

Integrin $\alpha6\beta4$ und Proteinkinase C in epidermaler Differenzierung und Haut-Carcinogenese

Vom Fachbereich der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

(D 386)

vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Nicole Daum

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 01. Juli 2004

Kaiserslautern 2004

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 01. Juli 2004

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. E. Fusenig

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Februar 2001 und Mai 2004 in der Abteilung „Differenzierung und Carcinogenese *in vitro*“ des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg angefertigt.

SO EINE ARBEIT WIRD EIGENTLICH NIE FERTIG,
MAN MUSS SIE FÜR FERTIG ERKLÄREN,
WENN MAN NACH ZEIT UND UMSTÄNDEN DAS MÖGLICHSTE GETAN HAT.

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	DIE MENSCHLICHE HAUT.....	9
1.1.1	<i>Aufbau und Funktion</i>	9
1.1.2	<i>Die Basalmembran</i>	11
1.1.3	<i>Integrine</i>	12
1.1.3.1	Aufbau der Integrine.....	13
1.1.3.2	Vorkommen und Funktion der Integrine.....	15
1.1.3.3	Integrin $\alpha 6\beta 4$	16
1.1.4	<i>Proteinkinase C</i>	18
1.1.4.1	Aufbau der PKC-Familie.....	18
1.1.4.2	PKC in der Haut.....	20
1.1.5	<i>Integrine und Proteinkinase C in der Signaltransduktion</i>	20
1.1.6	<i>Organotypische Kokulturen</i>	21
1.2	HaCaT ALS MODELLSYSTEM.....	22
1.1	ADENOVIREN UND GENTRANSFER.....	24
1.2.1	<i>Aufbau der Adenoviren</i>	24
1.2.2	<i>Organisation des adenoviralen Genoms</i>	25
1.2.3	<i>Verlauf des Infektionszyklus</i>	25
1.2.4	<i>Gentransfer mittels Adenovirus-abgeleiteter Vektoren</i>	26
2	ZIELSETZUNG	28
3	MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1	ZELLKULTIVIERUNG.....	31
3.1.1	<i>Medien und Lösungen</i>	31
3.1.2	<i>Verwendete Zellen</i>	32
3.1.2.1	HaCaT-Keratinocyten.....	32
3.1.2.2	Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinocyten.....	32
3.1.2.3	Isolierung und Kultivierung primärer humaner Fibroblasten.....	32
3.1.2.4	Herstellung von Feeder-Zellen.....	33
3.1.2.5	Passagierung der Zellen.....	33
3.1.2.6	Einfrieren von Zellen.....	34

3.1.2.7	Test auf Mykoplasmenkontamination	34
3.1.3	<i>Proliferations-Test</i>	35
3.1.4	<i>Migrations-Tests</i>	35
3.1.5	<i>Adhäsions-Test</i>	35
3.1.6	<i>Herstellung von in vitro-Hautäquivalenten</i>	36
3.1.6.1	Isolierung von Kollagen für die Gele der organotypischen Kokultur	36
3.1.6.2	Standardprotokoll für organotypische Kokulturen (OTK).....	37
3.2	VERWENDUNG ADENOVIRALER GEN-KONSTRUKTE	37
3.2.1	<i>Herstellung</i>	37
3.2.2	<i>Bestimmung der Adenovirus-Konzentration</i>	40
3.2.3	<i>Adenovirale Infektion</i>	40
3.3	NACHWEIS DER PROTEIN-EXPRESSION	41
3.3.1	<i>Lyse der Zellen</i>	41
3.3.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	42
3.3.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese</i>	42
3.3.4	<i>Western Blot</i>	44
3.3.5	<i>Immunodetektion</i>	44
3.4	NACHWEIS DER MRNA-EXPRESSION.....	45
3.4.1	<i>Isolation von Gesamt-RNA</i>	45
3.4.2	<i>Reverse Transkription</i>	45
3.4.3	<i>Semiquantitative Polymersase-Ketten-Reaktion</i>	46
3.4.3.1	Optimierung der PCR-Bedingungen	46
3.4.3.2	Verwendete Primer und PCR-Bedingungen.....	47
3.4.4	<i>DNA-Gelelektrophorese</i>	47
3.5	GEWEBEAUFARBEITUNG.....	48
3.5.1	<i>Histologie</i>	48
3.5.2	<i>Gefrierschnitte</i>	48
3.5.3	<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	48
3.6	β -GALAKTOSIDASE FÄRBUNG	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	TESTS ZUR BIOLIGISCHEN SICHERHEIT.....	52
4.1.1	<i>Nachweis der E1A- und E1B-mRNA</i>	52
4.1.2	<i>Infektiösität des Medienüberstandes infizierter Zellen</i>	53

4.2	BESTIMMUNG DER ADENOVIRUS-KONZENTRATION	54
4.3	ETABLIERUNG DER ADENOVIRALEN INFEKTION	55
4.4	BESTIMMUNG DER PROTEIN-ÜBEREXPRESSION	56
4.4.1	<i>Proteinkinase C α</i>	57
4.4.2	<i>Proteinkinase C δ</i>	58
4.4.3	<i>Integrin $\alpha 6$-Untereinheit</i>	59
4.4.4	<i>Resultierende, optimale Adenovirus-Konzentration</i>	62
4.5	BESTIMMUNG DER mRNA-EXPRESSION	62
4.6	MORPHOLOGIE DER INFIZIERTEN ZELLEN	63
4.7	BESTIMMUNG DER PROTEIN-SYNTHESE UND -VERTEILUNG MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESZENZ	63
4.8	WACHSTUMSVERHALTEN	66
4.9	MIGRATIONS-TESTS	69
4.10	ADHÄSIONS-TEST	71
4.11	STRATIFIZIERUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSFÄHIGKEIT DER INFIZIERTEN ZELLEN IN DER ORGANOTYPISCHEN KOKULTUR (OTK)	74
4.11.1	<i>Histologie</i>	74
4.11.2	<i>Expression von Basalmembrankomponenten und Differenzierungsmarkern in Kontroll-, PKCα- und PKCδ-OTK</i>	77
4.11.3	<i>Nachweis der Transgen-exprimierenden Zellen in OTKs</i>	79
5	DISKUSSION	82
5.1	PROTEIN-ÜBEREXPRESSION MITTELS VERWENDUNG ADENOVIRALER KONSTRUKTE	83
5.2	EINFLUSS DER PROTEINE AUF DAS VERHALTEN DER INFIZIERTEN ZELLEN IN ZWEI- DIMENSIONALEN KULTUREN	86
5.2.1	<i>Wachstum der Zellen nach Infektion</i>	86
5.2.2	<i>Migrationsverhalten</i>	88
5.2.3	<i>Adhäsionsverhalten</i>	89
5.3	EINFLUSS DER PROTEINE AUF DAS VERHALTEN DER INFIZIERTEN ZELLEN IN DREI- DIMENSIONALEN KULTUREN	90
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
7	SUMMARY.....	98
8	LITERATUR	100

9 ANHANG 112

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Aufbau der Haut	9
Abbildung 2:	Schematische Darstellung von Dermis und den verschiedenen Epidermisschichten.....	11
Abbildung 3:	Vorkommen und Assoziation der verschiedenen α - und β -Integrinketten ...	13
Abbildung 4:	Schematische Struktur der Integrine.....	14
Abbildung 5:	Konstitutive und induzierte Integrin-Expression in Wunde, Tumor und Differenzierung.....	16
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau der PKC-Familie	19
Abbildung 7:	drei-dimensionale organotypischen Kokultur	22
Abbildung 8:	HaCaT-Modell der Stufenhautcarcinogenese.....	23
Abbildung 9:	Schematischer Aufbau des Adenovirus.....	25
Abbildung 10:	Cosmid-Kassetten der verwendeten adenoviralen Konstrukte.....	39
Abbildung 11:	Nachweis der E1-mRNA in verwendeten Zell-Linien und Virusstocks.	53
Abbildung 12:	Adenovirus-Titer-Assay an HEK 293.	54
Abbildung 13:	β -Gal Färbung β -Gal infizierter HaCaT ₆ -Zellen 2d nach Infektion.....	56
Abbildung 14:	Quantität und Dauer der Proteinexpression in HaCaT ₆ nach Infektion mit PKC α Ad.....	58
Abbildung 15:	Quantität der Proteinexpression in NHK nach Infektion mit PKC α Ad.....	58
Abbildung 16:	Quantität und Dauer der Proteinexpression in HaCaT ₆ nach Infektion mit PKC δ Ad.....	59
Abbildung 17:	Quantität der Proteinexpression in NHK nach Infektion mit PKC δ Ad.....	59
Abbildung 18:	Quantität der Integrin α 6- und β 4-Kette in HaCaT ₆ -Zellen.....	60
Abbildung 19:	Quantifizierung der Integrin α 6-Proteinsynthese in HaCaT ₆	61
Abbildung 20:	Quantität der Proteinexpression in HEK 293 und NHK.	61
Abbildung 21:	Integrin α 6-mRNA-Expression in infizierten HaCaT-Zellen	62
Abbildung 22:	Morphologie unbehandelter und infizierter HaCaT ₆	63
Abbildung 23:	Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT ₆ -Zellen, 2d pi.....	65
Abbildung 24:	Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten NHK 2d pi.....	66
Abbildung 25:	Wachstumsverhalten infizierter und Parental-HaCaT ₆	67
Abbildung 26:	Lichtmikroskopische Ansicht Integrin α 6 infizierter HaCaT ₆	67

Abbildung 27: Wachstumsverhalten infizierter und Parental-NHK.....	68
Abbildung 28: Lichtmikroskopische Ansicht Integrin α_6 infizierten NHK.....	68
Abbildung 29: Migrationsassay I nach 0 und 24 h für HaCaT ₆	70
Abbildung 30: Migrationsdistanz in Migrationsassay II nach 24 h für HaCaT ₆	71
Abbildung 31: Zellmorphologie von Kontroll-HaCaT ₆ und -NHK.....	72
Abbildung 32: Adhäsionsassay für Kontroll- und infizierte NHK.	73
Abbildung 33: Adhäsionsassay für Kontroll- und infizierte HaCaT ₆	74
Abbildung 34: Histologie von OTK mit infizierten und Parental-HaCaT ₆	75
Abbildung 35: Histologie der OTK mit Parental-HaCaT ₆ . und PKC δ infizierten Zellen.	76
Abbildung 36: Histologie von OTK mit infizierten und Parental-NHK.	76
Abbildung 37: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT in OTK.	77
Abbildung 38: Proliferation von Parental- und infizierten HaCaT in OTK.	78
Abbildung 39: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT in OTK.	75
Abbildung 40: β -Galaktosidase Färbung von OTKs β -Gal infizierter HaCaT ₆ -Zellen.....	80
Abbildung 41: Immunfluoreszenz von OTKs von Parental- und infizierten HaCaT ₆	81

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Standardmedien.....	31
Tabelle 2: Lösungen und Zusätze.....	31
Tabelle 3: Standardkultivierung der Zellen.....	34
Tabelle 4: Verwendete Matrizes.....	36
Tabelle 5: Zusammensetzung des Kollagengels.....	37
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien zur Lyse der Zellen.....	42
Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	43
Tabelle 8: Zusammensetzung der bei der Elektrophorese verwendeten Lösungen.....	43
Tabelle 9: Primäre Antikörper für den Western Blot.....	44
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für den Western Blot.....	45
Tabelle 11: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen.....	47
Tabelle 12: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	49
Tabelle 13: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	50
Tabelle 14: Zusammensetzung der X-Gal-Färbelösung.....	50
Tabelle 15: Determinierte Virusstock-Konzentrationen.....	55
Tabelle 16: Verwendete Adenovirus-Konzentrationen.....	62

1 EINLEITUNG

1.1 DIE MENSCHLICHE HAUT

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Körpers zu seiner Umwelt dar und schützt ihn vor mechanischen, chemischen und physikalischen Einwirkungen, wie z.B UV-Strahlung. Sie besteht aus drei funktionellen Schichten, aus einer sich ständig erneuernden Oberschicht, der sogenannten Epidermis, einer mechanisch stabilen Unterschicht, der Dermis, und der darunterliegenden Hypodermis. Epidermis und Dermis werden dabei durch die Basalmembran (BM) getrennt.

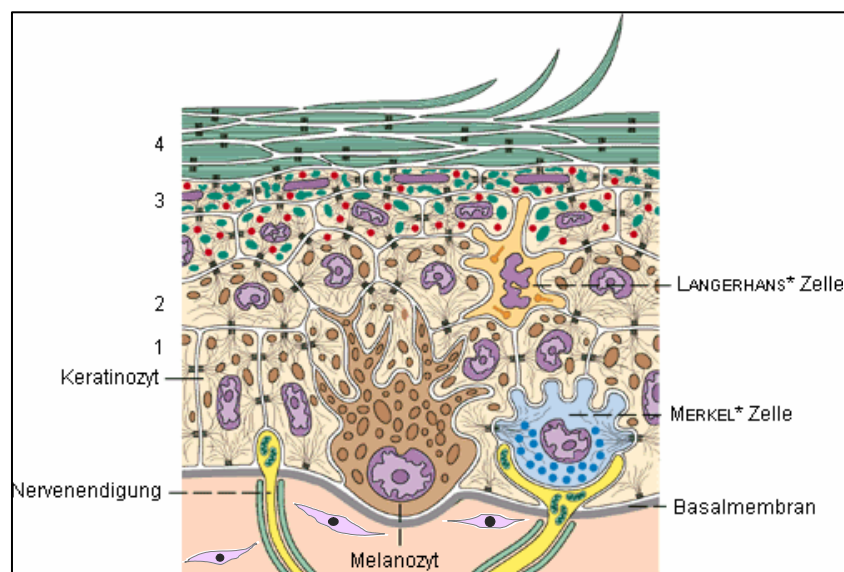


Abbildung 1: Aufbau der Haut

Die **Epidermis** ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, welches überwiegend aus Keratinozyten besteht. Desweiteren enthält die Epidermis auch Melanozyten zur Bildung und Verteilung von Melanin, Langerhans-Zellen zur Immunabwehr und Merkel-Zellen zur Tastempfindung. Die Keratinozyten als vorherrschender Zelltyp befinden sich in einem ständigen Erneuerungs- und Abstoßungsprozess und unterscheiden sich in den unterschiedlichen Schichten nicht nur durch die Zellform, sondern auch durch die Expression spezifischer Proteine (Holbrook 1994). Dabei ist das *Stratum basale* die proliferative Schicht in der Epidermis. Sie besteht aus palisadenartig auf der BM angeordneten Zellen. Neben den Stammzellen mit unbegrenztem Wachstumspotential befinden sich hier auch die *transient amplifying cells*, die nur noch wenige Zellzyklen durchlaufen können und danach in die terminale Differenzierung eintreten. Charakteristisch für die Basalzellen ist die Expression des Keratinpaars K5/14, das Grundelement des stabilen Cytoskeletts, der Tonofilamente (Moll et al. 1982; Steinert et al. 1985; Steinert & Roop 1988). Im *Stratum spinosum* nehmen die Zellen an Größe zu und zei-

gen eine unregelmäßige Gestalt sowie eine deutlich höhere Proteinsyntheseleistung. Dabei wird als prominentester Differenzierungsmarker das Keratinpaar K1/10 synthetisiert, das ein dichtes Netzwerk von stabilen Cytoskelettfilamenten ausbildet und neben den Desmosomen für die mechanische Stabilisierung der Epidermis verantwortlich ist (Garrod et al. 2002b). Auch die Expression der membranständigen Transglutaminase und des Hüllproteins Involucrin beginnen hier. Das *Stratum granulosum* stellt den Übergang von vitalen zu „toten“, synthetisch inaktiven Zellschichten dar und ist durch das Auftreten von Keratohyalin granula in den Zellen charakterisiert, die vor allem Filaggrin enthalten und das Keratinfilamentnetz verstärken. Daneben bilden sich an der Innenseite der Plasmamembran durch Anhäufung von Lipiden sowie Ablagerung und Quervernetzung weiterer Strukturproteine, wie Loricrin, chemisch äußerst resistente Strukturen, die *cornified envelopes* (Steinert et al. 1981; Lonsdale-Eccles et al. 1984; Magaldi et al. 1990; Hohl et al. 1991a; Hohl et al. 1991b). In den obersten Lagen werden Zellkerne und Organellen abgebaut. Proteine und Lipide werden über Granula in den Interzellulärraum abgegeben. Diese bilden mit den abgeflachten ineinander verzahnten Keratinozyten der Hornschicht, dem sog. *Stratum corneum*, eine stabile Barriere zur Umwelt. Erst nach Einstellung der metabolischen Aktivität werden die desmosomalen Kontakte gelöst und Lipide weiter metabolisiert, was schließlich das Abschilfern der Hornzellen vom Zellverband ermöglicht.

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

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

Die **Hypodermis** verbindet die Haut mit dem darunter liegenden Fettgewebe und besteht aus Bindegewebe, in das Energie-speichernde Adipozyten eingelagert sind. Sie ist stark von Blutgefäßen durchzogen, was eine schnelle Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet. Desweiteren isoliert das Fettgewebe den Körper vor Wärmeverlust.

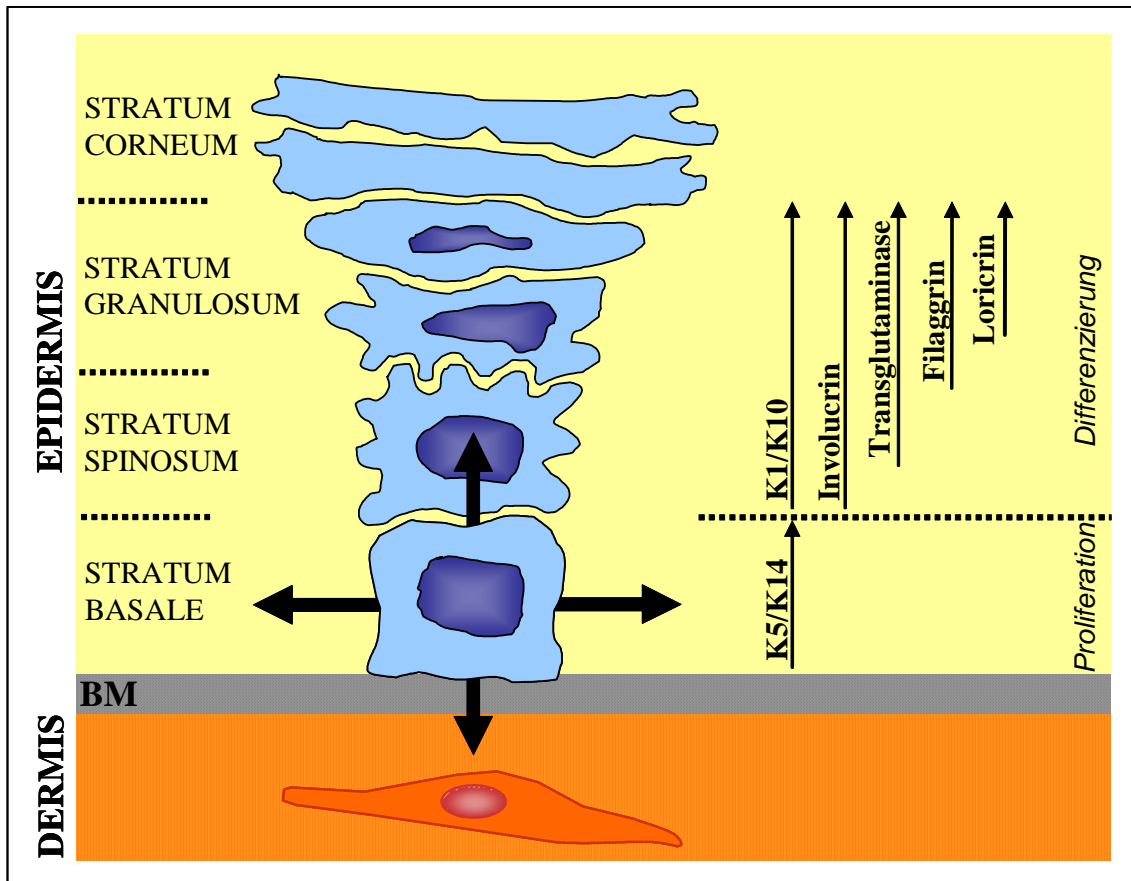


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Dermis und den verschiedenen Epidermisschichten

Ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierungsprozessen ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer funktionellen Epidermis unverzichtbar (Fuchs & Green 1980; Fuchs & Karakesisoglou 2001). Ein Schlüsselereignis der epidermalen Differenzierung ist dabei die Ablösung der Basalzellen von der BM und die Aufwärtsbewegung im Verlauf der terminalen Differenzierung bis hin zum Endprodukt, den Hornschuppen. Im Zuge der Wundregeneration können die Keratinozyten auch lateral migrieren. In der Tumorsituation können sie durch die Basalmembran in das Bindegewebe eindringen und letztendlich auch durch Blutgefäßwände in die Zirkulation gelangen (Abbildung 2).

1.1.2 Die Basalmembran

Basalmembranen (BM) repräsentieren dünne, flexible Strukturen von spezialisierter extrazellulärer Matrix und bilden generell das Substrat zur Anheftung der epithelialen Basal- sowie der endothelialen Zellen. Ferner umgeben BM Nerven- und Muskelfasern, glatte Muskeln, Fettzellen und Perizyten. Dabei trennt die BM Zellen und Zellschichten vom darunter liegenden oder sie umgebenden, lockeren Bindegewebe. Sie wird hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, von den Zellen synthetisiert, die auf ihr ruhen. Basalmembranen haben aber nicht nur einfache Strukturaufgaben, sie können desweiteren auch die Zellpolarität determinieren,

Zellproliferation und -differenzierung kontrollieren und als Barriere gegen Zellpenetration dienen (Kalluri 2003). In manchen Organen hat die BM ganz spezielle Funktionen, so dient sie als selektiver Filter in der Blut-Hirn-Schranke oder im Glomerulus der Niere. Basalmembranen spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Geweberegeneration nach Verletzungen. In der Wundsituation können Zellen aus dem umliegenden Gewebe auf der Basalmembran als Gerüst entlang migrieren und somit die Wunde schließen (siehe Abbildung 5). Dadurch wird die ursprüngliche Gewebsstruktur rasch wiederhergestellt.

Wie im Elektronenmikroskop erkennbar ist, besteht die Basalmembran aus zwei Schichten, der elektronendurchlässigen *Lamina lucida*, die unmittelbar an der Plasmamembran der Zellen liegt, und der elektronendichten *Lamina densa*. Die genaue Zusammensetzung der Basalmembran unterscheidet sich allerdings von Gewebe zu Gewebe. Dabei ist die Basalmembran in der Haut hauptsächlich aufgebaut aus den Glycoproteinen Laminin, Nidogen, Typ IV Kollagen und Perlecan, einem Heparan-Sulfat-Proteoglycan (Yurchenco et al. 1992; Marinkovich 1993; Timpl & Brown 1996; Chan 1997; McMillan et al. 2003). Die BM entsteht durch spezifische Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen und trägt wesentlich zur Widerstandsfähigkeit des Epithels gegenüber von außen wirkenden Kräften bei.

Laminin besteht aus drei langen, asymmetrisch-kreuzförmig angeordneten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Es bildet über Bindung der N-terminalen Enden Homo-Polymere und assoziiert zusätzlich mit Perlecan und über Nidogen indirekt mit Typ IV Kollagen. *Typ IV Kollagen* kommt fast ausschließlich in der BM vor und stellt aufgrund seiner festen und gleichzeitig biegsamen Struktur sowie der chemischen Widerstandsfähigkeit die strukturelle Hauptkomponente der BM dar. Wie bei allen Kollagenen ist das Kernelement in Typ IV Kollagen die dreisträngige Triple-Helix, die hier allerdings mehrfach unterbrochen ist, was die Flexibilität deutlich erhöht. Durch Quervernetzung über beide Enden (N- und C-Terminus) kommt es zur Bildung eines Maschendraht-ähnlichen Netzwerks. *Nidogen* assoziiert mit Laminin, Typ IV Kollagen sowie Perlecan und spielt eine wichtige Rolle als Verbindungsglied zwischen diesen Molekülen. *Perlecan* kommt ebenso in allen BM vor und ist mit seinen Heparansulfat-Seitenketten für die negative elektrostatische Ladung der BM verantwortlich. Es interagiert sowohl mit Laminin, als auch mit Typ IV Kollagen und Nidogen (Fox et al. 1991; Yurchenco et al. 1992; Timpl & Brown 1996; Aumailley & Smyth 1998).

1.1.3 Integrine

Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten wurden spezifische Zelloberflächen-Proteine, die die zelluläre Adhäsion zu anderen Zellen oder der ECM vermitteln,

in verschiedene Gruppen unterteilt. So unterscheidet man zwischen Integrinen, Selektinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Familie (Etzioni 1999).

Integrine sind ubiquitäre Zellmembran-Rezeptoren auf Säugerzellen, die eine Verknüpfung der extrazellulären Matrix mit dem intrazellulären Cytoskelett der Zellen herstellen. Sie wirken dabei als Transmembran-Kupplungen oder „Integratoren“ (Etzioni 1999). Sie unterscheiden sich von z.B. Hormonrezeptoren darin, dass sie ihre Liganden mit relativ geringer Affinität binden und dafür aber in bis zu 100-fach höherer Konzentration vorliegen. Diese individuell schwache Bindung an zahlreiche Matrixmoleküle erlaubt es den Zellen, über Zellausläufer die Umgebung zu erkunden, ohne den Kontakt zur Matrix zu verlieren. Wäre andererseits die Bindung zu fest, würden die Zellen regelrecht festkleben und könnten sich nicht mehr bewegen. Diese Form der Zell-Matrix-Interaktion wird deshalb auch als Klettverschluss-Prinzip bezeichnet (Alberts et al. 1995).

1.1.3.1 Aufbau der Integrine

Integrine bestehen aus zwei nicht-kovalent assoziierten Transmembran-Glykoproteinen, die man als α - und β -Untereinheit bezeichnet. Beide Untereinheiten tragen dabei zur Bindung der Matrixproteine bei. Bisher sind 16 α - und 8 β -Ketten beschrieben, die zusammen 22 Heterodimere bilden (Abbildung 3), wobei noch weitere Typen zu erwarten sind. Verstärkt wird diese Vielfalt durch unterschiedliches Spleißen einiger Integrin-mRNAs (Alberts et al. 1995).

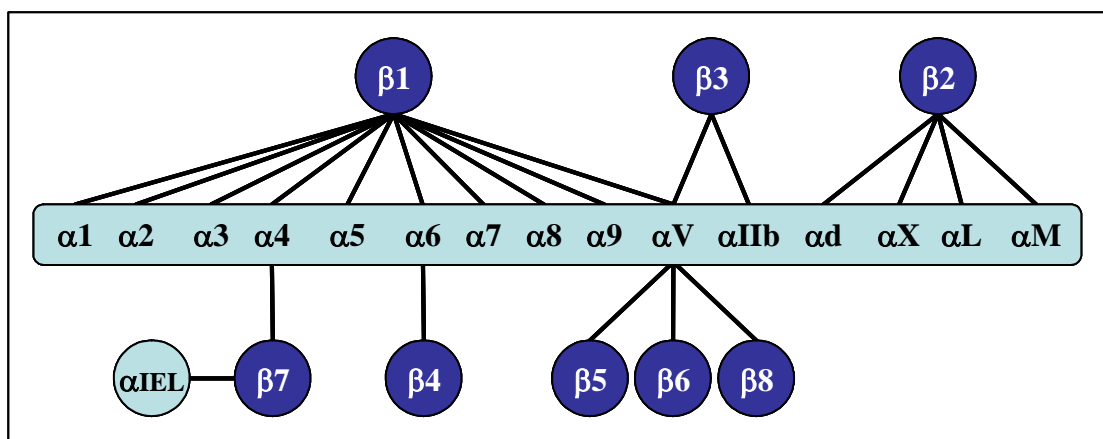


Abbildung 3: Vorkommen und Assoziation der verschiedenen α - und β -Integrinketten

Aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen und Röntgenstrukturanalysen wird heute die im Folgenden beschriebene Struktur postuliert: Der globuläre Kopf des Dimers ragt aus der Lipid-Doppelschicht in den Extrazellulärraum und bindet an spezifische Matrixproteine, während im Zellinnern das C-terminale Ende mit dem Cytoskelett assoziiert ist. Die beiden

Untereinheiten α und β sind glykosiliert und werden durch nicht-kovalente Bindung zusammen gehalten. Die zunächst durchgängige α -Kette wird nachträglich in einen kürzeren Transmembran-Teil und eine größere extrazelluläre Kette gespalten, die aber über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die extrazelluläre Domäne der β -Kette enthält vier Cysteinreiche Segmente. Die Bindung eines Integrins an seinen Liganden hängt von extrazellulären zweiwertigen Kationen ab, je nach Integrin-Typ Ca^{2+} oder Mg^{2+} . Die entsprechenden Bindungsstellen sind in drei bis vier Domänen der Kopf-Region der α -Kette lokalisiert (siehe Abbildung 4).

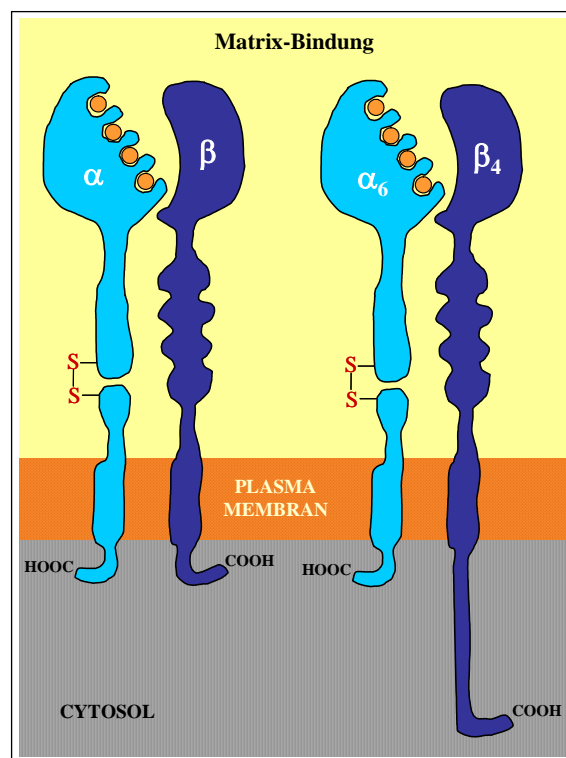


Abbildung 4: Schematische Struktur der Integrine

Die Spezifität eines Integrins für die Bindung bestimmter Liganden scheint hauptsächlich von der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit abhängig zu sein (Etzioni 1999). Jedoch sind beide Untereinheiten für die Funktion des Integrins von Bedeutung. Ein Großteil der Integrine erkennt die Tripeptid-Sequenz (Arginin, Glycin, Aspartat), die auch als RGD-Sequenz (Ein-Buchstaben-Code) bezeichnet wird. Nach der Bindung eines Integrins an seinen Liganden erfolgt die Bindung der cytoplasmatischen β -Kette an Talin, α -Aktinin und Vinculin, was die Bildung eines intrazellulären Adhäsionskomplexes auslöst (Hemler 1998; Liu et al. 2000). Diese Komplexe, oft als Cluster in *Focal Adhesions* vorliegend, verbinden Integrine mit den Aktin-Filamenten des Cytoskeletts. Die einzige Ausnahme hiervon bildet Integrin $\alpha_6\beta_4$, das als Teil der Hemidesmosomen in der Basalzellschicht mit seiner längeren cytoplasmatischen

$\beta 4$ -Domäne stattdessen an Keratin-Filamente bindet (Abbildung 4). In der Zelle kann die Bindungsaktivität der Integrine dadurch reguliert werden, dass entweder die Matrix-Bindungsstelle im Integrin oder aber die Assoziation an die Cytoskelett-Filamente verändert wird.

1.1.3.2 Vorkommen und Funktion der Integrine

Integrine bilden die vielfältigste Gruppe von Adhäsionsmolekülen. Sie spielen nicht nur eine Rolle bei der Zell-Verankerung, sondern können auch in beiden Richtungen Wechselwirkungen zwischen der extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett vermitteln (Inside-Out- und Outside-In-Signalwege, siehe Kapitel 1.1.5) und kooperieren mit Wachstumsfaktoren (Eliceiri 2001). Somit sind Integrine an der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Zellmigration, Wundheilung und einer Vielzahl pathologischer Vorgänge, wie der Metastasierung, maßgeblich beteiligt (Hynes 1992; Schwartz & Ginsberg 2002; Tsuruta et al. 2003).

In der Normalsituation werden in der Humanepidermis überwiegend die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ exprimiert (Hertle et al. 1991). Die Integrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ sind dabei hauptsächlich im apikalen und lateralen Membranbereich basaler Zellen und in geringem Maß perizellulär in den untersten suprabasalen Zellschichten lokalisiert. Sie sind Aktin-assoziiert und binden an verschiedene Matrixmoleküle, wie z.B. Kollagen und Laminin, was eine transiente Adhäsion der Zellen zur Folge hat (Belkin & Stepp 2000). Im Gegensatz hierzu findet sich Integrin $\alpha 6\beta 4$ ausschließlich am basalen Pol der Basalzellen, ist Keratin-assoziiert und bindet nur an Laminin, was in einer stabilen Adhäsion der Zelle resultiert (Breitkreutz et al. 1994; Sonnenberg et al. 1999). Während des Prozesses der terminalen Differenzierung mit der Zellwanderung in höhere Schichten werden die verbleibenden Integrine internalisiert. Dadurch entsteht ein gegenläufiger Gradient zum Anstieg von E-Cadherin und in Folge zu Anzahl und Größe desmosomaler Strukturen als Zell-Zell-Verbindungen (North et al. 1999; Garrod et al. 2002a). Da andererseits Tumorzellen eine Vielzahl adhäsiver Anomalitäten zeigen, die entscheidend zu ihrer Invasions-Fähigkeit beitragen, ist die Konversion zu Tumorzellen von drastischen Änderungen in der Integrin-Expression begleitet. Drei Varianten können dabei in Tumoren beobachtet werden: die Expression bestimmter Integrine wird hoch- oder herunterreguliert, und/oder die ursprünglich polarisierte Anordnung der Integrine geht völlig verloren (Tomakidi et al. 1999). So wird in der Tumor- wie auch der Wundsituation die Expression der Integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1,3,5,6$ induziert (Adams & Watt 1991; Herold-Mende et al. 2001). Ähnliche Vorgänge sind auch im Transplantationsmodell von Humanzellen auf

Nacktmaus zu beobachten (Breitkreutz et al. 1997; Breitkreutz et al. 1998). Desweiteren besteht in der Tumorsituation auch durch die veränderte Integrin-Verteilung die Möglichkeit, dass Tumorzellen die Basalmembran durchdringen und das Bindegewebe invadieren (Tomakidi et al. 1999; Tomakidi et al. 2003), wozu allerdings zusätzlich die Sezernierung von Matrix-Metalloproteinasen beitragen sollte (Lochter et al. 1998; Murphy et al. 1999; Egeblad & Werb 2002). Viele Zitate zur Beschreibung der Integrin-Expression sprechen für eine recht unterschiedliche Rolle der Integrine in der Tumorprogression je nach Stadium oder Gewebetyp.

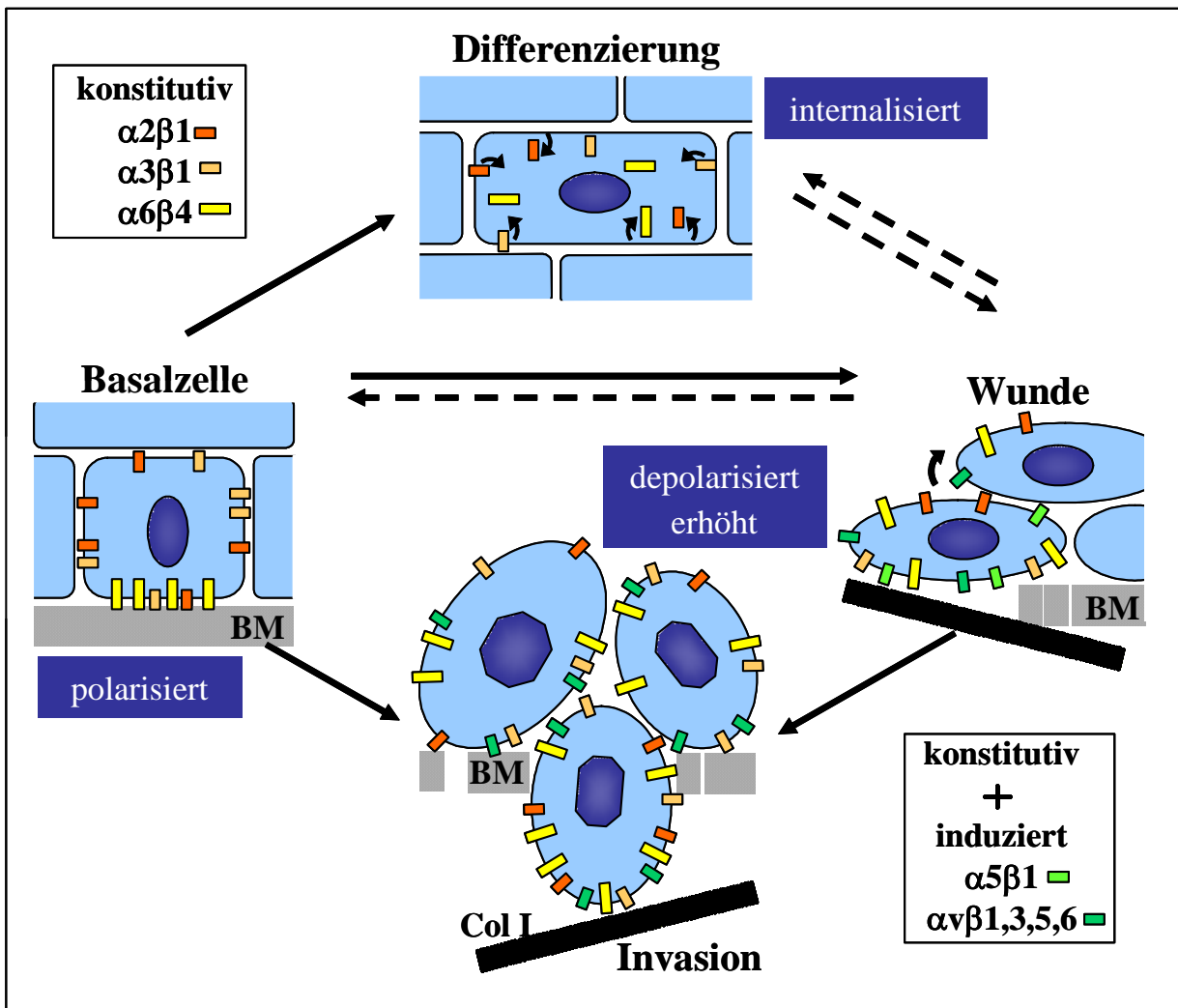


Abbildung 5: Konstitutive und induzierte Integrin-Expression in Wunde, Tumor und Differenzierung

1.1.3.3 Integrin $\alpha6\beta4$

Eine Besonderheit dieses Integrins ist die lange cytoplasmatische Domäne der $\beta4$ -Kette, verglichen mit den anderen Integrinen (Abbildung 4). Integrin $\alpha6\beta4$ wird in Endothel- und Epithelzellen exprimiert, in der Haut hauptsächlich in der epidermalen Basalzellschicht (*Stratum*

basale) und vergleichsweise schwach in Mikrogefäßen. Integrin $\alpha6\beta4$ ist Adhäsionsrezeptor für die meisten Laminine, wie etwa Laminin-5 und -10. Als integraler Bestandteil der Hemidesmosomen (HD) hat Integrin $\alpha6\beta4$ die höchste Affinität zu Laminin-5, das als Komponente der *Anchoring Filaments* die HD an der BM verankert. (Stepp et al. 1990; Jones et al. 1998; Borradori & Sonnenberg 1999).

Hemidesmosomen ähneln morphologisch einem halbierten Desmosom, woher auch ihr Name stammt, unterscheiden sich aber von diesen in Zusammensetzung und Funktion (Schwarz et al. 1990; Green & Jones 1996; Reznicek et al. 1998; North et al. 1999; Nievers et al. 1999). HD sind äußerst komplexe Strukturen, die Verknüpfungsstellen der Basalzellen mit der darunter liegenden Basalmembran darstellen. Sie dienen dabei als mechanische Verbindungen, die Zug- oder Scherkräfte in der darunter liegenden Dermis verteilen. Neben Integrin $\alpha6\beta4$ bestehen Hemidesmosomen aus weiteren prominenten Komponenten. Das bullöse Pemphigoid Antigen 1 (BPAG1), auch BP230 genannt, bindet an die lange cytoplasmatische Domäne von Integrin $\alpha6\beta4$ und im Verbund mit Plectin (siehe unten) an die Keratin-Filamente des Cytoskeletts. Das bullöse Pemphigoid Antigen 2 (BPAG2), oder BP180, ist ein Transmembranprotein. Dieses trimere Molekül rechnet man aufgrund seiner zahlreichen triplehelicalen Domänen (*Gly-X-Y-repeats*) zur Kollagenfamilie und es wird somit als Kollagen XVII bezeichnet. Der sogenannte *inner dense plaque* der Hemidesmosomen besteht aus Plectin, das sowohl an die $\beta4$ -Kette als auch an das Keratincytoskelett bindet und deshalb, wie schon BPAG1, die Assoziation zwischen Hemidesmosom und Keratin vermittelt. Verschiedene andere Moleküle, wie IFAP 300 und HD1, die als Bestandteile der *inner dense plaques* beschrieben wurden, sind möglicherweise mit Plectin identisch, oder zumindest Mitglieder der gleichen Protein-Familie (Sonnenberg et al. 1991; Jones et al. 1994; Borradori et al. 1998; Schaapveld et al. 1998; Zillikens & Giudice 1999; Steinbock & Wiche 1999; Hopkinson & Jones 2000). Strukturen, die alle genannten Komponenten enthalten, werden auch als Typ I Hemidesmosomen bezeichnet. Integrin $\alpha6\beta4$, Plectin und Laminin werden zudem auch in Zellen exprimiert und assoziiert, die keine Typ I Hemidesmosomen besitzen, wie z.B. in Zellen des Darmepithels. Die dort identifizierten Strukturen werden Typ II Hemidesmosomen genannt, sie sind bisher jedoch noch nicht genauer definiert und zeigen eine weniger komplexe Ultrastruktur als epidermale Typ I Hemidesmosomen (Nievers et al. 1998).

In der normalen Haut sind die Plaque-Komponenten der Hemidesmosomen mit Integrin $\alpha6\beta4$ assoziiert. In invasiven malignen Transplantaten ist diese Verbindung mit Integrin $\alpha6\beta4$ offensichtlich reduziert oder sogar komplett unterbrochen. Die Ultrastruktur der Hemidesmo-

somen kann dabei mit fortschreitender Tumorprogression vollständig verloren gehen. In Studien mit Integrin β 4-Knockout Mäusen waren keine Hemidesmosomen vorhanden, was zu einem lethalen Defekt führte, der bereits in frühen embryonalen Stadien oder spätestens perinatal wegen schwerer Blasenbildung in Haut und Esophagus auftrat (van der Neut et al. 1996). Beim Menschen sind mehr als 20 Kategorien von Genveränderungen von HD-Komponenten bekannt, die zu den als *Epidermolysis bullosa* bezeichneten Hautanomalien zählen (Jones et al. 1994; Chan 1997; Pulkkinen & Uitto 1998; Zillikens & Giudice 1999).

1.1.4 Proteinkinase C

Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Signaltransduktionswege entwickelt, die sich gegenseitig beeinflussen und ein komplexes Netzwerk bilden. Dabei stellt die Proteinphosphorylierung aufgrund ihres reversiblen Charakters einen idealen Regulationsmechanismus dar und spielt bei der Signalübertragung in der Zelle eine wichtige Rolle. Während Proteinkinasen für Phosphorylierungsreaktionen verantwortlich sind, werden Dephosphorylierungen von Phosphatasen katalysiert.

Die Proteinkinase C (PKC)-Familie, eine Familie von Serin-Threonin-Kinasen, hat dabei eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion und ist an einer Vielzahl physiologischer Vorgänge beteiligt, wie z.B. Wachstum und Apoptose (Nishizuka 1986; Nishizuka 1988; Kanashiro & Khalil 1998).

1.1.4.1 Aufbau der PKC-Familie

Die PKC Familie besteht aus mindestens 11 Isoenzymen, die alle eine spezifische Funktion in der Zelle besitzen und je nach Struktur und benötigten Cofaktoren in drei Klassen unterteilt werden. Man unterscheidet zwischen konventionellen (cPKC), neuen (nPKC) und atypischen PKC (aPKC). Eine Gemeinsamkeit aller PKC ist, dass sie aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer Amino-terminalen regulatorischen Domäne und einer Carboxy-terminalen katalytischen Domäne aufgebaut sind (Newton 1995; Newton 1997; Dempsey et al. 2000; Newton 2001; Newton 2003).

Die cPKC besitzen die konservierten Regionen C1-C4. Die C1-Domäne enthält zwei Cysteinereiche Zinkfinger-Motive und ist für die Bindung von und Aktivierbarkeit durch Diacylglycerin (DAG) oder Phorbolster, die funktionellen Analoge von DAG, verantwortlich (Gschwendt 1999). Desweiteren sind diese Isoenzyme von Ca^{2+} abhängig, das zusammen mit sauren Phospholipiden an die C2-Region bindet. Die cPKC spielen als Bestandteil der Phosphoinositid-Kaskade eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung. Die

Bindung eines Liganden an einen Zelloberflächen-Rezeptor führt zur Aktivierung der Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, ein Phospholipid der Plasmamembran, in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und DAG spaltet. IP₃ führt zur raschen Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, das zusammen mit DAG die PKC-Isoformen aktiviert. Die C3- und C4-Regionen als Bestandteile der katalytischen Domäne umfassen die ATP-Bindestelle (C3) und die Kinasedomäne (C4). Die nPKC als zweite Gruppe besitzen eine modifizierte C2-Region, die anders als bei den cPKC vor der C1-Region liegt und Ca²⁺ nicht binden kann, somit sind sie Ca²⁺-unabhängig. Auch sie sind Bestandteile von Signalkaskaden, über die DAG freigesetzt wird. Den Isoformen der dritten Gruppe fehlt die C2-Domäne, zusätzlich dazu ist das Zinkfinger-Motiv nicht vollständig ausgebildet. Aus diesem Grund sind sie Ca²⁺-unabhängig und nicht durch DAG bzw. Phorbolster aktivierbar, weswegen sie auch als „atypische“ PKC (aPKC) bezeichnet werden. Alle PKC-Isoenzyme sind für ihre Aktivierung auf die Bindung an Phospholipide angewiesen, wobei das saure Phosphatidylserin bevorzugt wird. Vermutlich findet deshalb die Aktivierung in der Zelle weitgehend an Zellmembranen statt.

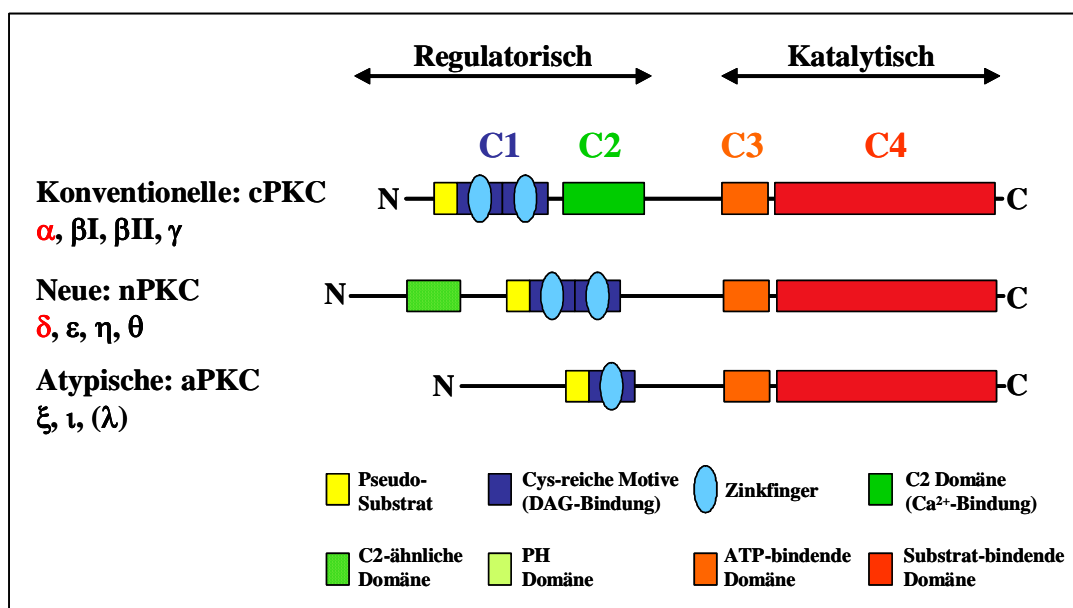


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der PKC-Familie

Zu PKC-Substraten gehören Strukturproteine, wie z. B. Integrine, Enzyme und viele Signalübertragenden Proteine (Liu et al. 2000). Die Isoenzym-Spezifität der Substratphosphorylierung kommt wahrscheinlich überwiegend durch regulierte subzelluläre Kollokalisierung von PKC-Isoenzym und Substrat zustande. Je nach Zell- und Gewebetyp beobachtet man eine unterschiedliche Expression der einzelnen Isoformen. So findet man eine ubiquitäre Verteilung von PKCα und PKCδ, während z. B. PKCγ nur im zentralen Nervensystem zu finden ist

(Blobe et al. 1994; Liu & Heckman 1998). Sowohl die gewebsspezifische Expression als auch die subzelluläre Lokalisation deuten darauf hin, dass die einzelnen Isoenzyme individuelle Funktionen haben und spezifisch reguliert werden.

1.1.4.2 PKC in der Haut

Untersuchungen mit Keratinozyten zeigten, dass die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Zelldichte Wachstum und Differenzierung *in vitro* regulieren (Ryle et al. 1989; Breitzkreutz et al. 1993; Denning et al. 1995; Li et al. 1995a; Li et al. 1995b). Darauf gründete sich die Hypothese, dass PKC α als klassische, Ca^{2+} -abhängige Isoform eine Rolle bei der epidermalen Differenzierung spielt. In nachfolgenden Studien wurden in Keratinozyten vier weitere PKC Isoformen identifiziert, und zwar PKC δ , PKC η , PKC ε und PKC ζ , deren Vorkommen auch *in vivo* nachfolgend bestätigt werden konnte. Diese PKC Isoformen kommen sowohl in basalen als auch in differenzierenden Keratinozyten vor, unterscheiden sich jedoch in der subzellulären Lokalisation. In neueren Studien wurde zudem gezeigt, dass diese PKC Isoformen spezifische Funktionen in Signalwegen innehaben, die Proliferation und Differenzierungsvorgänge in der normalen Epidermis regulieren.

1.1.5 Integrine und Proteinkinase C in der Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt können Integrine in beiden Richtungen Wechselwirkungen zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zell-Cytoskelett vermitteln. Die extrazelluläre Bindungsaktivität der Integrine wird über Konformationsänderungen vom Innern der Zelle reguliert (Inside-Out-Signaling), während die Bindung von Matrixmolekülen Signale auslöst, die in das Innere der Zelle übertragen werden (Outside-In-Signaling) (Schwarz et al. 1990; Giancotti & Ruoslahti 1999; Fashena & Thomas 2000; Miranti & Brugge 2002; Humphries et al. 2003).

Zweifelsohne spielt PKC eine zentrale Rolle in der Hautdifferenzierung (Denning et al. 1995; Lee et al. 1997; Ohba et al. 1998). Zudem mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass PKC an der Integrin-vermittelten Adhäsion und Signaltransduktion beteiligt ist. So führte die Stimulierung von PKC mit Phorbolestern zu einer erhöhten Adhäsion und Migration der Zellen, während dieser Effekt durch PKC-Inhibitoren völlig blockiert wurde (Chun & Jacobson 1993; Defilippi et al. 1997). Offensichtlich sind auch Integrin-Funktionen mit einer Aktivierung von *Downstream*-Elementen, die am Phospholipidmetabolismus beteiligt sind (PLC und DAG), assoziiert. Letztere Komponenten sind wiederum direkte physiologische Aktivatoren von PKC Isoformen (Chun & Jacobson 1993; van Leeuwen et al. 1994; Kolanus & Seed 1997).

Integrin $\alpha 6\beta 4$ wird im Zuge der epidermalen Differenzierung von PKC δ phosphoryliert, was zu einer Inaktivierung und damit verringerten Zelladhäsion an Laminin-5 führt (Alt et al. 2001). Dies wird als Anfangsschritt bei der Ablösung der Basalzellen von der Basalmembran betrachtet. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass auch PKC α als einzige Ca²⁺-abhängige Isoform in der Epidermis Integrin $\alpha 6\beta 4$, in diesem Fall positiv, reguliert. PKC α and PKC δ scheinen somit die cytoplasmatischen Integrin-Teile antagonistisch zu modifizieren. Grundlegende Änderungen in Expression und Funktion von Integrinen werden in der Tumorigenese beobachtet. Auffallend bei experimentellen Hautcarcinom-Modellen sind die Dislokation und Überexpression von Integrin $\alpha 6\beta 4$, die mit Anomalien in der PKC Signaltransduktion korrelieren (Tennenbaum et al. 1993; Tennenbaum et al. 1995; Dlugosz et al. 1995; Tennenbaum et al. 1996).

1.1.6 Organotypische Kokulturen

In der konventionellen zwei-dimensionalen Kultur werden die Zellen mehr oder weniger als Monolayer submers kultiviert. Das Verhalten von Keratinozyten weist dabei naturgemäß gegenüber der *in vivo* Situation der Haut große Unterschiede auf. Durch das Fehlen von Fibroblasten und einer Kollagenmatrix bildet sich kein strukturiertes, mehrschichtiges Epithel, somit ist auch eine reguläre Gewebepolarität nicht gegeben. Differenzierungsvorgänge laufen nur unvollkommen, sowie räumlich und zeitlich unkontrolliert ab.

Ein aufwendigeres Kultursystem, das der *in vivo*-Situation in wesentlichen Zügen entspricht, ist die drei-dimensionale, organotypische Kokultur (OTK), ein *in vitro*-Hautäquivalent. In diesem Modellsystem wachsen Fibroblasten eingebettet in ein Kollagengel, das in einen Filtereinsatz gegossen wurde. Die Keratinozyten werden auf der Geloberfläche ausgesät und schließlich luftexponiert kultiviert, wobei sie ein mehrschichtiges Epithel bilden.

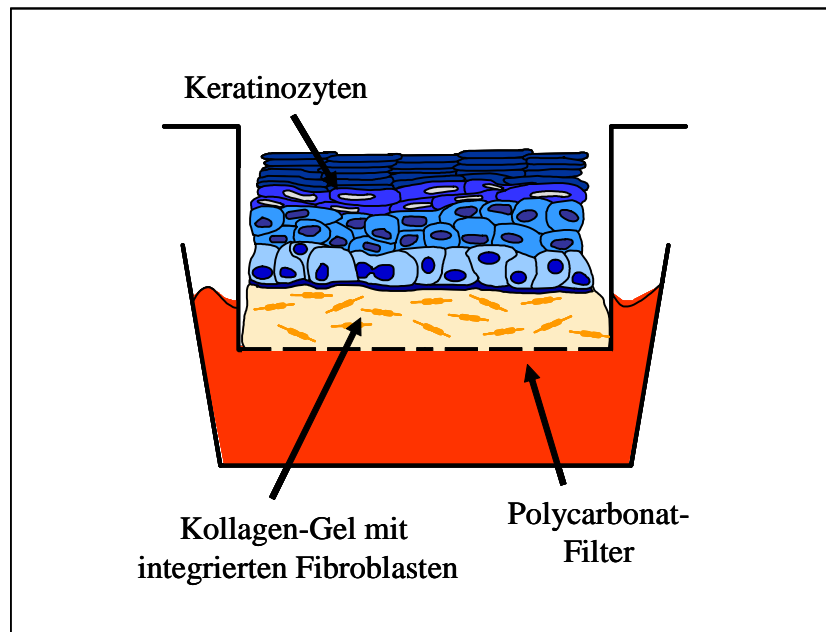


Abbildung 7: drei-dimensionale organotypischen Kokultur

Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt ausschließlich mittels Diffusion durch das Kollagen-gel, wie in der Haut. Somit lassen sich in der OTK epidermale Differenzierung und Stratifizierung optimal beobachten und analysieren.

1.2 HaCaT ALS MODELLSYSTEM

Die spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Linie HaCaT wurde aus einer normalen Primärkultur menschlicher Epidermiszellen isoliert, die aus direkter Nachbarschaft eines Melanoms eines 62-jährigen männlichen Patienten stammten (Boukamp et al. 1988). Die Keratinozyten wurden nach Trennung von Epidermis und Dermis durch Trypsinierung bei 4°C isoliert und in einer hohen Zelldichte ohne die Verwendung von Feeder-Zellen ausgesät. Die Langzeitkultivierung erfolgte in Medium mit niedrigem Calciumgehalt (0,2 mM), was eine reduzierte terminale Differenzierung der Zellen zur Folge hatte (Breitkreutz et al. 1984; Breitkreutz et al. 1986; Hennings et al. 1989; Breitkreutz et al. 1993; Li et al. 1995a). Zudem resultierte die Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 38,5°C in einem Anstieg der proliferativen Aktivität sowie einer Verlängerung der durchschnittlichen Lebensdauer, was zur Manifestation der Immortalisierung beitrug. Aufgrund der Kulturbedingungen zur Generierung dieser Zell-Linie wurde schließlich die Bezeichnung HaCaT gewählt (Human, aadult, niedrig Ca²⁺, erhöhte Temperatur).

Als Hauptauslöser für die Immortalisierung der HaCaT ist eine genetische Instabilität in Folge der UV-spezifischen Mutationen in beiden Allelen des Tumorsuppressor-Gens p53 anzusehen, die eine Inaktivierung der Supressorfunktion von p53 bewirkt (Lehman et al. 1993), als auch

eine anfänglich erhöhte Kultivierungstemperatur. Vermutlich hat die funktionelle Inaktivierung des p53-Gens sowie die erhöhte Kultivierungstemperatur zu einer gesteigerten Rate nicht-reparierter DNA-Schäden und chromosomaler Aberrationen geführt. Hierfür spricht auch das Auftreten und die Persistenz charakteristischer Markerchromosomen in HaCaT (Lehman et al. 1993).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten HaCaT-Subklon 6, im Folgenden kurz als HaCaT₆ bezeichnet, handelt es sich um eine hochgradig differenzierende HaCaT-Variante. Sie stammt aus einer Population von Standard-HaCaT-Zellen, die in der zehnten Passage kloniert und in der 16. Passage rekloniert wurden. Eine Zell-Linie bietet dabei entscheidende Vorteile gegenüber Primärkulturen. Sie ist nicht nur leichter zu handhaben als Primärzellen, man kann auch eine Spendervariation ausschließen, was andernfalls eines großen Probenumfangs bedürfte.

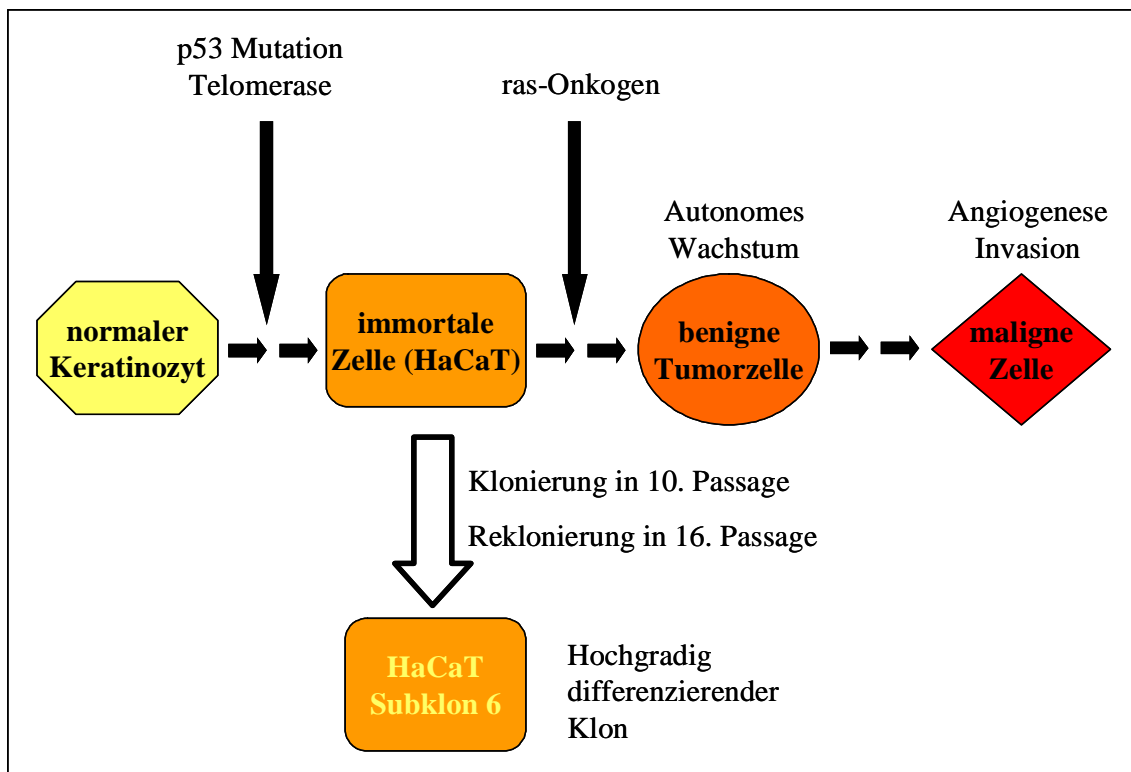


Abbildung 8: HaCaT-Modell der Stufenhautcarcinogenese

Trotz ihrer genetischen Veränderungen und verlängerter Überlebenszeit in Kultur haben HaCaT Keratinozyten viele morphologische und biochemische Kriterien einer normalen Epidermiszelle bewahrt (Ryle et al. 1989; Breikreutz et al. 1993; Breikreutz et al. 1998). Im Laufe der letzten Jahre wurden in unserer Arbeitsgruppe viele Varianten der ursprünglichen Standard-HaCaT-Zellen etabliert, die gut mit verschiedenen Stufen der Haut-Carcinogenese korrelieren.

HaCaT-Zellen bilden in organotypischen Kokulturen ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, dessen Aufbau überwiegend dem der normalen Epidermis entspricht. Die Epithelentwicklung erfolgt jedoch im Vergleich zu normalen Keratinozyten verzögert und die terminale Differenzierung läuft nur unvollständig ab (Baur 1995; Syrjanen et al. 1996; Steinstrasser et al. 1997; Schoop et al. 1999; Boelsma et al. 1999), was jedoch nach Transplantation dieser Zellen auf Nacktmäuse korrigiert werden kann (Breitkreutz et al. 1998). So bilden HaCaT-Zellen unter den Kulturbedingungen in der OTK im Vergleich zu normalen Keratinozyten ein Epithel mit parakeratotischem *Stratum corneum* aus.

1.1 ADENOVIREN UND GENTRANSFER

Adenoviren verursachen im Menschen gewöhnlich akute Atemwegserkrankungen. Sie wurden erstmals 1953 aus spontan degenerierten primären Zellen humaner Gewebewucherungen des Nasenraums isoliert (Rowe et al. 1953; Hilleman & Werner 1954). Bis heute umfasst die Familie der Adenoviridae über 100 Mitglieder, die eine große Zahl von Zelltypen unterschiedlicher Spezies infizieren können. Humane Zellen sind permissiv für Adenoviren, ihre Infektion verläuft deshalb produktiv. Beim Menschen sind 47 Serotypen beschrieben. Entsprechend der Onkogenität für Nagetiere werden die Adenoviren in drei Gruppen aufgeteilt:

- Subgruppe A: „stark“ onkogene Adenoviren, die nach kurzer Latenzperiode Tumorstadium in Tieren induzieren
- Subgruppe B: „schwach“ onkogene Adenoviren, die nur bei wenigen der infizierten Tieren nach einer langen Latenzperiode Tumorstadium hervorrufen können
- Subgruppe C: Adenoviren ohne erkennbares onkogenes Potential

Die meisten zum Gentransfer genutzten Adenoviren leiten sich vom Serotyp 5 der Subgruppe C ab (Adenovirus 5, Ad5), da sie keine pathogenen oder onkogenen Eigenschaften aufweisen (Murray et al. 1982; Braithwaite 1986; Eggerding & Pierce 1986).

1.2.1 Aufbau der Adenoviren

Adenoviren enthalten ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von 32-36 kb, das von einer ikosaedrischen Proteinhülle, dem Viruskapsid, umgeben ist. Das Kapsid besitzt eine Größe von 70 bis 100 nm und setzt sich aus 252 Untereinheiten, den Kapsomeren zusammen, die sich in 240 Hexons und 12 Pentons unterteilen (Modrow & Falke 1998).

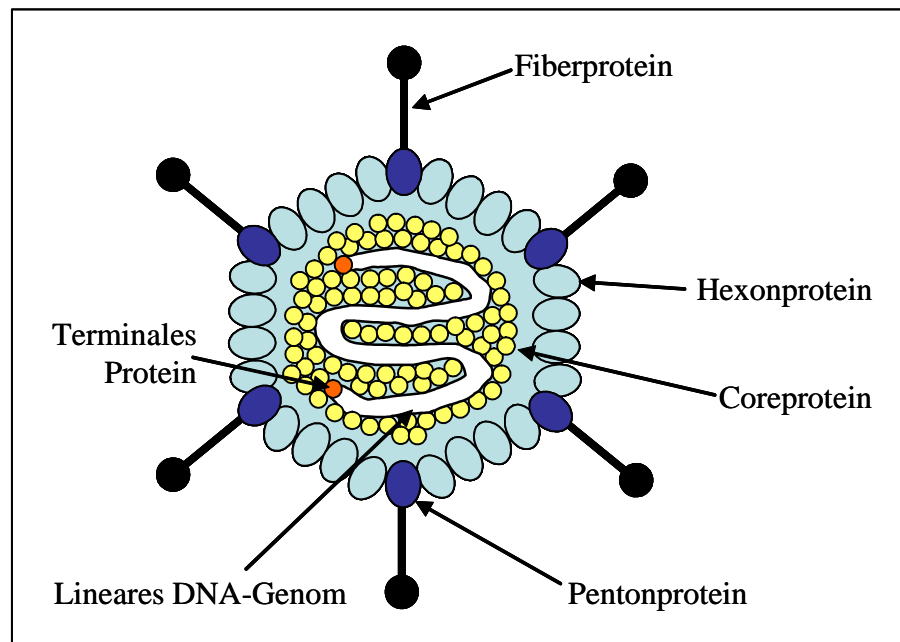


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Adenovirus

1.2.2 Organisation des adenoviralen Genoms

An den Enden der DNA liegen *inverse terminale Repeats* (ITR) mit den Polymerasebindungssequenzen für den Start der DNA-Replikation, gefolgt vom DNA-Verpackungssignal ψ . Das relativ komplexe Genom der Adenoviren besitzt mehrere Transkriptionseinheiten, die in zeitlichen Clustern exprimiert werden. Die „frühen“ Ereignisse des produktiven Infektionszyklus beginnen mit der Transkription des E1A-Gens ($E = \text{early}$), dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1B, E2, E3 und E4 wirkt und somit eine Expressionskaskade der frühen Gene einleitet. Dies ist die Voraussetzung für die nachfolgende DNA-Replikation, mit der dann auch die „späte“ Phase des produktiven Infektionszyklus einsetzt, in der Virionen entstehen. Dabei werden die späten Gene (L1-L4, $L = \text{late}$) exprimiert, die hauptsächlich für Strukturproteine des Virions kodieren. Der produktive Infektionszyklus führt anschließend zur Lyse der infizierten Wirtszelle (Doerfler 1983; Fields et al. 1996).

1.2.3 Verlauf des Infektionszyklus

Der Infektionsprozess beginnt mit der Bindung des C-terminalen Endes des Fiberproteins an den zellulären Cocksackievirus-Adenovirus-Rezeptor, CAR (Bergelson et al. 1997; Anders et al. 2003). Die Internalisierung des Virus erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endocytose, wobei neben der Interaktion des Fiber-Proteins mit dem zellulären Rezeptor auch die Interaktion des Penton-Proteins mit zellulären Integrinen erforderlich ist. Die Absenkung des pH-Wertes in-

nerhalb der Endosomen führt zur Freisetzung der Viruspartikel in das Zell-Cytoplasma. Der Transport der Viruspartikel erfolgt dabei wahrscheinlich entlang der Mikrotubuli (Toth et al. 1992). Nach Eintritt der Virus-DNA in den Zellkern erfolgt die über das Terminal-Protein vermittelte Assoziation an die Kernmatrix. Gleichzeitig startet die Transkription der frühen viralen Transkriptionseinheiten. Neben der Aktivierung der späten viralen Gene und der Replikation der viralen DNA modulieren die Genprodukte der frühen Gene auch Regulationsprozesse in der infizierten Zelle. So aktivieren sie den Zellzyklus, verhindern die Initiation der Apoptose und blockieren antivirale Maßnahmen des Wirtes.

1.2.4 Gentransfer mittels Adenovirus-abgeleiteter Vektoren

Bei den zum Gentransfer verwendeten Adenovirus-abgeleiteten Vektoren handelt es sich überwiegend um Adenovirus Typ5-Vektoren, deren E1-Region deletiert ist. Daraus resultieren replikationsdefekte Ad5-Deletionsmutanten, die auch als „adenovirale Vektoren der ersten Generation“ bezeichnet werden. Zur Erhöhung der Aufnahmekapazität für fremde DNA wird bei manchen dieser Vektoren zusätzlich die E3-Region deletiert. Sie enthalten jedoch noch die übrigen frühen und späten viralen Gene, die nach der Infektion in geringen Mengen exprimiert werden können (Engelhardt et al. 1993; Simon et al. 1993; Yang et al. 1994). Eine zusätzlich Deletion der E2- und E4-Region führte zu den „adenoviralen Vektoren der zweiten Generation“, in denen nur noch die späten Gene vorliegen. Bei klinischen Anwendungen hatten virale Genprodukte eine Immunantwort gegen transduzierte Zellen induziert, was eine Entzündungsreaktion und eine verkürzte Expressionsdauer des Transgens zur Folge hatte (Nelson & Kay 1997; Goldsmith et al. 1998; Steinwaerder et al. 2000). Daher zielen die neuen Strategien zur Vektorverbesserung auf die Verminderung der Immunogenität und die Erhöhung der Aufnahmekapazität fremder DNA ab. In den neu entwickelten Adenovirus-Vektoren der dritten Generation, den sogenannten „Gutless“-Vektoren, sind sämtliche viralen Leserahmen deletiert (Kochanek et al. 1996; Kochanek 1999; Fisher et al. 1996; Schiedner et al. 1998).

Experimentell hat die Verwendung adenoviraler Vektoren entscheidende Vorteile gegenüber der herkömmlichen Transfektion von Zellen:

- Eine Vielzahl von Säugerzellen kann infiziert werden.
- Die Infektion erfolgt in proliferierenden und post-mitotischen Zellen.
- Hohe Expressionslevel der Fremdgene werden erreicht.
- Ein Mutationsereignis wird vermieden, da rekombinante Gene nicht integriert werden.

Da das Fremdgen somit episomal verbleibt, ist dagegen ein gravierender Nachteil der adenoviralen Vektoren, dass betreffende Gene lediglich transient exprimiert werden.

Bei den in diesem Projekt verwendeten adenoviralen Vektoren handelt es sich um Vektoren der ersten Generation mit Deletionen in der E1- und E3-Region. Sie wurden im Labor von Tamar Tennenbaum, Bar Ilan University, Ramat-Gan, Israel, unter Verwendung der COS-TPC-Methode hergestellt. Diese wurde von Saito (Miyake et al. 1996) etabliert und besteht aus zwei Schritten. Zuerst wird die Ziel-DNA hinter einen Promoter in die Cosmidkassette eines Adenovirus Typ 5 inseriert. Danach erfolgt in HEK 293 eine homologe Rekombination, bei der die Enden des Parental-Adenovirus mit den *terminalen Protein-Komplexen* (TPC) in die Cosmid-Kassette eingebaut werden. Das dadurch produzierte Virusgenom enthält die Target-DNA und wird an beiden Seiten von den TPC geschützt, wogegen die zur Amplifizierung notwendigen E1A- und E1B-Gene fehlen. Durch die TPC ist das Virus-Genom nach der Infektion einer Zelle mit anschließender Internalisierung und Transport in den Zellkern vor der direkten Restriktion durch Zellnucleasen geschützt.

2 ZIELSETZUNG

Schlüsselereignisse bei der epidermalen Differenzierung sind das Ablösen der Basalzellen von der Basalmembran und ihre Aufwärtswanderung synchron zur terminalen Differenzierung mit dem Endstadium der Hornschuppen, die die äußerste Barriere bilden. Zellrezeptoren, die bei der Auslösung dieses Prozesses eine wichtige Rolle spielen, sind die Integrine, die einen erheblichen Anteil an der Gewebeorganisation haben. Andererseits sind Integrine auch maßgeblich an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Als Hauptkomponente der Hemidesmosomen, die die Basalzellen mit der darunter liegenden Basalmembran verbinden, kommt Integrin $\alpha6\beta4$ eine herausragende Funktion zu. Über seine cytoplasmatischen Domänen interagiert $\alpha6\beta4$ mit PKC α und PKC δ , und wird dabei seinerseits modifiziert. Grundlegende Änderungen in der Integrin-Expression und -Verteilung werden bei der Tumorigenese beobachtet. Auffallend bei Hautcarcinomen sind vor allem eine Dislokation und Überexpression von Integrin $\alpha6\beta4$, was weitreichende Konsequenzen für die PKC-Signaltransduktion hat.

Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der Rolle von PKC α , PKC δ und Integrin $\alpha6\beta4$ in Keratinozyten und deren mögliche Bedeutung bei der Tumorentstehung. Dabei sollte die Funktion von PKC α , PKC δ und Integrin $\alpha6\beta4$ bei der Regulation von Zell-Matrix-Interaktionen, Migration und Differenzierung untersucht werden. Hierfür wurden normale humane primäre Keratinozyten und die humane Keratinozyten-Zell-Linie HaCaT, eine immortale „prämaligne“ Zelle, mit adenoviralen Konstrukten für PKC α , PKC δ und für die Integrin $\alpha6$ -Kette infiziert. Folgende Aspekte sollten dabei im Einzelnen untersucht werden:

1. Ist die Verwendung adenoviraler Konstrukte eine geeignete Methode zur Überexpression regulatorischer Proteine in HaCaT und auch in normalen Keratinozyten? Wichtig hierbei war die Abklärung des biologischen Sicherheitsrisikos.
2. Sind die Infektions-Effizienz und vor allem die Dauer der Proteinüberproduktion ausreichend, um den Effekt der betreffenden Proteine in kurzfristigen (bis zu 4 Tage) aber auch in längerfristigen (bis zu 14 Tagen) Experimenten zu untersuchen?
3. Welchen Einfluss hat die Überexpression der Proteine PKC α , PKC δ und Integrin $\alpha6$ in konventionellen zwei-dimensionalen Kulturen auf Morphologie, Wachstumsverhalten, Migration und Zell-Adhäsion?
4. Inwieweit beeinflusst diese transiente Überexpression die Stratifizierungs- und Differenzierungseigenschaften der Zellen in der komplexeren, drei-dimensionalen, organotypischen Kokultur?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 ZELLKULTIVIERUNG

Die verschiedenen Zell-Linien wurden in Standardmedium kultiviert. Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Die Standard-Kultivierung der Zellen wurde in Zellkulturflaschen der Marke Integra oder in Zellkulturschalen der Marke Falcon (Becton Dickinson) durchgeführt. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

3.1.1 Medien und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Standardmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM	Dulbecco´s MEM Medium 10 % FCS 100 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin 1mM Natriumpyruvat	Serva Biochrom Hoechst Hoechst
FAD _{komplett}	DMEM/Hams F12 (3:1) 5 % FCS 5 µg/ml Insulin 18,2 µg/ml Adenin 0,4 µg/ml Hydrocortison 0,01 µg/ml EGF 10 ⁻¹⁰ M Cholera toxin 100 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat	Serva Biochrom Sigma Sigma Sigma Sigma Sigma Hoechst Hoechst
FAD _{reduziert}	DMEM/Hams F12 (3:1) 10 % FCS 0,4 µg/ml Hydrocortison 10 ⁻¹⁰ M Cholera toxin 100 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat	Serva Biochrom Sigma Sigma Hoechst Hoechst
Einfriermedium	70 % Standardmedium 20 % FCS 10 % Glycerin	Serva Biochrom Merck

Tabelle 2: Lösungen und Zusätze

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

3.1.2 Verwendete Zellen

3.1.2.1 HaCaT-Keratinozyten

Die spontan immortalisierte humane Keratinozyten-Zell-Linie HaCaT (Human, aadult, niedrig Calcium, hohe Temperatur) wurde in unserer Arbeitsgruppe aus einer normalen Primärkultur menschlicher Epidermiszellen isoliert, die aus direkter Nachbarschaft eines Melanoms eines 62-jährigen männlichen Patienten generiert worden war (Boukamp et al. 1988). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten HaCaT Subklon 6, im Folgenden kurz als HaCaT₆ bezeichnet, handelt es sich um eine hochgradig differenzierende HaCaT-Variante. Sie stammt aus einer „Standard“-HaCaT-Population, die in der zehnten Passage kloniert und in der 16. Passage rekloniert wurde. HaCaT₆-Zellen wurden in dieser Arbeit in den Passagen 10-17 verwendet.

3.1.2.2 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

Biopsien gesunder Körperhaut wurden von der plastischen Chirurgie, Klinik St. Elisabeth, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Diese Hautbiopsien wurden zur Isolierung der epidermalen Keratinozyten in Betaisadonna-Lösung 20 bis 30 min desinfiziert, anschließend mehrmals mit PBS gespült und das Fettgewebe möglichst vollständig entfernt. Das Gewebe wurde in etwa 0,5 cm breite Streifen geschnitten und über Nacht bei 4°C in 500 µg/ml inkubiert. Das Epithel wurde von der Dermis abgezogen und in Trypsin-EDTA-Lösung (0,4 % / 0,025 %) im Inkubator angedaut. Die epithelialen Zellen wurden über einen Zellfilter (70 µm Porengröße, Falcon) abgetrennt. Die Aussaat der so erhaltenen Keratinozyten ($5 \times 10^4/\text{cm}^2$) erfolgte in FAD-Medium mit 10 % FCS in Schalen mit 24 h vorkultivierten Feeder-Zellen ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$). Bei 80 % Konfluenz wurden die primären Keratinozyten eingefroren (2×10^6 , Passage 1), bei Bedarf wieder aufgetaut und auf vorkultivierte Feeder-Zellen ausgesät (Smola et al. 1993).

3.1.2.3 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Fibroblasten

Der bei der Keratinozyten-Isolierung verbleibende dermale Hautanteil wurde in $0,1 \text{ cm}^2$ große Stücke zerteilt. Diese wurden auf eine Zellkulturschale gesetzt und nach dem Anheften mit DMEM (20 % FCS) überschichtet. Mediumwechsel erfolgte alle 4 Tage. Die Fibroblasten wuchsen innerhalb von 2 bis 3 Wochen aus den Explantaten aus. Sobald die Kulturen konfluent waren, wurden die Fibroblasten von den Schalen abtrypsiniert. In Medium suspendierte Fibroblasten wurden in einer Dichte von $6 \times 10^3/\text{cm}^2$ ausgesät und bis zu Passage 2 weiter vermehrt. Im Anschluss daran wurden sie in Passage 3 eingefroren ($1 \times 10^6/\text{ml}$) und in Versuchen bis zu Passage 9 eingesetzt (Smola et al. 1993).

3.1.2.4 Herstellung von Feeder-Zellen

Die Proliferation von Fibroblasten kann unterbunden werden, indem sie γ -Strahlung ausgesetzt werden. Die sublethale Strahlendosis versetzt die Zellen aufgrund von DNA-Schädigung in einen teilungsunfähigen, postmitotischen Zustand, wobei viele physiologische Funktionen weiterhin erhalten bleiben. Die bestrahlten Fibroblasten, auch Feeder-Zellen genannt, sind in vermindertem Maße weiterhin metabolisch aktiv, sezernieren für die Keratinozyten wichtige Wachstumsfaktoren und können somit im Feeder-Layer-Kokultursystem eingesetzt werden. Zur Bestrahlung wurden abtrypsinisierte Fibroblasten in einer Konzentration von 5×10^5 /ml in Medium aufgenommen und mit einer γ -Strahlendosis von 70 Gray bestrahlt.

3.1.2.5 Passagierung der Zellen

Für die Passagierung konfluenter HaCaT-Keratinozyten wurden die Zellen zunächst kurz mit EDTA gespült, dann 10 bis 20 min in EDTA (0,1%) inkubiert, bis die Interzellularräume durch Lockerung der Calcium-abhängigen Zellkontakte vergrößert waren, erkennbar im Phasenkontrast-Mikroskop als optisch weniger dichte und damit hellere Zone. Durch anschließende Trypsin-EDTA-Behandlung (0,1 % / 0,05 %, im Verhältnis 1:1) wurden die Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und durch vorsichtiges Pipettieren in Einzelzellsuspension überführt. Nach Abstoppen der Trypsin-EDTA-Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Zellzahl mittels CASY-Zellzählgerät bestimmt. Nach Abzentrifugieren (250 g, 5 min, Labofuge 400, Heraeus) und vorsichtigem Abziehen des Überstandes erfolgte die Aussaat der passagierten Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro cm^2 .

Primäre Keratinozyten wurden zweimal je 3 min mit EDTA inkubiert. Die vorhandenen Feeder-Zellen, die sich nach EDTA-Behandlung leicht ablösen lassen, wurden abgespült und verworfen. Durch anschließende 5 minütige Trypsin-EDTA-Behandlung (0,4 % / 0,05 %, im Verhältnis 1:1) wurden die noch verbliebenen Keratinozyten durch Pipettieren vereinzelt und die Trypsinaktivität mit serumhaltigen Medium abgestoppt.

Primäre Fibroblasten wurden entsprechend kürzer mit EDTA (einmal 3 min) und Trypsin (einmal 3 min) vorbehandelt und in Zelldichten von etwa 1×10^5 Zellen pro cm^2 ausgesät.

HEK 293 Zellen wurden zur Passagierung mit PBS gespült und 1 min mit Trypsin-EDTA (0,1 %/0,05 %, im Verhältnis 1:1) inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren, dann wurde die

Reaktion in serumhaltigen Medium abgestoppt, die Suspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen anschließend in einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro cm^2 ausgesät.

Tabelle 3: Standardkultivierung der Zellen

Zelltyp	Medium	Serum	Split
HaCaT ₆	DMEM	10 % FCS	1:10, alle 10 d
HaCaT ₆ (OTC)	DMEM	10 % FCS	-----
Keratinocyten	FAD _{komplett}	5 % FCS	-----
Keratinocyten (OTC)	FAD _{reduziert}	10 % FCS	-----
Fibroblasten	DMEM	10 % FCS	1:4, alle 7 d
HEK 293	DMEM	10 % FCS	1:20, alle 4 d

3.1.2.6 Einfrieren von Zellen

Die Langzeitlagerung von Zell-Linien erfolgte nach Kryokonservierung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen trypsiniert und gezählt, das Medium wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (5 min, 250 g, Labofuge 400, Heraeus) und entfernt. Die Zellen wurden in Einfriermedium (Grundmedium mit Zusatz von 10 % Glycerin und 20 % FCS) in einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml aufgenommen (Feeder-Zellen: 1×10^6 Zellen/ml). Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Einfrieröhrchen mit Schraubdeckel abgefüllt, mindestens eine Stunde bei 4°C abgekühlt und danach im Einfrierautomaten mit festgelegter Abkühlrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ eingefroren.

Das Auftauen erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Die aufgetauten Zellen wurden sofort in einer 10 cm-Schale mit vorgewärmtem Medium ausgesät und das Medium nach 24 h gewechselt.

3.1.2.7 Test auf Mykoplasmenkontamination

Die verwendeten Zell-Linien wurden standardmäßig auf die Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dafür wurden die Zellen für zwei Passagen in Antibiotika-freiem Medium kultiviert und nachfolgend auf Objektträger ausgesät. Nachdem die Zellen 70 bis 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS- gewaschen und für 15 min in frischer Carnoy-Lösung fixiert (Methanol zu Eisessig im Verhältnis 3:1). Die luftgetrockneten Zellen wurden mit Hoechst/Bisbenzimid für 30 min im Dunkeln angefärbt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der zwischen die Basen der DNA interkaliert. Nach dreimaligem Waschen in deionisiertem Wasser wurden die gefärbten Zellen in Permafluor (Immunotech) eingebettet, mit einem Deckglas versehen und im UV-Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-R) auf positive Signale im Cytoplasma analysiert.

3.1.3 Proliferationstest

8×10^3 HaCaT₆ bzw. 5×10^4 primäre Keratinozyten auf $2,5 \times 10^4$ Feeder-Zellen wurden in DMEM bzw. FAD_{komplett} pro Well einer 12-Well-Platte ausgesät und in Standardmedium kultiviert. Um die Anwachsrate und Proliferation zu ermitteln, wurden die Zellen täglich, an 10 aufeinander folgenden Tagen nach der Aussaat, in Triplikaten trypsiniert und gezählt. Die Zellzahlen wurden mittels CASY-Zellzählgerät ermittelt und in einer Wachstumskurve dargestellt.

3.1.4 Migrations-Tests

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Migrations-Assays etabliert, deren Ergebnisse miteinander verglichen wurden.

Im ersten Migrationsassay wurde aus einem konfluenten Monolayer mittels Plastikspitze, die in einem 45°-Winkel gehalten wurde, eine dünne Linie von Zellen abgekratzt und die abgelösten Zellen zusammen mit dem Medium entfernt. Nach zweimaligem Spülen mit sterilem PBS wurde wiederum Wachstumsmedium zugegeben. Die Zellfronten rechts und links dieser Linie wurden markiert und zum Zeitpunkt 0 und nach 24 h fotografiert. Auf diesen Fotos war die Migrationsdistanz der beiden Fronten direkt erkennbar und vergleichbar.

Im zweiten Migrationsassay wurde, ebenfalls aus konfluentem Monolayer, mittels Zellschaber (Costar) ein Stück des Zellrasens abgeschabt. Das Medium wurde zusammen mit den abgeschabten Zellen abgesaugt, die Platte zweifach mit sterilem PBS gespült und anschließend erneut mit Wachstumsmedium versetzt. Der Rand der Zellfront wurde auf der Schalenunterseite mit Filzstift nachgezogen, außerdem wurden mittig drei Querstreifen eingezeichnet. Nach 0 h und 24 h wurde die Zellfront fotografiert, die Orientierung erfolgte anhand der Querstreifen. Auf diesen Fotos konnte die Migrationsdistanz innerhalb von 24 h direkt vermessen werden.

3.1.5 Adhäsions-Test

Die 48-Well-Platten wurden für 1 h bei 37°C mit je 80 µl der entsprechenden Matrix-Lösung in Triplikaten beschichtet. Der Überstand wurde abgesaugt und die Wells mit je 160 µl 0,1 % BSA (PAA Laboratories) für 1 h bei 37°C versetzt. Nach erneutem Absaugen wurden pro Well 200 µl der Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen in serumfreien Wachstumsmedium (0,1 % BSA) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Nach mehreren Waschschritten (dreimal mit PBS-), um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen, wurde der Über-

stand gründlich abgesaugt und die Platte bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der Menge der adhärenen Zellen wurde die Platte bei Raumtemperatur 10 min aufgetaut. Diese Zellen wurden mit $230\ \mu\text{l}$ DNA-Farbstoff pro Well angefärbt (Sybr-Green, Molecular Probes, 1:2500 in PBS+ mit 0,1 % Triton-X) und für 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA-Fluoreszenzintensität wurde mittels Fluoreszenz-Plattenleser „Fluorocan Ascent“ (Labsystems) bestimmt, die Intensität war dabei proportional zur Menge der adhärenen Zellen.

Tabelle 4: Verwendete Matrices

Matrix	Spezies	Konzentration	Herkunft
Laminin-5	Ratte	-----	Überstand von 804G-Zellen
Kollagen Typ I	Ratte	$10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in H_2O	Isolation aus Rattenschwänzen
Kollagen Typ IV	Maus	$10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in 0,05 M HCl	BD Biosciences
Fibronektin	Human	$5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in PBS-	BD Biosciences

3.1.6 Herstellung von *in vitro*-Hautäquivalenten

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

3.1.6.1 Isolierung von Kollagen für die Gele der organotypischen Kokultur

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

3.1.6.2 Standardprotokoll für organotypische Kokulturen (OTK)

Die Fibroblasten wurden trypsiniert, abzentrifugiert und in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in FCS aufgenommen. Kollagen und Hank's (mit Phenolrot als Indikator) wurden auf Eis zusammen pipettiert und das Gemisch mit NaOH bis zum Umschlagspunkt des Indikators neutralisiert. Die Zellsuspension wurde mit der neutralisierten Kollagenlösung vorsichtig vermischt und luftblasenfrei in Volumina von jeweils 2,5 ml in Filterinserts pipettiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Kollagengels

Bestandteil	Zusammensetzung	Herkunft
Kollagen-Lösung (3 mg/ml)	80 %	Rattenschwänze
Hank's Lösung (10x konzentriert)	10 %	Biochrom
NaOH (5 M)	etwa 150 μ l	J. T. Baker
FCS mit Zellen	10 %	-----

Die Filterinserts (3 μ m Porengröße, Becton Dickinson) wurden ihrerseits in spezielle 6-Well-Platten (*Deep-Well-Plates*, BioCoat, Becton Dickinson) eingesetzt. Anschließend wurden die Gele zum Aushärten 1 h im Brutschank inkubiert. Auf die festen Kollagengele wurden sterile Glasringe mit einem Innendurchmesser von 18 mm aufgesetzt und weitere 15 min im Brutschrank inkubiert. Dabei wurden die Gele durch das Gewicht der Ringe komprimiert und die ausgetretene Flüssigkeit abgesaugt. In die Vertiefungen der 6-Well-Platten und auf die Gele wurde Standardmedium gegeben, so dass die Gele vollständig mit Medium bedeckt waren. 24 h später wurde das Medium innerhalb der Glasringe abgesaugt und durch die epitheliale Zellsuspension (1×10^6 Zellen/Well) ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium oberhalb der Zellen vorsichtig abgesaugt und die Glasringe entfernt. Dieser Zeitpunkt, von dem an die Zellen luftexponiert kultiviert wurden, entsprach dem Tag 0 der Kultur. Im Anschluss wurde das Medium alle 2 Tage gewechselt. Dabei war darauf zu achten, dass nur so viel Medium zugegeben wurde, bis der Mediumspiegel die Unterseite des Filterinserts gerade berührte. Die Kulturen wurden frühestens an Tag 5 und spätestens an Tag 14 entnommen und nachfolgend für die Histologie bzw. für Gefrierschnitte weiterpräpariert.

3.2 VERWENDUNG ADENOVIRALER GEN-KONSTRUKTE

3.2.1 Herstellung

Die Herstellung der adenoviralen Vektoren erfolgte in mehreren Teilschritten im Labor von Tamar Tennebaum, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, Israel.

Das in den viralen Vektor zu übertragende Gen (Transgen) wurde dabei in ein Rekombinationsplasmid eingeführt und von DNA-Sequenzen flankiert, die zu den nicht codierenden 5'- und 3'-Bereichen der Adenovirus-5-E1-Region homolog sind.

Im Ad5-Genom sind die kodierenden DNA-Sequenzen der frühen Gene E1A und E1B deletiert, benachbarte nicht-kodierende 5'- und 3'-Bereiche sind noch vorhanden.

Das Rekombinations-Cosmid mit dem Transgen wird gemeinsam mit dem defekten Ad5-Genom in eine Helferzell-Linie eingeschleust. Da die E1-Gene zur Amplifizierung der Viren und somit für die virale DNA-Replikation unbedingt erforderlich sind, werden zur Komplementierung des E1-deletierten Ad5-Genoms permissive Zell-Linien benötigt. Die am häufigsten verwendete Helferzell-Linie ist die humane Zell-Linie 293, die durch Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit fragmentierter Ad5-DNA entstanden ist und die E1-Gene konstitutiv exprimiert (Graham et al. 1977). Eine weitere Helferzell-Linie mit vergleichbarem E1-Integrationsmuster ist 911 (Fallaux et al. 1996).

Im Verlaufe der viralen DNA-Replikation kommt es aufgrund der DNA-Sequenzhomologien der nicht-kodierenden E1-Regionen zur Rekombination zwischen dem Transgen und dem defekten Ad5-Genom. Es entsteht ein rekombinantes, replikationsdefektes Ad5-Genom, bei dem anstelle der deletierten E1-Region jetzt das Transgen vorliegt. Die im Ad5-Genom noch vorhandenen späten Gene werden exprimiert und somit die replikationsdefekten Ad5-Viruspartikel gebildet, die von der Helferzell-Linie abgegeben werden (ZKBS 2001). Diese Zielgen-positiven Adenoviren im Medienüberstand werden mittels Cäsiumchlorid-Zentrifugation gereinigt und isoliert. Sie können nach Bestimmung der Adenovirus-Konzentration und erneuter Überprüfung des Inserts in Infektionsversuchen eingesetzt werden.

Die Cosmid-Kassetten der in diesem Projekt verwendeten adenoviralen Konstrukte für das LacZ-Operon (Negativkontrolle), die Maus PKC α -cDNA, die Maus PKC δ -cDNA und die humane Integrin $\alpha 6$ -cDNA sind im Folgenden dargestellt (Abbildung 10).

Der dabei verwendete CAG-Promotor aus Cytomegalovirus-Immediate-Early-Enhancer, Huhn- β -Actin-Promotor und Kaninchen- β -Globin-Polyadenylierungssignal bewirkte eine starke Expression des Zielgens (Ohba et al. 1998).

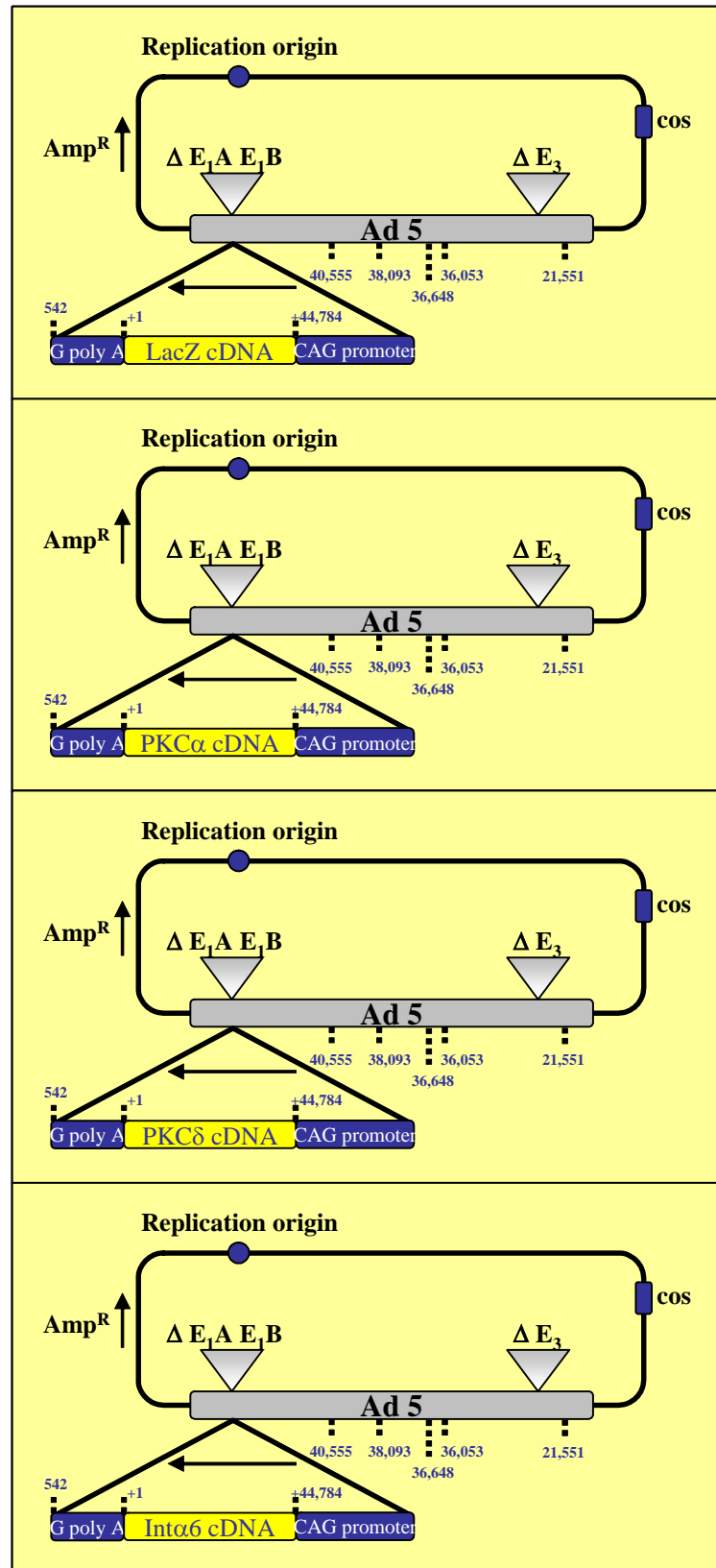


Abbildung 10: Cosmid-Kassetten der vier verwendeten adenoviralen Konstrukte für β -Gal, PKC α , PKC δ und Integrin α 6

3.2.2 Bestimmung der Adenovirus-Konzentration

Zur Bestimmung der Adenovirus-Konzentration der Stocklösungen wurde das Adeno-X Rapid Titer Kit (BD Clontech) verwendet. Dieses Kit basiert auf einer Antikörperreaktion auf Hexonproteine des Adenovirus Typ 5.

In eine 12-Well-Platte wurden 5×10^5 HEK 293 Zellen pro Well ausgesät. Vom Virusstock wurden jeweils 10-fach Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-6} angesetzt. Hiervon wurden je 100 μ l tropfenweise zu den Wells gegeben (in Duplikaten) und die Zellen bei 37°C für 48 h inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und nach vollständigem Trocknen der Wells wurde 1 ml eiskaltes 100 %iges Methanol vorsichtig zu den Zellen gegeben, ohne die Zellen abzulösen. Die Platte wurde 10 min bei -20°C inkubiert, das Methanol entfernt, und die Zellen dreimal mit PBS (0,1 % BSA) gewaschen. Nach Abziehen des Überstands werden 0,5 ml des Erstantikörpers (Maus anti-Hexon, 1:1000 in PBS mit 1 % BSA) zu jedem Well gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Wells erneut dreimal mit PBS mit 0,1 % BSA gespült. Der Zweitantikörper (Ratte anti-Maus, 1:500 in PBS mit 0,1 % BSA) wurde ebenfalls in einem Volumen von 0,5 ml zu jedem Well gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstands und dreimaligem Spülen mit PBS (0,1 % BSA) wurde zur Detektion 0,5 ml DAB-Lösung (DAB-Substrat, 1:10 verdünnt mit Peroxidasepuffer) zu jedem Well gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DAB-Lösung wurde abgesaugt und die Wells mit je 1 ml PBS versetzt. Bei der Substratumsetzung erfolgte die Oxidation von DAB zu einem unlöslichen braunen Farbstoff, der die positiven Zellen braun färbt. Fünf Felder von Zellen wurden unter dem Mikroskop (Olympus IX70) mittels 20er Objektiv ausgezählt und die durchschnittliche Menge positiver Zellen pro Well in folgender Formel berücksichtigt, mit der die Anzahl infektiöser Partikel pro ml berechnet werden konnte:

$$\text{ifu/ml} = \frac{(\text{infizierte Zellen/Feld}) \times (573 \text{ Felder/Well})}{\text{Virusvolumen (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

3.2.3 Adenovirale Infektion

Die adenovirale Infektion erfolgte aufgrund der Infektiösität der Viren in einem Labor der Sicherheitsstufe 2. Dazu wurden die HaCaT₆ Zellen 24 h vor der Infektion in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro cm^2 ausgesät. Die normalen Keratinozyten wurden auf einem Feeder-Layer bis zu 60-70 % Konfluenz kultiviert und dann in der Infektionsprozedur eingesetzt. Die Infektion erfolgte für beide Zellarten im Prinzip gleich, wobei die Verdünnungen der Virusstocks im entsprechenden Wachstumsmedium angesetzt wurden.

Das Medium wurde von den Zellen abgezogen und die Virusverdünnung (1 ml/25cm²) zugegeben. Während der Inkubation (1 h bei 37°C) wurden die Flaschen alle 15 min vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Infektionslösung sicher zu stellen und ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und nach Zugabe des Wachstumsmediums für weitere 24 h im Brutschrank im S2-Bereich inkubiert. Nach dieser Zeit galten sie als Virus-frei und wurden in den S1-Bereich gebracht.

3.3 NACHWEIS DER PROTEIN-EXPRESSION

Proteine lassen sich in einem SDS-Acrylamidgel nach ihrer Molekularmasse auftrennen und anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie immobilisiert vorliegen. Die aufgetrennten Proteine lassen sich auf der Membran mit spezifischen Antikörpern nachweisen, die ihrerseits durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper detektiert werden. Die Umsetzung des entsprechenden Enzym-Substrats macht das betreffende Protein sichtbar. Die relative Konzentration der Proteine ist so semiquantitativ bestimmbar.

3.3.1 Lyse der Zellen

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

Dazu wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS gespült und die adhärennten Zellen mechanisch mit einem Zellschaber in wenig PBS abgelöst. Nach mehrmaligem Waschen des Pellets und Zentrifugation (zweimal je 5 min, 250 g, Labofuge 400, Heraeus; einmal 5 min, 600 g, Biofuge 15R, Heraeus) wird das Pellet entweder zur Lagerung bei -80°C eingefroren oder bei sofortiger Weiterverarbeitung in RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Das Zell-Lysat wurde durch weitere, rigorosere Zentrifugation (10 min, 13000 g, Biofuge 15R, Heraeus) von verbleibenden Zelltrümmern abgetrennt, der klare Überstand abgenommen und für die folgenden Experimente weiterverwendet.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien zur Lyse der Zellen

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

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

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

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Es wurden vertikale Gelapparaturen (Hofer) verwendet, wobei in einem niedrigprozentigen Sammelgel zunächst die Aufkonzentration der Proteine zu einer schmalen Schicht erfolgt. Im unteren Trenngel, in dem andere Pufferbedingungen herrschen, werden die Proteine dann entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt (Sambrook et al. 1989).

Sammel- und Trenngel wurden durch Mischen der jeweiligen Gelpuffer mit Acrylamid/Bisacrylamid (Biorad) hergestellt. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von TEMED (Sigma) als Katalysator und APS (Serva) als Radikalstarter eingeleitet.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Konzentration	Trenngel				Sammelgel
	6%	7,5%	10%	12%	2,8%
Glycerin (50% v/v)	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	-----
Wasser	5,25 ml	4,90 ml	4,25 ml	3,75 ml	2,60 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	-----
Sammelgelpuffer	-----	-----	-----	-----	0,95 ml
Acrylamid(T40%-3,7%)	1,50 ml	1,90 ml	2,50 ml	3,00 ml	0,30 ml
APS (10%)	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	22,5 μ l
Temed	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	7,5 μ l

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen (10 x 8,5cm) und direkt nach dem Giessen mit Isobutanol (Merck) überschichtet, um eine glatte Oberfläche des Gels zu gewährleisten. Die Polymerisation erfolgte für etwa 1 h bei Raumtemperatur, dann wurde mit Wasser gespült und schließlich das Sammelgel aufgegossen. Durch das Einsetzen von Kämmen entstanden dabei Ladetaschen, die ein Probenvolumen von maximal 40 μ l fassen konnten. Nach weiteren 30 min wurden diese Kämmen vorsichtig entfernt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der bei der Elektrophorese verwendeten Lösungen

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

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

Gel ein Regenbogen-Proteinmarker (Amersham-Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte in Laufpuffer für etwa 2-3 Stunden bei Raumtemperatur bei 80 V.

3.3.4 Western Blot

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Schleicher und Schüll, BA-85). Die Gele wurden in einer Kassette auf der Membran fixiert und in eine Transferkammer (Biorad) gesetzt. Der Transfer erfolgte bei 48 V für 3 bis 4 h. Die Transfereffizienz wurde durch Färben der Membran mit essigsaurer Ponceau-Rot-Lösung (Sigma) überprüft; die Ponceau-Färbung wurde nach der Dokumentation des Bandenmusters durch Waschen mit Blockierlösung (pH 7) komplett entfernt.

3.3.5 Immunodetektion

Um auf der Membran gebundene Proteine nachzuweisen, wurden in Blockierlösung gelöste, spezifische Primärantikörper verwendet. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung und dann mit den Primärantikörpern für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Membranen in Blockierlösung (fünfmal je 5 min bei Raumtemperatur) wurden die Membranen mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem, sekundärem Antikörper für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach fünfmal 5-minütigem Waschen mit Blockierlösung erfolgte die Nachweisreaktion der Chemolumineszenz nach Angaben des Herstellers (Amersham-Pharmacia Biotech). Dabei wird das Detektionsreagenz Luminol durch die Peroxidase oxidiert und in einen angeregten Zustand überführt. Unter Lichtemission fällt Luminol anschließend in seinen Grundzustand zurück, wobei das emittierte Licht durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm) detektiert wurde.

Tabelle 9: Primäre Antikörper für den Western Blot

Antigen	Nr.	Typ	Verd.	Hersteller	Katalog-Nr.
GAPDH	p775	Maus, mk	1:2000	Chemicon	MAB374
Integrin $\alpha 6$	p589	Ratte, mk	1:1000	Chemicon	MAB1378
Integrin $\beta 4$	p587	Ratte, mk	1:1000	Pharmingen	33691A
PKC α	p753	Maus, mk	1:1000	BD Bioscience	610107
PKC α	p643	Kaninchen, pk	1:1000	Santa Cruz	SC-208
PKC δ	p754	Maus, mk	1:1000	BD Bioscience	610397
PKC δ	p644	Ziege, pk	1:1000	Santa Cruz	SC-213

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Spezifität	Nr.	Detektion	Verd.	Hersteller	Katalog-Nr.
Anti-Kaninchen	S216	POX	1:10000	Dianova	711-035-152
Anti-Maus	S219	POX	1:10000	Dianova	800-367-5296
Anti-Ratte	S218	POX	1:10000	Dianova	112-035-003
Anti-Ziege	S231	POX	1:10000	Dianova	765-035-003

3.4 NACHWEIS DER mRNA-EXPRESSION

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

3.4.1 Isolation von Gesamt-RNA

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

80-90 % konfluente Zellen in Einzellschicht wurden nach Angaben des Herstellers direkt in der Zellkulturschale mittels Lysepuffer und Zellschaber lysiert. Die weiteren Schritte erfolgten ebenfalls wie vom Hersteller beschrieben.

3.4.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA aus Zellen wurde mittels „OmniscryptTM Reverse Transcriptase Kit“ von Qiagen in cDNA umgeschrieben.

Gemäß dem Protokoll wurden 1 µg RNA in 1x RT-Puffer mit 0,5 mM Nukleotid-Mix (dNTP-Mix), 10 units Omniscrypt Reverse Transcriptase, 1,25 µM Oligo dT Primern und Random Hexameren sowie RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 min. Danach wurden die Produkte 5 min bei

93°C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und bei –20°C eingefroren oder direkt für die PCR eingesetzt.

3.4.3 Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurden 4 µl der RT-Produkte mit 0,2 mM dNTPs, 5 U/50 µl Taq-Polymerase (Qiagen), 1x PCR-Puffer, MgCl₂ optimiert je nach Primer, jeweils 0,15 µM upstream und downstream Primer mit H₂O auf 50 µl eingestellt. Die Bedingungen für die PCR wurden Primer-abhängig optimiert.

3.4.3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die Auswahl geeigneter Primerpaare zur Amplifikation spezifischer cDNAs erfolgte nach mehreren Kriterien. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, die als Verunreinigung in der RNA-Präparation vorhanden sein kann, wurden die Primer so gewählt, dass sie Exon-übergreifend binden. Durch die zwischen den Exons liegenden Intron-Sequenzen würde die sehr viel längere genomische DNA von der Taq-Polymerase nicht vollständig synthetisiert. Zum anderen ist sie aufgrund ihrer Größe auf dem Gel vom mRNA-Produkt unterscheidbar. Die zu amplifizierende cDNA-Sequenz sollte zwischen 200 und 700 bp lang sein, da Fragmente dieser Länge elektrophoretisch gut auftrennbar sind. Die Primer sollten zwischen 18 und 25 Nukleotiden lang sein, damit eine Annealingtemperatur unterhalb des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase gegeben ist. Die Annealingtemperatur sollte allerdings auch nicht zu niedrig sein, da sich sonst Sekundärstrukturen innerhalb des cDNA-Templates und der Primer bilden können, die zur Beeinträchtigung der Primerbindung führen. Die Primerauswahl nach diesen Kriterien wurde mit Hilfe des Software-Programms „Oligo“ (National Biosciences, Inc.) vorgenommen. Die Spezifität der Primer wurde dann mit Hilfe der Sequenzdatenbank „Blast-Search“ (PubMed) überprüft. Synthetisiert wurden die so ausgesuchten und überprüften Primer von der Firma Thermohyaid.

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

Neben der Annealingtemperatur spielt auch die Konzentration an divalenten Kationen im Reaktionsgemisch eine große Rolle. Mg²⁺ stabilisiert doppelsträngige DNA und erhöht damit deren Schmelzpunkt. Daneben stimuliert es aber auch die Aktivität der Taq-Polymerase und

bildet lösliche Komplexe mit den Desoxynukleotiden, die deren Einbau durch die Polymerase ermöglichen. Eine zu niedrige Mg^{2+} -Konzentration führt daher zu geringer Ausbeute, eine zu hohe Konzentration zu unspezifischen Produkten.

Daraus wird ersichtlich, dass Annealingtemperatur und $MgCl_2$ -Konzentration nicht unabhängig voneinander optimiert werden können, da sich mit der $MgCl_2$ -Konzentration auch die optimale Annealingtemperatur ändert. Daher wurden $MgCl_2$ -Konzentrationen von 1,5 bis 2,5 mM bei jeder der 12 ausgewählten Annealingtemperaturen getestet. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und die optimalen Bedingungen dementsprechend bestimmt.

Die Anzahl an amplifizierten Kopien einer cDNA steigt während der PCR theoretisch exponentiell. Daher hängt die Kopienzahl nach einem beliebigen Zyklus von der Ausgangsmenge an Template-Molekülen und der Zykluszahl ab. Tatsächlich ist jedoch die Ausbeute in jedem Zyklus kleiner als 100 %. Denn mit steigender Zykluszahl nimmt die Aktivität der Polymerase ab. Darüber hinaus bilden sich während des Annealings zunehmend Dimere zwischen den Einzelsträngen des Produkts. Diese Reaktion konkurriert mit steigender Kopienzahl des Produktes immer stärker mit dem Primer-Annealing. Daher erreicht die Kopienzahl, die durch die PCR erzeugt werden kann, bei höheren Zykluszahlen ein Plateau.

3.4.3.2 Verwendete Primer und PCR-Bedingungen

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

Tabelle 11: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen

mRNA	Länge	Sequenz	Produkt	Bedingungen
Integrin $\alpha 6$	23 bp	F: ctt tgg gcg gtg tta tgt cct ga	546 bp	2,0 mM Mg^{2+} , 58°C, 30 Zyklen
	23 bp	R: tct tgc cac cca tcc ttg ttg ag		
GAPDH	22 bp	F: ggt gaa ggt cgg agt caa cgg a	240 bp	1,5 mM Mg^{2+} , 62°C, 20 Zyklen
	22 bp	R: gag gga tct cgc tcc tgg aag a		
E1A	21 bp	F: ttt ccc gac tct gta atg ttg	292 bp	2,0 mM Mg^{2+} , 52°C, 35 Zyklen
	19 bp	R: tcc tcc ggt gat aat gac a		
E1B	21 bp	F: ggc atg gac ggg gtg gtt att	404 bp	1,5 mM Mg^{2+} , 66°C, 30 Zyklen
	20 bp	R: ccg tcc gag cag gtc agc at		

3.4.4 DNA-Gelelektrophorese

10 μ l des PCR-Produkts wurden mit 2 μ l 6X-Probenpuffer (Novagen) verdünnt, auf ein 1 %iges, ausgeliertes Agarose-TAE-Gel (Cambrex) mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid (Sigma)

aufgetragen und elektrophoretisch bei 100 V für 30 min in TAE (Tris-Essigsäure 40 mM, EDTA 1 mM) getrennt. Als DNA-Leiter diente dabei ein 100 Basenpaar-Standard (Novagen). Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht mittels Chemi-Imager 4000 (Alpha Innotech Corporation).

3.5 GEWEBEAUFARBEITUNG

Zur Analyse der *in vitro*-Hautäquivalente wurden von den organotypischen Kokulturen Gewebeschnitte hergestellt und gefärbt. Die Filterinserts wurden hierzu entnommen und die Kulturen mit einem Skalpell aus dem Filter herausgeschnitten. Für die weitere Analyse in Histologie und als Gefrierschnitt wurden die Proben geteilt und folgendermaßen weiterverarbeitet.

3.5.1 Histologie

Der Teil der Kultur für die histologische Aufarbeitung wurde für 24 h in PBS (3,7 % Formaldehyd) fixiert. Nach der Einbettung in Agar erfolgte eine erneute Fixierung in dieser Lösung für 24 h. Die Präparate wurden daraufhin in Kapseln eingeschlossen (Medim, Giessen), durch eine Alkoholreihe entwässert (70 %, 80 %, 90 %, 96 % Ethanol in H₂O, Xylol), und in Paraffin (Medim) eingebettet. Von den eingebetteten Präparaten wurden Schnitte von 4 µm angefertigt und mit Hämalaun (15 min) und Eosin (5 min) gefärbt. Die HE-Färbung ist dabei die gängigste Übersichtsfärbung in der Histologie. Hämalaun als basischer Farbstoff färbt im alkalischen Milieu basophile Strukturen wie Zellkerne intensiv blau. Das azidophile Cytoplasma wird anschließend mit einer Eosin-haltigen, sauren Lösung rot gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Eukitt (Medim) und einem Deckglas versiegelt.

3.5.2 Gefrierschnitte

Gewebestückchen der Kulturen wurden in Tissue Tec-Einbettmedium langsam in der Gasphase von flüssigem Stickstoff eingefroren und nachfolgend bei -80°C gelagert. Die Präparate werden an einem Kryomikrotom in 7 µm Schnittdicke geschnitten, auf Objektträger aufgezogen (Superfrost, Neolab), luftgetrocknet und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

3.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Untersuchungen zur subzellulären und gewebespezifischen Expression und Lokalisation von Proteinen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei werden Zellen im Gewebe permeabilisiert und alle Komponenten fixiert. Ausgesuchte Proteine werden von spezifischen Primärantikörpern erkannt und diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden ih-

rerseits mit Fluorochrom-markierten, sekundären Antikörper detektiert, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind.

Die Objektträger mit Gefrierschnitten wurden in 80 % Methanol bei 4°C für 5 min, danach bei -20°C für 2 min in Aceton fixiert und anschließend in PBS+ rehydriert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde für 15 min in PBS+ (0,1 % BSA) inkubiert. Überschüssiges Salz und Protein wurden durch kurze Inkubation in Wasser entfernt, die Schnitte mit 20 µl der Primärantikörper-Mischung benetzt und in einer feuchten Kammer inkubiert. Dies erfolgte entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Präparate mit Wasser abgespült und erneut zur Blockierung für 15 min in PBS+ (5 % Milchpulver, 0,02 % Tween) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten, sekundären Antikörpern erfolgte schließlich lichtgeschützt für 40 min. Die Zellkerne wurden gleichzeitig zur Sekundärantikörper-Reaktion mit Bisbenzimid (Hoechst, 20 µg/µl) gefärbt. Nach erneutem Waschen in PBS (dreimal je 10 min im Dunkeln) wurden die Objektträger kurz in Wasser gespült, die Schnitte in Permafluor (Immunotech) eingebettet, mit einem Deckglas versehen und nach dem Trocknen bei 4°C gelagert.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoresmikroskop (Leica DM-R) und die Dokumentation mit einer digitalen Kamera (SIS F12, Soft Imaging Systems) unter Verwendung des Programms AnalySIS (Soft Imaging Systems).

Tabelle 12: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antigen	Nr.	Typ	Verd.	Hersteller	Katalog-Nr.
Kollagen Typ IV	p495	Maus, mk	1:200	Progen	10710
Filaggrin	p415	Maus, mk	1:200	Cell Systems	5002
Integrin α 2	p621	Maus, mk	1:100	Chemicon	MAB1950Z
Integrin α 3	p619	Maus, mk	1:100	Chemicon	MAB1952Z
Integrin α 6	p370	Ratte, mk	1:400	A. Sonnenberg	-----
Integrin β 1	p620	Maus, mk	1:100	Chemicon	MAB1951Z
Integrin β 4	p373	Ratte, mk	1:5	Damsky	-----
Involucrin	p578	Maus, mk	1:100	Sigma	I9018
panKeratin	p733	Meerschwein, pk	1:1000	Progen	GP14
Keratin 1,10,11	p638	Maus, mk	1:100	Sigma	C7284
Ki67	p581	Maus, mk	1:20	Dianova	DIA 505
Laminin-5	p328	Kaninchen, pk	1:200	Marinkovich	-----
Laminin γ 1	p528	Maus, mk	1:1000	HMR Gerl	-----
Laminin γ 2	p466	Kaninchen, pk	1:1000	Meneguzzi	-----
Loricrin	p204	Kaninchen, pk	1:8	Hohl	-----
PKC α	p753	Maus, mk	1:100	BD Bioscience	610107
PKC δ	p754	Maus, mk	1:100	BD Bioscience	610397
Transglutaminase	p423	Maus, mk	1:20	Harbor BioProd	5003
Vimentin	p545	Meerschwein, pk	1:100	Cell Systems	MON3005-1

Tabelle 13: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Spezifität	Nr.	Fluorochrom	Verd.	Hersteller	Katalog-Nr.
Anti-Maus	s134	Cy2	1:100	Dianova	115-227-003
Anti-Ratte	s208	Cy2	1:100	Dianova	712-226-153
Anti-Ratte	s207	Cy3	1:1000	Dianova	712-166-153
Anti-Meerschwein	s141	Cy3	1:1000	Dianova	706-165-148
Anti-Kaninchen	s209	Cy3	1:1000	Dianova	711-166-152
Anti-Kaninchen	s180	Cy3	1:1000	Dianova	111-165-144

3.6 β -GALAKTOSIDASE FÄRBUNG

Zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in den mit β -Gal Adenovirus infizierten Zellen wurde das Protokoll nach Dimri (Dimri et al. 1995) verwendet. Dieses Protokoll beruht auf der Umsetzung des Substrats X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galaktosid) mit Hilfe des Enzyms β -Galaktosidase zu einem blauen, unlöslichen Farbstoff. Die Blaufärbung der infizierten Zellen kann im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden.

Dazu wurden die Objektträger mit Zellen bzw. mit Kryoschnitten von organotypischen Kulturen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min in Fixierungspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Präparate nochmals zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur mit der Färbelösung inkubiert. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit PBS, gefolgt von PBS (0,1 % Triton) für 5 min, wurden die Objektträger in Permafluor eingebettet, mit einem Deckglas verschlossen und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der X-Gal-Färbelösung

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller	Anteil an Färbelösung
Fixierungspuffer	2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS	Sigma	-----
X-Gal	20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galaktosid in Dimethylformamid	Sigma	5 %
Reagenz A	200 mM Magnesiumchlorid	Sigma	1 %
Reagenz B	400 mM Kaliumferricyanid	Sigma	1 %
Reagenz C	400 mM Kaliumferrocyanid	Sigma	1 %
			92 % PBS

4 ERGEBNISSE

4.1 TESTS ZUR BIOLIGISCHEN SICHERHEIT

Aufgrund der Infektiösität der modifizierten Adenoviren mussten wegen eines möglichen Rest-Infektionsrisikos die Sicherheitsstandards insbesondere bei den Vektoren, Viusstocks und den zu infizierenden Zellen vor dem eigentlichen Versuchsbeginn nochmals abgeklärt werden.

4.1.1 Nachweis der E1A- und E1B-mRNA

Nach abortiver Infektion mit replikationsdefekten Adenoviren Typ 5 (Ad5) entstehen generell keine neuen Viruspartikel, sofern die infizierten Zellen den Replikationsdefekt von Ad5 nicht komplementieren. Die viralen Nucleinsäuren können somit nicht auf weitere Zellen übertragen werden. Beim Umgang mit diesen Zellen wird nach derzeitigem Stand der Forschung nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt ausgegangen (ZKBS 2001). Um das Risiko einer möglichen Komplementierung ausschließen zu können, mussten die Zellen und Zell-Linien, die in den Experimenten verwendet werden sollten, auf Expression von E1A- und E1B-mRNA getestet werden. Die Ad-Gene könnten infolge einer eventuellen Infektion mit einem Wildtyp-Adenovirus trotz geringer Integrationswahrscheinlichkeit der viralen Nucleinsäure in das Wirtsgenom gelangt sein. Bei Verwendung solcher Zellen wäre die Möglichkeit der Rekombination zu rekombinationskompetenten Adenoviren nicht völlig ausgeschlossen, die dann in der Lage wären, weitere Zellen zu infizieren sowie sich ungehemmt zu vermehren und zu verbreiten. Zudem muss bei replikationsdefekten rekombinanten Adenoviren, die mittels einer Helferzell-Linie, in diesem Fall HEK 293 (Graham et al. 1977), erzeugt wurden, definitiv die Präsenz replikationskompetenter Viren ausgeschlossen werden, bevor die gentechnischen Arbeiten nach Infektion der Zellen in den Sicherheitsbereich 1 herabgestuft werden dürfen. Denn bei derartig modifizierten Adenoviren besteht immer die Möglichkeit der homologen Rekombination zwischen dem defekten Adenovirus-Genom und dem in den Zellen integrierten E1-Gen.

Aus diesem Grund wurden nicht nur die Zellen getestet, die direkt mit den Viren infiziert werden sollten, wie HaCaT₆ und normale humane Keratinozyten (NHK), sondern auch die Fibroblasten, die als Feeder für die NHK dienten oder in der organotypischen Kokultur (OTK) verwendet wurden. HEK 293 Zellen dienten als Positivkontrolle, da sie aufgrund einer Transfektion die E1-Gene konstitutiv exprimieren (Graham et al. 1977; Louis et al. 1997). Außerdem wurden auch die Virus-Stocks selbst auf mögliche Rekombination getestet. Die

Expression des „House-Keeping-Genes“ Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diene als Expressions- und Ladungskontrolle.

Wie in Abbildung 11 erkennbar, war außer in der Positivkontrolle HEK 293 keine E1A- oder E1B-mRNA nachweisbar. Die getesteten Zellen konnten deshalb ohne Risiko im adenoviralen System eingesetzt und nach 24 h im Sicherheitsbereich 1 (S1) weiterverwendet werden. Versuche mit HEK 293 Zellen wurden jedoch weiterhin aufgrund des erhöhten Sicherheitsrisikos im Sicherheitsbereich 2 (S2) durchgeführt.

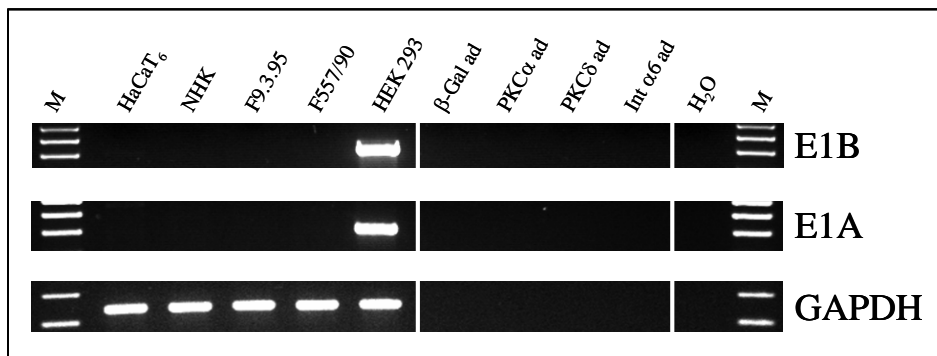


Abbildung 11: Nachweis der E1-mRNA in verwendeten Zell-Linien und Virusstocks mittels RT-PCR. M = Molekulargewichtsstandard. Expressionskontrolle GAPDH 240 bp, E1A 292 bp, E1B 404 bp.

4.1.2 Infektiösität des Medienüberstandes infizierter Zellen

Desweiteren wurde aus Sicherheitsgründen überprüft, ob der Medienüberstand der infizierten Zellen, die nach 24 h in den S1-Bereich transferiert werden sollten, zu diesem Zeitpunkt frei von infektiösen Partikeln war. Dazu wurde der Überstand von β-Gal infizierten HaCaT₆-Zellen 24 h nach Infektion entnommen und als potentielle Virusverdünnung in einem weiteren Infektionsexperiment verwendet. In diesen mit dem Überstand „potentiell infizierten“ HaCaT₆-Kulturen wurde nach weiteren 24 h Stunden eine β-Gal Färbung durchgeführt. Bei dieser spezifischen Färbemethode setzt die mittels adenoviralem Konstrukt in die Zellen eingebrachte β-Galaktosidase das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) zu einem unlöslichen, blauen Produkt um. Anhand der Blaufärbung können im Phasenkontrastmikroskop die infizierten, positiven Zellen nachgewiesen werden.

Mit dieser spezifischen Färbemethode konnten keine infizierten Zellen identifiziert werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass im Medienüberstand keine infektiösen Partikel mehr enthalten waren. Der Transport der infizierten Zellen einschließlich Überstand in den Sicherheitsbereich 1 war somit möglich und stellte kein biologisches Sicherheitsrisiko dar.

4.2 BESTIMMUNG DER ADENOVIRUS-KONZENTRATION

Die Lagerungsdauer und Bedingungen der Lagerung von Virusstocks beeinflussen den Virustiter. So wird z.B. die Exposition der Viren mit Trockeneis als Ursache einer Erniedrigung des Titers diskutiert (Nyberg-Hoffman & Aguilar-Cordova 1999). Zudem war es nicht möglich, vom Ursprungslabor der Viren eine verlässliche Information über die Viruskonzentration zu bekommen. Deshalb musste vor Versuchsbeginn der Virustiter bestimmt werden. Der Nachweis basiert auf einer Antikörperreaktion gegen die Hexonproteine des Adenovirus Typ 5. Es wurden Virus-Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-5} in Wachstumsmedium im Duplikat an HEK 293 getestet, zusätzlich zu Negativkontrollen mit Wachstumsmedium ohne Virus. Anhand der Umsetzung des DAB-Substrates durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper zu einem braunen, unlöslichen Farbstoff konnten die infizierten Zellen identifiziert und quantifiziert werden. Die Dosis-abhängige Infektionsrate der einzelnen Viruspräparationen ist in Abbildung 12 gezeigt.

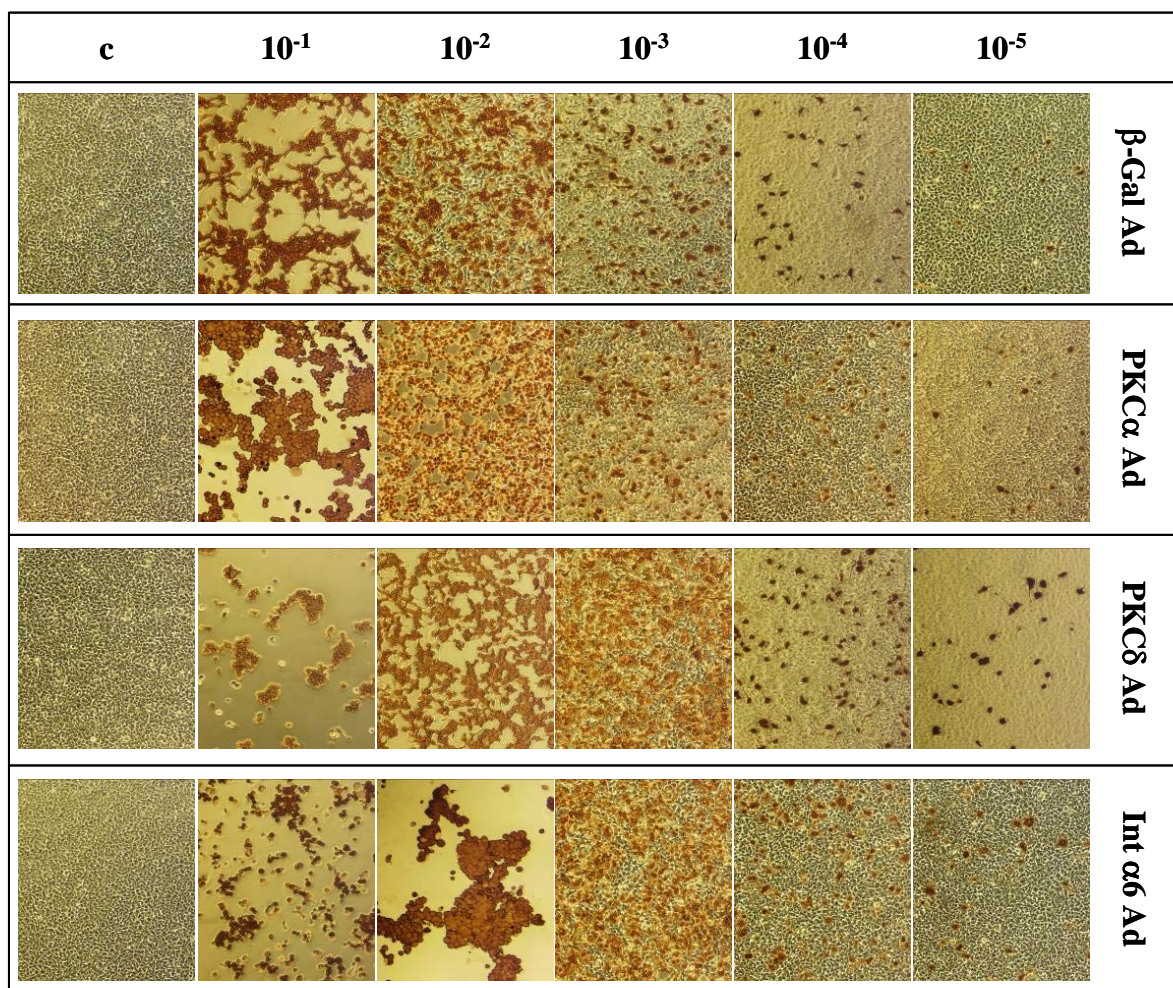


Abbildung 12: Adenovirus-Titer-Assay an HEK 293 mit verschiedenen Viruskonzentrationen (10^{-1} bis 10^{-5}) für β-Galaktosidase, PKCα, PKCδ und Integrin α6 Adenovirus (Ad), c = Kontrolle (unbehandelt). Abnahme der Viruskonzentration von links nach rechts. 20fache Vergrößerung.

Die HEK 293 Zellen, die mit relativ niedrigen Virusverdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-2} infiziert wurden, zeigten nach 48 h starke cytopathische Effekte aufgrund der Infektion, erkennbar an den teilweise abgelösten, toten Zellen. Bei diesen Konzentrationen waren alle noch adhären-ten Zellen infiziert. Bei höheren Verdünnungen erfolgte keine Ablösung der toten Zellen von der Oberfläche, und die infizierten braunen Zellen waren klar von den nicht infizierten unge-färbten Zellen zu unterscheiden. Gemäß Protokoll des Herstellers sollten solche Felder ausge-zählt werden, die zwischen 10 und 50 positive braune Zellen zeigten. Bei allen vier getesteten viralen Konstrukten wurde deshalb zur Auswertung die 10^{-5} -Verdünnung gewählt. Es wurden fünf zufällig ausgesuchte, unabhängige Felder ausgezählt. Daraus wurde ein Mittelwert gebil-det, der mit Hilfe der in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Formel unter Berücksichtigung der Flä-che und Virusverdünnung in die tatsächliche Viruskonzentration umgerechnet wurde.

Tabelle 15: Determinierte Virusstock-Konzentrationen

Adenovirus	Konzentration Stocklösung (ifu/ml)	SD (ifu/ml)
β -Gal	$11,57 \cdot 10^9$	$1,10 \cdot 10^9$
PKC α	$13,06 \cdot 10^9$	$1,48 \cdot 10^9$
PKC δ	$28,88 \cdot 10^9$	$1,55 \cdot 10^9$
Int $\alpha 6$	$23,72 \cdot 10^9$	$1,55 \cdot 10^9$

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, lag der Virustiter der Stocklösungen zwischen $11,57$ und $28,88 \cdot 10^9$ infektiösen Partikeln pro ml (ifu/ml). Dieser Titer gab zumindest einen Hinweis auf den Konzentrationsbereich für die Infektions-Experimente. Letztendlich wurde jedoch die zu verwendende Viruskonzentration nach der Bestimmung der exogenen Proteinmenge ge-wählt (Kapitel 4.4).

4.3 ETABLIERUNG DER ADENOVIRALEN INFEKTION

Die Infektionsprozedur wurde mittels β -Galaktosidase Adenovirus (β -Gal Ad) zuerst an HaCaT₆-Zellen etabliert. Die β -Gal Expression wurde durch die β -Gal Färbung, wie in Kapi-tel 4.1.2 beschrieben, bestimmt.

In Abbildung 13 ist erkennbar, dass die dunkelblau gefärbten, β -Gal exprimierenden Zellen von den nicht infizierten, ungefärbten Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop gut zu un-terscheiden sind. Eine steigende Viruskonzentration führte hierbei zu einer steigenden Infek-

tionsrate der Zellen. Eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor 10 steigerte die Infektionseffizienz von etwa 20 % auf über 90 %. Dabei fügte auch die höchste getestete Viruskonzentration und die damit verbundene starke Proteinsynthese den HaCaT₆-Zellen keinen Schaden zu, wie aus der unveränderten Morphologie und Anzahl der Mitosen geschlossen werden konnte. Diese Konzentration von $1,16 \cdot 10^9$ ifu/ml wurde somit als Standardkonzentration für den β -Gal Ad in allen Folgeexperimente verwendet.

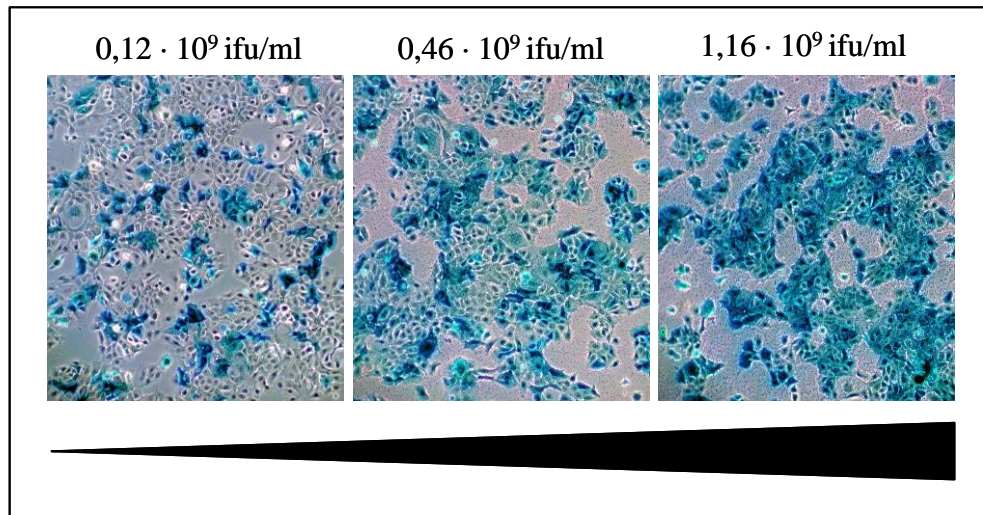


Abbildung 13: β -Gal Färbung β -Gal infizierter HaCaT₆-Zellen 2d nach Infektion (pi). Steigende Viruskonzentration ($0,12 - 1,16 \cdot 10^9$ ifu/ml) von links nach rechts. 20fache Vergrößerung.

Die gleichen Viruskonzentrationen wurden ebenfalls an normalen humanen Keratinozyten (NHK) getestet, wobei das identische Infektionsprotokoll verwendet wurde. Auch bei diesen Zellen war die Infektionseffizienz annähernd proportional zur eingesetzten Viruskonzentration. Die höchste getestete Konzentration hatte ebenfalls keine cytopathischen Effekte zur Folge und resultierte in einer Infektionseffizienz von bis zu 90 %. Aus diesem Grund wurde diese Konzentration auch für NHK standardmäßig verwendet.

4.4 BESTIMMUNG DER PROTEINÜBEREXPRESSION UND DER RESULTIERENDEN OPTIMALEN VIRUSKONZENTRATION

Die Infektionseffizienz der anderen adenoviralen Konstrukte wurde dadurch bestimmt, dass die exogene Proteinexpression im Vergleich zur endogenen im Western Blot überprüft wurde. Die Orientierung erfolgte anhand der Titer-Werte, die mittels Adenovirus-Titer-Assay bestimmt worden waren (Kapitel 4.2). Ziel dabei war es, die optimale Viruskonzentration für die nachfolgenden Versuche zu bestimmen.

Da die infizierten Zellen auch in längerfristigen Versuchen, wie der OTK, eingesetzt werden sollten, musste jedoch nicht nur die Quantität sondern auch die Dauer der Proteinüberexpression bestimmt werden. Hierbei wurde für HaCaT₆-Zellen ein Zeitfenster zwischen zwei und 21 Tagen nach Infektion (pi) gewählt, da die exogene Proteinexpression nach adenoviraler Infektion ein Maximum zwischen 24 und 72 h erreicht (Ohba et al. 1998), andererseits aber die Versuchsdauer in der organotypischen Kokultur bis zu 2 Wochen beträgt. Die Expression ist zwangsläufig transient, da der episomal vorliegende Vektor bei der Zellteilung nur an eine Tochterzelle weitergegeben werden kann.

Als Expressions- und Ladungskontrolle diente bei allen Blots der Proteinnachweis der Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels spezifischem Antikörper.

4.4.1 Proteinkinase C α

PKC α ist die einzige „konventionelle“ und damit Ca²⁺ abhängige PKC-Isoform (cPKC) in der Epidermis. Deshalb wird angenommen, dass sie bei der Ca²⁺-induzierten Differenzierung von Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* eine wichtige Rolle spielt (Dlugosz et al. 1992). Abgesehen von Keratinozyten wird diese Form auch generell in der Haut exprimiert (Dlugosz et al. 1992; Wang et al. 2001).

Es wurden vier verschiedene Viruskonzentrationen getestet (Abbildung 14A). Dabei konnte wie auch schon für den β -Gal Ad gezeigt werden, dass die Menge an exogenem Protein proportional zur verwendeten Viruskonzentration war, und die Zellen durch die eingesetzten Viren und die hohe Expression keine Schädigung zeigten. Nachfolgend wurde standardmäßig die höchste getestete Viruskonzentration für alle Versuche mit HaCaT₆ verwendet (Kapitel 4.4.4).

Bei der Bestimmung der Expressionsdauer (Abbildung 14B) zeigte sich, dass Tage d pi die exogene Proteinmenge sehr hoch war verglichen mit der endogenen Expression in den Kontrollen. Nach geringfügiger Reduktion 4 Tage pi war die Expression 14 Tage pi immer noch leicht erhöht verglichen mit HaCaT₆ oder β -Gal infizierten Zellen. Nach drei Wochen war der Expressionslevel wieder auf dem Niveau der endogenen Menge in Kontrollen gesunken, was bedeutet, dass der Vektor vollständig ausgedünnt war.

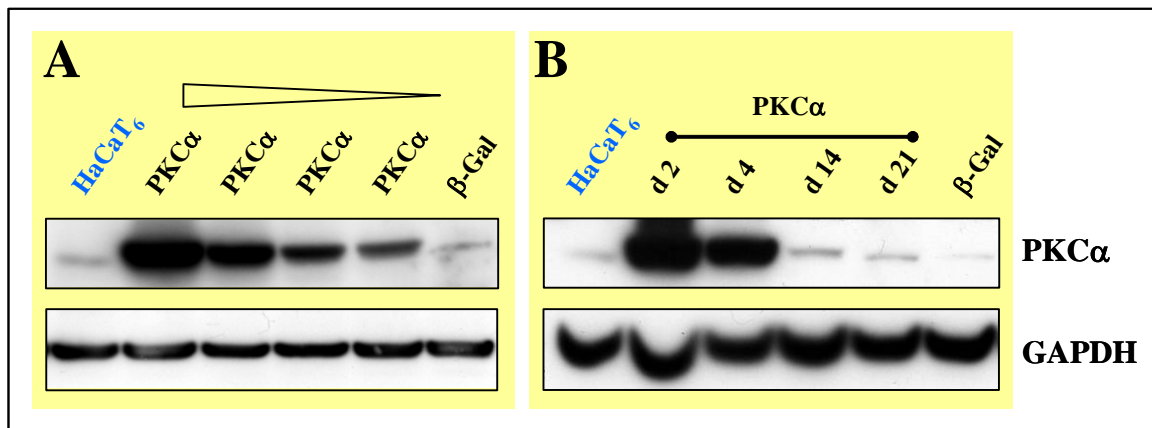


Abbildung 14: Quantität (A) und Dauer (B) der Proteinexpression in HaCaT₆ nach Infektion mit PKC α Ad. Vergleich mit nicht infizierten HaCaT₆ und β -Gal infizierten HaCaT₆, Expressions- und Ladungskontrolle mittels Bestimmung der GAPDH-Expression.

Auch NHK, bei denen ebenfalls die endogene Expression nur gering vorhanden war, zeigten nach Infektion mit drei verschiedenen PKC α -Virusverdünnungen eine konzentrationsabhängige exogene Proteinexpression, die die Zellen zu keinem Zeitpunkt negativ beeinflusste. Die höchste getestete Konzentration war identisch mit der für die HaCaT₆ verwendeten und wurde im Anschluss auch für NHK standardmäßig eingesetzt (Kapitel 4.4.4).

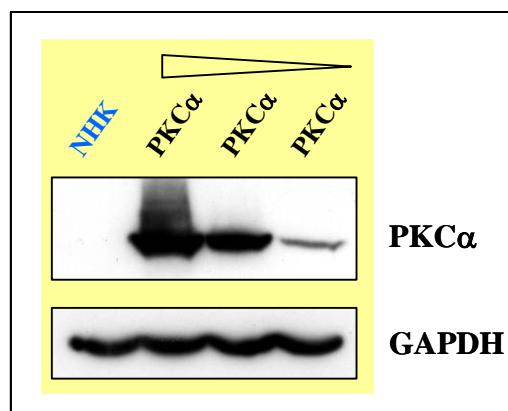


Abbildung 15: Quantität der Proteinexpression in NHK nach Infektion mit PKC α Ad. Expressions- und Ladungskontrolle mittels Bestimmung der GAPDH-Expression. GAPDH, 30 kDa; PKC δ , 80 kDa.

4.4.2 Proteinkinase C δ

PKC δ gehört zur Gruppe der „neuen“ und damit Ca²⁺-unabhängigen PKC Isoformen (nPKC) und wird in einer Vielzahl von Geweben, unter anderem der Haut, exprimiert. Auch PKC δ wird in epidermalen Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* exprimiert. In der Epidermis ist sie vor allem in der Basalzellschicht präsent, ihr Vorkommen nimmt in den höheren, suprabasalen Schichten ab.

Beim Test dreier verschiedener Viruskonzentrationen zeigte sich erneut ein annähernd proportionaler Anstieg der exogenen Proteinmenge entsprechend der eingesetzten Virusmenge.

Die höchste getestete Konzentration (vergleiche Kapitel 4.4.4), die keine cytopathischen Effekte hatte, wurde im Folgenden standardmäßig verwendet.

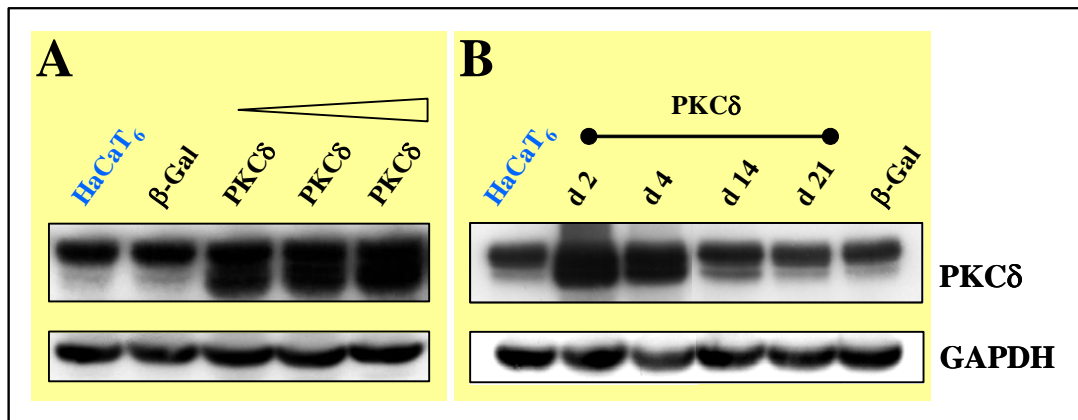


Abbildung 16: Quantität (A) und Dauer (B) der Proteinexpression in HaCaT₆ nach Infektion mit PKCδ Ad. Vergleich mit nicht infizierten HaCaT und β-Gal infizierten HaCaT₆, Ladungskontrolle mittels Bestimmung der GAPDH-Expression. GAPDH, 30 kDa; PKCδ, 80 kDa.

Auch bei der Bestimmung der Expressionsdauer von PKCδ zeigte sich, wie auch schon für PKCα, eine klare zeitabhängige Überexpression, die auch noch nach 14 Tagen zu erkennen war.

In den mit 3 verschiedenen PKCδ-Viruskonzentrationen infizierten NHK konnte ebenfalls eine Viruskonzentrations-abhängige Proteinüberexpression detektiert werden. Da auch hier kein cytopathischer Effekt sichtbar war, wurde die höchste Viruskonzentration als Standard festgesetzt (Kapitel 4.4.4).

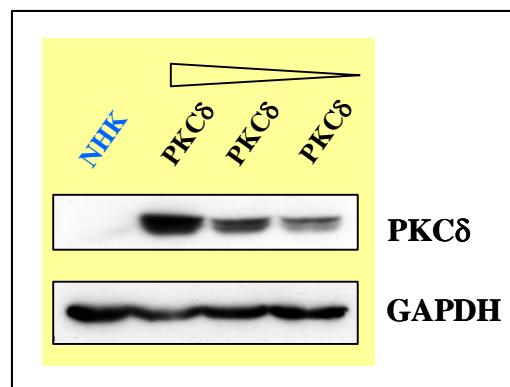


Abbildung 17: Quantifizierung der Proteinexpression in NHK nach Infektion mit PKCδ Ad mittels Western Blotting. Ladungskontrolle mittels Bestimmung der GAPDH-Expression. GAPDH, 30 kDa; PKCδ, 80 kDa.

4.4.3 Integrin α6-Untereinheit

Integrin α6β4 wird hauptsächlich in der Basalzellschicht der Epidermis exprimiert, wo es eine Hauptkomponente der Hemidesmosomen darstellt, aber auch in proliferationsfähigen Keratinozyten *in vitro*.

Die Elektrophorese für die Integrin-Proteinbestimmung wurde, abweichend von den bisher beschriebenen Western Blots, unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Damit sollte sicher gestellt werden, dass die mittels Disulfidbrücke verbundene, aus zwei Teilstücken bestehende Integrin $\alpha 6$ -Untereinheit strukturell erhalten blieb und damit bei der nachfolgenden Immunodetektion vom Erstantikörper problemlos erkannt werden konnte. Dies wurde auch für den Nachweis der einsträngigen $\beta 4$ -Integrinkette beibehalten, um den Nachweis von α - und β -Kette unter den gleichen Bedingungen auf der selben Membran zu ermöglichen.

Bei der Analyse der Integrin $\alpha 6$ Expression in HaCaT₆-Zellen nach adenoviraler Infektion zeigte sich ein überraschendes Ergebnis. Der erwartete hohe Proteinlevel blieb aus, statt dessen waren die detektierbaren Integrin $\alpha 6$ Mengen durchgehend vergleichbar mit den Kontrollen, unabhängig von der verwendeten Viruskonzentration (Abbildung 18).

Bei Versuchen mit normalen Mauskeratinozyten als Zellsystem konnte im Labor von Tamar Tennenbaum mit dem gleichen Vektor eine Überexpression von $\alpha 6$ Integrin erzielt werden, was zusätzlich einen entsprechenden Anstieg von Integrin $\beta 4$ zur Folge hatte (A. Alt, Bar-Ilan University, Israel, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde auch die $\beta 4$ -Konzentration in unbehandelten und infizierten HaCaT₆-Zellen getestet, was keinen Anstieg von $\beta 4$ nach der Infektion zeigte.

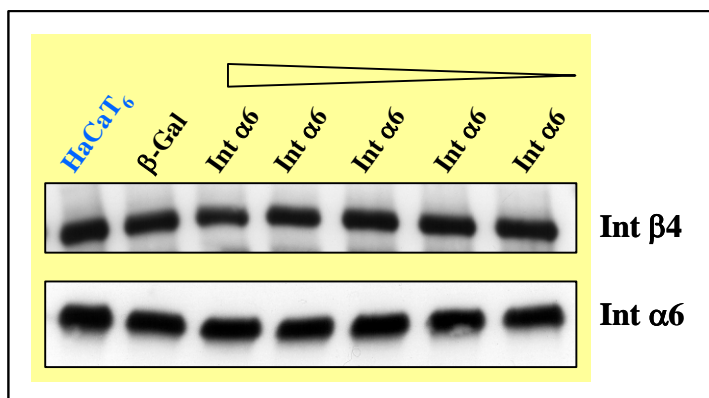


Abbildung 18: Quantifizierung der Integrin $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Kette in HaCaT₆-Zellen vor und nach Infektion mit Int $\alpha 6$ Ad und β -Gal Ad mittels western Blotting. Integrin $\alpha 6$, 150 kDa; Integrin $\beta 4$, 205 kDa.

Um auszuschließen, dass das Zeitfenster falsch gewählt war und die Überexpression 48 Stunden pi bereits herunterreguliert war, wurden auch Zell-Lysate früherer Zeitpunkte nach Infektion hinsichtlich der Proteinexpression analysiert, das heißt 12, 24, 36, und nochmals 48 Stunden pi. Diese Analysen bestätigten jedoch, dass $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrin zu keinem Zeitpunkt erhöht waren (Abbildung 19).

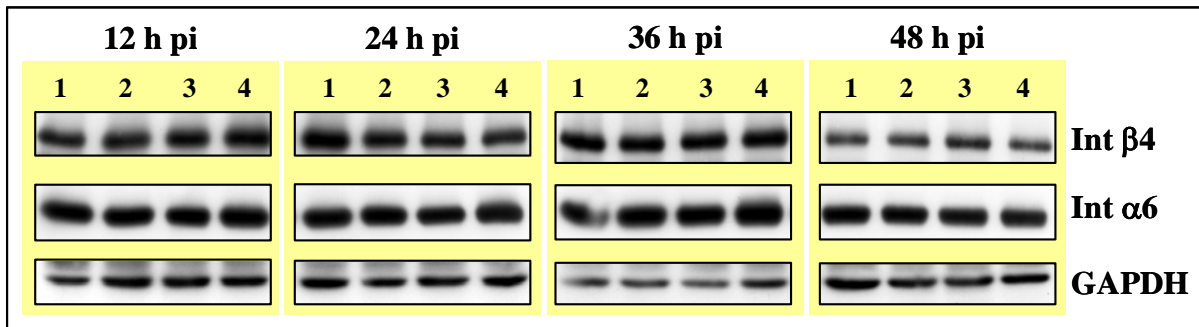


Abbildung 19: Quantifizierung der Integrin $\alpha 6$ -Proteinsynthese in HaCaT₆, 12, 24, 36 und 48 h nach Infektion. 1 = HaCaT₆, 2 = β -Gal infizierte HaCaT₆, 3 = PKC δ infizierte HaCaT₆, 4 = Integrin $\alpha 6$ infizierte HaCaT₆. Expressions- und Ladungskontrolle mittels Bestimmung der GAPDH-Expression. GAPDH, 30 kDa; Int $\alpha 6$, 150 kDa; Int $\beta 4$, 205 kDa.

Um zu klären, ob der Vektor funktionsfähig oder dies ein zellspezifisches Phänomen war, wurden zusätzlich NHK sowie die Helferzell-Linie HEK 293, die kein Integrin $\alpha 6 \beta 4$ exprimiert, mit dem Integrin $\alpha 6$ -Vektor infiziert. In beiden Zelltypen wurde, wie in Abbildung 20 gezeigt, exogenes Integrin $\alpha 6$ deutlich exprimiert.

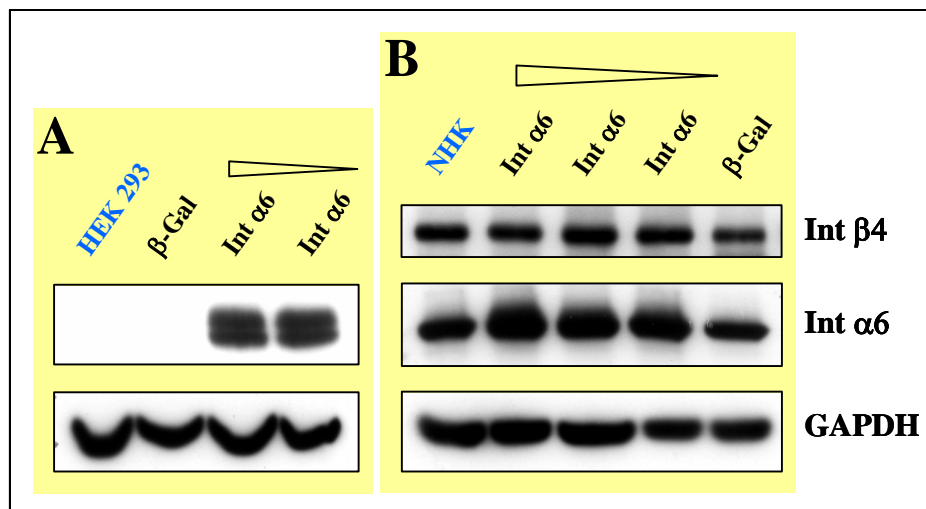


Abbildung 20: Quantität der Proteinexpression in HEK 293 (A) und NHK (B) nach Infektion mit Int $\alpha 6$ Ad. Vergleich mit nicht infizierten und β -Gal infizierten Zellen. GAPDH 30 kDa, Int $\alpha 6$ 150 kDa, Int $\beta 4$ 205 kDa.

HEK 293 exprimierten offensichtlich in gleicher Menge zwei verschiedene Spliceformen von Integrin $\alpha 6$ (Abbildung 20A), die auch in der Literatur beschrieben sind (Delwel et al. 1995). Die Expression von Integrin $\alpha 6$ in NHK war jedoch nur mäßig erhöht im Vergleich zur Stärke der Überexpression nach Infektion mit PKC α und PKC δ Ad. Aber auch hier blieb trotz leichten Anstiegs des Integrin $\alpha 6$ das Niveau der $\beta 4$ -Kette unverändert (Abbildung 20B).

4.4.4 Resultierende, optimale Adenovirus-Konzentration

Mit Hilfe der im Western Blot bestimmten Proteinüberproduktion in Abhängigkeit der verwendeten Viruskonzentration konnte nun die optimale Virusverdünnung festgelegt werden. Der in Kapitel 4.2 bestimmte Virustiter der Stocklösungen, der zwischen $11,57$ und $28,88 \cdot 10^9$ infektiösen Partikeln pro ml (ifu/ml) lag, wurde in der Kalkulation berücksichtigt. Die für alle Folgeexperimente verwendeten Konzentrationen lagen somit zwischen $0,58 \cdot 10^9$ ifu/ml für PKC δ Ad und $1,31 \cdot 10^9$ ifu/ml für PKC α Ad.

Tabelle 16: Verwendete Adenovirus-Konzentrationen

Adenovirus	Konzentration Stocklösung (ifu/ml)	optimale Verdünnung	eingesetzte Konzentration (ifu/ml)
β -Gal	$11,57 \cdot 10^9$	1:10	$1,16 \cdot 10^9$
PKC α	$13,06 \cdot 10^9$	1:10	$1,31 \cdot 10^9$
PKC δ	$28,88 \cdot 10^9$	1:50	$0,58 \cdot 10^9$
Int $\alpha 6$	$23,72 \cdot 10^9$	1:25	$0,95 \cdot 10^9$

4.5 BESTIMMUNG DER mRNA-EXPRESSION

Um zu überprüfen, ob trotz des fehlenden Anstiegs an Integrin $\alpha 6$ -Protein in HaCaT $_6$ zumindest die Integrin $\alpha 6$ -mRNA nach adenoviraler Infektion erhöht war, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Nach Optimierung der Primerbedingungen wurde 3, 6, 12, 18 und 24 Stunden nach Infektion die Integrin $\alpha 6$ -mRNA in unbehandelten (1), β -Gal (2), PKC δ (3) und Integrin $\alpha 6$ (4) infizierten HaCaT $_6$ -Zellen bestimmt.

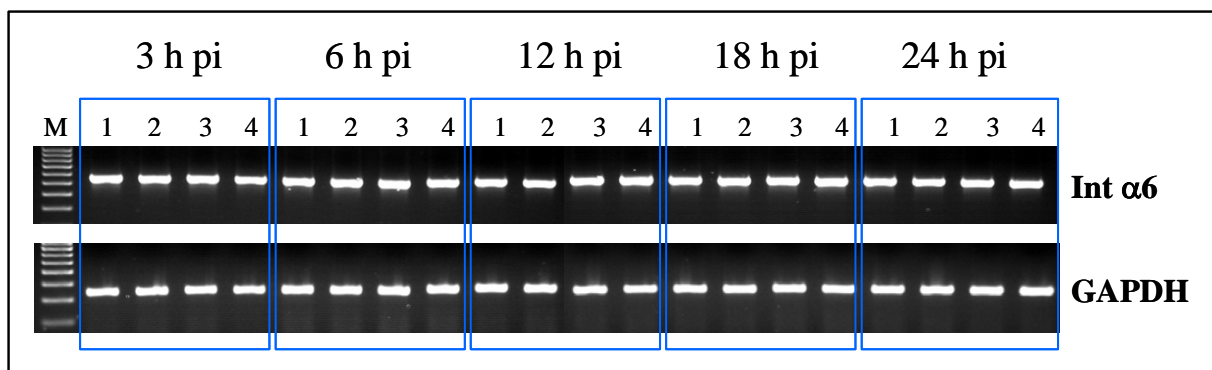


Abbildung 21: Integrin $\alpha 6$ -mRNA-Expression in infizierten HaCaT-Zellen und Kontrollen 3, 6, 12, 18 und 24 h nach Infektion. 1=HaCaT $_6$, 2= β -Gal infizierte HaCaT $_6$, 3=PKC δ infizierte HaCaT $_6$, 4=Integrin $\alpha 6$ infizierte HaCaT $_6$, M=Molekulargewichtsstandard, Integrin $\alpha 6$ -mRNA 546 bp, GAPDH-mRNA 240 bp.

Dabei zeigte sich auch für die Integrin $\alpha 6$ -mRNA in infizierten HaCaT₆ zu keinem Zeitpunkt ein erkennbarer Anstieg, das heißt der Level in allen Zellen entsprach zu allen Zeitpunkten der endogenen mRNA.

Das Ausbleiben des erwarteten Anstiegs von Integrin $\alpha 6$ (Kapitel 4.4.3) war somit auf eine fehlende mRNA-Überexpression zurückzuführen und nicht auf posttranskriptionelle Regulation.

4.6 MORPHOLOGIE DER INFIZIERTEN ZELLEN

Ein spezifischer Proteinüberschuss kann zu einer Änderung der Zellmorphologie führen. Dabei spielt nicht nur die Menge des überexprimierten Proteins eine Rolle, sondern auch die Art des Proteins. Auch für die Überexprimierung von PKC-Isoformen in Keratinozyten ist eine solche Änderung der Morphologie beschrieben (Ohba et al. 1998).

Aus diesem Grund wurde die Morphologie der infizierten Zellen 48 h nach Infektion kontrolliert, das heißt zu dem Zeitpunkt, an dem die exogene Proteinexpression am höchsten war. Sowohl bei HaCaT₆, als auch bei NHK konnten zu diesem Zeitpunkt jedoch keine deutlichen Änderungen in der Zellform beobachtet werden (Abbildung 22).

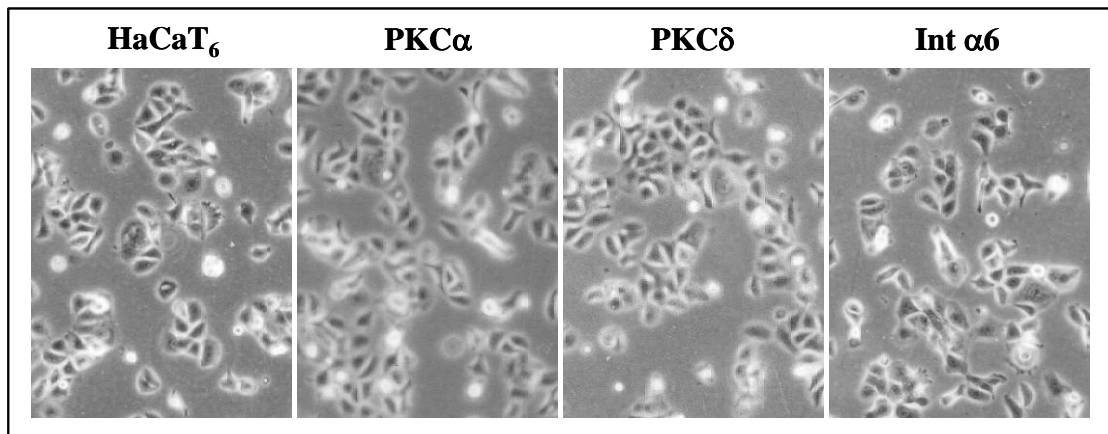


Abbildung 22: Morphologie unbehauelter und infizierter HaCaT₆ 48 h pi. 40fache Vergrößerung.

4.7 BESTIMMUNG DER PROTEIN-SYNTHESE UND -VERTEILUNG MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ

Eine weitere Methode, die Synthese und zusätzlich dazu die genaue Verteilung von Proteinen zu analysieren, ist die indirekte Immunfluoreszenz (IIF). Dazu wurden die infizierten Zellen 24 Stunden nach Infektion auf Objektträger ausgesät, dann für weitere 24 Stunden im Monolayer kultiviert und anschließend analysiert. Die Spezifität der Antikörper war im Vorfeld

abgeklärt worden. Zur besseren Orientierung wurden standardmäßig die Zellkerne mit Hoechst/Bisbenzimid angefärbt.

Bei der Analyse auf Überexpression von PKC α , PKC δ und der Integrin α 6-Kette in der IIF zeigten sich sowohl für HaCaT₆ (Abbildung 23) als auch für NHK (Abbildung 24) die Ergebnisse der Western Blot Analysen bestätigt. Die Überexpression von PKC δ (nicht gezeigt) und PKC α konnte mit Hilfe der Isoform-spezifischen Erstantikörper und einem Fluorochromgekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen werden. So waren die infizierten, exogen überexprimierenden Zellen durch ihre starke Färbung klar von den kaum gefärbten, vermutlich nicht infizierten Zellen klar zu unterscheiden. Auch die im Western Blot und nachfolgend per RT-PCR nachgewiesene, fehlende Überexpression von Integrin α 6 in HaCaT₆ konnte mittels IIF eindeutig bestätigt werden. Die Integrin α 6 Expression und Verteilung in den α 6-Zellen unterschied sich nicht von den übrigen Zellen.

Laminin-5 (LN-5, Laminin α 3 β 3 γ 2), wird als der wichtigste Ligand für Integrin α 6 β 4 von Keratinozyten bereits kurz nach der Aussaat sezerniert. Seine Verteilung wurde mittels Laminin γ 2-spezifischem Antikörper analysiert. Auch hier konnten keine Unterschiede in der Verteilung bei nicht infizierten und infizierten HaCaT₆-Zellen gefunden werden. Desweiteren wurden auch verschiedene Keratine, wie z. B. panKeratin, und weitere Integrine (α 2, α 3, β 1 und β 4) getestet. Zwischen infizierten und nicht infizierten HaCaT₆-Zellen bestanden auch hierbei keine Unterschiede in der Expression und Lokalisation dieser Marker.

Proliferierende Zellen wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ki67 detektiert, einem Proliferationsmarker für Zellen in der Mitose (Traut et al. 2002a; Traut et al. 2002b; Traut et al. 1998). Es zeigte sich, dass sich ein Großteil der HaCaT₆-Zellen 48 Stunden pi in einer replikativen Phase befand und die Infektion und Proteinüberexpression zu diesem Zeitpunkt keinen negativen Einfluss auf die Zellteilung hatten.

Bei der Betrachtung der überexprimierten Proteine in unbehandelten und infizierten NHK zeigte sich, wie schon für HaCaT₆-Zellen beschrieben, eine stärkere Färbung für die PKC α bzw. PKC δ Isoform in den entsprechend infizierten Zellen (Abbildung 24). Dagegen konnte keine Erhöhung des Integrin α 6 Proteins in der IIF nachgewiesen werden, obwohl eine sehr gemäßigte Proteinüberexpression im Western Blot gezeigt worden war. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sehr geringe Expressionsunterschiede mittels IIF nicht nachweisbar sind.

In den folgenden Abbildungen sind einige Marker exemplarisch aufgeführt.

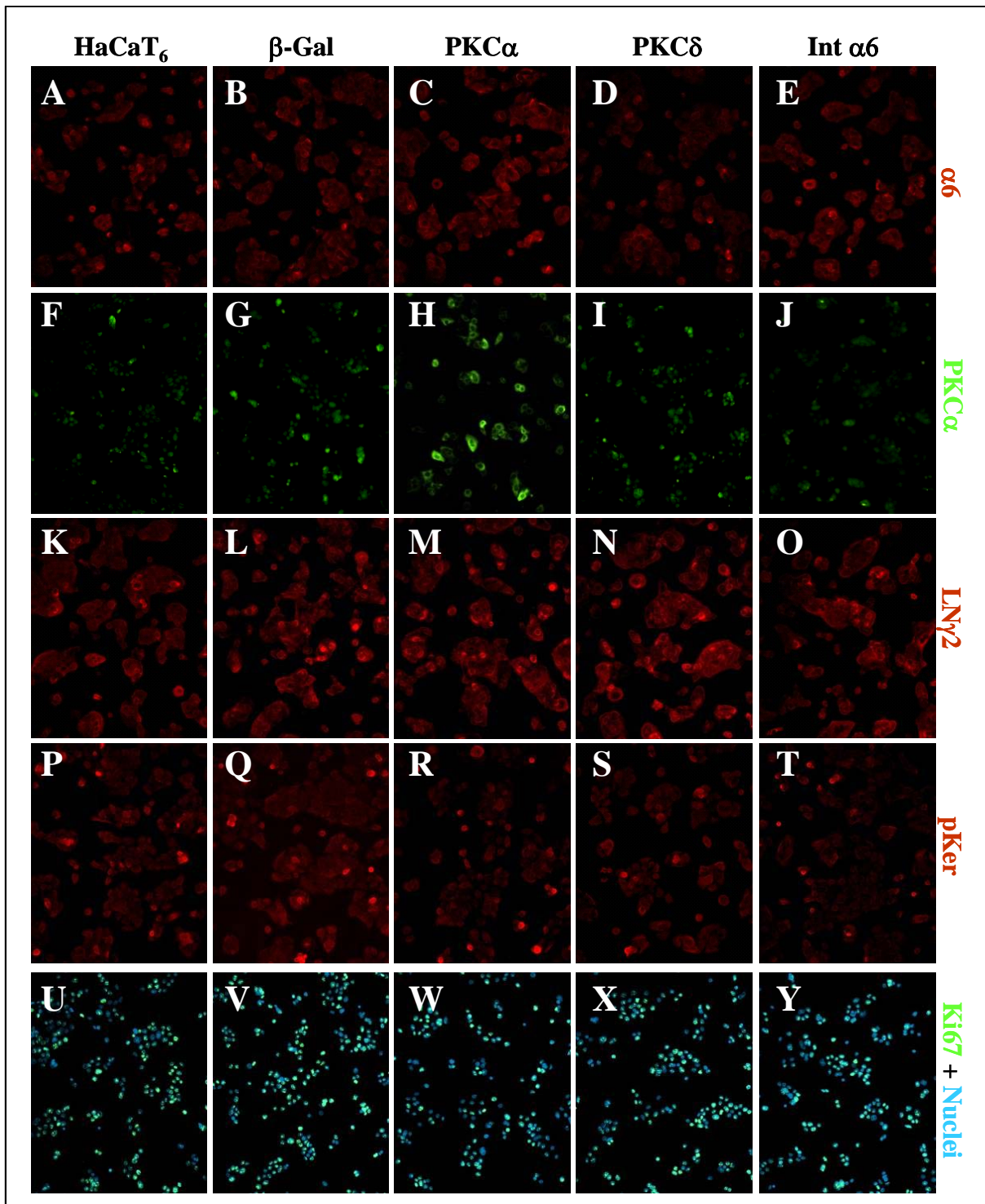


Abbildung 23: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT₆-Zellen, 2d pi. Integrin α6 (A-E), PKCα (F-J), Laminin γ2-Kette (K-O), panKeratin (P-T), Ki67 und Nuclei (U-Y). 20fache Vergrößerung.

Beim Vergleich wurde mit Laminin γ2-spezifischen Antikörpern ersichtlich, dass HaCaT₆ in der gleichen Zeit eine niedrigere Menge an Laminin-5 produzierten als NHK. Dagegen war jedoch die Anzahl an proliferierenden Zellen bei NHK48 h pi sehr viel geringer als bei Ha-

CaT₆-Zellen. Nur vereinzelte Ki67-positive NHK waren sichtbar, während sich ein Großteil der HaCaT₆-Zellen im Zellzyklus befand. Das Wachstumsverhalten wurde im Anschluss anhand einer Wachstumskurve genauer analysiert (Kapitel 4.8).

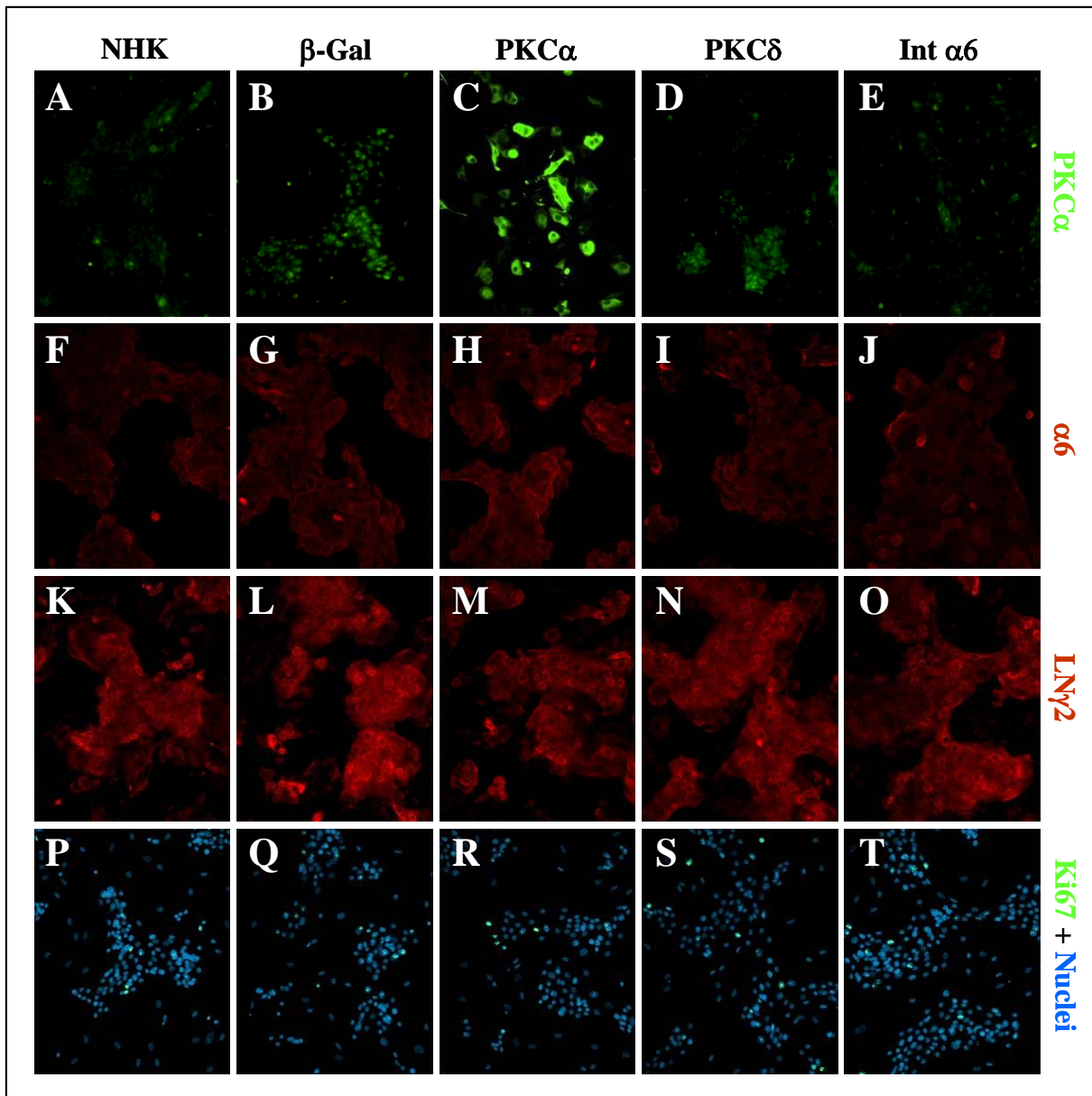


Abbildung 24: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten NHK 2d pi. Färbung auf PKC α (A-E), Integrin α6 (F-J), Laminin γ2-Kette (K-O), Ki67 und Nuclei (P-T). 20fache Vergrößerung.

4.8 WACHSTUMSVERHALTEN

Da prinzipiell die Möglichkeit besteht, dass die Virusinfektion und die veränderte Proteinexpression das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflussen, wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden alle zwei Tage nach Infektion die Zellen in Triplikaten ausgezählt, und zwar insgesamt über einen Zeitraum von 10 Tagen. Die unbehandelten und infizierten HaCaT₆-Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion in einer Dichte von $8 \cdot 10^3$ Zellen ausgesät. NHK

wurden in einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen auf einem Feederlayer von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen kultiviert. Die Zahl der Feeder-Zellen blieb dabei während des Experiments aufgrund ihres postmitotischen Zustands konstant und musste deshalb nicht gesondert berücksichtigt werden.

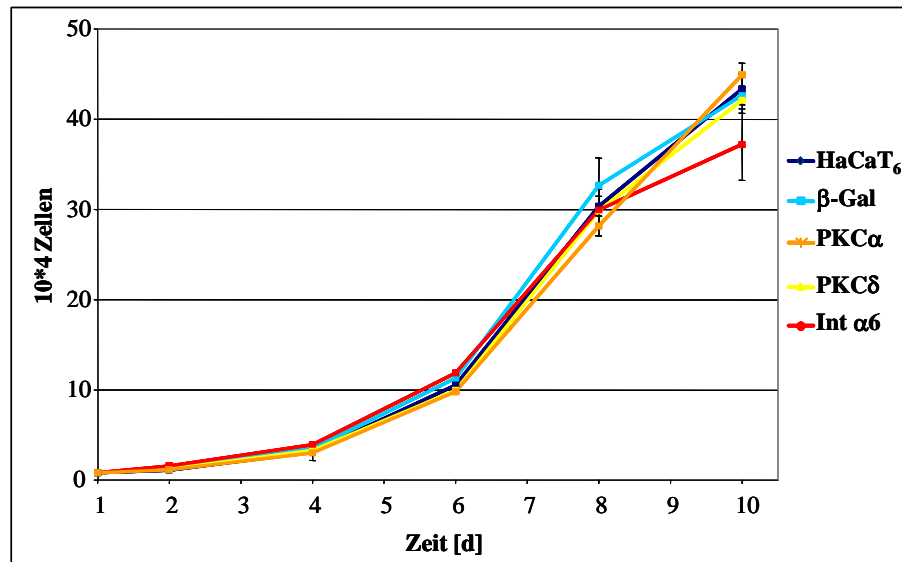


Abbildung 25: Wachstumsverhalten infizierter und Parental-HaCaT₆ über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Infektion.

Wie aus Abbildung 25 ersichtlich ist, wuchsen in den ersten Tagen nach Infektion alle HaCaT₆-Zellen mit einer konstanten Rate. Während die Wachstumskurve der beiden Kontrollen wie auch der PKCα und PKCδ Zellen bis Tag 7/8 einen exponentiellen Verlauf zeigte und dann etwas abflachte, war die Zellzahl in den α6 Kulturen an Tag 9/10 signifikant niedriger.

Die morphologische Analyse am Phasenkontrastmikroskop zeigte einen dramatischen Verlauf im Verhalten der Integrin α6 Zellen. Zu Beginn der Kultivierung wiesen die Zellen eine normale Morphologie auf, etwa ab Tag 7 bis 8 begannen sie aber, sich von der Kulturschale abzulösen und abzusterben (Abbildung 26). Dies dauerte so lange an, bis keine Zellen mehr auf der Platte zu sehen waren.

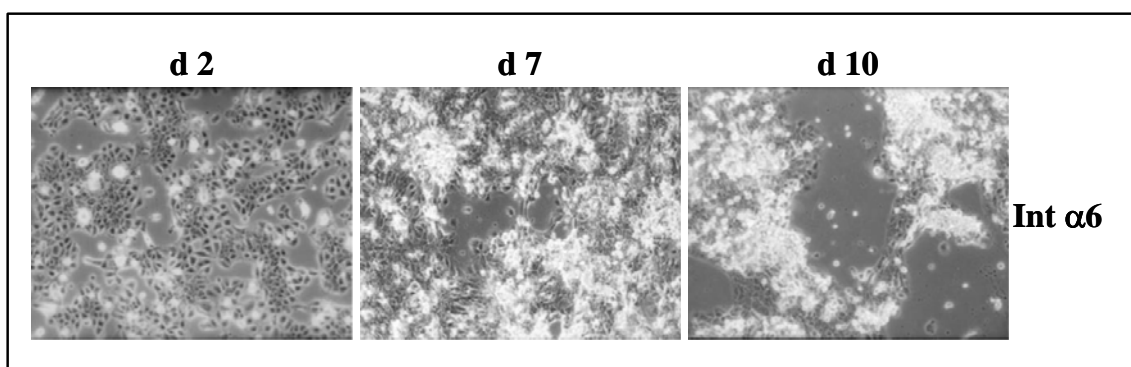


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Ansicht Integrin α6 infizierter HaCaT₆ nach 2, 7 und 10 Tagen. 20fache Vergrößerung.

Bei der Analyse des Wachstumsverhaltens von unbehandelten NHK zeigte sich zu Beginn eine verzögert anlaufende Proliferation verglichen mit nicht infizierten HaCaT₆. Diese ging konform mit den Beobachtungen in der indirekten Immunfluoreszenz (Kapitel 4.7), wo sich sehr viel weniger NHK als HaCaT₆-Zellen im Zellzyklus befanden. So war die exponentielle Wachstumsphase nicht schon nach 4-6 Tagen nach Infektion, sondern verzögert erst gegen Tag 6 bis 8 deutlich erkennbar.

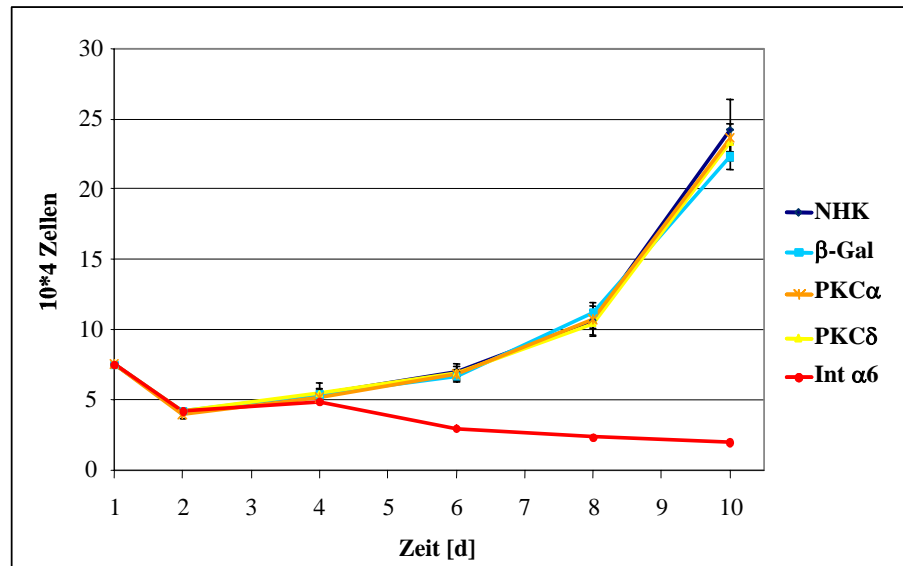


Abbildung 27: Wachstumsverhalten infizierter und Parental-NHK über 10 d nach Infektion.

Darüber hinaus war bei NHK der negative Einfluss der Infektion mit Integrin α 6 auf das Wachstum der Zellen noch drastischer. Die Zellen gingen kaum in die Proliferationsphase über und die Zellzahl nahm bereits etwa ab Tag 4 kontinuierlich ab. Die Unterschiede zu den anderen transgenen NHK wurde frühzeitig im Phasenkontrast deutlich, und gegen Ende der Versuchsdauer konnten nur noch lebende Feeder-Zellen auf der Platte beobachtet werden (Abbildung 28).

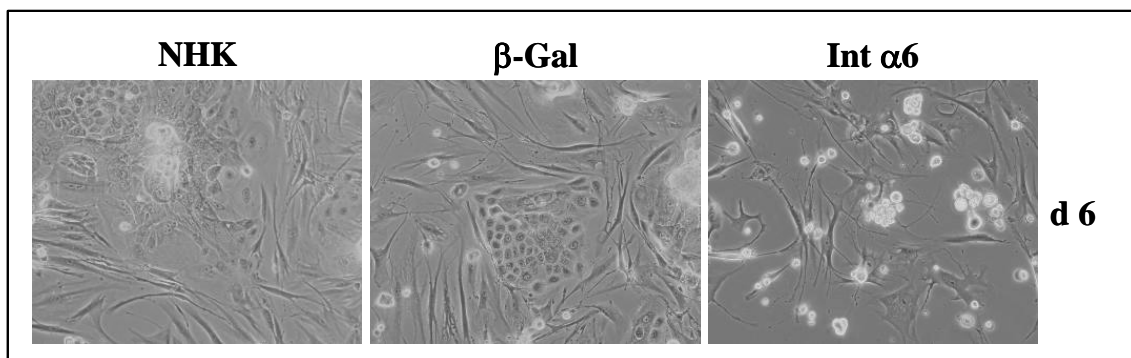


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Ansicht von Kontroll- und Integrin α 6 infizierten NHK auf Feeder-layer, 6 d nach Infektion. 40fache Vergrößerung.

Der negative Einfluss auf das normale Wachstumsverhalten, der sowohl bei HaCaT₆ als auch bei NHK beobachtet wurde und deshalb kein Zelltyp-spezifischer Effekt sein konnte, trat bei jedem Infektionsexperiment reproduzierbar auf, so dass ein Artefakt ausgeschlossen werden konnte. Dieser Effekt war unabhängig von der eingesetzten adenoviralen Konzentration, und war wegen des späten Auftretens mehrere Tage nach Infektion offenbar nicht auf einen direkten cytopathischen Effekt der Adenoviren zurückzuführen. Auch die Kultivierung der Integrin $\alpha 6$ infizierten Zellen auf einer extrazellulären Matrix (Kollagen I), auf der die Zellen besser adhäreren konnten, oder unterschiedliche Zelldichten bei der Aussaat waren nicht in der Lage, die Überlebensrate der Zellen zu verbessern, was mehrfach in unabhängigen Experimenten bestätigt wurde.

4.9 MIGRATIONSTESTS

Da Integrine einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen haben, wurde die migratorische Aktivität der Zellen getestet. Zusätzlich dazu gab es Hinweise in der Literatur, dass eine Inhibition von PKC δ die Migration humaner Keratinozyten blockiert (Li et al. 2002).

Es wurden zwei verschiedene Migrationsassays etabliert. Während im ersten Assay lediglich qualitative Unterschiede in der migratorischen Aktivität der Zellen dokumentiert werden konnten, ermöglichte der zweite Assay die genaue Quantifizierung der Migrationsdistanz. Wichtig war bei beiden Ansätzen, dass die Kulturen in der konfluenten Phase getestet wurden. Wegen der transienten Überexpression mit einem Maximum 48 Stunden pi wurden daher die Zellen direkt in den 6-Well-Platten infiziert, in denen die Migration analysiert werden sollte, wodurch eine erneute Trypsinierung vermieden wurde. Die Zellen erreichten dadurch bereits einen Tag pi ihre vollständige Konfluenz. So konnten die Migrationsassays bereits 2 Tage pi, das heißt am Höhepunkt der exogenen Proteinsynthese, durchgeführt werden. Dass die Zellen während der ersten 2-3 Tage pi keine Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten zeigten, war bereits anhand der Wachstumskurven (Kapitel 4.8) bestätigt worden. Somit erreichten alle Kulturen gleichzeitig die Postkonfluenz. Dadurch war gesichert, dass hierbei ausschließlich Migrationseffekte beobachtet wurden, unbeeinflusst von der Zell-Proliferation. Die Bestimmung erfolgte für beide Assays jeweils in Triplikaten.

Im ersten Assay wurde in den geschlossenen Zellrasen 2 Tage pi mit Hilfe einer Plastikspitze eine Schneise gekratzt. Die Zell-freie Zone war zum Zeitpunkt 0, der dem Zeitpunkt 48 Stunden pi entsprach, in Kontroll- und infizierten Zellen vergleichbar und gerade so breit, dass die Zellfronten rechts und links davon im Phasenkontrastmikroskop sichtbar waren. Das

Migrationsverhalten wurde nach weiteren 24 Stunden analysiert, entsprechend dem Zeitpunkt 72 Stunden nach Infektion.

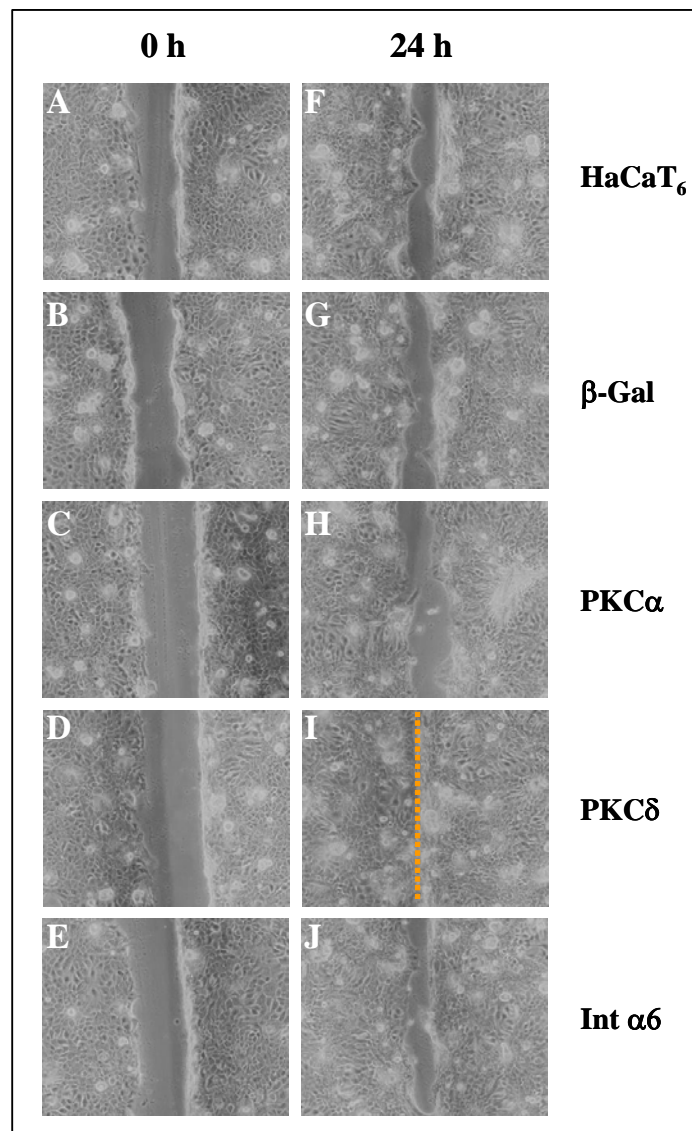


Abbildung 29: Migrationsassay I nach 0 und 24 h für HaCaT₆ (A, F), β -Gal (B, G), PKC α (C, H), PKC δ (D, I) und Integrin $\alpha 6$ infizierte HaCaT₆ (E, J). 20fache Vergrößerung.

Während diese „Wunde“ in den PKC δ Zellen nach 24 h bereits komplett geschlossen war (I, gestrichelte, orange-farbene Linie), waren bei den anderen infizierten Zellen (H, J) und den Kontrollen (F, G) die Migrationsfronten noch deutlich sichtbar und in vergleichbarer Position. Daraus konnte geschlossen werden, dass die migratorische Aktivität der HaCaT₆-Zellen spezifisch durch die PKC δ -Überexpression stimuliert wurde.

Um nun diese erhöhte migratorische Aktivität der PKC δ -Zellen zu quantifizieren, wurde der zweite Migrationsassay durchgeführt. Dazu wurde von dem vollständig geschlossenen Zellrasen 2 Tage pi eine breitere Fläche abgeschabt. Zur Orientierung wurde der Rand der Zellfront

und drei dazu senkrechte Linien an der Plastikunterseite markiert. Die Zellfront wurde an den gekennzeichneten Stellen zum Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden photographiert. Auf den Photos konnte die Migrationsdistanz der Zellen innerhalb 24 Stunden direkt vermessen werden.

Während HaCaT₆ und β -Gal Zellen innerhalb von 24 Stunden eine ähnliche Distanz zurück legten, war die Migration in den PKC δ überexprimierenden HaCaT₆-Zellen, entsprechend Migrationsassay I, deutlich stimuliert (Abbildung 30). Die PKC δ -Zellen wanderten in der gleichen Zeit mehr als doppelt so weit wie die übrigen Zellen (HaCaT₆, β -Gal, PKC α und Integrin α 6), deren Migrationsdistanz vergleichbar war.

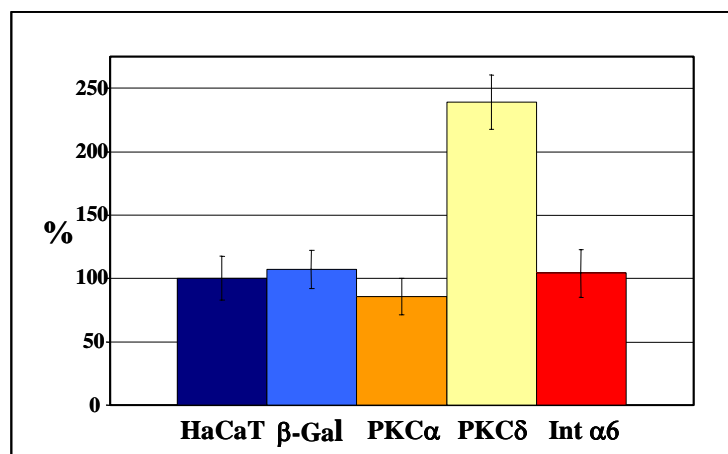


Abbildung 30: Migrationsdistanz in Migrationsassay II nach 24 h für HaCaT₆, β -Gal, PKC α , PKC δ und Integrin α 6 infizierte HaCaT₆.

4.10 ADHÄSIONSTEST

Um den Einfluss der überexprimierten Proteine auf die adhäsiven Eigenschaften von NHK und HaCaT zu testen, wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt, in dem Laminin-5, Kollagen I, Kollagen IV und Fibronectin als Matrices getestet wurden. Während Kollagen I, Kollagen IV und Fibronectin kommerziell erhältlich waren, wurde die Rattenzell-Linie 804 G für die Produktion von Laminin-5 verwendet. Diese Zellen synthetisieren eine große Menge an Laminin-5, das größten Teils ins Medium sezerniert wird. So wurde der Medienüberstand dieser Zellen nach 24 Stunden analog zu den Verdünnungen der käuflichen Matrices bei der Beschichtung der Plastikwells verwendet. Allerdings war die Konzentration des darin enthaltenen Laminin-5 nicht bekannt. Desweiteren wurden serumfreie Medien im Assay verwendet, um mögliche Effekte von im Serum enthaltenen adhäsiven Komponenten wie Fibronectin und Vitronectin auszuschließen, was die Resultate verfälschen würde. Ein möglicher Stress für die Zellen we-

gen Proteinmangels wurde durch Zusatz von BSA, das in der Zirkulation wichtige Transportfunktionen hat, abgemildert.

Zunächst wurde die Morphologie der Kontroll-HaCaT₆ und der unbehandelten NHK nach 60 min auf Plastik, BSA oder auf der entsprechenden Matrix im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Dies zeigte klare Unterschiede in der Form der Zellen auf Plastik mit und ohne BSA, wo sie noch kugelig und abgerundet vorlagen, und auf den jeweiligen Matrizes, auf denen die Zellen bereits nach 60 min eine flache, ausgebreitete Form aufwiesen. Darüber hinaus wurde jedoch die Zellform wesentlich von der jeweiligen verwendeten Matrix beeinflusst. Während die Zellen auf Fibronectin ein rundes Erscheinungsbild zeigten, waren sie auf Kollagen und Laminin-5 länglich bis spindelförmig (Abbildung 31).

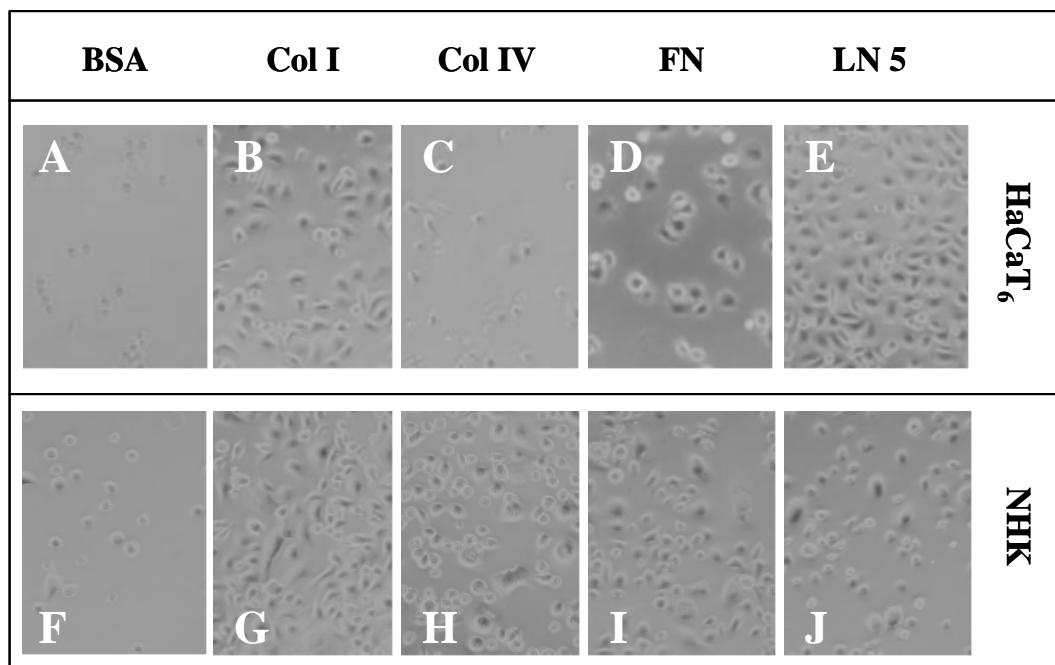


Abbildung 31: Zellmorphologie von Kontroll-HaCaT₆ (A-E) und -NHK (F-J) nach 60 min auf verschiedenen Matrizes (BSA, Kollagen I und IV, Fibronectin und Laminin 5). 40fache Vergrößerung.

Die fotografische Erfassung war jedoch wenig zur Zell-Quantifizierung geeignet, da die Zellen nicht gleichmäßig über die gesamte Fläche des Wells verteilt waren. Wegen der Matrixbeschichtung kam weiterhin eine Quantifizierung mittels Bestimmung des Gesamtproteins, ein häufig genutztes Verfahren, nicht in Frage. Als alternative Möglichkeit, die Zellzahl über das komplette Well zu bestimmen und somit einen repräsentativen Wert zu erhalten, diente die DNA-Fluoreszenzmarkierung der adhären Zellen mittels spezifischem Farbstoff und die Vermessung der daraus resultierenden Fluoreszenzintensität. Während auch diese Methode naturgemäß keine absoluten Zellzahlen liefern konnte, erlaubte sie jedoch eine präzise Bestimmung relativer Werte.

Zuerst wurde die Adhäsion auf Plastik und BSA getestet, d.h. ohne die Verwendung einer Matrix. Die Adhäsion auf BSA war vermindert, verglichen mit unbehandeltem Plastik, was bedeutet, dass die unspezifische Bindung der Zellen erfolgreich blockiert wurde. Der erhaltene Wert für die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zellen auf BSA wurde im Anschluss von der Fluoreszenzintensität der Zellen auf den Matrizes subtrahiert, um den eigentlichen Matrix-spezifischen Wert zu erhalten. Bei der Testung der Matrizes ergab sich, dass die Anzahl adhärenter Zellen auf LN-5 am höchsten war, niedriger auf FN und Col I und am niedrigsten auf Col IV, was auf eine Matrix-spezifische Adhäsion hinweist. Jedoch entgegen der Erwartung war das Verhalten der verschiedenen infizierten Zellen auf allen Matrizes vergleichbar, das heißt es war keine erhöhte Adhäsion eines bestimmten Zelltyps auf irgendeiner Matrix erkennbar. Die überexprimierten Proteine zeigten somit keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen auf unterschiedlichen Matrizes, dies galt sowohl für NHK (Abbildung 32) als auch für HaCaT₆ (Abbildung 33). Dies schließt allerdings nicht aus, dass in Langzeittests Unterschiede im Adhäsionsverhalten auftreten können, was nach den Migrationsstudien zu erwarten wäre.

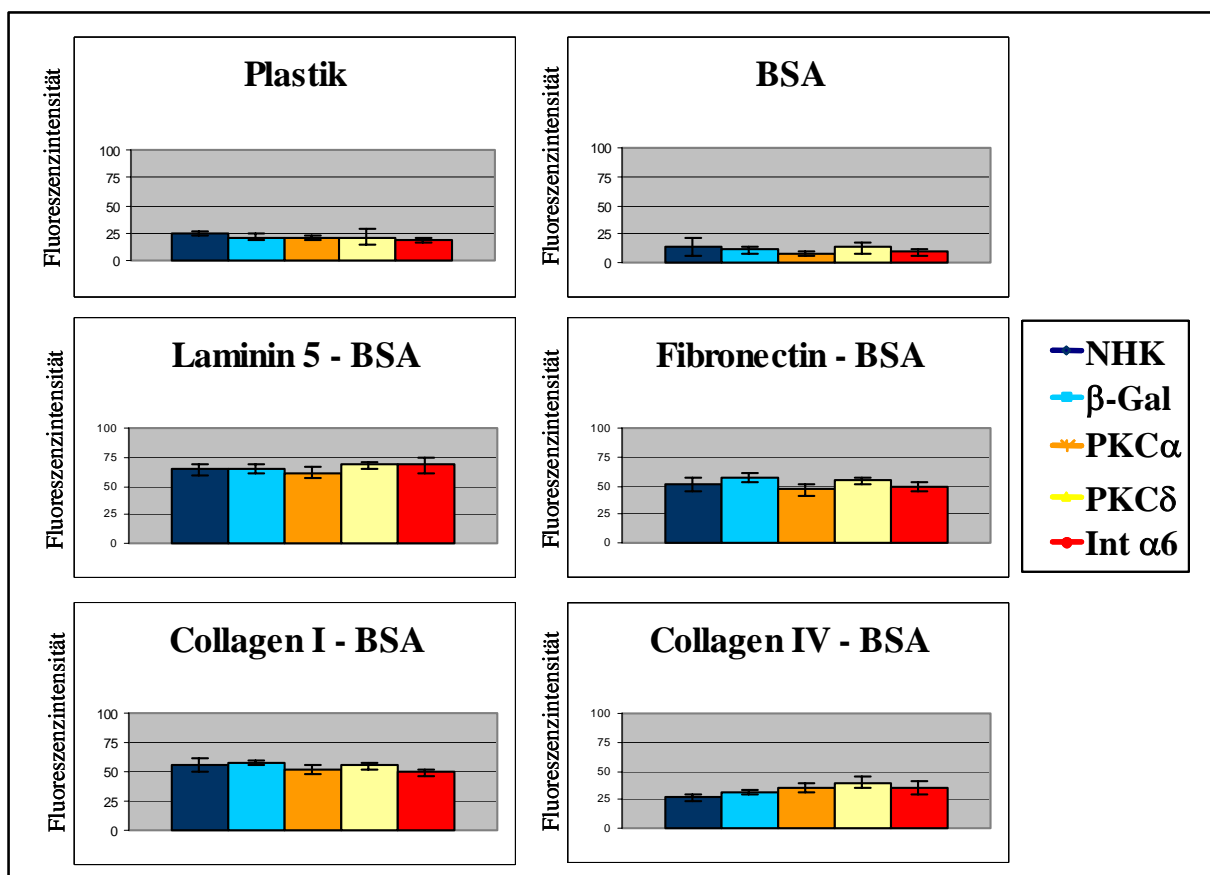


Abbildung 32: Adhäsionsassay für Kontroll- und infizierte NHK auf Plastik, BSA, Laminin-5, Fibronectin, Kollagen I und IV.

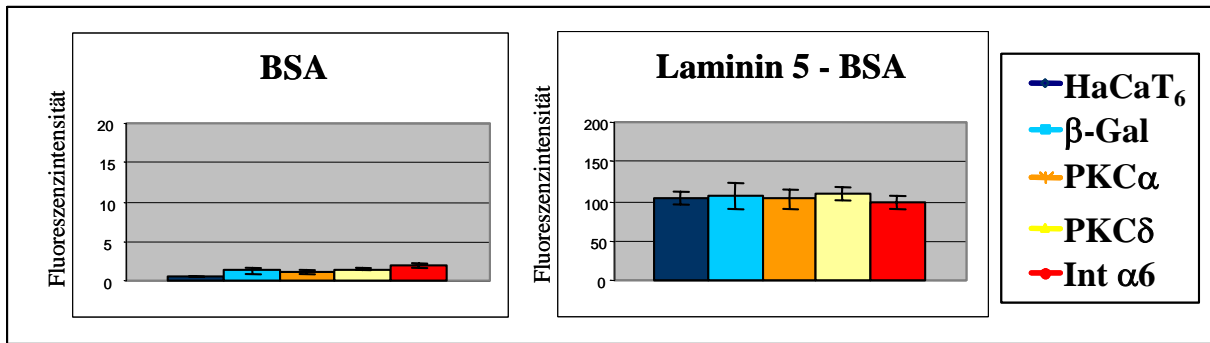


Abbildung 33: Adhäsionsassay für Kontroll- und infizierte HaCaT₆, exemplarisch gezeigt für Plastik und Laminin-5.

4.11 STRATIFIZIERUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSFÄHIGKEIT DER INFIZIERTEN ZELLEN IN OTKS

4.11.1 Histologie

Um den Einfluss der überexprimierten Proteine auf die Stratifizierungsfähigkeit in der organotypischen Kokultur (OTK) zu analysieren, wurden Paraffinschnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt. Wie bereits beschrieben (Kapitel 1), bildet die humane Keratinozyten-Linie HaCaT ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, dessen Aufbau überwiegend dem der normalen Epidermis entspricht. Dies erfolgt jedoch im Vergleich zu normalen Keratinozyten verzögert, das heißt während in OTKs von NHK dieser Prozess bereits nach einer Woche abgeschlossen ist, entwickeln HaCaT-Zellen erst nach 2-3 Wochen ein vergleichbares Epithel. Zudem generieren HaCaT-Zellen unter den Kulturbedingungen in der OTK im Vergleich zu normalen Keratinozyten ein Epithel mit einem parakeratotischen *Stratum corneum* aus, d.h. die terminale Differenzierung erfolgt nur unvollständig. Charakteristisch hierfür ist das Fehlen von Übergangszellen mit Keratohyalin-Granula (Corneozyten) und das Verbleiben von Kernresten in den Hornschichten. HaCaT₆ als gut differenzierender HaCaT-Subklon zeigt zwar ebenfalls diese aberrante Differenzierung, jedoch ist die Epithelbildung im Vergleich zu Standard-HaCaT-Zellen generell beschleunigt und erfolgt innerhalb der ersten 2 Wochen.

Die hier beschriebenen Experimente mit OTK entsprachen diesen Vorgaben. Nach 5 Tagen hatten die beiden Kontrollzell-Linien (HaCaT₆, HaCaT₆-β-Gal) auf dem Kollagengel ein dünnes, 1-2 schichtiges Epithel entwickelt (Abbildung 34). Im Gegensatz dazu waren bereits zu diesem Zeitpunkt sämtliche Integrin α6 infizierten HaCaT₆-Zellen abgestorben und es konnten nur noch Zelltrümmer auf dem verbliebenen Kollagengel identifiziert werden. Dagegen zeigten OTKs von PKCα und PKCδ infizierten HaCaT₆-Zellen schon nach dieser kurzen Kulturdauer ein mehrschichtiges, etwa doppelt so dickes Epithel im Vergleich zu den Kontrollen.

Auch die Basalzellschicht war besser strukturiert und bereits an Tag 5 war eine regelmäßige, Pallisaden-artige Anordnung der Zellen erkennbar. Nach 11 Tagen hatten auch die Kontrollzellen ein reguläres, stratifiziertes Epithel mit allen charakteristischen Zellschichten gebildet. Allerdings war das *Stratum corneum* nach wie vor parakeratotisch, als Anzeichen für eine unvollständige terminale Differenzierung. In den PKC α und PKC δ Kulturen waren die parakeratotischen Veränderungen deutlich vermindert (Abbildung 35). Zu diesem wie zu allen anderen Zeitpunkten zeigten sie eine größere Anzahl von Zellschichten und damit verbunden ein dickeres Epithel. Das *Stratum corneum* war dabei etwa doppelt so dick wie in den Kontrollen. Dies war in den PKC δ -Kulturen besonders ausgeprägt, was bedeuten könnte, dass beide PKC Isoformen die Stratifizierung fördern, PKC δ aber zusätzlich die Keratinisierung stimuliert. beobachten, das verdickte Epithel in den PKC α -Kulturen war nicht ganz so stark ausgeprägt.

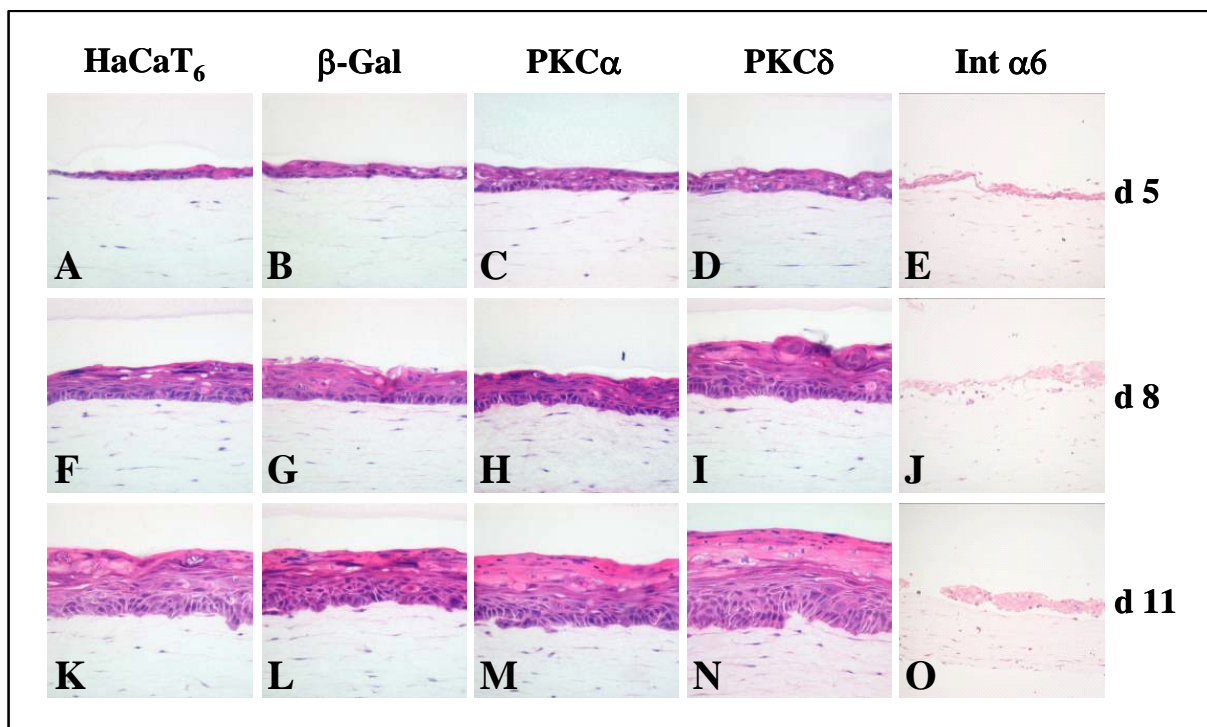


Abbildung 34: Histologie von OTK mit infizierten und Parental-HaCaT₆. Kulturen an d 5, 8 und 11. HaCaT₆ (A, F, K), β -Gal (B, G, L), PKC α (C, H, M), PKC δ (D, I, N) und Int α 6 infiziert (E, J, O). 20fache Vergrößerung.

Zusammenfassend machten diese Ergebnisse deutlich, dass die bei HaCaT₆ beobachteten Defekte in Epithelentwicklung und Differenzierung in den PKC α - und mehr noch in den PKC δ -Kulturen erheblich kompensiert wurden.

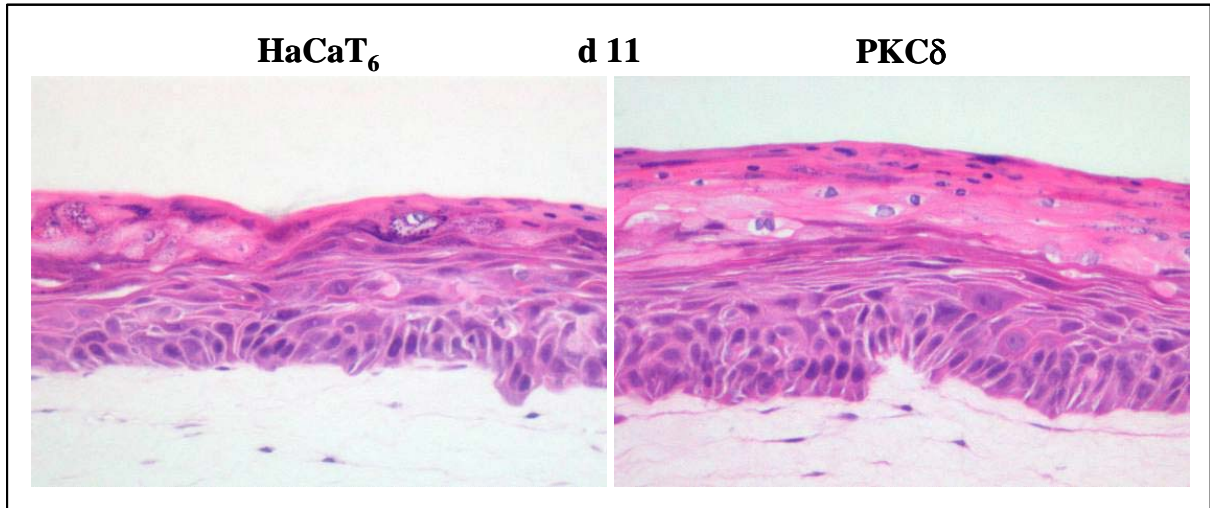


Abbildung 35: Histologie der OTK mit Parental-HaCaT₆ und PKC δ infizierten Zellen an d 11. Abgeschwächte Parakeratose und normalisierte Epithelbildung in PKC δ -Kulturen. 20fache Vergrößerung.

Nachdem die adenoviralen Konstrukte deutliche Effekte in organotypischen Kokulturen von HaCaT₆-Zellen gezeigt hatten, stellte sich die Frage, ob OTKs von NHK mit entsprechenden Veränderungen reagieren. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, zeigen NHK im Gegensatz zu HaCaT in OTK keinen Differenzierungs-Defekt gegenüber normaler Epidermis und die Epithelbildung verläuft im Vergleich zu HaCaT beschleunigt.

So war bereits an Tag 5 der Kultur in den NHK-Kontrollen ein mehrschichtiges Epithel zu beobachten (Abbildung 36). Im weiteren Zeitverlauf von Tag 5 bis Tag 11 war jedoch keine erhöhte Anzahl an Zellschichten erkennbar, vielmehr stieg der Differenzierungsgrad in den oberen sich ablösenden Schichten an.

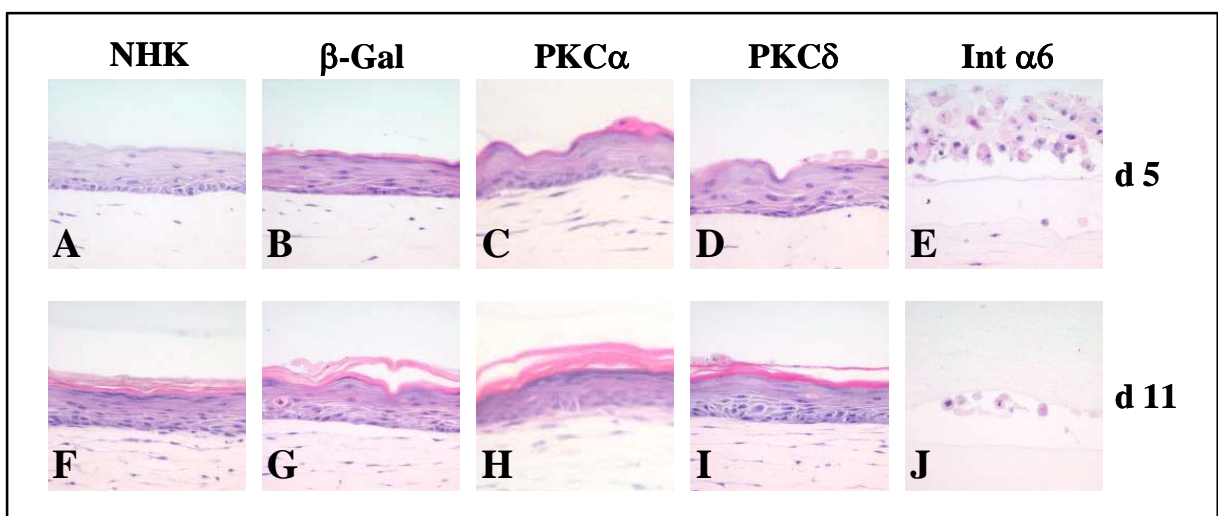


Abbildung 36: Histologie von OTK mit infizierten und Parental-NHK. Kulturen an d 5 und 11. NHK (A, F), β -Gal (B, G), PKC α (C, H), PKC δ (D, I) und Integrin $\alpha 6$ infiziert (E, J). 20fache Vergrößerung

Im Gegensatz zu HaCaT₆ organotypischen Kokulturen hatten bei NHK die PKC Isoformen keinen stimulierenden Einfluss auf Epithelwachstum und Stratifizierung. Dies ist ein weiterer

Hinweis darauf, dass die Überexpression der PKC-Isoformen die HaCaT-spezifischen Differenzierungs-Defekte zum Teil ausgleicht, die in NHK nicht vorliegen und andererseits die Balance dieser Isoformen regulatorische Konsequenzen hat. Der Effekt der $\alpha 6$ Integrin-Überexpression war wiederum ähnlich dramatisch wie in HaCaT₆ OTKs.

4.11.2 Expression von Basalmembrankomponenten und Differenzierungsmarkern in Kontroll-, PKC α - und PKC δ -OTK

Um die Differenzierungsfähigkeit der Zellen und den Differenzierungsgrad in der OTK an verschiedenen Zeitpunkten zu überprüfen, wurde die Expression bzw. Verteilung der Basalmembrankomponenten sowie früher und später Differenzierungsmarker mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die Evaluierung des Systems und die Kontrolle der Spezifität einiger Antikörper erfolgte an Humanhaut im Vergleich zu HaCaT₆-OTK (Daten nicht gezeigt). Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne standardmäßig mit Hoechst gefärbt. Nachfolgend wurden die Kulturen nicht infizierter mit infizierten HaCaT₆-Zellen verglichen. Um den Differenzierungsgrad der Kulturen beurteilen zu können, wurden neben den Komponenten der Basalmembranzone auch frühe und späte Differenzierungsmarker getestet. Die Integrin $\alpha 6$ Kulturen zeigten in ersten Tests sehr unspezifische Reaktionen und wurden aufgrund der hohen Absterberate nicht weiter analysiert.

Zur Analyse der Basalmembran-Zone wurden Antikörper gegen die Integrin $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Kette, Laminin-5 (mittels Antikörper gegen die $\gamma 2$ -Kette), LN-10 und CIV eingesetzt. Dabei zeigten die Kulturen aller HaCaT₆-Zellen ein reguläres Expressionsmuster vergleichbar zu Haut. Die Verteilung war überwiegend linear unterhalb der Basalzellschicht bzw. innerhalb der Grenzzone zwischen dermalem und epidermalem Äquivalent, was in Abbildung 37 exemplarisch für Integrin $\alpha 6$ und in Abbildung 39 für Laminin-5 gezeigt ist.

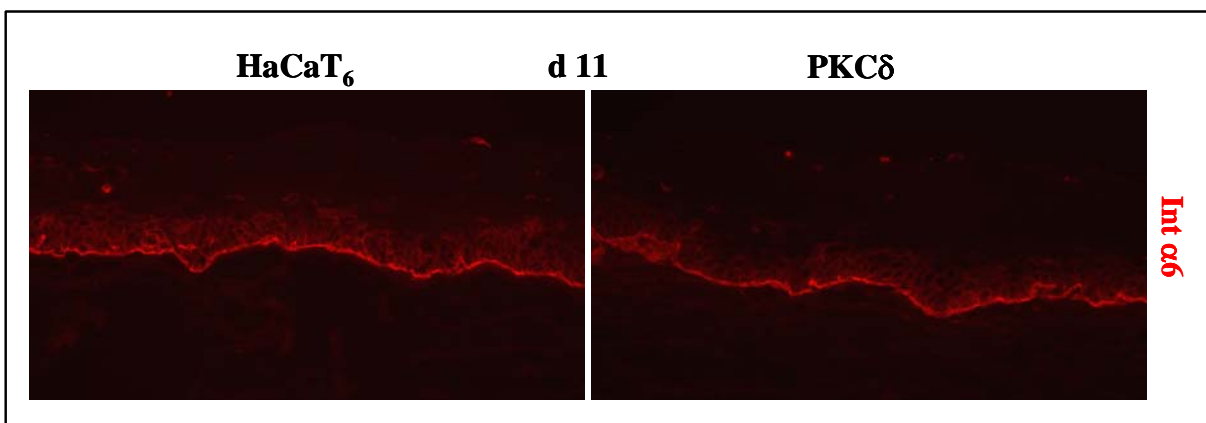


Abbildung 37: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT in OTK, d 11. Nachweis von Integrin $\alpha 6$ exemplarisch in HaCaT₆- und PKC δ -OTKs. 20fache Vergrößerung

Abweichend von $\alpha 6\beta 4$ waren die weiteren Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ weitgehend perizellulär in der Basalzellschicht angeordnet. Erwartungsgemäß färbten generelle Keratin-Antikörper das gesamte Epithel, wogegen die frühen Differenzierungsmarker, wie Keratin 1/10 und Involucrin regulär in *Stratum spinosum* und *granulosum* exprimiert wurden, unbeeinflusst von der Zell-Behandlung.

Die Proliferationsaktivität der Zellen in der Basalzellschicht wurde, wie bereits in Kapitel 4.7 beschrieben, mittels Ki67-Antikörper bestimmt. Trotz des in den PKC α und PKC δ Kulturen beobachteten dickeren Epithels war die Anzahl der positiv gefärbten und sich damit im Zellzyklus befindenden Zellen in allen Kulturen zu jedem getesteten Zeitpunkt (Tag 5, 8 und 11) vergleichbar. Somit dürfte der stärkere Zellzuwachs bei PKC-Überexpression auf einer beschleunigten Wachstumskinetik oder einer geänderten Apoptoserate basieren.

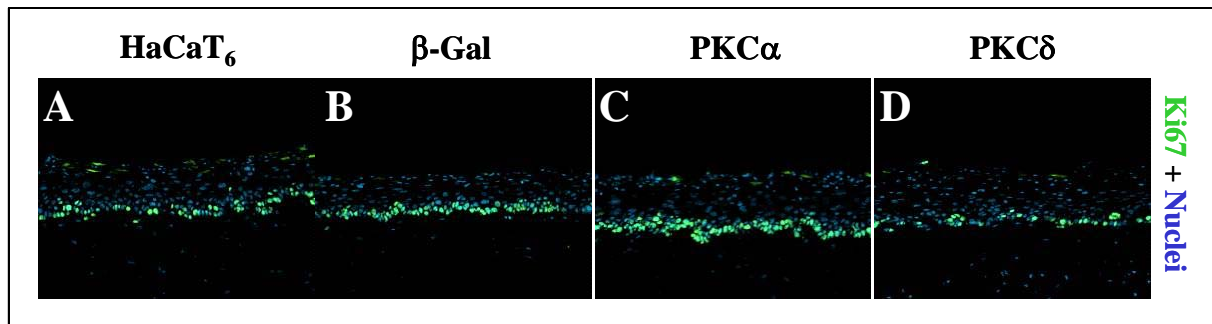


Abbildung 38: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT in OTK, d 11. Färbung auf Ki67 und Nuclei. 20fache Vergrößerung.

Desweiteren wurden späte Differenzierungsmarker getestet, wie Transglutaminase I, Filaggrin und Loricrin, die normalerweise in den obersten Zellschichten des *Stratum granulosum* und teilweise auch in den Schichten des *Stratum corneum* exprimiert werden. Für Filaggrin und Loricrin waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Kulturen erkennbar. Dagegen war die Expression und Verteilung von Transglutaminase I bei PKC α bzw. PKC δ Kulturen im Vergleich zu den OTK der Kontrollzellen leicht verschieden. Während an Tag 11 in den Kontrollen Transglutaminase I in allen oberen Schichten bis hin zum *Stratum corneum* zu finden war, war die Reaktion in den PKC-OTKs vor allem auf das *Stratum granulosum* beschränkt und im *Stratum corneum* nur noch schwach ausgeprägt. Ein solches Expressionsmuster zeigt sich in Kontroll-Kulturen der nicht infizierten HaCaT₆-Zellen erst nach einer Normalisierung des Epithels nach etwa 2-3 Wochen. Auch dies spricht wiederum dafür, dass die Überexpression der PKC-Isoformen α und δ dem Differenzierungsdefizit der HaCaT-Zellen in den ersten beiden Wochen der Kultur entgegenwirkt.

Die Fluoreszenz-Analysen werden im Folgenden exemplarisch aufgeführt.

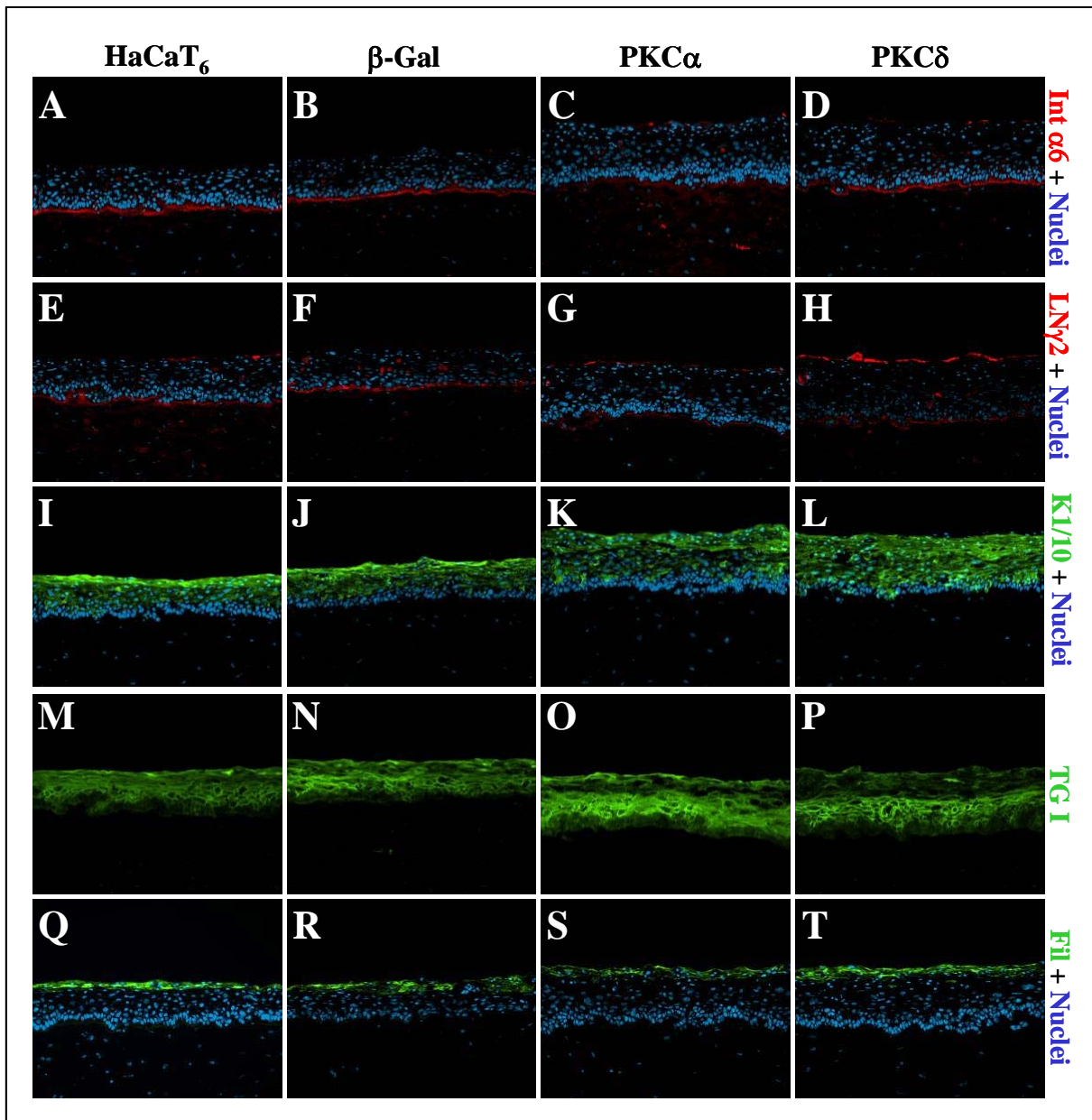


Abbildung 39: Immunfluoreszenz von Parental- und infizierten HaCaT in OTK, d 11. Färbung auf Integrin $\alpha 6$ und Nuclei (A-D), Laminin $\gamma 2$ -Kette und Nuclei (E-H), Keratin 1/10 und Nuclei (I-L), Transglutaminase I (M-P), Filaggrin und Nuclei (Q-T). 20fache Vergrößerung.

Entsprechend zur Ansicht der Histologie ist auch bei der Fluoreszenz-Färbung der PKC α - und PKC δ -Zellen eine deutliche Zunahme des Epithelwachstums im Vergleich zu den Kontrollkulturen erkennbar.

4.11.3 Nachweis der Transgen-exprimierenden Zellen in OTKs

Trotz offensichtlicher Unterschiede in der Histologie waren keine gravierenden Unterschiede in der Expression von Basalmembrankomponenten und Differenzierungsmarkern zu finden.

Nicht zuletzt aus diesem Grund sollte die Frage nach Verbleib und Lokalisation der Ad-infizierten Zellen in den verschiedenen Schichten der OTK nachgegangen werden.

Am eindeutigsten war der Nachweis der β -Gal positiven Zellen im Epithel der β -Gal Kulturen anhand der entsprechenden Enzym-katalysierten Färbung. Dabei wurde das gleiche Färbeprotokoll wie für Zellen im Monolayer verwendet. Die Verteilung der infizierten, blau gefärbten Zellen wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Abbildung 40 zeigt Aufnahmen der jeweils gleichen Ausschnitte in Phasenkontrast und zusätzlich im Hellfeld. Die Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahme diente der Lokalisation des Epithels einschließlich der Basalmembran, während die Blaufärbung der β -Gal positiven Zellen aufgrund des stärkeren Kontrasts besser im Hellfeld beurteilt werden konnte.

Am Tag 5 der Kultur, wo erst wenige Zellschichten erkennbar waren, befanden sich noch mehrere β -Gal infizierte Zellen in oder nahe der Basalzellschicht. Im weiteren Zeitverlauf waren offensichtlich alle β -Gal positiven Zellen in die oberen Epithelschichten gewandert und damit für die terminale Differenzierung programmiert. Bereits an Tag 11 waren positive Zellen nur noch im *Stratum corneum* sichtbar, was die Kontinuität dieses Prozesses belegte.

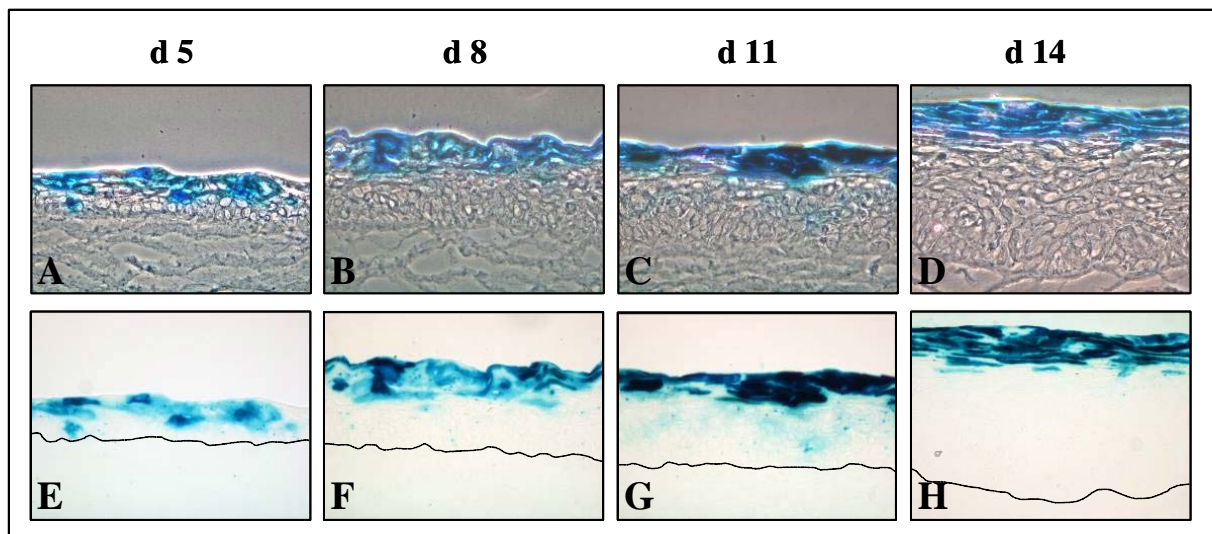


Abbildung 40: β -Galaktosidase Färbung von OTKs β -Gal infizierter HaCaT₆-Zellen an d 5, 8, 11 und 14. Aufgenommen mit Phase (A-D) und im Hellfeld (E-H). Basalmembran ist dargestellt durch gestrichelte Linie. 20fache Vergrößerung.

Um die Verteilung der PKC α und PKC δ positiven Zellen in den OTKs zu bestimmen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit PKC-Isoform-spezifischen Antikörpern für PKC α and PKC δ durchgeführt. Während an Tag 11 in den PKC α -OTKs viele positive Zellen in para- und suprabasalen Schichten sichtbar wurden, konnten nur sehr wenige PKC δ überexprimierende Zellen in den PKC δ -OTKs detektiert werden. Diese Beobachtungen ließen darauf

schließen, dass die Zellen mit adenoviral bedingter Überexpression aufgrund ihrer Lokalisation zumindest keinen direkten Einfluss auf die Proteinexpression und Struktur in den basalen und parabasalen Schichten haben konnten. Sie müssten nahe der BM lokalisiert sein, um mit anderen Proteinen interagieren zu können.

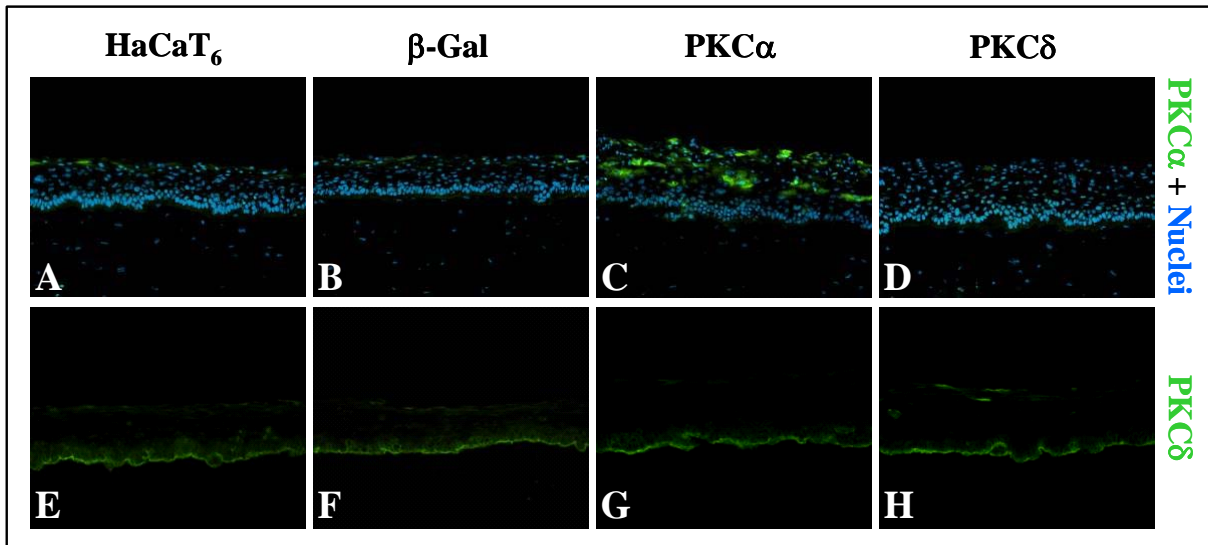


Abbildung 41: Immunfluoreszenz von OTKs von Parental- und infizierten HaCaT₆-Zellen an d 11, Nachweis von PKC α und Nuclei (A-D) sowie PKC δ (E-H). 20fache Vergrößerung.

Im Endeffekt bedeutet dies, dass alle infizierten, positiven Zellen eine bevorzugte Tendenz zur terminalen Differenzierung zeigten. Wieweit die Infektion an sich oder nur die Überexpression eine Rolle spielt, kann aus diesen Experimenten allerdings nicht geschlossen werden. Jedenfalls unterschied sich die Rate der terminal differenzierten, positiven Zellen in den jeweiligen Kulturen voneinander. Auch differierte die Verteilung der β -Gal, PKC α und PKC δ überexprimierenden Zellen beträchtlich in den verschiedenen Schichten. Während an Tag 11 sehr viele PKC α positive Zellen auch noch in parabasalen Schichten zu sehen waren, befanden sich β -Gal positive Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits hauptsächlich in den suprabasalen Schichten, vor allem im *Stratum corneum*, während von PKC δ positiven Zellen insgesamt nur noch wenige sichtbar waren. Demzufolge muss das jeweilige überexprimierte Protein einen entscheidenden Einfluss darauf haben, wie schnell die betreffenden Zellen den Differenzierungsprozess durchlaufen. Die terminalen Differenzierungsvorgänge werden somit durch die Überexpression offensichtlich direkt beeinflusst.

5 DISKUSSION

5.1 PROTEINÜBEREXPRESSION MITTELS VERWENDUNG ADENOVIRALER KONSTRUKTE

Mittels üblicher Transfektionsmethoden, wie z. B. der Lipofektion, ist es nicht möglich, Zellen zu transfizieren, die in einem postmitotischen Zustand sind oder nur noch wenige Zellteilungen durchlaufen, wie beispielsweise Primärzellen. Daher konnten normale humane Keratinozyten (NHK) nach herkömmlichen Methoden nicht bei Transfektionsversuchen verwendet werden. Bisher mussten deshalb immortalisierte Keratinozyten, wie z. B. die humane Keratinozyten-Linie HaCaT, als Ersatz für NHK in Transfektionsexperimenten eingesetzt werden. Dabei ergaben sich jedoch auch Schwierigkeiten bei der Transfektion von HaCaT-Zellen. Die Transfektionseffizienz war generell sehr gering und es konnte oft nur eine schwache Proteinüberexpression erreicht werden.

Die Verwendung viraler Vektoren für den Gentransfer findet seit einigen Jahren sowohl in der Biologie als auch in der Medizin breite Anwendung. Es wurden verschiedene Virustypen, wie z. B. Retroviren und Adenoviren, modifiziert, um sie im Gentransfer einzusetzen. Jedes der Vektorsysteme hat einzigartige Vorteile und Grenzen, weshalb sie für unterschiedliche Applikationen genutzt werden. Die Anwendung retroviraler Konstrukte für den Gentransfer in NHK ist dadurch ausgeschlossen, dass sie nur mitotisch aktiven Zellen transduzieren können. Dagegen werden adenovirale Vektoren aufgrund ihrer Fähigkeit, mitotisch aktive als auch ruhende und ausdifferenzierte Zellen *in vivo* und *in vitro* effektiv zu transduzieren, auch für den Gentransfer in Primärzellen und schwierig zu transfizierenden Zellen angewendet. Sie eignen sich wegen ihrer hohen Infektionseffizienz auch für die Transduktion von HaCaT-Zellen. Adenovirale Vektoren finden weitere Anwendung in der Gentherapie (Mittereder et al. 1996; Robbins & Ghivizzani 1998), wo sie 1993 erstmalig zur Behandlung der Cystischen Fibrose eingesetzt wurden (Zabner 1993). Adenovirale Vektoren haben den Vorteil, dass sie nicht in das Wirtsgenom integriert werden und somit keine Inserierung in die Transkriptionsregionen des Genoms vorliegt, was per se bereits ein Mutations-Ereignis darstellt. Die beobachteten Effekte sollten also ausschließlich auf das Vektor-Konstrukt selbst und nicht in irgendeinem Aspekt auf die Integration in das Genom zurückzuführen sein.

Die in diesem Projekt verwendeten adenoviralen Konstrukte wurden nach der Methode von Saito (Miyake et al. 1996) hergestellt. Zum einen ist diese Methode dafür geeignet, hohe Virustiter herzustellen, zum anderen werden die Enden des Virusgenoms nach erfolgter Infektion beim Transport in den Zellkern vor der direkten Restriktion durch Zellnucleasen mit den terminalen Protein-Komplexen (TPC) geschützt, was die hohe Infektionseffizienz ausmacht.

Zudem bewirkt der in den Konstrukten verwendete CAG-Promotor aus Cytomegalovirus-Immediate-Early-Enhancer, Huhn- β -Actin-Promotor und Kaninchen- β -Globin-Polyadenylierungssignal eine starke Expression des Zielgens.

Zu Beginn dieses Projekts wurde daher getestet, ob die Verwendung adenoviraler Konstrukte eine geeignete Methode ist, um Proteine auch in HaCaT sowie in normalen Keratinozyten überzuexprimieren. Bei beiden Zelltypen, die mit einer Effizienz von bis zu 90 % infiziert werden konnten, zeigte sich nach adenoviraler Infektion eine hohe Proteinüberexpression für β -Galaktosidase, PKC α und PKC δ , die sich annähernd proportional zur verwendeten Virusmenge verhielt. Diese starke Expression wurde sowohl durch den Schutz des Virusgenoms durch TPC als auch durch den starken CAG-Promotor verursacht. Sowohl die hohe verwendete Viruskonzentration von bis zu $1,31 \cdot 10^9$ infektiösen Partikeln pro ml und die dadurch verursachte, hohe Proteinsynthese fügten den Zellen keine Schäden zu, wie aus der unveränderten Morphologie und im Mikroskop beobachteten Mitosen geschlossen werden konnte. Die Proteinüberexpression mittels dieser adenoviralen Konstrukte erwies sich aufgrund der Infektionseffizienz, der exogenen Proteinmenge und der guten Reproduzierbarkeit als optimale Methode für HaCaT und NHK. Nach Abklärung des biologischen Restrisikos aufgrund der Infektiösität der Adenoviren wurde diese Methode im Projekt weiterhin eingesetzt.

Die Protein-Expression mittels adenoviraler Konstrukte ist lediglich transient, da die episomal vorliegenden Vektoren bei der Zellteilung aufgeteilt oder nur an eine Tochterzelle weitergegeben werden. Es musste somit zunächst geklärt werden, ob die Dauer der Proteinüberproduktion ausreichend ist, um den Effekt der betreffenden Proteine in kurzfristigen (bis zu 4 Tage) und auch in längerfristigen (bis zu 14 Tagen) Experimenten zu untersuchen. Es zeigte sich, dass eine gewisse Überexpression auch noch 2 Wochen nach Infektion nachweisbar war, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, was bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt nur noch wenige Zellen der Population das Protein überexprimierten. Drei Wochen nach Infektion waren die endogenen Proteinmengen wieder erreicht. Trotz des transienten Charakters der adenoviralen Infektion eignete sich diese Methode daher auch für längerfristige Experimente wie die organotypische Kokultur.

Bei der Analyse der Integrin $\alpha 6$ -Überexpression in HaCaT ergab sich jedoch ein überraschendes Ergebnis. Der erwartete hohe Anstieg von Integrin $\alpha 6$ blieb aus, statt dessen konnten nur Proteinmengen detektiert werden, die unabhängig von der Viruskonzentration mit den Kontrollen vergleichbar waren. Diese fehlende $\alpha 6$ -Überexpression wurde sowohl auf Protein-

Ebene mittels Western Blotting und indirekter Immunfluoreszenz als auch auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen. Das Ausbleiben der Proteinüberproduktion (Kapitel 4.4.3) war somit auf eine fehlende mRNA-Überexpression zurückzuführen und nicht auf posttranskriptionelle Regulation. Die Integrin $\alpha 6$ Synthese und Verteilung in den $\alpha 6$ -Zellen unterschied sich zu keinem Zeitpunkt von der in den übrigen Zellen, was bedeutet, dass die adenovirale Infektion nicht in der Lage war, die Integrin $\alpha 6$ Expression in HaCaT zu erhöhen. Die detektierten Level in allen Zellen entsprachen der endogen gebildeten mRNA. Die fehlende $\alpha 6$ -Überexpression hängt aber, wie durch die Versuche mit den β -Gal und PKC Adenoviren deutlich demonstriert war, nicht am adenoviralen System selbst. Denn wie schon erwähnt wurde mit all diesen Konstrukten eine hohe Überexpression erzielt. Es wurde mehrfach bewiesen, dass das eigentliche System der adenoviralen Überexpression gut funktioniert („Proof of Principle“). Zusätzlich dazu wurde auch die Integrität des Inserts vom Ursprungslabor der Viren überprüft und für korrekt befunden, diese Fehlerquelle konnte aber auch aufgrund erfolgreicher Integrin $\alpha 6$ -Expression in anderen Zellen ausgeschlossen werden.

Nicht zuletzt um zu klären, ob die fehlende Überexpression ein zellspezifisches Phänomen war, wurden zusätzlich NHK und die Helferzell-Linie HEK 293, die kein Integrin $\alpha 6\beta 4$ exprimiert, mit dem Integrin $\alpha 6$ -Vektor infiziert. Dabei zeigte sich, dass in beiden unterschiedlichen Zelltypen die erwartete Überexpression detektiert werden konnte, in NHK jedoch nur relativ schwach ausgeprägt im Vergleich zur starken PKC-Überexpression mit PKC-Vektoren in HaCaT und NHK. Parallel wurden im Ursprungslabor der Viren in Israel normale Maus-Keratinocyten mit der identischen Integrin $\alpha 6$ -Virus-Charge infiziert, was ebenfalls einen Anstieg der Integrin $\alpha 6$ -Proteinlevel zur Folge hatte. Die fehlende Integrin $\alpha 6$ -Expression war somit in der Tat ein zellspezifisches Phänomen und ausschließlich auf die HaCaT-Zellen zurückzuführen. Dabei muss beachtet werden, dass es sich bei der Keratinocyten-Linie HaCaT nicht um normale Primärzellen handelt. HaCaT zeigen zwar viele morphologische und biochemische Merkmale normaler Epidermiszellen. Jedoch weisen sie, wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, genetische Mutationen auf, die teils auch als Ursache für ihre Immortalisierung angesehen werden. Die funktionelle Inaktivierung des p53-Gens sowie die erhöhte Kultivierungstemperatur führten zu einer gesteigerten Rate nicht-reparierter DNA-Schäden und chromosomaler Aberrationen, wofür das Auftreten und die Persistenz charakteristischer Markerchromosomen in HaCaT spricht (Lehman et al. 1993). So verhalten sie sich teilweise wie transformierte, „prämaligne“ Zellen, da sie unter klonalen Bedingungen und in semi-soliden Substraten wachsen (Hülsen 1990). Ihr Verhalten weist somit Unterschiede zu

dem normaler Primärzellen auf, was die fehlende Integrin $\alpha 6$ Überexpression zumindest plausibel macht. Es besteht auch zusätzlich die Möglichkeit, dass HaCaT aufgrund ihres teilweise autonomen Charakters auf die adenovirale Infektion mit einer direkten Reduktion ihrer endogenen Integrin $\alpha 6$ Synthese reagieren. Die beobachtete Bruttosynthese, die vergleichbar mit den Proteinmengen in den Kontrollen war, würde somit aus der endogenen Synthese der Zellen und der zusätzlichen exogenen, adenoviral verursachten Proteinexpression resultieren.

5.2 EINFLUSS DER PROTEINE AUF DAS VERHALTEN DER INFIZIERTEN ZELLEN IN ZWEI-DIMENSIONALEN KULTUREN

Im weiteren sollte geklärt werden, welchen Einfluss die überexprimierten Proteine in der konventionellen zwei-dimensionalen Kultur auf die Morphologie, Migration und Adhäsion der infizierten Zellen haben.

5.2.1 Wachstum der Zellen nach Infektion

Da die Virusinfektion und die veränderte Proteinexpression das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflusst haben könnten, wurden in einem Zeitraum von 10 Tagen nach Infektion Wachstumskurven erstellt. Dabei zeigte sich, dass sich 48 Stunden pi fast alle HaCaT₆-Zellen im Zellzyklus befanden, was konform ging mit den Beobachtungen in der indirekten Immunfluoreszenz. Daraus ließ sich erneut schließen, dass die Infektion und Proteinüberexpression zu Beginn keinen negativen Einfluss auf die Zellteilung hatten. Die exponentielle Wachstumsphase von Kontroll-HaCaT₆ wurde bereits 4-6 Tage pi detektiert. Dagegen zeigte sich bei NHK ein langsamerer Start der Proliferation, was neben der Wachstumskurve auch die indirekte Immunfluoreszenz deutlich machte. Sie erreichten eine exponentielle Wachstumsphase erst an Tag 6-7 pi, die andererseits noch gegen Ende der Versuchsdauer anhielt. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten zwischen HaCaT und NHK ist darauf zurückzuführen, dass sich HaCaT-Zellen unter klonalen Bedingungen wie transformierte Zellen verhalten und deshalb eher vereinzelt wachsen verglichen mit Primärzellen. Diese sind nicht in der Lage, unter klonalen Bedingungen zu wachsen und bilden vorzugsweise zunächst kleine Zellinseln, was auch die physiologische Wundreaktion reflektiert.

Jedoch zeigte sich, dass die Integrin $\alpha 6$ -infizierten HaCaT₆-Zellen nach etwa 7-8 Tagen in Kultur eine signifikant niedrigere Zellzahl aufwiesen als die Kontrollen und die PKC-infizierten HaCaT₆-Zellen. Dieser Effekt war in Integrin $\alpha 6$ infizierten NHK sogar verstärkt, da die Zellen kaum in die Proliferationsphase übergingen und bereits etwa ab Tag 4 abstarben.

Die anfänglich reguläre Morphologie der Integrin $\alpha 6$ Zellen veränderte sich während der Versuchsdauer dramatisch. Die Zellen begannen, sich von der Plastikoberfläche abzulösen und starben ab. Dieser Effekt wurde zuerst an den Stellen beobachtet, an denen die Zellen konfluent wurden. Diese Ablösung erfolgte so lange, bis keine Zellen mehr auf der Platte sichtbar waren. Bei NHK konnten gegen Ende der Versuchsdauer nur noch lebende Feeder-Zellen auf der Platte beobachtet werden. Die Reaktion der Zellen war unabhängig von der eingesetzten adenoviralen Konzentration, und konnte wegen des späten Auftretens mehrere Tage nach Infektion nicht auf einen direkten cytopathischen Effekt der Adenoviren zurückgeführt werden. Auch die Kultivierung der Integrin $\alpha 6$ infizierten Zellen auf einer extrazellulären Matrix (Kollagen I), auf der die Zellen besser adhären konnten, und eine Variation in der anfänglichen Zelldichte waren nicht in der Lage, ein Überleben der Zellen zu ermöglichen, was mehrfach in unabhängigen Experimenten bestätigt wurde. Das beobachtete Absterben der Zellen war kein Zelltyp-spezifischer Effekt, da er nicht nur in HaCaT₆, sondern auch in NHK erfolgte. Dort trat dieses Phänomen sogar früher auf, was möglicherweise auf die hier auftretende leicht verstärkte $\alpha 6$ -Expression zurückgeführt werden kann.

Die im Ursprungslabor der Viren mit Integrin $\alpha 6$ infizierten normalen Maus-Keratinocyten hingegen zeigten zu keinem Zeitpunkt cytopathische Effekte der Infektion. In ihnen wurde ein Anstieg des Integrin $\alpha 6$ -Levels nachgewiesen, der zusätzlich eine Erhöhung von Integrin $\beta 4$ zur Folge hatte (persönliche Mitteilung, A. Alt). Damit wurde in diesen Zellen zusätzlich die $\beta 4$ -Integrin-Untereinheit hochreguliert, die ausschließlich mit der Integrin $\alpha 6$ -Untereinheit assoziiert. Die Bildung funktionsfähiger $\alpha 6\beta 4$ -Dimere wurde mittels Coimmun-Präzipitation verifiziert. In den in dieser Arbeit generierten, Integrin $\alpha 6$ infizierten normalen Human-Keratinocyten zeigte sich jedoch keine Änderung des Integrin $\beta 4$ -Levels trotz des $\alpha 6$ -Anstiegs, was eine gestörte Integrin-Balance in der Zelle impliziert. Da sich die primären, normalen Maus- und Human-Keratinocyten ausschliesslich in ihrer Herkunft unterscheiden, muss der bei NHK fehlende Ausgleich der $\beta 4$ -Level ein Spezies-spezifischer Effekt sein. Die Überexpression von Integrin $\alpha 6$ führt somit nur im humanen System unweigerlich zum Zelltod, was wahrscheinlich auf die Auslösung eines Apoptose-Programms aufgrund des Ungleichgewichts zwischen α - und β -Integrin-Ketten zurückzuführen ist. Von anderen Zellsystemen ist bekannt, dass Störungen in der Zell-Matrix-Interaktion Apoptose auslösen, das heißt zum programmierten Zelltod führen können. Diese Beobachtung ist ferner ein Beweis dafür, dass der direkte Vergleich von Spezies-übergreifenden Daten problematisch sein kann, was

auch auf die Interpretation von Tierversuchsergebnissen und deren Extrapolation auf die Humansituation zutrifft.

Der in dieser Arbeit beschriebene Integrin $\alpha 6$ -Effekt wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Infektion verschiedener HaCaT-Varianten mit retroviralen Vektoren für die Integrin $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Kette bestätigt (Bachelor Thesis, J. Kadathukalam). Dabei zeigte sich, dass auch mit retroviralen Vektoren nur eine bestenfalls schwache Überexpression von Integrin $\alpha 6$ erreicht werden konnte. Diese Zellen zeigten ebenfalls ein vermindertes Wachstum und unter Selektionsdruck eine drastisch geringere Kolonienzahl als Integrin $\beta 4$ infizierte Zellen. Es ist wahrscheinlich, dass unter diesen Bedingungen etwaige stark überexprimierende Zellen infolge Apoptose eliminiert wurden, während wenige Varianten mit ausgeglichener Expression (endogen/exogen) überleben konnten. Im Vergleich dazu hatte die starke Überexpression von Integrin $\beta 4$ keinen negativen Effekt auf die verschiedenen HaCaT-Varianten.

Der nachteiliger Einfluss einer Integrinüberexpression ist auch für die humane Blasenkarzinom-Linie UM-UC-2 beschrieben (Kim et al. 1997). Diese malignen Zellen exprimieren Integrin $\alpha 6$ assoziiert mit Integrin $\beta 1$, jedoch nicht Integrin $\beta 4$, und wurden mit der cDNA für $\beta 4$ Integrin stabil transfiziert. Auch hier wurde, verglichen mit dem Kontrollvektor, nur eine geringe Anzahl von Klonen erhalten. Diese konnten, obwohl die Richtigkeit des Inserts inklusive Selektionsmarker bestätigt war, nicht dauerhaft isoliert werden, da sie unter Selektionsdruck innerhalb kurzer Zeit abstarben. In diesem Fall dürften die gemeinen $\alpha 6\beta 1$ -Dimere essenziell für das Zellüberleben sein, wogegen $\alpha 6$ bevorzugt mit $\beta 4$ Dimere bildet, was das Gleichgewicht zwischen α - und β -Integrin-Untereinheiten gestört haben könnte.

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Balance zwischen den α - und β -Integrinketten ein wichtiger Faktor für das Überleben der Zellen ist. Integrin $\alpha 6\beta 4$ scheint dabei spezifisch eine Sonderrolle bei der Signaltransduktion in Keratinozyten zu spielen und eine wichtige Funktion nicht nur bei der Induktion der Differenzierung sondern auch bei der Auslösung der Apoptose zu haben.

5.2.2 Migrationsverhalten

Da Integrine als klassische Matrix-Rezeptoren einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen haben, wurde dies in konventionellen 2D-Kulturen getestet. Ein deutlicher Hinweis auf den Zusammenhang mit PKC war zudem die Beobachtung, dass die Inhibition von PKC δ die Migration humaner Keratinozyten blockiert (Li et al. 2002).

Während im ersten Assay lediglich ein qualitativer Eindruck der migratorischen Aktivität der Zellen gewonnen wurde, ermöglichte der zweite Assay eine genaue Quantifizierung der Migrationsdistanz. Wie bereits in Migrationsassay I beobachtet, war die Migration in den PKC δ überexprimierenden Zellen stimuliert. Bei der Quantifizierung der erhöhten migratorischen Aktivität der PKC δ -HaCaT₆-Zellen zeigte sich, dass diese in der gleichen Zeit mehr als doppelt so weit wanderten wie die restlichen Zellen. Die Migrationsdistanzen der PKC α Zellen und der Integrin α 6 Zellen waren dagegen vergleichbar mit den Kontrollen.

Die Kollokalisierung von Integrin α 6 β 4 und PKC δ in der Basalzellschicht der OTK, die mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt wurde, spricht für eine wichtige Rolle dieser Kinase in der Basalzellschicht. In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von Integrin α 6 β 4 durch PKC δ die Adhäsion an die Laminin-Matrix reduziert, indem α 6 β 4 vom Hemidesmosom dissoziiert und in das Cytosol internalisiert wird. Dies verursacht eine fortschreitende Destabilisierung des Hemidesmosoms und eine damit verbundene, reduzierte Adhäsion der Zellen, die zu einer verstärkten Migration der Zellen führt (Alt et al. 2001). Die PKC δ infizierten Zellen zeigten demnach eine erhöhte migratorische Aktivität, da bei ihnen die Internalisierung von Integrin α 6 β 4 ins Cytosol verstärkt und die Adhäsion an die darunterliegende Matrix vermindert war. Wahrscheinlich ist dieser Vorgang bei der horizontalen Migration (wie bei der Wund-Epithelialisierung) reversibel und es kommt im Gegensatz zum irreversiblen Differenzierungsprozess zur ständigen Neubildung funktionsfähiger Hemidesmosomen.

5.2.3 Adhäsionsverhalten

Um den Einfluss der überexprimierten Proteine auf die adhäsiven Eigenschaften der Zellen zu testen, wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt, in dem Laminin-5, Kollagen I, Kollagen IV und Fibronectin als Matrices getestet wurden. LN-5 war kommerziell nicht erhältlich, es konnte aber in Form von konditioniertem Medium der Laminin-5 sezernierenden Rattenzell-Linie 804G eingesetzt werden.

Die Zellen zeigten nach einem Verbleib von 60 min auf der jeweiligen Matrix einen klaren Unterschied in ihrer Zellform. Auf Plastik bzw. BSA lagen sie noch kugelig und abgerundet vor, während sie auf den Matrices eine flache, ausgebreitete Form aufwiesen. Dabei war jedoch die Zellform auch direkt abhängig von der jeweiligen verwendeten Matrix, was auf eine matrixspezifische Adhäsion und Zellform hinweist.

Überraschenderweise hatten die überexprimierten Proteine aber keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen auf den unterschiedlichen Matrices. Dieses Ergebnis wurde sowohl für HaCaT₆-Zellen als auch für NHK bestätigt. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass dieses Ergebnis stark von der eigentlichen Versuchsanordnung beeinflusst wird. Aufgrund der langen und notwendigen Behandlung der Zellen mit EDTA und Trypsin, um sie zu vereinzeln, werden Membranmoleküle, wie z.B. Integrine, zum Teil angedaut und funktionell inaktiviert. Die Zellen brauchen mehr als 60 min, um sich davon zu erholen. Aus diesem Grund ist kein Effekt der überexprimierten Proteine festzustellen. Ein direkter Einfluss der Trypsinierung auf Integrine wurde zudem dadurch bestätigt, dass im Western Blot nach Trypsinierung der Zellen keine Bande für Integrin $\alpha 6$ detektiert werden konnte, was auf einen Verdau der Bindungsdomäne des Antikörpers schliessen lässt.

Im Adhäsionsassay wurden serumfreie Medien verwendet, um mögliche Effekte von im Serum enthaltenen, adhäsiven Komponenten wie Fibronectin und Vitronectin auszuschließen. Trotz der damit verbundenen Stress-Situation für die Zellen beginnen sie sehr schnell, ihre eigene Matrix zu produzieren. Wie in der Immunfluoreszenz gezeigt wurde, hatten NHK 24 Stunden nach Aussaat eine fast geschlossene Laminin-5 Schicht gebildet. Eine Kultivierungszeit der Zellen von mehr als 60 min auf den jeweiligen Matrices wäre für den Adhäsionstest einerseits sinnvoll, um eine Wiederherstellung der Matrixmoleküle zu erreichen. Auf der anderen Seite jedoch kann nach längerem Verbleib der Zellen aufgrund ihrer eigenen Matrixproduktion nicht mehr von einem reinen Effekt der zugegebenen Matrix ausgegangen werden.

5.3 EINFLUSS DER PROTEINE AUF DAS VERHALTEN DER INFIZIERTEN ZELLEN IN DREI-DIMENSIONALEN KULTUREN

Die Einflussnahme der überexprimierten Proteine auf die Stratifizierung und Differenzierung im drei-dimensionalen Kokultursystem sollte untersucht werden. Dabei bildet die humane Keratinozyten-Linie HaCaT in organotypischen Kokulturen ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel, dessen Aufbau überwiegend dem der normalen Epidermis entspricht. Die Epithelentwicklung erfolgt jedoch im Vergleich zu normalen Keratinozyten verzögert, da die Proliferationsrate der HaCaT₆-Zellen initial gegenüber der primärer Keratinozyten reduziert ist. Diese verglichen zu konventionellen 2D-Kulturen scheinbar paradoxe Situation unterstreicht die Bedeutung von Mikro-Umgebung, Matrix sowie Zell-Interaktionen. HaCaT-Zellen wachsen auf Kollagengel-Matrix in 3D-Kokulturen wesentlich schlechter als NHK und

sind zudem noch in stärkerem Maß von der Präsenz dermalen Fibroblasten abhängig. Während NHK bereits nach einer Woche ein mehrschichtiges, differenziertes Epithel ausbilden, entwickeln HaCaT-Zellen erst nach 2-3 Wochen ein vergleichbares Epithel. Das bedeutet, dass sich die Epithelqualität von HaCaT erst durch eine verlängerte Kultivierungszeit verbessert. Zudem generieren HaCaT-Zellen unter den Kulturbedingungen in der OTK im Vergleich zu normalen Keratinozyten ein Epithel mit parakeratotischem *Stratum corneum* aus, d.h. die terminale Differenzierung erfolgt nur unvollständig (Baur 1995; Schoop et al. 1999). Diese Defizite in der epidermalen Struktur bleiben allerdings auch bei verlängerter Kultivierungszeit bestehen. Prinzipiell haben allerdings HaCaT-Zellen immer noch das Potential zu einer vollständigen Differenzierung ähnlich NHK. Dies ist offensichtlich beim Vergleich von Transplantaten auf immun-defiziente Nacktmäuse, wo beide Zelltypen Epidermis-ähnliche Epithelien bilden (Breitkreutz et al. 1997; Breitkreutz et al. 1998), was einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Mikro-Umgebung darstellt. Der Mangel, im *in vitro*-Hautäquivalent differenzierte Epithelien auszubilden, wurde auch von anderen Gruppen beobachtet (Syrjanen et al. 1996; Steinstrasser et al. 1997; Boelsma et al. 1999). HaCaT₆ als gut differenzierender HaCaT-Subklon zeigen zwar ebenfalls eine starke Parakeratose, jedoch ist die Epithelbildung in den ersten 2 Wochen im Vergleich zu Standard-HaCaT leicht beschleunigt. Sie verläuft jedoch immer noch langsamer als in NHK, was aus dem bestehenden Differenzierungsdefekt der HaCaT resultiert. Dieser ist offenbar auf eine veränderte bzw. nicht ausreichende Interaktion mit der als Dermisäquivalent eingesetzten, Fibroblasten-haltigen Kollagenmatrix zurückzuführen. Dafür spricht auch die Abschwächung des Differenzierungsdefekts der HaCaT in OTKs durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z. B. Interleukin-1 (Maas-Szabowski et al. 2003).

In OTKs Integrin $\alpha 6$ infizierter HaCaT-Zellen und NHK war zu keinem Zeitpunkt ein intaktes Epithel vorhanden, sodass überwiegend nur Zelltrümmer identifiziert werden konnten. Dies bedeutet, dass die Integrin $\alpha 6$ Zellen nicht nur in der zwei-dimensionalen, sondern auch in der drei-dimensionalen Kultur kurz nach der Infektion absterben, was wahrscheinlich auf die gestörte Integrin-Balance zurückzuführen ist. Die OTKs PKC α und PKC δ infizierter HaCaT zeigten schon nach kurzer Kulturdauer ein etwa doppelt so dickes, mehrschichtiges Epithel mit abgeschwächter Parakeratose und einer besser strukturierten, organisierten Basalzellschicht im Vergleich zu den Kontrollen. Der bei HaCaT beobachtete Differenzierungsdefekt mit verzögerter Epithelentwicklung und Parakeratose war somit in den PKC α - und mehr noch in den PKC δ -Kulturen stark abgeschwächt. PKC α und PKC δ OTKs ähnelten dabei weitge-

hend den Epithelien, die sich in der organotypischen Kokultur mit NHK etablieren. Die Überexpression der beiden PKC-Isoformen schien demnach die bei HaCaT veränderte bzw. nicht ausreichende Interaktion mit Fibroblasten zu verbessern, was letztendlich zu einer normalisierten Differenzierung und Keratose führte. Ein weiterer Grund für die verzögerte Epithelbildung der HaCaT-Zellen ist wahrscheinlich die verlangsamte Besiedlung der Kollagenmatrix. Denn es wurde beobachtet, dass HaCaT zu Beginn der Kultur keine vollständig geschlossene Zellschicht ausbildeten, wie dies bei primären Keratinozyten zu beobachten ist. Zusätzlich dazu gibt es Hinweise, dass HaCaT-Zellen auf der Kollagenmatrix nur eingeschränkt migrieren. Wie bereits erwähnt, zeigen die PKC δ infizierten Zellen eine stark erhöhte Migration in der zwei-dimensionalen Kultur im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese gesteigerte Migration sollte es den Zellen in der drei-dimensionalen Kultur ermöglichen, schon zu Beginn der Kultivierungszeit eine geschlossene Zellschicht zu bilden. Dafür spricht auch, dass die Epithel-Normalisierung in OTKs PKC δ überexprimierender HaCaT₆-Zellen stärker ausgeprägt war als bei PKC α infizierten Zellen, die durch die PKC α Überexpression keine Änderung der Migrationsfähigkeit erfuhren.

Um den Differenzierungsgrad der Kulturen beurteilen zu können, wurden in der indirekten Immunfluoreszenz neben den Komponenten der Basalmembranzone auch frühe und späte Differenzierungsmarker getestet. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede determiniert werden. Lediglich die Expression und Verteilung des späten Differenzierungsmarkers *Transglutaminase I* war bei PKC α bzw. PKC δ Kulturen im Vergleich zu den OTKs der Kontrollzellen leicht verschieden. Das Expressionsmuster an Tag 11 der PKC-Kulturen glich dem eines normalisierten HaCaT-Epithels nach 2-3 Wochen. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Überexpression der PKC-Isoformen α und δ den Differenzierungsdefekt der HaCaT-Zellen, der in den ersten beiden Wochen der Kultur am deutlichsten ist, zumindest teilweise korrigiert.

Trotz offensichtlicher Unterschiede in der Histologie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Basalmembranbestandteilen und Differenzierungsmarkern festgestellt werden. Um die mögliche Einflussnahme der infizierten Zellen auf die Strukturen der Basalschicht zu bestimmen, wurde die Lokalisation und Verteilung der infizierten Zellen in den verschiedenen Schichten der jeweiligen organotypischen Kokulturen analysiert. Dabei konnten nach längerer Kultivierungszeit β -Gal bzw. PKC α und PKC δ überexprimierende Zellen nur noch in para- und suprabasalen Epithelschichten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt auf eine terminale Differenzierung aller infizierten Zellen schließen, wobei

sich die β -Gal, PKC α und PKC δ OTKs darin unterschieden, wie schnell infizierte Zellen in die terminale Differenzierung übergehen. Während sehr viele PKC α positive Zellen auch noch in parabasalen Schichten identifiziert wurden, befanden sich β -Gal positive Zellen hauptsächlich in den suprabasalen Schichten, vor allem im *Stratum corneum*. Zur gleichen Zeit waren nur noch wenige PKC δ überexprimierende Zellen im äußersten *Stratum corneum* sichtbar. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass das jeweilige überexprimierte Protein einen erheblichen Einfluss darauf haben dürfte, wie schnell die betreffende, infizierte Zelle den Differenzierungsprozess durchläuft. Dabei zeigte sich, dass sich die PKC δ überexprimierenden Zellen zu einem frühen Zeitpunkt von der Basalmembran ablösen. Dies bestätigt damit die in Kapitel 5.2.2 bereits beschriebene Rolle von PKC δ bei der Destabilisierung des Hemidesmosoms mittels Phosphorylierung von Integrin $\alpha 6\beta 4$. Die dadurch bewirkte, verminderte Adhäsion der Zellen an die Basalmembran verursacht vorzeitig die Ablösung und Aufwärtsbewegung der PKC δ -Zellen bis zur terminalen Differenzierung, deshalb sind nach längerer Kulturdauer kaum noch positive Zellen in der obersten Schicht detektierbar. β -Gal positive Zellen fanden sich nach längerer Kulturdauer auch nur noch im *Stratum corneum*, wobei die Anzahl positiver Zellen in den verschiedenen Schichten größer als bei PKC δ Kulturen und kleiner als bei PKC α Kulturen war. Diese zeigten zur gleichen Zeit nämlich viele PKC α überexprimierender Zellen in fast allen Schichten, was darauf hinweist, dass diese Zellen zu Beginn der Kultivierung eine verstärkte Adhäsion in den unteren Schichten erfahren müssen, was mit einer Rolle von PKC α bei der Anheftung der Zellen an Laminin-5 konform ginge.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass die episomal vorliegenden adenoviralen Vektoren bei der Zellteilung asymmetrisch präferenziell bei einer der Tochterzellen verbleiben. Andernfalls hätten sich die infizierten oder zumindest die stärker positiven Zellen gleichmäßig in allen Schichten verteilen und die Reaktivität pro Zelle mit steigender Kulturdauer kontinuierlich abnehmen müssen. Die genaue Ursache, weshalb alle infizierten Zellen jedoch innerhalb kurzer Zeit in die terminale Differenzierung gehen und sich ihre Anzahl in den einzelnen Strata nicht gleichmäßig vermindert, konnte im Rahmen dieses Projekts nicht geklärt werden. Jedenfalls könnte ein generell differenzierungsfördernder Einfluss der adenoviralen Infektion auch in 2D-Kulturen die Phase der aktiven Überexpression deutlich verkürzt haben. Jedoch wurden, wie bereits beschrieben, die terminalen Differenzierungsvorgänge auch durch die Art des überexprimierten Proteins direkt beeinflusst. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass alle adenoviral infizierten Zellen aufgrund ihrer Lokalisation in den para- und suprabasalen Schichten keinen Einfluss auf die Protein-Expression und Struktur der Basal-

membranzone mit Basalzellschicht ausüben konnten. Sie müssten nahe der BM lokalisiert sein, um mit anderen Proteinen interagieren zu können und die Strukturen direkt zu beeinflussen. Wahrscheinlich aus diesem Grund sind keine klaren Unterschiede in Expression und Verteilung der Basalmembrankomponenten und Differenzierungsmarker nachweisbar.

Bei Kulturen normaler humaner Keratinozyten im Vergleich zu HaCaT₆ zeigten sich keine histologischen Unterschiede zwischen PKC-infizierten und Kontrollzellen. Dies ist ein weiteres Indiz, dass die Überexpression der PKC α - und mehr noch der PKC δ -Isoform den HaCaT-spezifischen Differenzierungsdefekt mit großer Wahrscheinlichkeit durch eine Normalisierung der Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion und eine gesteigerte Migrationsfähigkeit ausgleicht.

PKC erweist sich in der organotypischen Kokultur von HaCaT-Zellen als Schlüsselkomponente für die Übertragung der Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion, wahrscheinlich mittels verbesserter Signalübertragung durch Wachstumsfaktoren und Cytokine. PKC spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Balance von Zellwachstum und Differenzierung in der Epithelentwicklung und Normalisierung Differenzierungs-defekter HaCaT-Zellen. Dies ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Weiterentwicklung organotypischer Kulturen von HaCaT-Zellen als standardisiertes *in vitro*-Modell für die Generierung von Hautäquivalenten für pharmakologische Testungen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Schlüsselereignisse bei der epidermalen Differenzierung sind das Ablösen der Basalzellen von der Basalmembran und ihre Aufwärtswanderung synchron zur terminalen Differenzierung mit dem Endstadium der Hornschuppen, die die äußerste Barriere bilden. Zellrezeptoren, die bei der Auslösung dieses Prozesses eine wichtige Rolle spielen, sind die Integrine, die einen erheblichen Anteil an der Gewebeorganisation haben. Andererseits sind Integrine auch maßgeblich an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Als Hauptkomponente der Hemidesmosomen, die die Basalzellen mit der darunter liegenden Basalmembran verbinden, kommt Integrin $\alpha6\beta4$ eine herausragende Funktion zu. Über seine cytoplasmatischen Domänen interagiert $\alpha6\beta4$ mit PKC α und PKC δ , und wird dabei seinerseits modifiziert. Grundlegende Änderungen in der Integrin-Expression und -Verteilung werden bei der Tumorigenese beobachtet. Auffallend bei Hautcarcinomen sind vor allem die Dislokation und Überexpression von Integrin $\alpha6\beta4$, was weitreichende Konsequenzen für die PKC-Signaltransduktion hat.

Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der Rolle von PKC α , PKC δ und Integrin $\alpha6\beta4$ in Keratinozyten und deren mögliche Bedeutung bei der Tumorentstehung. Dabei sollte die Funktion von PKC α , PKC δ und Integrin $\alpha6\beta4$ bei der Regulation von Zell-Matrix-Interaktionen, Migration und Differenzierung untersucht werden. Hierfür wurden normale humane primäre Keratinozyten und die humane Keratinozyten-Zell-Linie HaCaT, eine immortale „prämaligne“ Zelle, mit adenoviralen Konstrukten für PKC α , PKC δ , für die Integrin $\alpha6$ -Kette und für β -Gal als Negativkontrolle infiziert. Reproduzierbare Infektionen mit hohen Infektionseffizienzen und die langsam abnehmende Synthese der exogenen Proteine erlaubten funktionelle Analysen in zwei-dimensionalen Kulturen, als auch in der komplexeren, physiologischen, drei-dimensionalen organotypischen Kokultur (OTK). In zwei-dimensionalen Kulturen erhöhte PKC δ die Migrationsaktivität der Zellen, vermutlich durch reduzierte Adhäsion an Laminin-5. Erhöhte Integrin $\alpha6$ Level dagegen veränderten das Wachstumsverhalten dramatisch, was schließlich zu einem massiven Absterben der Zellen führte. Daher entwickelten sich in OTKs von $\alpha6$ Zellen nur atrophische Epithelien. Differenzierungsmarker konnten, wahrscheinlich aufgrund der verminderten Lebenszeit der Zellen, nicht detektiert werden. Das Fehlen einer kompensierenden Hochregulation der Integrin $\beta4$ -Kette, die in überlebenden Maus-Keratinozyten beobachtet wurde, wird als Ursache für den Zelltod im humanen System angesehen. HaCaT-Zellen sind im Allgemeinen in der Lage ein Epithel vergleichbar der Epidermis zu bilden, obwohl sie bestimmte Differenzierungs-Defizite zeigen. So verläuft die Entwicklung stratifizierter Epithelien langsamer als bei normalen Keratinozyten und ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines parakeratotischen Stratum corneums, was auf eine

unvollständige Differenzierung hinweist. PKC α und PKC δ überexprimierende Zellen dagegen bildeten gut differenzierte Epithelien, die denen normaler Keratinozyten ähnelten. Differenzierungsmarker und Basalmembrankomponenten wurden regulär exprimiert. Bei normalen Keratinozyten hatte die adenovirale Überexpression der PKC Isoformen keinen stimulierenden Einfluss auf Epithelwachstum und Stratifizierung. Die Überexpression der beiden PKC-Isoformen schien somit die bei HaCaT veränderte bzw. nicht ausreichende Interaktion mit Fibroblasten zu verbessern, was letztendlich zu einer normalisierten Differenzierung und Stratifizierung führte.

7 SUMMARY

One key event in epidermal differentiation is the detachment and upward movement of basal cells upon their commitment. Cell receptors playing a major role in this process are integrins which provide spatial organization and participate in signaling events. Among those integrin $\alpha6\beta4$ is a key component of epidermal attachment devices to the basement membrane, the hemidesmosomes. These connect the proliferative basal cell layer with the underlying basement membrane. By its cytoplasmic integrin tails $\alpha6\beta4$ interacts with PKC α and PKC δ , thereby getting itself modified. Profound changes in integrin expression and tissue distribution occur during tumorigenesis. Most striking in skin carcinomas are dislocation and dramatic expansion of $\alpha6\beta4$ which coincides with anomalies in PKC signaling. This project was devoted to functional links of PKC α , PKC δ , and $\alpha6\beta4$ integrin in regulation of cell-matrix interactions, migration, and differentiation which also concerns respective defaults in neoplasia such as loss of tissue polarity. Thus, normal human keratinocytes (NHK) and the derived line HaCaT (clone 6) were infected with adenoviral constructs for PKC α , PKC δ , integrin $\alpha6$ chain, or β -gal as control. Reproducible infections, high efficiency rates, and slowly declining synthesis of exogenous proteins allowed functional tests in 2D-cultures, but also in the more complex, physiological 3D-organotypic cocultures. In 2D-cultures PKC δ enhanced closure of scratch wounds, presumably by reducing adhesion to epidermal laminin-5. Contrasting mouse data, elevated integrin $\alpha6$ levels altered the growth behavior, causing massive cell death eventually. Thus, in 3D-cocultures of $\alpha6$ -cells only poorly stratified, atrophic epithelia developed and no differentiation markers were detectable apparently due to the reduced lifespan. The lack of compensatory up-regulation of the integrin $\beta4$ chain, occurring in the surviving mouse cells, is considered to cause cell death in the human system. HaCaT cells in general are able to produce a nearly epidermis-like epithelium, although they display certain deficiencies in differentiation depending on environmental conditions. Thus, compared to normal keratinocytes the development of stratified epithelia occurs more slowly and is characterized by a parakeratotic stratum corneum, indicating uncomplete differentiation. PKC α and PKC δ overexpressing cells, however, gave rise to normal, well differentiated epithelia that resembled more closely those of NHK. Stratification was improved and parakeratosis reduced. All differentiation markers as well as components of the basement membrane zone were regularly expressed. Normal human keratinocytes, revealing no differentiation deficiencies in 3D-coculture, did not behave differently upon adenoviral infection. Thus, PKC-mediated improved interactions between HaCaT cells and dermal fibroblasts, being otherwise weakened, may be considered to induce epithelial normalization.

8 LITERATUR

- ADAMS,J.C. & WATT,F.M. (1991) Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J. Cell Biol.*, **115**, pp. 829-841.
- ALBERTS,B., BRAY,D., LEWIS,J., RAFF,M., ROBERTS,K. & WATSON,J.D. (1995) *Molekulabiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- ALT,A., OHBA,M., LI,L., GARTSBEIN,M., BELANGER,A., DENNING,M.F., KUROKI,T., YUSPA,S.H. & TENNENBAUM,T. (2001) Protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of alpha6beta4 is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment. *Cancer Res.*, **61**, pp. 4591-4598.
- ANDERS,M., HANSEN,R., DING,R.X., RAUEN,K.A., BISSELL,M.J. & KORN,W.M. (2003) Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, pp. 1943-1948.
- AUMAILLEY,M. & SMYTH,N. (1998) The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.*, **193 (Pt 1)**, pp. 1-21.
- BAUR,M. (1995) Charakterisierung von Proliferation und Differenzierung humaner Keratinozyten mit unterschiedlichem Transformationsgrad unter definierten Bedingungen: Effekte mesenchymaler Zellen und modulierender Faktoren. Universität Hohenheim. Dissertation
- BELKIN,A.M. & STEPP,M.A. (2000) Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.*, **51**, pp. 280-301.
- BERGELSON,J.M., CUNNINGHAM,J.A., DROGUETT,G., KURT-JONES,E.A., KRITHIVAS,A., HONG,J.S., HORWITZ,M.S., CROWELL,R.L. & FINBERG,R.W. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**, pp. 1320-1323.
- BLOBE,G.C., OBEID,L.M. & HANNUN,Y.A. (1994) Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.*, **13**, pp. 411-431.
- BOELSMA,E., VERHOEVEN,M.C. & PONEC,M. (1999) Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *J. Invest Dermatol.*, **112**, pp. 489-498.
- BORRADORI,L., CHAVANAS,S., SCHAAPVELD,R.Q., GAGNOUX-PALACIOS,L., CALAFAT,J., MENEGUZZI,G. & SONNENBERG,A. (1998) Role of the bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in the assembly of hemidesmosomes and cell adhesion--reexpression of BP180 in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa keratinocytes. *Exp. Cell Res.*, **239**, pp. 463-476.
- BORRADORI,L. & SONNENBERG,A. (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest Dermatol.*, **112**, pp. 411-418.
- BOUKAMP,P., PETRUSSEVSKA,R.T., BREITKREUTZ,D., HORNING,J., MARKHAM,A. & FUSENIG,N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**, pp. 761-771.

- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, pp. 248-254.
- BRAITHWAITE, A.W. (1986) Semipermissive replication of adenovirus 5 in rat brain cells and evidence for an induction of cellular DNA replication in vivo. *J. Gen. Virol.*, **67 (Pt 2)**, pp. 391-396.
- BREITKREUTZ, D., BOHNERT, A., HERZMANN, E., BOWDEN, P.E., BOUKAMP, P. & FUSENIG, N.E. (1984) Differentiation specific functions in cultured and transplanted mouse keratinocytes: environmental influences on ultrastructure and keratin expression. *Differentiation*, **26**, pp. 154-169.
- BREITKREUTZ, D., HORNUNG, J., POHLMANN, J., BROWN-BIERMAN, L., BOHNERT, A., BOWDEN, P.E. & FUSENIG, N.E. (1986) Environmental induction of differentiation-specific keratins in malignant mouse keratinocyte lines. *Eur. J. Cell Biol.*, **42**, pp. 255-267.
- BREITKREUTZ, D., SCHOOP, V.M., MIRANCEA, N., BAUR, M., STARK, H.J. & FUSENIG, N.E. (1998) Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur. J. Cell Biol.*, **75**, pp. 273-286.
- BREITKREUTZ, D., STARK, H.J., BAUR, M. & FUSENIG, N.E. (1994) Differentielle Veränderungen epidermaler Integrinmuster in Modellepithelien transformierter benignen und malignen Keratinozyten (HaCaT-ras). In: *Fortschritte der operativen und onkologischen Dermatologie* (Ed. by G.Mahrle, H.-J.Schulze & T.Krieg), pp. 37-46. Springer Verlag, Heidelberg.
- BREITKREUTZ, D., STARK, H.J., MIRANCEA, N., TOMAKIDI, P., STEINBAUER, H. & FUSENIG, N.E. (1997) Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes--implications for epidermal homeostasis. *Differentiation*, **61**, pp. 195-209.
- BREITKREUTZ, D., STARK, H.J., PLEIN, P., BAUR, M. & FUSENIG, N.E. (1993) Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺. *Differentiation*, **54**, pp. 201-217.
- CHAN, L.S. (1997) Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci.*, **2**, pp. d343-d352.
- CHUN, J.S. & JACOBSON, B.S. (1993) Requirement for diacylglycerol and protein kinase C in HeLa cell-substratum adhesion and their feedback amplification of arachidonic acid production for optimum cell spreading. *Mol. Biol. Cell*, **4**, pp. 271-281.
- DEFILIPPI, P., VENTURINO, M., GULINO, D., DUPERRAY, A., BOQUET, P., FIORENTINI, C., VOLPE, G., PALMIERI, M., SILENGO, L. & TARONE, G. (1997) Dissection of pathways implicated in integrin-mediated actin cytoskeleton assembly. Involvement of protein kinase C, Rho GTPase, and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **272**, pp. 21726-21734.

- DELWEL,G.O., KUIKMAN,I. & SONNENBERG,A. (1995) An alternatively spliced exon in the extracellular domain of the human alpha 6 integrin subunit--functional analysis of the alpha 6 integrin variants. *Cell Adhes. Commun.*, **3**, pp. 143-161.
- DEMPSEY,E.C., NEWTON,A.C., MOCHLY-ROSEN,D., FIELDS,A.P., REYLAND,M.E., INSEL,P.A. & MESSING,R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol*, **279**, pp. L429-L438.
- DENNING,M.F., DLUGOSZ,A.A., WILLIAMS,E.K., SZALLASI,Z., BLUMBERG,P.M. & YUSPA,S.H. (1995) Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ.*, **6**, pp. 149-157.
- DIMRI,G.P., LEE,X., BASILE,G., ACOSTA,M., SCOTT,G., ROSKELLEY,C., MEDRANO,E.E., LINSKENS,M., RUBELJ,I., PEREIRA-SMITH,O. & . (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **92**, pp. 9363-9367.
- DLUGOSZ,A.A., GLICK,A.B., TENNENBAUM,T., WEINBERG,W.C. & YUSPA,S.H. (1995) Isolation and utilization of epidermal keratinocytes for oncogene research. *Methods Enzymol.*, **254**, pp. 3-20.
- DLUGOSZ,A.A., MISCHAK,H., MUSHINSKI,J.F. & YUSPA,S.H. (1992) Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol. Carcinog.*, **5**, pp. 286-292.
- DOERFLER,W. (1983) *The molecular biology of adenoviruses*. Springer Verlag.
- EGEBLAD,M. & WERB,Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, pp. 161-174.
- EGGERDING,F.A. & PIERCE,W.C. (1986) Molecular biology of adenovirus type 2 semi-permissive infections. I. Viral growth and expression of viral replicative functions during restricted adenovirus infection. *Virology*, **148**, pp. 97-113.
- ELICEIRI,B.P. (2001) Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ. Res.*, **89**, pp. 1104-1110.
- ENGELHARDT,J.F., SIMON,R.H., YANG,Y., ZEPEDA,M., WEBER-PENDLETON,S., DORANZ,B., GROSSMAN,M. & WILSON,J.M. (1993) Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study. *Hum. Gene Ther.*, **4**, pp. 759-769.
- ETZIONI,A. (1999) Integrins--the glue of life. *Lancet*, **353**, pp. 341-343.
- FALLAUX,F.J., KRANENBURG,O., CRAMER,S.J., HOUWELING,A., VAN ORMONDT,H., HOEBEN,R.C. & VAN DER EB,A.J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, **7**, pp. 215-222.
- FASHENA,S.J. & THOMAS,S.M. (2000) Signalling by adhesion receptors. *Nat. Cell Biol.*, **2**, pp. E225-E229.

- FIELDS,B.N., KNIPE,D.M., HOWLEY,P.M., CHANOCK,R.M., MELNICK,J.L., MONATH,T.P., ROIZMAN,B. & STRAUS,S.E. (1996) *Fields Virology*. Lippincott, Philadelphia.
- FISHER,K.J., CHOI,H., BURDA,J., CHEN,S.J. & WILSON,J.M. (1996) Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, **217**, pp. 11-22.
- FOX,J.W., MAYER,U., NISCHT,R., AUMAILLEY,M., REINHARDT,D., WIEDEMANN,H., MANN,K., TIMPL,R., KRIEG,T., ENGEL,J. & . (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.*, **10**, pp. 3137-3146.
- FUCHS,E. & GREEN,H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, **19**, pp. 1033-1042.
- FUCHS,E. & KARAKESISOGLOU,I. (2001) Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.*, **15**, pp. 1-14.
- GARROD,D.R., MERRITT,A.J. & NIE,Z. (2002a) Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). *Mol. Membr. Biol.*, **19**, pp. 81-94.
- GARROD,D.R., MERRITT,A.J. & NIE,Z. (2002b) Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, pp. 537-545.
- GIANCOTTI,F.G. & RUOSLAHTI,E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, pp. 1028-1032.
- GOLDSMITH,K.T., DION,L.D., CURIEL,D.T. & GARVER,R.I., JR. (1998) trans E1 component requirements for maximal replication of E1-defective recombinant adenovirus. *Virology*, **248**, pp. 406-419.
- GRAHAM,F.L., SMILEY,J., RUSSELL,W.C. & NAIRN,R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**, pp. 59-74.
- GREEN,K.J. & JONES,J.C. (1996) Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.*, **10**, pp. 871-881.
- GSCHWENDT,M. (1999) Protein kinase C delta. *Eur. J. Biochem.*, **259**, pp. 555-564.
- HEMLER,M.E. (1998) Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, pp. 578-585.
- HENNINGS,H., KRUSZEWSKI,F.H., YUSPA,S.H. & TUCKER,R.W. (1989) Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes. *Carcinogenesis*, **10**, pp. 777-780.
- HEROLD-MENDE,C., KARTENBECK,J., TOMAKIDI,P. & BOSCH,F.X. (2001) Metastatic growth of squamous cell carcinomas is correlated with upregulation and redistribution of hemidesmosomal components. *Cell Tissue Res.*, **306**, pp. 399-408.
- HERTLE,M.D., ADAMS,J.C. & WATT,F.M. (1991) Integrin expression during human epidermal development in vivo and in vitro. *Development*, **112**, pp. 193-206.

- HILLEMANN, M.R. & WERNER, J.H. (1954) Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**, pp. 183-188.
- HOHL, D., LICHTI, U., BREITKREUTZ, D., STEINERT, P.M. & ROOP, D.R. (1991a) Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *J. Invest Dermatol.*, **96**, pp. 414-418.
- HOHL, D., MEHREL, T., LICHTI, U., TURNER, M.L., ROOP, D.R. & STEINERT, P.M. (1991b) Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J. Biol. Chem.*, **266**, pp. 6626-6636.
- HOLBROOK, K.A. (1994) *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge.
- HOPKINSON, S.B. & JONES, J.C. (2000) The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol. Biol. Cell*, **11**, pp. 277-286.
- HÜLSEN, A. (1990) In-vitro-Analysen von Proliferations- und Differenzierungseigenschaften humaner Keratinozyten in unterschiedlichen Transformationsstadien. Universität Kaiserslautern. Dissertation
- HUMPHRIES, M.J., MCEWAN, P.A., BARTON, S.J., BUCKLEY, P.A., BELLA, J. & PAUL, M.A. (2003) Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, pp. 313-320.
- HYNES, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, pp. 11-25.
- JONES, J.C., ASMUTH, J., BAKER, S.E., LANGHOFER, M., ROTH, S.I. & HOPKINSON, S.B. (1994) Hemidesmosomes: extracellular matrix/intermediate filament connectors. *Exp. Cell Res.*, **213**, pp. 1-11.
- JONES, J.C., HOPKINSON, S.B. & GOLDFINGER, L.E. (1998) Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays*, **20**, pp. 488-494.
- KALLURI, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, pp. 422-433.
- KANASHIRO, C.A. & KHALIL, R.A. (1998) Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, pp. 974-985.
- KIM, S.Y., BACHMAN, N.J., NAIR, T.S., GOLDSMITH, S., LIEBERT, M., GROSSMAN, H.B., LOMAX, M.I. & CAREY, T.E. (1997) Beta 4 integrin transfection of UM-UC-2 (human bladder carcinoma) cells: stable expression of a spontaneous cytoplasmic truncation mutant with rapid loss of clones expressing intact beta 4. *Cancer Res.*, **57**, pp. 38-42.
- KOCHANEK, S. (1999) High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, **10**, pp. 2451-2459.

- KOCHANEK,S., CLEMENS,P.R., MITANI,K., CHEN,H.H., CHAN,S. & CASKEY,C.T. (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, pp. 5731-5736.
- KOLANUS,W. & SEED,B. (1997) Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, pp. 725-731.
- LEE,Y.S., DLUGOSZ,A.A., MCKAY,R., DEAN,N.M. & YUSPA,S.H. (1997) Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol. Carcinog.*, **18**, pp. 44-53.
- LEHMAN,T.A., MODALI,R., BOUKAMP,P., STANEK,J., BENNETT,W.P., WELSH,J.A., METCALF,R.A., STAMPFER,M.R., FUSENIG,N., ROGAN,E.M. & . (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, **14**, pp. 833-839.
- LI,L., TUCKER,R.W., HENNINGS,H. & YUSPA,S.H. (1995a) Chelation of intracellular Ca²⁺ inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro. *J. Cell Physiol*, **163**, pp. 105-114.
- LI,L., TUCKER,R.W., HENNINGS,H. & YUSPA,S.H. (1995b) Inhibitors of the intracellular Ca²⁺-ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca²⁺ compartments. *Cell Growth Differ.*, **6**, pp. 1171-1184.
- LI,W., NADELMAN,C., GRATCH,N.S., LI,W., CHEN,M., KASAHARA,N. & WOODLEY,D.T. (2002) An important role for protein kinase C-delta in human keratinocyte migration on dermal collagen. *Exp. Cell Res.*, **273**, pp. 219-228.
- LIU,S., CALDERWOOD,D.A. & GINSBERG,M.H. (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci.*, **113 (Pt 20)**, pp. 3563-3571.
- LIU,W.S. & HECKMAN,C.A. (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.*, **10**, pp. 529-542.
- LOCHTER,A., STERNLICHT,M.D., WERB,Z. & BISSELL,M.J. (1998) The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **857**, pp. 180-193.
- LONSDALE-ECCLES,J.D., RESING,K.A., MEEK,R.L. & DALE,B.A. (1984) High-molecular-weight precursor of epidermal filaggrin and hypothesis for its tandem repeating structure. *Biochemistry*, **23**, pp. 1239-1245.
- LOUIS,N., EVELEGH,C. & GRAHAM,F.L. (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, **233**, pp. 423-429.
- MAAS-SZABOWSKI,N., STARKER,A. & FUSENIG,N.E. (2003) Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF-alpha. *J. Cell Sci.*, **116**, pp. 2937-2948.

- MAGNALDO,T., POMMES,L., ASSELINEAU,D. & DARMON,M. (1990) Isolation of a GC-rich cDNA identifying mRNA present in human epidermis and modulated by calcium and retinoic acid in cultured keratinocytes. Homology with murine loricrin mRNA. *Mol. Biol. Rep.*, **14**, pp. 237-246.
- MARINKOVICH,M.P. (1993) The molecular genetics of basement membrane diseases. *Arch. Dermatol.*, **129**, pp. 1557-1565.
- MCMILLAN,J.R., AKIYAMA,M. & SHIMIZU,H. (2003) Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J. Dermatol. Sci.*, **31**, pp. 169-177.
- MIRANTI,C.K. & BRUGGE,J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.*, **4**, pp. E83-E90.
- MITTEREDER,N., MARCH,K.L. & TRAPNELL,B.C. (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.*, **70**, pp. 7498-7509.
- MIYAKE,S., MAKIMURA,M., KANEGAE,Y., HARADA,S., SATO,Y., TAKAMORI,K., TOKUDA,C. & SAITO,I. (1996) Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, pp. 1320-1324.
- MODROW,S. & FALKE,D. (1998) Adenoviren. In: *Molekulare Virologie* pp. 391-411. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- MOLL,R., FRANKE,W.W., SCHILLER,D.L., GEIGER,B. & KREPLER,R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, pp. 11-24.
- MURPHY,G., KNAUPER,V., COWELL,S., HEMBRY,R., STANTON,H., BUTLER,G., FREIJE,J., PENDAS,A.M. & LOPEZ-OTIN,C. (1999) Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **878**, pp. 25-39.
- MURRAY,J.D., BELLETT,A.J., BRAITHWAITE,A., WALDRON,L.K. & TAYLOR,I.W. (1982) Altered cell cycle progression and aberrant mitosis in adenovirus-infected rodent cells. *J. Cell Physiol*, **111**, pp. 89-96.
- NELSON,J.E. & KAY,M.A. (1997) Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J. Virol.*, **71**, pp. 8902-8907.
- NEWTON,A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.*, **270**, pp. 28495-28498.
- NEWTON,A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, pp. 161-167.
- NEWTON,A.C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.*, **101**, pp. 2353-2364.
- NEWTON,A.C. (2003) The ins and outs of protein kinase C. *Methods Mol. Biol.*, **233**, pp. 3-7.

- NIEVERS,M.G., SCHAAPVELD,R.Q., OOMEN,L.C., FONTAO,L., GEERTS,D. & SONNENBERG,A. (1998) Ligand-independent role of the beta 4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes. *J. Cell Sci.*, **111** (Pt 12), pp. 1659-1672.
- NIEVERS,M.G., SCHAAPVELD,R.Q. & SONNENBERG,A. (1999) Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.*, **18**, pp. 5-17.
- NISHIZUKA,Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**, pp. 305-312.
- NISHIZUKA,Y. (1988) Studies and prospectives of protein kinase C in signal transduction. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi*, **51**, pp. 1321-1326.
- NORTH,A.J., BARDSLEY,W.G., HYAM,J., BORNSLAEGER,E.A., CORDINGLEY,H.C., TRINNAMAN,B., HATZFELD,M., GREEN,K.J., MAGEE,A.I. & GARROD,D.R. (1999) Molecular map of the desmosomal plaque. *J. Cell Sci.*, **112** (Pt 23), pp. 4325-4336.
- NYBERG-HOFFMAN,C. & AGUILAR-CORDOVA,E. (1999) Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat. Med.*, **5**, pp. 955-957.
- OHBA,M., ISHINO,K., KASHIWAGI,M., KAWABE,S., CHIDA,K., HUH,N.H. & KUROKI,T. (1998) Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, **18**, pp. 5199-5207.
- PULKKINEN,L. & UITTO,J. (1998) Hemidesmosomal variants of epidermolysis bullosa. Mutations in the alpha6beta4 integrin and the 180-kD bullous pemphigoid antigen/type XVII collagen genes. *Exp. Dermatol.*, **7**, pp. 46-64.
- REZNICZEK,G.A., DE PEREDA,J.M., REIPERT,S. & WICHE,G. (1998) Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J. Cell Biol.*, **141**, pp. 209-225.
- ROBBINS,P.D. & GHIVIZZANI,S.C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.*, **80**, pp. 35-47.
- ROWE,W.P., HUEBNER,R.J., GILMORE,L.K., PARROTT,R.H. & WARD,T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, pp. 570-573.
- RYLE,C.M., BREITKREUTZ,D., STARK,H.J., LEIGH,I.M., STEINERT,P.M., ROOP,D. & FUSENIG,N.E. (1989) Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*, **40**, pp. 42-54.
- SAMBROOK,J., FRITSCH,E.F. & MANIATIS,T. (1989) *Molecular Cloning*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHAAPVELD,R.Q., BORRADORI,L., GEERTS,D., VAN LEUSDEN,M.R., KUIKMAN,I., NIEVERS,M.G., NIESSEN,C.M., STEENBERGEN,R.D., SNIJDERS,P.J. & SONNENBERG,A. (1998) Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J. Cell Biol.*, **142**, pp. 271-284.

SCHIEDNER,G., MORRAL,N., PARKS,R.J., WU,Y., KOOPMANS,S.C., LANGSTON,C., GRAHAM,F.L., BEAUDET,A.L. & KOCHANNEK,S. (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.*, **18**, pp. 180-183.

SCHOOP,V.M., MIRANCEA,N. & FUSENIG,N.E. (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest Dermatol.*, **112**, pp. 343-353.

SCHWARTZ,M.A. & GINSBERG,M.H. (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.*, **4**, pp. E65-E68.

SCHWARZ,M.A., OWARIBE,K., KARTENBECK,J. & FRANKE,W.W. (1990) Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, pp. 461-491.

SIMON,R.H., ENGELHARDT,J.F., YANG,Y., ZEPEDA,M., WEBER-PENDLETON,S., GROSSMAN,M. & WILSON,J.M. (1993) Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum. Gene Ther.*, **4**, pp. 771-780.

SMOLA,H., THIEKOTTER,G. & FUSENIG,N.E. (1993) Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J. Cell Biol.*, **122**, pp. 417-429.

SONNENBERG,A., CALAFAT,J., JANSSEN,H., DAAMS,H., VAN DER RAAIJ-HELMER LM, FALCIONI,R., KENNEL,S.J., APLIN,J.D., BAKER,J., LOIZIDOU,M. & . (1991) Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J. Cell Biol.*, **113**, pp. 907-917.

SONNENBERG,A., NIEVERS,M., SCHAAPVELD,R., GEERTS,D., NIESSEN,C. & BORRADORI,L. (1999) Interaction of BP180 and alpha6beta4. *J. Invest Dermatol.*, **112**, pp. 830-832.

STEINBOCK,F.A. & WICHE,G. (1999) Plectin: a cytolinker by design. *Biol. Chem.*, **380**, pp. 151-158.

STEINERT,P.M., CANTIERI,J.S., TELLER,D.C., LONSDALE-ECCLES,J.D. & DALE,B.A. (1981) Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, pp. 4097-4101.

STEINERT,P.M. & ROOP,D.R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, pp. 593-625.

STEINERT,P.M., STEVEN,A.C. & ROOP,D.R. (1985) The molecular biology of intermediate filaments. *Cell*, **42**, pp. 411-420.

- STEINSTRASSER,I., KOOPMANN,K. & MERKLE,H.P. (1997) Epidermal aminopeptidase activity and metabolism as observed in an organized HaCaT cell sheet model. *J. Pharm. Sci.*, **86**, pp. 378-383.
- STEINWAERDER,D.S., CARLSON,C.A. & LIEBER,A. (2000) DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum. Gene Ther.*, **11**, pp. 1933-1948.
- STEPP,M.A., SPURR-MICHAUD,S., TISDALE,A., ELWELL,J. & GIPSON,I.K. (1990) Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, pp. 8970-8974.
- SYRJANEN,S., MIKOLA,H., NYKANEN,M. & HUKKANEN,V. (1996) In vitro establishment of lytic and nonproductive infection by herpes simplex virus type 1 in three-dimensional keratinocyte culture. *J. Virol.*, **70**, pp. 6524-6528.
- TENNENBAUM,T., BELANGER,A.J., GLICK,A.B., TAMURA,R., QUARANTA,V. & YUSPA,S.H. (1995) A splice variant of alpha 6 integrin is associated with malignant conversion in mouse skin tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, pp. 7041-7045.
- TENNENBAUM,T., BELANGER,A.J., QUARANTA,V. & YUSPA,S.H. (1996) Differential regulation of integrins and extracellular matrix binding in epidermal differentiation and squamous tumor progression. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **1**, pp. 157-161.
- TENNENBAUM,T., WEINER,A.K., BELANGER,A.J., GLICK,A.B., HENNINGS,H. & YUSPA,S.H. (1993) The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, **53**, pp. 4803-4810.
- TIMPL,R. & BROWN,J.C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, **18**, pp. 123-132.
- TOMAKIDI,P., MIRANCEA,N., FUSENIG,N.E., HEROLD-MENDE,C., BOSCH,F.X. & BREITKREUTZ,D. (1999) Defects of basement membrane and hemidesmosome structure correlate with malignant phenotype and stromal interactions in HaCaT-Ras xenografts. *Differentiation*, **64**, pp. 263-275.
- TOMAKIDI,P., STARK,H.J., HEROLD-MENDE,C., BOSCH,F.X., STEINBAUER,H., FUSENIG,N.E. & BREITKREUTZ,D. (2003) Discriminating expression of differentiation markers evolves in transplants of benign and malignant human skin keratinocytes through stromal interactions. *J. Pathol.*, **200**, pp. 298-307.
- TOTH,M., DOERFLER,W. & SHENK,T. (1992) Adenovirus DNA replication facilitates binding of the MLTF/USF transcription factor to the viral major late promoter within infected cells. *Nucleic Acids Res.*, **20**, pp. 5143-5148.
- TRAUT,W., ENDL,E., GARAGNA,S., SCHOLZEN,T., SCHWINGER,E., GERDES,J. & WINKING,H. (2002a) Chromatin preferences of the perichromosomal layer constituent pKi-67. *Chromosome. Res.*, **10**, pp. 685-694.
- TRAUT,W., ENDL,E., SCHOLZEN,T., GERDES,J. & WINKING,H. (2002b) The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis. *Chromosoma*, **111**, pp. 156-164.

TRAUT,W., SCHOLZEN,T., WINKING,H., KUBBUTAT,M.H. & GERDES,J. (1998) Assignment1 of the murine Ki-67 gene (Mki67) to chromosome band 7F3-F5 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, **83**, pp. 12-13.

TSURUTA,D., HOPKINSON,S.B., LANE,K.D., WERNER,M.E., CRYNS,V.L. & JONES,J.C. (2003) Crucial role of the specificity-determining loop of the integrin beta4 subunit in the binding of cells to laminin-5 and outside-in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **278**, pp. 38707-38714.

VAN DER NEUT,R., KRIMPENFORT,P., CALAFAT,J., NIESSEN,C.M. & SONNENBERG,A. (1996) Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat. Genet.*, **13**, pp. 366-369.

VAN LEEUWEN,R.L., DEKKER,S.K., ARBISER,J.L., VERMEER,B.J., BRUIJN,J.A. & BYERS,H.R. (1994) Phorbol ester induced rapid attachment and spreading of melanoma cells and the role of extracellular matrix proteins. *Int. J. Cancer*, **57**, pp. 894-900.

WANG,H.Q., KIM,M.P., TIANO,H.F., LANGENBACH,R. & SMART,R.C. (2001) Protein kinase C-alpha coordinately regulates cytosolic phospholipase A(2) activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. *Mol. Pharmacol.*, **59**, pp. 860-866.

YANG,Y., NUNES,F.A., BERENCSI,K., FURTH,E.E., GONCZOL,E. & WILSON,J.M. (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **91**, pp. 4407-4411.

YURCHENCO,P.D., CHENG,Y.S. & COLOGNATO,H. (1992) Laminin forms an independent network in basement membranes. *J. Cell Biol.*, **117**, pp. 1119-1133.

ZILLIKENS,D. & GIUDICE,G.J. (1999) BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, pp. 187-194.

ZKBS (2001) Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5. (Ed. by Zentrale Kommission für biologische Sicherheit).

9 ANHANG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Amper
Ad	Adenovirus
Ad5	Adenovirus Typ 5
APS	Ammoniumpersulfat
β-Gal	β-Galaktosidase
BM	Basalmembran
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Col I	Kollagen Typ I
Col IV	Kollagen Typ IV
Ca ²⁺	Calciumionen (zweiwertig)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cy3	Indocarbocyanin (Fluorochrom)
cDNA	complementary DNA (komplementär zu mRNA)
d	Tag(e)
DAB	3-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco`s MEM
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid 5'-triphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FAD	Hanks`F12 and DMEM
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)

FN	Fibronectin
g	Gravitationskonstante bzw. Gramm
GAPDH	Glycerin-aldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde(n)
HaCaT	<u>H</u> uman, <u>a</u> adult, niedrig <u>C</u> alcium, hohe <u>T</u> emperatur
HaCaT ₆	HaCaT Subklon 6
HD	Hemidesmosom
HE	Hämatoxylin/Eosin
IFAP	Intermediate Filament Associated Protein
Int	Integrin
K	Keratin
kDa	Kilo Dalton
LN-5	Laminin-5
M	Molar oder Marker
MEM	Modified Eagle`s Minimun Essential Medium
Mg ²⁺	Magnesiumionen (zweiwertig)
µg, µm, µl, µM	Mikro-Gramm, -meter, -liter, -Molar
mg, mm, ml, mM	Milligramm, -meter, -liter, -Molar
min	Minute
mk	Monoklonal
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng, nM	Nanogramm, -Molar
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pi	Nach der Infektion (post Infektion)
pk	Polyklonal
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin-Glycin-Aspartat
RIPA	Radio immuno precipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
S1	Sicherheitsbereich 1
S2	Sicherheitsbereich 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N, N, N, N –Tetramethylethyldiamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Maß für biologische Aktivität)
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. Norbert E. Fusenig möchte ich für die Aufnahme in seine Gruppe danken, für die hervorragende Ausrüstung des Labors, seine konstruktive Kritik und die finanzielle Absicherung bis zum Ende dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Dirk Breitzkreutz für die langen, ergiebigen Diskussionen und die Freiheiten, die ich bei der Versuchsplanung und – durchführung sowie beim Schreiben dieser Arbeit genießen durfte.

Von Herzen danke ich Frau Prof. Dr. Petra Boukamp und Frau Dr. Margareta Müller. Für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und Anregungen, und nicht zu vergessen für die Versorgung mit Süßigkeiten.

Dr. Angel Cid-Arregui und Kerstin Müller sei gedankt für die Bereitstellung der Bench im S2-Labor.

Bei Eva möchte ich mich dafür bedanken, dass sie meine Leidenschaft für den Thai mit mir geteilt hat und für all die schönen unzähligen Abende, und auch „Urlaube“, die wir miteinander verbracht haben. Willi danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die Beantwortung ständiger Fragen einer „Nicht-Biologin“. Ana sei gedankt für die Einführung in die Geheimnisse des Western Blot. Der ganzen Mensa- und Botanik-Clique, nämlich Silvia, Hans-Jürgen, MaKo, Sonja, Eva C., Karsten, Katharina, Michael, Joachim... danke für die schönen, erholsamen Mittagspausen mit grenzenlosen Diskussionen wissenschaftlicher und vor allem nicht-wissenschaftlicher Art, bei denen ich sehr viel gelernt habe. Nicht zu vergessen alle restlichen „Fusenix“ (Claudia, MaO, Iris, MaKe, Regina, Angelika, Alex, Heinrich, Silke, ...), mit denen es viel Spaß gemacht hat, zusammen zu arbeiten. Ich werde Euch alle vermissen!

Christoph danke ich dafür, dass er immer für mich da war, für das Verständnis für meine Arbeit, seine Gelassenheit und seine Aufmunterungen und nicht zuletzt für die ständige Hilfe bei allen Computer-Fragen und -Problemen.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, für ihr Vertrauen in mich und meine Entscheidungen und ihre nie endende Unterstützung. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

CURRICULUM VITAE

NICOLE DAUM

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 24. August 1976

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG

1982 –1986 Grundschule Landsweiler-Reden

1986 –1995 Gymnasium am Steinwald (Neunkirchen), Schulabschluss: Abitur

STUDIUM

Ab 10/1995 Studium an der Universität Kaiserslautern im Fach Lebensmittelchemie

09/1997 Vordiplom (staatliche Zwischenprüfung)

Ab 10/1997 Hauptstudium

08 – 10/1998 dreimonatiges Ferienpraktikum an der staatlichen Universität von Campinas/SP, Brasilien, zum Thema „Biodegradation tests with bacteria capable of biodegrading PAH in solid and liquid media“

02 – 04/1999 dreimonatiges Forschungspraktikum an der Universität von Murcia, Spanien, zum Thema „Oxidative stress in melanocytes after H₂O₂ treatment determined by lipid peroxidation and glutathione levels“

03/2000 Mündliche Diplomprüfung (Erste Staatsprüfung) in den Fächern

Lebensmittelchemie

Biochemie/Naturstoffe

Mikrobiologie der Lebensmittel

04 – 10/2000 Diplomarbeit an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Abteilung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, zum Thema „Beeinflussung der zellulären Calcium-Homöostase in Primärhepatozyten der Ratte durch polychlorierte Biphenyle“

10/2000 Studienabschluss: Diplom im Fach Lebensmittelchemie

DISSERTATION

Seit 02/2001 Vorbereitung zur Dissertation am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, Abteilung Differenzierung und Carcinogenese *in vitro*, zum Thema „Integrin $\alpha\beta_4$ und Protein Kinase C in epidermaler Differenzierung und Haut-Carcinogenese“