

Aus dem Institut für Toxikologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Funktionale Bedeutung der Protein Kinase C –  $\delta$  (PKC –  $\delta$ ) in der  
Reorganisation der zytoskelettären Architektur humaner  
Keratinocyten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
dem Fachbereich Medizin vorgelegt  
von

Nicolas Maximilian Gumpert  
aus Hamm

Mainz, 2000

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 28. Mai 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>1.1.    AUFBAU DES EUKARYONTISCHEN ZYTOSKELETTS</b> .....	1
<b>1.2.    AUFBAU DER EPIDERMIS</b> .....	3
<b>1.3.    MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER WACHSTUMSREGULATION DURCH ZELLKONTAKTE</b> .....	6
<b>1.4.    DIE PROTEINKINASE C – FAMILIE</b> .....	11
1.4.1. Die Proteinkinase C – $\delta$ .....	15
<b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	17
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	18
<b>3.1.    ZELLKULTUR</b> .....	18
3.1.1. Zelllinien.....	18
3.1.2. Zellkulturmedium.....	19
3.1.3. Zellpassagierung.....	20
3.1.4. Bestimmung der Zellzahl.....	23
3.1.5. Kryokonservierung.....	24
3.1.6. Test auf Mykoplasmenkontamination.....	25
3.1.7. Fixierung von Zellen.....	27
3.1.8. Proliferationstest.....	28
3.1.9. Hämatoxylin – Eosin – Färbung.....	30

<b>3.2.</b>	<b>PROTEINGEWINNUNG AUS DER ZELLKULTUR.....</b>	32
3.2.1.	Gewinnung eines Gesamtzelllysates.....	32
<b>3.3.</b>	<b>BIOCHEMISCHE METHODEN.....</b>	34
3.3.1.	Proteinisolierung durch Fällung.....	34
3.3.1.1.	Chloroform – Methanol – Fällung.....	34
3.3.2.	Proteinquantifizierung (BCA – Test).....	35
<b>3.4.</b>	<b>ELEKTROPHORESE.....</b>	39
3.4.1.	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	39
3.4.1.1.	Gele gießen.....	40
3.4.1.2.	Probenvorbereitung.....	42
3.4.1.3.	Durchführung der Elektrophorese.....	43
3.4.1.4.	Standardproteine für die Elektrophorese.....	44
3.4.1.4.1.	Bluemarker.....	45
3.4.1.4.2.	Coomassie – Marker.....	45
3.4.1.5.	Proteindetektion nach der Gelelektrophorese.....	46
3.4.2.	Proteindetektion nach Transfer auf die Trägermembran.....	46
3.4.2.1.	Unspezifische Proteindetektion durch Coomassie – Färbung.....	48
3.4.2.2.	Spezifische Proteindetektion durch Western Blot.....	48
<b>3.5.</b>	<b>IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....</b>	49
3.5.1.	Western Blot.....	49
3.5.1.1.	Vorinkubation eines Antikörpers mit einem Blockpeptid.....	53
3.5.2.	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	55
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	59
<b>4.1.</b>	<b>DIE ROLLE DER PKC – <math>\delta</math> IN DER KONTAKT – INHIBITION HUMANER KERATINOZYTEN.....</b>	<b>59</b>
4.1.1.	Untersuchung der PKC – Isoformen – Expression in humanen Keratinocyten.....	60

4.1.2.	Untersuchung der Wirkung des Phorbolesters TPA auf humane Keratinozyten.....	66
4.1.2.1.	Wirkung des Phorbolesters TPA auf die Kontaktinhibition humaner Keratinozyten.....	66
4.1.3.	Untersuchung der Wirkung von Rottlerin auf humane Keratinozyten.....	69
4.1.3.1.	Wirkung von Rottlerin auf die Kontaktinhibition humaner Keratinozyten.....	69
4.1.3.2.	Wirkung von Rottlerin auf die Kontaktinhibition nach verzögerter Aussaat.....	71
4.1.3.3.	Untersuchung der Proliferationshemmung durch Rottlerin auf humane Keratinozyten.....	72
4.1.3.4.	Reversibilität / Toxizität von Rottlerin.....	74
4.1.4.	Untersuchung der Wirkung von Calphostin C auf die Kontaktinhibition und das Proliferationsverhalten.....	77
4.1.5.	Untersuchung der Wirkung von Trifluoperazin auf die Kontaktinhibition und das Proliferationsverhalten.....	79
<b>4.2.</b>	<b>DIE ROLLE DER PKC – <math>\delta</math> IN DER ZYTO – ARCHITEKTONISCHEN REORGANISATION HUMANER KERATINOZYTEN.....</b>	<b>82</b>
4.2.1.	Lokalisation der PKC– $\delta$ in konfluenter und semikonfluenter Zellkultur.....	82
4.2.2.	Lokalisation der PKC – $\delta$ unter Rottlerinbehandlung.....	83
4.2.3.	Reorganisation des Zytoskeletts unter Rottlerin-, Calphostin C- und Trifluoperazin – Behandlung.....	86
4.2.4.	Untersuchung einer Transdifferenzierung durch Rottlerin.....	90
4.2.5.	Untersuchung über Lokalisationsveränderungen von E – Cadherin und $\beta$ – Catenin unter Rottlerin-, Calphostin C– und Trifluoperazin – Behandlung.....	92
4.2.6.	Untersuchung morphologischer Strukturveränderungen unter Rottlerin-, Calphostin C– und Trifluoperazin – Behandlung durch HE – Färbung .....	96
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>102</b>

**7. LITERATURVERZEICHNIS..... 104**

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumine
CaM – Kinase III	Calmodulinkinase III
cAMP	Cyclo-Adenosin-Monophosphat
CG	Culture Growth
CHAPS	3 – (3 – cholamidopropyl) – dimethylammonio – 1 – propansulfat
cpm	counts per minute
D, kD	Dalton, Kilo – Dalton
DAG	Diacylglycerol
DABCO	1, 4 – Diaminobicyclooctan
DAPI	4', 5 – Diamidino – 2 – phenylindoldihydrochlorid
DIOC	3, 3' – dihexadecyloxacarbocyanine perchlorate
DMF	N, N' – Dimetylformamid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen – diamin – tetraacetat
eEF – 2	Elongationsfaktor – 2
FCS	Fetal calf serum
Gy	Gray
H 7	(1 – (5 – isoquinolinesulphonyl) – 2 – methylpiperazine)
HaCaT	Human ceratinozyte
HE – Färbung	Hämatoxylin – Eosin – Färbung
HEPES	4 (2 – Hydroxyethyl ) – 1 – piperazinethansulfonsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IP <sub>3</sub>	Inositol – 1, 4, 5 – trisphosphat

NBT	4 – Nitroblautetrazoliniumchlorid
PAGE	Polyacrylamid – Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PDD	4 – $\alpha$ – Phorbol – 12, 13 – didecanoat
PDGF	Platelet derived growth factor
PEST	Penicillin, Streptomycin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rottlerin	5, 7 – dihydroxy – 2, 2 – dimethyl – 6 – (2, 4, 6 – trihydroxy – 3 – methyl – 5 – acetylbenzyl) – 8 – cinnamoyl 1, 2 – chromene
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N', N', N', N – tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TGK	Transglutaminase
TPA	12 – o – Tetradodecanoylphorbol – 13 – acetat
Tris	Tris – (hydroxymethyl) – aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
X – Phosphat	5 – Brom – 4 – Chlor – 3 – indolylphosphat – p – toluidinsalz

## 1. Einleitung

In den ersten Entwicklungsstadien eines Embryos sehen zunächst alle Zellen morphologisch gleich aus. Mit der Bildung der Keimblätter verlieren die Zellen ihre Gleichartigkeit und entwickeln neue morphologische Charakteristika, die sie auch beibehalten, wenn man die Zellen isoliert und in Gewebekultur weiterzüchtet.

In der Embryonalperiode differenzieren sich für jedes der drei Keimblätter charakteristische Gewebe (Organogenese).

Aus dem Ektoderm, dem äußeren Keimblatt, entstehen das zentrale und periphere Nervensystem, sowie die Epidermis. Aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, entspringt der Bewegungs- und Stützapparat einschließlich der Muskulatur, dem Knochen und Knorpel. Aus dem Entoderm, dem inneren Keimblatt, entwickelt sich die epitheliale Auskleidung des Gastrointestinal- und Respirationstraktes, sowie das Parenchym der Tonsillen, des Thymus, der Leber, und der Pankreas.

In dem Bereich der Organanlagen vermehren sich die Zellen und es treten die für das Organ typischen morphologischen Strukturen auf. Viele Organanlagen durchlaufen nach ihrer Entstehung zunächst eine Phase der Zellvermehrung, ehe sie mit der eigentlichen morphologischen und biochemischen Differenzierung beginnen. In der ersten Phase produzieren die Zellen im wesentlichen Strukturproteine, die für die Zellvermehrung notwendig sind und nur geringe Mengen organspezifischer Eiweißkörper. Mit der Differenzierung verschiebt sich anschließend das Verhältnis zugunsten der spezifischen Proteine (Langmann, J., 1989).

Es stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen die Zelle ihre morphologische und biochemische Differenzierung steuern kann und wie sie ihren Aufgaben entsprechend die zytoskelettäre Architektur organisiert.

### 1.1. Aufbau des eukaryontischen Zytoskeletts

Die äußere Gestalt der Zellen schwankt häufig erheblich. In der Regel ist die äußere Gestalt für die jeweilige Zellart charakteristisch, wobei Umgebung und Funktion starken Einfluß auf die Zellmorphologie besitzen. Die jeweils typische Zellform formiert sich in der Regel erst im Gewebeverband.

Charakteristische Bestandteile aller eukaryonter Zellen sind **Mikrotubuli**, **Mikrofilamente** und **intermediäre Filamente**. Zusammen bilden sie das **Zytoskelett**. Alle Teile des Zytoskeletts fügen sich zu einem hochstrukturierten, dynamischen, zytoplasmatischen Netzwerk zusammen, das für die Gestalt der Zelle, für Bewegungsvorgänge und für den intrazellulären Transport von Organellen und Vesikeln von zentraler Bedeutung ist.

Mikrotubuli haben eine wichtige Funktion sowohl bei der Aufrechterhaltung, als auch bei der Änderung der Zellmorphologie. Durch ihre zellspezifisch gestreckte Anordnung stabilisieren sie die Zellstruktur. Bei Morphologieänderung von Zellen werden Mikrotubuli aufgebaut, wo Vorwölbungen und Fortsätze entstehen, abgebaut werden sie im allgemeinen dort wo sich Einziehungen bilden. Daneben sind Mikrotubuli wesentliche Bestandteile, die für Zellteilungs- (*Zentriolen*) und Fortbewegungsvorgänge (z.B. *Geißel* beim Spermium), sowie dem zielgerichteten Transport (z.B. *Zilien*, die Schleim und Partikel aus den Atmungsorganen entfernen) benötigt werden.

Mikro- oder Aktinfilamente sind sehr feine, vernetzte oder gebündelte Fäden von maximal 1 µm Länge, die häufig mit der Kern- oder Zellmembran in Verbindung stehen. Sie entstehen durch Polymerisation freier globulärer Aktinmoleküle. Jedes Aktinfilament besteht aus zwei helikal umeinander gewundenen Aktineinzelfäden. Mit dem aktinbindenden Protein Filamin bilden sie gemeinsam durch Quervernetzung ein dreidimensionales Geflecht innerhalb der Zelle. Das Aktinnetzwerk besitzt einerseits die Aufgabe, die Zelle zu stabilisieren und andererseits reorganisatorische Umbauprozesse, wie sie z. B. während der ringartigen Durchschnürung der Zelle in der Mitosephase auftreten, zu unterstützen. Weiterhin kommt Aktin in Muskelzellen myosinassoziiert vor und bildet hier das Aktin – Myosin – Kontraktionssystem, das Kontraktionsvorgänge ermöglicht.

Eine weitere Art von intrazytoplasmatischen Filamenten sind intermediäre Filamente. Sie haben zumeist eine Länge von mehreren Mikrometern, sind fadenförmig und kommen besonders in Zellen mit großer mechanischer Beanspruchung (z. B. Kerationozyten) vor. Intermediäre Filamente sind die stabilsten Komponenten des Zytoskeletts. Trotz einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz und Größenunterschieden im Molekulargewicht von 40 – 210 kD, haben die verschiedenen

intermediären Filamente einen ähnlichen Aufbau. Die primäre Polypeptidkette hat eine  $\alpha$  – Helixstruktur, wobei sich drei dieser Helices zu einem kurzen Faden zusammenlagern. Diese Struktur bedingt die hohe Festigkeit und Stabilität der Filamente.

Intermediäre Filamente bilden ein Netzwerk, das sich vom Zellkern, mit dem sie verknüpft sind, durch das Zytoplasma in die Peripherie zieht. Dabei treten sie an die Desmosomen heran und bilden über die Zellen hinweg ein Gerüstwerk von interzytoplasmatischen Filamenten.

Die intermediären Filamente unterteilt man in drei verschiedene Klassen. Zur Klasse I zählen saure Keratine (z.B. K 9, K 10, K 14), die in Epithelzellen und Derivaten der Epidermis (Haare und Nägel) vorkommen. In die II. Klasse ordnet man die basischen und neutralen Keratine (z.B. K 1, K 5, K 7) ein. Es lagert sich jeweils ein Keratin der Klasse I mit einem Keratin der Klasse II zu einem sogenannten Heterodimer zusammen. Insgesamt bilden die Keratine eine Großfamilie mit mindestens 30 Mitgliedern. Als wasserunlösliche Proteine besitzen sie die Aufgabe, epitheliale Zellen vor mechanischer Belastung, Wasserverlust und Hitze zu schützen. Zur Klasse III gehört das Vimentin, das in vielen Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie z. B. in Fibroblasten, Endothelzellen, Blutgefäßen und weißen Blutzellen vorkommt. Vimentin hat dabei vermutlich strukturerhaltende Aufgaben.

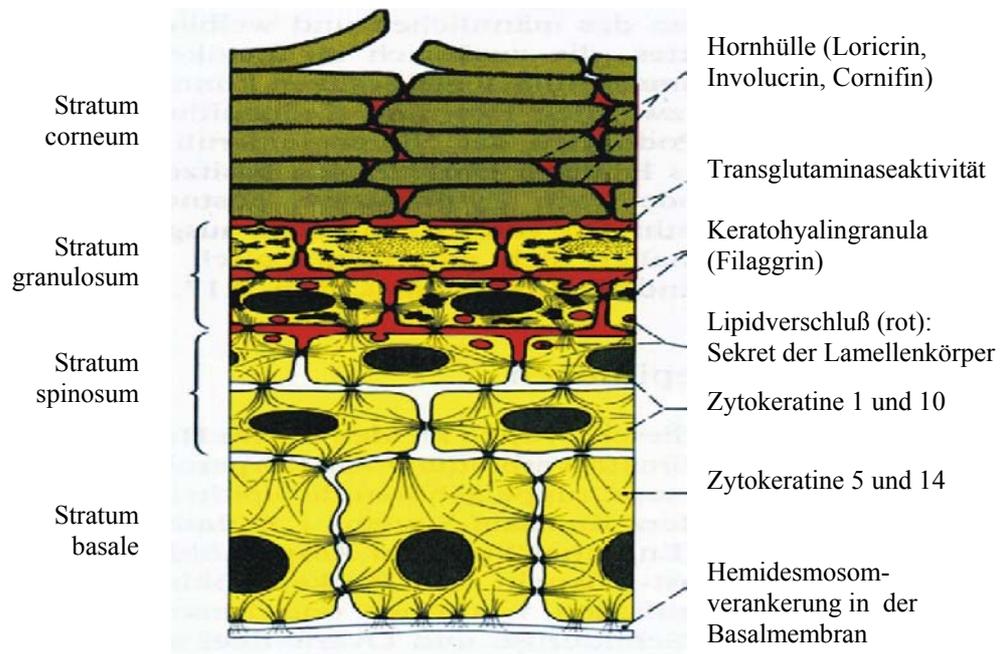
## 1.2. Aufbau der Epidermis

Die Haut (*Integumentum commune*) bedeckt die äußere Körperoberfläche und hat eine ungefähre Oberfläche von  $1,5 - 1,8 \text{ m}^2$ . Sie gliedert sich in *Kutis* (Haut im engeren Sinne), die *Subkutis*, sowie *Hautanhangsgebilde* (Haare, Nägel, Drüsen).

Die Epidermis unterliegt einer starken Zellerneuerung. Innerhalb von 30 Tagen wird die gesamte Epidermis durch Mitose ersetzt. 85 % aller Zellen der Epidermis sind Keratinozyten, die restlichen 15 % stellen Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans – Zellen (Makrophagozyten) und Merkel – Zellen (Tastzellen).

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden (keratinisierenden) Plattenepithel. In den basalen Lagen der Epidermis teilen sich kontinuierlich Stammzellen und differenzieren sich mit dem Aufstieg in höhere Schichten, wobei sich in jeder Schicht Zellen gleichen Differenzierungsstadiums befinden.

Die Epidermis besteht aus vier bis teilweise fünf deutlich voneinander abgrenzbaren Schichten :



**Abbildung 1:** Funktionelle Histologie des verhornten Plattenepithels (schematisiert).

Das *Stratum basale* besteht aus kubischen bis hochprismatischen Zellen, die über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Sie sind reich an sauren (besonders K 14), sowie basischen und neutralen ( besonders K 5 ) Keratine, die zu lockeren Bündeln zusammengelagert sind.

Im *Stratum spinosum* haben die Keratinozyten eine polygonale Morphologie. Sie besitzen Zytoplasmaausläufer, über die sie durch Desmosomen mit Nachbarzellen verknüpft sind. In diese Zytoplasmaausläufer ziehen Keratine hinein, die die Interzellularspalten aber nicht kreuzen. Nun werden besonders die Keratine K 1 (basisch) und K 10 (sauer) exprimiert, die sich zu einem Heterodimer, zu sogenannten Tonofibrillen zusammenlagern. Diese integrieren sich in das schon existierende Netzwerk aus K 5 und K 14 (Kartasova , T. *et al.*, 1993). Das Stratum spinosum stabilisiert die Haut und hält mechanischer Beanspruchung besonders gut stand, weshalb diese Schicht an Hand- und Fußflächen besonders dick ist.

Das *Stratum granulosum* besteht zumeist nur aus wenigen Schichten, in denen die Zellen stark abgeflacht sind und schon stark verdichtete Filamente sowie

membranumschlossene Granula aufweisen. Diese Granula werden in den Interzellularraum abgegeben und tragen im wesentlichen zur Abdichtung bei.

Ein *Stratum lucidum* ist nur in einer dicken Epidermis nachweisbar. Es handelt sich um eine Übergangsschicht, in der Zellorganellen lysosomal degradiert und Zellkerne pyknotisch werden.

Das *Stratum corneum* bildet die letzte Schicht der Epidermis. Ihre Dicke variiert anspruchsbedingt außerordentlich stark. Es kommen alle Vorgänge, die zur Verhornung der Epithelzelle führen, zum Abschluß. Morphologisch sind Veränderungen an der Zellmembran, Abbau aller Zellbestandteile und die Bildung von weiterem Keratin nachweisbar.

Da in einer Keratinozyten – Zellkultur der differenzierungsspezifische dermale Schichtenaufbau nur ansatzweise beobachtet werden kann, wurde von F.M. Watt das basal / suprabasal – Modell zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen in Kultur eingeführt.

Als basale Zellen werden dabei alle Zellen bezeichnet, die Kontakt mit der Haftmatrix (z.B. Zellkulturschale) besitzen. Zellen, die sich in zweiter oder höherer Schicht befinden und damit ausschließlich Kontakt zu anderen Zellen haben, werden als suprabasal definiert. Mit dem Aufstieg in höhere Zellschichten beginnt der Differenzierungsprozeß.

Die Zytokeratine K 5 und K 14 werden in Zellkultur schon in der basalen Schicht exprimiert. Ausnahmsweise kann man auch die differenzierungsspezifischen Zytokeratine K 1 und K 10 in Zellkultur schon vereinzelt in der basalen Schicht beobachten. Dies ist besonders ausgeprägt, wenn die Dichte zunimmt (Boukamp, P. *et al.*, 1988). Diese Beobachtung läßt sich *in situ* in einem Maushautmodell (Hautimplantationsversuche auf thymuslosen Nacktmäusen) bestätigen. Alle früh K 1 und 10 exprimierenden Zellen weisen eine veränderte Morphologie auf, d.h. sie haben im Vergleich einen längeren Zellkörper als nichtexprimierende Zellen und besitzen nur noch einen lockeren Kontakt zur Basalmembran (Regnier, M. *et al.*, 1986). Ähnlich wie K 1 und K 10 kann man auch den Beginn der Involucrin – Synthese vereinzelt in der basalen und konstant in der ersten suprabasalen Schicht beobachten. Das vernetzende Protein Involucrin kann man in der intakten Haut erst im Stratum granulosum nachweisen. Es gilt als differenzierungsspezifisch und legt sich der

Innenseite der Zytoplasmamembran an und bildet damit eine Hülle, die biochemisch den widerstandsfähigsten Teil verhornender Keratinozyten darstellt (Banks – Schlegel, S., Green, H., 1981). Zusammen mit den weiteren Hüllenproteinen Filлагrin und Loricrin, bilden sie ein dichtes Netzwerk.

Durch die calciumabhängige epidermale Transglutaminase (TGK), die die Bildung von  $\epsilon - (\gamma - \text{Glutamyl}) \text{Lysin} - \text{Bindungen}$  katalysiert, werden die Hüllenproteine zu einem festen Gitter verknüpft (Ogawa, H., Goldsmith, L.A., 1976; Rice, R.H.; Green, H., 1977). Die TGK wird in Zellkultur ausschließlich in suprabasal gelegenen Zellen exprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß durch Aktivierung der PKC die Expression von TGK mRNA signifikant gesteigert werden kann und sie damit eine Schlüsselrolle in der späten Differenzierung von epidermalen Mäusekeratinozyten spielt (Dlugosz, A.A. und Yuspa, S.H., 1994).

Die Verteilung von K 10, Involucrin und Filлагrin in der Zellkultur ist vergleichbar wie sie *in vivo* vorliegt (Breitkreuz, D. *et al.*, 1991). Dabei bleibt die spezifische Verteilung auch bis in hohe Passagen (> 150) von K 1 und K 10 erhalten (Ryle, C. *et al.*, 1989).

### **1.3. Molekulare Grundlagen der Wachstumsregulation durch Zellkontakte**

Jeder lebende Organismus ist das Resultat eines feinst ausgewogenen Regelnetzwerkes von wachstumsfördernden und wachstumshemmenden – z. T. differenzierungs-induzierenden – Signalen.

Als Prototyp für wachstumsfördernde Signale stehen die Wachstumsfaktoren. Über die Regulation von Wachstumsfaktoren gibt es eine Reihe von etablierten Modellen. Gut untersuchte Wachstumsfaktoren sind der Nervenwachstumsfaktor (NFG), das Erythropoetin (EPO), der koloniestimulierende Faktor (CSF), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF) (Wieser, R.J. und Oesch, F., 1995).

Über den Mechanismus der zellichteabhängigen Proliferationshemmung gesunder Zellen gibt es eine Reihe von Hypothesen. Durch intensive Forschung auf dem Gebiet der Kontaktinhibition in den letzten Jahren haben sich besonders zwei Hypothesen bestätigt.

Zum einen konnte nachgewiesen werden, daß die Sekretion von wachstumshemmenden Faktoren nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte eine Proliferationshemmung bewirkt. Wichtige Wachstumshemmer scheinen dabei der Transforming – growth – faktor –  $\beta$  (TGF –  $\beta$ ), der Tumornekrosefaktor –  $\alpha$  (TNF –  $\alpha$ ), sowie das Zytokin Interferon –  $\gamma$  (INF –  $\gamma$ ) zu spielen. Die Rolle von Chalononen in der Wachstumsregulation (niedermolekulare Peptide, die besonders in epithelialen Geweben nachweisbar sind) ist nicht eindeutig geklärt.

Zum anderen ist ein wesentlicher Kontrollmechanismus bezüglich des Wachstums, der insbesondere in Zellkultur beobachtet werden kann, die sogenannte kontaktabhängige Hemmung des Wachstums (Kontaktinhibierung). Diese Kontaktinhibierung wird in FH 109 – Zellen nach Ausbildung von Zell – Zell – Kontakten zwischen benachbarten Zellen durch Interaktion von zwei Zellmembranglykoproteinen, dem Contactinhibin, und seinem spezifischen Rezeptor reguliert, wodurch wachstumshemmende Signale in die Zelle generiert werden (Gradl, G. *et al.*, 1990). Contactinhibin hat eine Größe von 60 – 70 kD, wobei ein entscheidender Anteil den Oligosaccharidstrukturen zuzuordnen ist. Dabei scheinen  $\beta$  – glykosidisch gebundene Galaktosereste in humanen Fibroblasten (FH 109) eine wichtige Rolle zu spielen, da diese in semikonfluent ausgesäten Zellen durch Sialinsäuren maskiert sind. Erst mit Erreichen der Konfluenz werden die Sialinsäuren abgespalten und dadurch das wachstumshemmende Signal aktiviert. Auch das Zytoskelett scheint bei der Signalentstehung und Transmission ins Zellinnere aktiv beteiligt, da der Contactinhibin – Rezeptor eine zytoskelettäre Verankerung besitzt (Wieser, R.J. und Oesch, F., 1995).

Gesunde unveränderte Gewebezellen wachsen normalerweise in Kultur bis zur Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens (Monolayer), wobei sie entweder mit zunehmender Zelldichte ihre Wachstumsrate reduzieren und später komplett einstellen (z.B. Fibroblasten) oder suprabasal aufzusteigen beginnen, wodurch der Differenzierungsprozeß induziert wird (z.B. Keratinozyten).

Damit scheinen spezifische Zell – Zell – Kontakte eine entscheidende Rolle in der Wachstumskontrolle zu spielen. An einer Fibroblastenzellkultur konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von glutaraldehydfixierten Fibroblasten zu einem semikonfluenten Zellrasen eine Proliferationshemmung erzeugt wurde, die der Wachstumsrate konfluenter Kulturen entspricht (Wieser, R.J. *et al.*, 1985). Das gleiche Ergebnis konnte

mit der HaCaT – Zelllinie reproduziert werden. Fixiert man in einer Mikrotiterplatte einen dichten Zellrasen mit Glutardialdehyd und sät auf diesen Rasen HaCaT - Zellen aus, so kann man durch Quantifizierung der Proliferationsrate durch Einbau von [<sup>3</sup>H] – markiertem Thymidin eine Proliferationshemmung von bis zu 80 % gegenüber dem Wachstum von Zellen ohne fixierten Rasen feststellen (Doktorarbeit Ast, S., 1998).

Weitere Hypothesen, wie z.B. die Inhibierung des Wachstums durch Diffusionsbarrieren oder die Regulation des Zellwachstums über die Zellform, konnten bereits widerlegt werden.

Bei der Ausbildung von Zell – Zell – Kontakten kommt es zu interzellulären Verbindungen, die die Gewebearchitektur stabilisieren. Es gibt ein Reihe von unterschiedlichen Mechanismen der Zell – Zell – Adhäsion. Diese Zell – Zell – Verknüpfungen spielen in epithelialen Geweben eine besondere Rolle. Sie dienen unter Einbeziehung des Zytoskeletts der mechanisch stabilen Verknüpfung zu Gewebeverbänden. Daneben sind sie aber auch in anderen Geweben nachweisbar und scheinen während der Embryogenese eine differenzierungsspezifische Aufgabe zu besitzen. Durch diese interzellulären Verbindungen kommt die typische polygonale Morphologie (Pflastersteinrelief) humaner Keratinozyten im Zellverband zustande.

Man unterscheidet Desmosomen vom Typ I und Typ II, sowie CAM (cell adhesion molecule). Weiterhin gibt es Zellmatrixkontakte zur Befestigung des Zellverbandes auf einer extrazellulären Matrix (häufig der Basalmembran), wie fokale Kontakte und Hemidesmosomen.

Desmosomen benutzen als Zell – Zell – Verbindung **Cadherine**. Cadherine sind integrale Membranproteine, deren Aufgabe die Aufrechterhaltung der Calcium – abhängigen Zelladhäsion ist. Man differenziert E – Cadherine (epitheliale Zellen), N – Cadherine (Nerven– und Muskelzellen) und P – Cadherine (Plazenta und Epidermis). Bei der Verknüpfung des Zellkontakts assoziieren je zwei Cadherine benachbarter Zellen und gehen damit eine sogenannte homophile Bindung ein. An einer humanen Colorectal – Karzinom – Zelllinie konnte nachgewiesen werden, daß man durch Aktivierung der Proteinkinase C eine E – Cadherin – vermittelte Adhäsionssteigerung erzielt werden kann. Dadurch erhielten gering differenzierte Karzinomzellen eine gewebeentsprechende epitheliale Morphologie zurück (Cowell, H.E. und Garrod, D.R.,

1999). Intrazellulär binden die Cadherine entweder an **Catenine** (Desmosomen Typ II) die wiederum die Verankerung mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts ermöglichen oder an Adapterproteinen (Talin, Vinculin,  $\alpha$  – Actinin), die die Verankerung mit Zytokeratinen vermitteln (Desmosomen Typ I). Es gibt Hinweise, daß  $\beta$  – Catenine unabhängig von der interzellulären Adhäsion, d.h. nicht – Cadherin – assoziiert regulativ in die Wachstumskontrolle integriert sind (Zhu, A.J., Watt, F.M., 1999).

Fokale Kontakte benutzen als Adhäsionsmoleküle Integrine, die mit extrazellulären Matrixproteinen (z.B. Kollagen, Laminin, Elastin, Proteoglykane) über Adapterproteine (Talin, Vinculin,  $\alpha$  – Actinin) verbunden sind. Intrazellulär sind fokale Kontakte am Aktinfilamentennetzwerk verankert.

Bei Integrinen handelt es sich um Transmembranproteine, die aus einem Heterodimer, d.h. einer  $\alpha$ – und einer  $\beta$ – Kette bestehen. Sowohl von der  $\alpha$ – wie auch von der  $\beta$ –Kette gibt es eine größere Anzahl von Isoformen. In fokalen Kontakten kommt besonders die Integrinisiform  $\alpha 5$  –  $\beta 3$  vor. Diese Isoform kann durch PKC Aktivierung, z.B. durch den Phorbolster TPA auf Proteinebene hochreguliert werden. Dadurch weisen die fokalen Kontakte eine stärkere Adhäsion auf und schaffen damit die Grundlage für matrixabhängige Zellmigration (Fahraeus, R. und Lane, D.P., 1999). Im Rahmen der terminalen Differenzierung werden in Keratinozyten vermutlich PKC – abhängig die Integrine  $\alpha 2$  –  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$  –  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  –  $\beta 1$  geringer exprimiert als auf Stammzellen. Dadurch nimmt die Haftung zur Basalmembran, speziell zu den Matrixproteinen Laminin und Kollagen Typ IV, ab und ermöglicht der Zelle damit in höhere Schichten aufzusteigen (Adams, J.C., Watt, F.M., 1995).

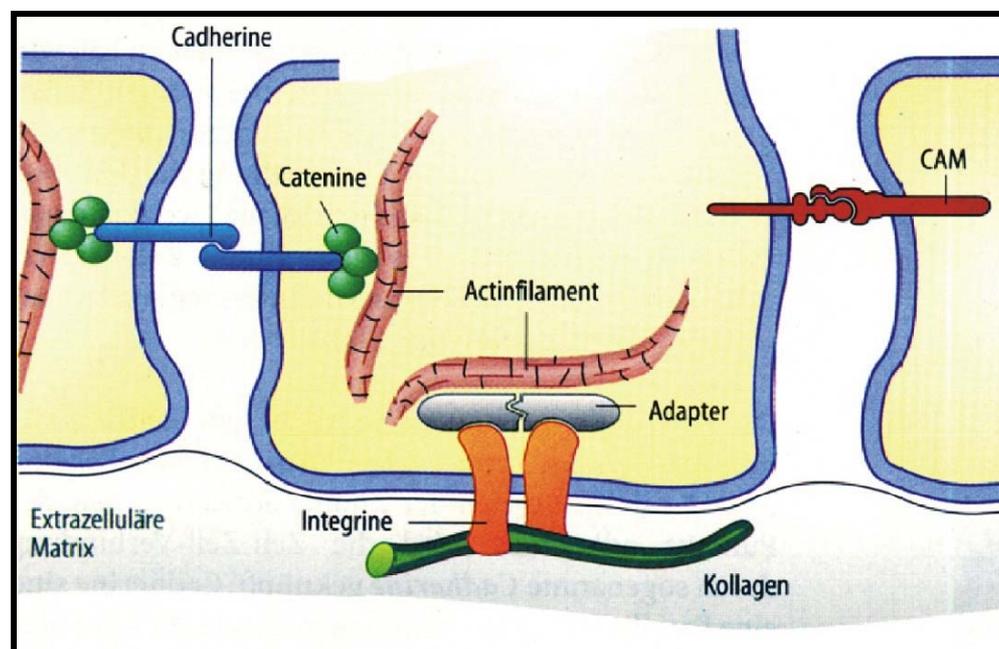
Hemidesmosomen benutzen als Adhäsionsmoleküle ebenfalls Integrine. Intrazellulär sind sie jedoch an Zytokeratinen verankert.

Eine Calcium – unabhängige Zell – Zell – Adhäsion wird durch die Mitglieder einer zur Immunglobulin – Großfamilie gehörenden Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen katalysiert. Von diesen **CAM** gibt es eine große Anzahl von Isoformen, die durch alternatives Spleißen des jeweiligen Gens entstehen. Sie sind über eine Transmembrandomäne mit der Zelle verankert. Wie Cadherine gehen auch CAM homophile Bindungen ein, die allerdings wesentlich schwächer sind als Cadherinbindungen. Die Rolle der CAM bei humanen Keratinozyten ist derzeit noch

unklar, da die Ausschaltung von CAM – Genen nur eine geringe morphologische Veränderung nach sich zieht. In Keratinozyten wird besonders die Untergruppe der ICAM's (zuerst auf Immunzellen entdeckt) exprimiert. ICAM können unter ionisierender Strahlung (10 – 40 Gy) als Schutzfunktion und unter Stimulation mit Interferon –  $\gamma$  verstärkt in der Zellmembran nachgewiesen werden (Behrends, U. *et al.*, 1994 und Winiski, A.P., Foster C.A., 1992).

Kontakt	Adhäsionsmolekül	Ligand	Zytoskelettanker
Desmosom Typ I	Cadherine	Cadherine auf benachbarter Zelle	Zytokeratine
Desmosom Typ II	Cadherine	Cadherine auf benachbarter Zelle	Aktinfilamente
Fokale Kontakte	Integrine	Extrazelluläre Martixproteine	Aktinfilamente
Hemidesmosomen	Integrine	Extrazelluläre Martixproteine	Zytokeratine

Tabelle 1: Cadherin– und Integrin – vermittelte Kontakte



**Abbildung 2 :** Schematische Darstellung des Aufbaus von Zell – Zell– bzw. Zell – Matrix – Kontakten.

#### 1.4. Die Proteinkinase C – Familie

Unter dem Begriff der Proteinkinase C (PKC) faßt man eine aus elf Mitgliedern bestehende Familie von Proteinkinasen zusammen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Enzymem der Größe 74 (PKC  $\lambda$ ) – 116 kD (PKC  $\mu$ ), die Serin- und Threoninreste phosphorylieren (Stabel, S., 1994).

Man unterteilt die einzelnen Isoformen in drei Gruppen:

##### 1.) Konventionelle PKC (cPKC):

Untergruppe	Vorkommen
alpha ( $\alpha$ )	ubiquitär
beta I ( $\beta$ I)	besonders in mesenchymalen Geweben
beta II ( $\beta$ II)	besonders in mesenchymalen Geweben
gamma ( $\gamma$ )	ausschließlich im Gehirn

Dieser Gruppe ist gemeinsam, daß sie zur vollen Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$  benötigen. Daneben werden sie durch Diacylglycerol und Phorbolster stimuliert.

##### 2.) Neue PKC (nPKC)

Untergruppe	Vorkommen
delta ( $\delta$ )	ubiquitär, größte Expression im Pankreas
epsilon ( $\epsilon$ )	besonders im Gehirn
eta ( $\eta$ )	besonders in Haut, Herz und Lunge
theta ( $\theta$ )	besonders im mesodermalen Gewebe
my ( $\mu$ )	glatte und quergestreifte Muskulatur

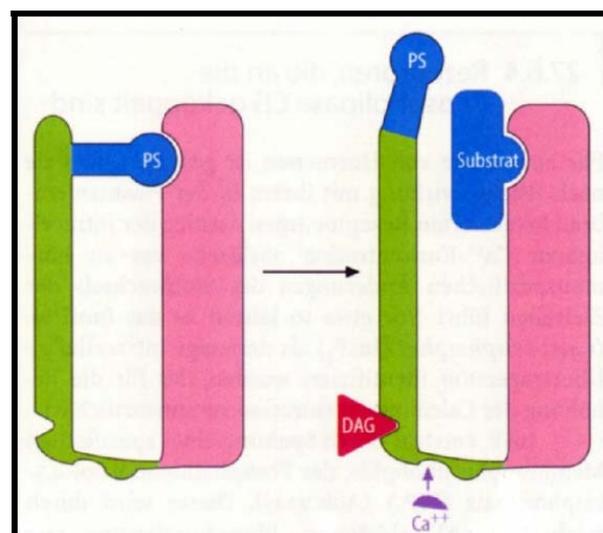
Die Gruppe der neuen PKC's zeichnet sich dadurch aus, daß sie  $\text{Ca}^{2+}$  – unabhängig ist, aber durch Diacylglycerol und Phorbolster aktiviert werden kann.

## 3.) Atypische PKC (aPKC)

Untergruppe	Vorkommen
zeta ( $\zeta$ )	ubiquitär
lambda ( $\lambda$ )	besonders in Keimdrüsen

Atypische PKC's sind wie neue PKC's  $\text{Ca}^{2+}$  – unabhängig und reagieren zudem nicht auf Stimulation mit Diacylglycerol und Phorbolestern (Newton, A. C., 1995).

Allen PKC's ist eine katalytische Domäne gemeinsam, die eine gut konservierte ATP – Bindungsregion und eine Substratbindungsstelle aufweist. Diese Substratbindungsstelle hat bei Vergleich der verschiedenen Mitglieder der PKC – Familie große Unterschiede. In ihrer aktivierten Form liegt die Proteinkinase C als lösliches Protein vor, wobei ihre Aktivierung durch Bindung von Diacylglycerol erfolgt, welches an der Innenseite der Plasmamembran gebunden ist. Dabei macht die Polypeptidkette eine Konformationsänderung durch, so daß die Substratbindungsstelle des Enzyms freigelegt wird. Diese Konformationsänderung kann teilweise durch gleichzeitige Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  erleichtert werden. Die Substrate der Proteinkinase C werden an Serin – bzw. Threoninresten phosphoryliert und ändern damit ihre biologische Aktivität.

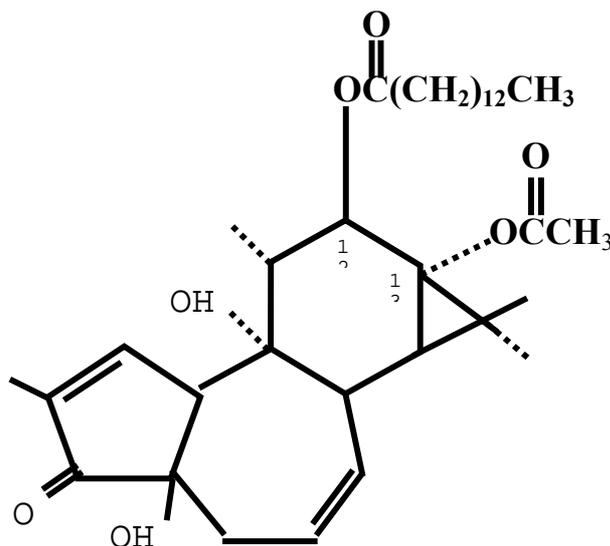


**Abbildung 3:** Schematisierte Darstellung des Aufbaus der PKC.

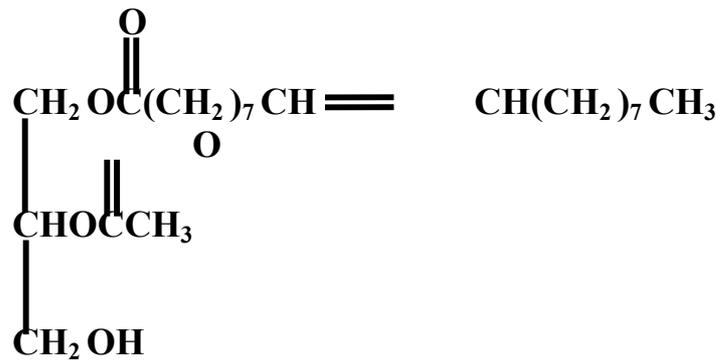
PS = Pseudosubstratstruktur

Die Gruppe der konventionellen und neuen PKC wird durch Diacylglycerol aktiviert. Es gibt mehrere Wege der Bildung von Diacylglycerol. Durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4, 5 – bisphosphat aus der Zellmembran durch die Phospholipase C entstehen Diacylglycerol und Inositol – 1, 4, 5 – trisphosphat (IP<sub>3</sub>). Beide second messenger besitzen eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden. IP<sub>3</sub> vermittelt die sofortige Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern. Dieser Weg wird besonders in der hormonellen Signaltransduktion durch Aktivierung konventioneller PKC's besprochen. Ein zweiter Weg für die Entstehung von Diacylglycerol, der besonders für Wachstum, Differenzierung und Mikrofilamentnetzwerkorganisation bedeutend ist, ist die Hydrolyse von Phosphatidylcholin mittels der Phospholipase D. Hierdurch werden besonders die neuen PKC aktiviert (Asaoka, Y. *et al.*, 1992). Durch Phospholipase D – Aktivierungsversuche konnte in humanen Keratinozyten eine PKC – vermittelte verstärkte Aktivierung der Transglutaminase (TDK) nachgewiesen werden, was eine späte Differenzierung induzierte (Jung, E.M. *et al.*, 1999).

Alle diacylglycerolabhängigen PKC's können auch durch Phorbolster wie z.B. 12 – o – Tetradodecanoylphorbol – 13 – acetat (TPA) aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zu Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden.



**Abbildung 4:** 12 – o – Tetradodecanoylphorbol – 13 – acetat (TPA)



**Abbildung 5:** Diacylglycerol (DAG)

TPA ist ein Tumorpromotor, der konventionelle und neue PKC's aktiviert. Im Gegensatz zum second messenger Diacylglycerin (DAG), der eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden besitzt, wird TPA erheblich langsamer metabolisiert. Dadurch verlängert sich die Wirkzeit gegenüber DAG deutlich.

Betrachtet man die Wirkung von TPA, so unterscheidet man eine kurzzeitige von einer langzeitigen Wirkung. Innerhalb von Minuten kommt es nach Zugabe von TPA zu einer Aktivierung aller TPA – sensiblen PKC's. Nach etwa 24 h tritt dann eine *down – Regulation* der PKC's auf Proteinebene ein. Durch die PKC – Daueraktivierung kommt es vermutlich zu einer verlängerten Membranassoziation der Enzyme, die eine Degradation derselben initiiert. Nach dieser Degradation ist keine oder nur noch eine geringfügige Aktivität nachweisbar (Keenan, C., *et al.*, 1997 / Nishizuka, Y., 1988 / Rodriguez – Pena, A., Rozengurt, E., 1984).

Zusammenfassend besitzt die Proteinkinase C – Familie eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Regulationsvorgängen in der Zelle, wie z. B. bei der Signaltransduktion, der Regulation von Wachstum, der Differenzierung und Netzwerkorganisation sowie der Beweglichkeit von Spermien (Rotem, R., 1990). Außerdem gibt es Hinweise, daß sie auch in die Karzinomentstehung involviert ist (Assert, R. *et al.*, 1999; Yuspa, S., 1998).

### 1.4.1. Die Proteinkinase C – $\delta$

Die PKC –  $\delta$ , die zur Untergruppe der neuen PKC's gehört, besitzt eine errechnete Größe von 77,5 kD, bei einer Länge von 673 Aminosäuren (Nishizuka, Y., 1988). Sie ist in fast allen Geweben vorzufinden, wobei ihre stärkste Expression in den Langerhans – Zellen des Pankreas nachweisbar ist (Arany, I *et al.*, 1997). Durch ihr ubiquitäres Vorkommen besitzt sie in verschiedenen Zellen unterschiedlichste Funktionen.

Die PKC –  $\delta$  wird sowohl in humanen Keratinozyten *in vivo* und in der HaCaT – Zelllinie *in vivo* (Hautimplantationsversuche auf thymuslosen Nacktmäusen (Breitkreutz, D. *et al.*, 1998)), sowie *in vitro*, d.h. in Zellkultur exprimiert.

Weitere Untersuchungen an Tumorgeweben, wie z. B. am Dickdarmadenom, haben eine erniedrigte Expression der PKC –  $\delta$  ergeben. Dies weist auf eine antiproliferative Rolle dieses Enzyms in der Wachstumsinhibition hin (Assert, R. *et al.*, 1999; Yuspa, S., 1998).

In vollendifferenzierten Körnerzellen des Kleinhirns (Nervenzellen) konnte der PKC –  $\delta$  in dem Vorgang der Apoptose (programmierter Zelltod) als integrale Funktion nachgewiesen werden (Villalba, M., 1998). Das gleiche Ergebnis konnte auch an Speicheldrüsenzellen der Parotis reproduziert werden (Reyland, M.E. *et al.*, 1999).

Die Untersuchung der PKC – Untergruppen ist problematisch, da es nur wenige spezifische Aktivatoren, bzw. Inhibitoren gibt. Phorbolster (z. B. TPA) aktivieren die klassischen und neuen PKC's, Inhibitoren wie Staurosporine (z.B. UCN – 01) oder H – 7 (1 – (5 – isoquinolinesulphonyl) – 2 – methylpiperazine) wirken gleich auf eine große Zahl von PKC's inhibitorisch. Dadurch ist es schwierig, den einzelnen PKC – Untergruppen eine spezifische Funktion zuzuschreiben.

Rottlerin (5,7 – dihydroxy – 2,2 – dimethyl – 6 – (2,4,6 – trihydroxy 3 – methyl – 5 – acetylbenzyl) – 8 – cinnamoyl – 1,2 chromene), ein Extrakt aus der Fruchtschale der *Mallotus philippinensis*, ist ein selektiver Inhibitor der PKC –  $\delta$  mit einer  $IC_{50}$  von 3 – 6  $\mu$ M. Dabei scheint Rottlerin mit ATP um die ATP – Bindungsstelle der PKC –  $\delta$  zu konkurrieren (Gschwendt, M, *et al.*, 1994). In einer malignen Gliomzelllinie verursacht Rottlerin zellmorphologische Veränderungen, wie spindelförmige Zellschrumpfung,

Vermehrung zytoplasmatischer Vakuolen und Ballung zellulärer Membrankomponenten im Zytoplasma (Parmer, T.G. *et al.*, 1997).

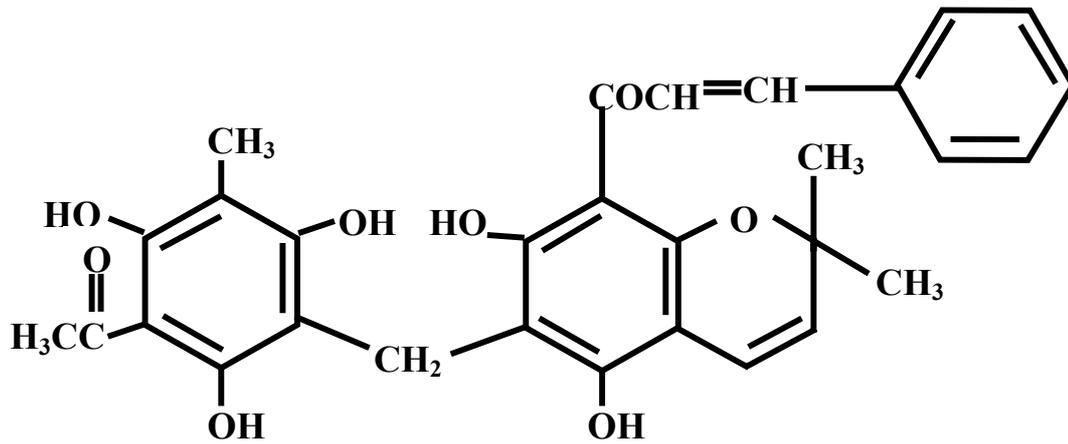


Abbildung 6: Rottlerin

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Entwicklung und Differenzierung, aber auch bei maligner Transformation von humanen Keratinozyten, kommt es funktions- und umgebungsabhängig zur Reorganisation der zytoskelettären Architektur. Der Aufbau der Epidermis, sowie ihre Veränderungen in den einzelnen Schichten sind weitestgehend bekannt. Induktoren, die differenzierungsspezifische Veränderungen verursachen, sind dagegen nur teilweise bekannt. Die Interaktion und Art der daran angeschlossenen Signalkaskaden sind sogar größtenteils unbekannt.

Gerade ein hochorganisiertes Gewebe, wie es Keratinozyten bilden, eignet sich besonders gut zur Untersuchung des fein ausgeprägten mikrofilamentären Netzwerks.

Die Proteinkinase C – Familie spielt eine entscheidende Rolle in Aufbau und der Reorganisation des keratinozytischen Zytoskeletts. In dieser Arbeit soll speziell untersucht werden, welche Rolle die Proteinkinase C –  $\delta$  in Bezug auf Zellmorphologie und Zytoarchitektur spielt. Dabei wird die Aktivität der Proteinkinase C –  $\delta$  gezielt durch den selektiven Proteinkinase C –  $\delta$  – Inhibitor Rottlerin supprimiert.

Daneben kann man der Proteinkinase C –  $\delta$  eine bedeutende Aufgabe in der Wachstumskontrolle zuordnen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Funktion die Proteinkinase C –  $\delta$  in Bezug auf den Regulationsmechanismus der Kontaktinhibition spielt. Durch Verwendung verschiedener PKC – Inhibitoren soll das Proliferationsverhalten beobachtet werden, um Rückschlüsse auf ihre regulative Funktion zu ziehen. Gegebenfalls ist es dann möglich, eine Korrelation zwischen morphologischer Veränderung und einer Aufhebung der Kontaktinhibition herzustellen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. ZELLKULTUR

##### 3.1.1. Zelllinien

In der Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

1. Humane Keratinozyten ( HaCaT )

Der Name der HaCaT – Zelllinie leitet sich von den ursprünglichen Kultivierungsbedingungen ab: Human adult skin keratinocytes, low Calcium (0,2 mM), high Temperature (38,5° C).

Diese Zelllinie wurde aus histologisch normaler Haut gewonnen. *In vitro* immortalisierten die Zellen spontan, wobei sie weiterhin eine vollständige Differenzierungsfähigkeit beibehalten. Sie exprimieren die differenzierungs – spezifischen Zytokeratine 1 und 10, sowie die Differenzierungsmarker Involucrin und Filaggrin. Trotz Immortalisierung durch Defekt des p53 Gens und chromosomalen Veränderungen, sind die Zellen weiter kontaktinhibiert (Boukamp, P., *et al.*, 1988 / Fusenig, N.E. und Boukamp, P., 1998).

In dieser Arbeit wurden humane Keratinozyten ab der Passage 40 – 65 verwendet, da sie ab Passage 70 beginnende Alterserscheinungen aufweisen.

2. FH 109 (Firma LIA, München)

Primäre Zelllinie aus humanen, diploiden, embryonalen Lungenfibroblasten. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um nicht immortalisierte Zellen mit einem begrenzten Teilungspotential von 50 bis 100 Teilungen pro Zelle (Darnell *et al.*, 1994). Sie unterliegen *in vitro* einer dichteabhängigen Wachstumshemmung, d. h. sie hören auf zu proliferieren, sobald sie einen einschichtigen Zellrasen (Monolayer) ausgebildet haben. Dabei haben sie die für Fibroblasten typische Spindelform und ordnen sich bei zunehmender Zelldichte parallel zueinander an.

Da sie etwa ab Passage 16 Alterserscheinungen zeigen, wurden für die Versuche nur die Passagen 6 –11 verwendet.

### 3.1.2. Zellkulturmedium

Die verwendeten HaCaT-Zellen wurden in der *in – vitro* – Zellkultur adhären auf Gewebekulturschalen kultiviert. Als Nährmedium wurde das Cell – Growth – Medium (CG – Medium) verwendet.

#### Zusammensetzung des CG-Mediums (nach Vitromex) :

<u>Aminosäuren</u>	<u>mg/l</u>
L – Alanin	19,87
L – Arginin	84,00
L – Asparagin	17,22
L – Asparaginsäure	23,48
L – Cystin	28,00
L – Cystin 2 HCl	62,57
L – Glutamin	59,60
L – Glutaminsäure	584,00
Glycin	30,00
L – Histidin HCl x H <sub>2</sub> O	42,00
L – Isoleucin	105,00
L – Lysin HCl	146,00
L – Methionin	30,00
L – Phenylalanin	66,00
L – Prolin	31,79
L – Threonin	95,00
L – Tryptophan	16,00
L – Tyrosin	103,79
L – Valin	94,00

<u>Vitamine</u>	<u>mg/l</u>
Biotin	0,013
D – Ca <sup>2+</sup> – Pantothenat	4,00
Cholinchlorid	4,00
Folsäure	4,00
i – Inosit	7,20
Nicotinsäureamid	4,00
Pyridoxal HCl	4,00
Riboflavin	0,40
Thiamin HCl	4,00
Vitamin B <sub>12</sub>	0,013

<u>Anorganische Salze</u>	<u>mg/l</u>
CaCl <sub>2</sub>	200,00
Fe(NO <sub>3</sub> ) x 9 H <sub>2</sub> O	0,10
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,075
KCl	400,00
MgSO <sub>4</sub>	97,67
NaCl	6400,00
NaHCO <sub>3</sub>	2500,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	125,00
Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Se	0,022

<u>Andere Komponenten</u>	<u>mg/l</u>
Cholesterin	57,50
D – Glukose	4500,00
HEPES	3500,00
Natriumpyruvat	87,42
Phenolrot	15,00
Rinderserumalbumin	1000,00
Sojabohnenlipide	100,00
humanes Transferrin	0,032
β – Mercaptoethanol	50000,00

Zu 500 ml CG – Medium wurden folgende steril aliquotierte Lösungen zugesetzt :

1. ) 2,5 ml fötales Kälberserum : FCS (fetal calfserum) (Greiner)  
(enthält wichtige Hormone, Bindungs– und Anheftungsfaktoren (Fibronektin), sowie Peptid – Wachstumsfaktoren (EGF, IGF, PDGF usw.)
2. ) 5 ml Antibiotika – Lösung : Penicillin 10000 U / ml  
Streptomycin : 10 mg / ml in aqua dest.  
(zur Vermeidung bakterieller Kontamination)

### **3.1.3. Zellpassagierung**

- Geräte :
- Inkubator (Labotect)
  - Vertical Laminar Flow Box (Inter Med)
  - Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
  - Zentrifuge (Hettich)
  - Vakuumpumpe (Lebold – Heraeus)

- Dampfsterilisator (Fraciomat electronic, Fritz Gössner)
- Pipettenhilfe (Pipettus)
- Phasenkontrastmikroskop (Zeiss)
- Fluoreszenzmikroskop (Nikon)
- Kryotank (Taylor Wharton)

Materialien:

- Gewebekulturschalen, 6 / 10 / 15 cm Durchmesser ( Greiner, Falcon )
- Multiwellplatten, 96 wells pro Platte (Greiner)
- Sterile Kunststoffpipetten, 1 / 5 / 10 / 25 ml (Greiner)
- Sterilfiltriereinheit (Nalgene)
- Pasteurpipetten (WV)
- Zentrifugenröhrchen 15 / 50 ml (Falcon)
- Glasflasche mit Teflondichtung (Schott)
- Spitzen für Einfach- und Multipipetten (Nichiryo)

Reagenzien:

- Natriumchlorid (Roth)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Merk)
- Kaliumchlorid (Roth)
- Kaliumhydrogenphosphat (Roth)
- EDTA (Serva)
- Penicillin (Gibco)
- Streptomycin (Gibco)
- Salzsäure (Merk)
- Ethanol (Roth)
- Dimethylsulfoxid (Roth)

Fertige Lösungen:

- CG – Medium (Vitromex)
- 2, 5% Trypsin – Stammlösung (Seromed)
- FCS (Greiner)

Lösungen:

- PBS – Lösung:
 

136,80 mM	NaCl
2,68 mM	KCl
1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
3,20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	in aqua dest.
	(mit HCl auf pH – 7,5
	eingestellt, dampfauto-
	klaviert, Lagerung bei 4° C)
- Trypsinlösung:
 

0,025 % Trypsin
0,020 % EDTA in PBS
(steril filtriert, Lagerung bei
-20° C)

- Penicillin / Streptomycin: 10000 U / ml Penicillin  
10 mg / ml Streptomycin  
(steril filtriert, Lagerung  
bei – 20° C)
- CG – Medium mit 0,5 % FCS
- CG – Medium mit 5 % FCS

Die Kulturbedingungen im Brutschrank betragen 37° C und 10 % CO<sub>2</sub> bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Stammkulturen wurden in Petrischalen von 15 cm Durchmesser mit 20 ml Medium pro Schale kultiviert. Die HaCaT – Zellen wurden passagiert, bevor ein konfluenter Rasen erreicht wurde. Je nach Zellbedarf wurden die Zellen 1 : 5, 1 : 10 oder 1 : 20 gesplittet.

Die hierbei verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad bei 37° C temperiert.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in der Vertikal Laminar Flow Box durchgeführt. Sämtlich verwendete Materialien wurden dampfautoklaviert (25 min., 120° C) und steril verpackt aufbewahrt. Vor jedem Arbeitsgang erfolgte eine Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion mit 70%igem Ethanol.

#### Durchführung :

1. Nährmedium absaugen.
2. Zellrasen dreimal mit PBS (10 ml) waschen.
3. 10 ml 0,05 % – iges EDTA in PBS auf dem Zellrasen verteilen. Die Inkubationszeit beträgt 15 min. bei 37° C.
4. 1 ml Trypsinlösung (0,025 %) auf dem Rasen verteilen. Die Inkubationszeit beträgt 5 min. bei 37° C
5. Unter dem Mikroskop wird die Abrundung und Ablösung der Zellen von der Petrischale kontrolliert. Die Zellen werden mit 9 ml 5 % FCS / CG – Medium vorsichtig von der Platte gespült und durch langsames Resuspendieren in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Das CG – Medium mit 5 % FCS stoppt durch den Proteaseinhibitor Antitrypsin die peptische Wirkung des Trypsins ab.

6. Zentrifugieren bei 800 Upm für 10 min. (nur, falls die Bestimmung der Zellzahl durchgeführt werden soll).
7. Die Zellen werden in 0,5 % FCS / CG – Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt.

#### **3.1.4. Bestimmung der Zellzahl**

Um Zellen in bestimmter Dichte aussäen zu können, muß die Zellzahl bestimmt werden. Dafür entnimmt man bei der Zellpassagierung (vgl. 4.1.3. unter Schritt 6) der Zellsuspension ein Aliquot und versetzt es im Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau. Trypanblau ist ein „Vitalfarbstoff“, das heißt: er wird nur von toten Zellen mit verletzter Plasmamembran aufgenommen. Dadurch kann man beim Zählen lebende von toten Zellen unterscheiden (Cook und Mitchell, 1989).

- Gerät :
- Mikroskop (Zeiss)
- Materialien :
- Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer)
- Reagenzien :
- Trypanblau
- Lösung :
- 0,1 % (w/v) Trypanblau (Sigma) in PBS

#### Durchführung :

1. Von der nach dem Trypsinisieren erhaltenen Zellsuspension (siehe 4.1.3. unter 6.) wird ein Aliquot von 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau – Lösung versetzt.
2. Die ungefärbten Zellen werden in der Neubauer – Zählkammer unter dem Mikroskop pro 4 Großfelder ausgezählt.
3. Die ermittelte Zellzahl multipliziert mit dem Kammerfaktor 2500 und dem Verdünnungsfaktor 2 (durch die Verdünnung mit der Trypanblau – Lösung) ergibt die Zellzahl pro ml Suspension.

Die Zellsuspension erfüllt in der Kammer ein definiertes Volumen. Aus der in einer bestimmten Fläche gezählten Zellen  $n$  kann die Zellkonzentration  $c$  (Zellen pro ml) der Ausgangssuspension errechnet werden. Das Volumen der gesamt ausgezählten Fläche beträgt  $0,04 \text{ mm}^3$ . So errechnet sich die Zellkonzentration der Zellsuspension unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 2 mit der Trypanblaulösung zu :

$$C = n \times 5000$$

### 3.1.5. Kryokonservierung

Insbesondere Zellen niedriger Passagen wurden in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ \text{C}$  kryokonserviert. Durch stufenweises Einfrieren und der Anwesenheit eines Frostschutzmittels (DMSO = Dimethylsulfoxid) soll verhindert werden, daß die Zellen durch die Bildung von Eiskristallen zerstört werden.

Lösungen :                      • Einfrierlösung : 10 % DMSO (v / v) / FCS

Durchführung :

1. Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension (siehe 4.1.4.).
2. Zellen abzentrifugieren und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Einfrierlösung aufnehmen, gut resuspendieren.
3. In 1 ml – Portionen auf Kryoröhrchen verteilen, in Styropor verpackt bei  $-20^\circ \text{C}$  einfrieren.
4. 24 h bei  $-70^\circ \text{C}$  aufbewahren, dann in der Kryoschiene des Stickstofftanks versenken.

Der Auftauprozess erfolgt rasch bei  $37^\circ \text{C}$ . Der Inhalt eines Kryoröhrchens wird auf eine mediumgefüllte Petrischale gegeben und das Medium nach einem Tag erneuert, um das DMSO zu entfernen.

### 3.1.6. Test auf Mykoplasmenkontamination

Frisch aufgetaute Zellen wurden nach einer Passage auf Mykoplasmeninfektion untersucht.

Mykoplasmen sind 125 nm bis 150 nm kleine Prokaryonten (Hahn, 1994). Sie sind aufgrund einer fehlenden Zellwand sehr flexibel, können so herkömmliche Sterilfilter passieren und über sterilfiltrierte Lösungen in die Zellkultur gelangen. Im Gegensatz zu anderen Bakterien sind diese Mikroorganismen mikroskopisch nicht erkennbar. Man benutzt daher eine besondere Färbemethode, bei der spezifisch die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',5'-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) angefärbt wird. Liegt eine Infektion mit Mykoplasmen vor, so werden neben den Zellkernen auch die DNA-Moleküle der Kontaminanten als kleine gelbe Punkte unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Die Kernfärbung wurde jeweils bei 340 nm im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei stellen sich die Zellkerne als kompakte, stark hellblau leuchtende Gebilde dar. Befinden sich Zellen in der Mitose kann man die einzelnen Chromosomen gut erkennen.

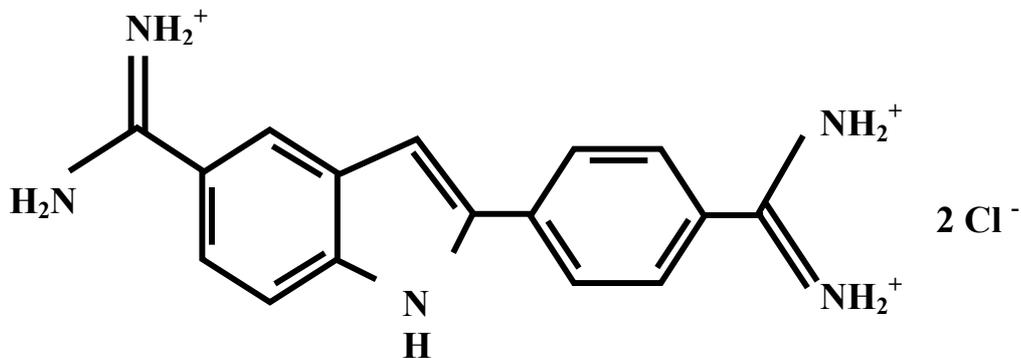


Abb. 1 : DAPI

- Geräte :
- Fluoreszenzmikroskop (Nikon)
  - Wasserstrahlpumpe

- Materialien :
- runde / quadratische Glasplättchen
  - Objektträger
  - Gummiringe, 1 cm Durchmesser
  - feuchte Kammer
  - Nagellack

- Reagenzien :
- Methanol (Riedel de Haen)
  - Histogel – Eindeckellösung (Gibco)
  - DABCO (Sigma)
  - DAPI (Boehringer Mannheim)
  - Ethanol p.a. (Roth)

- Lösungen:
- DAPI – Stammlösung : 5  $\mu$ l / mg in PBS (Lagerung bei  $-20^{\circ}$  C)
  - DAPI – Gebrauchslösung : 0,2 ml Stammlösung in 10 ml Methanol
  - Eindeckellösung 0,25 g DABCO in 10 ml Histogel – Eindeckelmedium.
  - Fixierlösung: Methanol / Essigsäure 3/1 (v/v).

Durchführung :

1. In einer Petrischale werden zwei Deckgläschen für 10 min. mit 70 % Ethanol desinfiziert.
2. Dann werden sie dreimal mit PBS und einmal mit Medium gewaschen.
3. Zellen werden auf desinfizierten Deckgläschen mindestens zwei Tage kultiviert.
4. Zellen dreimal mit PBS waschen und zweimal je 5 min. mit Fixierlösung behandeln.
5. Die luftgetrockneten Deckgläschen 15 min. mit 2 ml Gebrauchslösung im Dunkeln färben.

6. Die Zellen einmal mit Methanol und einmal mit PBS waschen.
7. Deckgläschen werden mit nach unten gerichtetem Zellrasen auf einem Objektträger fixiert.
8. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit einem Ölimmersionsobjektiv bei 100 – facher Vergrößerung und Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm.

### 3.1.7. Fixierung von Zellen

Um eine Kontaktinhibierung über den Kontaktinhibinmechanismus, wie es bei konfluenten Zellen der Fall ist, nachzuahmen, wird ein konfluenter Zellrasen mit Glutaraldehyd fixiert. Sät man auf diesen fixierten Rasen nichtfixierte HaCaT-Zellen, kommt es zur Wachstumshemmung. Diese Technik hat den Vorteil, daß der Zeitpunkt der Kontaktinhibierung im Experiment genau gesetzt werden kann. Andere Effekte wie z.B. Mediummangel werden dadurch umgangen.

Materialien :

- 96 – Well – Mikrotiterplatte (Greiner)

Reagenzien :

- Glutaraldehydlösung 25 % (Sigma)
- Glycin (Roth)

Lösungen :

- CG – Medium (0,5 % FCS, PEST)
- PBS
- Fixierlösung : Glutaraldehyd mit PBS auf 1 % (v/v) verdünnen.
- Blocklösung : 0,1 M Glycin in PBS, sterilfiltriert.

Durchführung :

1. In eine 96 – Well – Mikrotiterplatte werden pro Well  $7 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Die Zellen werden 24 h kultiviert.

2. Nach mikroskopischer Kontrolle der Konfluenz des Rasens wird das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt. Danach wird der Rasen dreimal mit PBS gewaschen.
3. Pro Well werden 100  $\mu$ l einer 1 % – igen Glutaraldehydfixierlösung gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 30 min. bei RT.
4. Zellen dreimal mit PBS waschen.
5. In jedes Well werden 100  $\mu$ l der Blocklösung gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 30 min. bei RT.
6. Zellen dreimal mit PBS waschen.
7. Pro Well werden je 200  $\mu$ l CG – Medium (0,5 % FCS, PEST) gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 1 h. Dabei wird die Mikrotiterplatte in den Zellkulturschrank gestellt.
8. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, werden – je nach Versuchsansatz – Zellen in entsprechender Dichte auf den fixierten Rasen ausgesät.

### 3.1.8. Proliferationstest

Um die Wirkung definierter Bedingungen auf die Proliferation von Zellen zu untersuchen, ermittelt man die Proliferationsrate. Hierzu werden die Zellen mit Tritium markiertem Thymidin inkubiert, welches als Baustein während der Replikationsphase in die DNA eingebaut wird. Die Messung der über einen bestimmten Zeitraum aufgenommenen Radioaktivität gibt indirekten Aufschluß über die proliferative Aktivität der Zellen.

Als Methode benutzt man dafür die Flüssigkeits – Szintillations – Spektroskopie. Hierbei wird die Energie des radioaktiven Präparats in Form von  $\beta$  – Strahlung über Kollision auf Lösungsmittelmoleküle übertragen. Diese geben die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge 260 – 340 nm frei. Um diese Strahlung messen zu können, wird dem Lösungsmittel eine zweite Komponente zugefügt. Diese Verbindung fluoresziert und wird *primärer Szintillator* genannt. Das

Absorptionsspektrum des Szintillators überlagert komplett das Emissionsspektrum des Lösungsmittels. So wird die vom Lösungsmittel als Licht freigegebene Energie vom Szintillator aufgenommen und bei längerer Wellenlänge als Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben. Diese kann vom Szintillationszähler über einen Photoverstärker (elektrisch als Licht – Impulse) verarbeitet und als „Counts per minute“ angegeben werden.

Geräte :

- Zellharvester (Scatron)
- Trockenschrank (Memmert)
- Vials (Roth)
- Racks (Hewlett – Packard)
- Counter (Hewlett – Packard)

Materialien :

- Multiwellplatte mit 96 Vertiefungen (Greiner)
- Glasfaserfilter (Wathman)

Reagenzien und fertige Lösungen siehe 4.1.3.

Lösungen :

- [ $^3\text{H}$ ] – Thymidin – Stammlösung = Methyl – [ $^3\text{H}$ ] – Thymidin, 740 GBq / mmol (Hartmann)
- [ $^3\text{H}$ ] – Thymidin – Gebrauchslösung = 370 kBq / ml in Nährmedium (Lagerung bei 4° C)
- Szintillator (Rotiszint eco, Roth)
- 0,06 M EDTA in PBS
- 2,5 % – ige Trypsinlösung

Durchführung:

1. Zellen werden dem Versuch entsprechend in bestimmter Anzahl in eine 96 – Well – Mikrotiterplatte ausgesät und wie angegeben behandelt.
2. Nach entsprechender Kulturdauer werden in jeden Ansatz 25  $\mu\text{l}$  der [ $^3\text{H}$ ] – Thymidin – Gebrauchslösung gegeben und 4h inkubiert.

3. Die Platte wird ausgeschlagen und dreimal mit PBS gewaschen.
4. In jedes Well werden 10 µl 0,05 M EDTA – Lösung gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 20 min bei 37° C.
5. Danach werden pro Well 10 µl einer 2,5 % – igen Trypsinlösung zugegeben. Die Inkubationszeit beträgt 15 min. bei 37° C. Abschließend wird die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert.
6. Die Multiwellplatte wird bei – 20° C gelagert, bis die Ansätze vollständig durchgefroren sind. Dabei werden die Zellen zerstört und die DNA liegt nach dem Auftauen frei vor.
7. Mit Hilfe des Zellharvesters werden die Zellbruchstücke auf Glasfaserfilter gespült.
8. Das Filterpapier wird im Trockenschrank getrocknet.
9. Die den einzelnen Wells entsprechenden Filterstücke werden in Vials gegeben und mit jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt.
10. Die Proben werden mit Hilfe des Szintillationszählers ausgewertet.

### **3.1.9. Hämatoxylin – Eosin – Färbung**

Die meisten Zellen und Gewebe sind farblos. Deshalb wurden histologische Färbungen entwickelt, die dazu dienen, Zell- und Gewebestandteile mikroskopisch erkennbar und voneinander unterscheidbar zu machen. Die Färbungen beruhen auf Bindung der Farbstoffe an azidophile, basophile oder neutrophile Strukturen. Es gibt eine große Anzahl histologischer Färbemethoden.

Die HE – Färbung ist ein etabliertes Verfahren in der Histologie, bzw. in der Histopathologie. Hierbei werden alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen (z. B. Chromatin der Zellkerne, manche Zytoplasmabestandteile) durch Hämatoxylin blau angefärbt. Alle azidophilen Bestandteile (z. B. Zytoplasma und die meisten Interzellulärsubstanzen) werden durch Eosin rot gefärbt (Junquiera, 1991).

- Materialien :
- 60 mm Zellkulturschalen (Greiner)
  - 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon)
- Reagenzien :
- Ethanol 70 % (Roth)
  - Ethanol 100 % (Roth)
  - HCl (Merck)
- Lösungen :
- Differenzierungslösung : 22,5 ml Ethanol 100 %  
2 ml konzentrierte HCl  
auf 30 ml auffüllen.
  - PBS
  - Eosin – Lösung (Sigma)
  - Hämatoxylin – Lösung (Sigma)

Durchführung :

1. Dreimal mit PBS waschen
2. In Zellkulturschale 10 min. lang 70 % – iges Ethanol geben.
3. Ethanol vorsichtig abgießen und 3 min. mit Hämatoxylin färben.
4. Einmal kurz mit Leitungswasser spülen.
5. Zellen mit Differenzierungslösung kurz entfärben.
6. Unter fließendem Leitungswasser Zellen 10 min. lang abspülen.
7. Einmal mit aqua dest. spülen.
8. Die Zellkultur 5 min. lang mit Eosin färben.
9. Abschließend überschüssiges Eosin mehrmals mit aqua dest. herunterspülen.

Das Ergebnis der Färbung wird am Mikroskop (Nikon) bei einer 20 bis 120 – fachen Vergrößerung betrachtet.

## 3.2. PROTEINGEWINNUNG AUS DER ZELLKULTUR

Die Methode zur Gewinnung von zellulären Proteinen beruht meist auf der Verwendung von Detergenzien, die die Zellmembran solubilisieren. Durch diese Detergenzextraktion gewinnt man integrale Plasmamembranproteine. Der Zellkern, sowie das Zytoskelett und daran assoziierte Proteine, bleiben an der Kulturschale haften. Sollen diese detergenzienunlöslichen Komponenten auch erfaßt werden, müssen sie mechanisch vom Substrat abgelöst werden. In diesem Verfahren wird zuerst der Extraktpuffer zugegeben und dann werden mit diesem die Proteine von der Kulturschale abgeschabt. Die gewonnenen Zellextrakte unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihrer Proteinzusammensetzung.

### 3.2.1. Gewinnung eines Gesamtzelllysates

Zur Herstellung eines Gesamtzelllysates wurden die Zellen mit reduzierendem SDS – Probenpuffer aufgekocht. Die proteolytischen Enzyme wurden dabei sofort inaktiviert, so daß auf den Einsatz von Proteaseinhibitoren verzichtet werden konnte.

#### Geräte:

- Zentrifuge (Eppendorf)
- Heizblock (Eppendorf)
- Wasserstrahlpumpe
- Pipetten
- Zellschaber
- Vortexer

#### Materialien:

- Polypropylen – Zentrifugenröhrchen = Caps (Eppendorf)
- Zellschaber
- Sterilfilter (Acrodisc)

#### Reagenzien:

- Tris
- SDS (Serva)
- DTT (Sigma)
- Saccharose (Roth)
- Bromphenolblau (Serva)

Lösungen:

- 1,0 M Tris pH 6,8: 12,1 g Tris in 100 ml aqua dest. lösen, mit HCl auf pH 6,8 einstellen, filtrieren und autoklavieren.
- 20 % SDS: 20 g SDS in 100 ml aqua dest. lösen.
- 1 M DTT: 5 g Dithiothreitol
- zweifacher Laemmli – Sample – Buffer :
 

1,0 M Tris pH 6,8	1,2 ml
20 % SDS	5,0 ml
Saccharose	2,0 g
aqua dest.	ad 10 ml
Bromphenolblau	q.s

Der zweifache Puffer wurde zu einem **reduzierenden Puffer** verdünnt:

- 5 Teile zweifacher Laemmli – Sample – Buffer
- 4 Teile aqua dest. (autoklaviert)
- 1 Teil 1 M DTT

Durchführung :

1. Nährmedium über den Zellen absaugen.
2. Dreimal waschen mit 1,0 M Tris pH 6,8.
3. 500 µl kochenden SDS-Probenpuffer auf die Zellen geben und kurz inkubieren lassen.
4. Zellen abkratzen, mit einer Pipette in ein Cap überführen und gut vortexen.
5. Zellen im Heizblock 10 min. aufkochen.
6. 20 sec. lang das entstandene Kondenswasser und nicht gelöste Zellfragmente bei 7000 Upm abzentrifugieren.

### 3.3. BIOCHEMISCHE METHODEN

#### 3.3.1. Proteinisolierung durch Fällung

Nach einem Zellaufschluß liegen die löslichen Proteine gemeinsam mit Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und anderen löslichen niedermolekularen Verbindungen vor. Ziel ist das selektive Ausfällen von Proteinen, wobei die anderen Komponenten in Lösung bleiben.

Ein Protein besitzt an seinem isoelektrischen Punkt die geringste Löslichkeit. Durch Änderung der Ionenstärke, des pH – Wertes und durch Zugabe von Wasser mit mischbaren Lösungsmitteln, können Proteine ausgefällt werden.

Die hier angewandte Fällung beruht auf Abnahme der dielektrischen Konstanten des Lösungsmittels und der Dehydration der Proteine in einem Lösungsmittel. Ersteres vergrößert die Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzt geladenen Oberflächenresten. Dadurch bilden sich große Aggregate, die aus der Lösung ausfallen. Durch die Dehydration wird dieser Effekt unterstützt.

##### 3.3.1.1. Chloroform – Methanol – Fällung

Die Chloroform – Methanol – Methode eignet sich besonders zur Fällung kleinster Proteinmengen, z.B. zur Analyse durch SDS – PAGE. Die Proteine werden qualitativ erfaßt, eignen sich also für analytische Zwecke.

Geräte :

- Zentrifuge (Eppendorf)
- Vortexer
- Pipetten

Materialien :

- Polypropylen – Zentrifugenröhrchen = Caps (Eppendorf)

Reagenzien :

- Chloroform (Roth)
- Methanol (Riedel de Haen)

Durchführung :

1. Die gewünschte Menge Proteinlösung wird in jeweils zwei Eppendorf – Caps überführt und mit aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt.
2. 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl aqua dest. werden zugegeben und gut gemischt (vortexen).
3. Bei 13000 Upm wird in der Eppendorf – Zentrifuge 3 min. lang zentrifugiert. Dabei scheidet sich das Chloroform aus dem Lösungsmittelgemisch ab.
4. Die obere Phase (Methanol und Wasser) wird bis kurz oberhalb der Phasengrenze vorsichtig abgesaugt. An der Grenze zur Chloroformphase befindet sich das Proteinpellet.
5. 300 µl Methanol werden zugegeben.
6. Bei 13000 Upm wird 5 Minuten lang zentrifugiert.
7. Der Überstand wird abgesaugt (verworfen) und das im Cap verbleibende Pellet wird getrocknet.

**3.3.2. Proteinquantifizierung (BCA – Test)**

Zur Bestimmung der Gesamtproteine in einer Lösung wurde eine Farbreaktion mit BCA (**B**icin **C**hronic **A**cid) in Gegenwart von Kupfer – II – Ionen angewandt (Smith, 1985). Es handelt sich dabei um die Biuret – Reaktion, bei der reduktive Gruppen des Proteins im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  – Ionen zu  $\text{Cu}^+$  – Ionen reduzieren. Die  $\text{Cu}^+$  – Ionen ergeben einen intensiv gefärbten Komplex mit je zwei Molekülen BCA (vgl. Abbildung 2). Die Absorption der Lösung wird bei 562 nm gemessen.

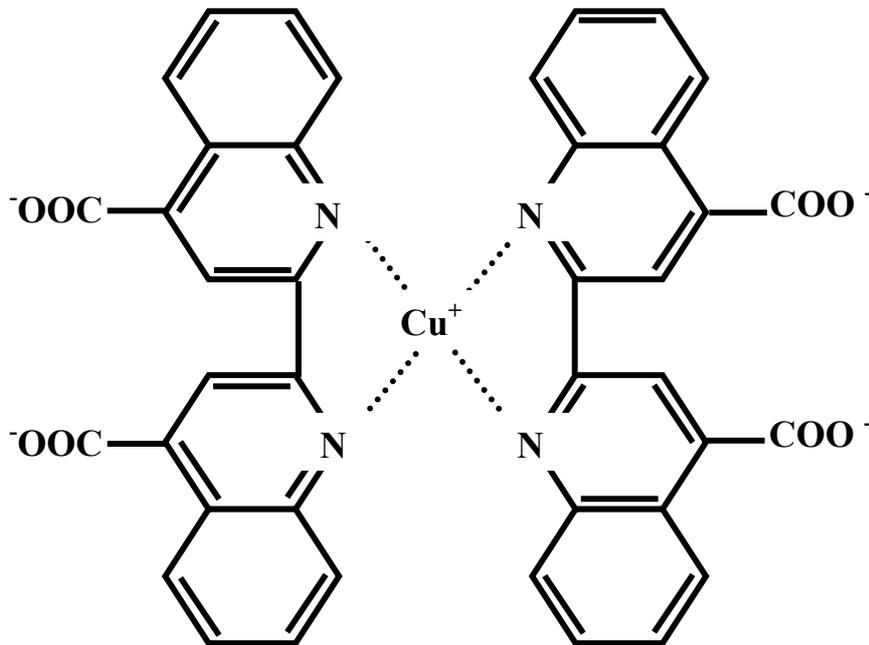
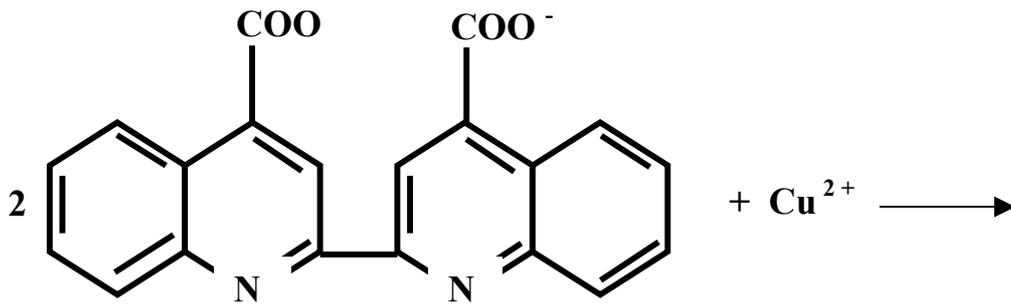


Abb. 2 : Bildung des Farbstoffkomplexes

Der Vorteil der BCA – Bestimmung im Vergleich zu anderen Methoden liegt in der geringen Störanfälligkeit durch Detergenzien. Da verschiedene Proteine unterschiedlich stark mit den  $\text{Cu}^{2+}$  - Ionen reagieren, liefert auch diese Methode nur Näherungswerte. Störende Reagenzien, wie beispielsweise Reaktionsmittel oder aminhaltige Pufferkomponenten (Tris), müssen wegen der Reduktion oder Komplexbildung des  $\text{Cu}^{2+}$  vor der Bestimmung durch eine vorhergehende Fällung entfernt werden (vgl.: Kapitel 4.3.1. Chloroform – Methanol – Fällung in dieser Arbeit). Anschließend wird das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  0,1 N NaOH aufgenommen.

Geräte:

- Spektrophotometer (Biochrom Ultrospec 4051, LKB)
- Wasserbad (37° C)
- Pipetten

Materialien:

- Polypropylen – Zentrifugenröhrchen = Caps (Eppendorf)
- Küvetten

Reagenzien:

- BCA (Sigma)
- Natriumhydroxid (Roth)
- Natriumhydrogencarbonat (Merck)
- Natriumcarbonat (Merck)
- Dinatriumtartat (Merck)
- Kupfer – II – Sulfat (Merck)
- BSA (Roth)

Lösungen:

- Lösung A : 1 % (m/V) BCA  
2 % (m/V)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
0,16 % (m/V)  $\text{Na}_2$  – Tartat  
0,40 % (m/V) NaOH  
0,95 % (m/V)  $\text{NaHCO}_3$  in aqua dest.  
Der pH wird mit 5 N NaOH oder festem  $\text{NaHCO}_3$  auf 11,25 eingestellt und bei Raumtemperatur gelagert.
- Lösung B: 4 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  in aqua dest.
- Testlösung: 100 Teile der Lösung A  
2 Teile der Lösung B  
(Mischung erst kurz vor der Proteinbestimmung herstellen.)
- BSA – Lösung : 1 mg / ml aqua dest.

- Standardlösungen:
  - a) 10 µl BSA – Lösung  
+ 40 µl aqua dest.  
+ 1 ml Testlösung
  - b) 25 µl BSA – Lösung  
+ 25 µl aqua dest.  
+ 1 ml Testlösung
  - c) 50 µl BSA – Lösung  
+ 1 ml Testlösung
  
- Leerwert
  - a) 10 µl H<sub>2</sub>O  
+ 1 ml Testlösung

Durchführung :

1. Die Probenlösung wird innerhalb der verwendeten Standardkonzentrationen angesetzt.
2. Die Proteinlösung wird mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und dann mit 1 ml Testlösung versetzt. Die Tests und Standards werden doppelt angesetzt.
3. Die Ansätze werden bei 37° C für 30 min. inkubiert.
4. Die Extinktion E wird bei 562 nm gemessen.

Als Berechnungsgrundlage diene hierfür eine Regressionsanalyse, da der Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und der Extinktion im verwendeten Meßbereich linear ist:

Formel:  $c = E \times F / V$

c = Konzentration der Proteinlösung in mg / ml

F = Mittelwerte der aus den einzelnen Standardwerten errechnete Faktor (F<sub>i</sub>)

$$F_i = \text{Vol. BSA (ml)} / E$$

V = Volumen der Protein- bzw. Standardlösung

E = Mittelwerte der bei 562 nm gemessenen Extinktionen

### 3.4. ELEKTROPHORESE

Eine Elektrophorese basiert auf Ionenwanderungen innerhalb eines elektrischen Feldes. Die Proteine haben unterschiedliche Gesamtladungen und unterschiedliche pK – Werte, die abhängig von der Anzahl saurer und basischer Aminosäuren sind. Wenn man ein geladenes Molekül in ein elektrisches Feld bringt, so ist die elektrophoretische Beweglichkeit von seiner Größe und Gestalt, der Gesamt – Nettoladung, dem pH – Wert, der Porengröße des Trägers, der Temperatur, der Ionenstärke des Puffers und von der elektrischen Feldstärke abhängig.

Die Proteintrennung wird meistens in Form eines Gels (Agarose, Polyacrylamid), in einer sogenannten **Trägermatrix** durchgeführt. Durch die variablen Vernetzungsgrade des Gels entsteht ein sogenannter Siebeffekt, der die Moleküle sowohl nach ihrer Ladung, aber auch nach ihrer Größe und Gestalt trennt.

#### 3.4.1. Eindimensionale SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Werden Proteine durch das anionische Detergen SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) geladen, ist eine Auftrennung im elektrischen Feld fast ausschließlich nach dem Molekulargewicht möglich. SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziiert werden. Durch die Bindung wird eine stark negative Ladung in die denaturierten, nach Zufall geknäulten und gefalteten Polypeptid-Ketten, eingeführt. Es entsteht ein Komplex mit nach außen gerichteten negativen Sulfat – Gruppen, d. h. die Anzahl der negativen Ladungen verhält sich proportional zur Porengröße. Die Proteine wandern durch ihre Ladung von der Kathode zur Anode.

Im Rahmen der sogenannten **diskontinuierlichen Gelelektrophorese** ist ein weniger stark vernetztes Sammelgel mit erhöhtem pH – Wert für die Konzentrierung des anfänglichen Proteingemischs in einer „scharfen“ Zone verantwortlich. So laufen die Proteine nahezu gleichzeitig in das engporige Trenngel ein. Dort wirkt dann der Molekularsiebeffekt, wodurch die Proteine ihrer Größe entsprechend getrennt werden.

Zur erfolgreichen Durchführung einer Gelelektrophorese müssen die Proteinproben in ein Medium gebracht werden, das eine Durchmischung der Proben herabsetzt oder verhindert. Das Medium darf weder mit der Probe reagieren, noch die Bewegung der Proteinprobe hemmen. Alle diese Bedingungen werden von den Polyacrylamid – Gelen erfüllt.

Das Netzwerk des Gels wird durch radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden bifunktionellen N, N' – Methylen – Bisacrylamids aufgebaut. Als Radikalstarter werden Ammoniumperoxodisulfat und das tertiäre Amin N, N, N', N' – Tetramethylethyldiamin (TEMED) verwendet. Die Porengröße kann durch das Mengenverhältnis der beiden Komponenten variiert werden. Für unterschiedliche Molekulargewichte können so optimale Trennungsbedingungen geschaffen werden (Cooper, 1981).

#### **3.4.1.1. Gele gießen**

##### Geräte :

- Trockenschrank
- Gelgießkammer
- Heizblock (Eppendorf)
- Vakuum – Saugflasche (Schott)
- Wasserstrahlpumpe

##### Materialien :

- Glasplatten (8 x 13,5 cm)
- Klebeband (3M)
- Kunststoffspacer (Dicke 0,5 mm)
- Probekämme (Dicke 0,5 mm)

##### Reagenzien :

- Tris (Tris – (hydroxymethyl) – aminonethan) (Roth)
- Salzsäure 37 % (Merck)
- Acrylamid 4 x kristallin (Roth)
- N, N' – Methylen – Bisacrylamid (Roth)
- TEMED: N,N,N',N'–Tetramethylethyldiamin (Serva)
- Ammoniumperoxodisulfat (Serva)
- Natriumlaurylsulfat (Serva)
- Ethanol p.a. (Roth)
- Saccharose (Roth)
- Dithiothreitol (Sigma)
- Bromphenolblau (Serva)

<u>Lösungen</u> :	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60% Acrylamid Mix</li> <li>• 1,5 M Tris pH 8,8</li> <li>• 1,0 M Tris pH 6,8</li> <li>• 10 % SDS</li> <li>• 10 % APS</li> <li>• Übersichtungslösung</li> </ul>	<p>116,5 g Acrylamid 3,2 g Bisacrylamid aqua dest. ad 200 ml</p> <p>181,5 g Tris in 800 ml aqua dest. lösen, pH mit HCl auf 8,8 einstellen, auf 1 l mit aqua dest. auffüllen, filtrieren und autoklavieren.</p> <p>12,1 g Tris in 80 ml aqua dest. lösen, pH mit HCl auf 6,8 einstellen, auffüllen auf 100 ml, filtrieren und autoklavieren.</p> <p>10 g SDS in 100 ml aqua dest..</p> <p>10 % Amoniumpersulfat in aqua dest..</p> <p>50 % (V/V) Ethanol p. a. in aqua dest..</p>
-------------------	--	---

Die Glasplatten wurden nach jeder Elektrophorese mit Spülmittel gereinigt und mit demineralisiertem Wasser nachgespült.

Die zum Gießen verwendeten Glasplatten wurden vor dem Gebrauch im Trockenschrank für etwa 30 min. auf 150° C erhitzt. Vor dem Zusammenfügen zu Gelkammern wurden die Platten gründlich mit technischem Ethanol (70 %) gereinigt. Danach wurden die ebenfalls gesäuberten Spacer jeweils rechts und links zwischen zwei Glasplattenkanten positioniert und mit Klebeband befestigt. Zur Fixierung kamen die fertigen Gelkammern für etwa 20 min. in den Trockenschrank (80 – 100° C) und wurden anschließend für den Gießvorgang wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Trenngel-Stammlösung:

<u>100 ml</u>	<u>7,5 % - Gele</u>
aqua dest.	61,5 ml
60 % Acrylamid – Mix	12,5 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	25,0 ml
10 % SDS	1,0 ml

Nach dem Mischen und Entgasen der Lösung wurden als Start der Polymerisation zu 100 ml Trenngel 60 µl TEMED und 1 ml 10 % APS gegeben. Die Lösung wurde direkt in die Gelkammer gegossen. Jedes Gel wurde dann vorsichtig mit je 100 µl 50 % Ethanol überschichtet, um die Oberfläche der Gele zu glätten. Die überstehende Flüssigkeit wurde nach Polymerisation des Trenngels abgesaugt und die gereinigten Probenkämme eingesetzt.

Sammelgel-Stammlösung:

<u>10 ml</u>	
aqua dest.	7,65 ml
60 % Acrylamid-Mix	0,85 ml
1,0 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	0,10 ml

Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch 100 µl 10 % APS, sowie 10 µl TEMED gestartet. Nach Beendigung der Polymerisation wurden die Gelplatten in feuchte Papiertücher eingeschlagen, in Aluminiumfolie verpackt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

**3.4.1.2. Probenvorbereitung**Geräte:

- Zentrifuge (Eppendorf)
- Heizblock (Eppendorf)
- Pipetten

- Materialien:
- Polypropylen – Zentrifugenröhrchen = Caps (Eppendorf)
- Reagenzien:
- Tris (Roth)
  - Salzsäure (Merk)
  - SDS (Serva)
    - DTT (Sigma)
- Lösungen:
- 1 M Tris pH 6,8 : 12,1 g Tris in 80 ml aqua dest. lösen, mit HCl den pH auf 6,8 einstellen, auf 100 ml auffüllen, filtrieren und autoklavieren.
  - reduzierender Probenpuffer :
    - 5 Teile zweifacher Laemmli – Sample – Buffer
    - 4 Teile aqua dest. (HPLC-rein und autoklaviert)
    - 1 Teil 1 M DTT

Durchführung :

1. Die Proben werden mittels Chloroform – Methanol – Fällung gefällt.
2. Das Pellet wird in einer Menge reduzierenden Sample Buffer aufgenommen, daß man ungefähr 20 – 30 µg Protein in 10 µl Puffer enthält.
3. Zur vollständigen Denaturierung werden die Proben 10 min. im Heizblock bei 95° C aufgeköcht.
4. Vor dem Auftragen werden die Proben kurz abzentrifugiert.

**3.4.1.3. Durchführung der Elektrophorese (Laemmli, 1970)**

- Geräte :
- Elektrophoresekammer
  - Netzgerät
  - Pipetten
- Reagenzien :
- Tris (Roth)
  - Glycin (BDHLaboratory)
  - SDS (Serva)

Lösungen :

- Elektrophoresepuffer : 15 g Tris  
72 g Glycin  
6,25 g SDS in aqua dest. lösen.

Durchführung :

1. Der untere Teil der Elektrophoresekammer wird mit Elektrophoresepuffer gefüllt.
2. Die Gele werden in die Elektrophoresevorrichtung eingehängt. (Luftblasen am unteren Ende der Gele durch schwenken im Puffer vermeiden).
3. Vom unteren Anodenraum wird Puffer in den oberen Kathodenraum gepumpt.
4. Vom Auftragen der Probe bis zum Einlaufen in das Sammelgel bleibt die Pumpe ausgeschaltet, um Aufwirbelungen zu vermeiden.
5. Zum Einlaufen der Proben wird eine Stromstärke von 50 mA angelegt.
6. Haben die Proben das Trenngel erreicht, wird die Stromstärke auf 50 mA pro Gel erhöht und die Pumpe zur Umwirbelung des Elektrophoresepuffers wieder angestellt.
7. Die Auftrennung ist beendet, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hat.

#### **3.4.1.4. Standardproteine für die Elektrophorese**

Ein Marker ist ein Gemisch aus hoch- oder niedermolekularen Standardproteinen, deren Molekulargewichte bekannt sind. Er wird bei der Elektrophorese zusätzlich auf das Gel aufgetragen, um den zu detektierenden Proteinen ihr entsprechendes Molekulargewicht zuzuordnen.

#### 3.4.1.4.1. Bluemarker

- Prestained SDS molecular weight markers SDS – 7 B (Sigma)

Die Standardproteine werden hier mit einem **blauen** Farbstoff gekoppelt. Dadurch ändert sich das Molekulargewicht der Proteine. Aus diesem Grund wurde nach jeder Farbstoffkopplung das Molekulargewicht des jeweiligen Standardproteins neu berechnet. Das Lyophilisat wurde den Angaben des Herstellers (Sigma) entsprechend mit Harnstofflösung und SDS – Laemmli – Probenpuffer aufgelöst und in Aliquots zu 10 µl (dies entspricht der Menge für eine Probenkammer) bei – 20° C eingefroren.

#### Molekulargewichte:

α – 2 – Makroglobulin, Human Plasma	190.000 D
β – Galaktosidase, E. coli	108.000 D
Fruktose – 6 – Phosphat – Kinase, Rabbit Muscle	84.000 D
Pyruvat – Kinase, Chicken Muscle	67.000 D
Fumarase, Porcine Heart	55.000 D
Lactat – Dehydrokinase, Rabbit Muscle	39.000 D
Triosephosphat – Isomerase, Rabbit Muscle	35.000 D

#### 3.4.1.4.2. Coomassie – Marker

- SDS – PAGE molecular weight standards (Bio Rad)

Für die Coomassiefärbung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1 : 20 in reduzierendem Probenpuffer verdünnt, 10 min. bei 96° C abgekocht und in Aliquots zu je 10 µl bei –20° C eingefroren.

Molekulargewichte

Myosin	200.000 D
$\beta$ – Galaktosidase, E. coli	116.250 D
Muskelphosphorylase	97.000 D
Rinderserumalbumin	66.200 D
Hühnereialbumin	42.699 D
Rindercarboanhydrase	31.000 D
Sojabohnentrysininhibitor	14.000 D

**3.4.1.5. Proteindetektion nach der Gelelektrophorese**

Nach der Elektrophorese müssen die Proteine detektiert werden. Je nach zu detektierender Proteinmenge bieten sich verschiedene spezifische sowie unspezifische Methoden an. Man detektiert die Proteine meist als gefärbte Komplexe nach ihrer Reaktion mit Farbstoffen, Silbersalzen oder Fluoreszenzfarbstoffen. Neben diesen unspezifischen Färbemethoden, die im Gel direkt durchgeführt werden, können Proteine auch nach Transfer auf eine Trägermembran spezifisch bzw. unspezifisch nachgewiesen werden.

Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich in ihrer Sensitivität.

**3.4.2. Proteindetektion nach Transfer auf die Trägermembran**

Die durch die SDS – PAGE getrennten Proteine werden aus dem Gel mit Hilfe elektrophoretischer Elution im Naß – Verfahren auf eine engporige, aus Nitrocellulose oder Nylon bestehende Trägermembran übertragen. Da die Proteine noch durch SDS negativ aufgeladen sind, wandern sie von der Kathode zur Anode (Beisiegel, 1986).

Der sogenannte Blot erfolgt im „Sandwichverfahren“ zwischen zwei Filterpapieren, in diesem Fall im Tankverfahren.

Geräte :

- Blockkammer mit Einsätzen (BioRad)
- Netzgerät (Pharmacia)
- Rocker Plate (Heidolph)

Materialien :

- Polyvinylidendifluoridmembran (Immobilon P, Millipore)
- Filterpapier (Blotting Papiere, Schleicher & Schüll, N° GB 002)
- Schaumstoffkissen

Reagenzien :

- Tris (Roth)
- Methanol (Riedel de Haen)
- Glycin (Roth)

Lösungen :

- Blotpuffer :                    25 mM Tris  
    0,192 M Glycin  
    20 % Methanol in aqua dest.

Durchführung :

1. Die Blotmembran wird in Methanol benetzt. Inkubationszeit 1 min..
2. Schwenken der Membran in aqua dest. Inkubationszeit 15 min..
3. Das Gel wird luftblasenfrei auf die Blotmembran überführt und zwischen jeweils drei Lagen Filterpapier und einem Schaumstoffkissen in einen Bloteinsatz geklemmt.
4. Das „Sandwich“ wird in die mit Blotpuffer gefüllte Blotkammer eingehängt, so daß das Gel der Kathodenseite und die Blotmembran der Anodenseite zugewandt ist.
5. Der Blotvorgang findet bei einer Stromstärke von 100 mA über Nacht (16 h) statt.

### 3.4.2.1. Unspezifische Proteindetektion durch Coomassie – Färbung

Die Coomassiefärbung zählt zu den unspezifischen Färbemethoden und eignet sich zur Detektion größerer analytischer Proteinmengen ( $> 1 \mu\text{g}$ ). Genau wie in Polyacrylamidgelen können die geblotteten Proteine auf der Membran durch den Coomassie – Farbstoff gefärbt werden.

- Geräte :
- Rocker Plate (Heidolph)
- Materialien :
- Färbeschale
  - Glasschale
- Reagenzien :
- Methanol (Riedel de Haen)
  - Essigsäure (Roth)
  - Coomasie brilliant blue G (Sigma)
- Lösungen :
- Färbelösung :            0,125 % ( m / V ) Coomassie brilliant blue G in Entfärbelösung
  - Entfärbelösung :        30 % Methanol  
                                  10 % Essigsäure in aqua dest.

Durchführung :

1. Blot 1 min. mit Coomassie brilliant blue G – Färbelösung inkubieren.
2. Entfärbung der Blotmembran mit Entfärbelösung bis die gewünschte Bandenintensität erreicht ist.
3. Abspülen der entfärbten Membran mit aqua dest..

### 3.4.2.2 Spezifische Proteindetektion durch Western – Blot

Die Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper wird unter immunologischen Methoden behandelt (siehe 3.5.1.).

### **3.5. Immunologische Methoden**

Immunologische Methoden beruhen auf der Beobachtung, daß höhere Organismen in der Lage sind, gegen körperfremde Proteine (Antigene) Antikörper zu bilden und daß Antigene spezifisch durch Antikörper in der Antigen – Antikörper – Reaktion gebunden werden. Die Antigen – Antikörper – Reaktion beruht auf der nichtkovalenten Wechselwirkung zwischen der Determinanten eines Antigens und dem entsprechenden Antikörper.

#### **3.5.1. Western – Blot**

Beim Western – Blot werden Proteine, die durch Gelelektrophorese getrennt wurden, auf eine Membran transferiert und dort mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Der Immunkomplex wird mit Hilfe eines Enzymkonjugats sichtbar gemacht. Um den Effekt zu verstärken, erfolgt die Detektion indirekt über markierte „Zweitantikörper“, die gegen den im Immunkomplex gebundenen „Erstantikörper“ gerichtet sind. Bei Enzymkonjugaten, wie beispielsweise der Meerrettichperoxidase oder aber einer alkalischen Phosphatase, erfolgt die Visualisierung durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion. Hierbei wird ein wasserlösliches, farbloses Substrat zu einem wasserunlöslichen, gefärbten Produkt umgesetzt. Das Produkt fällt sofort aus und markiert auf der Membran die Lage des Antigens.

Die Sensitivität des Western – Blots liegt in einem Bereich von 10 bis 100 Femtomol. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 50 kDa ca. 0,5 bis 5 ng.

Wenn eine höhere Sensitivität erreicht werden soll, kann man Verstärkersysteme, wie beispielsweise Biotin – Streptavidin oder Peroxidase – Anti – Peroxidase einsetzen. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Detektion.

Die gebundenen Antikörper können z. B. in Umsetzung der Substrate Chloronaphthol und Diaminobenzidin über eine Peroxidasereaktion detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Detektion mittels X-Phosphat / NBT angewendet. Mit Hilfe von 5 – Brom – 4 – Chlor – 3 – Indolylphosphat (X – Phosphat) werden die Proteine durch die alkalische Phosphatase zu einem Indigofarbstoff umgesetzt. Die dabei aus dem Indoxyl entstehenden Reduktionsäquivalente reduzieren das Tetrazoliumsalz NBT zum purpurfarbenen Diformazan. Sichtbar wird dann eine violette Mischfarbe aus beiden Farbstoffen.

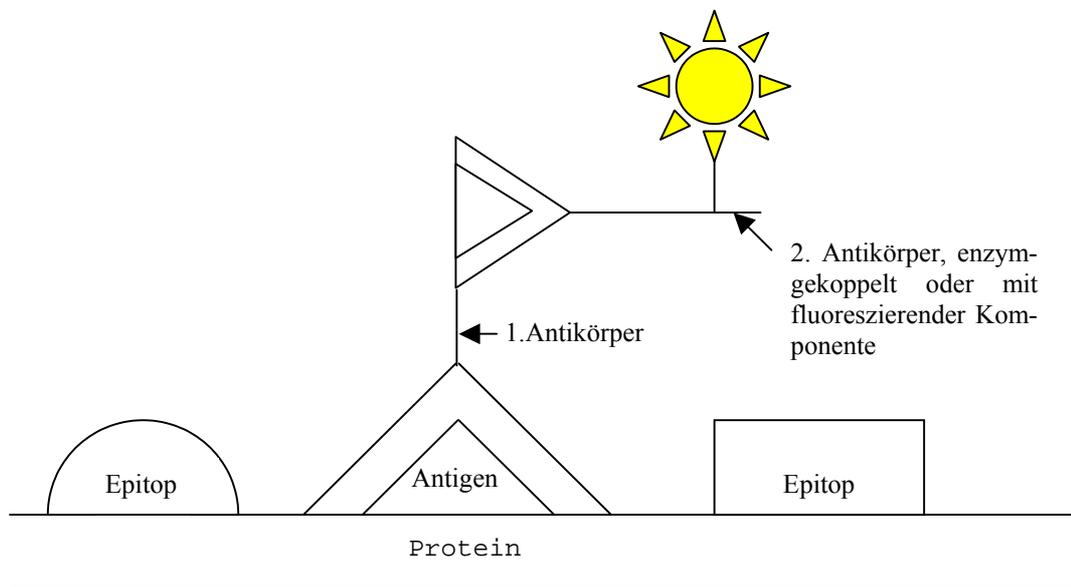


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Antigen – Antikörper – Reaktion

- Geräte :
- Rocker Plate (Heidolph)
- Materialien :
- Kunststoffschalen
- Reagenzien :
- Tris (Roth)
  - Salzsäure (Merck)
  - Natriumchlorid (Roth)
  - Magnesiumchlorid (Merck)
  - Tween 20 (Sigma)

- BSA (Merck)
- Magermilchpulver
- N, N' - Dimethylformamid, DMF (Merck)
- Alkalische Phosphatase gekoppelter „IgG – Zweitanti – körper“ (Sigma)
- 5 – Brom – 4 – Chlor – 3 – indolyphosphat, X – Phosphat (Boehringer Mannheim)
- 4 – Nitroblautetrazoliumchlorid, NBT (Boehringer, Mannheim)

Lösungen :

- PBS
- Entwicklungspuffer : 50 mM Tris  
150 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
(mit HCl auf pH 9,5 einstellen)
- TBS ( Tris buffered saline ) : 50 mM Tris  
150 mM NaCl  
(mit HCl auf pH 7,5 einstellen)
- Blocklösung : 1 % BSA / TBS
- Waschlösung : Blocklösung mit 0,1 % Tween 20
- X – Phosphatlösung : 50 mg X – Phosphat in 1 ml DMF
- NBT – Lösung : 75 mg NBT in 1 ml 70 % ( v / v )  
DMF / H<sub>2</sub>O
- Entwicklungslösung : 37,5 µl X – Phosphat  
50 µl NBT – Lösung  
in 10 ml Entwicklungspuffer

Antikörper :

- Erst – Antikörper :
  - 1.) **anti – PKC δ** : Kaninchen, polyklonal  
Konzentration : 200 µg / ml  
Verdünnung : 1 : 3000  
(Santa Cruz Biotechnologies)
  - 2.) **anti – PKC α** : Maus, monoklonal  
Konzentration : 200 µg / ml  
Verdünnung : 1 : 2000  
(U.B.I.)

- |      |   |  |
|------|---|--|
| 3.)  | <b>anti – PKC <math>\beta</math> I :</b>  | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2000<br>(P.P.)                       |
| 4.)  | <b>anti – PKC <math>\beta</math> II :</b> | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2000<br>(Santa Cruz Biotechnologies) |
| 5.)  | <b>anti – PKC <math>\gamma</math> :</b>   | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 3000<br>(Santa Cruz Biotechnologies) |
| 6.)  | <b>anti – PKC <math>\epsilon</math> :</b> | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2000<br>(Santa Cruz Biotechnologies) |
| 7.)  | <b>anti – PKC <math>\eta</math> :</b>     | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2000<br>(Santa Cruz Biotechnologies) |
| 8.)  | <b>anti – PKC <math>\mu</math> :</b>      | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 200<br>(Santa Cruz Biotechnologies)  |
| 9.)  | <b>anti – PKC <math>\theta</math> :</b>   | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2000<br>(Santa Cruz Biotechnologies) |
| 10.) | <b>anti – PKC <math>\lambda</math> :</b>  | Maus, monoklonal<br>Konzentration : 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2500<br>(Transduction Laboratories)        |
| 11.) | <b>anti – PKC <math>\xi</math> :</b>      | Kaninchen, polyklonal,<br>Konzentration : 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$<br>Verdünnung : 1 : 2000<br>(P.P.)                       |
- **Zweit – Antikörper :**
    - 1.) **anti – Kaninchen – Antikörper** aus der Ziege (CC 43008),  
alkalische – Phosphatase – konjugiert  
(Cedarlane Laboratories Limited)
    - 2.) **anti – Maus – Antikörper** aus der Ziege (CC 30008), alkalische –  
Phosphatase – konjugiert  
(Cedarlane Laboratories Limited)

Durchführung :

1. Blot aus der Blotkammer entnehmen.
2. Blot 1h in Blocklösung schwenken.
3. Spezifischen Antikörper (Erstantikörper) in ausreichender Verdünnung (Verdünnung richtet sich individuell für jeden Antikörper nach den Herstellerangaben (siehe auch 3.5.2.)) in Waschlösung aufgeben und 1,5 h inkubieren lassen.
4. Blot in Waschlösung waschen: dreimal kurz und dreimal je 10 min..
5. Alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper 1 : 3000 verdünnt in Waschlösung dazugeben und 1h inkubieren lassen.
6. Blot in Waschlösung waschen : dreimal kurz und dreimal je 10 min..
7. Einmal kurz in TBS schwenken.
8. Entwicklungslösung zugeben und bis zum Sichtbarwerden der Banden unter Lichtabschluß inkubieren lassen.
9. Blot mit aqua dest. waschen.
10. Membran zwischen Papiertüchern trocknen lassen.

### **3.5.1.1. Vorinkubation eines Antikörpers mit einem Blockpeptid**

Die antigene Determinante (Epitop) ist die als fremd erkannte Struktur eines Antigens, an die Antikörper mit ihrer spezifischen Bindungsstruktur binden. Als besonders gute Immunogene eignen sich Aminosäuren, wobei ein Antikörper spezifisch an einer Aminosäuresequenz von nur 6 – 10 Aminosäuren bindet. Das Epitop ist damit nur eine kleine Molekülgruppe innerhalb des gesamten Antigenmoleküls (Löffler, 1994).

Der Antikörper bindet also hochspezifisch, trotzdem kann es zu unspezifischen Wechselwirkungen des Antikörpers mit anderen nicht zu detektierenden Proteinen kommen. Um die spezifischen von den unspezifischen Bindungen trennen zu können setzt man Blockpeptide ein. Dieses besitzt an der Oberfläche eine antigene Struktur,

passend zum Antikörper. Durch Vorinkubation des Antikörpers mit dem Blockpeptid im Überschuß werden alle spezifischen Bindungsstellen des Antikörpers abgedeckt. Durch dieses Verfahren ist nur noch eine unspezifische Bindung möglich. Im Vergleich zwischen vorinkubierten und den ohne Blockpeptid behandelten Präparaten kann man die spezifischen von den unspezifischen Bindungen differenzieren.

Geräte :

- Schüttler (Eppendorf)

Materialien :

- Polypropylen – Zentrifugenröhrchen = Caps (Eppendorf)

Antikörper :

- Erst – Antikörper :

1.) **anti – PKC  $\epsilon$**  : Kaninchen, polyklonal,  
Konzentration : 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 2000  
(Santa Cruz Biotechnologies)

2.) **anti –PKC  $\epsilon$  – blockpeptid cell – lysate** : Kaninchen, polyklonal  
Konzentration : 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 200  
(Transduction Laboratory)

Durchführung :

1. Herstellung einer Blockpeptid – Antikörper – Lösung im Verhältnis 10 : 1 (Verdünnung von Blockpeptid und Antikörper siehe Herstellerangaben (3.5.2.)).
2. Inkubation der Lösung bei RT.:
  - Für 1 h auf dem Schüttler.
  - Für 1 h ohne Schüttler.
3. Der vorinkubierte Antikörper kann so für die Proteindetektion im Western – Blot (3.5.1.) und in der Immunfluoreszenzmikroskopie (3.5.2.) eingesetzt werden.

### 3.5.2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Durch Immunfluoreszenz kann man Moleküle oder Epitope durch die entsprechenden Antikörper mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff – gekoppelten Zweitantikörpers, der spezifisch gegen den im Antigen – Antikörper – Komplex gebundenen Erstantikörper gerichtet ist, indirekt auf bzw. in der kultivierten Zelle nachweisen.

Vor den Färbeschritten müssen die Zellen noch mit Aceton permeabilisiert und fixiert werden, um sie in einem Zustand zu erhalten, in dem die Morphologie weitestgehend der unter natürlichen Bedingungen entspricht. Die Fixierung sollte weiterhin noch die Voraussetzung erfüllen, daß die Antigen – Determinante für die Antikörper erkennbar und die Bindungsstellen für Antikörper zugänglich wird und bleibt.

#### Geräte:

- Fluoreszenzmikroskop (Nikon)
- Wasserstrahlpumpe

#### Materialien

- runde/quadratische Glasplättchen
- Objektträger
- Gummiringe, 1cm Durchmesser
- feuchte Kammer
- Nagellack

#### Reagenzien:

- BSA (Roth)
- Histogel – Eindeckelmedium (Gibco)

#### Lösungen:

- Aceton (Riedel de Haen)
- PBS
- Ethanol 70 %
- Ethanol 100 %
- Eindecklösung :   5 g Moviol 4 – 88 (Hoechst AG)  
                          6 g Glycerin  
                          6 ml aqua dest. in 50 ml Falcon Tube  
                          einrühren, 1 – 2 h bei RT quellen lassen.  
                          12 ml 0,2 M Tris, pH 8,5 dazugeben, 15  
                          min. im Wasserbad kochen und 15 min.  
                          bei 3000 Upm zentrifugieren.
- Blocklösung :     5 % BSA in PBS

Antikörper :

• Erst – Antikörper :

- 1.) **anti – PKC  $\epsilon$  :** Kaninchen, polyklonal,  
Konzentration : 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 400  
(Santa Cruz Biotechnologies)
  
- 2.) **anti –PKC  $\epsilon$ – blockpeptid cell – lysate :**  
Kaninchen, polyklonal  
Konzentration : 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 40  
(Transduction Laboratory)
  
- 3.) **anti – PKC  $\mu$  :** Kaninchen, polyklonal  
Konzentration: 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 50  
(Santa Cruz Biotechnologies)
  
- 4.) **anti – E – Catherin :** Kaninchen, polyklonal  
Konzentration : 250  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 200  
(Transduction Laboratory)
  
- 5.) **anti –  $\beta$  – Catenin :** Kaninchen, polyklonal  
Konzentration : 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 250  
(Santa Cruz Biotechnologies)
  
- 6.) **anti – Cytokeratin 7 :** Maus, monoklonal  
Konzentration : 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 50  
(Boehringer, Mannheim)
  
- 7.) **anti – Cytokeratin 10 :** Maus, monoklonal  
Konzentration : 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 50  
(DAKO A/S, Denmark)
  
- 8.) **anti – Involukrin** Maus, monoklonal  
Konzentration : 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 50  
(Sigma)
  
- 9.) **anti – Vimentin** Maus, monoklonal  
Konzentration : 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$   
Verdünnung : 1 : 30  
(Sigma)

• Zweit – Antikörper :

- 1.) **anti – Kaninchen IgG – Antikörper CY 3** aus der Ziege  
1 : 1 mit Glycerin verdünnt, dann 1 : 100 in PBS  
(Jackson)

- 2.) **anti – Ziege IgG – Antikörper CY 3** aus der Maus  
1 : 1 mit Glycerin verdünnt, dann 1 :100 in PBS  
(Jackson)
- 3.) **anti – Maus IgG – Antikörper CY 3** aus der Ziege  
1 : 1 mit Glycerin verdünnt, dann 1 :150 in PBS  
(Jackson)

Durchführung :

1. 10 min. sterilisieren mit 70% Ethanol.
2. 10 min. sterilisieren mit 100% Ethanol.
3. Überschüssiges Ethanol auf Glasplättchen verdunsten lassen.
4. Einmal waschen mit PBS.
5. Einmal waschen mit 0,5 % FCS / CG - Medium.
6. Zellen in gewünschter Dichte auf die Glasplättchen in 0,5% FCS / CG – Medium aussäen und kultivieren.
7. Medium absaugen und dreimal mit PBS waschen.
8. Glasplättchen mit Zellen zum Fixieren für 5 min in Aceton (–20° C) eintauchen.
9. Zellen 3 x mit PBS waschen und auf Gummiringe in die feuchte Kammer überführen
10. 25 min. in Blocklösung inkubieren, 200 µl / Glassplättchen.
11. Auf jedes Plättchen 100 µl Antikörper in PBS (Verdünnungsverhältnis je nach Antikörper) geben, 1,5 - 2 h inkubieren lassen.
12. 3 x kurz, 3 x 5 min. mit PBS waschen.
13. Auf jedes Plättchen 100 µl Fluorescein – gekoppelten Zweit – IgG Antikörper in PBS (Verdünnungsverhältnis 1 : 300) geben, 1 h abgedunkelt inkubieren lassen.
14. 3 x kurz, 3 x 5 min. mit PBS waschen.
15. Plättchen kurz in PBS schwenken und gut abtropfen lassen.  
PBS – Reste vorsichtig mit Zellstofftuch am Rand des Glasplättchens absaugen.

16. Glasplättchen mit Zellen nach unten auf einen Tropfen Eindeckelmedium auf einen Objektträger legen und luftblasenfrei festpressen.
17. Präparat mit Nagellack versiegeln.

Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mit Licht der Wellenlänge 480 nm.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die Rolle der PKC – $\delta$ in der Kontaktinhibition von humanen Keratinozyten

Jeder lebende Organismus ist das Resultat eines feinst ausgewogenen Regelnetzwerks von wachstumsfördernden und wachstumshemmenden – z.T. differenzierungs – induzierenden – Signalen.

Ein wesentlicher Kontrollmechanismus bezüglich des Wachstums, der insbesondere in Zellkultur beobachtet werden kann, ist die kontaktabhängige Hemmung des Wachstums. Diese Kontaktinhibition wird über Zellmembranglykoproteine der Zell – Zell – Kontakte vermittelt, wie z. B. dem Contactinhibin und seinem Rezeptor. Wie schon in der Einleitung erwähnt, konnte man durch Untersuchungen an Tumorgeweben eine erniedrigte PKC –  $\delta$  – Expression in diesen Geweben feststellen, was auf eine antiproliferative Rolle dieses Enzyms in der Wachstumsinhibition hinweist (Assert, R. *et al.*, 1999 und Yuspa, S. *et al.*, 1998).

Durch Rottlerin, einem selektivem Inhibitor der PKC –  $\delta$ , kann man die Kontaktinhibition humaner Keratinozyten (HaCaT), humaner Fibroblasten (FH 109) und NIH3T3 (Mäusefibroblasten) aufheben (Doktorarbeit Heit, I., 2000).

Unter Kurzzeit – TPA – Behandlung kommt es innerhalb von Minuten nach Zugabe von TPA zu einer Aktivierung aller TPA – sensiblen PKC. Dabei konnte man in konfluent gewachsenen Zellen eine zweifach erhöhte Proliferationsrate feststellen, während semikonfluent kultivierte Zellen mit einer Wachstumshemmung von 50 % reagierten (Oesch, F. *et al.*, 1988).

Nach etwa 24 h TPA – Dauerbehandlung tritt dann eine *down – Regulation* der PKC auf Proteinebene ein. Durch die PKC – Deaktivierung kommt es vermutlich zu einer verlängerten Membranassoziation der Enzyme, die eine Degradation derselben initiiert. Nach dieser Degradation ist keine oder nur noch eine geringfügige Aktivität nachweisbar (Keenan, C. *et al.*, 1997 / Nishizuka, Y., 1988 / Rodriguez – Pena, A., Rozengurt, E., 1984).

Langzeitbehandlung von FH 109 – Zellen mit TPA haben zu einer Teilaufhebung der Kontaktinhibition geführt. Gab man zu Kontrollzellen glutardialdehydfixierte Zellen hinzu, die den Mechanismus der Kontaktinhibition simulierte, so konnte eine Wachstumsreduktion gegenüber proliferierende Zellen in Höhe von 70 % festgestellt werden. Der gleiche Versuchsansatz mit 24 bzw. 48 h TPA – vorinkubierten Zellen ( $10^{-7}$  M), ergab eine Reduktion von nur 40 %. Dies führt zu dem Schluß, daß TPA Einfluß auf die Kontaktinhibition humaner Fibroblasten nimmt (Diplomarbeit Heit, I., 1997).

Es liegt nun nahe, die Rolle der PKC –  $\delta$  in der zytoskelettären Signaltransduktion mittels den Enzyminhibitoren TPA und Rottlerin (siehe Einleitung) zu untersuchen.

#### **4.1.1 Untersuchung der PKC – Isoformen in humanen Keratinozyten**

Da nicht in jedem Gewebe alle PKC – Isoformen exprimiert werden, ist es zunächst wichtig zu untersuchen, welche Isoformen in HaCaT – Zellen vorkommen.

Außerdem sollte gezeigt werden, welche Isoformen nach 24 bzw. 48 – stündiger TPA – Behandlung herunterreguliert werden, wobei TPA in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M verwendet wurde.

Als Negativ – Kontrolle diente der inaktive Phorbol ester PDD (4 –  $\alpha$  – Phorbol – 12, 13 – didecanoat) in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M. Weiterhin wurde eine Kontrolle ohne Zugabe jeglicher Substanzen durchgeführt.

Von einer konfluenten 15 cm  $\varnothing$  HaCaT – Zellkulturschale wurde die Zellzahl bestimmt und auf sechs 60 mm  $\varnothing$  Schalen zu je einer Million Zellen verteilt.

Man ging also von folgenden Ansätzen aus :

Lane	Ansatz
1	Kontrollzellen, die 24 h unbehandelt kultiviert wurden.
2	Kontrollzellen, die 48 h unbehandelt kultiviert wurden.
3	PDD ( $10^{-7}$ M) – behandelte Zellen, die 24 h kultiviert wurden.
4	PDD ( $10^{-7}$ M) – behandelte Zellen, die 48 h kultiviert wurden.
5	TPA ( $10^{-7}$ M) – behandelte Zellen, die 24 h kultiviert wurden.
6	TPA ( $10^{-7}$ M) – behandelte Zellen, die 48 h kultiviert wurden.
7	Probeextrakt der PKC – $\eta$ als Positiv – Kontrolle.

Nach Ablauf der Kultivierungsdauer wurde ein Gesamtzelllysat hergestellt (siehe 3.2.1.). Um von gleichen Bedingungen auszugehen, wurde mittels BCA – Test der Proteingehalt festgestellt und pro Bahn 20  $\mu$ g Protein aufgetragen. Darauf folgte eine 1D SDS PAGE (siehe 3.4.1.) und anschließend ein Western blot mit Antikörpern gegen die unterschiedlichen PKC – Isoformen (vgl.: 3.4.2.2.).

Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt. Die spezifische Bande ist durch einen Pfeil markiert.

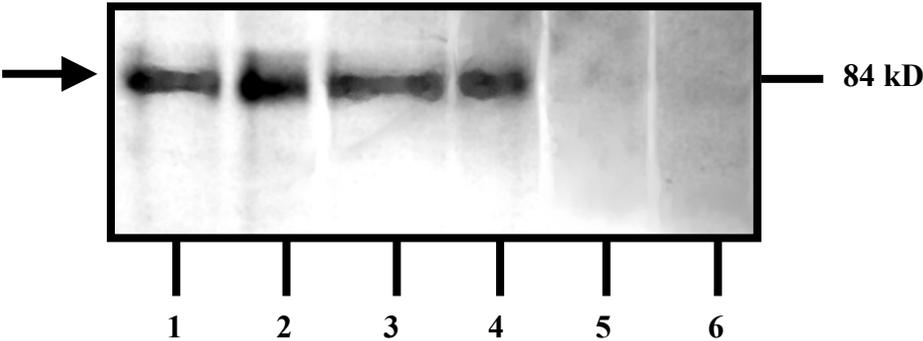


Abbildung 3:  $\alpha$  – Isoform im Western – blot

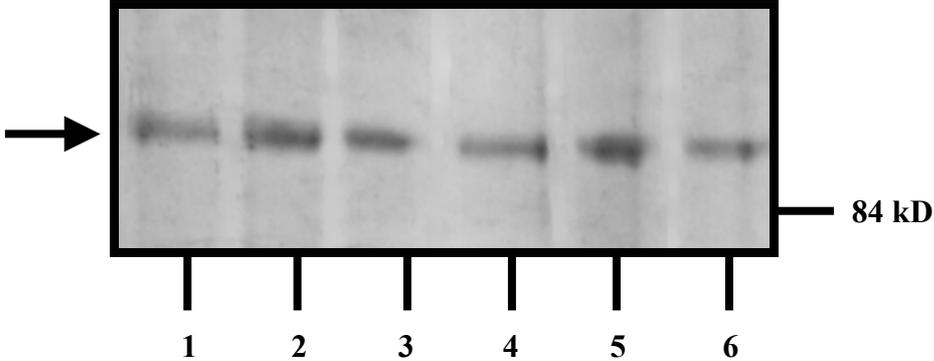


Abbildung 4:  $\beta$  I – Isoform im Western – blot

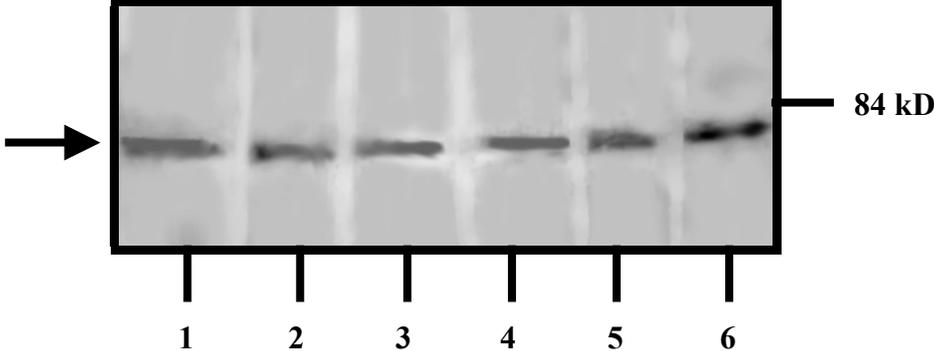


Abbildung 5:  $\beta$  II – Isoform im Western – blot

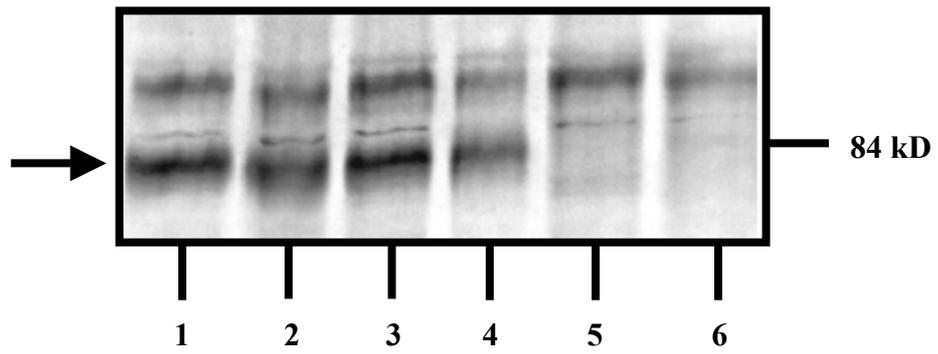


Abbildung 6:  $\delta$  – Isoform im Western – blot

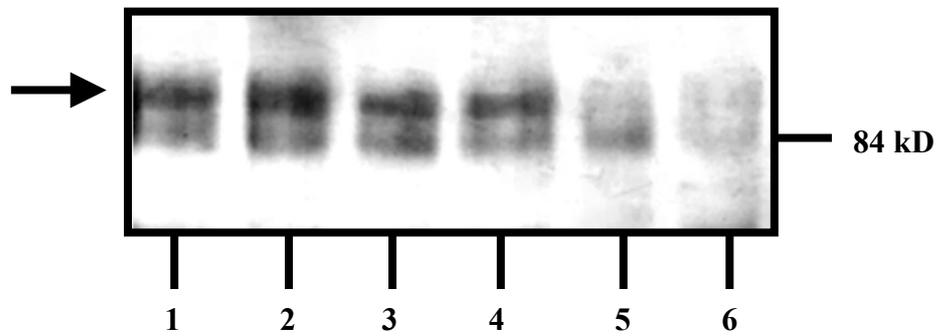


Abbildung 7:  $\epsilon$  – Isoform im Western – blot

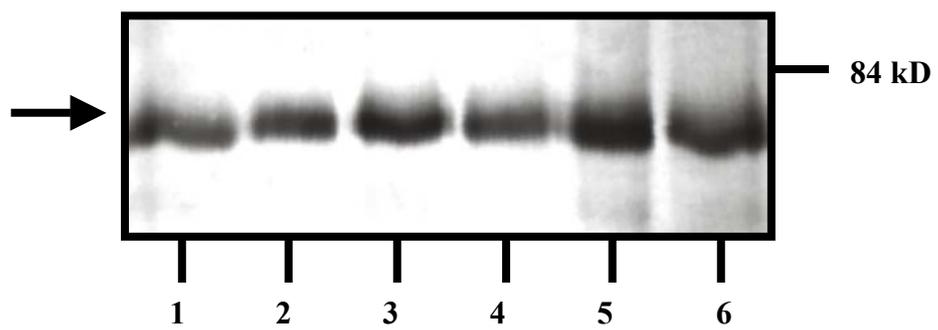
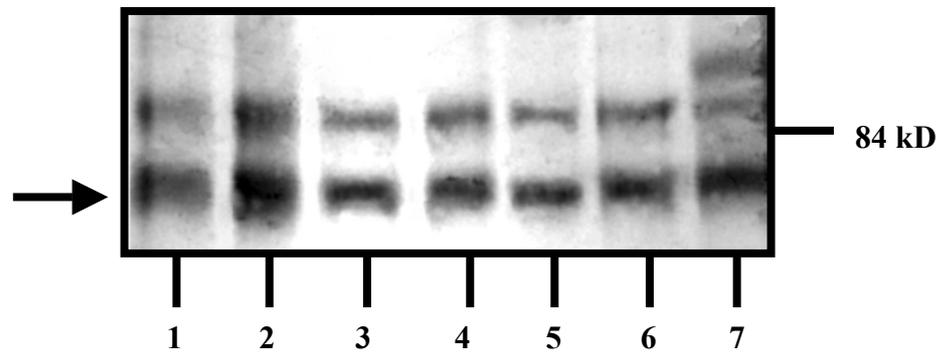
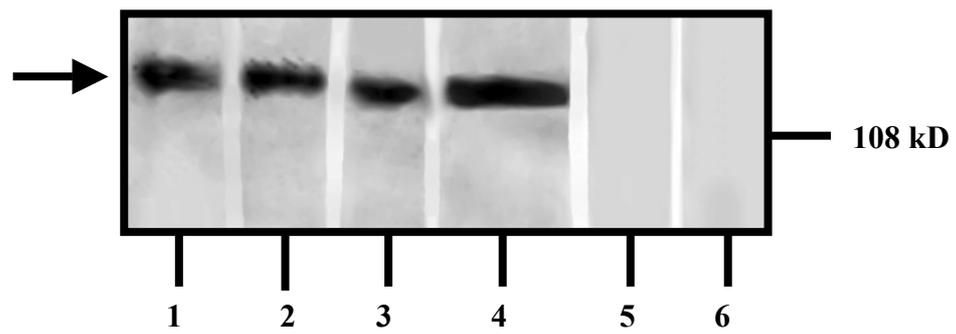


Abbildung 8:  $\zeta$  – Isoform im Western – blot



**Abbildung 9:**  $\eta$  – Isoform im Western – blot



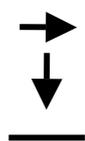
**Abbildung 10:**  $\mu$  – Isoform im Western – blot

Die Westernblot Analysen der PKC - Isoformen  $\gamma$ ,  $\lambda$  und  $\theta$  sind nicht dargestellt, da diese Isoformen in HaCaT nicht zu detektieren waren.

Das Vorkommen der Isoformen und deren Reaktion auf TPA ist nachfolgend tabellarisch zusammengefaßt.

Isoform	24 h TPA Behandlung	48 h TPA Behandlung
$\alpha$	↓	↓
$\beta$ I	→	→
$\beta$ II	→	→
$\gamma$	—	—
$\delta$	↓	↓
$\varepsilon$	↓	↓
$\eta$	→	→
$\theta$	—	—
$\zeta$	→	→
$\lambda$	—	—
$\mu$	↓	↓

Zeichen:



gleiche Expression

Abnahmen der Expression

keine Expression

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die konventionelle PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  I und  $\beta$  II, die neuen PKC – Isoformen  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\mu$ , sowie die atypische PKC  $\zeta$  in der HaCaT – Zelllinie nachweisen lassen.

Die  $\beta$  – Isoform, sowie die PKC  $\eta$  reagierten nicht erwartungsgemäß auf TPA – Behandlung. Dafür sind zwei Gründe denkbar. Einerseits könnte die TPA – Konzentration nicht ausreichend gewesen sein, um diese Isoformen quantitativ auf Proteinebene herunterregulieren zu können. Andererseits könnte auch aus kinetischer Sicht eine schon wieder einsetzende Neuexpression dafür verantwortlich gemacht werden.

#### **4.1.2. Untersuchung der Wirkung des Phorbolesters TPA auf humane Keratinozyten**

I. Heit konnte in ihrer Diplomarbeit 1997 eine Reduzierung der Kontaktinhibition unter TPA – Behandlung an humanen Fibroblasten (FH 109) nachweisen. Entsprechend dieses Ergebnisses liegt es daher auf der Hand, das Verhalten humaner Keratinozyten (HaCaT - Zelllinie) in Bezug auf Kontaktinhibition und Proliferationsverhalten unter TPA – Behandlung zu untersuchen.

##### **4.1.2.1. Wirkung des Phorbolesters TPA auf die Proliferation und Kontaktinhibition humaner Keratinozyten**

Um die Wirkung von TPA auf proliferierende Keratinozyten festzustellen, wurden zwei Zellkulturen jeweils 24 h, bzw. 48 h mit TPA in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M vorinkubiert. Dadurch wurde garantiert, daß eine *Down* – Regulation der sensiblen PKC – Isoformen stattgefunden hat und es somit zu einer „indirekten“ Inhibition dieser Isoformen gekommen ist (siehe 4.1.1.). Frühe Effekte der Aktivierung können damit vernachlässigt werden. Zeitgleich wurde eine weitere Platte mit dem inaktiven Phorbol ester PDD (4 –  $\alpha$  – Phorbol – 12, 13 – didecanoat) 48 h lang mit der gleichen Konzentration vorinkubiert.

Diese vorinkubierte Zellen wurden in einer 96 – Well – Mikrotiterplatte ausgesät. Pro Versuchsreihe wurden in je 6 Wells jeweils  $10^4$  Zellen auf 200  $\mu$ l Medium gegeben und mit TPA, bzw. PDD weiterbehandelt.

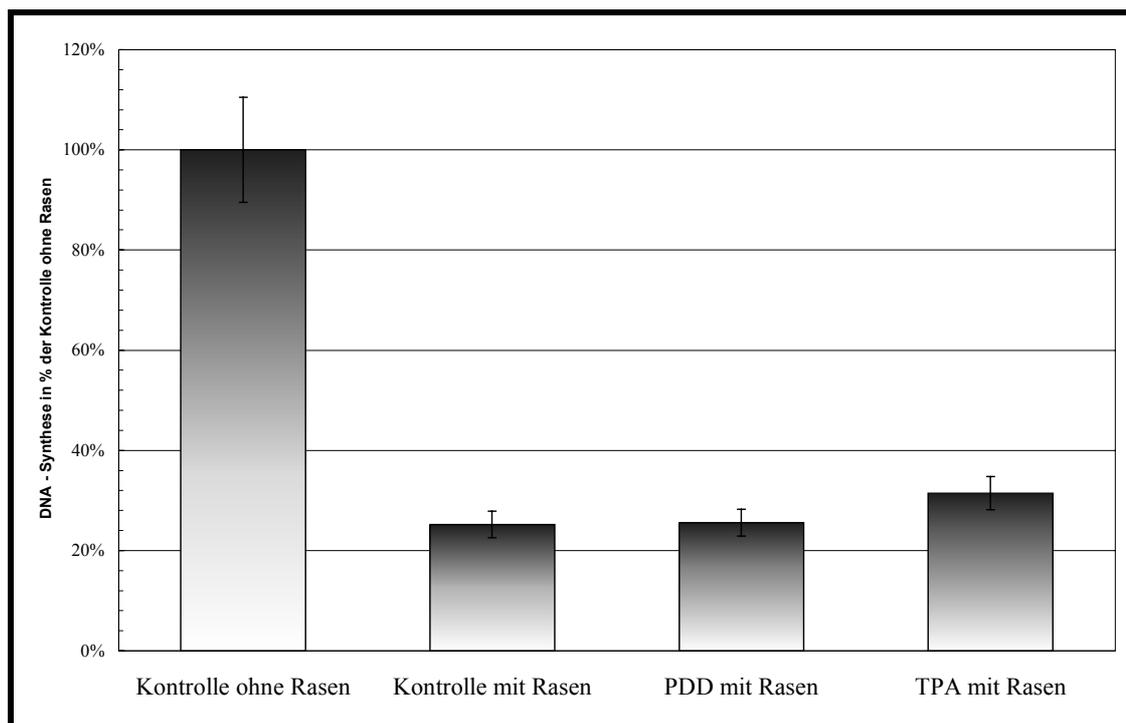
Nach einer weiteren Wachstumsphase von 24 h wurde ein vierstündiger [ $^3$ H] – markierter Thymidineinbau durchgeführt und die Proliferationsrate gemessen (siehe 3.1.8.).

Dieser Versuch ergab, daß TPA einen gering hemmenden Eigeneffekt auf proliferierende Keratinozyten besitzt. Unter TPA – Behandlung sinken die Proliferationsraten um ca. 16 % nach 24 h, bzw. um ca. 13 % nach 48 h gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Das inaktive PDD zeigt mit 4 % Wachstumshemmung keinen Effekt auf die Proliferation.

Um das Verhalten von Keratinozyten unter Kontaktinhibition untersuchen zu können, wurde 24 h vor Versuchsbeginn in eine 96 – Well – Mikrotiterplatte ein Zellrasen ausgesät und fixiert (siehe 3.1.7.). Anschließend wurde dann die zu untersuchenden Zellen ausgesät. Diese Zellen wiesen nun großflächige Kontakte zum Zellrasen auf und aktivierten dadurch die Mechanismen der Kontaktinhibition (siehe Doktorarbeit S. Ast, 1998).

Zwei Zellkulturplatten wurden mit je  $10^{-7}$  M TPA, bzw. PDD 24 h vorinkubiert. Von diesen vorinkubierten Zellen, sowie von einer unbehandelten Kontrollplatte, wurde je  $10^4$  Zellen / Well ausgesät. Dabei wurden die Zellen pro Versuchsansatz in Wells ohne, sowie mit fixiertem Rasen ausgesät. Und mit TPA, bzw. PDD weiterbehandelt.

Nach einer weiteren Wachstumsphase von 24 h wurde ein vierstündiger [ $^3$ H] – Thymidineinbau durchgeführt und die Proliferationsrate gemessen (siehe 3.1.8.).



Grafik 1: Wirkung von TPA auf humane Keratinozyten unter Kontaktinhibition (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

Wie man der Grafik 1 entnehmen kann, wiesen Keratinozyten, die auf einem fixierten Zellrasen wuchsen, eine starke Wachstumshemmung auf. In der Kontrollreihe konnte man eine Proliferationshemmung von ca. 76 % feststellen. Mit PDD behandelte Zellen reagierten ebenfalls mit einer Hemmung von ungefähr 76 %. Unter TPA – Behandlung reduzierte sich das Wachstum der Zellen um ca. 69 %.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß man durch TPA die Kontaktinhibition humaner Keratinozyten nicht signifikant beeinflussen kann.

Wie beschrieben, wird durch TPA – Vorinkubation die Gruppe der konventionellen und neuen PKC's gleichzeitig und unselektiv *down – reguliert*. Dadurch scheinen sich antagonisierende Wirkungen einzelner Isoformen in Bezug auf die Kontaktinhibition aufzuheben. Dies hat zur Folge, daß man durch TPA – Behandlung keinen eindeutigen Effekt auf die Kontaktinhibition erzielen kann.

### 4.1.3. Untersuchung der Wirkung von Rottlerin auf humane Keratinozyten

Rottlerin ist im Gegensatz zu TPA ein spezifischer Inhibitor der PKC – Isoform –  $\delta$  mit einer  $IC_{50}$  von 3  $\mu$ M (in Schweinemilzzellen) und 5  $\mu$ M (in humanen Keratinozyten). Dabei scheint Rottlerin mit ATP um die ATP – Bindungsstelle der PKC –  $\delta$  zu konkurrieren. In Kinaseassays konnte nachgewiesen werden, daß die  $IC_{50}$  von Rottlerin entsprechend der zugegebenen Konzentration von ATP ansteigt.

Andere PKC's werden in dem Bereich von 3  $\mu$ M Rottlerin nur gering (< 10 %) in ihrer Aktivität gehemmt.

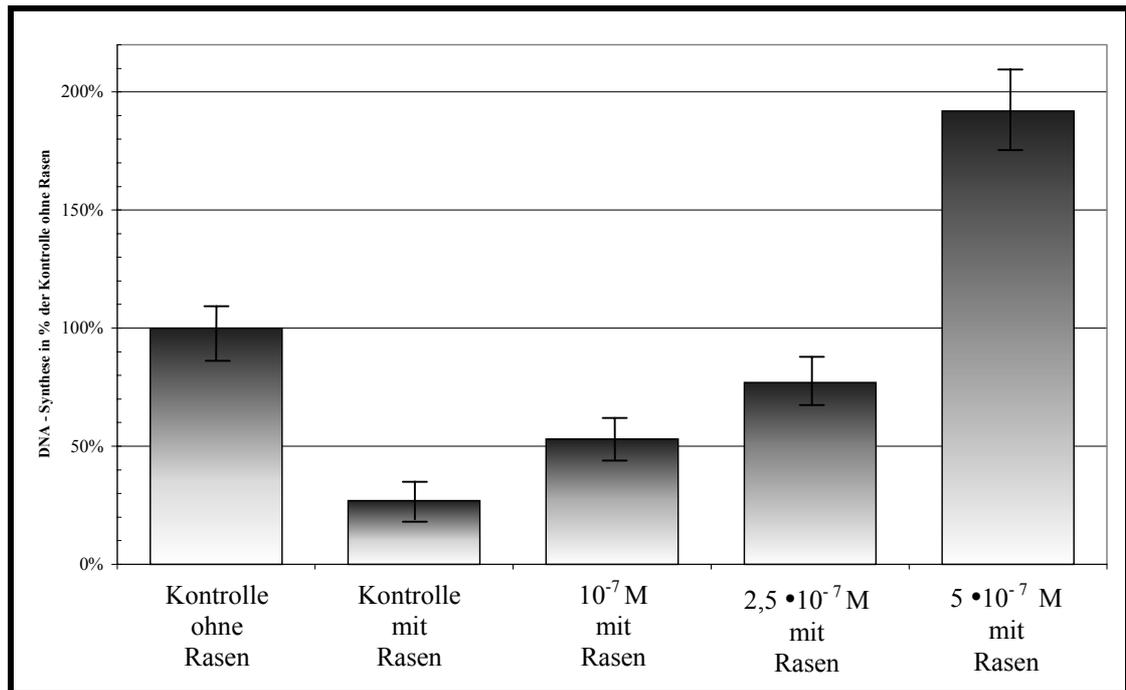
#### 4.1.3.1. Wirkung von Rottlerin auf die Kontaktinhibition humaner Keratinozyten

Es ist bekannt, daß man durch Rottlerinbehandlung der HaCaT - Zelllinie die Kontaktinhibition aufheben kann (Doktorarbeit Heit, I. 2000). Auf diese Ergebnis aufbauend, erscheint es sinnvoll, das Verhalten der Zellen in Bezug auf Kontaktinhibition und Proliferation unter Variation der Rottlerinkonzentration genauer zu untersuchen.

Entsprechend der Untersuchung der Wirkung des Phorbolesters TPA auf die Kontaktinhibition (siehe 4.1.2.1.), wurde 24 h vor Versuchsbeginn in eine 96 – Well – Mikrotiterplatte ein Zellrasen ausgesät und fixiert (siehe 3.1.7.). Anschließend konnten die zu untersuchenden Zellen ausgesät werden.

Pro Versuchsreihe wurden Zellen einer semikonfluenten Zellkulturplatte genommen und jeweils  $10^4$  Zellen / Well auf 200  $\mu$ l Medium gegeben. Entsprechend des Versuchsansatzes wurde nach vier Stunden – zu diesem Zeitpunkt waren über 90% der Zellen adhärend – Rottlerin in den Konzentrationen von  $5 \cdot 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M und  $5 \cdot 10^{-7}$  M zugegeben.

Nach einer weiteren Wachstumsphase von 24 h wurde ein vierstündiger [ $^3$ H] – Thymidineinbau durchgeführt und die Proliferationsrate gemessen (siehe 3.1.8.).



Grafik 2: Wirkung von Rottlerin auf humane Keratinozyten und Kontaktinhibition (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

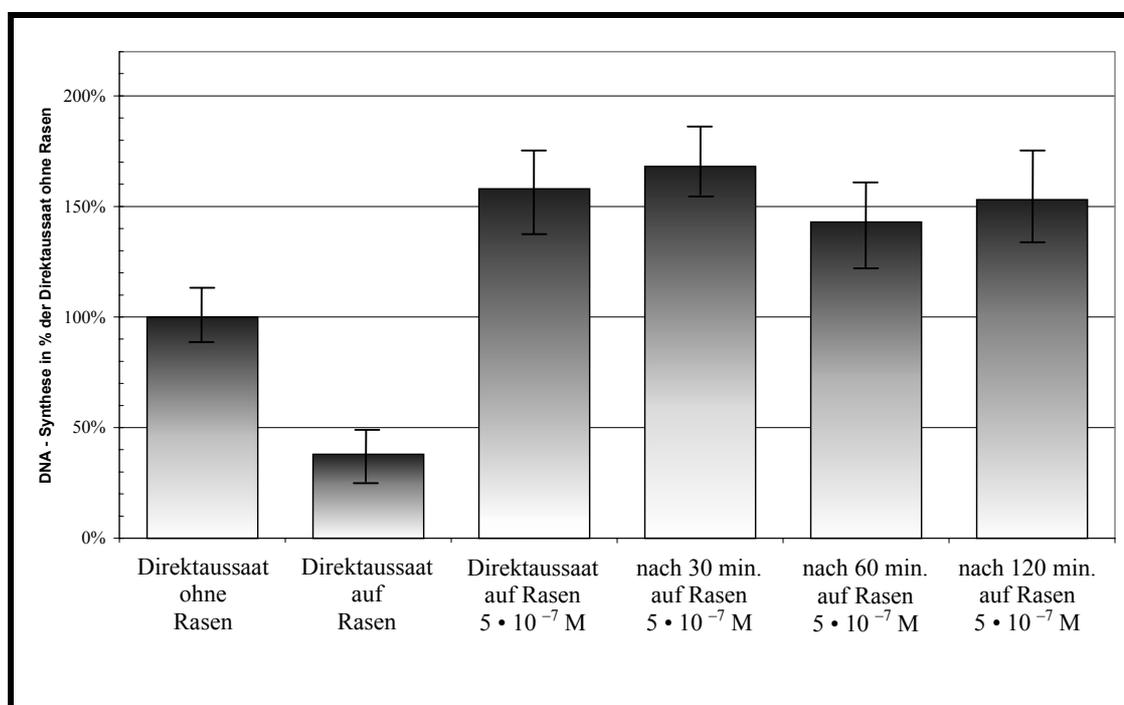
Aus der Grafik 2 kann man erkennen, daß unter Rottlerinbehandlung die Kontaktinhibition aufgehoben werden konnte. Die durch den fixierten Rasen bewirkte Proliferationshemmung nahm mit steigender Konzentration kontinuierlich ab.

Während die Kontrollzellen eine Wachstumshemmung von circa 77 % aufwiesen, verringerte sich mit steigender Rottlerinkonzentration die Hemmung von 42 % bei  $10^{-7}$  M, auf ungefähr 23 % bei  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M auf fixierten Rasen. Unter der maximalen Konzentration von  $5 \cdot 10^{-7}$  M kommt es zu einer Umkehr, so daß die Keratinozyten stärker auf Rasen wachsen als ohne (Proliferationssteigerung von circa 92 %).

Aus diesem Ergebnis stellt sich die Frage, ob die Aufhebung der Kontaktinhibition PKC –  $\delta$  vermittelt ist oder unspezifische Effekte Einfluß besitzen, wie z.B. eine Rottleinwirkungsabschwächung durch Absorption durch den Zellrasen.

#### 4.1.3.2. Wirkung von Rottlerin auf die Kontaktinhibition nach verzögerter Aussaat

Um auszuschließen, daß der fixierte Rasen die Wirkung des Rottlerins verändert, wurden in einem weiteren Versuch Zellen nach Abtrypsinisierung sowohl direkt ausgesät, als auch in drei Falcon – Tube im Wasserbad bei 37 ° C gelagert. Dabei wurden die Zellen in einem Falcon – Tube unbehandelt gelassen, die anderen zwei mit  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M und  $5 \cdot 10^{-7}$  M Rottlerin inkubiert. Eine Inkubationszeit von einer Stunde ist ausreichend, damit Rottlerin die Zelle penetriert und seine volle Wirkung entfalten kann (Doktorarbeit Heit, I., 2000). Durch Vorinkubation im Falcon – Tube kann ausgeschlossen werden, daß der fixierte Rasen Einfluß auf die Rottlerinwirkung nimmt. Unter regelmäßigem behutsamen Schütteln wurde ein Absetzen der Zellen vermieden. Nach einer Verweildauer von 30 Minuten, einer, bzw. zwei Stunden im Wasserbad wurden die Zellen ausgesät und Rottlerin der Konzentration  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M und  $5 \cdot 10^{-7}$  M zugegeben.



Grafik 3: Wirkung von Rottlerin auf die Kontaktinhibition nach verzögerter Aussaat (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

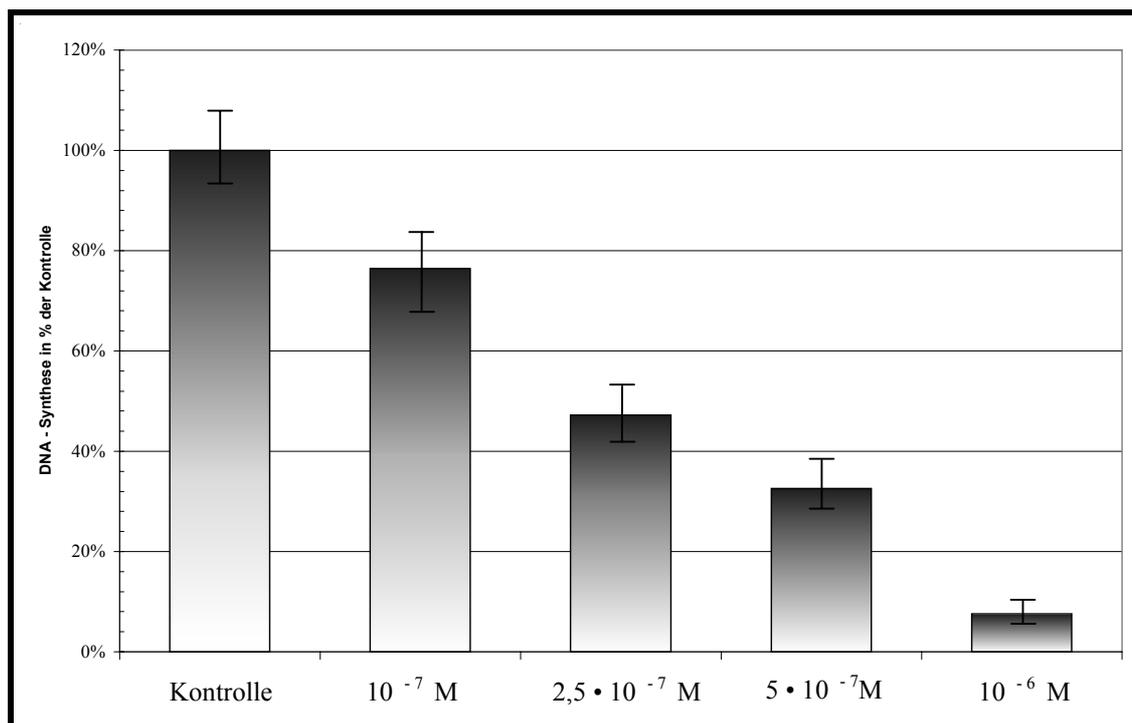
Dabei konnte im anschließenden Proliferationstest beobachtet werden, daß im Vergleich der unbehandelten Direktaussaat mit unbehandelten im Wasserbad gelagerten Zellen das Wachstum mit verlängertem Verbleib im Wasserbad abnahm (maximal 20 % nach 2h gegenüber direkt ausgesäeter Kontrolle). Die Reaktion der Keratinozyten in Bezug auf die Kontaktinhibition veränderte sich jedoch nicht. Auch nach zweistündig verzögerter Aussaat konnte eine rottlerinbedingte Aufhebung der Kontaktinhibition festgestellt werden (siehe Grafik 4).

Daraus läßt sich schließen, daß der fixierte Rasen keinen Einfluß auf die Rottlerinwirkung in Bezug auf das Wachstumsverhalten proliferierender Keratinozyten besitzt, d.h. es findet keine unspezifische Absorption oder Wirkabschwächung durch Interaktion mit dem Zellrasen statt..

#### **4.1.3.3. Untersuchung der Proliferationshemmung durch Rottlerin auf humane Keratinozyten**

Um die Wirkung von Rottlerin auf proliferierende Keratinozyten festzustellen, wurden Zellen einer semikonfluenten Zellkulturplatte genommen. Pro Versuchsreihe wurden jeweils  $10^4$  Zellen / well in 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Entsprechend des Versuchsansatzes wurde nach vier Stunden – zu diesem Zeitpunkt waren über 90 % der Zellen adhärend – Rottlerin in den Konzentrationen von  $10^{-7}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M,  $5 \cdot 10^{-7}$  M und  $10^{-6}$  M zugegeben. Als Kontrolle diente ein unbehandelter Versuchsansatz.

Nach einer Wachstumsphase von 24 h wurde ein vierstündiger [ $^3$ H] – markierter Thymidineinbau durchgeführt und die Proliferationsrate gemessen (siehe 3.1.8.).



Grafik 4: Wachstumshemmung durch Rottlerin auf humane Keratinozyten  
(Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

Anhand der Grafik erkennt man, daß Rottlerin einen konzentrationsabhängigen proliferationshemmenden Effekt auf Keratinozyten besitzt, der nahezu linear verläuft. Unter einer Dosierung von  $10^{-7}$  M Rottlerin beobachtet man eine Wachstumsreduktion von circa 24 %. Steigert man die Konzentration auf  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M, so reduziert sich das Wachstum um etwa 53 %. Die Proliferationshemmung bei  $5 \cdot 10^{-7}$  M erreicht rund 64 %. In der höchsten Konzentration liegt die Inhibition durch Rottlerin bei ungefähr 92 %.

Dieser Effekt wird möglicherweise durch Inhibition der CAM Kinase III ausgelöst.

Mit einer  $IC_{50}$  von  $5,3 \mu\text{M}$  inhibiert Rottlerin neben der PKC –  $\delta$  auch die Calmodulinkinase III (CAM Kinase III).

Die **Calmodulinkinase III** gehört zur Familie der Calcium / Calmodulin – Kinasen. Zu dieser Familie gehören drei Enzyme, die Myosin – leichte – Kettenkinase (MLCK) (besonders in Muskelzellen nachweisbar), die Phosphorylase – Kinase (Enzym der

Glykogenolyse) und auch die multifunktionelle CAM – Kinase III, mit einem besonders umfangreichen Substratspektrum.

Die CAM – Kinase III wird spezifisch von einem Calcium / Calmodulinkomplex aktiviert. Calmodulin ist besonders stark in Muskelzellen nachweisbar, wird aber auch in geringen Konzentrationen in Keratinozyten angetroffen. Unter Calciumbindung an einer seiner vier Calciumbindungsstellen macht Calmodulin eine Konformationsänderung durch, wodurch es in seine aktive Form überführt werden kann.

Rottlerin scheint an der CAM – Kinase III als Calmodulin – Antagonist zu wirken und kompetitiv um die Calmodulinbindungsstelle zu konkurrieren (Geschwendt, M. *et al*, Juni, 1994).

Die CAM – Kinase III phosphoryliert hochspezifisch den **Elongationsfaktor – 2** (eEF – 2), der eine Regulation der Proteinbiosynthese auf Ebene der Proteinverlängerung ermöglicht. Der eEF – 2 vermittelt die Verlagerung der ribosomalen Einheit um die folgenden drei Basenpaare (Codon). Dabei wird eEF – 2 für die Translokation der Peptidyl – tRNA mit der mRNA auf die Peptidylstelle des Ribosoms benötigt.

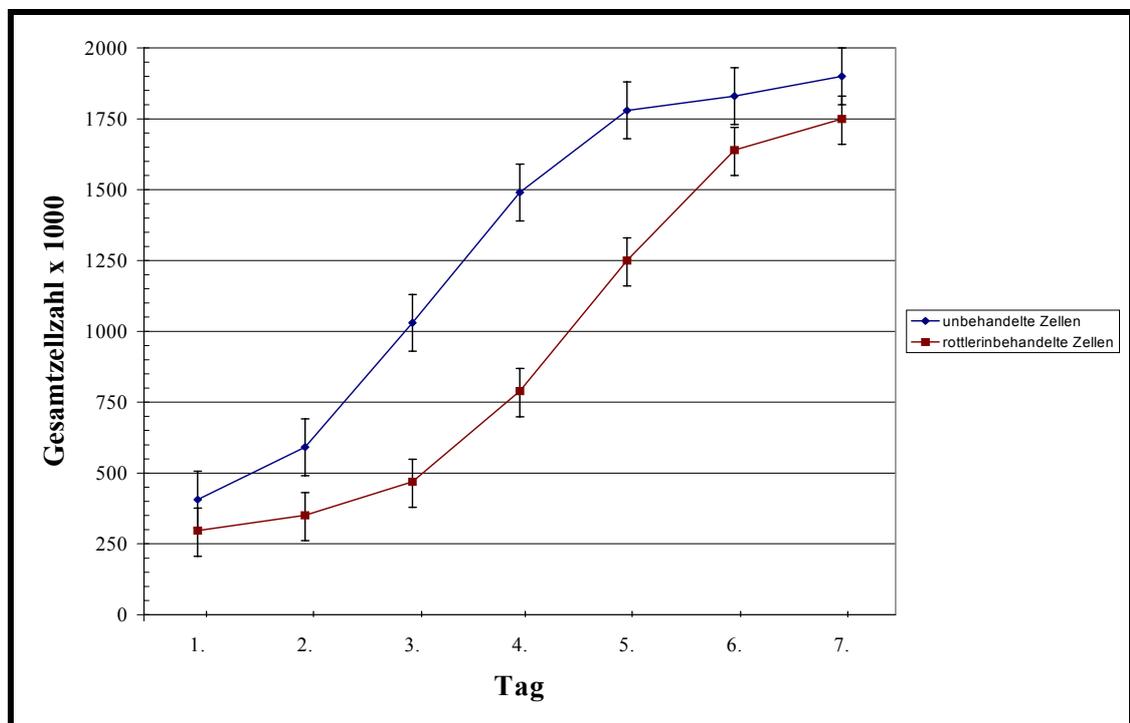
#### **4.1.3.4.Reversibilität / Toxizität von Rottlerin**

Da es durch Rottlerin zu einer teilweise erheblichen Proliferationsreduktion kommt (siehe 4.1.3.3.), sollte in folgendem Versuch nachgewiesen werden, daß die Wachstumshemmung von Rottlerin reversibel ist und damit nicht auf toxischen Effekten beruht.

Dafür wurden jeweils  $3 \cdot 10^5$  Zellen in 60 mm  $\varnothing$  – Zellkulturschale ausgesät. Zeitgleich wurden außerdem  $10^4$  Zellen pro Well in 96 – Well – Mikrotiterplatten gegeben. Nach vier Stunden wurde Rottlerin in der Konzentration von  $5 \cdot 10^{-7}$  M in die Hälfte aller Platten, bzw. Wells gegeben. Nach einer Wachstumszeit von 24 h wurde Rottlerin durch dreimaliges Spülen mit PBS heruntergewaschen. Anschließend folgte ein Mediumwechsel.

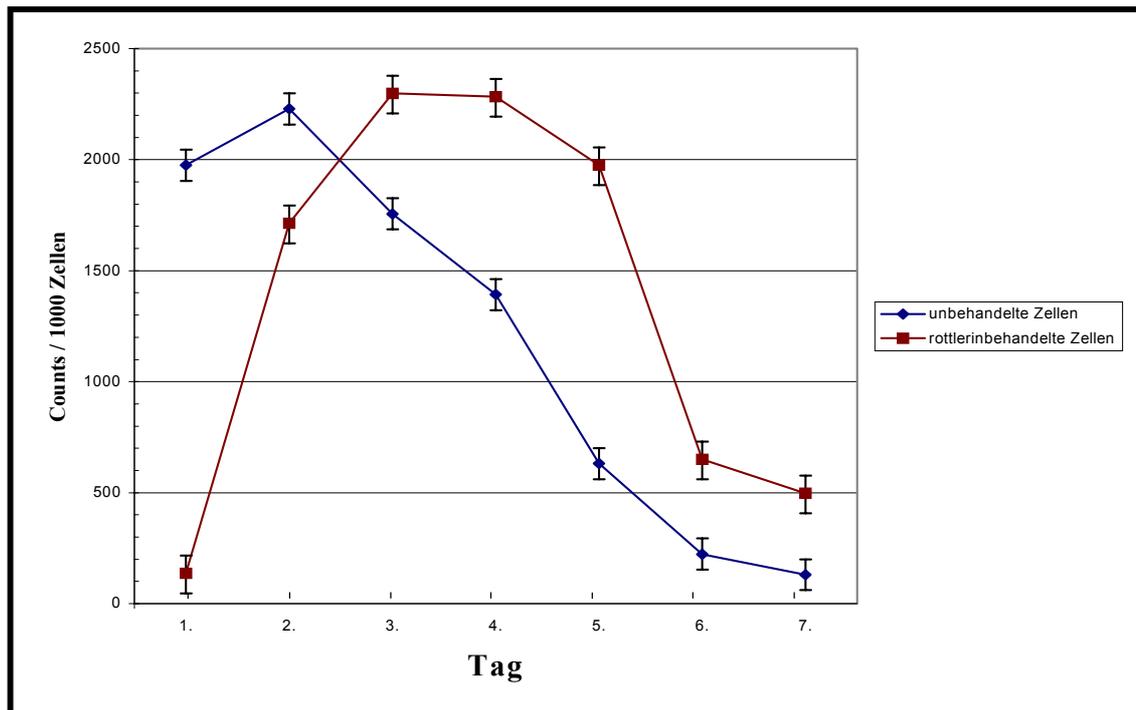
Nach dem ersten Tag wurde jeweils täglich die Zellzahl der Kontroll-, sowie der Rottlerin-behandelten Zellen auf den Zellkulturplatten bestimmt (siehe 3.1.4.). Um die Toxizität zu bestimmen, wurde sowohl die Anzahl der lebenden, wie auch die der abgestorbenen Zellen ausgezählt. Dafür wurde der Vitalitätstest mit Trypanblau angewendet.

Alle Zellzahlbestimmungen erfolgten im Doppelansatz. Neben der Zellzahlbestimmung wurde zeitgleich in den Mikrotiterplatten ein vierstündiger [ $^3\text{H}$ ] - markierter Thymidineinbau durchgeführt.



**Grafik 5:** Reversibilitätstest unter Rottlerinbehandlung

(Mittelwert aus 4 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)



Grafik 6: Proliferationstest unter Rottlerinbehandlung

(Mittelwert aus 4 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

Wie man entsprechend der Grafik 5 erkennen kann, kommt es am ersten Tag zu einer Rottlerin – bedingten Wachstumsreduktion. Nach einer kurzen „Erholungsphase“, beginnen die Zellen jedoch erneut zu proliferieren. Zellzahlbezogen weisen sie gegenüber der Kontrollgruppe einen Rückstand von circa 1,5 Tagen auf, wobei der relative Zellzahlzuwachs dabei jedoch dabei annähernd gleich bleibt. Mit zunehmender Konfluenz der Kulturplatte reduziert sich das Wachstum nach initialer Beschleunigungsphase zusehends (siehe Grafik 6).

Damit ist eindeutig bewiesen, daß die Rottlerin – bedingte Wachstumsreduktion, vollständig reversibel ist und somit nicht auf toxischen Effekten beruht.

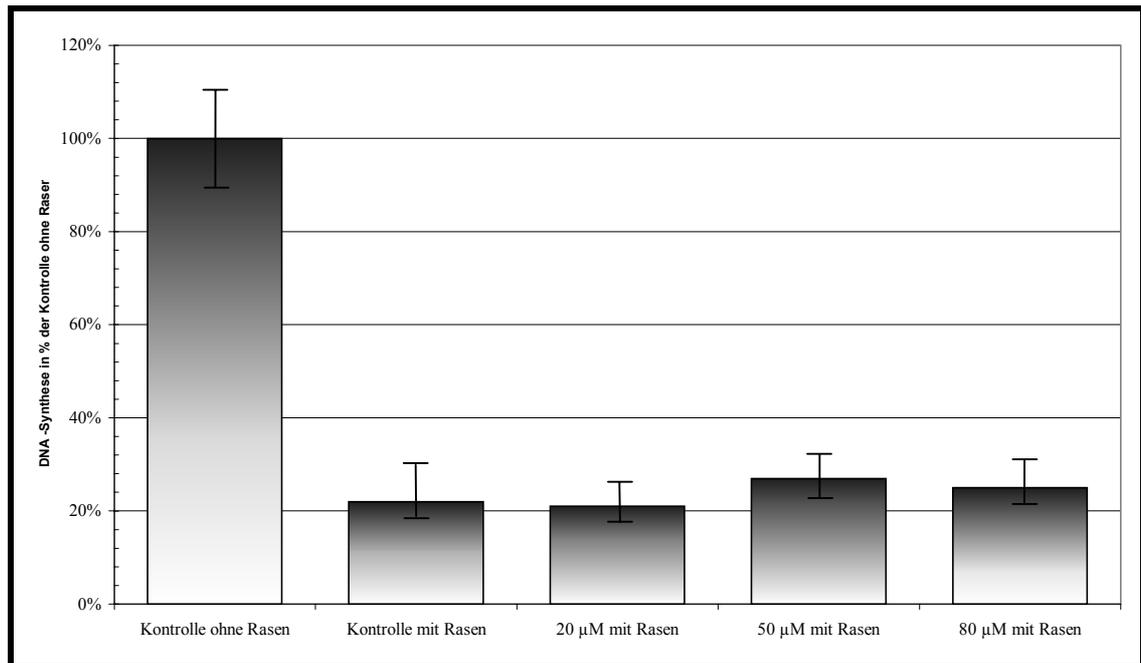
#### **4.1.4. Untersuchung der Wirkung von Calphostin C auf die Kontaktinhibition und Proliferationsverhalten**

Calphostin C ist ein PKC – Inhibitor der konventionellen und neuen Gruppe, wobei eine Präferenz gegenüber neuen PKC's festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu Rottlerin besitzt Calphostin C jedoch keine PKC –  $\delta$  – Selektivität (Keenan, C. *et al.*, 1997). Es gehört zu den Inhibitoren mikrobiologischen Ursprungs, isoliert aus dem Pilz *Cladosporium cladosporoides* (Tamaoki, T. *et al.*, 1990).

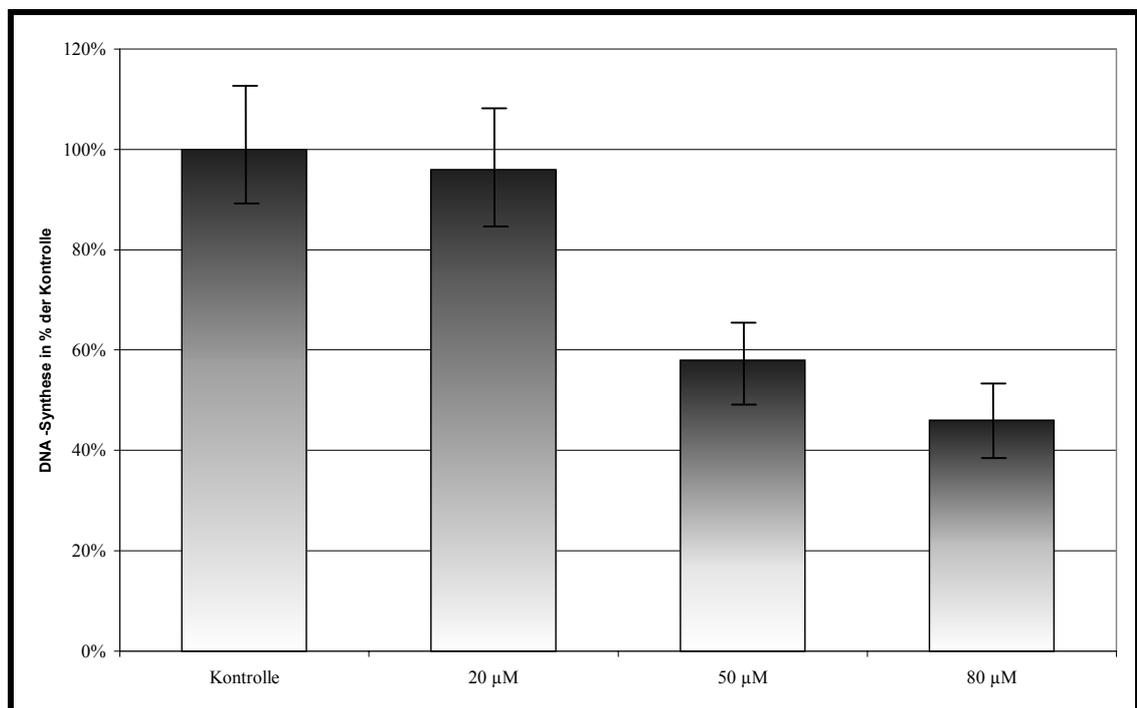
Calphostin C besitzt jedoch gegenüber Rottlerin den Vorteil, daß es keine Wirkung auf die CAM – Kinase III ausübt. Ziel dieses Versuches ist es, im Vergleich die Rottlerinwirkungen besser der PKC -  $\delta$ , bzw. der CAM – Kinase III zuordnen zu können.

Um das Verhalten von Keratinozyten unter Kontaktinhibition untersuchen zu können, wurde 24 h vor Versuchsbeginn in eine 96 – well – Mikrotiterplatte ein Zellrasen ausgesät und fixiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen ausgesät und die entsprechenden Konzentrationen Calphostin C zugegeben.

Nach einer Wachstumsphase von 24 h wurde ein vierständiger [ $^3\text{H}$ ] – markierter Thymidineinbau durchgeführt und die Proliferationsrate gemessen (siehe 3.1.8.).



Grafik 7: Wirkung von Calphostin C auf die Kontaktinhibition  
(Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)



Grafik 8: Wachstumshemmung durch Calphostin C  
(Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

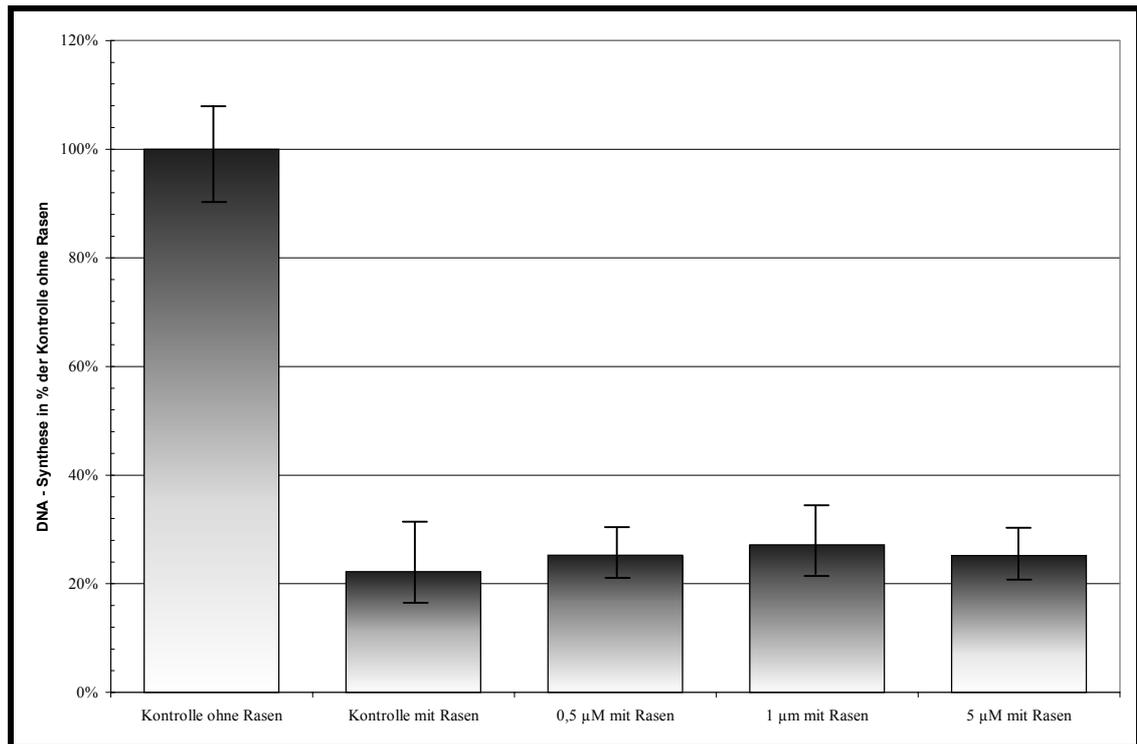
Calphostin C besitzt – wie man aus der Grafik 8 entnehmen kann – mit steigender Dosierung einen inhibitorischen Effekt auf das Proliferationsverhalten. Auf noch höhere Konzentrationen wurde verzichtet, da sich in diesem Bereich irreversible toxische Effekte einstellten. Diese Proliferationshemmung kann man sowohl beim Wachstum ohne, sowie auf fixiertem Rasen nachweisen. Im Vergleich des Wachstums von Zellen mit, bzw. ohne Rasen bleibt die raseninduzierte Hemmung auch bei Dosissteigerung zwischen 73 und 79 % etwa gleich (siehe Grafik 7). Auch eine Vorinkubation der Zellen von ½ h, 2 h und 24 h mit Calphostin C in entsprechender Konzentration bestätigte diese Versuchsergebnisse.

Im Gegensatz zu Rottlerin kann man durch Calphostin C die Kontaktinhibition nicht aufheben. Dies liegt höchstwahrscheinlich darin begründet, daß Calphostin C als PKC – Inhibitor keine eindeutige Präferenz besitzt. Durch gleichzeitige unselektive Inhibition mehrerer PKC's, scheinen sich antagonisierende Wirkungen in Bezug auf die Kontaktinhibition aufzuheben und es bleibt ein allgemein wachstumsinhibitorischer Effekt übrig. Dieses Ergebnis ähnelt den Untersuchung unter TPA – Behandlung.

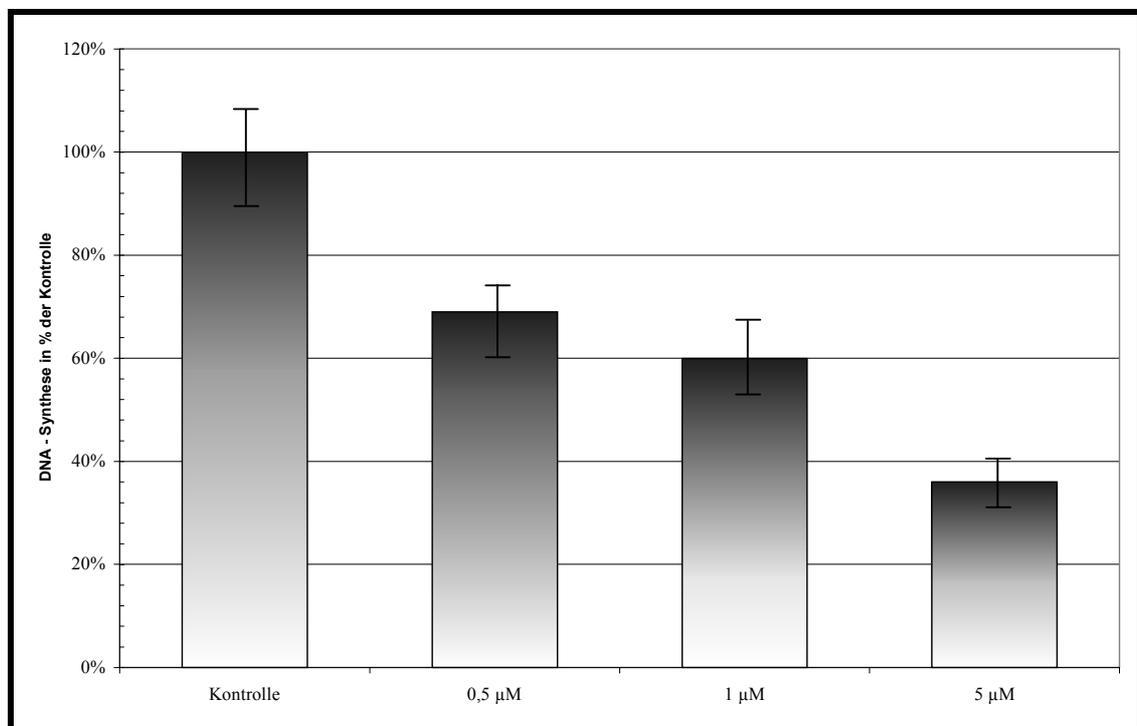
#### **4.1.5. Untersuchung der Wirkung von Trifluoperazin auf die Kontaktinhibition und das Proliferationsverhalten**

Trifluoperazin ist ein indirekter Inhibitor der Calmodulinkinase III. Dabei wirkt es als kompetitiver Antagonist zum Calmodulin (Parmer *et al.*, 1997). Durch Inhibition dieses Enzyms kommt es zu einer mangelhaften Phosphorylierung des Elongationsfaktors – 2 und damit sekundär zu einer Störung in der Proteinbiosynthese (siehe 4.1.3.3.). Auf die PKC –  $\delta$  hat Trifluoperazin keinen bekannten Einfluß.

Daher eignet sich Trifluoperazin gut, wie auch schon zuvor die Versuche mit Calphostin C, die Wirkungen von Rottlerin besser der PKC –  $\delta$ , bzw. der CAM – Kinase III zuordnen zu können.



Grafik 9: Wirkung von Trifluoperazin auf die Kontaktinhibition  
(Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)



Grafik 10: Wachstumshemmung durch Trifluoperazin  
(Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung)

Um das Verhalten von Keratinozyten unter Kontaktinhibition untersuchen zu können, wurde 24 h vor Versuchsbeginn in eine 96 – well – Mikrotiterplatte ein Zellrasen ausgesät und fixiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen ausgesät und die entsprechenden Konzentrationen Trifluoperazin zugegeben.

Nach einer Wachstumsphase von 24 h wurde ein vierstündiger [<sup>3</sup>H] – markierter Thymidineinbau durchgeführt und die Proliferationsrate gemessen (siehe 3.1.8.).

Trifluoperazin besitzt einen wachstumshemmenden Effekt. In einer Konzentration von 5 µM kann man das Wachstum gegenüber der Kontrolle um 64 % hemmen (siehe Grafik 10).

Trifluoperazin hat aber keinen Effekt auf die Kontaktinhibition. Trotz Wachstumshemmung bleibt das relative Verhältnis zwischen Wachstum auf / ohne Rasen etwa gleich (Hemmung zwischen 71 und 76 %) (siehe Grafik 9).

Die Wachstumsreduktion läßt sich auf eine indirekte Hemmung der CAM – Kinase III zurückführen. Durch mangelnde Phosphorylierung des Elongationsfaktor 2 (eEF – 2), kommt es sekundär zu einer Störung der Proteinverlängerung auf ribosomaler Ebene, so daß nicht mehr ausreichend Zellteilungsproteine für den Mitoseprozeß zur Verfügung gestellt werden können.

Daß Trifluoperazin keine Einfluß auf die Kontaktinhibition hat, unterstützt die Hypothese einer PKC – δ vermittelten Aufhebung der Kontaktinhibition durch Rottlerin.

## **4.2. Die Rolle der PKC – $\delta$ in der zytoarchitektonischen Reorganisation humaner Keratinozyten**

Wie schon in der Einleitung beschrieben, besitzt die PKC eine Schlüsselfunktion in der terminalen Differenzierung und Organisation des mikrofilamentären Netzwerks (Gherzi, T. *et al.*, 1992).

Unter Rottlerin – Behandlung kommt es zu typischen morphologischen Veränderungen humaner Keratinozyten (Doktorarbeit Heit, I., 2000 / siehe auch Bild 2). Im Zellverband verlieren sie ihren typischen Plattenepithelcharakter. Es treten spindelförmige Zellausläufer auf, die an Zellen mesenchymalen oder neuronalen Ursprungs erinnern. Weiterhin vermehren sich zytoplasmatische Vakuolen und es tritt eine Ballung zellulärer Membrankomponenten im Zytoplasma auf, wie es auch Parmer, T.G. *et al.*, 1997 beschrieben haben.

In den weiteren Versuchen soll nachgewiesen werden, daß diese zellmorphologischen Veränderungen aufgrund einer Hemmung der PKC –  $\delta$  auftreten. Dafür werden Versuche mit Rottlerin und Calphostin C, sowie dem CAM – Kinase III – Inhibitor Trifluoperazin durchgeführt.

### **4.2.1. Lokalisation der PKC– $\delta$ in konfluenter und semikonfluenter Zellkultur**

In diesem Versuch soll die Fragestellung geklärt werden, ob sich die quantitative Expression, bzw. Lokalisation der PKC –  $\delta$  in konfluent, d.h. kontaktinhibiert ausgesäten Zellen gegenüber semikonfluenten Zellen unterscheidet, um daraus Rückschlüsse auf ihren Aktivierungszustand ziehen zu können.

Es ist bekannt, daß die PKC –  $\delta$  in allen Zellkompartimenten humaner Keratinozyten detektiert werden kann. Dabei ist sie nukleär am stärksten nachweisbar (Gschwendt, M. *et al.*, 1994).

Um zu klären, wo die PKC–  $\delta$  innerhalb kultivierter Zellen lokalisiert ist, wurden Immunfluoreszenzversuche (siehe 3.5.2.) mit einem spezifischen PKC –  $\delta$  – Antikörper

durchgeführt. Dafür wurden Zellen zum einen semikonfluent ( $3 \cdot 10^5$  Zellen / 60 mm  $\varnothing$  – Zellkulturschale, in der sich drei Deckplättchen befanden) und zum anderen konfluent ( $6 \cdot 10^5$  Zellen / 60 mm  $\varnothing$  – Zellkulturschale, in der sich drei Deckplättchen befanden) ausgesät. Um die Qualität des Antikörpers zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenzuntersuchung unter Vorinkubation des Antikörpers mit einem Blockpeptid durchgeführt (siehe 3.5.1.1.).

Wie man anhand der Bilder 3 bis 6 erkennen kann, ist die PKC –  $\delta$  erwartungsgemäß primär kernständig lokalisiert.

In den dicht ausgesäten Zellen (Bild 5) fällt auf, daß die PKC –  $\delta$  quantitativ stärker nachweisbar ist als in semikonfluenten (Bild 3). Eine Translokation ist dabei aber nicht festzustellen. Der Zell – Zell – Kontakt scheint damit Einfluß auf die PKC –  $\delta$  – Expression zu besitzen.

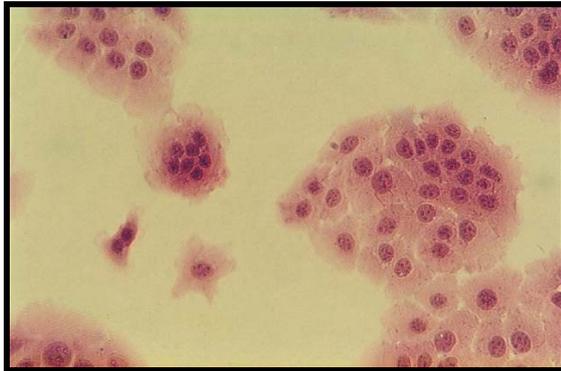
Die mit dem PKC –  $\delta$  – spezifischen Blockpeptid vorinkubierte Immunfluoreszenz ist nicht dargestellt, da nur eine sehr schwache unspezifische Färbung nachweisbar war. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man feststellen, daß der PKC –  $\delta$  – Antikörper hochspezifisch bindet.

#### **4.2.2 Lokalisation der PKC – $\delta$ unter Rottlerinbehandlung**

Durch Inhibierung der Aktivität der PKC –  $\delta$  mittels Rottlerin soll untersucht werden, ob es zu einer kompartimentären Translokation kommt.

Dafür wurde Rottlerin 4 h nach Aussaat der Zellen in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-7}$  M zugegeben.

Entsprechend der Bilder 7 und 8 kann man auch weiterhin unter Rottlerin – Behandlung eine der Kontrolle vergleichbare Lokalisation und quantitativen Expression der PKC –  $\delta$  nachweisen. Damit kommt es unter Rottlerin – Behandlung zu keiner Translokation, bzw. Expressionsveränderung. Eine Degradation wie sie unter TPA – Behandlung stattfindet, ist damit nicht anzunehmen.



**Bild 1:**

Unbehandelte Keratinozyten.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.

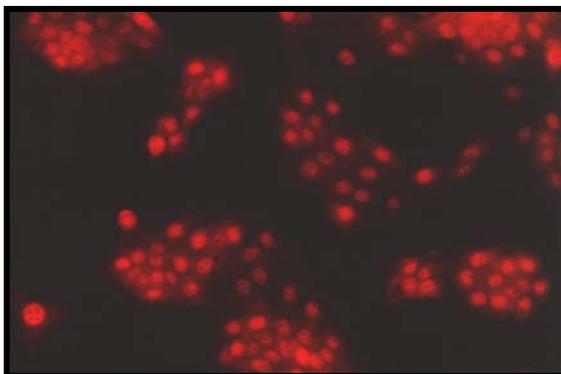
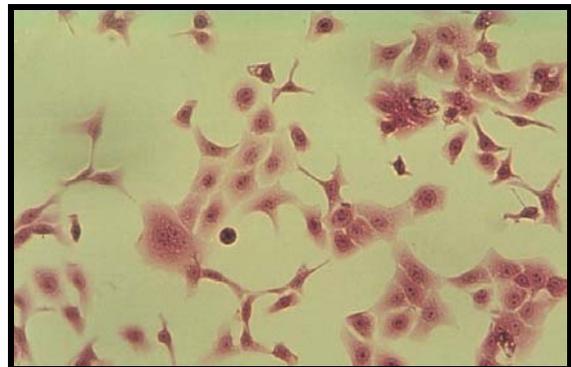
**Bild 2:**

Rottlerin – behandelte

Keratinozyten.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.



**Bild 3:**

Semikonfluente Keratinozyten.

Immunfluoreszenz mit einem

PKC –  $\delta$  – Antikörper.

Vergrößerung: 80 – fach.

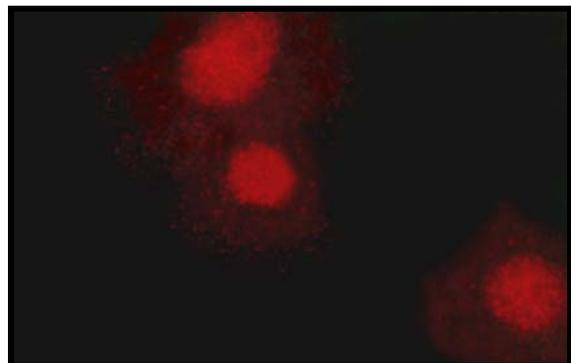
**Bild 4:**

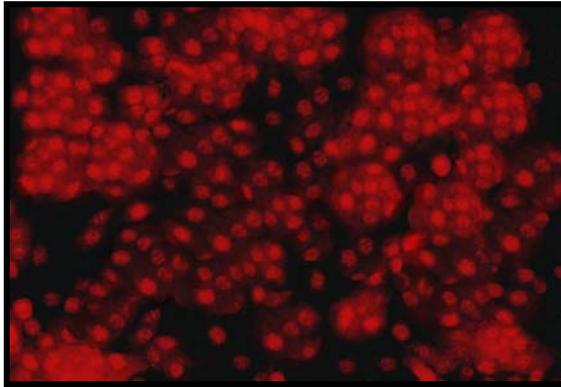
Semikonfluente Keratinozyten.

Immunfluoreszenz mit einem

PKC –  $\delta$  – Antikörper.

Vergrößerung: 400 – fach.

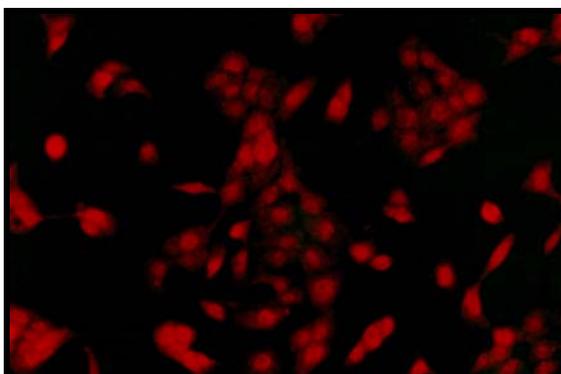
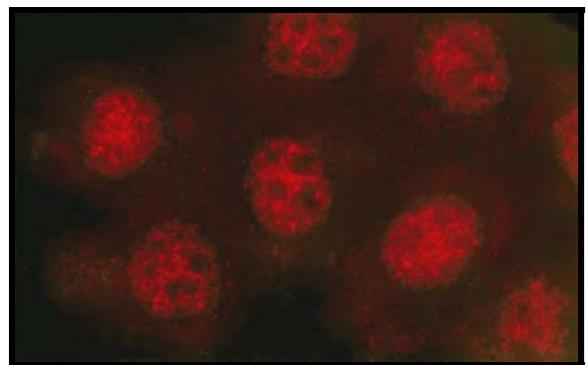




**Bild 5:**

Konfluente Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
PKC –  $\delta$  – Antikörper.  
Vergrößerung: 80 – fach.

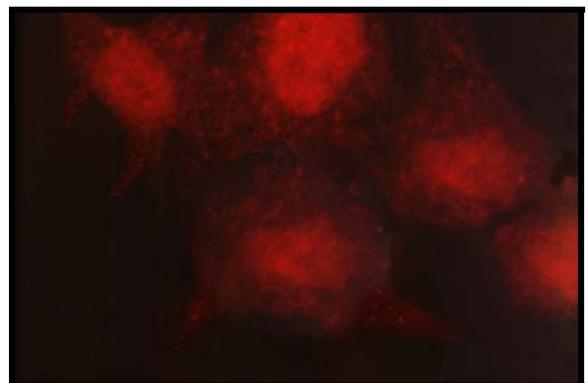
**Bild 6:**  
Konfluente Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
PKC –  $\delta$  – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



**Bild 7:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
PKC –  $\delta$  – Antikörper.  
Vergrößerung: 80 – fach.

**Bild 8:**  
Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
PKC –  $\delta$  – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



#### **4.2.3. Reorganisation des Zytoskeletts unter Rottlerin-, Calphostin C- und Trifluoperazin – Behandlung**

Zytokeratine gehören zu den intermediären Filamenten, die eine hohe Belastungsstabilität der Keratinozyten gewährleisten und dessen Morphologie prägen (siehe Einleitung).

Das Zytokeratin 7 gehört zur Gruppe der basischen Keratine. In Zellkultur wird es sowohl basal, als auch suprabasal exprimiert. Dadurch eignet es sich in besonderem Maße für Reorganisationsuntersuchungen.

Entsprechend der morphologischen Veränderungen ist zu erwarten, daß unter Rottlerin – Behandlung auch zytokeratine Veränderungen nachweisbar sind. Um diesen Effekt der PKC –  $\delta$  zuschreiben zu können, wurden gleichzeitig Versuche mit Calphostin C und Trifluoperazin durchgeführt.

Mittels Immunfluoreszenzuntersuchung kann man das Zytokeratin 7, wie in der Einleitung beschriebenen Lage und Verankerung darstellen (Bild 9 und 10). Die Zellen scheinen dabei jeweils eine Polarisierung zu besitzen, so daß einzelne Fasern einer Gesamttrichtung in die Peripherie folgen. Verankert sind diese Keratine an der Zellwand, sowie an der Kernmembran. Der Zellkern bleibt ausgespart.

Unter Rottlerin – Behandlung ( $5 \cdot 10^{-7}$  M für 24 h), kommt es zu einer aktiven Reorganisation der zytoarchitektonischen Struktur mit kernkonzentrischer, rosettenförmiger Anordnung einzelner Keratinfasern. Die Polarisierung erscheint nun teilweise (Bild 11), bzw. vollständig (Bild 12) aufgehoben.

Aus diesem Ergebnis stellt sich die Frage, ob möglicherweise durch Inhibition der PKC –  $\delta$  Umdifferenzierungsprozesse einsetzen.

Behandelt man humane Keratinozyten mit dem Inhibitor konventioneller und neuer PKC Calphostin C, kommt es auch hier zu einer Reorganisation des Zytokeratinskeletts. Auffallend sind hierbei die zytoplasmatischen Ausläufer der Zellkörper, wobei allerdings weiterhin eine Polarisierung der Zytokeratinfasern

bestehen bleibt, die einer Gesamtverlaufsrichtung in die Peripherie folgen (siehe Bild 13 und Bild 14).

Die Behandlung mit dem Calmodulin – Antagonisten Trifluoperazin führt dagegen nur zu geringen morphologischen Veränderungen der Zytokeratinstruktur. Die Feinstruktur erscheint jedoch nicht mehr so detailliert, einzelne Keratinfasern sind im Vergleich mit den Kontrollzellen nur noch schwierig zu differenzieren (vgl. Bild 15 und Bild 16).

Zusammenfassend ergibt die Behandlung mit jedem Inhibitor ein eigenständiges Erscheinungsbild. Rottlerin- und Calphostin C – behandelte Zellen weisen im Vergleich stärkere Gemeinsamkeiten in Bezug auf Veränderungen der Zytoarchitektur auf als Trifluoperazin – behandelte. Eine scheinbar völlige Umstrukturierung der Zytokeratinfasern ist jedoch nur unter Rottlerinbehandlung zu erreichen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die unter Rottlerin erkennbaren Veränderungen PKC -  $\delta$  vermittelt erscheinen.

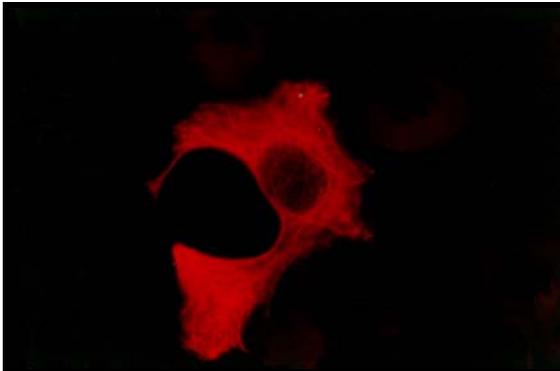
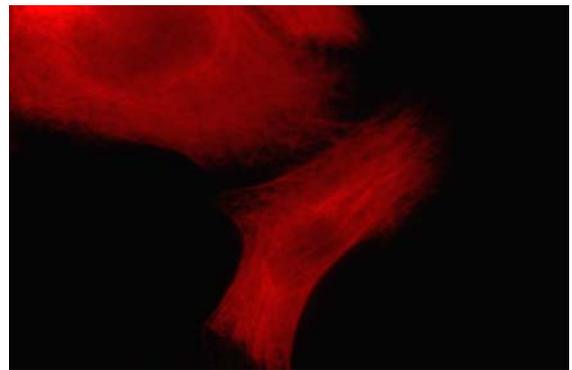


**Bild 9:**

Unbehandelte Kontrollzellen.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.

**Bild 10:**

Unbehandelte Kontrollzellen.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.

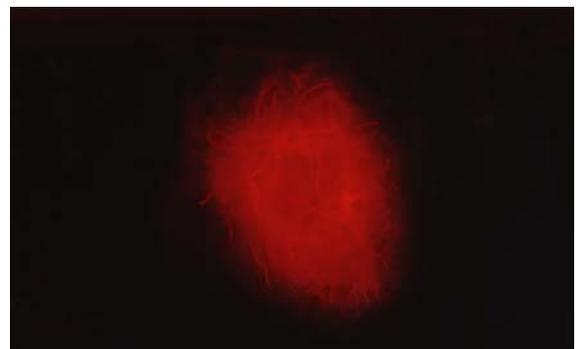


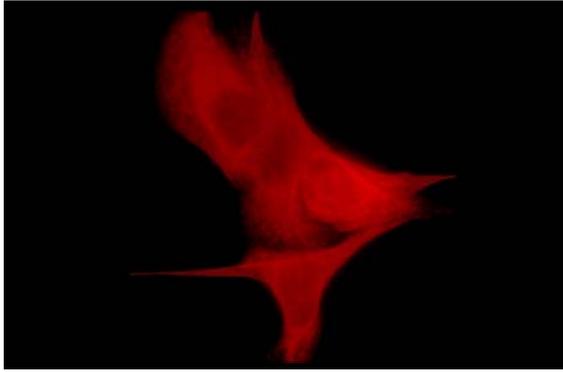
**Bild 11:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.

**Bild 12:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



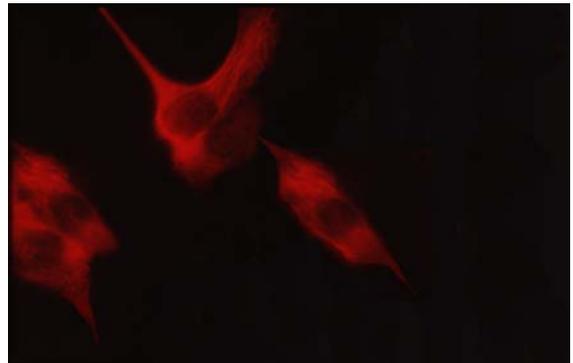


**Bild 13:**

Calphostin C –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.

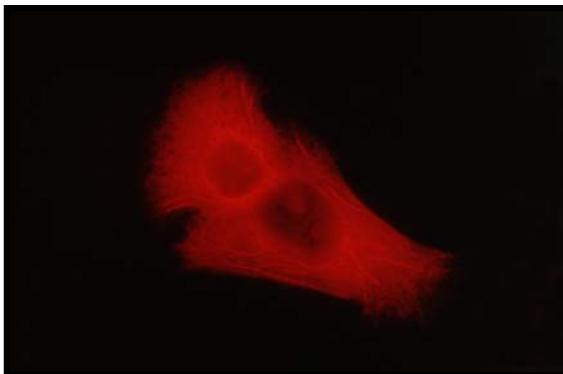
**Bild 14:**

Trifluoperazin –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



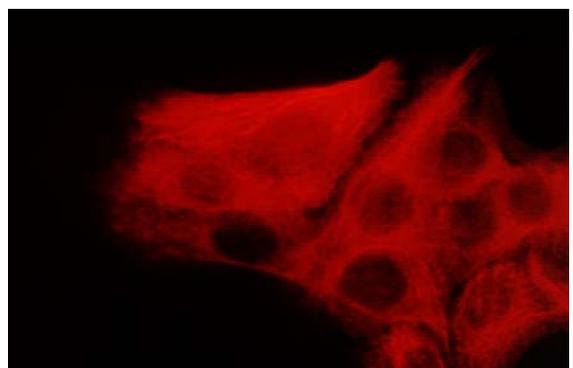
**Bild 15:**

Trifluoperazin –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



**Bild 16:**

Trifluoperazin –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Zytokeratin 7 – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



#### 4.2.4. Untersuchung einer Transdifferenzierung durch Rottlerin

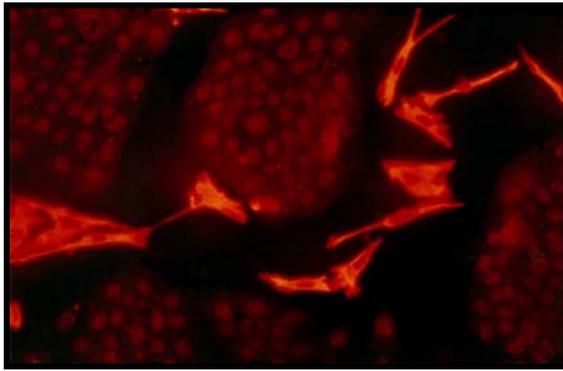
Keratinocyten gehören entwicklungsgeschichtlich zur ektodermalen Gewebegruppe (siehe Einleitung). Dies hat zur Folge, daß entwicklungsspezifische Proteine, wie beispielsweise Zytokeratine, ausschließlich in ektodermalen Zellen exprimiert werden. Da die PKC –  $\delta$  eine wichtige Funktion im Differenzierungsprozeß besitzt, liegt die Überlegung nahe, daß es unter PKC –  $\delta$  – Inhibition zu Transdifferenzierungsprozessen kommen kann. Von dieser Überlegung ausgehend soll überprüft werden, ob unter Rottlerinbehandlung das mesenchymspezifische Protein Vimentin nachweisbar wird. Vimentin kommt besonders stark in endothelialen Zellen und im Fettgewebe vor. Häufig kann man es auch in noch undifferenzierten Zellen vorfinden. Es bildet dabei einen Teil des Zytoskeletts und ist teilweise mit Aktin – Myosin – Komponenten, beziehungsweise desmosomalen Strukturen assoziiert.

Um im Versuchsaufbau eine Positivkontrolle zu besitzen, wurden die Versuche in Cokultur mit FH 109 – Fibroblasten, die als Zellen mesenchymalen Ursprungs Vimentin exprimieren, durchgeführt.

In Bild 15 und 16 erkennt man deutlich die stark positiv gefärbten Vimentin – Fibroblasten in ihrer typisch spindelförmigen Morphologie. Die Keratinocyten weisen dagegen nur eine basale unspezifische Färbung auf.

Auch unter Rottlerinbehandlung (Konzentration:  $5 \cdot 10^{-5}$  M) konnte keine Veränderung im Differenzierungsverhalten festgestellt werden (siehe Bild 17 und 18). Fibroblasten exprimieren weiterhin stark Vimentin, Keratinocyten bleiben dagegen negativ.

Unter Rottlerin – Behandlung kommt es damit zu keiner Neusynthese von Vimentin in Keratinocyten als Marker einer mesenchymalen Umdifferenzierung.

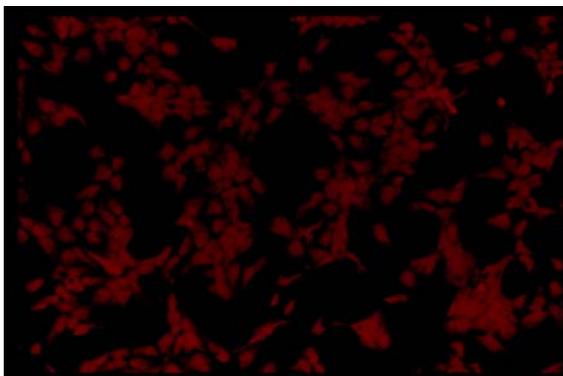
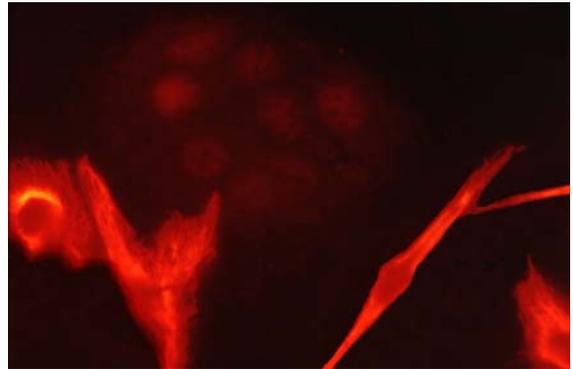


**Bild 17:**

Unbehandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Vimentin – Antikörper.  
Vergrößerung: 80 – fach.

**Bild 18:**

Unbehandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Vimentin – Antikörper.  
Vergrößerung: 240 – fach.



**Bild 19:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Vimentin – Antikörper.  
Vergrößerung: 80 – fach.

**Bild 20:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
Vimentin – Antikörper.  
Vergrößerung: 240 – fach.



#### **4.2.5. Untersuchung über Lokalisationsveränderungen von E – Cadherin und $\beta$ – Catenin unter Rottlerin-, Calphostin C- und Trifluoperazin – Behandlung**

Keratinocyten besitzen als Zellen mit einer mechanischen, biologischen und chemischen Schutzfunktion besonders starke Zell – Zell – Kontakte, vorwiegend in Form von Desmosomen und Zonula adhaerens.

Das in epithelialen Zellen vorkommende E – Cadherin (siehe Einleitung) ist ein wesentliches Strukturelement der Zonula adhaerens, das die Keratinocyten zu einem konfluenten Zellverband verknüpft und damit eine Stabilisierung und Strukturhaltung der Zellmorphologie gewährleistet. Dabei geht es mit einem weiteren E – Cadherin der Nachbarzelle eine homophile Bindung ein. Intrazellulär bindet E – Cadherin an Catenine, welche als Adapter E – Cadherin an Aktinfilamenten des Zytoskeletts verankern.

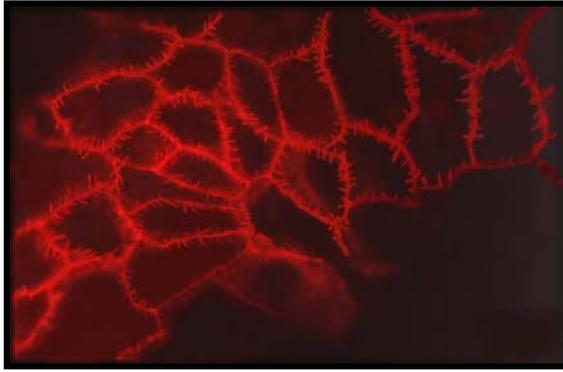
Da es unter Rottlerin zu einer Aufhebung der Kontaktinhibition kommt, interessiert es im besonderen, wie sich adhäsionsvermittelnde Strukturkomponenten, wie E – Cadherin und  $\beta$  – Catenin unter Rottlerin – Behandlung verhalten. Gleichzeitig wurden weitere Untersuchungen mit Calphostin C und Trifluoperazin durchgeführt.

Entsprechend ihrer Funktion kann man E – Cadherin und  $\beta$  – Catenin durch Immunfluoreszenz interzellulär nachweisen (siehe Bild 21 und Bild 25). Insbesondere das  $\beta$  – Catenin bildet eine reißverschlußartige Struktur (Bild 25) und verbindet einzelne Zellen über zahllose Zell – Zell – Verknüpfungen zu einem geschlossenen Zellverband. Unter Rottlerinbehandlung (Konzentration:  $5 \cdot 10^{-7}$  M) ist eine interzelluläre Lokalisation von E – Cadherin und  $\beta$  – Catenin deutlich schwächer nachweisbar (siehe Bild 22 und 26). Dieses Ergebnis stützt die Beobachtung aus den Proliferationstests, in denen durch Rottlerin – Behandlung die Kontaktinhibition aufgehoben werden konnte. Dabei scheinen die Zellen ihre Zell – Zell – Kontakte komplett abubrechen.

Bei einer Behandlung der Keratinozyten mit Trifluoperazin (Konzentration:  $2 \cdot 10^{-5}$  M) liegen E – Cadherin und  $\beta$  - Catenin ähnlich der Kontrollzellen interzellulär (Bild 23 und 27). Die in Bild 25 sichtbaren reißverschlußartigen  $\beta$  – Catenin – Strukturen lösen sich unter dem Einfluß von Trifluoperazin weitgehend auf, bleiben aber weiterhin deutlich interzellulär nachweisbar. Die Zellgrenzen treten dabei scharfkantig hervor ohne jedoch Feinstrukturen erkennen zu können (vgl. Bild 27).

Unter Calphostin – C – Behandlung (Konzentration:  $2 \cdot 10^{-4}$  M) zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie unter Trifluoperazin. E – Cadherin und  $\beta$  – Catenin bleiben auch hier interzellulär nachweisbar. Die Strukturen verzahnen sich nicht mehr so stark gegeneinander. Die verknüpfende Feinstruktur ist nicht mehr augenfällig sichtbar (siehe Bild 24 und 28). Eine Auflösung der Zell – Zell – Kontakte, wie es unter Rottlerin auftritt, ist nicht zu beobachten.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Kontaktinhibitionstests (siehe 4.1.3. – 5.), so bestätigt sich das Ergebnis, daß nur Rottlerin in der Lage ist, die Kontaktinhibition aufzuheben.

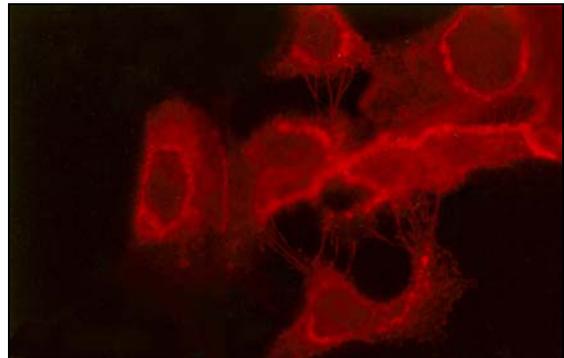


**Bild 21:**

Unbehandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
E – Cadherin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.

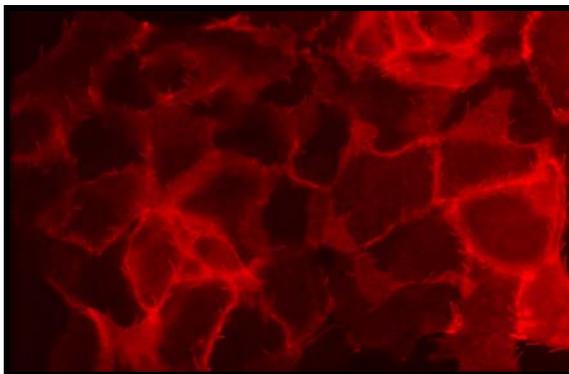
**Bild 22:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
E - Cadherin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



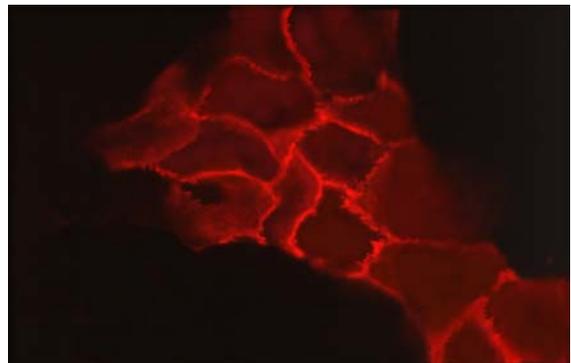
**Bild 23:**

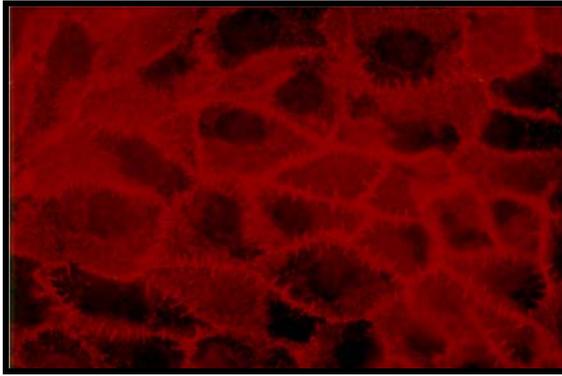
Trifluoperazin –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
E - Cadherin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



**Bild 24:**

Calphostin C –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
E – Cadherin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



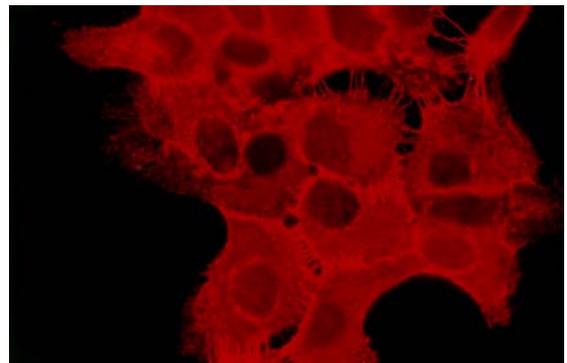


**Bild 25:**

Unbehandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
 $\beta$ - Catenin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.

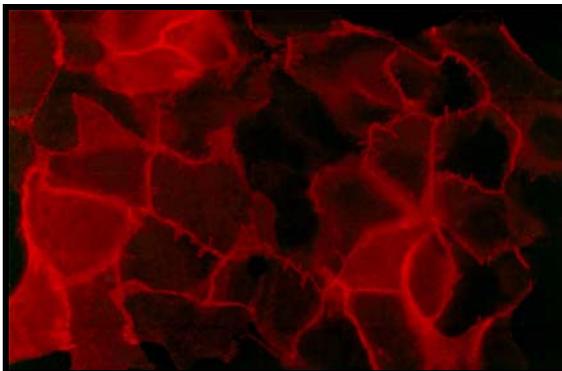
**Bild 26:**

Rottlerin – behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
 $\beta$  – Catenin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



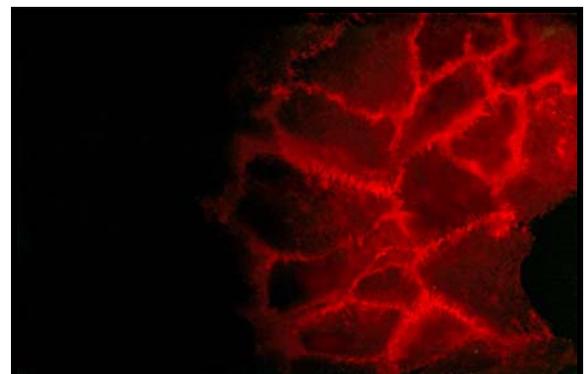
**Bild 27:**

Trifluoperazin –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
 $\beta$ - Catenin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



**Bild 28:**

Calphostin C –  
behandelte Keratinozyten.  
Immunfluoreszenz mit einem  
 $\beta$ - Catenin – Antikörper.  
Vergrößerung: 400 – fach.



#### 4.2.6. Vergleich morphologischer Strukturveränderungen unter Rottlerin- / Trifluoperazin- und Calphostin C- Behandlung durch HE – Färbung

Analog zu den Untersuchungen der Reversibilität, bzw. Toxizität von Rottlerin im Proliferationstest (siehe 4.1.3.3.) wurden HE – Färbungen durchgeführt, um die Reversibilität der morphologischen Veränderungen nachzuweisen.

Dazu wurden in jeweils drei 60 mm Ø Zellkulturschalen  $6 \cdot 10^5$  Zellen ausgesät. Zwei Stunden nach Aussaat wurde Rottlerin in der Konzentration  $5 \cdot 10^{-7}$  M, bzw. Trifluoperazin in der Konzentration  $5 \cdot 10^{-6}$  M und Calphostin C in der Konzentration von  $2 \cdot 10^{-7}$  M dazugegeben.

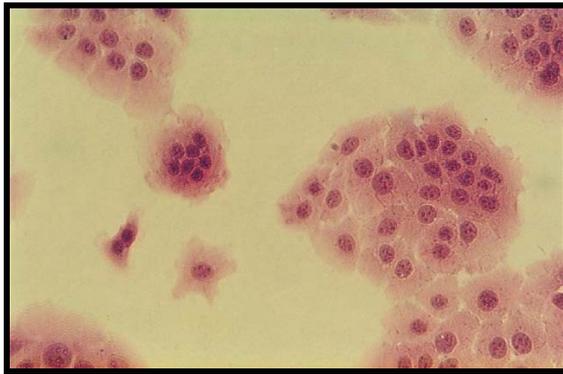
Nach einer Wachstumszeit von 24 h wurde eine HE – Färbung mit jeweils einer Schale durchgeführt. Die restlichen Zellkulturschalen wurden dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen, anschließend wurde neues Medium hinzugegeben. Nach 48 bzw. 72 h fanden jeweils weitere HE – Färbungen statt.

Unter Rottlerin – Behandlung zeigen die Zellen spezifische morphologische Veränderungen. Es kommt zu einer spindelförmigen Ausziehung der Zellkörper, sowie zu einer zytoplasmatischen Reduktion, wodurch die Zellen kleiner erscheinen (siehe Bild 30). Schon nach weiteren 48 h kann man die rottlerin-spezifischen Veränderungen im Zellverband nicht mehr erkennen; isoliert liegende Zellen weisen immer noch leichte Zellkörperausziehungen auf (vgl.: Bild 31). Nach 72 h lassen sich die morphologischen Veränderungen kaum noch nachweisen (Bild 32).

Behandelt man die Zellen mit Trifluoperazin, so lassen sich auch hierbei morphologische Veränderungen nachweisen, die allerdings weniger spindelförmig, sondern stärker abgerundet erscheinen (vgl.: Bild 33). Auch diese Veränderungen sind komplett reversibel und schon nach weiteren 48 h nicht mehr sichtbar (siehe Bild 34).

Mit Calphostin C – behandelte Zellen weisen zytoplasmatische Ausziehungen auf, wobei die Zytoplasmareduktion im Gegensatz zu Rottlerin deutlich geringer ausfällt (Bild 35). Wie schon unter Rottlerin- und Trifluoperazin- Behandlung, bilden sich diese Veränderungen komplett zurück. 48 h nach dem Waschen der Zellen kann man keinen Unterschied mehr im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennen (vgl. Bild 36).

Eine Behandlung mit jeweils einem der drei Inhibitoren ergibt ein eigenständiges morphologisches Zellbild. Eine genauere Zuordnung der morphologischen Veränderungen zur PKC –  $\delta$ , bzw. CAM III – Kinase ist daher nicht möglich.



**Bild 29:**

Unbehandelte Keratinozyten.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.

**Bild 30:**

Keratinozyten nach 24 – stündiger

Rottlerin – Behandlung.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.

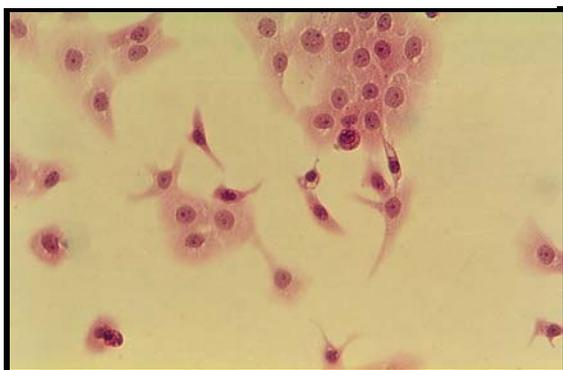


**Bild 31:**

Keratinozyten nach 24 – stündiger  
Rottlerin – Behandlung am dritten Tag.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.

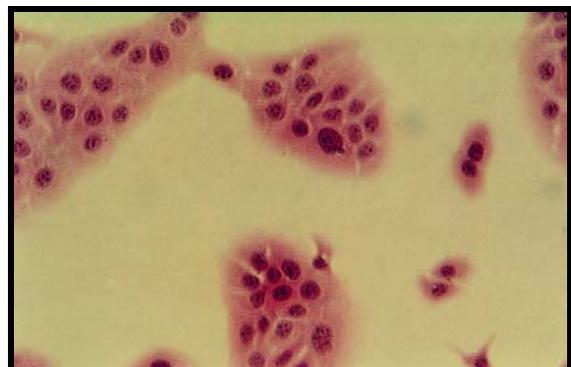


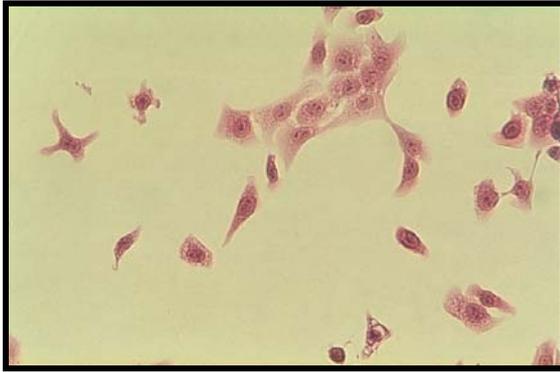
**Bild 32:**

Keratinozyten nach 24 – stündiger  
Rottlerin – Behandlung am vierten Tag.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.





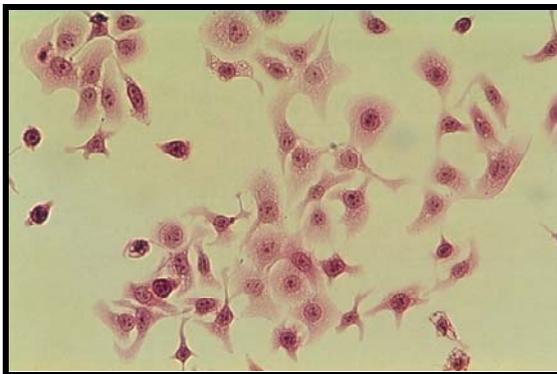
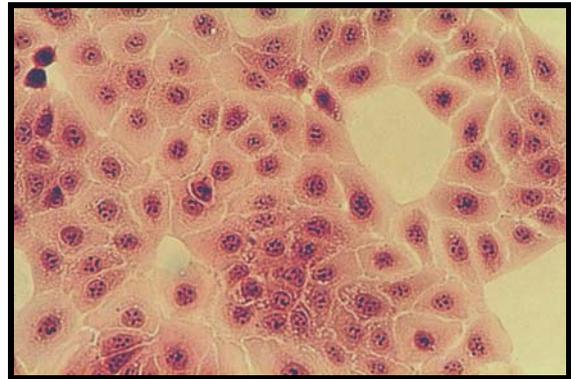
**Bild 33:**

Keratinocyten nach 24 – stündiger  
Trifluoperazin – Behandlung.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 –fach.

**Bild 34:**  
Keratinocyten nach 24 – stündiger  
Trifluoperazin – Behandlung  
am dritten Tag.  
HE – Färbung.  
Vergrößerung: 80 – fach.



**Bild 35:**

Keratinocyten nach 24 – stündiger  
Calphostin C – Behandlung.

HE – Färbung.

Vergrößerung: 80 – fach.

**Bild 36:**  
Keratinocyten nach 24 – stündiger  
Calphostin C – Behandlung  
am dritten Tag.  
HE – Färbung.  
Vergrößerung: 80 – fach.



## 5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionale Bedeutung der Protein Kinase C –  $\delta$  in der Reorganisation humaner Keratinozyten untersucht.

Die besondere Schwierigkeit dieser Arbeit bestand darin die PKC –  $\delta$  selektiv zu inhibieren, ohne weitere Enzyme signifikant zu beeinflussen. Dafür wurden der Phorbolster TPA als indirekter Inhibitor konventioneller und neuer PKC, Calphostin C, ein weiterer Inhibitor klassischer und neuer PKC, Rottlerin als selektiver PKC –  $\delta$  – Inhibitor sowie Trifluoperazin, welches als kompetitiver Calmodulin – Antagonist die Calmodulin – Kinase III (CAM – Kinase III) hemmt, verwendet.

Durch Rottlerin kann die Kontaktinhibition in der HaCaT – Zelllinie aufgehoben werden. Dabei hemmt Rottlerin isoformenspezifisch die PKC –  $\delta$ , aber in ähnlicher Konzentration auch die Calmodulinkinase III (CAM – Kinase III). Dieses Ergebnis kann weder durch TPA, Calphostin C noch durch Trifluoperazin reproduziert werden. Es konnte weiter nachgewiesen werden, daß der fixierte Rasen keinen Einfluß auf die Rottlerinwirkung besitzt.

Betrachtet man die exprimierten PKC – Isoenzyme in Keratinozyten und die Wirkung von TPA auf diese, so muß man feststellen, daß durch TPA gleichzeitig vier PKC – Isoformen ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ) *down – reguliert* werden. Aus der Literatur sind zum Teil antagonistische Effekte dieser Isoformen bekannt, die als Endresultat einen eindeutigen Effekt auf die Kontaktinhibition aufheben. Dadurch ist die Verwertbarkeit begrenzt.

Calphostin C kann ebenfalls die Kontaktinhibition nicht aufheben, was ähnlich wie bei TPA höchstwahrscheinlich in der gleichzeitigen Inhibition mehrerer Isoformen begründet liegt.

Auch Trifluoperazin hatte erwartungsgemäß keine Wirkung auf die Kontaktinhibition, da es als kompetitiver Antagonist der CAM – Kinase III, keine Rolle in der Kontaktinhibition besitzen dürfte.

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß die Kontaktinhibition PKC –  $\delta$  vermittelt ist.

In Immunfluoreszenzstudien konnte die PKC –  $\delta$  primär kernständig, geringer aber auch im Zytoplasma lokalisiert werden, wie es auch Geschwendt, M. *et al.*, 1994 berichteten. In konfluent ausgesäten Zellen verstärkt sich deren Expression ohne eine Translokation feststellen zu können. Auch unter Rottlerin – Behandlung kann man keine Expressionsveränderung, bzw. Translokation feststellen, wie sie z.B. bei PKC –  $\delta$  – Aktivierung zu sehen ist (Szallasi, Z. *et al.*, 1995 und Maloney, J.A. *et al.*, 1998).

Entsprechend der Aufhebung der Kontaktinhibition durch Rottlerin kann man parallel dazu spezifische reversible morphologische Veränderungen unter Immunfluoreszenz und Hämatoxylin – Eosin – Färbung feststellen.

Untersucht man das Zytokeratinskelett mittels Immunfluoreszenz, so kann man einen reorganisatorischen Umbau des Zytoskeletts feststellen, in dem die zytoarchitektonisch Polarisierung innerhalb der Zelle verloren geht. Es kommt zu einer rosettenförmigen Anordnung einzelner Keratinfasern mit spindelförmigen zytoplasmatischen Ausziehungen

Auch unter Calphostin C– und Trifluoperazin – Behandlung kommt es zu reversiblen morphologischen Veränderungen, die jedoch jeweils ein nicht mit Rottlerin vergleichbares eigenständiges Zellbild ergeben. Dies ist vermutlich ähnlich wie bei der Kontaktinhibition damit zu erklären, daß Calphostin C alle neuen PKC gleichzeitig inhibiert und sich damit verschiedene Effekte überlagern. Die Veränderungen unter Trifluoperazin fallen deutlich geringer aus als unter Rottlerin.

Damit scheint der aktive Umbau unter Rottlerin – Behandlung PKC –  $\delta$  – vermittelt, wie es auch Masson, B. *et al.*, 1997 berichteten.

Unter der Voraussetzung, daß Rottlerin die Kontaktinhibition aufhebt, wurden  $\beta$  – Catenin und E – Cadherin, als Strukturelemente der Zell – Zell – Verknüpfung untersucht.

Dabei kommt es unter Rottlerin – Behandlung zeitgleich – entsprechend der Kontaktinhibitionsaufhebung – zur Auflösung der Zell – Zell – Verknüpfungen. Der interzelluläre Nachweis von  $\beta$  – Catenin und E – Cadherin schwächt sich deutlich ab, wobei die typische reißverschlußartige Struktur nicht mehr vorhanden ist. Da

E – Cadherin mit dem Contactinhibin – Rezeptor (CIR) kolokalisiert ist (Doktorarbeit Heit, I., 2000) ist es denkbar, daß Rottlerin über die Kolokalisation von E – Cadherin Einfluß auf den Contactinhibin – Rezeptor und damit auf die Kontaktinhibition nimmt. Unter Calphostin C – Behandlung ist die Auflösung der Reißverschlußstrukturen schwächer und unter Trifluoperazin noch geringer nachzuweisen. Auch dieser Effekt unterliegt der Reversibilität, d.h. nach Beendigung der Rottlerin-, Calphostin C- und Trifluoperazinwirkung kommt es zur Wiederherstellung des Zell – Zell – Gitternetzwerkes.

Aus diesem Ergebnis ist anzunehmen, das  $\beta$  – Catenin und E – Cadherin der regulativen Kontrolle der PKC  $\delta$  unterliegt und damit eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion zu spielen scheint. Dieses Ergebnis stützt auch die Untersuchungen von Lewis, J. E. *et al.*, 1994, die eine gegenseitige Beeinflussung zwischen PKC und E – Cadherin beschrieben haben. Weiterhin beschreiben van Hengel, J. *et al.*, 1997 eine Wiederherstellung der E – Cadherin – abhängigen interzellulären Zelladhäsion durch PKC – Aktivierung in einer Colon – Carciom – Zelllinie.

Das Wissen über PKC Substrate ist äußerst begrenzt. Spezifische Substrate einzelner PKC – Isoformen sind kaum bekannt. Ein spezifisches Substrat der PKC –  $\delta$  ist das myristoylated alanin – rich C kinase substrate (MARCKS), welches zytoplasmatisch und nukleär nachgewiesen werden kann (Kim, S.S. *et al.*, 2000). Unter kurzzeitiger PKC – Aktivierung durch TPA kommt es zu einer unorganisierten Vermehrung von Aktinmikrofilamenten und interzellulärer Zell – Zell – Verknüpfungen (Mullin, J.M. *et al.*, 1998).

Es ist daher anzunehmen, daß ein wichtiges PKC –  $\delta$  – Substrat in Zell – Zell – Verknüpfungen zu suchen ist. Auch wird vermutlich durch die PKC –  $\delta$  die Zelladhäsion entscheidend beeinflusst, die dadurch sekundär wiederum Wirkung auf die Zellmorphologie besitzt.

Hinweise auf eine Transdifferenzierung mit einer Vimentinexpression als Differenzierungsmarker eines mesenchymales Gewebes wie es Boukamp, P. und Fusenig, N., 1993 beschrieben haben, liegen nicht vor.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß in humanen Keratinozyten die konventionelle PKC –  $\alpha$ , –  $\beta$  I, –  $\beta$  II, die neuen PKC –  $\delta$ , –  $\epsilon$ , –  $\eta$  und –  $\mu$ , sowie die atypische PKC –  $\xi$  exprimiert werden.

Ferner konnte gezeigt werden, daß TPA – Behandlung humaner Keratinozyten keinen Einfluß auf die Kontaktinhibition besitzt.

Rottlerin hingegen kann die Kontaktinhibition aufheben. Durch verzögerte Aussaat konnte nachgewiesen werden, daß der fixierte Rasen die Rottlerinwirkung nicht beeinflußt.

Rottlerin besitzt daneben einen wachstumsinhibitorischen Effekt, der aber reversibel ist und damit nicht auf toxischen Eigeneffekten beruht.

Unter Calphostin C–, sowie Trifluoperazin – Behandlung konnte kein Einfluß auf die Kontaktinhibition festgestellt werden.

Analog zur Aufhebung der Kontaktinhibition konnte entsprechend der morphologischen Veränderungen ein zytoarchitektonisches Korrelat durch Immunfluoreszenz– und Hämatoxin – Eosin – Färbungen aufgezeigt werden.

Die PKC –  $\delta$  ist primär kernständig lokalisiert, aber auch im Zytoplasma nachweisbar. In konfluenten Zellen wird sie stärker exprimiert. Es findet aber keine Translokation durch zunehmende Zelldichte statt.

Rottlerin hat weder Einfluß auf die Expression, noch bewirkt es eine Translokation der PKC –  $\delta$ .

Morphologisch kommt es unter Rottlerin – Behandlung zu einer Reorganisation der zytoarchitektonischen Struktur mit rosettenförmiger Anordnung einzelner Keratinfasern. Die Polarisierung ist dabei aufgehoben. Zell – Zell – Kontakte brechen ab und adhäsionsvermittelnde Glykoproteine, wie E – Cadherin und  $\beta$  – Catenin können nur noch schwach interzellulär nachgewiesen werden.

Eine Vimentinexpression als Marker einer mesenchymalen Umdifferenzierung unter Rottlerin – Behandlung konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Rottlerin-, Calphostin C-, Trifluoperazin- Studien deutet auf eine entscheidende Rolle der PKC –  $\delta$  in der Kontaktinhibition und zytoarchitektonischen Reorganisation hin.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Adams, J.C., Watt, F.M. (1990)**

Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha5 – beta1 integrin loss from the cell surface.

Cell **63**: 425 – 435

**Amar, L.S., Shabana al – HM, Oboeuf, M., Martin, N., Forest, N. (1998)**

Desmosomes are regulated by protein kinase C in primary rat epithelial cells.

Cell adhesion Commun **5**: 1- 12

**Arany, I., Adler – Storthz, K., Chen, Z., Tying, S.K., Brysk, H., Brysk, M.M. (1997)**

Differentiation markers in oral carcinoma cell lines and tumors.

Anticancer Res **17**: 4607 –4610

**Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K. (1992)**

Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation.

TIBS **17**: 414 – 417

**Assert, R., Kotter, R., Bisping, G., Scheppach, W., Stahlnecker, E., Müller, K. M., Dusel, G., Schatz, H., Pfeiffer, A. (1999)**

Anti – proliferative activity of protein kinase C in apical compartments of human colonic crypts: evidence for a less activated protein kinase C in small adenomas.

Int J Cancer **80**: 47 – 53

**Ast, S. (1998)**

Zusammenhang zwischen Kontaktinhibierung und Differenzierung in humanen Kertinozyten.

Doktorarbeit, Institut für Toxikologie, Johannes Gutenberg – Universität, Mainz

**Baciu, P. C., Goetinick, P.F. (1995)**

Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan – 4 into focal contacts.

Mol Biol Cell **6**: 1503 – 13

**Banks – Schlegel, S., Green, H. (1981)**

Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia.

J Cell Biol **90**: 732 – 737

**Beisiegel, U. (1986):**

Protein blotting

Electrophoresis **7**: 235 – 241

**Behrends, U., Peter, R.U., Hintermeier – Knabe, R., Eissner, G., Holler, E., Bornkamm, G.W. Caughman, S.W., Degitz, K. (1994)**

Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule – 1 in vitro.

J Invest Dermatol **103**: 726 – 730

**Blum, S., Ness, W., Petrow, W., Achenbach, F. (1994)**

Localization of protein kinase C in primary cultures of human keratinocytes in relation to cell contact proteins.

Cell Signal **6**: 157 - 65

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

Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid Human Keratinocyte Cell Line

The Journal of Cell Biology **106**: 761 – 771

**Boukamp, P., Fusenig, N.E. (1993)**

Trans – differentiation from epidermal to mesenchymal / myogenic phenotype is associated with a drastic change in cell – cell and cell – matrix adhesion molecules.

J Cell Biol **120**: 981 –993

**Breitkreutz, D., Boukamp, P., Ryle, C.M., Stark, H.-J., Roop, D.R., Fusenig, N.E. (1991 )**

Epidermal morphogenesis and keratin expression in c – Ha – ras – transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line.

Cancer Resarch **51**: 4402 – 4409

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

Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants.

Eur J Cell Biol **75**: 273 –286

**Cooper, T. G.; Neumeier, R.; Maurer, H. R. (1981):**

Biochemische Arbeitsmethoden

Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York, S.: 61 – 95

**Cowell, H.E., Garrod, D.R. (1999)**

Activation of protein kinase C modulates cell – cell and cell – substratum adhesion of a human colorectal carcinoma cell line and restores ‘normal’ epithelial morphology.

Int J Cancer **80**: 455 – 464

**Darnell, J.; Lodish, H.; Daltimore, D. (1994):**

Teil 1: Moleküle, Zellen, Proteine und experimentelle Methoden: Eine Einführung. Wie man Zellen und Viren kultiviert und manipuliert

Molekulare Zellbiologie, Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York , S. 196 – 197

**Dlugosz, A.A., Yuspa, S.H. (1994)**

Protein kinase C regulates keratinocyte trasglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium.

J Invest Dermatol **102**: 409 – 414

**Fahreus, R., Lane, D.P. (1999)**

The p16(INK4a) tumour suppressor protein inhibits alph5 – beta3 integrin – mediated cell spreading on vitronectin by blocking PKC – dependent localization of alpa5 – beta3 to focal contacts.

EMBO J **18**: 2106 – 2118

**Fusenig, N.E., Boukamp, P. (1998)**

Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes.

Mol Cancinog **23**: 144 – 158

**Gherzi, R., Sparatore, B., Patrone, M., Sciutto, A., Briata, P. (1992)**

Protein kinase C mRNA levels and activity in reconstituted normal human epidermis: relationships to cell differentiation.

Biochem Biophys Res Com **184**: 283 – 291

**Gradl, G., Faust, D., Oesch, F., Wieser, R.J. (1995)**

Density – dependent regulation of cell growth by contactinhibin and the contacinhibition receptor.

Curr Biol **5**: 526 – 535

**Gschwendt, M., Müller, H. – J., Kielbass, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. Marks, F. (1994)**

Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor.

Biochem Biophys Res Com **199**: 93 – 98

**Gschwendt, M. Kittstein, W., Marks, F. (1994)**

Elongation factor – 2 kinase: effektive inhibitor by the novel protein kinase inhibitor rottlerin and relative intensity towards staurosporine

FEBS letters **338**: 85 – 88

**Hahn, H. (1994):**

Mykoplasmen und Ureaplasmen

Medizinische Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 485 – 490

**Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., Saito, T. (1999)**

PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu.

Biochem Biophys Acta **1450**: 99 – 104

**Heit, I. (2000)**

Generierung und Transduction wachstumsnegativer Signale durch den Contactinhibinrezeptor.

Doktorarbeit, Institut für Toxikologie, Johannes Gutenberg – Universität, Mainz

**Hsu, S.L., Chou, Y.H., Yin, S.C., Liu, J.Y. (1998)**

Differential effects of phorbol ester on growth and protein kinase C isoenzyme regulation in human hepatoma Hep3B cells.

Biochem J **333**: 57 – 64

**Hyatt SL, Klauck T, Jaken S (1990):**

Protein kinase C is localized in focal contacts of normal but not transformed fibroblasts.

Mol Carcinog **3**: 45 - 53

**Jung, E.M., Betancourt – Calle, S., Mann – Blakeney, R., Griner, R.D., Bollinger – Bollag, W. (1999)**

Sustained phospholipase D activation is associated with keratinocyte differentiation.  
Carcinogenesis **20**: 569 – 576

**Junquiera, L., C., Carneiro, L. (1991):**

Gewebevorbehandlung: Färbung

Histologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 17 – 21

**Kartasova, T., Roop, D.R., Holbrook, K.A., Yuspa, S.H. (1993)**

Mouse differentiation – specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network.

J Cell Biol **120**: 1251 – 1261

**Keenan, C., Goode, N., Pears, C. (1997)**

Isoform specificity of activators and inhibitors of protein kinase C  $\gamma$  and  $\delta$ .

FEBS **415**: 101 – 108

**Kim, S.S., Kim, J.H., Kim, H.S., Park D.E., Chung, C.H. (2000)**

Involvement of the theta – type protein kinase C in translocation of myristoylated alanine rich C kinase substrate (MARCKS) during myogenesis of chick embryonic myoblasts.

Biochem J **347**: 139 – 146

**Laemmli, U. K. (1970):**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**: 680 – 685

**Langmann, J. (1989)**

Entwicklung der dreiblättrigen Keimscheibe

Medizinische Embryologie, Thieme – Verlag, Stuttgart, New York, S. 52 – 77

**Lewis, J.E., Jensen, P.J., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. (1994)**

E – Cadherin mediates adherens junction organization through protein kinase C

J Cell Sci **107**: 3615 -21

**Löffler, G., Petrides, P., E. (1997)**

Immunsystem

Biochemie und Pathobiochemie, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,

S.1057 – 1089

**Maloney, J.A., Tsygankova, O., Szot, A., Yang, L., Li, Q., Williamson, J.R. (1998)**

Differential translocation of protein kinase C isoenzymes by phorbol ester, EGF, and ANG II in rat liver cells.

Am J Physiol **274**: 974 – 982

**Masson – Gadais, B., Salers, P., Bongrand, P., Lissitzky, J.-C. (1997)**

PKC regulation of microfilament network organization in keratinocytes defined by a pharmacological study with PKC activators and inhibitors.

Exp Cell Res **236**: 238 - 47

**Mullin, J.M., Kampherstein, J.A., Laughlin, K.V., Clarkin, C.E., Miller, R.D., Szallasi, Z., Kachar, B., Soler, A.P., Rosson, D. (1998)**

Overexpression of protein kinase C – delta increases tight junction permeability in LLC – PK1 epithelia.

Am J Physiol 1998 **275**: 544- 554

**Newton, A. C. (1995)**

Protein Kinase C: structure, function, and regulation.

J Biol Chem **270**: 28495 – 28498

**Nishizuka, Y. (1988)**

The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.

Nature **334**: 661 - 665

**Oesch, F., Schäfer, A., Wieser, R.J. (1988)**

12 – O – tetradecanoylphorbol – 13 – acetate releases human diploid fibroblasts from contact – dependent inhibition of growth

Carcinogenesis **9**: 1919 –1921

**Ogawa, H., Goldsmith, L.A (1976)**

Human epidermal transglutaminase: preparation and properties.

J Biol Chem **251**: 7281 – 7288

**Parmer, T.G., Ward , M.D., Hait W.N. (1997)**

Effects of Rottlerin, an inhibitor of calmodulin – dependent protein kinase III, on cellular proliferation, viability, and cell cycle distribution in malignant glioma cells.

Cell Growth Differ **8**: 327 – 334

**Regnier, M., Vainnot, P., Darmon, M., Prunieras, M. (1986)**

Onset of epidermal differentiation in rapidly proliferating basal keratinocytes.

J Invest Dermatol **87**: 472 – 476

**Reyland, M.E., Anderson, S.E., Matassa A.A., Barzen, K.A., Quissel, D.O. (1999)**

Protein kinase C delta is essential for etoposide – induced apoptosis in salivary gland acinar cells.

J Biol Chem **274**: 19115 –19123

**Rice, R.H., Green, H. (1977)**

The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross – linked protein.

Cell **18**: 417 – 422

**Rice, R.H., Green, H. (1979)**

Presence in human epidermal cells of soluble protein precursor of the cross – linked envelope: activation of the cross – linking by calcium ions.

Cell **40**: 681 – 694

**Rodriguez – Pena, A., Rozengurt, E. (1984)**

Disappearance of  $\text{Ca}^{2+}$  – sensitive, phospholipid – dependent protein kinase activity in phorbol ester – treated 3T3 cells.

Biochem Biophys Res Comm **120**: 1053 –1059

**Rotem, R., Paz, G.F., Homonnai, Z. T., Kalina, M., Naor, Z. (1990)**

Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility.

Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 7305 – 7308

**Ryle, C., Breitkreuz, D., Stark, H.- J., Leigh, I.M., Steinert, P.M., Roop,D., Fusenig, N.E. (1989)**

Density – depend modulation of synthesis of keratin 1 and 10 in human keratinocyte line HaCat.

Differentiation **40**: 42 – 54

**Stabel, S. (1994)**

Proteinkinase C – An enzyme and its relatives.

Semin Cancer Biol. **5**: 277 – 284

**Smith, P. K., Krohn, R. J., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985)**

Measurement of protein using bicinchoninic acid.

Anal. Biochem. **150**: 76 – 85

**Szallasi, Z., Kosa, K., Smith, C.B., Dlugosz, A.A., Williams, E.K., Yuspa, S.H., Blumberg, P.M. (1995)**

Differential regulation by anti – tumor – promoting 12 – desoxyphorbol – 13 – phenylacetate reveals distinct roles of the classical and novel protein kinase C isoenzymes in biological response of primary mouse keratinocytes.

Mol Pharmacol **47**: 258 – 265

**Takei, T., Han, O., Ikeda, M., Male, P., Mills, I., Sumpio, B.E. (1997)**

Cyclic strain stimulates isoform – specific PKC activation and translocation in cultured human keratinocytes.

J Cell Biochem **67**: 327 –337

**Tamaoki, T., Nakoma, H. (1990)**

Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin.

Biotechnology **8**: 732 – 735

**Van Hengel, J., Gohon, L., Bruyneel, E., Vermeulen, S., Cornelissen, M., Marceel, M., von Roy, F.( 1997)**

Protein kinase C activation up regulates intercellular adhesion of alpha – catenin – negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes.

J Cell Biol **137**: 1103 –16

**Villalba, M. (1998)**

A possible role for PKC delta in cerebellar granule cells apoptosis.

Neuroreport **9**: 2381 – 2385

**Watt F.,M., Kubler MD, Hotchin NA, Nicholson LJ, Adams J., C. (1993)**

Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin – extracellular matrix interactions.

J Cell Sci **106**: 175 - 82

**Wieser, R.J., Oesch, F. (1995)**

Molekulare Grundlagen der Wachstumsregulation durch Zellkontakte

Medwelt **46**: 272 – 279

**Wieser, R.J., Schutz, S., G., Thomas, H., Dienes, H. P., Oesch, F. (1990)**

Isolation and characterisation of a 60 – 70 kD plasma membrane glycoprotein involved in the contact – dependent inhibition of growth.

**Wieser, R.J., Oesch, F. (1985)**

Contact inhibition of growth of human diploid fibroblasts by immobilized plasma membrane glycoproteins.

J Cell Biol **103**: 361 – 367

**Winiski, A.P., Foster, C.A. (1992)**

ICAM – 1 expression in a spontaneously transformed human keratinocyte cell line: characterization by a simple cell – ELISA assay.

J Invest Dermatol **99**: 48 – 52

**Yuspa, S.H. (1998)**

The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis.

J Dermatol Sci **17**: 1 – 7

**Zhu, A.J., Watt, F.M. (1999)**

$\beta$  – Catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion.

Development **126**: 2285 – 2298

## **DANKSAGUNG**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. F. O. für die freundliche Aufnahme in das Institut für Toxikologie und der Möglichkeit, meine Doktorarbeit dort anfertigen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau I. H., die mich in die notwendigen Arbeitstechniken eingewiesen und mich während der gesamten Zeit in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen hervorragend unterstützt hat.

Danken möchte ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. R. W., der mich in seiner Arbeitsgruppe herzlich aufgenommen hat und Frau Dr. C. D., die mich nach seinem Ausscheiden fördernd weiterbetreute.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe D., darunter Frau Dr. D. F.t, Ch. F., S. B. und J. H..

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, sowie den Lektoren Ch. G., F. L., H. H. und H. H..

Zuletzt danke ich noch meiner Freundin D. H. für die hilfreiche Unterstützung.

## LEBENS LAUF

### 1. Persönliche Daten

**Name:** Nicolas Maximilian Gumpert  
**Wohnort:** Mainz; Kaiserstraße 36  
**Geburtstag:** 18. Juni 1974  
**Geburtsort:** Hamm  
**Eltern:** Dagmar Gumpert, geborene Collein, Hausfrau  
Peter Gumpert, Diplom-Kaufmann  
**Familienstand:** ledig

### 2. Schulausbildung

**1981 – 1985:** Grundschule Taunusstein – Wehen  
**1985 – 1994:** Integrierte Gesamtschule „Obere Aar“ in Taunusstein –  
Hahn  
**Juni 1994:** Abitur in den Fächern Mathematik und Biologie,  
Deutsch und Religion

### 3. Ersatzdienst

**Juli 1994 – Oktober 1995:**  
Arbeiter Samariter Bund, Taunusstein – Wehen:  
Mobiler Sozialer Hilfsdienst

### 4. Hochschulausbildung

**Wintersemester 95/96:**  
Beginn des Medizinstudiums an der Johannes Gutenberg  
– Universität in Mainz.  
**Sommersemester 97:**  
Ärztliche Vorprüfung

**Sommersemester 98:**

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Erstes Staatsexamen)

**Wintersemester 00/01:**

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Zweites Staatsexamen)

**Wintersemester 01/02:**

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Drittes Staatsexamen)

**5. Promotion**

**Mai 1998**

Beginn der Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin am Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg – Universität in Mainz:

Thema: Funktionale Bedeutung der Protein Kinase C –  $\delta$  (PKC –  $\delta$ ) in der Reorganisation der zytoskelettären Architektur humaner Keratinozyten.

**Mai 2001**

Offenlage der Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

**Mai 2002**

Beendigung des Promotionsverfahrens der Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin