-20min in 0,2fachem SSC-Puffer bei 42°C. Anschließend wurde 5min bei Raumtemperatur in 0,1fachem SSC-Puffer und abschließend in 2fachem SSC-Puffer für ebenfalls 5min bei Raumtemperatur gewaschen.

2.3.5 Immunhistochemie

Zu Beginn wurden die Objektträger für 10min bei Raumtemperatur in einfacher Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base (TNMT) gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation in 3% BSA-Blockpuffer bei Raumtemperatur. Über Nacht bei 4 °C in Feuchter Kammer erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers Anti-DIG-Fab-Antikörpers mit einer Verdünnung von 1:500 in 1% BSA-Puffer.

Am nächsten Tag wurde zunächst zweimal 10min in einfachem TNMT-Puffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift in Nitroblautetrazoliumchlorid-Puffer (NTB) für 5min und weitere 5min in 5mM Levamisol in einfachem NTB-Puffer.

Anschließend erfolgte das Entwickeln mit Nitroblautetrazolium/Brom-Chlor-Indolyolphosphat (NTB-BCIP)-Lösung in völliger Dunkelheit. Die benötigte Zeit für das Entwickeln war dabei sehr variabel (min-h).

Anschließend wurde nochmals 5min in 5mM Levamisol in einfachem NTB-Puffer gewaschen. Nach kurzem Waschen in aq. bidest. wurde in Glycergel eingedeckelt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zelllinie

Für die Untersuchung der Exprimierung von PTPIP51 in Abhängigkeit der Differenzierungsstadien in lebenden Keratinocyten wurde eine immortalisierte humane Keratinocyten-Zelllinie (HaCaT, Boukamp et al. 1988) verwendet. Die Zelllinie wurde uns freundlichst von Herrn Prof. Dr. H.-J. Teschemacher der Abteilung Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen überlassen (Genehmigung: DKFZ Heidelberg, MTA L-4598).

2.4.2 Kulturbedingungen

Zur Anzucht wurden 75cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) für 1h mit fetalem Kälberserum (FKS; PAA, Marburg) beschichtet. Danach wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium (SIGMA, Deisenhofen), das je 500ml mit 50ml Fetalem Kälberserum und 5ml Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PSA; Invitrogen) angereichert wurde, suspendiert. Die HaCaT-Zellen wurden dreimal wöchentlich einem Mediumwechsel unterzogen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.3 Splitting

Die HaCaT-Zellen wurden nach 7-10 Tagen gesplittet. Hierfür wurden die adhären wachsenden Zellen durch Zugabe von 3ml 100mM PBS / 0,05%-EDTA inkubiert und anschließend mit 3ml Trypsin-EDTA (PAA, Marburg) von der Zellkulturflasche gelöst und 10min bei 500g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Hilfe einer silikonisierten Pasteurpipette mehrmals trituiert und dann im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

2.4.4 Kryokonservierung

Die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen HaCaT-Zellen wurden 10 Minuten bei 500g zentrifugiert, um eine Mindestmenge von 5×10^6 Zellen pro ml zu erhalten. Anschließend wurde das Zellpellet im Einfriermedium (RPMI 1640, 10% FKS, 1% PSA, 10% Dimethylsulfoxid(DMSO)) resuspendiert und in 1,8 ml fassende Kryoröhrchen (Cryogenic Vials; Nalgene Rockster/USA) portioniert. Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einen Cryo 1° Freezing Container (Nalgene Rockster/USA) positioniert, der die Zellen mit einer gleichmäßigen Geschwindigkeit von 1°C/min auf -70°C kühlt. Schließlich wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.5 Auftauen

Bei Bedarf wurden die Kryoröhrchen für 2-3min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt wurde in 9ml angewärmtes Kulturmedium pipettiert und 10min bei 500g zentrifugiert, um die Bestandteile des Einfriermediums möglichst gründlich zu entfernen. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Kulturmedium versetzt und in einer 75cm² Zellkulturflasche ausgesät. Anschließend wurden die Zellen wie üblich inkubiert.

2.5 Zellversuch mit EGF

2.5.1 Durchführung

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die HaCaT-Zellen nach einem weiteren Splitting pro Versuchsansatz in jeweils zwei 75cm² Kulturflaschen und auf einen "Culture Slide" pro Versuchsbedingung ausgesät. Die Zelldichte betrug bei Aussaat 1000 Zellen/100µl. Die Kammerung des Objektträgers in acht Näpfe ermöglichte es, unter gleichen Versuchsbedingungen in mehreren Näpfen parallel HaCaT-Zellen auszusäen und zu behandeln und in der sich anschließenden Immunhistochemie zusätzlich 2 Näpfe für Spezifitätskontrollen zu nutzen. Nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz – ca. nach 4 Tagen bei täglichem Mediumwechsel (400µl frisches Medium pro Napf) wurden die Zellen in ein Kulturmedium mit 1% FKS überführt, um Interferenzen mit etwaigen endogenen Bestandteilen des FKS auf die Versuchsansätze zu vermeiden. Parallel wurde in einer anderen Versuchsreihe mit zu diesem Zeitpunkt alternativ auf 5% Panexin (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) gewechselt. Panexin ist ein Mediumzusatz für Zellkulturen, der nach Angabe (mündliche) des Herstellers kein endogenes EGF enthält. Nach weiteren 24h

wurden nun das EGF, in den entsprechenden Konzentrationen (s. Tab. 3) im Nährmedium gelöst, den Zellen zugegeben.

Dabei wurden die Mediumzusätze, 5% Panexin und 1% FKS, jeweils beibehalten. Die Inkubation erfolgte weitere 24h. Danach wurden in die Kulturflaschen 500µl 2fach Laemmlipuffer (125mM Tris/HCl pH 6,6 + 4% Natrium Dodecylsulfat (SDS) + 5% Glycerol + 0,005% Bromphenol Blau) gegeben und die Zellen mit einem Cellscrapper (23cm, Nalge Nunc International, USA) von Flaschenboden gelöst, im Puffer für 10min bei 70°C erhitzt und anschließend bei 15000rpm für 10min abzentrifugiert. Bis zur Weiterverarbeitung mittels Westernblotverfahren wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.

Die Zellen, die auf den Culture Slides gezüchtet worden waren, wurden nach Absaugen des Kulturmediums für 20min in Zamboni fixiert und dann einer Immunhistochemie unterzogen. Im Anschluss an die Immunhistochemie wurden die Kerne mittels DAPI-Färbung dargestellt, um bei der Auswertung die Gesamtzahl der Zellen erfassen zu können. Dazu wurden die Culture Slides für 5min in einer Küvette mit 0,5µg/ml DAPI gelöst in Methanol inkubiert, dann 5min in reinem Methanol gespült. Anschließend wurden die Slides nochmals für 10min in PBS gespült, bevor sie in gepufferten Glycerol eingedeckelt wurden.

2.5.2 Auswertung

Zur Klärung der konzentrationsabhängigen EGF Effekte (Konzentrationen siehe Tab. 3) auf die Exprimierung von PTPIP51, wurden pro Versuchsansatz und Versuchsbedingung ein Culture Slide mit 8 Nöpfen einer bestimmten EGF-Konzentration jeweils entweder mit 1% FKS oder 5% Panexin als Mediumszusatz verwendet. Unter 400facher Vergrößerung wurde dann zufällig sechs verschiedene Felder innerhalb eines Napfes mit jeweils einer Fläche von ca. 0,04 mm² sowohl mit PTPIP51 Färbung (Filter U-MNIB für FITC bzw Filter U-M41007A für Cy3) als auch mit Kernfärbung (Filter U-M41007A für DAPI) aufgenommen (s. Abb. 7). Die Gesamtzahl der PTPIP 51 positiven Zellen eines Bereiches wurde in Relation zur Gesamtzellzahl dieses Bereiches gesetzt. Dabei wurden bis zu 1000 Zellen in 6 Feldern ausgezählt. Der Versuch wurde sechsmal wiederholt (n=6). Die Ergebnisse wurden in Tabellen vermerkt (s. Abb. 8) und anschließend in Microsoft Excel eingegeben, um Mittelwerte, zugehörige Standardabweichungen und den SEM für den Anteil der reaktiven Zellen zu bestimmen. Daraufhin wurden geeignete Diagramme im selbigen Programm erstellt.

Eine weitere statistische Analyse wurde mit Hilfe eines SPSS-Programmes durchgeführt (SPSS Inc. Chicago, Illinois/USA). Die Verhältnisse zwischen PTPIP51 positiven Zellen und

der Gesamtzahl der Zellen wurden anhand eines nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war.

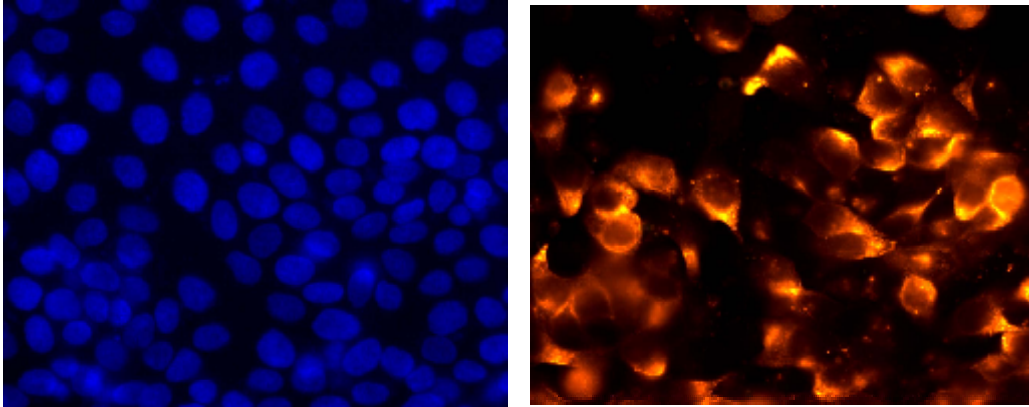


Abb. 7 HaCaT-Zellen bei 400facher Vergrößerung auf Culture Slides gewachsen; linkes Bild: DAPI-Kernfärbung (Filter U-M41007A); rechtes Bild: dieselbe Lokalisation mit Filter U-M41007A (Cy3) zur Darstellung der PTPIP51 positiven Zellen.

Tab. 3 Daten und Konzentrationen des verwendeten Wachstumsfaktors in der Zellkultur

Name	Abkürzung	Konzentration in mol/l	Herkunft
Epidermal Growth Factor	EGF	10^{-9}	SIGMA, Saint Louis/USA
		10^{-8}	
		10^{-7}	
		10^{-6}	

HaCaTprojekt:

Kulturmedium mit Zusatz:

Inkubationsdauer (Stunden):

Wachstumsfaktor (Konzentration):

Primärantikörper (Verdünnung):

Sekundärantikörper (Verdünnung):

DAPI-positiv	P51-positiv

Notizen:

Abb. 8 Auswertungsbogen für den EGF-Versuch.

2.6 Western Blot

2.6.1 Durchführung

Nach Auftauen der in Laemmlipuffer eingefrorenen Zellen, wurden den Proben 0,2% Mercaptoethanol zugegeben, um die in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken aufzuspalten. Zur Inkubation wurden die Proben erneut 10min bei 95°C belassen. Anschließend wurde kurz anzentrifugiert.

Als Trenngel wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel (10% Acrylamid) verwendet und auf Immobilon-PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) geblotet. Unspezifische Proteinbindungen wurden mit 10% Magermilchpulver, gelöst in TTBS (0,025M Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, Tween 20 0,05% (v/v)), für 1h geblockt und anschließend mit Anti-PTPIP51-AntiSerum (1:500) in TTBS mit 2,5% Magermilchpulver über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TTBS (3x10min) erfolgte die Inkubation mit anti-Kaninchen IgG-Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:10000; Promega, Mannheim), in TTBS mit 2,5% Magermilchpulver für 1h, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit

Material und Methoden

TTBS (2x10min). Abschließend wurde nochmals für 10min mit TM (0,1M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1M NaCl, 5mM MgCl₂) gespült. Dann wurde die Aktivität der an das Sekundärreagenz gekoppelten alkalischen Phosphatase mit NTB-BCIP Phosphatase Substrate 1-C (KPL, Maryland USA) über eine Farbreaktion nachgewiesen.

3. Ergebnisse

3.1. Einfache Immunofluoreszenz

3.1.1 Lokalisation des PTPIP51 in der Haut

In Vorversuchen mit entsprechenden Verdünnungsreihen wurde eine optimale Konzentration für den aus Kaninchen gewonnenen Antikörper gegen PTPIP51 von 1:250 für Rattengewebsschnitte bei Epidermis und Dermis ermittelt. Diese Konzentration führte auch in humanem und Mäusegewebe zu einem optimalen Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund.

Im Folgenden wurden immunocytochemische Untersuchungen an Proben von Maus, Ratte, Meerschweinchen und humaner Haut durchgeführt.

3.1.1.1 Epidermis

Wie in Abbildung 9 dargestellt ist, reagiert die Epidermis aller untersuchten Spezies in charakteristischer Weise einheitlich: Das Stratum basale war in allen untersuchten Proben PTPIP51 negativ. Eine Reaktivität des Antikörpers gegen PTPIP51 war nur in den suprabasalen Schichten zu finden. Eine detaillierte Analyse zeigte Unterschiede in der Reaktivität zwischen den verschiedenen Spezies. Während bei tierischen Geweben die Reaktivität sich langsam über den Verlauf des Stratum spinosum mit einem Maximum an Reaktivität im Stratum granulosum und Stratum corneum einstellte (Abb. 10 a), zeigte sich beim Menschen eine gleichmäßig starke Reaktivität ab dem Stratum spinosum, die auch das Stratum granulosum einschloss (Abb. 10 b). Das Stratum corneum war in seiner Reaktivität durchwegs uneinheitlich (s. Abb. 11).

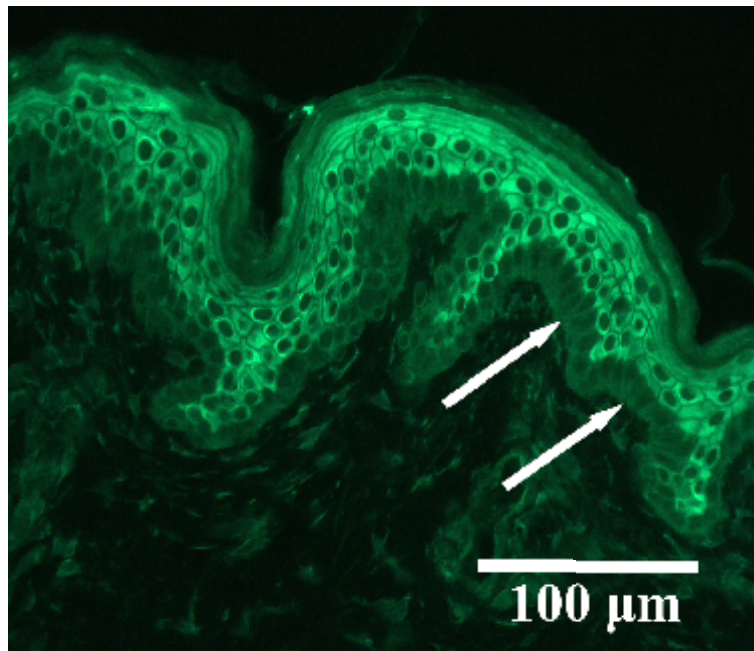


Abb. 9 Immunreaktivität von PTPIP51 in humaner Epidermis. Das Stratum basale weist keine Reaktion auf (s. Pfeile).

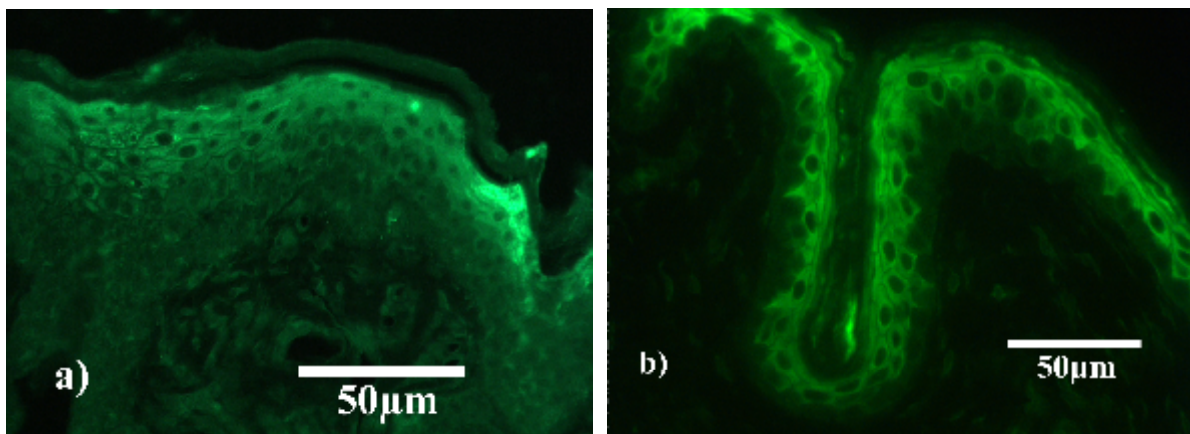


Abb. 10 a) Immunreaktivität von PTPIP51 in der Epidermis einer Ratte,
b) PTPIP51 Immunreaktivität in humaner Epidermis

Zusätzlich wurden den Tieren Gewebeproben an unterschiedlichen Stellen entnommen, wie Kopf, Pfote/Hand, Bauch, Brust und im Bereich der Achsel, um so die Lokalisation des PTPIP51 in Felderhaut, Leistenhaut und behaarter Haut vergleichen zu können. Wie Abb. 11 a) und b) belegen, zeigt sich, dass die Epidermis in allen Arealen bezüglich ihrer Immunreaktivität des PTPIP51 identisch reagiert - nämlich mit einem negativem Stratum basale und stark positiven suprabasalen Zelllagen.

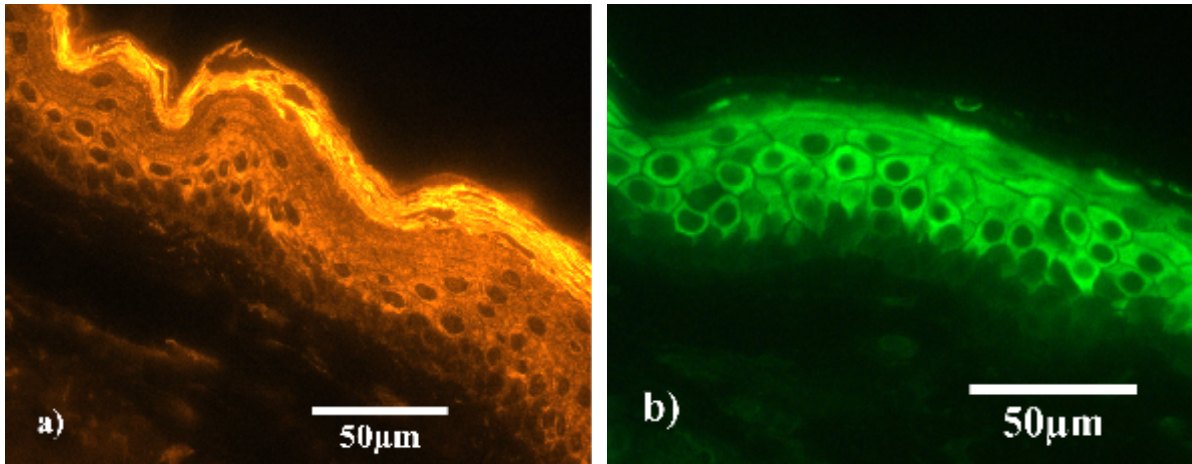


Abb. 11 a) Immunreaktivität von PTPIP51 in humaner Leistenhaut (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*),

b) Immunreaktivität von PTPIP51 in humaner Kopfhaut (*Sekundärantikörper FITC*)

Auf cytologischer Ebene (Abb. 12) zeigt sich, dass die positive Reaktion innerhalb der Keratinocyten *in vivo*, wie übrigens auch in den meisten anderen Epithelzellen (s. Abb. 13, 16, 17 und 18), auf das Cytoplasma beschränkt ist. Nucleus und Zellmembran bleiben dagegen in der Regel ausgespart.

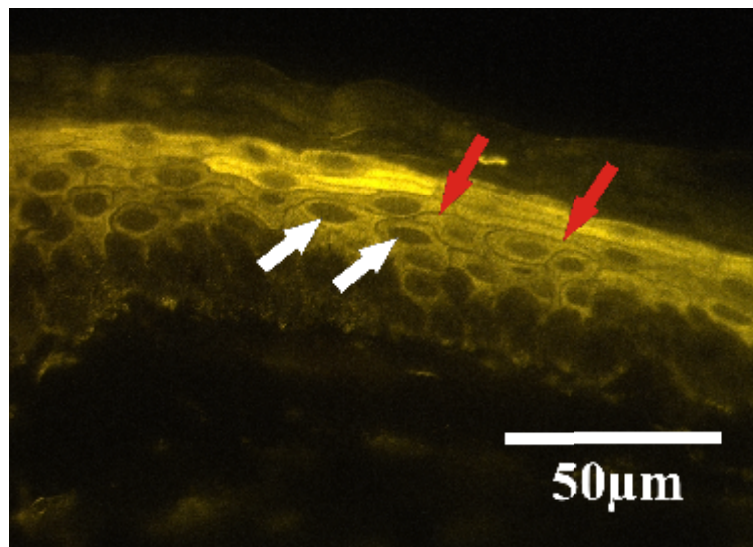


Abb. 12 Immunreaktivität von PTPIP51 in humaner Epidermis (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*). Ausbleibende Reaktion in Nucleus (weiße Pfeile) und Zellmembran (rote Pfeile)

3.1.1.2 Lokalisation des PTPIP51 in den Anhangsgebilden der Haut

3.1.1.2.1 Ekkrine Schweißdrüsen

Immunocytochemische Reaktionen mit dem Antikörper gegen PTPIP51 in den Hautanhangsgebilden fiel schwächer aus als in der Epidermis. Wie Abb. 13 zeigt, sind die Ausführungsgänge und Endstücke der ekkrinen Schweißdrüsen PTPIP51 immunreaktiv. Die etwas diffus erscheinende Reaktion ist in allen Zellen zu beobachten, wobei die Nuclei wiederum ausgespart bleiben (Abb. 13 a).

3.1.1.2.2 Apokrine Schweißdrüsen

Apokrine Drüsen sind vorwiegend auf die Areale von Achseln, Genitoanalregion, Brustwarzen beschränkt. Auch ihre Endstücke weisen eine positive PTPIP51 Reaktion auf (Abb.13 b). Das einschichtige Epithel der Drüsenendstücke weist eine positive Reaktion für PTPIP51 auf, die in ihrer Intensität in etwa der der ekkrinen Endstücke vergleichbar ist.

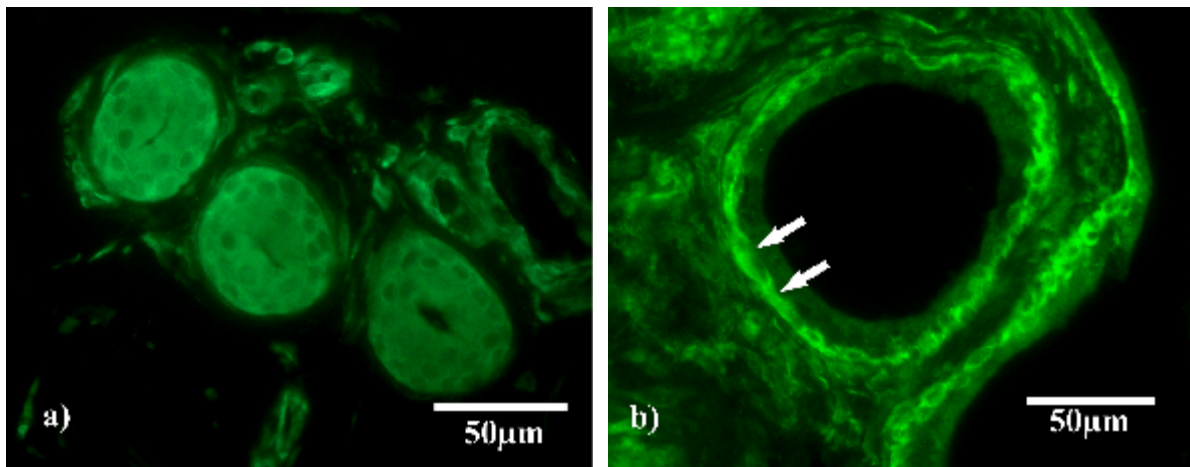


Abb. 13a) PTPIP51 Immunreaktivität ekkriner Schweißdrüsen in humaner Haut. Es handelt sich hier um Ausführungsgänge,

b) PTPIP51 Reaktivität einer apokrinen Schweißdrüse in humaner Haut. Das einschichtige Epithel der Endstücke weist eine positive Reaktion auf (weiße Pfeile).

3.1.1.2.3 Talgdrüsen

Die Glandulae sebaceae weisen mit dem Antikörper gegen PTPIP51 positive Reaktionen auf. Diese sind von der Intensität mit denen der Schweißdrüsen vergleichbar, wobei eine starke Reaktivität in den basalen Ersatzzellen zu verzeichnen ist. Außerdem erscheinen sowohl die

Zellmembran als auch die Kernmembran sowie die perinucleare Regionen positiv. Ebenso sind auch die pyknotischen Zellkerne der sich in Talg umwandelnden Zellen markiert.

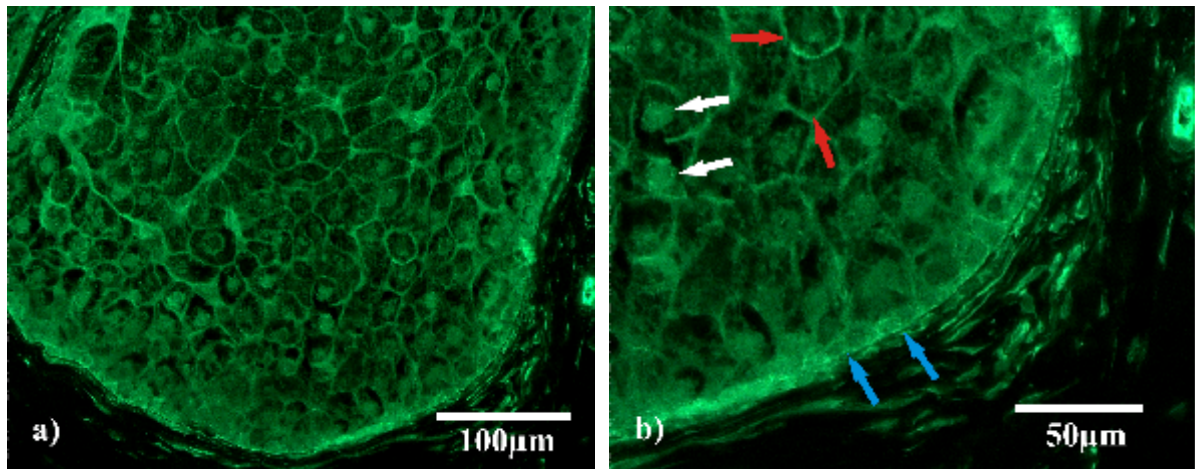


Abb. 14 a) PTPIP51 Immunreaktivität in einer holokrinen Drüse humaner Haut, 200fache Vergrößerung,

b) gleiche Drüse bei höherer Vergrößerung (400fach). Positive Reaktionen der pyknotischen Zellkerne (weiße Pfeile), der Zellmembran (rote Pfeile) und der Basalzellen (blaue Pfeile).

3.1.1.2.4 Haarfollikel

Im Haarapparat zeigt sich eine sehr charakteristische Verteilung des PTPIP51. So findet sich im Kortex und der Medulla mit sich nach peripher anschließender Cuticula keine Reaktion mit dem Antikörper gegen PTPIP51. Dagegen hebt sich die innere Wurzelscheide auf Grund ihrer sehr starken Reaktion mit dem Antikörper gut davon ab, was sowohl im Querschnitt als auch im Längsschnitt deutlich zu erkennen ist (Abb. 15). Die äußere epitheliale Wurzelscheide bleibt weitestgehend negativ, bis auf die äußerste Zellschicht, deren Zellmembranen oder cytoplasmatische Strukturen, die räumlich eng mit der Zellmembran assoziiert sind, eine eindeutig positive Reaktion aufweisen (s. Abb. 15 b).

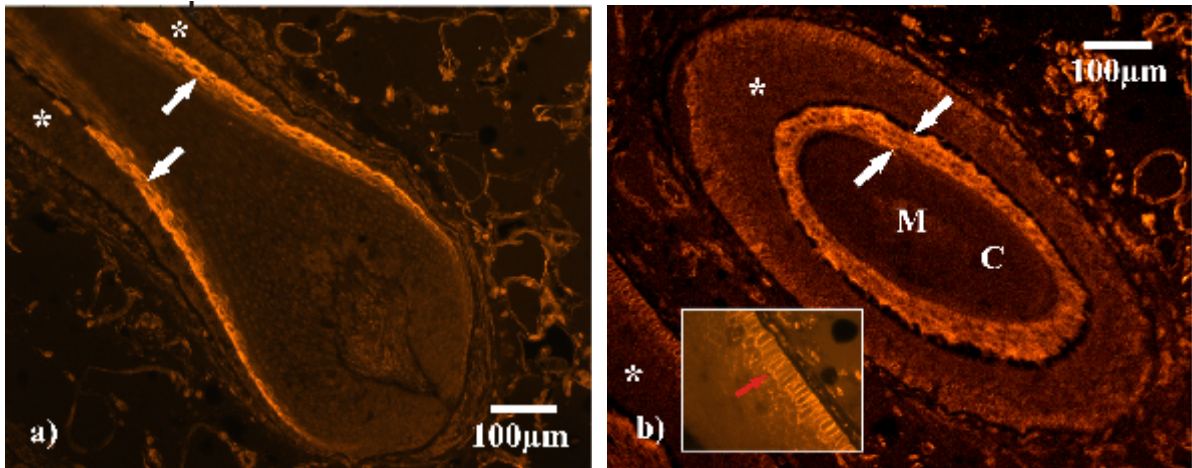


Abb. 15 PTPIP51 Immunreaktion im Haarapparat

a) Längsschnitt durch ein humanes Haar mit Reaktivität von PTPIP51 in der inneren epithelialen Wurzelscheide (weiße Pfeile) und ausbleibender Reaktion in der äußeren Wurzelscheide (*),

b) Querschnitt durch ein humanes Haar mit gleicher Reaktivitätsverteilung und der Unterteilung des Haares in Medulla (M) und Cortex (C), Vergrößerung im Bild zeigt die positive Reaktion der Zellmembranen oder zellmembrannahen Strukturen der äußeren Zelllage der äußeren epithelialen Wurzelscheide.

3.1.2 Lokalisation des PTPIP51 in anderen Epithelien

3.1.2.1 Mehrschichtig verhorntes Plattenepithel

Das mehrschichtige verhornte Epithel der Zunge und oraler Mucosa von Ratte und Maus weist eine der Epidermis vergleichbare Reaktion mit dem Antikörper gegen PTPIP51 auf. Die basale Schicht der Keratinozyten ist nahezu negativ, suprabasalwärts wird die Reaktion mit dem Antikörper gegen PTPIP51 zunehmend stärker. Die Reaktivität des Epithels bildet einen zur Oberfläche hin gerichteten Gradienten (s. Abb. 16).

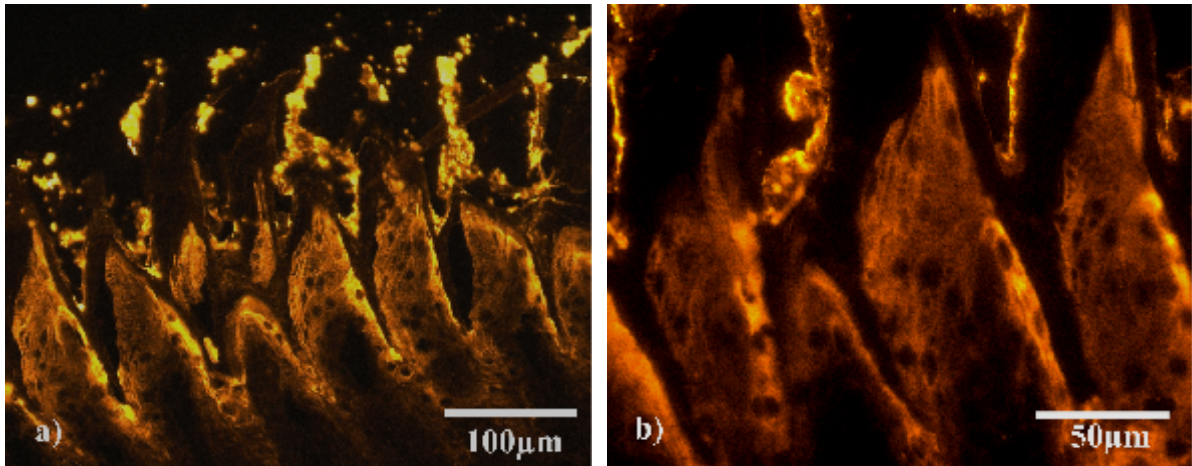


Abb.16 PTPIP51 Immunreaktivität des Oberflächenepithels der Rattenzunge,
a) bei 200facher Vergrößerung,
b) bei 400facher Vergrößerung

3.1.2.2 Mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel

Es zeigte sich in dieser Art von Epithel eine ebenfalls eine positive Reaktion der suprabasalen Schichten. Außerdem ist auch der schon oben erwähnte von basal nach suprabasal entstehende Gradient zu beobachten (Abb. 17). Da jedoch nur Ösophagusgewebe von Ratte und Meerschweinchen zur Verfügung stand und beide einen gewissen Grad der Verhornung zeigten, ist ein Stratum corneum zu sehen. Dies ist in seiner Reaktivität weitestgehend negativ (s. Abb 17). Zudem sind im Stratum basale die Zellmembranen oder peripher cytoplasmatische Strukturen der Epithelzellen markiert (Abb 17, weiße Pfeile), ganz ähnlich denen der äußeren epithelialen Wurzelscheide im Haar (s. Abb. 15 b).

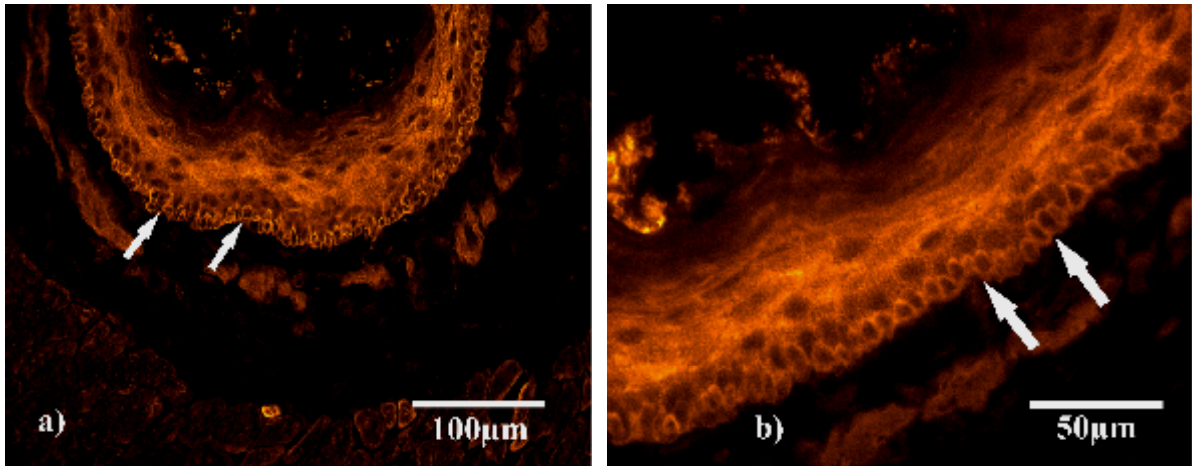


Abb.17 PTPIP51 Immunreaktivität im Epithel des Ösophagus einer Ratte

a) Übersichtsvergrößerung (200fach),

b) 400fache Vergrößerung: Die Zellmembranen oder periphere cytoplasmatische Strukturen des Stratum basale zeigen eine positive Reaktion (weiße Pfeile).

3.1.2.3 Mehrreihiges Epithel (Urothel)

PTPIP51 ist in allen Schichten des Urothels mittels Immuncytochemie nachweisbar. Die Reaktion des Antikörpers beschränkt sich auf das Cytoplasma. Die Zellkerne bleiben weitestgehend ausgespart. Perinucleär fällt gelegentlich eine verstärkte Reaktionen auf (s. Abb. 18).

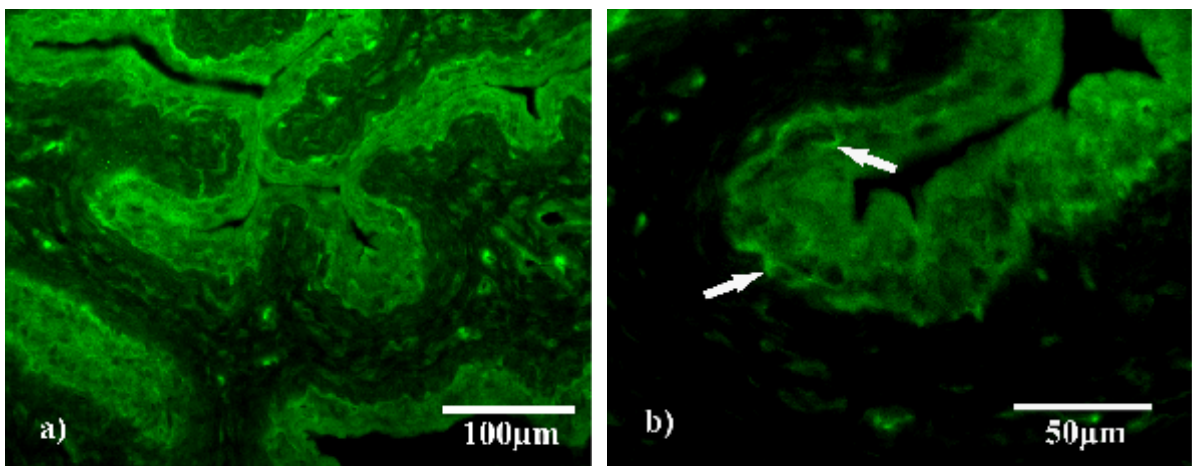


Abb. 18 PTPIP51 Immunreaktivität im Urothel einer Ratte

a) Übersichtsvergrößerung,

b) 400facher Vergrößerung: Die weißen Pfeile markieren verstärkte positive perinucleäre Bereiche.

3.2 Doppelimmunofluoreszenz

Zur Charakterisierung der PTPIP51haltigen Zellen wurden Doppelimmunreaktionen durchgeführt. Zur Markierung der proliferativen Zellschicht wurde ein Antikörper gegen die Cytokeratine K5 und 14 verwendet. Die Markierung von differenzierenden Zellen wurde ein Antikörper gegen die K1 und 10 verwendet.

3.2.1 PTPIP 51 und K5/14 Immunreaktivität

Die Doppelmarkierung der Antigene PTPIP51 und K5 und 14 zeigt innerhalb der Epidermis keine gleiche Verteilung. Während die Markierung mit den Antikörpern gegen PTPIP51 wie gewohnt erfolgt (s. Abb. 19 a), ist das Stratum basale mit dem Antikörpern gegen K5 und 14 positiv, während die suprabasalen Schichten nicht reagieren (s. Abb. 19 b).

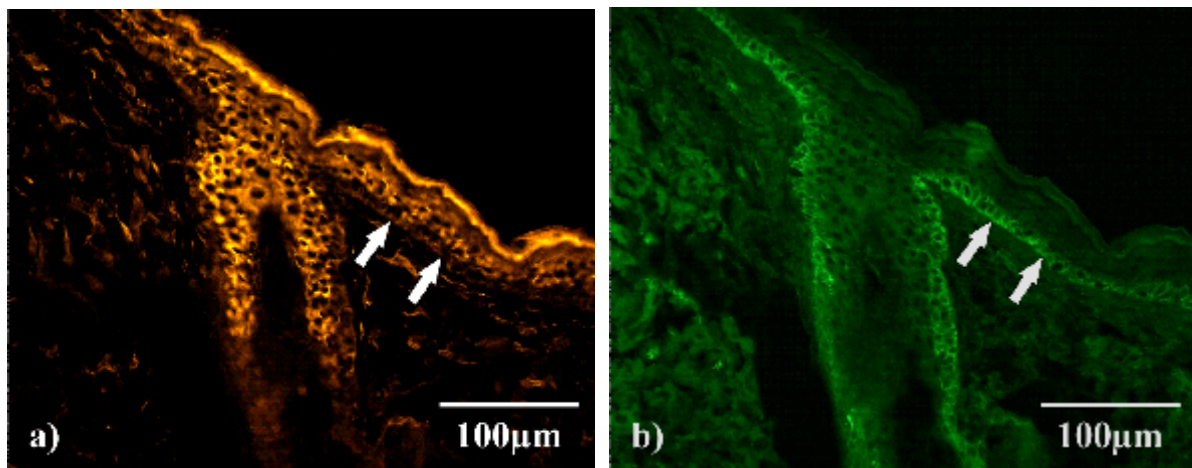


Abb. 19 Doppelimmunreaktion von PTPIP51 und K5 und 14

a) PTPIP51 Reaktion (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*) und

b) K5 und 14 Reaktion (*Sekundärantikörper FITC*) in humaner Epidermis.

Das Stratum basale (weiße Pfeile) zeigt eine positive Immunreaktion bei K5 und 14.

3.2.2 PTPIP51 und K1/10 Immunreaktivität

Die Doppelmarkierung der Antigene PTPIP51 und K1 und 10 zeigt innerhalb der Epidermis eine identische Verteilung. Das Stratum basale ist mit beiden Antikörpern negativ, während die suprabasalen Schichten stark positiv reagieren (s. Abb. 20).

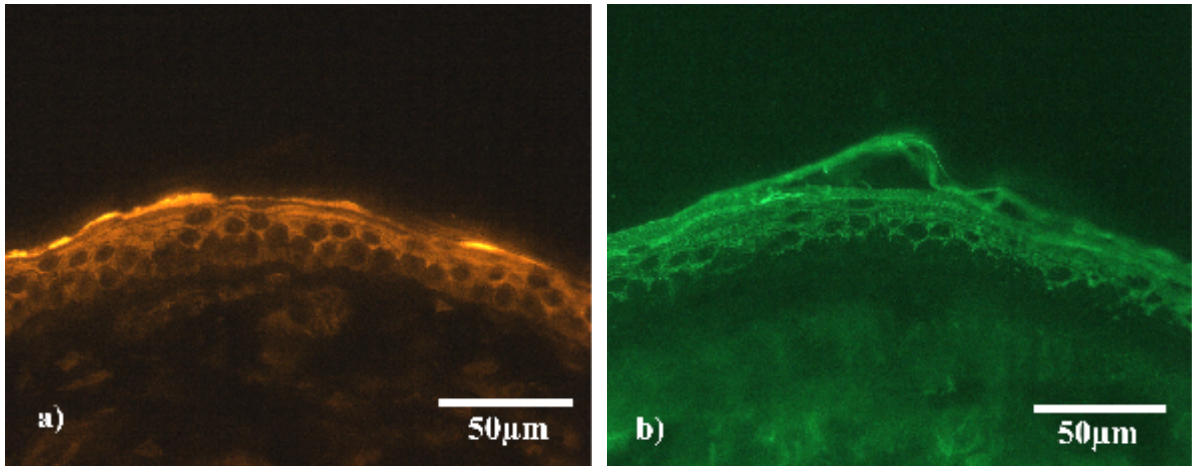


Abb. 20 Doppelimmunreaktion von PTPIP51 und K1 und 10 in humaner Epidermis

- a) PTPIP51 (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*),
- b) K1 und 10 (*Sekundärantikörper FITC*)

Diese Gleichverteilung findet sich nicht für die Hautanhangsgebilde wie Haar, Schweißdrüsen und Talgdrüsen. PTPIP51 ist in der inneren epithelialen Wurzelscheide nachzuweisen, nicht aber K1 und 10 (s. Abb. 21 a und b).

Lediglich in den luminalen Anteilen der ekkrinen Drüsenendstücke kam es zu einer Übereinstimmung der Reaktion beider Antikörper (s. Abb.21 c und d).

Eine identische Verteilung der beiden Antigene findet sich nur bei den mehrschichtigen Epithelien aus Oesophagus und Zunge, die Verhornung zeigen.

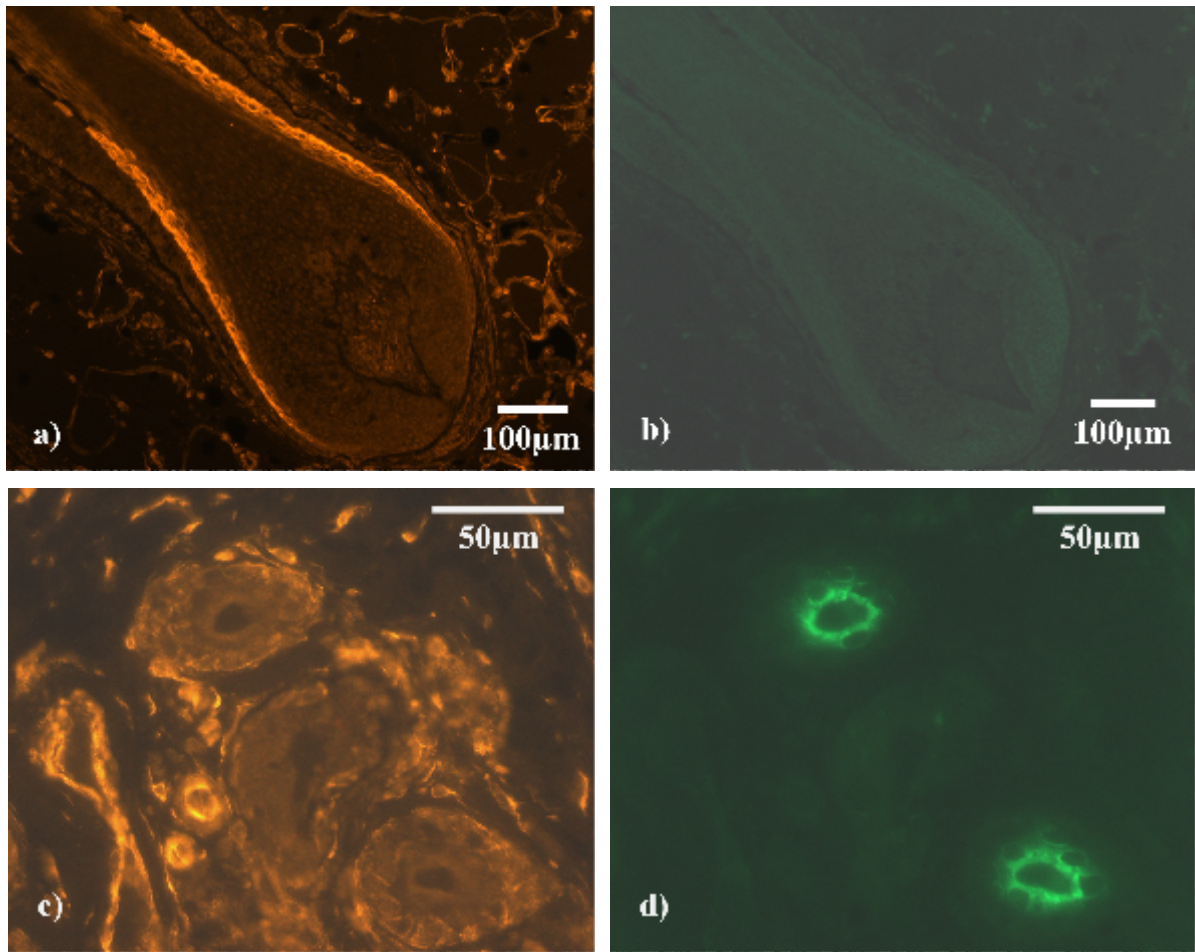


Abb.21 PTPIP51 und K1 und 10 Immunreaktivität in Hautanhangsgebilden von humaner Haut

- a) Haar im Längsschnitt mit Markierung von PTPIP51 (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*),
- b) gleiches Haar mit Markierung von K1 und 10 (*Sekundärantikörper FITC*),
- c) Ausführungsgänge ekkriner Schweißdrüsen mit verstärkt basaler Markierung des PTPIP51,
- d) gleiche Stelle im Schnitt mit dem Antikörper gegen K1 und 10, vorwiegend luminal reagierenden Anteilen.

3.2.3 Doppelimmunofluoreszenz mit Antikörpern gegen TCPTP und PTP1B

Zur Überprüfung eventueller Gleichverteilung von potentiellen Interaktionspartnern der PTPIP51 wurden Doppelfärbungen mit den Antikörpern gegen PTPIP51 und die beiden in Frage kommenden PTPs, PTP1B und TCPTP, durchgeführt.

3.2.3.1 PTPIP51 und TCPTP Immunreaktivität

In der Epidermis in Abb. 22 ist die Lokalisation des PTPIP51 auf die suprabasalen Schichten beschränkt. Bei der TCPTP kam es lediglich zu einer sehr schwachen Reaktion in den suprabasalen Schichten der Epidermis humaner Haut mit einem sich nach apikal

verstärkendem Gradienten. Bei den Hautanhangsgebilden wie ekkrinen Schweißdrüsen und Haarfollikel mit Talgdrüsen ließ sich keine Gleichverteilung von PTPIP51 und den zum Teil extrem geringen Markierungen der TCPTP erkennen.

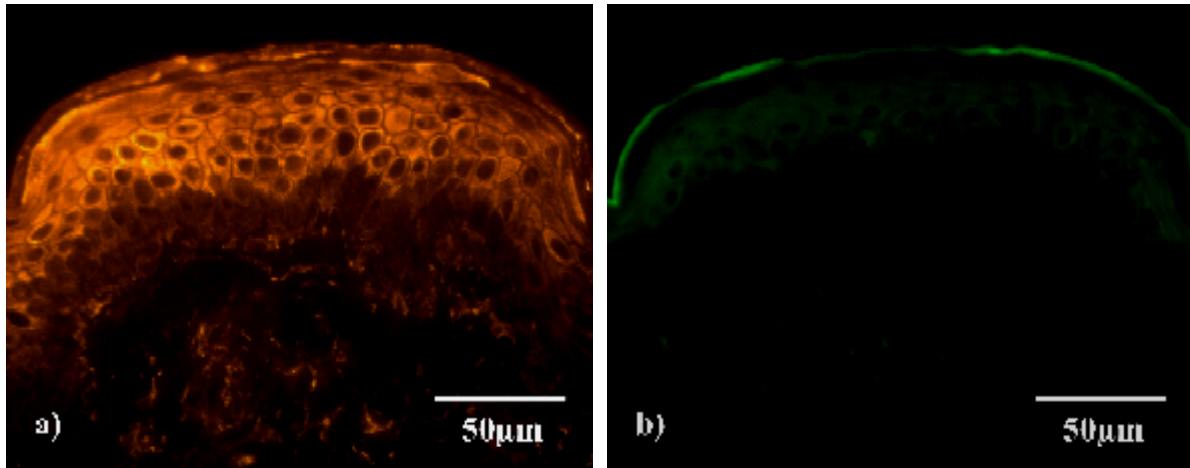


Abb. 22 Doppelmarkierung der PTPIP51 und TCPTP in humaner Haut

a) PTPIP51 (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*),

b) TCPTP (*Sekundärantikörper FITC*)

3.2.3.2 PTPIP51 und PTP1B Immunreaktivität

Die Doppelimmunreaktion der Haut mit dem Antikörper gegen PTPIP51 und PTP1B zeigte ein gänzlich unterschiedliches Verteilungsmuster für die beiden Proteine in der Epidermis humaner Haut. Während PTPIP51 in erwähnter Lokalisation zu finden war, zeigte sich mit dem gegen PTP1B gerichteten Antikörper lediglich eine Reaktion in den einzelnen Zellen, die nach morphologischen Gesichtspunkten Langerhans-Zellen entsprachen (s. Abb. 23). Auch in den Hautanhangsgebilden zeigten sich keinerlei Übereinstimmungen in der Lokalisation von PTPIP51 und PTP1B. Hier sind ebenfalls dendritische Zellen PTP1B positiv (s. Abb. 24).

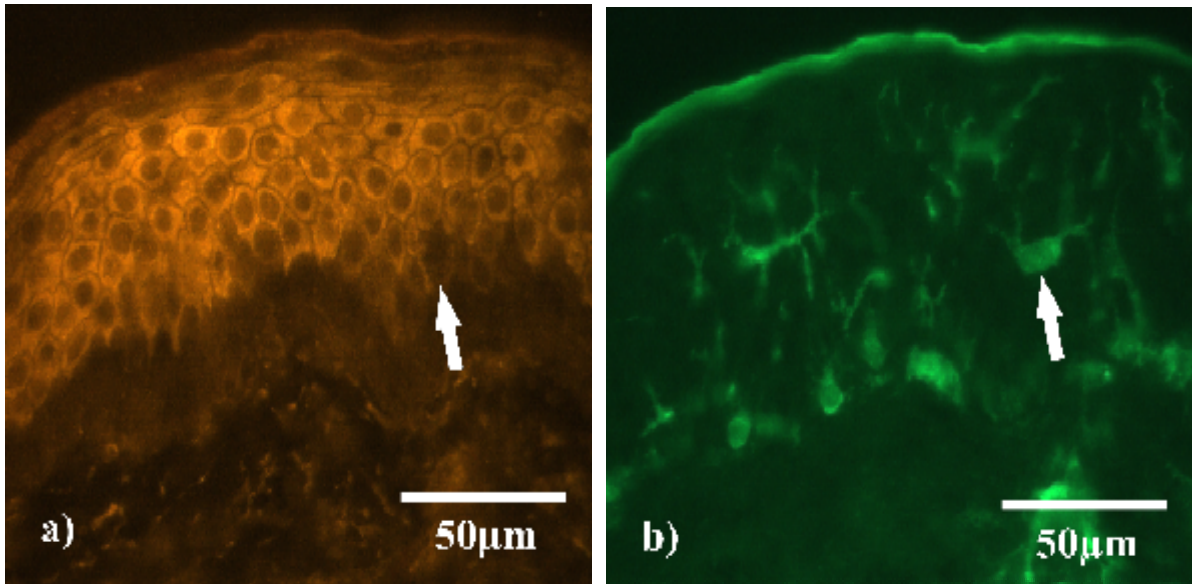


Abb. 23 Immunreaktivität von PTPIP51 und PTP1B in humaner Epidermis

a) PTPIP51 (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*)

b) PTP1B (*Sekundärantikörper FITC*)

Weißer Pfeil markieren eine Langerhanszelle, die für PTP1B positiv markiert ist (keine Markierung bei Anti-PTPIP51).

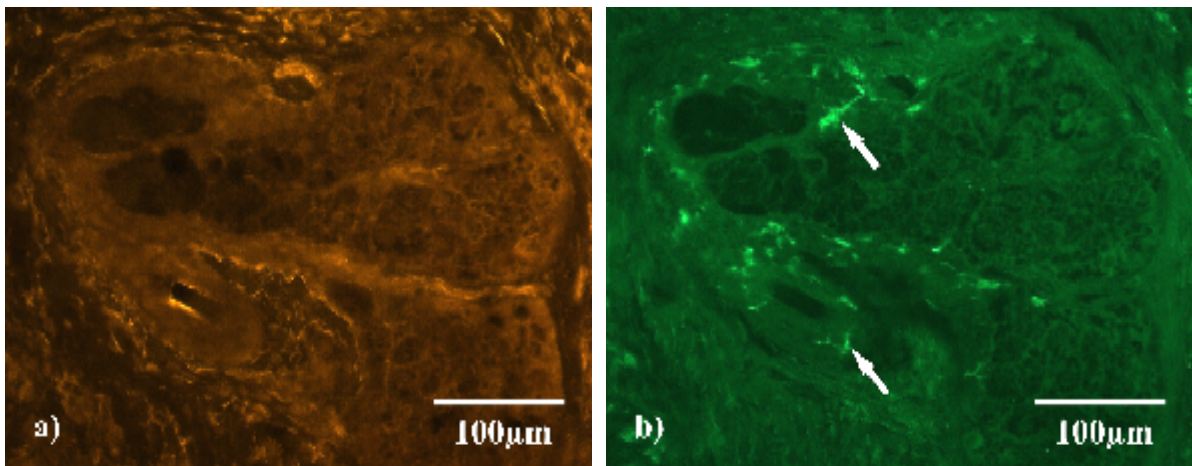


Abb. 24 Immunreaktivität von PTPIP51 und PTP1B einer Talgdrüse in humaner Dermis

a) PTPIP51 (*Sekundärantikörper Alexa Fluor*)

b) PTP1B (*Sekundärantikörper FITC*)

Weißer Pfeile markieren Langerhanszellen, die für PTP1B positiv markiert sind.

3.3 In Situ Hybridisierung

Zum Nachweis der Expression des Proteins PTPIP51 in der Epidermis und ihren Anhangsgebilden wurde die mRNA des Proteins in Schnitten mit Hilfe von In Situ Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen.

3.3.1 Lokalisation der mRNA von PTPIP51 in der Epidermis

Mittels In Situ Hybridisierung konnte die mRNA der PTPIP51 in der Epidermis detektiert werden (Abb. 25 a). Auch hier ist eine stärkere Reaktion in den suprabasalen Schichten mit ansteigendem Gradienten zum Stratum granulosum zu beobachten. Das Stratum corneum ist negativ. Im Gegensatz zur Immunofluoreszenz Reaktion findet sich eine schwache Färbung in der Basalschicht. Intrazellulär zeigt sich eine Konzentrierung der mRNA perinucleär (Abb. 25 b).

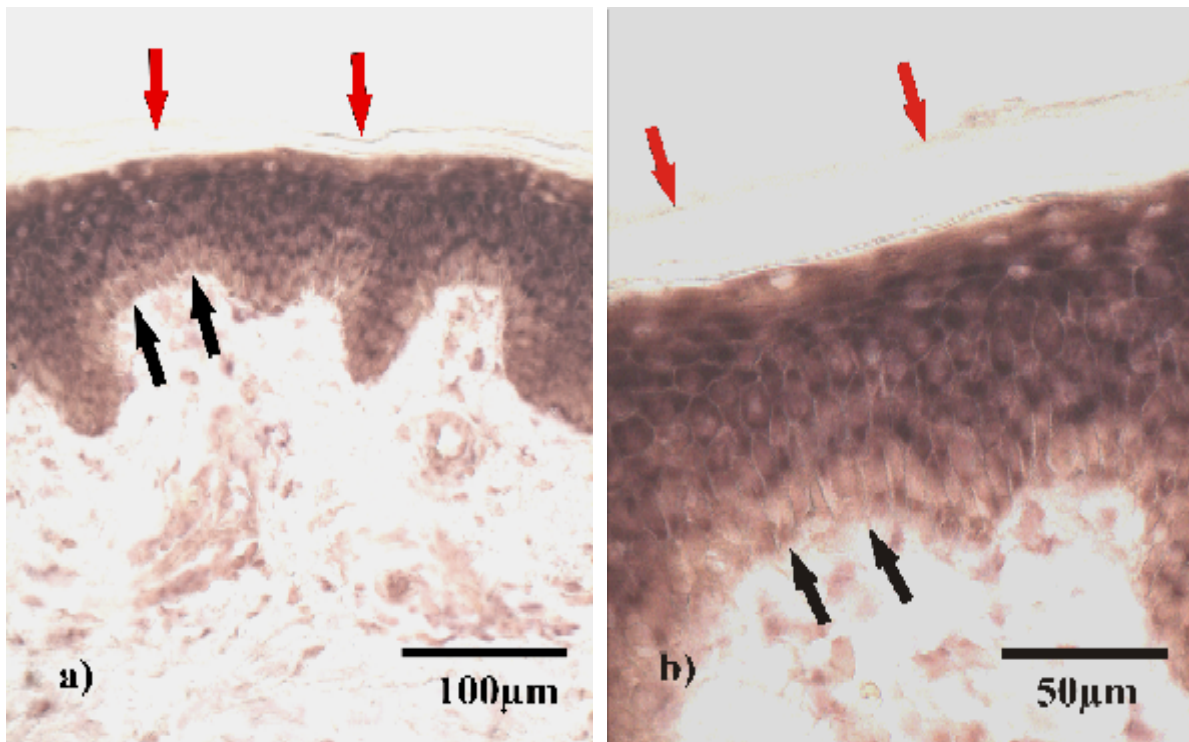


Abb. 25 Nachweis der mRNA von PTPIP51 mittels In Situ Hybridisierung in Schnitten humaner Haut

a) Übersichtsvergrößerung

b) 400fache Vergrößerung.

Beide Bilder zeigen das schwächer reagierende Stratum basale (schwarze Pfeile) und das negative Stratum corneum (rote Pfeile).

3.3.2 Lokalisation der mRNA von PTPIP51 in den Hautanhangsgebilden

Auch in den Hautanhangsgebilden entsprach der Nachweis der mRNA der mittels Immunocytochemie gefundenen Verteilung.

So zeigte sich beim Haar eine ausgesprochene Reaktivität der inneren Wurzelscheide (s. Abb. 26 a). Auch das einschichtige Epithel der ekkrinen Schweißdrüsenendstücke weist eine

cytoplasmatische Lokalisation der mRNA auf (s. Abb. 26 b). Für die Glandulae sebaceae beschränkt sich die mRNA auf die basalen Ersatzzellen (s. Abb. 26 c).

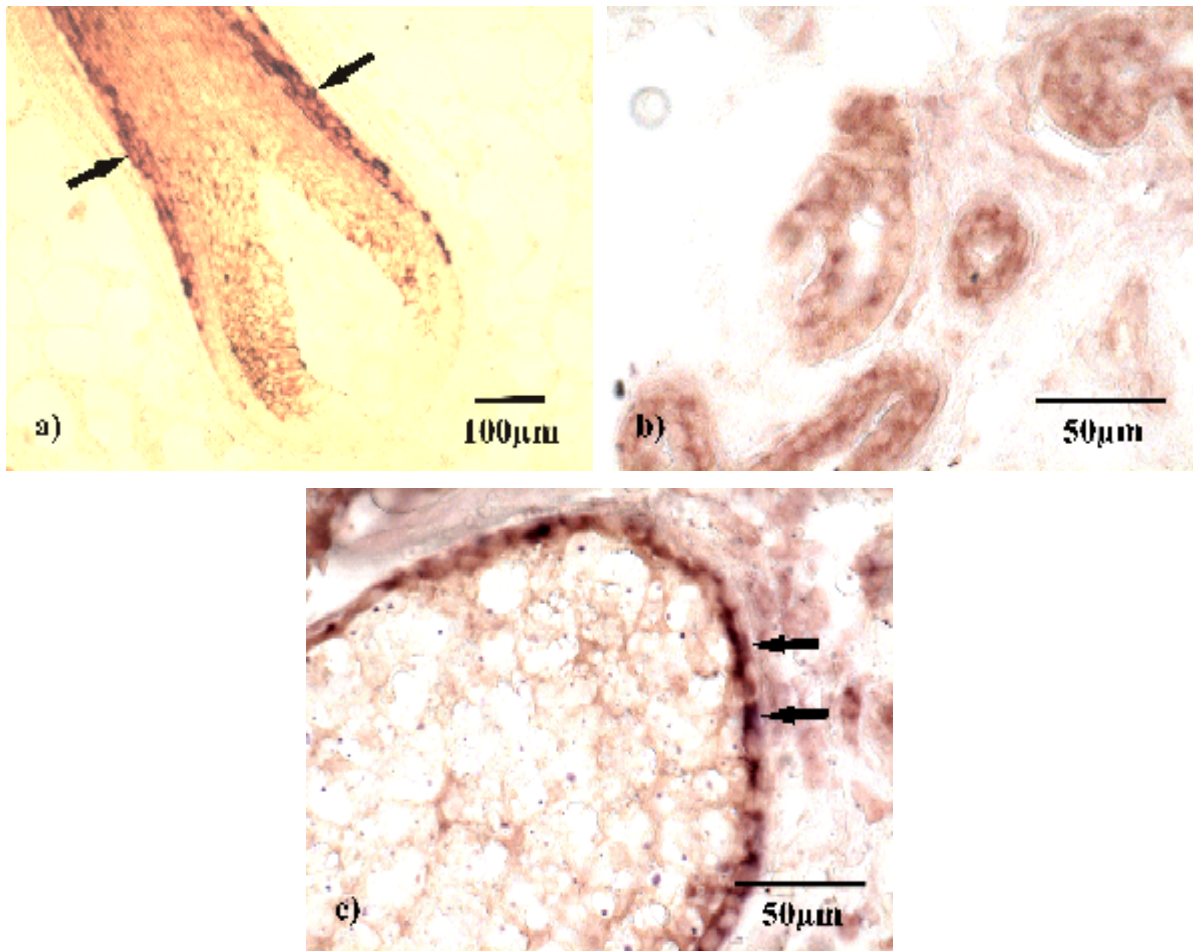


Abb. 26 In Situ Hybridisierung der PTPIP51 in Hautanhangsgebilden humaner Haut

a) Haarfollikel mit positiver Reaktion der inneren epithelialen Wurzelscheide (schwarze Pfeile),

b) ekkrine Schweißdrüsen,

c) holokrine Drüse mit positiver Reaktion in den Basalzellen (schwarze Pfeile)

3.4 Zellkultur

Zur Untersuchung der Faktoren, die möglicherweise Einfluss auf die Verteilung des PTPIP51 in der Epidermis haben, wurden Versuche mit einer spontan immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinie (HaCaT) durchgeführt.

3.4.1 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von PTPIP51 in HaCaT Keratinocyten

In den Zellen der HaCaT Linie lässt sich das Protein PTPIP51 mittels Immunfluoreszenztechnik nachweisen (Abb. 27). Dieses Protein ist sowohl generell im Cytoplasma als auch verstärkt perinucleär und gelegentlich auch an der Zellkernmembran lokalisiert. Vereinzelt wurden auch Zellkerne markiert.

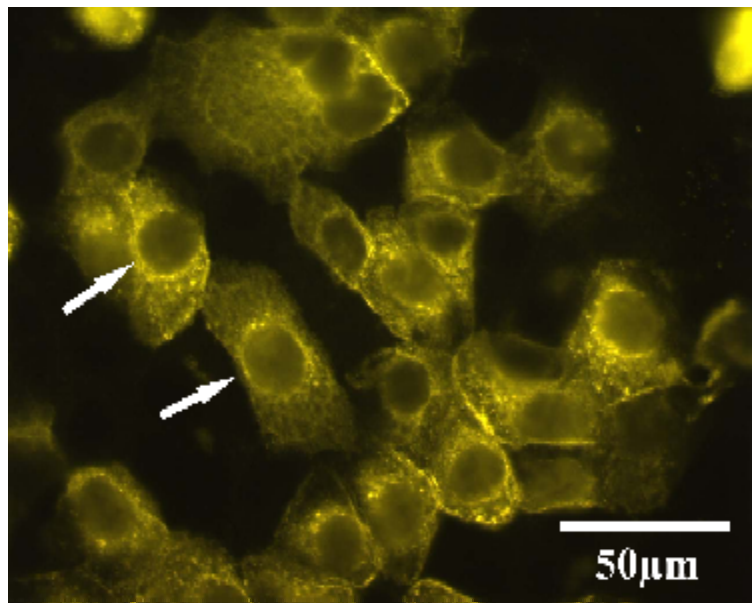


Abb. 27 PTPIP51 Immunreaktivität in humanen Keratinozyten (HaCaT) mit cytoplasmatischer Lokalisation, besonders perinucleär (weiße Pfeile).

Die subzelluläre Lokalisation ist nicht gleichmäßig, sondern einzelne Bereiche reagieren wesentlich stärker als andere. In hoher Auflösung zeigt sich, dass das Protein in granulärer Form in den Keratinozyten vorliegt.

Weitere subzelluläre Analyse mittels Doppelmarkierung der Keratinozyten mit dem Antikörper gegen PTPIP51 und jeweils einem spezifischen Marker des Golgi-Apparates, des Endoplasmatischen Reticulum (ER) und der Mitochondrien zeigt, dass das Protein weder mit dem Golgi-Apparat (s. Abb. 28 a) noch mit dem ER (s. Abb. 28 b) assoziiert ist. Eine Kolokalisation des Proteins mit Mitochondrien ist abhängig von der Konfluenz, mithin von dem Differenzierungsgrad der Kultur (s. Abb. 28 c).

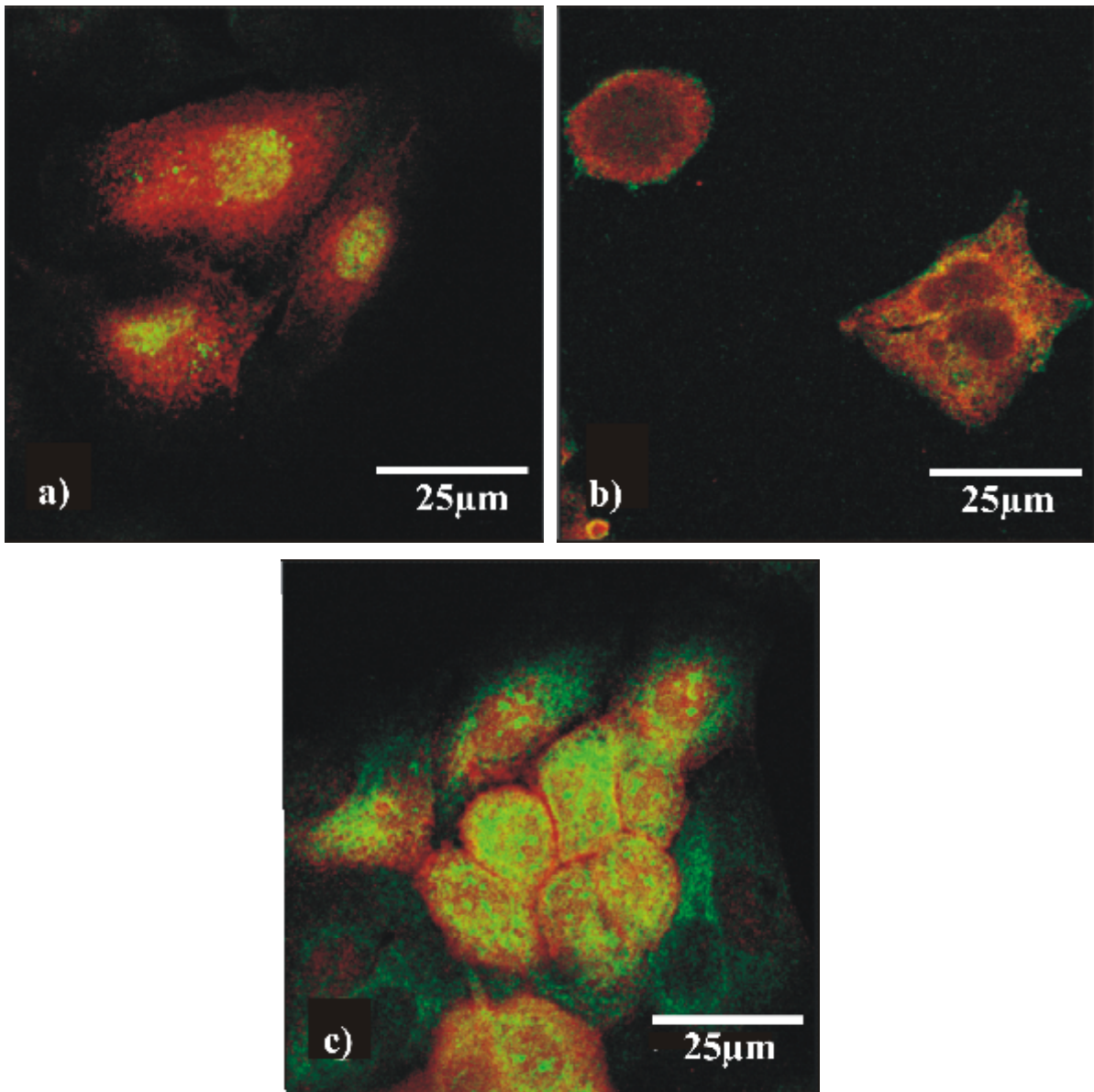


Abb. 28 Subzelluläre Lokalisation von PTPIP51

a) Doppelimmnuofluoreszenz von PTPIP51 (*Alexa 555, rot*) und dem Golgi-Apparat (*Alexa 488, grün*),

b) Doppelimmnuofluoreszenz von PTPIP51 (*Alexa 555, rot*) und PDI Antikörper zur Detektion des Endoplasmatischen Reticulums (*ER, Alexa 488, grün*). Doppellokalisierungen erscheinen gelb.

c) Doppelimmnuofluoreszenz von PTPIP51 (*Alexa 555, rot*) und Complex V Antikörper zur Detektion der Mitochondrien (*Alexa 488, grün*). Doppellokalisierungen erscheinen gelb.

Konfluentes Wachstum der Keratinocyten, führt zu einer Reduktion der Reaktivität mit dem Antikörper gegen PTPIP51 in den basal gelegenen Zellen, wohingegen die darüber gelegenen Zellen weiterhin eine starke Reaktion aufweisen. Fixation der noch nicht konfluenten

Keratinocyten nach 6-12h zeigt in diesen Zellen eine wesentlich stärkere Reaktivität für PTPIP51 im Vergleich zu den für längere Zeit gewachsenen Keratinocyten (z.B. nach 48h). Es lässt sich beobachten, dass direkt nach Aussaat der Anteil der PTPIP51 positiven Keratinocyten besonders hoch ist. Dieser Anteil reduziert sich bei längerem Wachstum. Mit der Verdichtung zu einem konfluenten der Zellrasen, dem Wachstum in zwei Schichten und der damit verbundenen Differenzierung der oberen Keratinocyten steigt die Zahl der positiven Zellen wieder an.

3.4.2. Doppelimmunofluoreszenz mit Anti-PTPIP51 und Antikörpern zur Detektion von K1/10 bzw. K5/14

Um die Abhängigkeit der PTPIP51 Reaktion vom Differenzierungsgrad der Zellen zu untersuchen, wurden Doppelmarkierungen mit dem Antikörper gegen PTPIP51 und dem Antikörper gegen K1 und 10 an den HaCaT-Zellen vorgenommen. Wie Abb. 29 zeigt, ist auch in diesem Fall eine ausgesprochen hohe Kolo-kalisation festzustellen.

Die Verwendung des Proliferationsmarkers (Antikörper gegen K5 und 14) zeigt eine geringe bis gar keine Kolo-kalisation (s. Abb. 30)

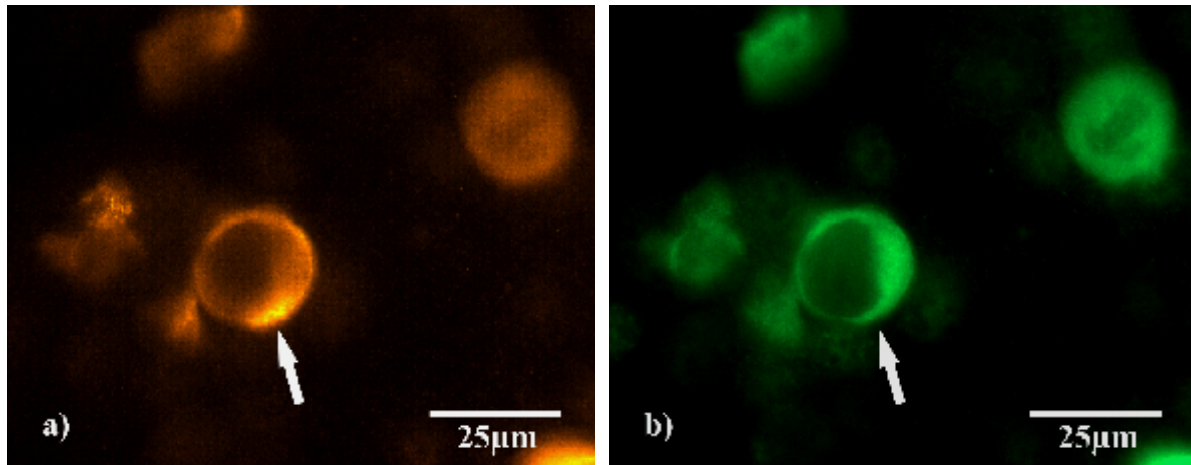


Abb. 29 Doppelimmunreaktivität von PTPIP51 und K1 und 10 in humanen keratinocyten

a) PTPIP51 (*Alexa 555*),

b) K1 und 10 (*Alexa 488*) mit hoher Kolo-kalisation beider Proteine (weißer Pfeil).

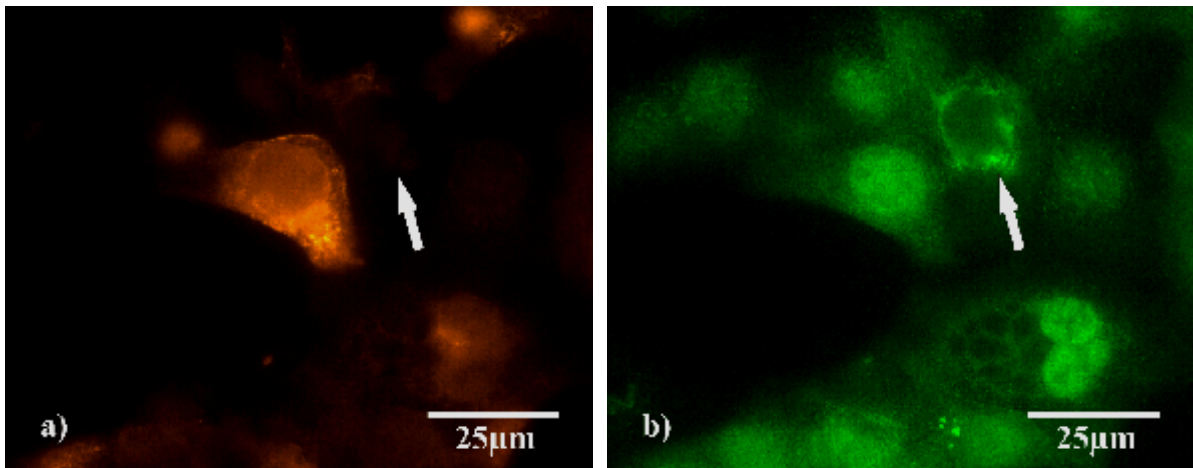


Abb. 30 Doppelimmunreaktivität von PTPIP51 und K5 und 14 in humanen Keratinocyten

a) PTPIP51 (Alexa 555),

b) K5 und 14 (Alexa 488): keine Kolokalisation (weißer Pfeil)

3.4.3 In Situ Hybridisierung an P51-mRNA mit HaCaT-Keratinocyten

Bei der In Situ Hybridisierung ergibt sich ein zur Immunofluoreszenz. vergleichbares Bild. Die mRNA ist im Cytoplasma nachzuweisen mit perinucleärer höherer Konzentration. Nicht alle Zellen erwiesen sich als reaktiv, sondern nur Zellen bei höherer Konfluenz, die sich zu differenzieren beginnen (s. Abb. 31).

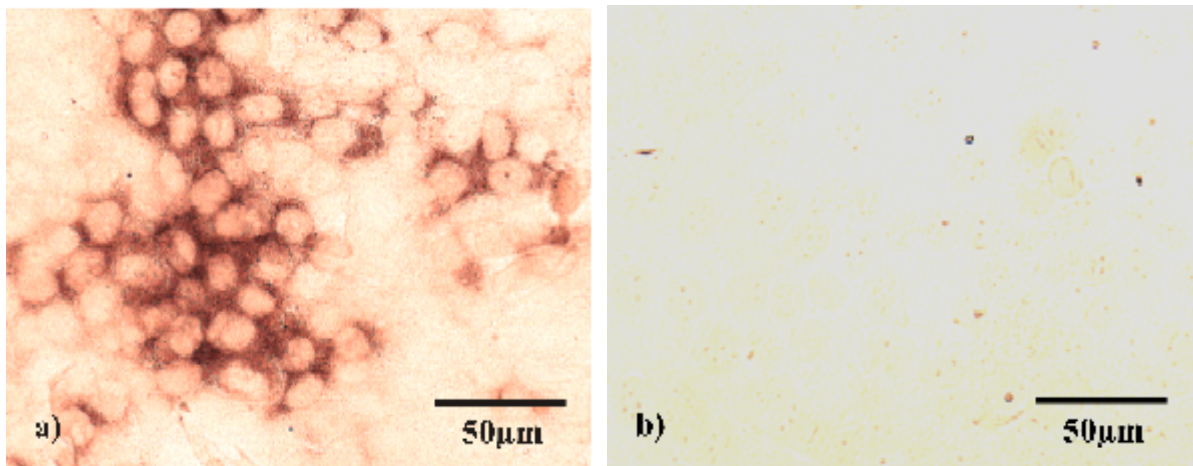


Abb. 31 In Situ Hybridisierung der PTPIP51 in HaCaT Zellen

a) anti-Sense Sonde: cytoplasmatische und verstärkt perinucleärer Reaktivität

b) Sense Sonde (Negativ-Kontrolle).

3.4.4 EGF-Zellversuch mit HaCaT-Keratinocyten

3.4.4.1 Auswertung des Versuchs

Nach Feststellung der Vergleichbarkeit der HaCaT-Zellen mit Keratinozyten der Epidermis konnten Versuche zur Differenzierungsabhängigkeit der Zellen durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen mit dem proliferationsinduzierenden und differenzierungshemmenden EGF behandelt.

Durch Zugabe von EGF zum Kulturmedium in ansteigenden Konzentrationen wurde untersucht, ob die Expression des PTPIP51 vom Vorhandensein des Wachstumsfaktors abhängig ist. Die Experimente wurden entweder mit reduzierter Konzentration des FKS durchgeführt oder mit Medium, dem das EGF-freie Panexin (Auskunft des Herstellers) zugesetzt wurde. Durch das „Shiften“ des FKS von 10% auf 1% im Medium sollte, die verbleibende EGF-Konzentration vernachlässigbar sein. Beide Versuchsansätze führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Zugabe von EGF wirkte sich auf die Expression von PTPIP51 aus.

Die Auswertung erfolgte über das Zählen der Gesamtzellpopulation (DAPI Kernfärbung) und der Bestimmung der PTPIP51 positiven Zellen. Zugabe von EGF in Konzentrationen von 10^{-9} M, was in etwa eine „physiologische“ Konzentration für die Keratinocyten darstellt, reduzierte den Anteil PTPIP51 reaktiver Zellen statistisch signifikant für beide Mediumzusätze (FKS und Panexin). Auch die nächst höhere Konzentration von 10^{-8} M EGF bei Mediumzusatz Panexin unterschied sich in ihrem Ergebnis statistisch signifikant von der Kontrolle. Ausgangswerte waren die Kontrollen, die lediglich mit dem gewohnten Medium zuzüglich 1% FKS bzw. 5% Panexin behandelt wurden. Für erstere betrug der Anteil der PTPIP51 reaktiver Zellen 34%, für letztere 15%. Bei Zugabe von 10^{-9} M EGF zum FKS-haltigem Medium ergab sich eine Senkung der reaktiven Anteils um ca. 13% auf 21%, mit dem Mediumzusatz Panexin etwa um 11% auf 4%. Bei Applikation einer Konzentration von 10^{-8} M EGF, stieg auch der Anteil der reaktiven Zellen: bei Panexin auf 6% und bei FKS auf 28%, was einer Steigerung im Vergleich zur 10fach niedrigeren EGF-Konzentration bei Panexin von 2% und bei FKS von 7% entsprach. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration von EGF auf 10^{-7} M ergab sich eine Steigerung des Anteils an reaktiven Zellen im Vergleich zur nächst niedrigeren EGF-Konzentration (10^{-8} M) bei Panexin um 11% auf 17% und bei FKS um ebenfalls 11% auf 39%. Diese Werte überstiegen sogar die Kontrollwerte, der unbehandelten Keratinocyten, die für Panexin bei 15 % und für FKS bei 34% lagen. Die höchste Konzentration des EGF mit 10^{-6} M zog dann wieder eine leichte

Ergebnisse

Senkung des Anteils der reaktiven Zellen für PTPIP51 nach sich. So ergab sich bei Panexin eine Senkung von 3% (bezogen auf eine EGF-Konzentration von 10^{-7} M) auf insgesamt 14%. Ein Wert, der knapp unter dem Kontrollwert von 15% lag. Bei FKS erniedrigte sich der Anteil um 8% (bezogen auf eine EGF-Konzentration von 10^{-7} M) auf 31%, was 3% unter der Kontrollwert von 34% lag (s. Diagramm 1 und 2).

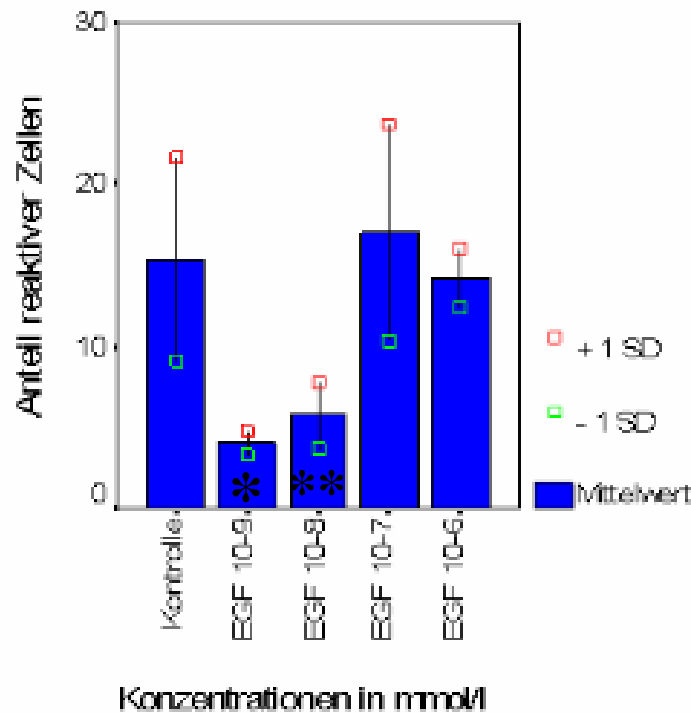


Diagramm 1 Einfluss von EGF auf den Anteil an PTPIP51 positiven Keratinocyten mit 5% Panexin als Mediumzusatz. Kontrollen entsprechen Zellen mit Mediumzusatz 5% Panexin. SD=Standardabweichung, * = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$),

** = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,01$)

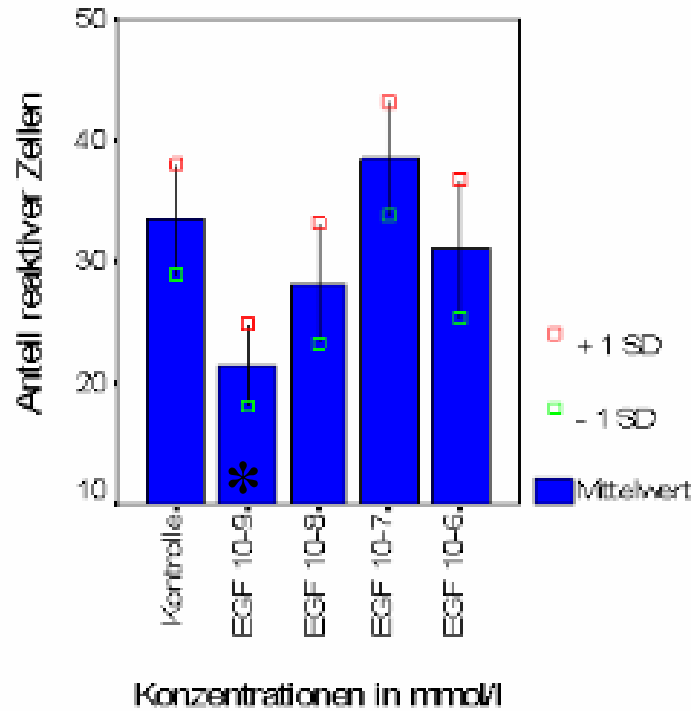


Diagramm 2 Einfluss von EGF auf den Anteil von PTPIP51 positiven Keratinocyten mit 1% FKS als Mediumzusatz. Kontrollen entsprechen Zellen mit Mediumzusatz 1% FKS. SD= Standardabweichung, * = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$)

3.4.4.2 mRNA Nachweis des PTPIP51 an mit EGF behandelten HaCaT-Keratinocyten

Die Expression von PTPIP51 konnte auch unter dem Einfluss von EGF in HaCaT Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Keratinocyten auf „Culture Slides“ gezogen und mit äquivalenten EGF-Konzentrationen behandelt.

Wie schon zuvor beobachtet, lässt sich auch hier eine relative Reduktion der mRNA nach Gabe von EGF in Konzentration von $10^{-9}M$ erkennen. Eine Erhöhung der Konzentration auf Werte von $10^{-8}M$ bzw. $10^{-7}M$ EGF führte zu einer gewissen Erhöhung des mRNA Gehaltes (s. Abb. 33 und 34). Dies gilt für beide Mediumzusätze (Panexin und FKS)

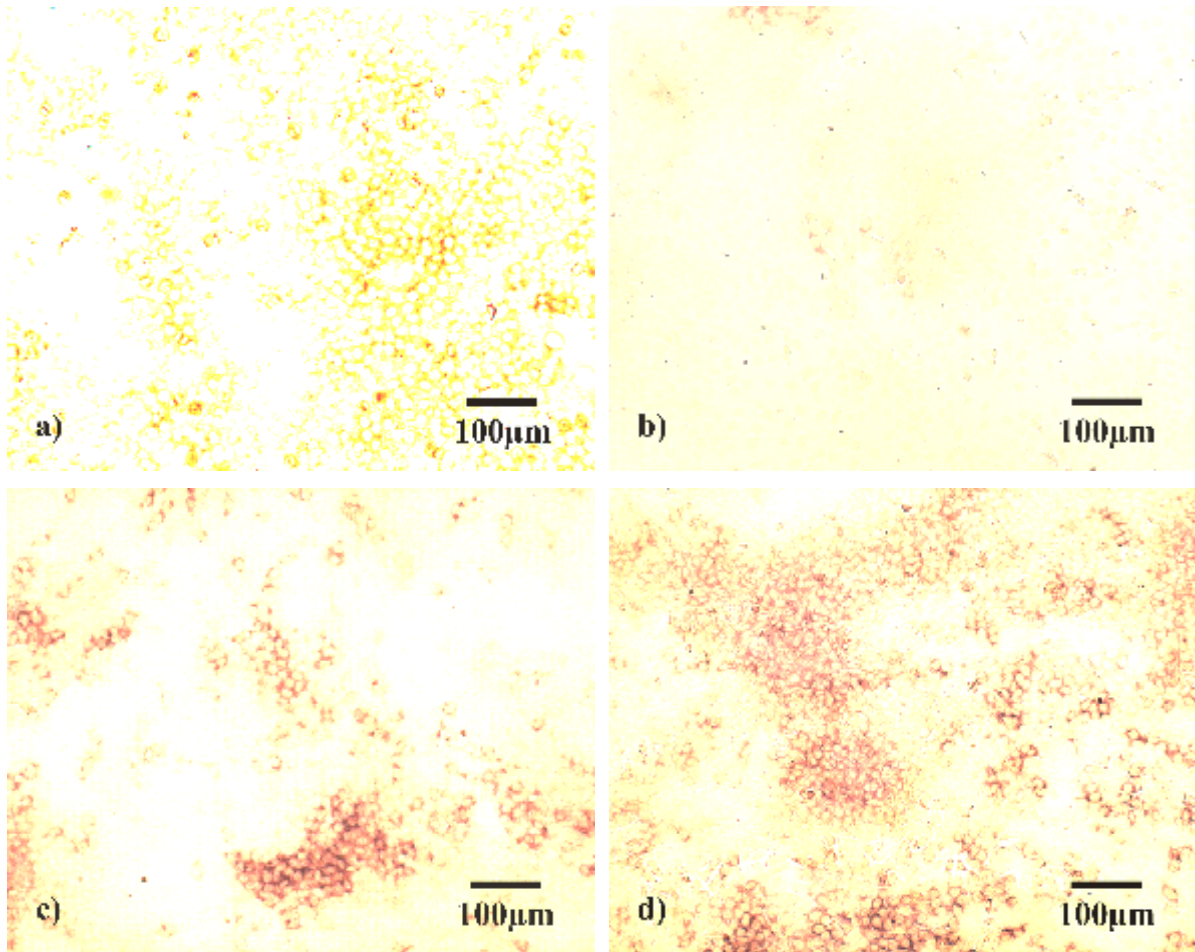


Abb. 33 In Situ Hybridisierung an mit EGF behandelten Keratinocyten (HaCaT), gewählter Mediumzusatz: 5% Panexin, a) Kontrolle, b) EGF 10^{-9} M, c) EGF 10^{-8} M, d) EGF 10^{-7} M

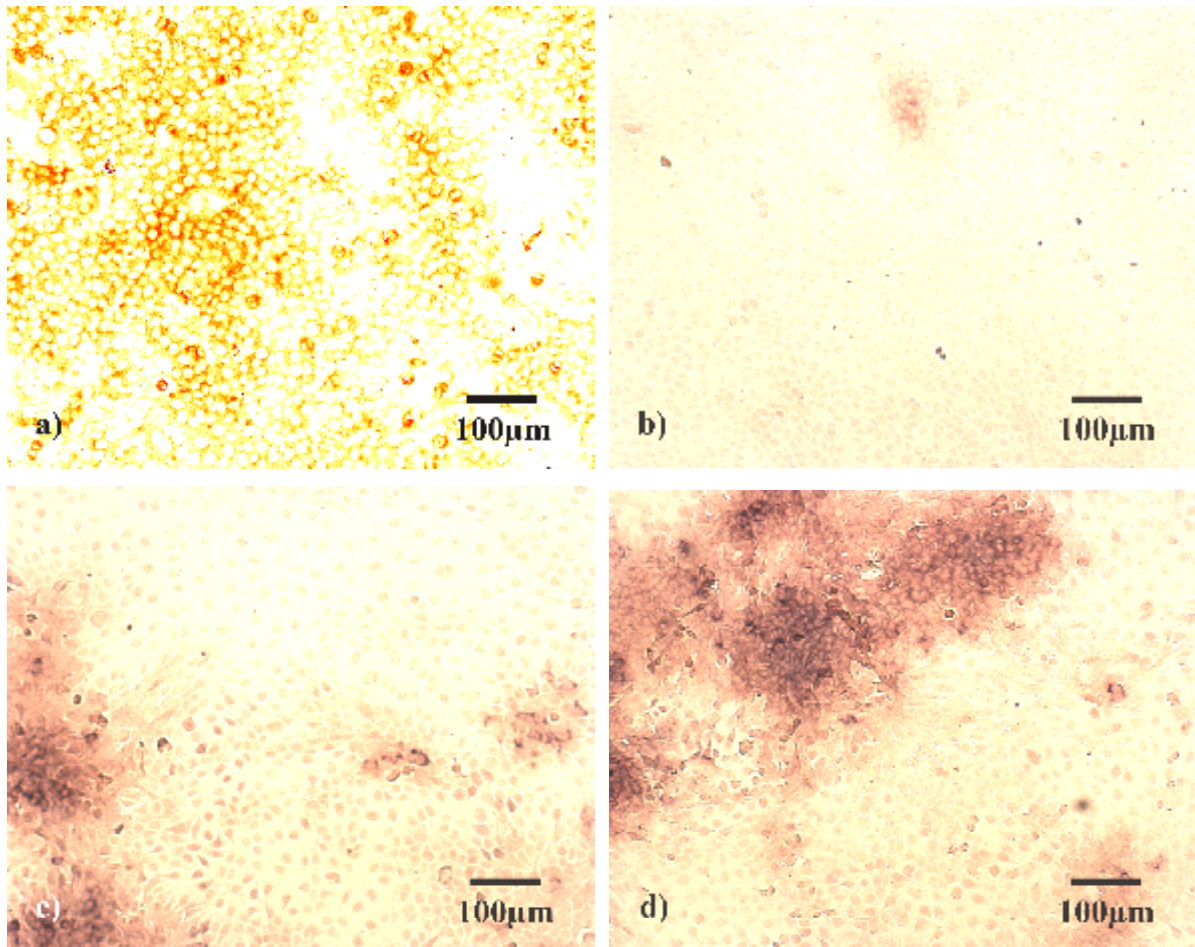


Abb. 34 In Situ Hybridisierung an mit EGF behandelten Keratinocyten (HaCaT) bei 1% FKS
a) Kontrolle, b) EGF 10^{-9} M, c) EGF 10^{-8} M, d) EGF 10^{-7} M

3.4.4.2 Western Blotting an mit EGF behandelten HaCaT Keratinocyten und an humaner Haut

Weitere Untersuchungen der mit EGF behandelten Zellen wurden im Western Blot Verfahren durchgeführt. PTPIP51 zeigte eine Bande bei ca. 31 und 62kDa, die unabhängig von den Konzentrationen des zugegeben EGF war. Zusätzlich wurde eine Bande bei ca. 52kDa sichtbar, die ebenfalls in allen Zellen unabhängig von den Konzentrationen des zugegebenen EGF detektiert werden konnte. Eine ~45kDa Form von PTPIP51 wurde nur in unbehandelten Zellen und Zellen, die mit niedriger EGF-Konzentration behandelt wurden, detektiert (s. Abb.35)

Bei Untersuchungen im Western Blot Verfahren mit humanen Hautproben wurde lediglich eine Bande bei 45kDa detektiert (s. Abb. 35).

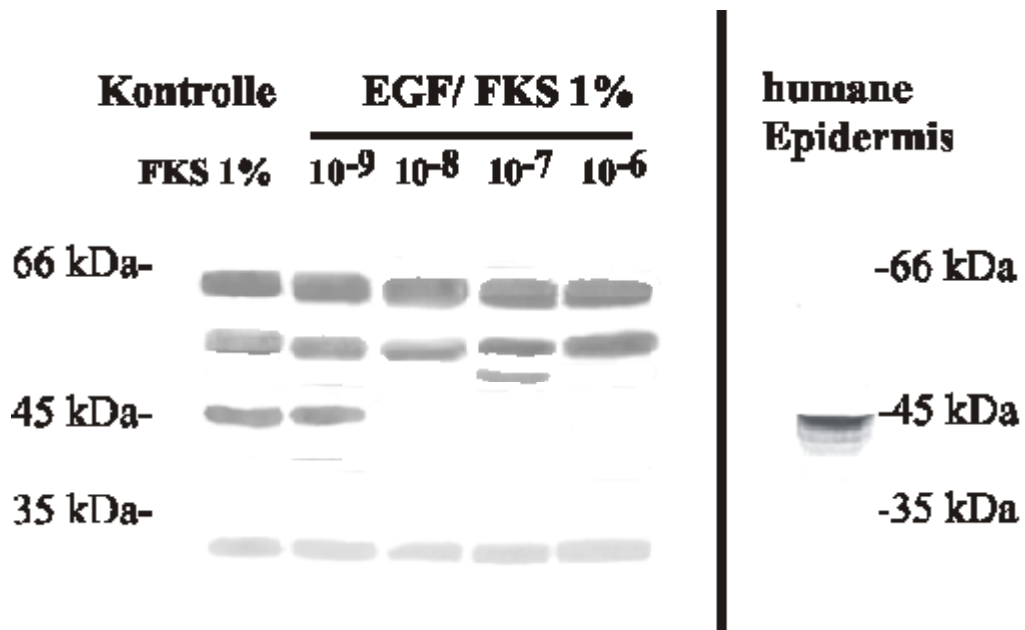


Abb. 35 Western Blotting von HaCaT Zellen, die mit EGF behandelt waren (links) und an humaner Haut (rechts).

4. Diskussion

4.1 Einfache Immunofluoreszenz

4.1.1 Epidermis

Der Nachweis des PTPIP51 mittels Immunfluoreszenzmethoden in der Epidermis der Ratte ergab ein charakteristisches Muster: Im Stratum basale war in keiner der untersuchten Proben PTPIP51 Protein nachweisbar, wohingegen die suprabasalen Schichten eine ausgeprägte positive Reaktion aufwiesen. Dieses Muster mit negativer Basalschicht und stark positivem suprabasalen Zelllagen war innerhalb einer Spezies in verschiedenen Arealen der Haut-Leisten-, Felder- und Kopfhaut zu beobachten. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dies ebenso für die Epidermis anderer Spezies, z. B. Maus, Meerschwein und Mensch gilt. Dies weist auf einen hohen Grad der Konservierung in der Evolution hin (Wimmer, persönliche Mitteilung).

Da PTPIP51 auf suprabasale Zelllagen limitiert ist, ist anzunehmen, dass dieses Protein in die Differenzierungsvorgänge der Epidermis involviert ist. In der Epidermis vollzieht sich ein Wechsel von der mitotisch aktiven Basalschicht zu den sich zunehmend differenzierenden Keratinocyten der suprabasalen Schichten. Es kommt zur Expression von frühen und späten Differenzierungsmarkern wie Involucrin und K1 und 10 einerseits und Filaggrin, Loricrin und Transglutaminase andererseits. Diese Differenzierungsmarker sind in der Regel suprabasal lokalisiert. Die frühen Differenzierungsmarker werden genau wie PTPIP51 schon ab dem Stratum spinosum exprimiert (Fuchs 1996, Presland und Dale 2000, Gibbs et al. 2000).

Die cytoplasmatische Lokalisation des PTPIP51 in vivo könnte auf eine Beteiligung an differenzierungsassoziierten Vorgängen hinweisen, da es sich bei den meisten Differenzierungsmarkern um cytoplasmatische Proteine handelt, die Teile des Cytoskeletts bilden oder eng mit ihm assoziiert sind.

Beim Vergleich von Epidermis der Ratte und humanem Gewebe zeigt sich für die Ratte eine Zunahme der Reaktivität des PTPIP51 von basal nach suprabasal, wohingegen im humanem Gewebe alle Strata eine gleichmäßig hohe Reaktivität zeigen. Dies kann aus Unterschieden im Ablauf von Differenzierungsvorgängen in der Epidermis von verschiedenen Species resultieren, wie Banks-Schlegel et al (1983) anhand qualitativer und quantitativer Unterschiede der Keratinexpression in der Epidermis von Mensch und Ratte belegen konnten. Das Stratum corneum war in einem Teil der Proben PTPIP51 negativ. Dies ist Folge der Umwandlung der Keratinocyten des Stratum granulosum in Corneocyten des Stratum

corneum, was zu einem Abbau des Nucleus und dem Sistieren der Proteinexpression führt. Das bereits vorhandene PTPIP51 könnte durch Protein abbauende Prozesse, wie sie für das Stratum granulosum und corneum typisch sind, eliminiert werden (Caubet et al. 2004, Brattsand et al. 2005).

Eine positive Reaktion des Stratum corneum könnte unspezifisch sein oder möglicherweise die Folge einer Funktionsänderung der Keratinocyten ausgelöst durch angeborene oder erworbene Faktoren. Solche äußere oder erworbene Faktoren, die den Abbau von Proteinen im Stratum corneum beeinflussen können, sind für Retinolsäure, Cholecalciferol, psychologischer Stress oder auch das höhere Lebensalter beschrieben worden (Egelrud et al. 1993, Ghadially et al. 1995, Elias et al. 2002, Fischer et al. 2004, Choi et al. 2005). Angeborene Faktoren können Stoffwechseldefekte wie das Netherton-Syndrom sein, bei dem es u. a. durch gesteigerte Aktivität von Proteasen in der Hornschicht zum vermehrten Proteinabbau kommt (Descargues et al. 2006).

4.1.2 Hautanhangsgebilde

Die Anhangsgebilde der Haut sind Bildungen der Epidermis unter Beteiligung des Bindegewebes. Wie die Ergebnisse zeigen, exprimieren diese Strukturen das PTPIP51. In den Hautanhangsgebilden finden sich spezifische Expressionsmuster der Cytokeratine, wie z. B. die Differenzierungsmarker K1 und 10 (Stark et al. 1990, Eckert et al. 1992, Fuchs 1996, Yamamoto et al. 2000). Weitere Differenzierungsmarker wie Involucrin und Filaggrin wurden in Ausführungsgängen von Talgdrüsen, innerer epithelialer Wurzelscheide von Haarfollikeln, und Ausführungsgängen ekkriner Drüsen nachgewiesen (Kanitakis et al. 1986, Imcke et al. 1988, Wollina et al. 1992, Ishida-Yamamoto et al. 1996, Ishida-Yamamoto et al. 1997, Komine et al. 2000).

Die typische Schichtung der Epidermis findet sich in gewisser Weise in den Haarfollikeln und der Talgdrüsen wieder.

PTPIP51 war in der inneren epithelialen Wurzelscheide nachzuweisen. Die innere epitheliale Wurzelscheide stellt ein Äquivalent zu den suprabasalen Schichten der Epidermis dar (Limat et al. 1991, Fuchs 1996), somit war die Lokalisation des PTPIP51 in dieser Schicht zu erwarten. Außerdem markierte der PTPIP51 Antikörper die Zellmembranen und die direkt anliegenden Cytoplasmabereiche der basalen Zellen der äußeren epithelialen Wurzelscheide. In dieser Zellschicht wurde ein eigenes Cytokeratin K15 beschrieben, das den Beginn des frühesten Stadiums der terminalen Differenzierung markiert. K15 findet sich ausserdem nur noch in der Basalschicht von holokrinen Drüsen, der Epidermis und der Basalschicht des

Oesophagus beim Schaf. Beim Menschen wurde es im gesamten Epithel des Oesophagus detektiert (Whitbread et al. 1998). Eine Gleichverteilung des PTPIP51 mit diesem Protein war nur teilweise feststellbar. Eine räumliche Interaktion ist deswegen aber eher unwahrscheinlich ist.

Die Basalschicht der Talgdrüsen, die die mitotisch aktive Schicht dieser Drüse darstellt, ist in für PTPIP51 positiv. Diese Zellen der Basalschicht exprimieren K5 und 14, Keratine, die identisch mit denen des Stratum basale der Epidermis sind (Fuchs 1996). Bei der Epidermis war im Bereich der K5 und 14 positiven Basalzellschicht keine PTPIP51 nachzuweisen. Dies spricht gegen eine strikte Assoziation von PTPIP51 mit spezifischen Cytokeratinformen bzw. gegen eine ausschließliche Assoziation von PTPIP51 und Differenzierungsmarkern wie K1 und 10.

Bei der Wanderung der Sebocyten aus der Drüsenperipherie ins Zentrum der Drüse werden die Zellen apoptotisch. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich dabei um ein von der Zelle selbst herbeigeführtes Absterben, in dem so genannte Caspasen eine elementare Rolle spielen. Diese aktivieren u. a. in den Nuclei Endonukleasen, die eine Fragmentierung der DNA herbeiführen (Enari et al. 1998). In den untersuchten holokrinen Talgdrüsen konnte das PTPIP51 außerdem in den pyknotischen Zellkernen der inneren Drüsenschichten festgestellt werden, was auf eine mögliche Nähe zu apoptotischen Prozessen schließen lässt. Dies wird zusätzlich untermauert durch weitere Versuchsreihen aus unserem Labor, bei denen gezeigt werden konnte, dass das sonst cytoplasmatisch vorkommende PTPIP51 in apoptotischen Zellen nachzuweisen ist und hier im Speziellen im Kern lokalisiert ist. In diesem Zusammenhang kann auch die verstärkte Reaktion in Zellmembranen der Talgdrüsen gesehen werden, da ein wichtiger Weg der zur Induktion der Apoptose führt, über Rezeptoren in der Zellmembran abläuft. Diese Rezeptoren starten bei Bedarf im Cytoplasma die Aktivierung der Caspase-Kaskade über die Caspase 8 (Sheikh et al. 1998, Cho et al. 2002).

Solche apoptotischen Vorgänge wurden anhand fragmentierter DNA auch im Stratum granulosum der Epidermis und in der inneren epithelialen Wurzelscheide des Haarfollikels beobachtet (Tamada et al. 1994). Dabei handelt es sich um Zellschichten, in denen ebenfalls PTPIP51 detektiert werden konnte. Auch in diesen Fällen wäre eine Interaktion mit PTPIP51 denkbar. So wurden in weiteren Strukturen wie in der Basalschicht der äußeren epithelialen Wurzelscheide des Haarfollikels und dem Epithel des Oesophagus PTPIP51 mit der Zellmembran assoziiert detektiert. Denkbar ist eine Verknüpfung der Funktionsbereiche der Differenzierung und der Apoptose von PTPIP51.

4.1.3 Weitere untersuchte Epithelien

Mehrschichtig, leicht verhornendes Plattenepithel, wie es in der Zunge vorkommt, zeigt ein der Epidermis vergleichbares Verteilungsmuster des PTPIP51. Die Lokalisation von PTPIP51 in der Zunge, untersucht am Beispiel von Ratte und Maus, passt sehr gut zu der bisher aufgestellten Hypothese einer Beteiligung der PTPIP51 an spezifischen Zellprozessen ein. Auch für orale mehrschichtige Plattenepithelien ist das Vorkommen der spezifischen Differenzierungsmarker K1 und 10, Involucrin und Filaggrin, analog der Verteilung in der Epidermis, beschrieben worden (Banks-Schlegel et al. 1981, Presland et al. 2000).

Im humanem Oesophagus, einem Organ mit mehrschichtig unverhornten Plattenepithel, findet sich für die Verteilung des PTPIP51 wie schon in der Epidermis beobachtet, ein Gradient von der Basalschicht zu den sich höher differenzierenden Zellschichten. Auch für diese Form des Epithels ist, wenn auch in quantitativ geringerem Ausmaß, das Vorkommen von Differenzierungsmarkern wie K10 und Involucrin beschrieben worden (van Dorst et al. 1998, Morales et al. 2003).

Bei Urothel handelt es sich ebenfalls um ein mehrreihiges Epithel, das aus Basalzellen, Intermediärzellen und einer Superfizialschicht besteht. In allen Zellreihen war das PTPIP51 im Cytoplasma nachzuweisen. Dieses Epithel unterliegt eigenen Differenzierungsvorgängen, was sich an dem Muster der Cytokeratinexpression erkennen lässt. Die Keratine K5 und 17 werden nur basal exprimiert, während K13 in allen Zellen außer denen der Superfizialschicht vorkommt. Diese exprimiert wiederum relativ spezifisch K20 (Moll et al. 1992, Southgate et al. 1999, Varley et al. 2004). Darüber hinaus wird auch das Protein Involucrin, ein weiterer Differenzierungsmarker, im gesamten Urothel synthetisiert (Walts et al. 1985). Das Vorkommen des PTPIP51 kann im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen, die wie die Präsenz des Involucrin zeigt, offenbar in allen Schichten des Urothels ablaufen, gesehen werden. Es lässt sich wiederum kein Zusammenhang mit der Expression spezifischer Cytokeratine erkennen.

4.2 Doppelimmunofluoreszenz

4.2.1 Proliferationsmarker K5/14, Differenzierungsmarker K1/10

Doppelimmunofluoreszenz Studien mit den typischen Proliferations- bzw. Differenzierungsmarkern an Epidermis und Hautanhangsgebilden zeigte eine hohe Kolokalisation von PTPIP51 und K1/10, aber keine Gleichverteilung von K5/14 und PTPIP51. Dies unterstützt die Annahme einer Assoziation von PTPIP51 und Differenzierungsprozessen in der Epidermis. Der verwendete K10 Antikörper zeigte keine Reaktion in der inneren epithelialen Wurzelscheide des Haarfollikels, obwohl in der Literatur über das Vorkommen von K10 in dieser Schicht berichtet wird (Fuchs 1996). Es ist zu vermuten, dass die Cytokeratine in der Epidermis und inneren epithelialen Wurzelscheide nicht völlig identisch sind, sondern nur einen gewissen Grad der Homologie aufweisen, was dazu führt, dass der monoklonale Antikörper, der in der Epidermis reagiert, das gleichnamige Cytokeratin im Haarfollikel nicht markiert (Stark et al. 1990).

4.2.2 TCPTP

Diese Phosphatase, die genau wie PTP1B ein möglicher Interaktionspartner von PTPIP51 sein könnte (Welte, 1999, Porsche 2001), ist funktionell und strukturell sehr ähnlich der PTP1B (Romsicki et al. 2003). Sie existiert in zwei verschiedenen Splicevarianten, von der die eine nucleär, die andere cytoplasmatisch lokalisiert ist. Es besteht eine Interaktion zum EGFR, dessen cytoplasmatischen Anteil sie dephosphorylieren kann. Dadurch wird die weitere Signaltransduktion des Rezeptors inhibiert (Tiganis et al. 1998, Ibarra-Sanchez et al. 2000, Klingler-Hoffmann 2001, Matilla et al. 2005). In der Epidermis fand sich eine schwache suprabasale Reaktion für TCPTP, obwohl auch diese Phosphatase als ubiquitär vorkommendes Protein beschrieben wird (Ibarra-Sanchez et al. 2000, Klingler-Hoffmann et al. 2001). Da die Hautanhangsgebilde keine nennenswerte Kolokalisation zeigte, ist eine räumliche Interaktion mit dieser zumindest in der Haut nicht wahrscheinlich.

4.2.3 PTP1B

PTPT1B, eine ubiquitär vorkommende nichttransmembranöse Phosphatase, ist in der Epidermis eng assoziiert mit dem EGFR und wird verstärkt in basalen Schichten exprimiert. Es wurde beschrieben, dass PTP1B sowohl an den cytoplasmatischen Teil des Rezeptors bindet und dort an Tyrosin phosphoryliert wird, als dass es auch selbst Substrate des EGFR dephosphoryliert. Eine Phosphorylierung der PTP1B durch den EGFR zieht eine erhebliche

Steigerung der katalytischen Aktivität nach sich (Gunaratne et al. 1994, Liu et al. 1997). Ein Nachweis der PTP1B in humaner Haut konnte nur für einzelne Zellen innerhalb der Epidermis erbracht werden. Ihrer Morphologie nach handelte es sich dabei um Langerhans-Zellen. Dabei handelt es sich um eine Zellart des spezifischen Abwehrsystems, die zur Antigenaufnahme befähigt ist. Dies steht im Gegensatz zu den Literaturdaten, die ein Vorkommen in der ganzen Epidermis, besonders in basalen Schichten, beschreiben. Hinweise auf ein spezielles Vorkommen von PTP1B in Langerhans-Zellen ist nicht beschrieben worden. Da auch in den Hautanhangsgebilden keine Kolokalisation der PTP1B und dem PTPIP51 zu beobachten war, ist zumindest in humaner Haut eine Interaktion eher unwahrscheinlich.

4.3 In Situ Hybridisierung

Die Spezifität des Antikörpers gegen PTPIP51 wurde bestätigt durch In Situ Hybridisierungs Experimente. Dabei ergab sich beim Nachweis der PTPIP51 mRNA eine nahezu identische Lokalisation von mRNA und Protein in Epidermis und Hautanhangsgebilden.

4.3.1 Epidermis

In der Epidermis war in den suprabasalen als auch in den basalen Schichten, wenn auch hier in wesentlich geringerem Maße, PTPIP51 mRNA nachzuweisen. Das Protein des PTPIP51 erscheint erst in den suprabasalen Schichten. Dies zeigt, dass die Transkription bereits in der Basalzellschicht beginnt, die Translation erst in den anschließenden Zellschichten stattfindet. Da PTPIP51 schon sehr früh im Differenzierungsprozess des Keratinocyten benötigt wird, ist es denkbar, dass die Transkription bereits in den Basalzellen beginnt, um den sich ablösenden und damit differenzierenden Keratinocyten mit Abschluss der Translation möglichst schnell das benötigte Protein zur Verfügung zu stellen. Solche Prozesse sind in der Epidermis nicht unbekannt. Die Markerproteine für hyperproliferative Epidermis K6 und 16, die z. B. im Rahmen der Wundheilung auftreten, werden von den Keratinocyten kontinuierlich transkribiert, aber nicht weiter translatiert. Erst bei Bedarf, z. B im Rahmen einer Verletzung, kommt es innerhalb weniger Stunden zur Exprimierung der beiden Keratine (Tyner und Fuchs 1986).

4.3.2 Hautanhangsgebilde

Der Nachweis von PTPIP51-mRNA in den Hautanhangsgebilden entspricht in seiner Lokalisation weitestgehend dem Muster der Proteinexpression.

Der Nachweis von mRNA in der proliferativen und undifferenzierten Basalschicht der Talgdrüsen weist auf eine nicht ausschließlich differenzierungsassoziierte Funktion hin (Latham et al. 1989). Vorstellbar ist auch eine Beteiligung an Proliferationsvorgängen, da Ergebnisse von Stenzinger und Mitarbeitern (2005) und neuere Untersuchungen an humanen Keratinocyten auf eine Expression in mitotischen Zellen hinweisen. Die in Apoptose übergehenden Zellen zeigen eine Umlagerung des PTPIP51 in den pyknotischen Zellkern. Dies kann interpretiert werden als eine Beteiligung des PTPIP51 an Apoptose. Diese Vermutung wird gestützt durch neuere Untersuchungen an humanen Keratinocyten bei denen ebenso ein Vorkommen von PTPIP51 in Kernen apoptotischer Zellen beobachtet werden konnte. Transkription und Translation sind also nur in der Basalschicht zu beobachten. Das Protein wird aber in der voranschreitenden Apoptose der Sebocyten, entsprechend der antizipierten Funktionen, umgelagert. Ein ähnlicher Prozess ist auch für K5/14 in der Epidermis beschrieben, bei dem die RNA beider Keratine lediglich in der Basalschicht exprimiert wird, die Proteine aber noch in suprabasalen Schichten nachweisbar sind (Denning 2004).

4.4 Zellkultur

4.4.1 Immunofluoreszenz und In Situ Hybridisierung an HaCaT Keratinocyten

Mittels In Situ Technik und Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass die Keratinocyten der humanen Zelllinie HaCaT sowohl mRNA von PTPIP51 als auch das Protein aufweisen. In diesen Zellen konnte das Protein PTPIP51 sowohl im Cytoplasma als auch im Kern gezeigt werden. Detaillierte Analyse der subzellulären Verteilung des mit dem Antikörper markierten Proteins zeigte nur eine Assoziation mit den Mitochondrien in nicht konfluenten Zellen. Eine nucleäre Lokalisation des PTPIP51 neben der mitochondrialen Assoziation kann als Hinweis auf eine Verknüpfung von PTPIP51 und Apoptose bei in vitro kultivierten Keratinocyten gedeutet werden (Enari et al. 1998). So wird ein im Verlauf der Apoptose eingeschlagener Weg über die Abgabe von Cytochrom c aus Mitochondrien getriggert. Dies hat wiederum die Aktivierung von Caspase 9 zur Folge, die ein elementares Enzym des programmierten Zelltodes darstellt (Li et al. 1999, Ssang-Goo und Eui-Jo 2002).

Die Beobachtung, dass HaCaT-Keratinocyten, in den ersten Stunden nach Aussaat auf Culture Slides noch eine sehr starke Reaktion für PTPIP51 aufweisen, die dann im Verlauf der nächsten 24 bis 48h sich verringert, um erst bei Konfluenz der Zellen bzw. bei Stratifizierung und damit Differenzierung sich zu verstärken, wurde ähnlich für K1 und 10 von anderen Autoren beobachtet (Ryle et al. 1989, Pivarsci et al. 2001). Dies weist auf eine Abhängigkeit des Vorkommens von PTPIP51 von Differenzierungsvorgängen in vitro hin.

4.4.2 Doppelimmunofluoreszenz mit K1/10 bzw. K5/14

Der Nachweis einer hohen Kolokalisation von K1 und 10 mit PTPIP51 und einer sehr geringen Kolokalisation mit den Proliferationsmarkern K5 und 14 bestätigt die in situ im Präparat der Epidermis gemachten Beobachtungen.

4.4.3 Stimulation von Keratinocyten mit EGF

Wie die Ergebnisse zeigten, hat EGF einen signifikanten Einfluss auf die Zahl der PTPIP51 positiven HaCaT-Zellen.. Ausserdem wird durch EGF Applikation die Expression von Formen mit unterschiedlichen Molekulargewichten induziert.

Wie in der Literatur beschrieben wurde (Wahl et al. 1989, Carpenter et al. 1990, Yarden et al. 2001, Fickova 2002, Hanada et al. 2004, Wang et al. 2006, Wujcik 2006), ist EGF in eine Fülle von Signaltransduktionswegen involviert, die zu Proliferation und seltener zu Differenzierung in epidermalen Zellen führen. Dies wurde bestätigt durch die Beobachtung, dass EGF, wenn es in geringer, proliferativ wirkender Konzentration appliziert wurde, zu einer Herunterregulierung von PTPIP51 positiven Zellen führte. Dies deckt sich mit der Beobachtung einer Assoziation des PTPIP51 mit Differenzierungsprozessen. Die insignifikante Zunahme von PTPIP51 positiven Zellen, die man bei EGF-Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-8} M beobachtete, könnte eine Folge der Herunterregulierung des EGF Rezeptors (Wiley et al. 1991, Nanney et al. 1992, Fickova 2002, Ono et al 2004) sein. Andererseits könnte diese Zunahme der PTPIP51 positiven Zellen bedingt sein durch eine konzentrationsabhängige Reduktion der Affinität des EGF zum Rezeptor (Huang et al. 2004), was wiederum zur Reduktion der Proliferation führt.

Wie von Gandarillas (2000) und Candi et al. 2005 beschrieben, besteht eine direkte Beziehung und Abhängigkeit zwischen Proliferation, Differenzierung und programmiertem Zelltod, um die physiologische Hautbarriere zur Umwelt zu erhalten. Es ist denkbar, dass PTPIP51 in die Regulation dieser Abhängigkeiten involviert ist, was bedeutet, dass PTPIP51 sowohl in Differenzierungsvorgängen als auch in Apoptose von HaCaT-Zellen involviert sein

kann. Die suprabasale Expression von PTPIP51 in der Epidermis und anderen mehrschichtigen Epithelien, sowie ihr Vorkommen in Kernen apoptotischer Zellen impliziert eine vergleichbare Rolle *in vivo*.

Abschließend ist zu bemerken, dass aufgrund des wesentlich geringeren Anteils von PTPIP51 positiven Zellen und verringerter Zellzahlen unter dem Mediumzusatz Panexin, dieser Mediumzusatz vermutlich keine Alternative zum bisher verwandten FKS darstellt.

4.4.4 In Situ Hybridisierung an mit EGF behandelten Keratinocyten

Obwohl In Situ Hybridisierung an HaCaT-Zellen, die mit Wachstumsfaktor behandelt wurden, nur qualitativ ausgewertet wurden, ließ sich ein Trend erkennen, der die mittels immunocytochemischem Nachweis gewonnenen Erkenntnis zur Lokalisation des PTPIP51 bestätigt: Die Zugabe von 10^{-9} M EGF verringerte die Reaktivität, wohingegen höhere Konzentrationen (10^{-8} und 10^{-7} M), die Reaktivität wieder ansteigen ließen. Folglich ist es wahrscheinlich, dass EGF schon auf Transkriptionsebene die Genexpression von PTPIP51 beeinflussen könnte.

4.4.5 Immunblotting von mit EGF behandelten Keratinocyten

Im Western Blot von HaCaT-Zelllysaten zeigte sich ein spezifisches Bandenmuster in Abhängigkeit von der Konzentration des Wachstumsfaktor EGF. Die Bandenstruktur des immunoreaktiv detektierten PTPIP51 in HaCaT-Keratinocyten unterschied sich wesentlich von der einzelnen Bande mit 45kDa, die in humaner Haut detektiert wurde (Stenzinger et al. 2005). Dies bedeutet, dass in kultivierten humanen Keratinocyten weitere Formen der PTPIP51 exprimiert werden.

Dies stimmt mit vorherigen Beobachtungen überein, die zeigten, dass PTPIP51 eine zell- und gewebeabhängige Expression mit unterschiedlichen Molekulargewichten besitzt, die wahrscheinlich Isoformen dieses Proteins darstellen (Stenzinger et al. 2005). Diese Isoformen werden durch dasselbe Gen kodiert werden. Es beinhaltet 12 Exons und ist auf dem Chromosom 15 (15q15.1) lokalisiert. Die Variationen im Molekulargewicht könnten möglicherweise auf Splicingvarianten zurückzuführen sein oder auf die Verwendung verschiedener AUG-Tripletts als Startcodons in den unterschiedlichen Geweben hindeuten. AUG Tripletts ohne Kozak-Sequenz finden sich am Beginn von Exon 1, 2 und 3. Ein anderes Startcodon mit begleitender Kozak-Sequenz ist am Beginn von Exon 4 lokalisiert. Wenn diese Tripletts als Startpunkte der Transkription genutzt würden, könnten dabei Proteine generiert werden mit Molekulargewichten von 52, 45, 38 und 30 kDa. Das entspricht den in einer SDS-

Diskussion

Page ermittelten Molekulargewichten von PTPIP51-Protein. Obwohl die experimentellen Befunde und die theoretischen Überlegungen übereinstimmen, ist das hypothetische Auftreten verschiedener Isoformen Gegenstand weiterer Studien.

5. Zusammenfassung

Reversible Tyrosinphosphorylierung bzw. -dephosphorylierung von Proteinen ist ein zentraler Mechanismus zur Regulation verschiedenster zellulärer Vorgänge wie z. B. Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Die Dephosphorylierung ist die dabei zu kontrollierende Instanz und erfolgt sehr präzise mittels verschiedener Protein Tyrosin Phosphatasen.

Bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern der eng verwandten PTP PTP1B und TCPTP, wurde mit Hilfe eines Yeast Two Hybrid Screen das PTPIP51 entdeckt.

Ziel der vorliegenden Dissertation war zunächst die morphologische Analyse des PTPIP51 in der Haut verschiedener Spezies. Dabei ergab sich der Nachweis des PTPIP51 mittels Immunfluoreszenzmethoden in der Epidermis aller untersuchten Spezies und Hautareale in einem charakteristischen Muster: Im Stratum basale war PTPIP51 nicht nachweisbar, wohingegen die suprabasalen Schichten eine ausgeprägte positive Reaktion aufwiesen. Aus der Gleichverteilung mit Differenzierungsmarkern der Epidermis und der cytoplasmatischen Lokalisation ließ sich auf eine mögliche Assoziation mit Differenzierungsvorgängen schließen.

Dies wurde auch durch das Verteilungsmuster innerhalb der Hautanhangsgebilde gestützt, die einen Nachweis von PTPIP51 in den Schichten ergaben, die sich ähnlich zu denen der suprabasalen Zellschichten der Epidermis differenzieren. Ein Nachweis in pyknotischen Zellkernen und Zellmembranen von Sebocysten deuteten auf eine mögliche Assoziation mit Vorgängen der Apoptose hin. Es ist denkbar, dass PTPIP51 in beide Vorgänge involviert ist.

Die Spezifität des Antikörpers gegen PTPIP51 wurde bestätigt durch In Situ Hybridisierungs Experimente. Dabei ergab sich beim Nachweis der PTPIP51 mRNA eine nahezu identische Lokalisation im Vergleich zum Protein in Epidermis und Hautanhangsgebilden.

Proliferation und Differenzierung werden in der Epidermis durch Faktoren induziert, die die Genexpression beeinflussen. Tyrosinphosphorylierung spielt im Rahmen der Signaltransduktion dabei eine entscheidende Rolle.

In diesem Zusammenhang wurde anhand von EGF mit seiner weitgehend proliferativen Wirkung und einer immortalisierten Keratinocytenzelllinie (HaCaT) gezeigt, dass es bei niedrigen Konzentrationen von EGF zu einer signifikant geringeren Expression von PTPIP51 kommt. Dieser Effekt war bei steigender Konzentration rückläufig, was auf einer Herunterregulierung des EGFR beruhen könnte. Eine Assoziation von PTPIP51 mit Mitochondrien und Nucleus deuteten daraufhin, dass auch in vivo eine Verknüpfung mit apoptotischen Vorgängen denkbar wäre.

Zusammenfassung

Die Beobachtung eines spezifischen Bandenmusters in Abhängigkeit von der Konzentration des EGF im Immunblotting stimmte mit vorherigen Beobachtungen überein. Sie zeigten, dass PTPIP51 eine zell- und gewebeabhängige Expression mit unterschiedlichen Molekulargewichten besitzt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Isoformen dieses Proteins.

6. Summary

Reversible protein tyrosine phosphorylation and dephosphorylation are central mechanisms of the regulation of the most different cellular processes as for example proliferation, apoptosis and differentiation. Dephosphorylation has occurred to be the switch point in this process which has to be controlled precisely. This is done by different protein tyrosine phosphatases.

With the search for possible interaction partners of the narrowly related PTP PTP1B and TCPTP, PTPIP51 was discovered with the help of a Yeast Two Hybrid Screen.

The first purpose of the present thesis was the morphological analysis of the PTPIP51 in the skin of different species. Besides, PTPIP51 was detected by means of immune fluorescence methods in the epidermis of all examined species and skin areas in a typical pattern: In the Stratum basale PTPIP51 was not found, while the suprabasal layers showed a distinctive positive reaction. From the same distribution with differentiation markers of the epidermis and the cytoplasmatic localization of the protein can be inferred on a possible association with differentiation processes.

This was also supported by the distribution pattern within the skin appendages which showed PTPIP51 in the layers which differentiate similarly to those of the suprabasal strata of the epidermis. Detection in pycnotic nuclei and cell membranes of sebocytes pointed to a possible association with processes of apoptosis. Therefore it is conceivable that PTPIP51 is involved in both functional areas.

The specificity of the antibody against PTPIP51 was confirmed by In Situ Hybridisation experiments. Besides, the PTPIP51 mRNA had a nearly identical localization like the protein in epidermis and skin appendages.

Proliferation and differentiation are induced in the epidermis by factors which influence genetic expression. Herein tyrosine phosphorylation as a part of signaltransduction pathways plays a crucial role.

In this context it was shown on the example of EGF with his mostly proliferative effect and an immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT) that low concentrations of EGF lead to a significantly lower expression of PTPIP51. This effect disappeared with rising concentrations what is probably due to downregulation of the EGFR.

An association of PTPIP51 with mitochondria and nuclei also indicated that in vivo a linking of PTPIP51 with apoptotic processes could be conceivable.

The observation of a specific band pattern in dependence of different concentrations of EGF in the immunoblotting agreed with previous observations which showed that PTPIP51 has a

Summary

cell and tissue dependent expression of different molecular weights. Besides, isoforms of this protein are probably concerned.

7. Literaturverzeichnis

A

Adams JC, Watt FM.

Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes.
Nature. **1989** Jul 27;340(6231):307-9.

Alibardi L, Tschachler E, Eckhart L.

Distribution of caspase-14 in epidermis and hair follicles is evolutionarily conserved among mammals.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. **2005** Oct;286(2):962-73.

Asselineau D, Dale BA, Bernard BA.

Filaggrin production by cultured human epidermal keratinocytes and its regulation by retinoic acid.
Differentiation. **1990** Dec;45(3):221-9.

B

Banks-Schlegel S, Green H.

Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia.
J Cell Biol. **1981** Sep;90(3):732-7.

Banks-Schlegel SP, Harris CC.

Tissue-specific expression of keratin proteins in human esophageal and epidermal epithelium and their cultured keratinocytes.
Exp Cell Res. **1983** Jul;146(2):271-80.

Bikle DD, Pillai S.

Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation.
Endocr Rev. **1993** Feb;14(1):3-19. Review.

Blumenberg M

Molecular biology of human keratin genes

In: Molecular Biology of the Skin: The Keratinocyte.

Darmon M, Blumenberg M, editors

San Diego, 1993 Academic Press, Inc., pp. 1-24

Blumenberg M, Tomic-Canic M.

Human epidermal keratinocyte: keratinization processes.

EXS. 1997;78:1-29. Review.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE.

Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.

J Cell Biol. 1988 Mar;106(3):761-71.

Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T.

A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum.

J Invest Dermatol. 2005 Jan;124(1):198-203.

Bürklen T

Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase und potentiellen Interaktionspartnern

Diplomarbeit, 2001, University of Konstanz

Büttel R

Untersuchungen zur Funktion von potentiellen Proteintyrosin-Phosphatasen interagierenden Proteinen

Diplomarbeit, 2000, University of Konstanz

C

Candi E, Schmidt R, Melino G.

The cornified envelope: a model of cell death in the skin.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Apr;6(4):328-40. Review.

Carpenter G, King L Jr, Cohen S.

Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro.

Nature. **1978** Nov 23;276(5686):409-10.

Carpenter G, Cohen S.

Epidermal growth factor.

J Biol Chem. **1990** May 15;265(14):7709-12. Review.

Carroll JM, Albers KM, Garlick JA, Harrington R, Taichman LB.

Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. **1993** Nov 1;90(21):10270-4.

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G.

Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7.

J Invest Dermatol. **2004** May;122(5):1235-44.

Cha D, O'Brien P, O'Toole EA, Woodley DT, Hudson LG.

Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) relative to epidermal growth factor (EGF).

J Invest Dermatol. **1996** Apr;106(4):590-7.

Cho SG, Choi EJ.

Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases.

J Biochem Mol Biol. **2002** Jan 31;35(1):24-7. Review.

Choi EH, Brown BE, Crumrine D, Chang S, Man MQ, Elias PM, Feingold KR.

Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity.

J Invest Dermatol. **2005** Mar;124(3):587-95.

Cohen S, Elliott GA.

The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse.

J Invest Dermatol. **1963** Jan;40:1-5.

Crick FH, Rich A.

Structure of polyglycine II.

Nature. **1955** Oct 22;176(4486):780-1.

D

Dale BA, Resing KA, Lonsdale-Eccles JD.

Filaggrin: a keratin filament associated protein.

Ann N Y Acad Sci. **1985**;455:330-42. Review.

Dale BA, Holbrook KA, Fleckman P, Kimball JR, Brumbaugh S, Sybert VP.

Heterogeneity in harlequin ichthyosis, an inborn error of epidermal keratinization: variable morphology and structural protein expression and a defect in lamellar granules.

J Invest Dermatol. **1990** Jan;94(1):6-18.

Denning MF, Dlugosz AA, Threadgill DW, Magnuson T, Yuspa SH.

Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta.

J Biol Chem. **1996** Mar 8;271(10):5325-31.

Denning MF, Dlugosz AA, Cheng C, Dempsey PJ, Coffey RJ Jr, Threadgill DW, Magnuson T, Yuspa SH.

Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes.

Exp Dermatol. **2000** Jun;9(3):192-9.

Denning MF.

Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms.

Int J Biochem Cell Biol. **2004** Jul;36(7):1141-6. Review.

De Potter IY, Poumay Y, Squillace KA, Pittelkow MR.

Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation.

Exp Cell Res. **2001** Dec 10;271(2):315-28.

Descargues P, Deraison C, Prost C, Fraitag S, Mazereeuw-Hautier J, D'Alessio M, Ishida-Yamamoto A, Bodemer C, Zambruno G, Hovnanian A.

Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome.

J Invest Dermatol. **2006** Jul;126(7):1622-32. Epub 2006 Apr 20.

van Dorst EB, van Muijen GN, Litvinov SV, Fleuren GJ.

The limited difference between keratin patterns of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas is explicable by both cell lineage and state of differentiation of tumour cells.

J Clin Pathol. **1998** Sep;51(9):679-84.

E

Eckert F, Nilles M, Schmid U, Altmannsberger M.

Distribution of cytokeratin polypeptides in syringomas. An immunohistochemical study on paraffin-embedded material.

Am J Dermatopathol. **1992** Apr;14(2):115-21.

Eckert RL.

Structure, function, and differentiation of the keratinocyte.

Physiol Rev. **1989** Oct;69(4):1316-46. Review.

Egelrud T, Regnier M, Sondell B, Shroot B, Schmidt R.

Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in reconstructed human epidermis and its suppression by retinoic acid.

Acta Derm Venereol. **1993** Jun;73(3):181-4.

Elias PM, Ghadially R.

The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities.

Clin Geriatr Med. **2002** Feb;18(1):103-20, vii. Review.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.

Nature. **1998** Jan 1;391(6662):43-50. Erratum in: Nature 1998 May 28;393(6683):396.

F

Fickova M.

Structure and activation of EGF receptor: minireview.

Endocr Regul. **2002** Jun;36(2):87-93. Review.

Filvaroff E, Stern DF, Dotto GP.

Tyrosine phosphorylation is an early and specific event involved in primary keratinocyte differentiation.

Mol Cell Biol. **1990** Mar;10(3):1164-73.

Fischer H, Stichenwirth M, Dockal M, Ghannadan M, Buchberger M, Bach J, Kapetanopoulos A, Declercq W, Tschachler E, Eckhart L.

Stratum corneum-derived caspase-14 is catalytically active.

FEBS Lett. **2004** Nov 19;577(3):446-50.

Fuchs E, Green H.

Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A.

Cell. **1981** Sep;25(3):617-25.

Fuchs E.

Epidermal differentiation: the bare essentials.

J Cell Biol. **1990** Dec;111(6 Pt 2):2807-14. Review.

Fuchs E.

The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments.

Annu Rev Genet. **1996**;30:197-231. Review.

Fukuyama R, Shimizu N.

Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in human tissues.

J Exp Zool. **1991** Jun;258(3):336-43.

G

Gandarillas A.

Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways?

Exp Gerontol. **2000** Feb;35(1):53-62. Review.

Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM.

The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model.

J Clin Invest. **1995** May;95(5):2281-90.

Gibbs S, Ponec M.

Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa.

Arch Oral Biol. **2000** Feb;45(2):149-58.

Gniadecki R.

Activation of Raf-mitogen-activated protein kinase signaling pathway by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human keratinocytes.
J Invest Dermatol. **1996** Jun;106(6):1212-7.

Grinnell F.

Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation.
J Cell Sci. **1992** Jan;101 (Pt 1):1-5. Review.

Gunaratne P, Stoscheck C, Gates RE, Li L, Nanney LB, King LE.

Protein tyrosyl phosphatase-1B is expressed by normal human epidermis, keratinocytes, and A-431 cells and dephosphorylates substrates of the epidermal growth factor receptor.
J Invest Dermatol. **1994** Nov;103(5):701-6.

Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R.

Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation.
Endocr Rev. **2002** Dec;23(6):763-86. Review.

H

Hanada M, Feng J, Hemmings BA.

Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target.
Biochim Biophys Acta. **2004** Mar 11;1697(1-2):3-16. Review.

Hashimoto K.

Regulation of keratinocyte function by growth factors.
J Dermatol Sci. **2000** Dec;24 Suppl 1:S46-50. Review.

Hauri HP, Bucher K.

Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution.
Anal Biochem. **1986** Dec;159(2):386-9.

Hohl D, Ruf Olano B, de Viragh PA, Huber M, Detrisac CJ, Schnyder UW, Roop DR.

Expression patterns of loricrin in various species and tissues.
Differentiation. **1993** Aug;54(1):25-34.

Hori T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura H, Fukagawa T.

Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells.
J Cell Sci. **2003** Aug 15;116(Pt 16):3347-62. Epub 2003 Jun 26.

Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T.

Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3.
Endocrinology. **1983** Dec;113(6):1950-7.

Huang Y, Chang Y, Wang X, Jiang J, Frank SJ.

Growth hormone alters epidermal growth factor receptor binding affinity via activation of extracellular signal-regulated kinases in 3T3-F442A cells.
Endocrinology. **2004** Jul;145(7):3297-306. Epub 2004 Apr 7.

Hynes RO.

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell. **1992** Apr 3;69(1):11-25. Review.

I

Ibarra-Sanchez MJ, Simoncic PD, Nestel FR, Duplay P, Lapp WS, Tremblay ML.

The T-cell protein tyrosine phosphatase.
Semin Immunol. **2000** Aug;12(4):379-86. Review.
Review über TCPTP, Basics, Diskussion

Imcke E, Gollnick H, Orfanos CE.

Presence and distribution of cytokeratins and filaggrin in human anagen follicles

Hautarzt. **1988** Oct;39(10):680-3.

Ishida-Yamamoto A, Iizuka H.

Eccrine syringofibroadenoma (Mascaro). An ultrastructural and immunohistochemical study.

Am J Dermatopathol. **1996** Apr;18(2):207-11.

Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WM, Dale BA, Iizuka H.

Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation.

Br J Dermatol. **1997** Jul;137(1):9-16.

Itin PH, Pittelkow MR, Kumar R.

Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium.

Endocrinology. **1994** Nov;135(5):1793-8.

J

Jetten AM.

Multi-stage program of differentiation in human epidermal keratinocytes: regulation by retinoids.

J Invest Dermatol. **1990** Nov;95(5 Suppl):44S-6S.

Jones JC, Kurpakus MA, Cooper HM, Quaranta V.

A function for the integrin alpha 6 beta 4 in the hemidesmosome.

Cell Regul. **1991** Jun;2(6):427-38.

K

Kanitakis J, Zambruno G, Viac J, Thivolet J.

Involucrin expression in adnexal skin tumours. An immunohistological study.

Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. **1986**;408(5):527-40.

O'Keefe EJ, Woodley DT, Falk RJ, Gammon WR, Briggaman RA.

Production of fibronectin by epithelium in a skin equivalent.

J Invest Dermatol. **1987** May;88(5):634-9.

Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, Takehara K, Diamandis EP.

Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases.

Br J Dermatol. **2005** Aug;153(2):274-81.

Komine M, Hattori N, Tamaki K.

Eccrine syringofibroadenoma (Mascaro): an immunohistochemical study.

Am J Dermatopathol. **2000** Apr;22(2):171-5.

L

Latham JA, Redfern CP, Thody AJ, De Kretser TA.

Immunohistochemical markers of human sebaceous gland differentiation.

J Histochem Cytochem. **1989** May;37(5):729-34.

Li LH, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T.

Silibinin Prevents UV-Induced HaCaT Cell Apoptosis Partly through Inhibition of Caspase-8 Pathway.

Biol Pharm Bull. **2006** Jun;29(6):1096-101.

Limat A, Breitzkreutz D, Stark HJ, Hunziker T, Thikoetter G, Noser F, Fusenig NE.

Experimental modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes from epidermis and hair follicle outer root sheath and matrix cells.

Ann N Y Acad Sci. **1991** Dec 26;642:125-46; discussion 146-7.

Liu F, Chernoff J.

Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor.

Biochem J. **1997** Oct 1;327 (Pt 1):139-45.

M

Manabe M, O'Guin WM.

Keratohyalin, trichohyalin and keratohyalin-trichohyalin hybrid granules: an overview.

J Dermatol. **1992** Nov;19(11):749-55. Review.

Marchese C, Rubin J, Ron D, Faggioni A, Torrisi MR, Messina A, Frati L, Matsumoto K, Hashimoto K, Kiyoki M, Yamamoto M, Yoshikawa K.

Effect of 1,24R-dihydroxyvitamin D3 on the growth of human keratinocytes.

J Dermatol. **1990** Feb;17(2):97-103.

Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J.

Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP.

Nat Cell Biol. **2005** Jan;7(1):78-85. Epub 2004 Dec 12.

Moll I, Moll R.

Comparative cytokeratin analysis of sweat gland ducts and eccrine poromas.

Arch Dermatol Res. **1991**;283(5):300-9.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R.

The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.

Cell. **1982** Nov;31(1):11-24. Review.

Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW.

Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies.

Am J Pathol. **1992** Feb;140(2):427-47.

Morales CP, Gandia KG, Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Spechler SJ.

Characterisation of telomerase immortalised normal human oesophageal squamous cells.

Gut. **2003** Mar;52(3):327-33.

N

Nanney LB, Magid M, Stoscheck CM, King LE Jr.

Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendages.

J Invest Dermatol. **1984** Nov;83(5):385-93.

Nanney LB, Yates RA, King LE Jr.

Modulation of epidermal growth factor receptors in psoriatic lesions during treatment with topical EGF.

J Invest Dermatol. **1992** Mar;98(3):296-301.

Nonomura K, Yamanishi K, Hosokawa Y, Doi H, Hirano J, Fukushima S, Yasuno H.

Localization of transglutaminase 1 mRNA in normal and psoriatic epidermis by non-radioactive in situ hybridization.

Br J Dermatol. **1993** Jan;128(1):23-8.

O

Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H, Fujii T, Kuwano M.

Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation.

Mol Cancer Ther. 2004 Apr;3(4):465-72.

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase TO, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S.

Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs.

Nat Genet. 2004 Jan;36(1):40-5. Epub 2003 Dec 21.

P

Peus D, Hamacher L, Pittelkow MR.

EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation.

J Invest Dermatol. **1997** Dec;109(6):751-6.

Pivarcsi A, Szell M, Kemeny L, Dobozy A, Bata-Csorgo Z.

Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes.

Arch Dermatol Res. **2001** Apr;293(4):206-13.

Ponec M, Gibbs S, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Mommaas AM.

Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation.

Arch Dermatol Res. **1997** May;289(6):317-26.

Porsche A

Identifikation von Interaktionspartnern der T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase durch das Lex-A Two Hybrid

System.Thesis (Ph.D.), **2001**, University of Konstanz, UFO Publishers, Allensbach, Vol. 414

Presland RB, Bassuk JA, Kimball JR, Dale BA.

Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin.

J Invest Dermatol. **1995** Feb;104(2):218-23.

Presland RB, Dale BA.

Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease.

Crit Rev Oral Biol Med. **2000**;11(4):383-408. Review.

R

Reichert U, Michel S, Schmidt R

The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes

In: Molecular biology of the skin. The keratinocyte.

Darmon M, Blumenberg M, editors.

San Diego: Academic press. **1993**, pp. 107-150

Romsicki Y, Kennedy BP, Asante-Appiah E.

Purification and characterization of T cell protein tyrosine phosphatase

reveals significant functional homology to protein tyrosine phosphatase-1B.

Arch Biochem Biophys. **2003** Jun 1;414(1):40-50.

Roop DR, Huitfeldt H, Kilkenny A, Yuspa SH.

Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured

epidermal cells detected by monospecific antibodies to unique peptides of mouse epidermal keratins.

Differentiation. **1987**;35(2):143-50.

Ryle CM, Breitzkreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusenig NE.

Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human

keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones.

Differentiation. **1989** Mar;40(1):42-54.

S

Schwarz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW.

Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components.

Annu Rev Cell Biol. **1990**;6:461-91. Review.

Sheikh MS, Antinore MJ, Huang Y, Fornace AJ Jr.

Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1.

Oncogene. **1998** Nov 19;17(20):2555-63.

Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK.

Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications.

Histol Histopathol. **1999** Apr;14(2):657-64. Review.

Stark HJ, Breitzkreutz D, Limat A, Ryle CM, Roop D, Leigh I, Fusenig N.

Keratins 1 and 10 or homologues as regular constituents of inner root sheath and cuticle cells in the human hair follicle.

Eur J Cell Biol. **1990** Aug;52(2):359-72.

Stenzinger A, Kajosch T, Tag C, Porsche A, Welte I, Hofer HW, Steger K, Wimmer M.

The novel protein PTPIP51 exhibits tissue- and cell-specific expression.

Histochem Cell Biol. **2005** Jan;123(1):19-28. Epub 2004 Dec 18.

T

Tamada Y, Takama H, Kitamura T, Yokochi K, Nitta Y, Ikeya T, Matsumoto Y.

Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA.

Br J Dermatol. **1994** Oct;131(4):521-4.

Tennenbaum T, Li L, Belanger AJ, De Luca LM, Yuspa SH.

Selective changes in laminin adhesion and alpha 6 beta 4 integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation.

Cell Growth Differ. **1996** May;7(5):615-28.

Tiganis T, Bennett AM, Ravichandran KS, Tonks NK.

Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase.

Mol Cell Biol. **1998** Mar;18(3):1622-34.

Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE.

Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors.

Proc Natl Acad Sci U S A. **1980** Sep;77(9):5258-62.

Tomarev SI, Sundin O, Banerjee-Basu S, Duncan MK, Yang JM, Piatigorsky J.

Chicken homeobox gene Prox 1 related to Drosophila prospero is expressed in the developing lens and retina.

Dev Dyn. **1996** Aug;206(4):354-67. Erratum in: Dev Dyn 1996 Sep;207(1):120.

Tyner AL, Fuchs E.

Evidence for posttranscriptional regulation of the keratins expressed during hyperproliferation and malignant transformation in human epidermis.

J Cell Biol. **1986** Nov;103(5):1945-55.

U/V

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al.

Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.

Nature. **1984** May 31-Jun 6;309(5967):418-25.

Ushiro H, Cohen S.

Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes.

J Biol Chem. **1980** Sep 25;255(18):8363-5.

Varley CL, Stahlschmidt J, Smith B, Stower M, Southgate J.

Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells.

Am J Pathol. **2004** May;164(5):1789-98.

W

Wahl MI, Nishibe S, Suh PG, Rhee SG, Carpenter G.

Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1989** Mar;86(5):1568-72.

Wakita H, Takigawa M.

Activation of epidermal growth factor receptor promotes late terminal differentiation of cell-matrix interaction-disrupted keratinocytes.
J Biol Chem. **1999** Dec 24;274(52):37285-91.

Walts AE, Said JW, Siegel MB, Banks-Schlegel S.

Involucrin, a marker of squamous and urothelial differentiation. An immunohistochemical study on its distribution in normal and neoplastic tissues.
J Pathol. **1985** Apr;145(4):329-40.

Wang Y, Wu J, Wang Z.

Akt binds to and phosphorylates phospholipase C-gamma1 in response to epidermal growth factor.
Mol Biol Cell. **2006** May;17(5):2267-77. Epub 2006 Mar 8.

Welte I

Untersuchungen zur Struktur und Funktion des potentiell mit der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase interagierenden Proteins P30
Diplomarbeit, **2000**, University of Konstanz

Whitbread LA, Powell BC.

Expression of the intermediate filament keratin gene, K15, in the basal cell layers of epithelia and the hair follicle.
Exp Cell Res. **1998** Nov 1;244(2):448-59.

Wiley HS, Herbst JJ, Walsh BJ, Lauffenburger DA, Rosenfeld MG, Gill GN.

The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor.

J Biol Chem. **1991** Jun 15;266(17):11083-94.

Wollina U, Berger U, Stolle C, Stolle H, Schubert H, Hipler C.

Histochemistry of the porcine pilosebaceous unit.

Acta Histochem. **1992**;93(1):256-63.

Wujcik D.

EGFR as a target: rationale for therapy.

Semin Oncol Nurs. **2006** Feb;22(1 Suppl 1):5-9. Review.

Y

Yaffe MB, Beegen H, Eckert RL.

Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope.

J Biol Chem. **1992** Jun 15;267(17):12233-8.

Yamamoto O, Hisaoka M, Yasuda H, Kasai T, Hashimoto H.

Cytokeratin expression of apocrine and eccrine poromas with special reference to its expression in cuticular cells.

J Cutan Pathol. **2000** Aug;27(7):367-73. Erratum in: J Cutan Pathol 2001 Jan;28(1):55.

Yarden Y.

The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities.

Eur J Cancer. **2001** Sep;37 Suppl 4:S3-8. Review.

Yarden Y, Sliwkowski MX.

Untangling the ErbB signalling network.

Nat Rev Mol Cell Biol. **2001** Feb;2(2):127-37. Review.

Yoneda K, Yanagihara M, Mori S.

Immunohistochemical study of human eccrine sweat ducts with anti-keratin antibodies. Presence of a layer between luminal and peripheral cell layers.

Am J Dermatopathol. **1991** Oct;13(5):475-80.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Protein Kinase B (im englischen Sprachgebrauch)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calcium
cDNA	klonale Desoxyribonukleinsäure
cRNA	klonale Ribonukleinsäure
C-terminal	carboxy-terminal
Cy3	Indocarbocyanin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ER	endoplasmatisches Retikulum
erbB1	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	einfache Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
Grb2	Growth Factor Receptor Binding Protein
HER1	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
h	Stunde
IP ₃	Inositoltriphosphat
K	Keratin
kb	Kilo-Basenpaare

M	molar
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NTB	Nitroblautetrazoliumchlorid-Puffer
NTB-BCIP	Nitroblautetrazolium/Brom-Chlor-Indolylphosphat
N-terminal	amino-terminal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadische Logarithmus der Aktivität der Oxoniumionen
PI ₃ K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PKB	Protein Kinase B
PKC δ	Protein Kinase C δ
PSA	Penicillin, Streptomycin, Ampicillin
PTK	Protein Tyrosin Kinase
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTPIP51	Protein Tyrosin Phosphatase Interagierendes Protein 51
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	„Rat sarcoma“ (Rattensarkom): ein Proto-Onkogen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rowswell Park Memorial Institut: ein Zellkulturmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of mean (Standardfehler des Mittelwerts in der Statistik)
SH2	Src Homologie Region 2
S.	Seite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SOS	„Son of sevenless“- ein (Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GEF)) von Ras

Src	„Rous sarcoma virus“- eine proto-onkogene Tyrosinkinase
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCPTP	T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase
TGF α	Transformierender Wachstumsfaktor α
TNMT	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TTBS	Tris gepufferte Salzlösung mit 0,5ml Tween 20 auf 1l TBS
U	Unit
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

Publikationen

Albrecht Stenzinger*, Dietmar Schreiner[°], Thorsten Pfeiffer*, Claudia Tag*, Hans Werner Hofer[°] and Monika Wimmer* (2006)

EGF, TGF, retinoic acid and 1,25(OH)₂D₃ regulated expression of the novel protein PTPIP51 in keratinocytes

**Justus-Liebig-University of Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, D-35385 Giessen, Germany*

°University of Konstanz, Department of Biology, D-78547 Konstanz, Germany

eingereicht bei Cells Tissues Organs

Poster

Albrecht Stenzinger*, Dietmar Schreiner[°], Thorsten Pfeiffer*, Claudia Tag*, Hans Werner Hofer[°] and Monika Wimmer* (2006)

Vitamine and EGF regulated expression of the novel protein PTPIP51 in epidermal cells

**Justus-Liebig-University of Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, D-35385 Giessen, Germany*

°University of Konstanz, Department of Biology, D-78547 Konstanz, Germany

Abstract Booklet; 48th Symposium of the Society for Histochemistry; Stresa

Kerstin Seyer*, Hans Werner Hofer^o, Thorsten Pfeiffer* and Monika Wimmer* (2003)

A Tcell PTP interacting Protein (TCPTPIP51) is expressed in different tissues in dependence from their degree of differentiation

**Justus-Liebig-University of Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, D-35385 Giessen, Germany*

^oUniversity of Konstanz, Department of Biology, D-78547 Konstanz, Germany

FEBS Special Meeting 2003 on Signal Transduction, Abstract Number: 715, Belgian Society of Biochemistry and Molecular Biology

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bedanken bei Frau PD Dr. Monika Wimmer-Röll für die Überlassung des Themas und die ausgesprochen gute Betreuung. Ihre ermutigende Art und optimistische Einstellung hat einen erheblichen Anteil zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Klaus Steeger und seinen ehemaligen Mitarbeitern aus dem Institut für Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für das Anfertigen der In Situ Hybridisierungen an Schnitten von Haut und an Keratinocyten im Rahmen der Stimulierung mit EGF.

Ein großer Teil der Arbeit wäre nur schwer umsetzbar gewesen ohne die Unterstützung der MTAs des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz besonders bei Claudia Tag bedanken, die mir nicht nur mit viel Geduld half, die verschiedenen Methoden zu erlernen, sondern auch den Immunoblot im Rahmen des EGF-Versuchs anfertigte. Des Weiteren möchte ich einen Dank an Martin Bodenbenner richten für die unermüdliche Unterstützung in der Zellkultur.

Herrn Albrecht Stenzinger gilt mein Dank für die große Hilfe bei der statistischen Analyse des EGF-Versuchs, aber auch für die aufschlussreichen und interessanten Diskussionen, die ich in den letzten Jahren mit ihm führen durfte.

Nicht zuletzt liegt dem Gelingen dieser Arbeit die Unterstützung, die ich in meiner Frau Tanja, meinen Eltern und Schwiegereltern erfahren habe, zu Grunde. Sie standen mir in all der Zeit, egal ob es Höhen oder Tiefen waren, immer treu zur Seite. Ich danke Euch dafür.

Der letzte und größte Dank gilt meinem Gott, dessen Gnade ich es zu verdanken habe, in einem Land zu leben, in dem Frieden herrscht und es möglich ist, zu studieren und zu forschen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thorsten Pfeiffer
Geburtsdatum	01.01.1978
Geburtsort	Siegen
Staatsbürgerschaft	deutsch
Familienstand	verheiratet, ein Kind

Schulbildung

1984-1988	Grundschule Haiger
1988-1994	Johann-Textor-Schule Haiger
1994-1997	Wilhelm-von-Oranien-Gymnasium Dillenburg
Juni 1997	Abitur

Studium

1998-2000	Studium der Zahnmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Februar 1999	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2000-2006	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
September 2001	Ärztliche Vorprüfung
März 2003	Erste Ärztliche Prüfung
März 2005	Zweite Ärztliche Prüfung
2005-2006	Praktisches Jahr am Evangelischen Krankenhaus Gießen, Lehrkrankenhaus der Universität Gießen Wahlfach: Anästhesie
Mai 2006	Dritte Ärztliche Prüfung
Juni 2006	Approbation