

Aus dem Institut für Physiologie der Charité-
Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

Eingereicht über das Institut für Biochemie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Receptor Interacting Proteins:
**Die Rolle der NF- κ B-Aktivatoren
bei der Wundheilung der Haut
und der epidermalen
Differenzierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stephanie Caroline Johanna Adams

Tierärztin
aus Hattingen

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3212

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. rer. nat. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Munz
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Skin, Keratinocytes, Healing, Wounds, Cell differentiation, Receptor-Interacting Protein Serine- Threonine Kinases (MeSH), NF-kappa B (MeSH)

Tag der Promotion: 10.07.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-513-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Aufbau und Wundheilung der Haut | 1 |
| 1.1.1 | <i>Aufbau und Funktion der Haut</i> | <i>1</i> |
| 1.1.2 | <i>Die kutane Wundheilung</i> | <i>4</i> |
| 1.2 | Die Familie der Receptor Interacting Proteins (RIPs) | 9 |
| 1.2.1 | <i>Strukturelle Merkmale der RIPs</i> | <i>10</i> |
| 1.2.2 | <i>Der Transkriptionsfaktor NF-κB als Target der RIP-Proteine</i> | <i>13</i> |
| 1.2.3 | <i>Funktionelle Bedeutung der einzelnen RIP-Proteine für den Gesamtorganismus</i> | <i>15</i> |
| 1.3 | Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit..... | 17 |
| 2 | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Material | 19 |
| 2.1.1 | <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i> | <i>19</i> |
| 2.1.2 | <i>Enzyme.....</i> | <i>22</i> |
| 2.1.4 | <i>Wachstumsfaktoren und Zytokine</i> | <i>23</i> |
| 2.1.5 | <i>Oligodesoxynukleotide</i> | <i>23</i> |
| 2.1.6 | <i>Oligonukleotide (siRNAs)</i> | <i>24</i> |
| 2.1.7 | <i>Plasmide.....</i> | <i>24</i> |
| 2.1.8 | <i>„Kits“</i> | <i>25</i> |
| 2.1.9 | <i>Bakterienstämme.....</i> | <i>25</i> |
| 2.1.10 | <i>Eukaryontische Zelllinien.....</i> | <i>25</i> |
| 2.1.11 | <i>Standardpuffer und Lösungen.....</i> | <i>25</i> |
| 2.2 | Methoden..... | 26 |
| 2.2.1 | <i>Zellbiologische Methoden.....</i> | <i>26</i> |
| 2.2.2 | <i>Mikrobiologische Methoden.....</i> | <i>28</i> |
| 2.2.3 | <i>Molekularbiologische Methoden.....</i> | <i>29</i> |
| 2.2.4 | <i>RNA-Techniken</i> | <i>33</i> |
| 2.2.5 | <i>Proteinchemische Methoden.....</i> | <i>37</i> |
| 2.2.6 | <i>Immunologische Methoden</i> | <i>39</i> |
| 2.2.7 | <i>Tierexperimentelle Arbeiten</i> | <i>42</i> |
| 2.2.8 | <i>Histologische Methoden</i> | <i>42</i> |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3 | Ergebnisse | 44 |
| 3.1 | Temporale und spatiale Expression der <i>rip</i>-Gene bei der Wundheilung der Haut | 44 |
| 3.1.1 | <i>Expressionskinetik der <i>rip</i>-Gene nach Hautverwundung</i> | 44 |
| 3.1.2 | <i>Expressionskinetik des <i>traf6</i>-Gens nach Hautverwundung</i> | 49 |
| 3.1.3 | <i>Immunhistochemische Untersuchung der <i>rip3</i>-Genexpression in der frühen Wundheilungsphase.....</i> | 50 |
| 3.1.4 | <i>Immunhistochemische Untersuchung der <i>rip4</i>-Genexpression in unverwundeter muriner Schwanzhaut.....</i> | 51 |
| 3.1.5 | <i>Immunhistochemische Untersuchung der <i>rip4</i>-Genexpression im Wundheilungsverlauf.....</i> | 53 |
| 3.2 | Expressionskinetik der <i>rip</i>-Gene in kultivierten Keratinozyten | 54 |
| 3.2.1 | <i>Die Expression der <i>rip</i>-Gene nach Verwundung in vitro</i> | 55 |
| 3.2.2 | <i>Die Expression der <i>rip</i>-Gene im Kultivierungsverlauf von Keratinozyten.....</i> | 60 |
| 3.2.3 | <i>Zwischenzusammenfassung I</i> | 62 |
| 3.3 | Analyse der Faktoren und Signaltransduktionswege, die an der Regulation der <i>rip4</i>-Genexpression in kultivierten Keratinozyten beteiligt sind | 63 |
| 3.3.1 | <i>Faktoren die zur Regulation der <i>rip4</i>-Genexpression führen</i> | 63 |
| 3.3.2 | <i>Signaltransduktionswege, die an der Regulation der <i>rip4</i>-Genexpression beteiligt sind.....</i> | 72 |
| 3.3.3 | <i>Zwischenzusammenfassung II</i> | 77 |
| 3.4 | Hemmung der <i>rip4</i>-Genexpression mittels spezifischer siRNA: Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten kultivierter Keratinozyten | 78 |
| 3.4.1 | <i>Etablierung und Optimierung der Transfektionsbedingungen.....</i> | 79 |
| 3.4.2 | <i>Einfluss der <i>rip4</i>-Genexpression auf die Proliferationsrate und die Expression proliferationsassoziierter Gene in kultivierten Keratinozyten</i> | 80 |
| 3.4.3 | <i>Einfluss von RIP4 auf die Expression differenzierungsassoziierter Gene in kultivierten Keratinozyten</i> | 82 |
| 3.4.4 | <i>Zwischenzusammenfassung III</i> | 86 |
| 3.5 | Die RIPs und deren funktionelle Bedeutung als Aktivatoren des Transkriptionsfaktors NF-κB in der Haut und bei der Wundheilung ... | 87 |
| 3.5.1 | <i>In kultivierten Keratinozyten bewirkt RIP4 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB.....</i> | 87 |
| 3.5.2 | <i>Aktivierung von NF-κB im Heilungsverlauf muriner Exzisionswunden.....</i> | 88 |
| 3.5.3 | <i>Die Expression eines NF-κB-Superrepressors in vivo führt zu einer aberranten Expression und Regulation der <i>rip</i>-Gene.....</i> | 90 |
| 3.5.4 | <i>Zwischenzusammenfassung IV.....</i> | 94 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4 | Diskussion | 95 |
| 4.1 | Die differentielle Regulation der <i>rip</i>-Gene bei der Wundheilung | 95 |
| 4.1.1 | <i>Das Expressionsmuster der rip-Gene bei der kutanen Wundheilung: Hinweise auf funktionelle Unterschiede der einzelnen RIP-Proteine im Hautgewebe?</i> | <i>95</i> |
| 4.1.2 | <i>Die Regulation der Expression der rip-Gene im Kultivierungsverlauf von Keratinozyten in vitro</i> | <i>97</i> |
| 4.1.3 | <i>Das rip2-Gen – ein Regulator der Keratinozytenproliferation?</i> | <i>98</i> |
| 4.1.4 | <i>Das rip4-Gen – ein Regulator der Keratinozytendifferenzierung?</i> | <i>99</i> |
| 4.2 | Funktionelle Charakterisierung des <i>rip4</i>-Gens in kultivierten Keratinozyten..... | 99 |
| 4.2.1 | <i>Die Regulation der rip4-Genexpression: ein multifaktoriell kontrollierter Prozess?.....</i> | <i>100</i> |
| 4.2.2 | <i>Glukokortikoide und Wundheilungsstörungen: Ein Zusammenhang mit der Expression des rip4-Gens ?.....</i> | <i>107</i> |
| 4.2.3 | <i>Welche intrazellulären Signaltransduktionswege vermitteln die Regulation der rip4-Genexpression?.....</i> | <i>109</i> |
| 4.2.4 | <i>Das RIP4-Protein – eine Schaltstelle für den Eintritt der Keratinozyten in die terminale Differenzierung?.....</i> | <i>113</i> |
| 4.3 | Der Transkriptionsfaktor NF-κB als Effektor der RIP-Proteine | 116 |
| 4.3.1 | <i>NF-κB bei der Wundheilung: ein essentieller Faktor?.....</i> | <i>116</i> |
| 4.3.2 | <i>Die RIP-Proteine und deren Effektor NF-κB: eine bidirektionale Regulation?</i> | <i>119</i> |
| 5 | Zusammenfassung | 121 |
| 6 | Summary | 123 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 125 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 133 |
| 9 | Publikationen | 135 |
| 10 | Danksagung..... | 136 |
| 11 | Eidesstattliche Erklärung..... | 137 |

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Wundheilung der Haut

1.1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut (*Cutis*) stellt mit einem Gesamtanteil von 15% des Körpergewichtes eines der größten Organe des Organismus dar und nimmt als dessen äußere Umhüllung eine zentrale Rolle ein, die vielfältige Funktionen beinhaltet. Als Barriere zur Außenwelt schützt sie in intakter Form vor mechanischen Schäden und dem Eindringen von Mikroorganismen, übernimmt jedoch über die eingebetteten Blutgefäße auch eine wichtige Funktion hinsichtlich der Thermoregulation und Homöostase des Elektrolythaushaltes. Des Weiteren werden hier sowohl körpereigene Schadstoffe über eingelagerte Drüsen ausgeschieden als auch essentielle Substanzen synthetisiert bzw. modifiziert. Als umfassendes Sinnesorgan und Signalgeber von Emotionen stellt sie letztendlich auch ein wichtiges Kommunikationsorgan dar.

Histologisch lässt sich die Haut in zwei Schichten einteilen, die aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel bestehende Epidermis (Oberhaut), und die aus Bindegewebe bestehende *Dermis* (Lederhaut, *Corium*). Beide Schichten bilden eine durch Fortsätze und Vorsprünge (Dermispapillen) verbundene feste Einheit, getrennt durch eine zwischengelagerte Basalmembran. Ihnen untergelagert ist die aus lockerem Bindegewebe bestehende *Subcutis* (Unterhaut) ^[39].

Die Zellen der *Epidermis* ein hochgradig regeneratives Epithel ektodermalen Ursprungs, wobei eine kontinuierliche Erneuerung des gesamten Gewebes essentiell für die Funktionalität der Haut ist. Dabei durchlaufen die zunächst zuunterst gelegenen Keratinozyten ein präzise strukturiertes Differenzierungsprogramm im Zuge dessen sie unter programmiertem Verlust ihrer Zellorganellen an die Oberfläche gelangen und als verhornte Zellen schließlich abgestoßen werden. Entsprechend diesem Differenzierungsprogramm lässt sich die *Epidermis* histologisch und zellbiologisch in sechs Schichten unterteilen, die sich sowohl morphologisch als auch anhand ihres spezifischen Expressionsmusters verschiedener Keratine unterscheiden ^[35, 37, 137]. Als Keratine wird eine Familie heterogener Proteine bezeichnet, die sich in Typ I (kleinere, saure) und Typ II (größere, basische) einteilen lassen. Die entsprechenden Gene werden jeweils paarweise spezifisch exprimiert und aggregieren zunächst zu Keratinheterodimeren, bevor sie schließlich nach komplexeren Zusammenlagerungen zu Keratinfilamenten als Strukturproteine eine wichtige Funktion bei der Formation des Zytoskeletts einnehmen ^[36].

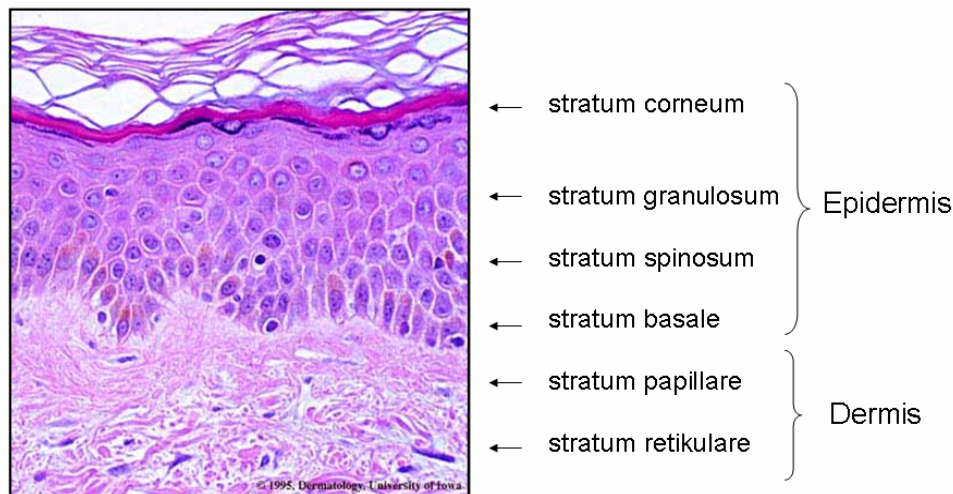


Abb. 1: Histologischer Aufbau der Haut (HE-Färbung). Abgebildet ist die HE-Färbung des Hautgewebes. Die feinstrukturierte Epidermis bildet das sich kontinuierlich regenerierende Epithel der Haut. Die dort lokalisierten Keratinozyten durchlaufen ein hochgradig reguliertes Differenzierungsprogramm, in dessen Verlauf sie sich durch unterschiedliche morphologische und zellbiologische Charakteristika auszeichnen. Aufgrund dessen lässt sich die Epidermis, wie auch die untergelagerte Dermis, in verschiedene Schichten einteilen. Im Text werden die einzelnen Charakteristika näher erläutert. Vergrößerung: 300-fach. (Abbildung: Homepage des dermatologischen Instituts der Universität von Iowa ^[16]).

Die zuunterst gelegenen Zellen des *Stratum basale* bilden die mitotisch aktive Komponente des Hautgewebes durch kontinuierliche Zellteilung findet hier die Rekrutierung neuer Zellen statt. Die hochprismatischen Basalzellen zeichnen sich durch zahlreiche Zellfortsätze an ihrer Basis aus, dies bewirkt zum einen eine besonders feste Verankerung an der untergelagerten Basalmembran, zum anderen eine deutlich vergrößerte Grenzfläche zu dem angrenzenden gefäßführenden Bindegewebe, über welches die Zellen der Epidermis lediglich durch Diffusion ernährt werden. Interzelluläre Verbindungen in Form von Desmosomen (Interzellularbrücken und Verankerungspunkte für Keratinfilamente) und Verbindungen zur Basalmembran in Form von Hemidesmosomen (Verbindungen des Laminins der Basalmembran mit intrazellulären Keratinfilamenten) tragen zur Integrität und Stabilität dieser Zellschicht bei ^[36]. Sämtliche Zellen dieser einzelligen Schicht besitzen die Fähigkeit zur Zellteilung, es kann jedoch zwischen Zellen mit begrenzter Teilungsfähigkeit (transient amplifizierende Zellen) und Zellen mit besonders hohem Teilungspotential, den epidermalen Stammzellen, unterschieden werden ^[138]. Die basalen Keratinozyten zeichnen sich durch die Expression des Keratinpaares K5 und K14 aus ^[35]. Neben den Keratinozyten existieren in dieser Schicht in geringerer Anzahl die das Pigmentsystem der Haut bildenden Melanozyten, die zum Immunsystem gehörenden Langerhansschen Zellen sowie Merkelzellen, welche Abkömmlinge des Nervensystems sind. Sämtliche weiter

außen gelegenen Zellen haben unter physiologischen Bedingungen die Fähigkeit zur Zellteilung verloren und durchlaufen den terminalen Differenzierungsprozess der Keratinisierung.

Die sich nach außen hin anschließende mehrlagige Schicht des *Stratum spinosum* wird von unter physiologischen Umständen postmitotischen Zellen gebildet, die eine besonders reichhaltige Anzahl an Desmosomen und intrazellulärer membranumschlossener ceramidhaltiger Vesikel aufweisen. Die sich im frühen Differenzierungsstadium befindlichen Zellen dieser Schicht exprimieren in erster Linie die Keratine K1 und K10^[35]. In den apikalen Schichten beginnt zudem die Synthese der glutamin- und lysinreichen Strukturproteine Involucrin und Loricrin, welche an der inneren Zellmembran deponiert werden und zur Stabilisierung derselben beitragen^[82, 104]. Des Weiteren beginnt in den Zellen des äußeren *Str. spinosum* die Expression des Profilaggrins, einem zunächst in den Keratohyalingranula gespeicherten kalzium-bindenden Vorläuferprotein des Filaggrins, das multiple, repetitive Filaggrin-Sequenzen enthält^[78].

Die sich anschließende Schicht rhomboider Zellen bildet das durch einen sehr hohen Anteil intrazellulärer Keratohyalingranula gekennzeichnete *Stratum granulosum*. Durch Dephosphorylierung und proteolytische Spaltung entstehen aus dem Profilaggrin hier die einzelnen Filaggrinmoleküle, die über Disulfidbrücken mit den Keratinfilamenten vernetzt werden^[102] und eine oberflächen-parallele stabilisierende Struktur bilden. Die Keratinozyten beginnen hier ihre Zellkerne und zytoplasmatischen Organellen zu verlieren, zudem erfolgt aufgrund einer erhöhten Permeabilität der dehydrierten Membranen der Einstrom von Kalzium.

Eine sehr dünne, jedoch nicht immer deutlich in Erscheinung tretende Schicht dicht gepackter, flacher Zellen bildet das folgende *Stratum lucidum*. Die Zellkerne der apoptotischen Zellen sind hier vollständig verschwunden und die Umrisse der Zellen sind nur noch vereinzelt zu erkennen.

In der äußersten Schicht, dem *Stratum corneum*, schichten sich mehrere Lagen verhornter, lamellenartig gestapelter Zellen übereinander, die mit ihren verdickten Membranen stark ineinander verzahnt sind. Die durch den erhöhten Kalziumspiegel aktivierte zelluläre Transglutaminase I katalysiert die Bildung von Lysin-Isopeptid-Brücken der unterschiedlichen Hüll- und Strukturproteine, welches zu einer zusätzlichen Verkittung führt^[104]. Filaggrinmoleküle werden hier größtenteils in freie Aminosäuren gespalten und tragen so zur Stabilität der epidermalen Osmolarität bei^[78]. Schließlich beginnen die obersten Lamellen sich von den unteren Hornsschichten abzulösen und bilden eine mitunter als *Stratum disjunctivum* bezeichnete, in Ablösung begriffene Schicht von Hautschuppen. Die hochgradige Vernetzung der Zellen des *Stratum corneum* in Kombination mit in den Extrazellularraum abgegebenen Lipidvesikeln bewirkt die nahezu völlige Wasserundurchlässigkeit der Haut. Die Zeitdauer der Wanderung der Keratinozyten

vom *Stratum basale* bis zum *Stratum corneum* beträgt in Abhängigkeit von der jeweiligen Körperregion zwischen 2 und 4 Wochen.

Die *Dermis*, eine kräftige Bindegewebsplatte mesodermalen Ursprungs bildet eine stützende Grundlage der *Epidermis*. Sie beinhaltet die der *Epidermis* entstammenden Haarfollikel sowie Schweiß- und Talgdrüsen und lässt sich in zwei nicht eindeutig voneinander abzugrenzende Schichten gliedern. Die aus relativ lockerem Bindegewebe bestehende dünne Papillarschicht (*Stratum papillare*) besteht aus einem Netzwerk dünner Kollagenfaserbündel und bildet die die *Epidermis* verankernden Dermispapillen. Die wesentlich straffere Geflechschicht (*Stratum reticulare*) enthält gröbere, zu einem dichten, oberflächenparallelem Netz verstreute Kollagenfasern. Insgesamt ist die Dermis zusätzlich mit einem Geflecht elastischer Fasern ausgestattet, beide Fasertypen verleihen der Haut in ihrer Kombination ein außerordentliches Maß an Elastizität und Reißfestigkeit. Die einbettende Matrix besteht aus stark wasserbindenden Glykoproteinen, zudem enthält sie Fibroblasten, welche Bindegewebsproteine sezernieren, sowie Makrophagen und Mastzellen. Des Weiteren ist die Dermis mit einem Geflecht von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen, diese dienen auch der Versorgung der gefäßfreien, lediglich durch Diffusion versorgten *Epidermis*. Zudem sind vielfach Nervenendigungen (Tastpapillen) in die *Dermis* eingebettet ^[39]. Beim Nager (Maus) ist zudem ein prominenter Muskelstrang (*panniculus carnosus*) in die Dermis eingelagert.

1.1.2 Die kutane Wundheilung

Verletzungen des feinstrukturierten Gewebes der Haut stellen eine erhebliche Irritation bis hin zu einem völligen Verlust der anatomischen, zellulären und biochemischen Kontinuität dar. Da eine der wichtigsten Funktionen der Haut in dem Schutz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen besteht, müssen Verletzungen jeder Art schnell und effizient behoben werden. Wenngleich die vollständige Rekonstitution des intakten Gewebes nur im Embryo möglich ist ^[75, 79], bedarf es einer möglichst umfassenden Wiederherstellung des funktionell intakten Gewebes. In dem Maße, in dem dies nicht gelingt, erfolgt ein Ersatz des Organdefektes durch funktionell minderwertiges Bindegewebe.

Eine effiziente Wundheilung erfordert daher die dynamische Koordination einer Vielzahl verschiedener zellulärer und molekularer Prozesse. Die hierbei ablaufenden Vorgänge lassen sich in drei Phasen einteilen, deren Vorgänge jedoch nicht strikt voneinander getrennt sind und fließend ineinander übergehen.

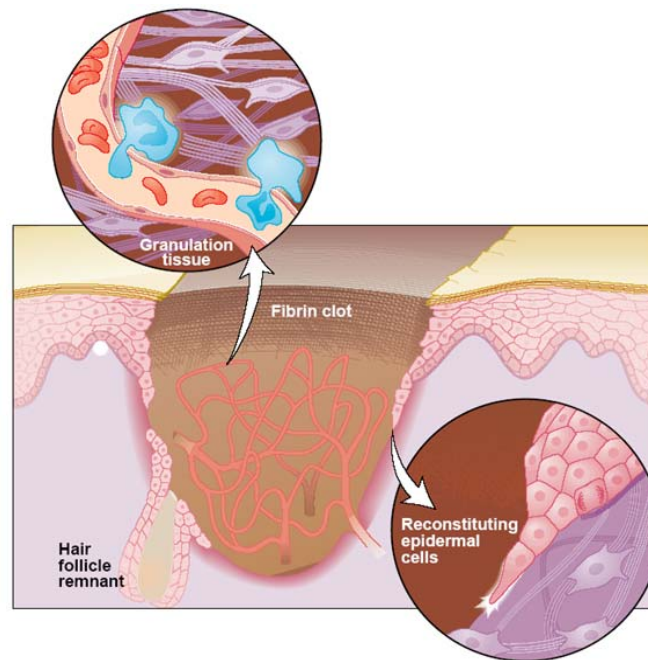


Abb. 2: Übersicht über die zentralen Prozesse der Wundheilung. In der Abbildung wird eine schematische Übersicht über die bei der Wundheilung ablaufenden Prozesse gegeben. Gezeigt ist der hauptsächlich aus Fibrin bestehende Wundschorf (*Fibrin Clot*), der sich nach Verwundung bildet. In diesen und den umgebene Wundbereich beginnen Entzündungszellen und Fibroblasten zu migrieren und tragen zur Formation des Granulationsgewebes (*Granulation tissue*) bei. Aktivierte Keratinozyten des Wundrandes und aus partiell zerstörten Haarfollikeln beginnen vermehrt zu proliferieren und entlang des Wundschorfes in das verwundete Areal zu migrieren (*Reconstituting epidermal cells*), welches die Grundlage für die Bildung einer neuen Epidermis darstellt. Zudem migrieren Monozyten aus den Kapillaren in das Granulationsgewebe. Im späten Stadium der Wundheilung kontrahiert dieses unter Beteiligung kontraktiler Myofibroblasten (nach Martin, 1997 ^[79]).

I inflammatorische Phase

Im frühen Stadium der Entzündungsphase kommt es zunächst zum Austritt von Blut und Lymphe in den extrazellulären Raum. Über die Aktivierung der Gerinnungskaskade bildet sich rasch ein aus aggregierten Thrombozyten bestehendes Blutkoagulum im Wundbereich. Die Freisetzung von Thrombin aus Prothrombin führt zur Umwandlung des im Plasma löslichen Fibrinogens zu Fibrin, welches sowohl eine die Thrombozyten einbettende Matrix bildet, als auch über Vernetzungen mit den Wundrändern eine erste Stabilität der Wunde bewirkt. Durch Austrocknen des Koagulums bildet sich der Wundschorf, welcher einen frühen, temporären Schutz vor dem Austrocknen der Wunde und vor potentiellen Infektionen bietet und zudem als vorläufige Matrix für migrierende Zellen dient. Des Weiteren

bildet er ein Reservoir an Faktoren, welche für die Initiierung des Wundheilungsprozesses essentiell sind ^[130]. Dies sind zum einen verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche aus degranulierenden Thrombozyten freigesetzt werden, zum anderen Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin ^[79, 120]. Bereits etwa sechs Stunden nach Verwundung werden neutrophile Granulozyten und später auch Monozyten in das Wundgebiet angelockt. Dies erfolgt chemotaktisch sowohl durch Wachstumsfaktoren und Zytokine wie EGF (*epidermal growth factor*), HB-EGF (*heparin binding epidermal growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), FGF1, 2 und 4 (*fibroblast growth factor 1, 2 und 4*), IL-1 α und - β (Interleukin-1 α und - β), IL-6, TGF- β (*transforming growth factor- β*), PDGF (*platelet derived growth factor*) als auch durch Proteine des Komplementsystems und Degradationsprodukte (Zelltrümmer, Protein-Abbauprodukte) ^[31, 79, 120]. Die überwiegenden Zellen der frühen Entzündungsphase sind die neutrophilen Granulozyten, ihre Hauptfunktion besteht in der Beseitigung von Mikroorganismen, toten Zellen und Fremdmaterial durch Phagozytose (*Debridement*). Jedoch bildet die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch diese Zellen auch die Grundlage für nachfolgende Prozesse. Diese freigesetzten Zytokine bewirken gemeinsam mit extrazellulären Abbauprodukten eine Anreicherung der im Blut zirkulierenden Monozyten. Beim Übertritt von der Blutbahn in das Wundgebiet durchlaufen diese nachfolgend einen durch die vorherrschenden Verhältnisse initiierten Aktivierungs- und Differenzierungsprozess zu Makrophagen. Die Aufgabe dieser die Spätphase der Entzündung kennzeichnenden Zellen besteht neben der Beteiligung an der Beseitigung von Keimen und Zelltrümmern durch Phagozytose ebenfalls in der Produktion und Freisetzung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche den Wundheilungsprozess modulieren. Sowohl Makrophagen als auch polymorphkernige Granulozyten sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies, die der Abtötung eingedrungener Mikroorganismen dienen, zu synthetisieren, dieser Vorgang wird auch als *oxidative burst* bezeichnet ^[31, 79, 120]

Die Entzündungsphase dauert im Normalfall 3-5 Tage, exogene sowie endogene Faktoren können zu Verlängerungen dieser Phase bis hin zu Wundinfektionen und chronischen Entzündungen führen.

II. *proliferative Phase*

In der sich anschließenden bis zu 14 Tage dauernden Phase beginnt die Reorganisation des Gewebes. Neben der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und Restrukturierung des Bindegewebes über Bildung eines provisorischen Mesenchyms, das aufgrund der durch die zahlreichen Zellkerne eingewanderter Zellen gekennzeichneten körnigen Struktur als Granulationsgewebe

bezeichnet wird, steht die Reepithelisierung des verletzten Gewebes im Vordergrund. Aktivierte Keratinozyten des Wundrandes beginnen entlang des Wundschorfes in das Wundgebiet zu migrieren. Voraussetzung hierfür sind die Dissoziation der hemidesmosomalen Verbindungen zwischen epidermalen Zellen und Basalmembran, die Retraktion intrazellulärer Tono- und Keratinfilamente, die Auflösung desmosomaler interzellulärer Verbindungen und die Formation peripherer zytoplasmatischer Actinfilamente (Lamellopodien) ^[110]. Die Keratinozytenmigration wird insbesondere durch die Wachstumsfaktoren TGF- β 1, EGF, MSP (*makrophage stimulating protein*), verschiedene Integrine (α 3 β 1, α 6 β 4, α v β 3), Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin-5 und Matrixmetalloproteasen (MMP1, 2, 9, 10) sowie proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) reguliert ^[31, 110, 144]. Neben der Migration kommt es zusätzlich zu einer erheblichen Steigerung der Proliferationsrate der Keratinozyten, wodurch ein verdicktes, hyperproliferatives Epithel am Wundrand entsteht. Auch dieser Prozess wird von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wie TGF- α , TGF- β , EGF, HB-EGF, KGF (*keratinocyte growth factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), Integrinen (α v β 3/ β 5, β 4, β 1) sowie Proteinen der extrazellulären Matrix wie Laminine, Kollagene und Matrixmetalloproteasen (MMP3) und diversen proinflammatorischen Zytokinen reguliert ^[31, 110, 144]. In diesem Stadium beginnen auch die unter physiologischen Umständen postmitotischen Zellen der suprabasalen Schicht zu proliferieren. Die in diesem Stadium angeregten Keratinozyten werden auch als aktivierte Keratinozyten bezeichnet. Einhergehend mit dieser Aktivierung ist zum einen die Expression eines spezifischen Keratinpaars (K6/K16) ^[51, 141], zum anderen die Synthese zusätzlicher Wachstumsfaktoren durch die Keratinozyten (TGF- α , IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) sowie MCSF (*macrophage colony stimulating factor*) ^[135].

Des Weiteren kommt es zu einer Sekretion verschiedener proteolytischer Enzyme, die dem Abbau des Blutgerinnsels dienen. Hierbei stellt das wichtigste fibrinolytische Enzym das Plasmin dar. Dieses entsteht aus der Spaltung des inaktiven Vorläuferproteins Plasminogen unter anderem durch die von den Keratinozyten produzierten Aktivatoren *Tissue-Type Plasminogen Activator* (tPA) und *Urokinase-Type Plasminogen Activator* (uPA) ^[31, 79]. Nachfolgend führen die bei der Fibrinolyse freigesetzten Fibrinospaltprodukte zu einer verstärkten Invasion von Fibroblasten in das Gewebe, die über die Synthese eines kollagenreichen Bindegewebes hauptverantwortlich sind für die Bildung der neuen Matrix.

Auch die Bildung des Granulationsgewebes wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, unter anderem PDGF und TGF- β reguliert. Neben den Fibroblasten finden sich Entzündungszellen, Nervenzellen und die Endothelzellen einsprossender Blutkapillaren im Granulationsgewebe ^[79, 120].

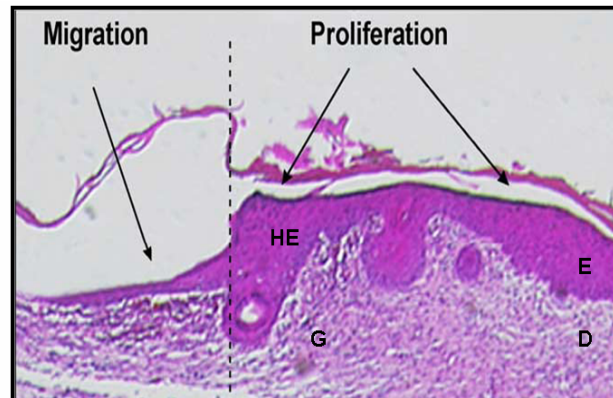


Abb. 3: Übersicht über das Migrations- und Proliferationsverhalten aktivierter Keratinozyten. Der Reepithelisierungsprozess des verwundeten Hautareals wird durch zwei funktionelle Komponenten der Keratinozyten bedingt und gesteuert: Die Proliferationssteigerung, initiiert durch multiple Zytokine und Wachstumsfaktoren der Wundheilung, findet im wesentlichen im hyperproliferativen Epithel des Wundrandes statt, während migrierende Keratinozyten von dort aus das verwundete Areal mit einer neuen Epithelschicht bedecken. Abkürzungen: E: Epidermis, HE: hyperproliferatives Epithel, G: Granulationsgewebe, D: Dermis. (modifiziert nach Santoro und Gaudino, 2005 ^[110])

Auch die Bildung des Granulationsgewebes wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, unter anderem PDGF und TGF- β reguliert. Neben den Fibroblasten finden sich Entzündungszellen, Nervenzellen und die Endothelzellen einsprossender Blutkapillaren im Granulationsgewebe ^[79, 120].

III. Umbauphase, Maturation

Nachdem sich ein neues, provisorisches Gewebe formiert hat, beginnt die Umformung desselben in eine der ursprünglichen mehr oder minder funktionell entsprechende Struktur. Etwa ab dem siebten Tag nach Verwundung ist eine Vielzahl von Fibroblasten im Wundgebiet zu finden, die sich nun zum Teil in Myofibroblasten umwandeln ^[18] und über ihre Kontraktilität ein Zusammenziehen der Wundränder bewirken. Nach vollständigem Wundverschluss kehrt ein Großteil der Fibroblasten in den Ruhezustand (Quieszenz) zurück, der übrige Teil stirbt apoptotisch ab ^[19]. In diesem Stadium wird zudem die Bildung neuer Blutgefäße fortgeführt, wobei die wichtigsten angiogenen Faktoren der von verschiedenen Zelltypen freigesetzte VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und der bFGF (*basic fibroblast growth factor*) ^[144] sind. Die Umbauphase kann in Abhängigkeit vom Ausmaß der Verletzung sowie verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren mehrere Wochen bis Monate andauern.

1.2 Die Familie der Receptor Interacting Proteins (RIPs)

RIP-Proteine wurden zunächst als Interaktionspartner von Transmembranproteinen der Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR)-Familie identifiziert. Letztere besitzen keine eigene Kinase- oder andere enzymatische Aktivität, sondern bedienen sich spezifischer zytoplasmatischer Adaptorproteine, um das durch Ligandenbindung an ihre extrazelluläre Domäne ausgelöste Signal ins Zellinnere weiterzuleiten. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl solcher Adaptorproteine identifiziert, unter ihnen die Familie der RIP-Proteine, welche momentan fünf Mitglieder umfasst. Letztendlich scheint die Art der Adaptorproteine, die an der Weiterleitung eines einzelnen Signals beteiligt sind, ausschlaggebend für die Spezifität der zellulären Antwort zu sein. Dabei ist Aktivierung der Rezeptoren vom TNFR-Typ häufig an der Induktion apoptotischer Prozesse sowie an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt.

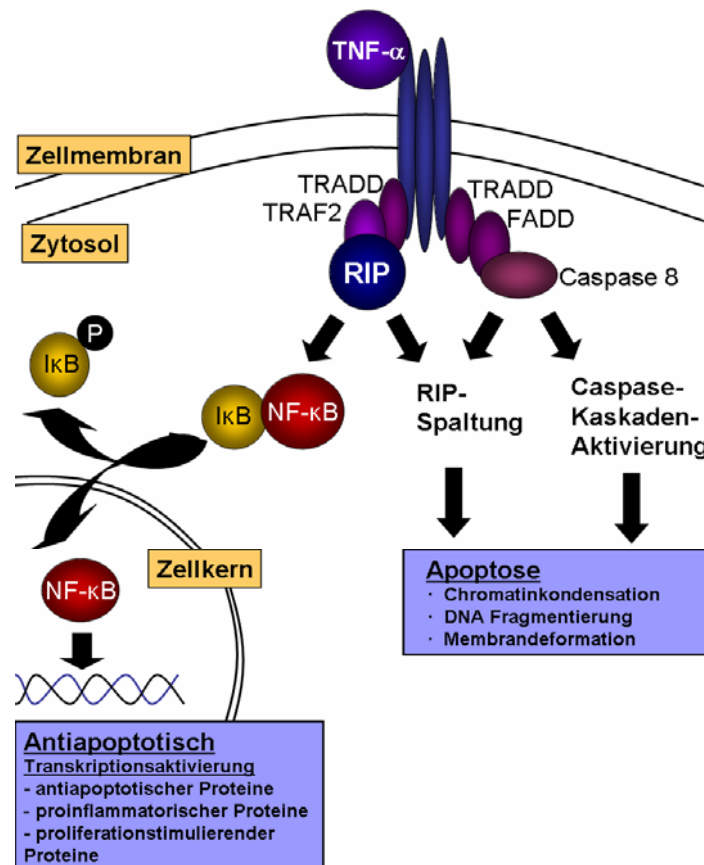


Abb. 4: Der Signaltransduktionsweg der RIP-Proteine (am Beispiel des RIP1). Die RIP-Proteine sind Adaptorproteine für Rezeptoren des TNFR-Typs. Diese verfügen über keine eigene enzymatische Domäne, sondern sind für die intrazelluläre Signaltransduktion auf die Bindung unterschiedlicher Adaptorproteine angewiesen. Während RIP1 in die antiapoptotische, NF- κ B-aktivierende Wirkung nach TNFR-Aktivierung involviert ist, bewirkt die Spaltung dieses Proteins einen scheinbar paradoxen Funktionswechsel: die Induktion der Apoptose. Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für die RIP-Proteine 3 und 4 nachgewiesen. Eine ausführlichere Erläuterung wird im Text gegeben. Quellen: Meylan *et al.*, 2005^[84]; Moynagh, 2005^[87], Feng *et al.*, 2007^[32]

1.2.1 Strukturelle Merkmale der RIPs

Die RIP-Proteine zeichnen sich durch eine übereinstimmende, konservierte Serin-Threonin-Kinasedomäne aus. Die sich jeweils anschließende intermediäre Domäne zeigt kaum Homologie zu anderen Proteinen und ist auch zwischen den einzelnen RIP-Proteinen relativ unterschiedlich. Demgegenüber sind die C-terminalen Domänen der einzelnen Proteine jeweils durch spezifische Strukturelemente gekennzeichnet.

RIP1 verfügt C-terminal über ein als *Death Domain* (DD) bezeichnetes Strukturelement. Als DDs werden spezielle Motive bezeichnet, die an der Induktion apoptotischer Prozesse beteiligt sind. Über diese Domäne erfolgen Interaktionen des RIP1 sowohl mit den DDs diverser Rezeptoren vom TNFR-Typ (TNFR I, EGFR, Fas (CD95) u.a.), als auch anderer Adaptorproteine (TRAF (*TNFR-associated protein*)1, 2 und 3, TRADD (*TNFR I-associated death domain*), FADD (*Fas-associated death domain*))^[48, 123]. Überexpression des *rip1*-Gens *in vitro* führt sowohl zur Induktion dieser apoptotischen Prozesse^[43, 48, 123] als auch zu Aktivierung von NF- κ B^[48]. Demgegenüber führt die Deletion von RIP1, generiert durch eine Spaltung des Exon 2, zu spezifischer Inhibierung der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung^[59]. Experimentell konnte zudem eine scheinbar kontroverse Funktion des RIP1 nachgewiesen werden: die Aktivierung der FADD durch TNFR-, Fas- oder TRAIL- (*TNF-related death inducing ligand*) Aktivierung kann über die Aktivierung der Caspase-8 zur Abspaltung der C-terminalen DD des RIP1 führen, welche in die Induktion der Apoptose involviert ist. Demgegenüber wirkt die intakte, ungespaltene Form des RIP1 nach TNFR-Stimulierung über die Aktivierung von NF- κ B antiapoptotisch^[60, 71, 80]. Hinsichtlich der NF- κ B-Aktivierung ließ sich dabei die intermediäre, α -helikale Domäne des RIP1 als essentieller Faktor identifizieren^[48, 134]. Über diese Domäne erfolgt auch eine direkte Interaktion mit NEMO (*NF- κ B essential modulator*, IKK γ), einem zytosolischen Inhibitorprotein von NF- κ B,^[153]. Als weiteres Strukturelement kennzeichnet RIP1 ein aus ca. 35 Aminosäuren bestehendes *RIP homotypic interacting motif* (RHIM), welches in der intermediären Domäne angesiedelt ist.

RIP2 zeichnet sich durch die C-terminale *caspase activating and recruitment domain* (CARD) aus und wird in der Literatur auch als *RIP-like interacting CLARP kinase* (RICK) oder *CARD-containing IL-1 β converting enzyme-associated kinase* (CARDIAK) bezeichnet. CARD-Domänen ähneln sowohl hinsichtlich der Sequenz als auch der Struktur den DD und bestehen wie diese aus sechs α -helikalen Strukturelementen^[139], über welche die Induktion apoptotischer Prozesse vermittelt wird. Interaktionen dieser Domäne des RIP2 finden einerseits mit den CARDS diverser Rezeptoren (Nod1 und 2) sowie anderer Adaptorproteine (TRAF 1, 2, 5 und 6, NEMO, CARD6, IKK α u.a.) und Kinasen (Caspase1) statt, zudem jedoch auch mit den DDs verschiedener Rezeptoren (NGF-R (*nerve growth factor-receptor*), TLR2)

statt. Wie RIP1 kann auch RIP2 die Aktivierung von NF- κ B - wie bei RIP1 vermittelt über die intermediäre Domäne - als auch die der Induktion apoptotischer Prozesse vermitteln. Zumindest bei Überexpression *in vitro* interagiert RIP2 jedoch auch mit den antiapoptotischen Proteinen cFLIP und cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis 1*) [49, 81, 133].

Abgesehen von dem in der intermediären Domäne angesiedeltem RHIM weist RIP3 keine besonderen Strukturelemente auf. Interaktionen der RHIMs von RIP3 und RIP1 mit nachfolgender Phosphorylierung von RIP1 durch RIP3 wurden beschrieben [56, 128, 129]. Aufgrund dieser Interaktion wird angenommen, dass RIP3 die Aktivität von RIP1 regulieren könnte [129]. Weiterhin wurden Interaktionen von RIP3 mit TRAF2 und den Caspasen-2, -8, -9 und -10 beschrieben, wobei ähnlich dem RIP1 die Caspase-8-abhängige Spaltung des RIP3 nachgewiesen wurde [32]. Wenngleich RIP3 zunächst *in vitro* als Apoptoseinduktor und Aktivator von NF- κ B identifiziert wurde [128], wird die Funktion dieses Faktors bis heute kontrovers diskutiert.

Das C-terminal durch 11 repetitive Ankyrinsegmente gekennzeichnete RIP4 wurde aufgrund der Interaktion mit spezifischen Isoformen der Proteinkinase C (PKC δ , bei der Maus auch PKC β) in der Literatur zunächst als *PKC δ -interacting protein kinase* (DIK) bzw. *protein kinase C-associated kinase* (PKK) bezeichnet [5, 10]. Polyankyrin-Domänen gehören zu den häufigsten eukaryontischen Protein-Protein Interaktionsmotiven, wobei die einzelnen Ankyrineinheiten aus paarweise wiederholten Modulen von je etwa 33 Aminosäuren aufgebaut sind. Hierbei scheint die sich ergebende spezifische räumliche Struktur die Funktionalität dieses Strukturelements zu definieren. Identifiziert wurden solche repetitiven Ankyrinsequenzen bereits in Proteinen mit diversen, recht unterschiedlichen Funktionen -Transkriptionsinitiation, Regulation des Zellzyklus, Formation des Zytoskeletts und Signaltransduktion [86]. Für RIP4 konnte experimentell gezeigt werden, dass die Polyankyrinsequenz eine autoregulatorische Funktion hinsichtlich der Kinaseaktivität und der damit einhergehenden NF- κ B-Aktivierung einnimmt [83]. Aus diesem Zusammenhang wird deutlich, dass im Gegensatz zu den anderen RIP-Proteinen die NF- κ B-Aktivierung durch RIP4 auch über die Kinaseaktivität dieses Proteins erfolgt [83, 91]. Zudem führt zumindest die Überexpression des *rip4*-Gens zu einer Aktivierung des JNK-AP1-Signal-transduktionsweges, ebenfalls vermittelt über die Kinaseaktivität. Ähnlich wie RIP1 und 3 wird RIP4 während apoptotischer Prozesse unter dem Verlust der NF- κ B-Aktivierungskapazität Caspase-vermittelt gespalten [83]. Während für die bisher beschriebenen RIP-Proteine bereits eine Vielzahl an Interaktionspartnern identifiziert wurde, ist für RIP4 bisher lediglich die Interaktion mit der bereits erwähnten PKC δ (bzw. PKC β) sowie den Adaptorproteinen TRAF 1, 2 und 5 nachgewiesen worden [84].

RIP5 weist im Vergleich zu den bisher beschriebenen RIP-Proteinen einige Besonderheiten auf und wurde im Wesentlichen aufgrund von Strukturhomologien der Kinasedomäne dieser Proteinfamilie zugeordnet. Diese Kinasedomäne ist jedoch im Gegensatz zu den anderen RIP-Proteinen nicht N-terminal, sondern C-terminal lokalisiert. Die intermediäre sowie die N-terminale Domäne von RIP5 weisen dagegen kaum Homologien zu anderen Proteinen auf, N-terminal sind jedoch ähnlich dem RIP4-Protein einige Ankyrinsegmente lokalisiert ^[152]. Bisher liegen lediglich einige wenige *in vitro*-Analysen zur Funktion von RIP5 vor, in welchen die Beteiligung dieses Faktors an der Induktion apoptotischer Prozesse gezeigt werden konnte. Ein weiteres Charakteristikum der RIP-Proteine, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, konnte für RIP5 jedoch nicht nachgewiesen werden ^[152].

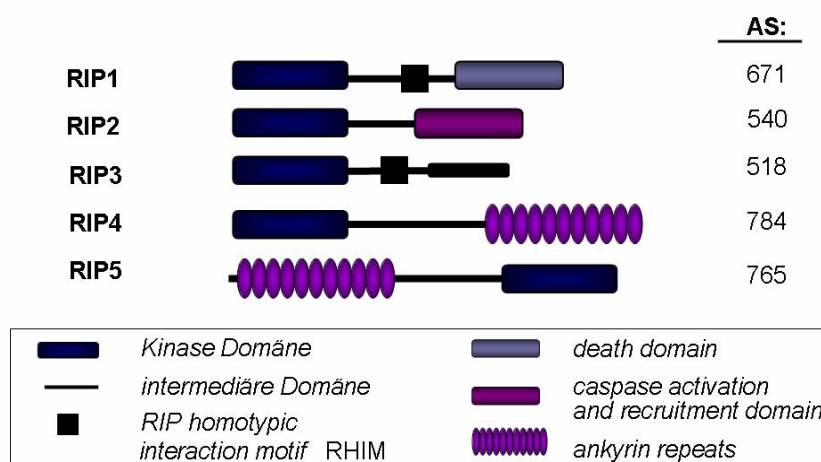


Abb. 5: Schematische Darstellung der RIP-Proteine und deren Domänen-Struktur.

Die RIP-Proteine verfügen über eine homologe, konservierte Kinase Domäne vom Serin-Threoninkinase-Typ, welche, abgesehen vom RIP5, N-terminal lokalisiert ist. Die intermediären sowie die C-terminalen, bzw. im Falle des RIP5 die N-terminale Domänen unterscheiden sich grundsätzlich. Die jeweiligen C-terminalen Domänen determinieren die funktionellen Eigenschaften der einzelnen Adaptorproteine. *Death domain*: „Todesdomäne“, *caspase activating and recruitment domain*: Caspase aktivierende und rekrutierende Domäne, *ankyrin repeats*: repetitive Ankyrinsegmente, *RHIM*: RIP-typisches Interaktionsmotif, AS: Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach Meylan, 2005 ^[84]. Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben.

1.2.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B als Target der RIP-Proteine

Abgesehen von RIP5 ist für die einzelnen RIP-Proteine die Integration in den Signaltransduktionsweg des Transkriptionsfaktors NF- κ B bereits bekannt, wobei sie nach Stimulation des TNFR-1 an der komplex regulierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors beteiligt sind. Die Transkriptionsfaktor-Proteinfamilie NF- κ B an sich umfasst ebenfalls eine Reihe von Mitgliedern (c-Rel, RelA (p65), NF- κ B1(p50), NF- κ B2 (p52)), die letztendlich als Hetero- oder Homodimere im Zellkern den aktiven Transkriptionsfaktor formieren [54, 58, 96]. Diese übernehmen in einer Vielzahl von Geweben fundamentale Funktionen, wie die Regulation von zellulären Stress-Situationen und apoptotischen Prozessen sowie der zellulären Entwicklung und der Onkogenese [54, 96]. In der Haut konnte das p50/p65-Dimer bereits als bedeutendste Komponente identifiziert werden, wobei zunächst eine protektive Wirkung für die proliferierenden Keratinozyten insbesondere nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden konnte [58]. In weiteren Analysen konnte schließlich zudem eine Integration des NF- κ B in den Differenzierungsprozess der Keratinozyten beobachtet werden, wobei dieser Faktor in denjenigen Zellen aktiviert zu werden scheint, die gerade aus dem Zellzyklus ausgetreten und in den terminalen Prozess der Differenzierung soeben eingetreten sind [58]. Die Regulation der NF- κ B-Aktivität erfolgt im Zytosol durch ein System von Inhibitorproteinen, die wiederum der Regulation durch Proteinkinasen unterliegen. So liegt das p50/p65-Dimer im Zytosol der proliferierenden Zellen der Basalschicht gebunden an dessen Inhibitorprotein I κ B α (Inhibitorprotein κ B α), und somit inaktiv, vor. Unterschiedliche exogene Stimuli bewirken über zelluläre Signaltransduktionswege die Aktivierung der IKK (*I κ B kinases*) bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK α und IKK β (*inhibitor κ B kinases*)), sowie einer regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO)), die die Phosphorylierung und nachfolgende Degradation des I κ B am 26S-Proteasomenkomplex induzieren. Der nun ungebunden und ebenfalls phosphoryliert vorliegende Transkriptionsfaktor ist in der Lage in den Zellkern überzutreten und bewirkt dort nach Bindung weiterer Adaptorproteine schließlich die Transkriptionsregulation über die Bindung an spezifische Erkennungsmotive der DNA [54, 58, 87, 96]. Diese Kaskade der NF- κ B-Aktivierung, welche von der Aktivierung der drei IKKs abhängig ist, wird auch als klassischer (*canonical*) Weg bezeichnet. Zudem existieren jedoch noch weitere Aktivierungskaskaden, wobei der alternative Weg (*non-canonical*) von der Aktivierung der NIK (NF- κ B Inhibitor Kinase) und IKK α abhängig ist [117]. Zudem erfolgt die NF- κ B-Aktivierung nach UV-Bestrahlung sowie durch reaktive Sauerstoffderivate unabhängig von den IKKs über die Aktivierung der p38-MAPK, welche nach Aktivierung der CKII (Casein Kinase II) die direkten Phosphorylierung des I κ B α bewirkt [57, 132].

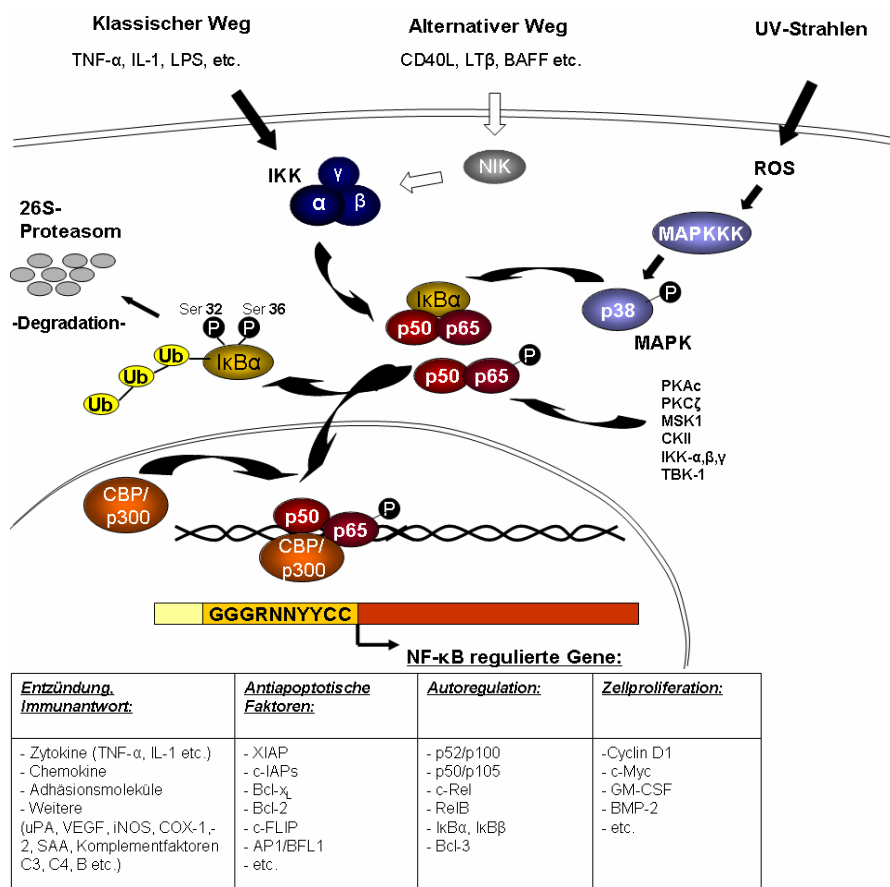


Abb. 6: Die Regulation der NF- κ B-Aktivierung. Unterschiedliche externe sowie interne Stimuli regulieren die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Während die RIPs in die Signaltransduktion des „klassischen“ Wegs über die Aktivierung der IKK α beteiligt sind, existieren zudem weitere Aktivierungswege. Hierzu zählen unter anderem der „alternative“ Aktivierungsweg über die NIK (NF- κ B Inhibitor Kinase) sowie die Aktivierung der p38-MAPK durch ROS (reaktive Sauerstoffderivate). Letztendlich resultieren die unterschiedlichen Stimuli in der Phosphorylierung und Ubiquitinierung des I κ B α , welches nun der Degradation am 26S-Proteasom unterliegt. Das im Zytosol frei vorliegende NF- κ B-Dimer (hier p50/p65) bewirkt nach Übertritt in den Zellkern und Bindung an spezifische Erkennungsmotive der DNA zusammen mit Kofaktoren schließlich die Induktion der Transkription einer Vielzahl von Genen, von denen einige in der Tabelle aufgeführt sind. Aufgrund der außerordentlichen Komplexität des NF- κ B-Signaltransduktionsweges werden hier lediglich die grundlegenden Prozesse dargestellt, auf die im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen wird. Konsensus-Sequenz: G: Guanin, R: Purin, N: Nukleotid, C: Cytosin. Quellen: Neumann und Naumann, 2007 ^[93], Karin, 2006 ^[54], Courtois, 2005 ^[13]; Kaufmann und Fuchs, 2000 ^[58].

1.2.3 Funktionelle Bedeutung der einzelnen RIP-Proteine für den Gesamtorganismus

Um über die *in vitro*-Daten hinausführende Hinweise hinsichtlich der funktionellen Relevanz der einzelnen RIP-Proteine zu erhalten, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits spezifische *knockout* Mäuse generiert, denen jeweils das für RIP1, RIP2, RIP3 oder RIP4 kodierende Gen entfernt worden war.

Die 1998 von Kelliher *et al.* ^[59] generierten *rip1*-defizienten Mäuse zeichneten sich sehr früh durch ein deutlich reduziertes Körpergewicht aus; zum anderen überlebte keines der Jungtiere länger als drei Tage. Autopsien dieser Tiere ergaben sämtlich den Befund hochgradiger ödematöser Schwellungen in den Nacken-, Axillar- und Inguinalgebieten, wohingegen die inneren Organe im Vergleich zu den Kontrolltieren weitgehend unverändert erschienen. Bei weiterführenden Studien wurde zudem eine deutlich verminderte Überlebensrate der Thymozytenpopulation beobachtet, während die B-Lymphozyten-Vorläuferzellen des Knochenmarks weitgehend unverändert waren. Bei der histologischen Analyse des Thymus zeigten sich zudem massive apoptotische und nekrotische Veränderungen der Zellen der Thymusrinde und des Thymusmarks, des Weiteren wurden spezifische Veränderungen der Lymphknoten in Form von Nekrosen, Ödemen und granulozytären Infiltrationen beobachtet. Ähnliche granulozytäre Infiltrationen und Gewebeschäden zeigten sich auch im subkutanen Fettgewebe der Dermis. Im Allgemeinen wird die Aktivierung sowohl von Makrophagen als auch von Lymphozyten durch das proinflammatorische Zytokin TNF- α induziert. Daher legen die geschilderten Befunde die Vermutung nahe, dass RIP1 eine absolut essentielle Komponente des antiapoptotischen, überlebensfördernden TNFR-Signaltransduktionsweges darstellt. Diese überlebenssichernde Bedeutung von RIP1 scheint dabei insbesondere für lymphoide Zelllinien und Gewebe sowie für Adipozyten von substantieller Bedeutung zu sein ^[59].

Im Gegensatz zu den *rip1*^{-/-} Mäusen zeigten die 2002 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen (Kobayashi *et al.* ^[62] und Chin *et al.* ^[11]) parallel generierten *rip2*^{-/-} Mäuse weder eine verminderte Überlebensfähigkeit noch eine eingeschränkte Fertilität. Allerdings wurde in diesen Tieren einerseits eine hochgradig verringerte Abwehrfähigkeit gegenüber dem intrazellulären pathogenen Erreger *Listeria monocytogenes* festgestellt; andererseits waren die Mäuse resistent gegenüber den letalen Effekten des LPS- (Lipopolysaccharid) induzierten endotoxischen Schocks. Unter Zuhilfenahme von *in vitro*-Analysen mit aus *rip2*^{-/-} -Mäusen isolierten Makrophagen konnte schließlich gezeigt werden, dass diese Zellen nach Stimulierung mit LPS, Peptidoglykan und doppelsträngiger (viraler) RNA unter anderem eine verminderte Zytokinproduktion (IL-6, TNF- α , IP10) aufwiesen. Zudem wurde in den T-Zellen der Mäuse eine deutlich verminderte IFN- γ -(Interferon- γ)-Produktion und eine reduzierte Differenzierungskapazität beobachtet. Auch die NF-

κ B-Aktivierung nach TLR4- und Nod1-Rezeptor Stimulierung war massiv eingeschränkt. Insgesamt lassen die Befunde der *rip2^{-/-}*-Mäuse darauf schließen, dass die hauptsächliche biologische Bedeutung von RIP2 in der Koordinierung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems liegt^[11, 62].

Die von der Arbeitsgruppe um Newton *et al.*^[94] generierten *rip3^{-/-}*-Mäuse zeigten keinerlei Phänotyp, obwohl das *rip3*-Gen in einer Vielzahl von embryonalen und adulten Geweben exprimiert wird. Auch der TNFR-NF- κ B-Signaltransduktionsweg war in den Zellen der Tiere nicht verändert^[94].

Die 2002 von Holland *et al.*^[47] generierten *rip4*-defizienten Mäuse starben sämtlich innerhalb kurzer Zeit nach der Geburt. Ursächlich für das Versterben stellte sich die epitheliale Fusion sämtlicher externer Körperöffnungen (Maul, Nase, Anus) mit Verschluss derselben dar. Diese Epithelverschmelzungen führten unter anderem über Verhinderung der Atmung zum Ersticken der Neugeborenen. Weiterführende Analysen wurden folglich an 17,5 und 18,5 Tage alten Embryonen durchgeführt, welche bereits makroskopisch erkenntlich deutliche Veränderungen der ektodermalen Epithelgewebe aufwiesen. Hierbei bestätigten histologische Untersuchungen des Kopfes die epitheliale Fusion der Maulhöhlenschleimhäute. Des Weiteren ergaben histologische Untersuchungen der Haut eine hochgradige Verdickung derselben, in der die äußere, normalerweise verhornte Schicht durch eine verdickte Schicht abgeflachter, parakeratotischer Zellen ersetzt war. Zudem zeigten die unteren epidermalen Schichten (*stratum spinosum* und *stratum granulosum*) stark hyperplastische Veränderungen, die jedoch nicht aus einer veränderten Proliferationsrate resultierten, wie BrdU-Analysen ergaben. Auch eine veränderte Apoptoserate der epidermalen Keratinozyten konnte mittels TUNEL-Färbungen des Gewebes als Ursache für die beobachteten Hautveränderungen ausgeschlossen werden. Jedoch wurde mittels immunhistochemischen Analysen ein insgesamt massiv verändertes Expressionsmuster verschiedener epidermaler Differenzierungsmarker in den Keratinozyten der Haut nachgewiesen. Hieraus lässt sich schließen, dass RIP4 eine besondere Rolle bei der Regulation der Epidermidifferenzierung zukommt.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die *receptor interacting proteins* wurden zunächst als Adaptorproteine des TNFR I identifiziert. Im Laufe der Zeit wurden jedoch zunehmend weitere Rezeptoren entdeckt, mit denen einige der RIPs interagieren. Insbesondere die Wundheilung der Haut, jedoch auch die Homöostase der intakten Haut wird über eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteuert, deren Wirkungen über unterschiedliche Rezeptoren in das Zellinnere vermittelt werden. Über die Bedeutung der RIPs bei der Wundheilung sowie über deren Rolle in der Haut war zu Beginn dieser Arbeit lediglich bekannt, dass RIP4 eine wichtige Funktion bei der embryonalen Entwicklung der Haut einnimmt. Aufgrund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung dieser Proteinfamilie für die Wundheilung sowie für die Keratinozyten der differenzierenden Haut unter folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1) Wird die Expression der *rip*-Gene bei der Wundheilung der Haut in Keratinozyten reguliert?

Unter Verwendung eines etablierten Wundheilungsmodells sollte die Regulation der Expression der *rip*-Gene während der Wundheilung untersucht werden. Hierfür sollten zunächst Exzisionswunden auf dem Rücken von Balb/c-Mäusen generiert werden, die nach der Entnahme zu definierten Zeitpunkten für RNA-Analysen sowie für histologische Untersuchungen aufbereitet werden sollten.

2) Lässt sich gegebenenfalls ein *in vitro*-Modell zur Analyse der Expressionsmuster der *rip*-Gene in Keratinozyten etablieren?

Sollte sich für eines oder mehrere der *rip*-Gene eine differentielle Expression in den Keratinozyten bei der Wundheilung nachweisen lassen, war es von Interesse, ein entsprechendes *in vitro*-Modell zu etablieren. Zudem war es von Interesse, das Expressionsmuster der *rip*-Gene in differenzierenden Keratinozyten zu untersuchen. Nachfolgend sollten dann diejenigen *rip*-Gene, welche insgesamt in Keratinozyten eindeutig reguliert werden intensiver auf ihre Bedeutung hin analysiert werden.

3) Welche Faktoren bewirken die differentielle Expression der entsprechenden *rip*-Gene?

Hierbei sollten im *in vitro*-Modell zunächst einige der Faktoren, welche eine Regulation der entsprechenden Gene bewirken, identifiziert werden.

4) Welche funktionelle Bedeutung haben die in Keratinozyten regulierten *rip*-Gene für diese Zellen?

Unter Verwendung spezifischer siRNA sollte schließlich die Funktion des bzw. der regulierten *rip*-Gene für Keratinozyten näher charakterisiert werden.

5) Welche Bedeutung hat der von den RIP-Proteinen aktivierte NF- κ B für die Wundheilung der Haut?

Abschließend war geplant, nach Möglichkeit die Korrelation zwischen der *rip*-Genexpression und deren Effektor NF- κ B zu untersuchen. Da auch über die Bedeutung von NF- κ B bei der Wundheilung der Haut vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt war, sollte dessen Aktivierung bei der Wundheilung, mit dem Fokus auf die Keratinozyten, möglichst ebenfalls untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) | Roth, Karlsruhe |
| Actinomycin D | Sigma, München |
| Agar | Roth, Karlsruhe |
| Agarose MP | Roche, Mannheim |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| APS | Roth, Karlsruhe |
| Bacto Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Blocking Reagenz | Roche, Mannheim |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma, München |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| CDP-Star | Roche, Mannheim |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Chromatographiepapier (3mm) | Whatman, Dassel |
| Curcumin | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| Defined K-SFM | Gibco (Invitrogen), Karlsruhe |
| Desoxynukleosidtriphosphate | Roche, Mannheim |
| Dexamethason | Sigma, München |
| 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) | Roche, Mannheim |
| Diethylether | Roth, Karlsruhe |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Roth, Karlsruhe |
| Dimethylformamid (DMF) | Roth, Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma, München |
| Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) | Biochrom AG, Berlin |
| ECL-Detektionsreagenzien | Amersham, Braunschweig |
| EDTA | Sigma, München |
| Einbettmedium für Gefrierschnitte | Jung, Nussloch |
| Eosin G-Lösung | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Fetales Bovines Serum | Biochrom AG, Berlin |
| First Strand Buffer, 5x | Roche, Mannheim |
| Formaldehyd | Roth, Karlsruhe |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Formamid | Roche, Mannheim |
| GF 109203X | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| Glukose | Roth, Karlsruhe |
| Glutamin | Biochrom, Berlin |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Guanidinhydrochlorid | Qiagen, Düsseldorf |
| Hämatoxylin-Lösung (4 g/l) | Merck, Darmstadt |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| Hybond™-C-Membran | Amersham, Braunschweig |
| Hybond™-N-Membran | Amersham, Braunschweig |
| Hybond™-P-Membran | Amersham, Braunschweig |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Isopropylthiogalaktosid (IPTG) | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Ketanest | Park Davis GmbH, Karlsruhe |
| Kollagen IV | Sigma, München |
| Lactacystin | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| Ligationspuffer, 10x | Roche, Mannheim |
| Lithiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Lysozym | Roche, Mannheim |
| Magnesiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Maleinsäure | Roth, Karlsruhe |
| β-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| Methylenblau | Merck, Darmstadt |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| MOPS | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| N-Lauroylsarcosin | Sigma, München |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma, München |
| Objekträger für Gefrierschnitte (Superfrost® Plus) | Menzel, Braunschweig |
| Objektkammerträger | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Oligo d(T) 15-Primer | Promega, Madison, USA |
| Orange G | Roth, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma, München |

| | |
|--|--|
| PBS für die Zellkultur | Biochrom, Berlin |
| PCR-Puffer, 10x | Roche, Mannheim |
| Peel-A-Way® disposable embedding molds T12 | Polysciences, Warrington, PA, USA |
| Penicillin | Biochrom, Berlin |
| Phenol | Roth, Karlsruhe |
| Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) | Sigma, München |
| Polaroidfilme | Polaroid, St. Albans, UK |
| Precision plus dual Proteingrößenmarker | BioRad, München |
| Retinolsäure, all trans (Vit.A) | Sigma, München |
| RNase Inhibitor | Roche, Mannheim |
| Ro-31-6045 | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| Rompun | Bayer, Leverkusen |
| Roti-Mark Prestained | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| SB202190 | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| SB202474 | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| SB203580 | Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Bad Soden |
| siPORT™ <i>Amine</i> , Transfektionsreagenz | Ambion Inc, Huntington, UK |
| siPORT™ <i>NeoFX</i> ™, Transfektionsreagenz | Ambion Inc, Huntington, UK |
| Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Trichlormethan (Chloroform) | Roth, Karlsruhe |
| Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan | Roth, Karlsruhe |
| Triton X | Sigma, München |
| TRIzol® | Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe |
| Ultra Pure Water | Biochrom, Berlin |
| 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-D-Galaktosid (X-Gal) | Roche, Mannheim |
| Xylencyanol | Roth, Karlsruhe |
| Xylol | Roth, Karlsruhe |
| Zellkulturgefäße | Biochrom, Berlin |
| | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellschaber | TPP, Trasadingen, Schweiz |

2.1.2 Enzyme

| | |
|--|-----------------|
| DNA-Restriktionsendonukleasen und Puffer | Roche, Mannheim |
| Reverse Transkriptase | Roche, Mannheim |
| RNase A | Roche, Mannheim |
| Taq-DNA-Polymerase | Roche, Mannheim |
| T4 DNA-Ligase | Roche, Mannheim |

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

| | |
|--|--|
| Anti-IkB α , aus Kaninchen | Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA |
| Anti-Ki67, aus Ziege | Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA |
| Anti-NF- κ B (p65), aus Kaninchen | Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA |
| Anti-p21, aus Maus | Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA |
| Anti-RIP1, aus Kaninchen | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-RIP2, aus Kaninchen | Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA |
| Anti-RIP2, aus Ratte | Alexis, Lörrach |
| Anti-RIP3, aus Kaninchen | ProSci Inc, Poway, USA |
| Anti-RIP4, aus Maus | Abnova, Taipei City, Taiwan |
| Anti- α -Tubulin, aus Maus | Sigma, München |
| Anti-Zytokeratin 10, aus Maus | Dako, Hamburg |

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

| | |
|--|--|
| anti-Digoxigenin-AP | Roche, Mannheim |
| Esel-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL) | Amersham, Braunschweig |
| Esel-anti-Ziege IgG, Cy2-gekoppelt | Dianova, Hamburg |
| Kaninchen-anti-Ziege IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL) | Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA |
| Maus-anti-Ratte IgG, FITC-gekoppelt | Dianova, Hamburg |
| Pferd-anti-Maus IgG, FITC-gekoppelt | Vector Lab, Burlingame, USA |
| Schaf-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL) | Amersham, Braunschweig |

| | |
|--|------------------|
| Ziege-anti-Kaninchen IgG, Cy2-gekoppelt | Dianova, Hamburg |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt | Dianova, Hamburg |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt | Dianova, Hamburg |

2.1.4 Wachstumsfaktoren und Zytokine

| | |
|--|----------------------------|
| Activin A | Boehringer, Mannheim |
| Epidermal growth factor (EGF) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Fibroblast growth factor 2 (FGF2) | Sigma, München |
| Interferon γ | Sigma, München |
| Interleukin-1 β (IL-1 β) | Boehringer, Mannheim |
| Keratinocyte growth factor (KGF) | PromoCell, Heidelberg |
| Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) | Boehringer, Mannheim |
| Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) | Roche, Mannheim |

2.1.5 Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden so gewählt, dass sie sowohl mit der murinen als auch mit der humanen Sequenz kompatibel waren. Die Synthese erfolgte durch die Firma BioTez, Berlin.

| | | |
|------------------|----|---|
| <u>Filaggrin</u> | 5' | 5'-CGCTGCAG TCT TTC CTC TAC CAG GTG AG-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC TAA TAG TAT CTC TGT GAC TG-3' |
| <u>Loricrin</u> | 5' | 5'- CGGGATCC TGG CTG TTT CTC CAG CGG TG |
| | 3' | 5'- CGGAATTC CGC TGC CAA TCC CGG AGG AG |
| <u>RIP1</u> | 5' | 5'-CGGGATCC GTC GGA CGT GTA CAG CTT TG-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC TCC TTT CCT CCT CTC TGT TG-3' |
| <u>RIP2</u> | 5' | 5'-CGGGATCC CTT GGC CAT TGA GAT TTC GC-3' |
| | 3' | 3'-CGGAATTC TGC AAA GGA TTG GTG ACA TC-3' |
| <u>RIP3</u> | 5' | 5'-CGGGATCC ATG TGG GCA GTG CTT GCT GG-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC GAG CTG GGA GGC TCC TCT AG-3' |
| <u>RIP4</u> | 5' | 5'-CGGGATCC GCC TGC CAG CAC GGG CAG GA-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC GGA ACT TGA GGC TCT GCA GG-3' |

Material und Methoden

| | | |
|---------------------------|----|---|
| <u>RIP5</u> | 5' | 5'-CGGGATCC GAG GAA GGT GGC CCA GGA AG-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC CCA TAT GGA TTG GTG TCC CC-3' |
| <u>Transglutaminase I</u> | 5' | 5'-CGGGATCC CCA ACA TGC GGG AGG ACA TC-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC CGC ACA GGC ACA AAC GAC TG-3' |
| <u>Zytokeratin 14</u> | 5' | 5'-CGGGATCC TTG AGAGCC TGA AGG AGG AG-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC GAG AAC TGG GAG GAG GAG AG-3' |
| <u>Zytokeratin 16</u> | 5' | 5'-CGGGATCC CCA ACG CCG ACC TGG AAG TG-3' |
| | 3' | 5'-CGGAATTC GCA ATC TCA TGC TCC AGC CG-3' |

2.1.6 Oligonukleotide (siRNAs)

| | |
|--|----------------------------|
| <i>silencer</i> [®] negative control #1 siRNA | Ambion Inc, Huntington, UK |
| <i>silencer</i> [®] Pre-designed siRNA: | Ambion Inc, Huntington, UK |
| - rip4-spezifische siRNA #1: ID 133160 | |
| - rip4-spezifische siRNA #2: ID 113612 | |
| - rip4-spezifische siRNA #3: ID 113613 | |

2.1.7 Plasmide

2.1.7.1 Vektoren

| | |
|--|------------------------|
| pBlueskript SKII(-) (Transkriptionsvektor) | Stratagene, Heidelberg |
|--|------------------------|

2.1.7.2 rekombinante Plasmide

| | |
|--------------------|------------------------------------|
| pCMV-SPORT6-mRIP2 | RZPD, Berlin |
| pCMV-SPORT6-hRIP3 | RZPD, Berlin |
| pCMV-SPORT6-mRIP3 | RZPD, Berlin |
| pCMV-SPORT6-mRIP4 | RZPD, Berlin |
| pBSKII(-)-Traf6 | Barbara Munz, Charité Berlin |
| pGEM-T-hInvolucrin | Sabine Werner, ETH Zürich, Schweiz |
| pGEM-T-hK10 | Sabine Werner, ETH Zürich, Schweiz |

2.1.8 „Kits“

| | |
|--|---------------------------------|
| BCA-Proteinbestimmungssystem | Pierce, Rockford, Illinois, USA |
| 5-Bromo-2'-Deoxyuridine Labeling and Detection Kit | Roche, Mannheim |
| DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) | Roche, Mannheim |
| Qiagen Plasmid Purifikation Kit | Qiagen, Düsseldorf |
| QIAexII Kit | Qiagen, Düsseldorf |
| QIAquick Kit | Qiagen, Düsseldorf |
| RNeasy Kit | Qiagen, Düsseldorf |
| Silencer siRNA Transfection Kit | Ambion, Huntington, UK |

2.1.9 Bakterienstämme

| | |
|----------------------|------------------------|
| E. coli XL1 blue MRF | Stratagene, Heidelberg |
|----------------------|------------------------|

2.1.10 Eukaryontische Zelllinien

| | |
|-------|---|
| HaCaT | humane adulte Keratinozyten, Petra Boukamp, DKFZ Heidelberg |
| NHEK | Normale humane ektodermale Keratinozyten, aus Vorhaut isoliert, Gibco (Invitrogen), Karlsruhe |

2.1.11 Standardpuffer und Lösungen

| | | |
|----------------|---|-------------|
| <u>PBS</u> | NaCl | 140 mM |
| | KCl | 30 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 6,5 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,4 mM |
| <u>TAE</u> | Tris-Acetat | 0,04 M |
| | EDTA | 0,1 mM |
| <u>TBST</u> | NaCl | 0,15 mM |
| | Tris-HCl pH 8,0 | 10 mM |
| | Tween 20 | 0,05% (v/v) |
| <u>20x SSC</u> | NaCl | 3 M |
| | Na ₃ Citrat | 0,3 M |
| RNase A | 100mg Enzym wurden in 10ml Wasser gelöst, 15 min auf 95°C erhitzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert | |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten HaCaT Zellen erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), versetzt mit 10% fetalem bovinem Serum (FBS) und Penicillin/Streptomycin (je 100U/ml). Die Gewebekulturflaschen und -schalen wurden sämtlich bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und 5%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Nach Erreichen vollständiger Konfluenz wurden die Zellen jeweils passagiert, hierfür wurden sie nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen, zur Ablösung mit Trypsin/EDTA überschichtet, 5 min bei 37°C inkubiert und mit einem Zellschaber vom Untergrund abgetrennt. Nach Zentrifugation und Resuspension in frischem Medium erfolgte die Aufteilung auf Kulturflaschen bzw. -schalen und die Weiterkultivierung.

Die Routinekultur der verwendeten primären Keratinozyten erfolgte im speziellen Medium der Firma Gibco (*defined* K-SFM), versetzt mit den separat gelieferten Supplementen sowie Penicillin/Streptomycin (je 20U/ml). Sämtliche verwendeten Kulturgefäße wurden zuvor mit 1 µg/cm² humanem Kollagen IV entsprechend den Angaben des Herstellers beschichtet. Die weitere Kultivierung erfolgte analog derjenigen der HaCaT-Zellen, mit der Abweichung, dass die primären Keratinozyten bereits vor dem Erreichen der 80%igen Konfluenz passagiert wurden. Versuche erfolgten jeweils lediglich mit Zellen der Passagen drei bis vier.

| | | |
|----------------------|------------------|--------|
| Trypsin/EDTA: | ultra pure water | 1x |
| | Trypsin (w/v) | 0,05% |
| | EDTA | 0,02 M |

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert, in Einfriergefäße (Kryotubes) überführt, langsam abgekühlt und bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

| | | |
|------------------------------|---------------------------------------|-----|
| Einfriermedium HaCaT: | DMEM | 1x |
| | FBS | 20% |
| | DMSO | 10% |
| Einfriermedium NHEK: | <i>defined</i> K-SFM + Supplemente | 1x |
| | DMSO | 10% |

Zur Wiederaufnahme der Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 20 ml Standardmedium gewaschen und entsprechend den jeweilig genannten Kultivierungsbedingungen behandelt.

2.2.1.2 *Behandlung eukaryontischer Zellen mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren*

Für die Durchführung von Induktionsversuchen an Zellen wurden diese bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz in 10cm bzw. 6cm-Schalen kultiviert. Zur Erreichung einer zellulären Quieszenz wurde 16h vor der Behandlung mit den jeweiligen Faktoren das Kulturmedium abgenommen und durch serum- bzw. supplementfreies Kultivierungsmedium ersetzt.

Zur Induktion wurden die jeweiligen Faktoren diesem Medium dann in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt.

2.2.1.3 *Mechanische Verletzung kultivierter Zellen*

Die Zellen wurden in 6-cm Kulturschalen bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz kultiviert und durch oben genannte Behandlung in einen Ruhezustand gebracht. Mittels Skalpellklinge wurden rasterförmige Inzisionen in die gesamte Schalenfläche gesetzt. Zur Standardisierung wurde jeweils eine Schablone mit entsprechendem Raster untergelegt, die Kantenlänge des erzeugten Gitters betrug 1mm.

2.2.1.4 *Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA*

Zur gezielten Inaktivierung der endogenen rip4-mRNA wurden die Zellen mit rip4-siRNA (Ambion, Huntington, UK) transfiziert. Die Transfektion erfolgte an 60-80% konfluenten Zellen in geeigneten Kulturgefäßen (Schalen zur RNA/Protein-Isolierung, bzw. Kammerobjektträger für das BrdU-Labeling). Als Transfektionsreagenz diente siPORT *NeoFX*TM (Ambion, Huntington, UK) in einer Endkonzentration von 5-8 µl/ml. Nach 15-minütiger Inkubation des Transfektionsreagenz in 100µl DMEM (serum- und antibiotikafrei) bei RT wurde diesem die zuvor ebenfalls in 100µl DMEM (serum- und antibiotikafrei) suspendierte siRNA (Endkonzentration 100nM) zugesetzt und zur Komplexierung weitere 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe des Ansatzes zu den Zellen erfolgte anschließend während des Aussäens der Zellen in die jeweiligen Kulturgefäße.

Nach 8- bis 12-stündiger Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch frisches, unbehandeltes ersetzt, je nach Fragestellung versetzt mit 10% FBS.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E.coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E.coli*-Stämmen in Flüssigkultur erfolgte durch Inkubation in mit Antibiotikum versetztem LB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37°C.

| | | |
|----------------------|---------------------|-----------|
| LB-Medium: | Bacto-Trypton (w/v) | 1% |
| | Hefeextrakt (w/v) | 0,5% |
| | NaCl (w/v) | 1% |
| Antibiotikum: | Ampicillin | 100 µg/ml |

Die Anzucht von *E.coli*-Kulturen auf LB-Agarplatten erfolgte ebenfalls mittels Inkubation über Nacht bei 37°C.

Zur Herstellung der Platten wurde LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Agar versetzt, nach dem Autoklavieren auf etwa 50°C abgekühlt, mit Antibiotikum versetzt und anschließend in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien des Stammes XL1 Blue MRF erfolgte mit einer frischen Übernachtskultur, welche zunächst 1:100 mit LB-Medium verdünnt und dann so lange unter Schütteln bei 37°C inkubiert wurde, bis eine Absorption von 0,4-0,5 bei 620nm erreicht war. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 2.500Upm) wurde das Sediment vorsichtig in einem Viertel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Magnesiumchloridlösung resuspendiert, 30min auf Eis inkubiert und nach erneuter Zentrifugation in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Kalziumchloridlösung resuspendiert und weitere 3-4h im Eisbad inkubiert.

Abschließend wurde steriles 87%iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 30% zugegeben, die Lagerung der Zellen erfolgte dann aliquotiert bei -80°C.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Transformation von *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Amplifikation rekombinanter Plasmide wurden diese in transformationskompetente *E.coli*-Bakterien des Stammes XL1 Blue MRF eingebracht.

Als Transformationsansatz dienten jeweils 200 µl dieser langsam im Eisbad aufgetauten *E.coli*-Bakterien und eine geeignete Menge Plasmid-DNA (0,1-0,5 µg). Der Ansatz wurde zunächst sofort vorsichtig durchmischt, anschließend mindestens 30 Minuten im Eisbad inkubiert und dann einem Wärmeschock (90 sec., 42°C) unterzogen. Nach weiterer 5-minütiger Inkubation im Eisbad wurden 600 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und unter Schütteln 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend in verschiedenen Volumina auf drei LB-Agarplatten verteilt, ausgestrichen und 16-20h bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden nachfolgend in antibiotikahaltiges LB-Flüssigmedium überführt und weitere 16-20h bei 37°C im Schüttler kultiviert.

Wurde die Methodik des „Blau/Weiß-Screenings“ zur Evaluierung der Klonierungseffizienz angewandt, wurden zuvor mit X-Gal (100µl) und IPTG (40µl) beschichtete LB-Agarplatten verwendet und weitere Arbeitsschritte erfolgten lediglich mit weißen, inserthaltigen Kolonien.

X-Gal- Stammlösung: 2% X-Gal (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid) in 100% Dimethylformamid (DMF) (w/v)

IPTG- Stammlösung: 0,1M IPTG in H₂O

2.2.3.2 Reinigung von Nucleinsäuren mittels Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolfällung

Zur Aufreinigung wässriger Nucleinsäure-Extrakte von Proteinen, Lipiden und weiteren Verunreinigungen wurden diese einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung unterzogen.

Hierfür wurden die RNA- bzw. DNA-Lösungen zunächst mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (pH 7,5) gemischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000 Upm, 1min, RT). Mittels anschließender Chloroformextraktion wurden eventuelle Phenolreste entfernt, nach erneuter Zentrifugation wurden die in der wässrigen Phase löslichen Nucleinsäuren mit dem 2,5fachen Volumen 100%igen Ethanol und dem 0,1-fachen Volumen einer 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2) 30min bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (13.000 Upm,

20 min, 4°C) sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in einer geeigneten Menge DEPC-behandeltem Wasser (pH 7,5-8,0) aufgenommen.

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Phenol/Chloroform, pH 7,5: | 4,5 Volumina | Phenol |
| | 4,5 Volumina | Chloroform |
| | 1 Volumen | 1M Tris-HCl pH 9,5 |

DNA wurde alternativ zu der beschriebenen Phenol/Chloroformextraktion mittels QIAquick-Kit der Firma Qiagen (Düsseldorf) entsprechend den Angaben des Herstellers gereinigt

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das den Konzentrationsbestimmungen zugrunde liegende Prinzip basiert auf dem spezifischen Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260nm.

Sämtliche Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurden im Spektralphotometer (Ultraspec 2100pro, Amersham) in Quarzküvetten durchgeführt, zum Abgleich des Photometers (Blindwert) wurde zunächst die Absorption DEPC-behandelten bzw. destillierten Wassers gemessen. Als Maßstab für die Reinheit der Nukleinsäurelösungen wurde das Verhältnis der Absorption bei 260nm zu derjenigen bei 280nm herangezogen, als Optimum galt der Wert von 1,8 (DNA) bzw. 1,8 - 2,0 (RNA).

2.2.3.4 Präparation von DNA

2.2.3.4.1 Plasmid-Schnellpräparation von 2ml-Kulturen

Diese Methode diente der schnellen Gewinnung von Plasmid-DNA in geringeren Mengen, in erster Linie zum Einsatz im analytischen Maßstab.

Nach Zentrifugation von 2 ml LB-Übernachtskultur (13.000 Upm, 30 sec, RT) wurde das Sediment in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung II wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden zur Neutralisation 100 µl Lösung III zugegeben und der gesamte Ansatz für 5 min im Eisbad inkubiert. Während dieser Inkubation aggregierte die denaturierte chromosomale DNA mit Proteinen und Lipiden zu einem unlöslichen Präzipitat, während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer *supercoil*-Struktur in der Lage war, zu renaturieren, und sich daher im Überstand befand. Letzterer wurde nach

Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, 4°C) abgenommen, einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen und die DNA mit absolutem Ethanol präzipitiert. Die gefällte DNA wurde nach Zentrifugation (13.000 Upm, 15 min, 4°C) in 100 µl wässriger RNase A-Lösung (100 µg/ml) aufgenommen, wovon in der Regel 10 µl für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt wurden.

| | | |
|-------------------|-----------------------|---------|
| Lösung I | Glucose | 50 mM |
| | EDTA | 10 mM |
| | Tris-HCl pH 8,0 | 25 mM |
| | Lysozym | 2 mg/ml |
| Lösung II | SDS | 1% |
| | NaOH | 0,2 M |
| Lösung III | Natriumacetat, pH 4,8 | 3M |

2.2.3.4.2 Plasmid-Präparation mit dem QIAGEN-Plasmidkit

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA größeren Maßstabs wurde diese aus 100 ml einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur mit Hilfe des *Plasmid purification Maxi Kits* der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3.5 **Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

2.2.3.5.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte üblicherweise in 1-2%igen, die Auftrennung gesamtzellulärer RNA in 1%igen Agarosegelen, jeweils in TAE, wobei die Agarosegele standardgemäß 1 µg Ethidiumbromid pro ml Gel enthielten. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen Auftragspuffer versetzt, die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße und Agarosekonzentration bei 40-140 V. Die Gele wurden im UV-Durchlicht (256nm) betrachtet und mit einer Polaroidkamera (Blende 16, 0,5 sec, Filmempfindlichkeit 3000 ASA, Rotfilter) fotografiert.

| | | |
|----------------------------|----------------|-------------|
| 10x Auftragspuffer: | Saccharose | 40% (w/v) |
| | Bromphenolblau | 0,25% (w/v) |
| | Xylencyanol | 0,25% (w/v) |
| | Orange G | 0,25% (w/v) |

2.2.3.5.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde standardmäßig das QIAexII-Kit der Firma Qiagen (Düsseldorf) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.6 *In vitro*-Reaktionen an Nucleinsäuren

2.2.3.6.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNA durch entsprechende Endonukleasen erfolgten unter den vom Hersteller (Roche, Mannheim) empfohlenen Reaktionsbedingungen. Üblicherweise wurden 0,5-1 Einheit Enzym pro µg DNA eingesetzt.

2.2.3.6.2 Ligation

Für eine effiziente Ligation ist ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:3 bis 1:4 bei „überhängenden“ und 1:10 bei „stumpfen“ Enden zwischen Vektor und einzufügendem DNA-Fragment optimal. Entsprechende Mengen des Vektors und des zuvor über ein präparatives Agarosegel aufgereinigten Fragments wurden zunächst auf Eis in Ligationspuffer aufgenommen, wobei das Volumen des Gesamtansatzes maximal 20 µl betrug. Nach Zugabe von 1U T4-DNA-Ligase folgte eine 16-stündige Inkubation bei RT.

2.2.3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerasekettenreaktion ist es möglich, spezifische DNA-Fragmente unter Verwendung von geeigneten Oligodesoxynukleotid-Primern aus einer DNA-Matrize zu amplifizieren. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl in sterilen Reaktionsgefäßen.

| | | |
|-------------------------|---------------------|---------|
| Reaktionsansatz: | DNA-Matrize (cDNA) | 2,0 µl |
| | 10x Puffer | 5,0 µl |
| | dNTP-Mix (2,5) mM | 8,0 µl |
| | 5'-Primer (20 µM) | 2,5 µl |
| | 3'-Primer (20 µM) | 2,5 µl |
| | ddH ₂ O | 33,8 µl |
| | Taq-Polymerase (1U) | 0,2 µl |

Die Reaktion erfolgte nach dem im folgendem beschriebenen Temperaturprogramm im PCR-Gerät *Primus evolution 25/96* (Clemens GmbH). Es wurde stets eine Kontrolle mit sämtlichen oben aufgeführten Komponenten außer der DNA-Matrize mitgeführt, um Verunreinigungen der Reagenzien oder Reaktionsgefäße ausschließen zu können.

| | | |
|-------------------------------|-----------|---------|
| Denaturieren | 1 min | 94°C |
| „Annealing der Primer“ | 1 min | 40-60°C |
| Polymerisation | 0,5-1 min | 72°C |

Die Amplifikationszeit richtete sich nach der Länge des zu erwartenden Produktes, wobei davon ausgegangen wurde, dass pro 1kb zu synthetisierender DNA etwa 1 min benötigt wird. Im Allgemeinen wurden 30 Zyklen durchlaufen, nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgte eine weitere 10minütige Inkubation der Reaktionsansätze bei 72°C während derer die Enden unvollständig synthetisierter Fragmente gegebenenfalls aufgefüllt wurden.

2.2.4 RNA-Techniken

2.2.4.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA

Zur Vermeidung der Degradation von RNA durch RNasen wurden für sämtliche Arbeitsschritte sterile Plastikgefäße oder gebackene (200°C, 8h) Glasgefäße verwendet. Um Lösungen von RNasen zu befreien, wurde diesen grundsätzlich 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugesetzt. Nach mindestens 16-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert.

Tris-haltige Lösungen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur nicht mit DEPC behandelt werden dürfen, wurden in autoklavierten Gefäßen mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.

2.2.4.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus kultivierten eukaryontischen Zellen

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Kits der Firma Qiagen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers.

2.2.4.3 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe

Gewebeproben, aus denen RNA isoliert werden sollte, wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Zur Isolierung der gesamtzellulären RNA wurde nachfolgend mit dem TRIzol® Reagenz der Firma Invitrogen gearbeitet. Bis zu 100 mg des gefrorenen Gewebes wurde zunächst mit einem ml des Reagenz überschichtet und zügig im *Ultra Turrax* fein zerkleinert. Unlösliches Material wurde nachfolgend abzentrifugiert (12.000g, 10 min, 4°C) und der RNA-, Protein- und DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden pro Ansatz 200 µl Chloroform zugegeben und 15 sec gut geschüttelt. Nach weiterer 3-minütiger Inkubation bei RT erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation (12.000 Upm, 15 min, 4°C). Die obere, wässrige, RNA-enhaltende Phase wurde abgenommen und diente der Weiterverarbeitung. Die DNA-enhaltende Phenol/Chloroform- sowie die Protein-enhaltende Interphase wurden zur späteren Weiterverarbeitung vorübergehend bei -80°C gelagert. Die Präzipitation der RNA erfolgte nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und einer 10-minütigen Inkubation bei RT. Nach Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4°C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in einem ml 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (7.500 g, 5 min, 4°C) und abschließend für 5-10 min bei RT getrocknet. Die Aufnahme des RNA-Sediments erfolgte dann in einer geeigneten Menge DEPC-behandelten Wassers.

2.2.4.4 Herstellung von RNA-Sonden

Die verwendeten RNA-Sonden wurden sämtlich im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Generiert wurden diese unter Verwendung von jeweils spezifischen Plasmiden, die entweder bereits zur Verfügung standen, oder zunächst hergestellt wurden. Hierfür wurde die gewünschte Sequenz zunächst mit speziell entworfenen Primern aus einem cDNA-Gemisch über PCR amplifiziert, gereinigt und nachfolgend mittels Standard-Klonierungstechniken in einen geeigneten Klonierungsvektor eingefügt. Nach Linearisierung der jeweiligen Plasmide durch ein geeignetes Restriktionsenzym wurde der Ansatz zur Aufreinigung der DNA-Matrize einer Phenol/Chloroformextraktion mit nachfolgender Ethanol-fällung unterzogen. Für die nachfolgende *in vitro*-Transkription in *antisense*-Orientierung wurde nach 5-minütigem Erhitzen auf 65°C jeweils 1 µg dieser DNA eingesetzt. In Abhängigkeit vom der Orientierung der Sequenz innerhalb des Plasmides wurde jeweils eine geeignete RNA-Poymerase (T7, T3, SP6) verwendet. Das weitere Vorgehen entsprach den Empfehlungen des Herstellers des verwendeten *Dig RNA labeling kits*.

2.2.4.5 Northern Blot

Innerhalb einer Versuchsreihe zu vergleichende Proben von 0,5 bis 8 µg gesamtzellulärer RNA wurden zunächst jeweils auf gleiche Volumina gebracht, je mit 10 µl Ladepuffer versetzt, 2min bei 85°C erhitzt und auf ein vertikales, etwa 1,5 cm dickes 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 100V (40-50mA) während 1-1,5h, anschließend wurde das Gel für 5min in 20xSSC geschwenkt. Der Transfer auf eine zuvor mit 20xSSC äquibrierte Nylon-Hybrid-N-Membran erfolgte über Nacht mittels vertikalem Kapillarblotverfahren, als Trägersubstanz diente 20xSSC. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte nach 2minütigem Schwenken in 2xSSC unter 1minütiger UV-Bestrahlung (120mJoule). Die anschließende reversible Färbung der Membran in Methylenblaulösung (0,5M NaAc pH 5,2; 0,04% Methylenblau) und Entfärbung in DEPC-H₂O erlaubte zum einen die Beurteilung der RNA bezüglich gleichmäßig aufgetragener Mengen und eventueller Degradation, zum anderen erfolgte die Markierung der markanten 18S- und 28S-rRNA-Banden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nachfolgend zunächst mindestens 1h bei 68°C in Hybridisierungslösung prähybridisiert, die Hybridisierung mit der Digoxigenin-gekoppelten RNA-Sonde erfolgte nach Zugabe zu dem Puffer über Nacht ebenfalls bei 68°C.

| | | |
|------------------------------|--------------------------|---------|
| Ladepuffer : | Formamid | 720 µl |
| | Formaldehyd | 260 µl |
| | 10x MOPS | 160 µl |
| | 80% Glycerol | 100 µl |
| | Bromphenolblau | 80 µl |
| | DEPC-H ₂ O | 180 µl |
| Agarosegel: | Agarose MP | 1,0 g |
| | DEPC-H ₂ O | 84,6 ml |
| | 10xMOPS | 10,0 ml |
| | Formamid | 5,4 ml |
| Laufpuffer | 1x MOPS | |
| Hybridisierungslösung | Formamid | 50% |
| | 20x SSC | 5x |
| | 10% Blocking Solution | 2% |
| | 20% N-L-sarcosine | 0,1% |
| | 10% SDS | 0,02% |
| | in DEPC-H ₂ O | |

Nach anschließendem dreimaligem, je 5minütigem Waschen in 2xSSC, 0,1% SDS bei RT, zweimaligem je 20minütigem Waschen in 0,1x SSC, 0,1% SDS bei 68°C im Hybridisationsbeutel und 5minütigem Waschen in Puffer 1, erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran in 1%iger Blockierungslösung. Nach Zugabe des Digoxigenin-Antikörpers (Fab-Fragment, Peroxidase gekoppelt, 1:15.000) und 30minütiger Inkubation wurde die Membran dreimal 15min in mit 0,03% Tween20 versetztem Puffer 1 und 5min in Puffer 3 gewaschen (sämtlich bei RT). Nach 5minütiger Inkubation mit dem Chemilumineszenzsubstrat (CDP-Star, 1:100 in Puffer 3 verdünnt) wurde für 0,5 bis 10 Minuten ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

| | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Waschlösung1: | 20x SSC | 50 ml |
| | 10% SDS | 5 ml |
| | DEPC-H ₂ O | 445 ml |
| Waschlösung 2: | 20x SSC | 2,5 ml |
| | 10% SDS | 5 ml |
| | DEPC-H ₂ O | 492,5 ml |
| Puffer 1: | Maleinsäure | 11,6 g |
| | NaCl | 8,75 g |
| | DEPC-H ₂ O | ad 1 l |
| | NaOH | ad pH 7,5 |
| Puffer 3: | 1M Tris pH 9,5 | 5 ml |
| | 5M NaCl | 1 ml |
| | 5M MgCl ₂ | 0,5 ml |
| | DEPC H ₂ O | 43,5 ml |

2.2.4.5.1 Umschreibung von RNA in cDNA mittels reverser Transkription

cDNA aus eukaryontischen Zellen oder Geweben wurde mittels reverser Transkription gesamtzellulärer RNA gewonnen. 5 µg RNA, gelöst in 7 µl DEPC-H₂O, wurden mit 1 µl Oligo(dT)₁₅-Primer (0,5 µg) gemischt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe des RT-Mixes wurde der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert und nachfolgend 5 min auf 95°C erhitzt.

| | | |
|----------------|---------------------------------|------|
| RT-Mix: | 5x Puffer (first strand buffer) | 4 µl |
| | dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM) | 4 µl |
| | RNAsin | 2 µl |
| | Reverse Transkriptase (200 U) | 1 µl |

2.2.5 Proteinchemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

2.2.5.1.1 Herstellung von Zytosollysaten

Nach Abnahme des Mediums und dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Kulturgefäße sofort auf Eis gestellt, mit 100-500µl eiskaltem Lysispuffer inklusive Proteaseinhibitoren überschichtet und für 10min unter leichtem Schwenken auf Eis inkubiert, wobei die nicht lysierten Zellkerne an den Kulturschalen haften blieben. Nach Abnahme von der Kulturschale wurde das Lysat zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (13.000UpM, 4°C, 5min) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.1.2 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die Zellen wurden zunächst entsprechend der gewöhnlichen Kultivierungsmethode mit PBS gewaschen, trypsinisiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet dreimal mit kaltem PBS gewaschen und abschließend in 100-500µl eiskaltem Lysispuffer inklusive Proteaseinhibitoren resuspendiert. Nach mehrmaliger kurzer Ultraschallbehandlung zur Aufschließung der Zell- und Zellkernmembranen und zur Fragmentierung der chromosomalen DNA wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (13.000UpM, 4°C, 5min) und der Überstand ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Zur Isolierung des Proteins aus Gewebeproben wurde zunächst wie unter 2.2.4.3 beschrieben vorgegangen. Aus der verbleibenden, RNA-freien Phenol-Chloroform- und Interphase wurde dann zunächst die DNA durch Zugabe von 300 µl reinem Ethanol, 3-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (2.000 g, 5 min, 4°C) gefällt. Das Sediment wurde nun bei -80°C zur eventuellen weiteren Verarbeitung gelagert, während mit dem proteinhaltigen Phenol-Ethanol-Überstand weitergearbeitet wurde. Nach Zugabe von je 1,5 ml Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei RT wurde das Protein unter Zentrifugation (12.000 g, 10min, 4°C) präzipitiert. Nachfolgend wurde das Sediment jeweils dreimal mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol gewaschen, wobei vor der Zentrifugation (7.500 g, 5 min, 4°C) jeweils eine 20-minütige Inkubation bei RT erfolgte. Abschließend wurde das Sediment in 2 ml reinem Ethanol aufgenommen, gevortext und nach weiterer 20-minütiger Inkubation bei RT abzentrifugiert (7.500 g, 5 min, 4°C). Nach Abnahme des Überstandes und 10- bis 15-minütigem Trocknen bei RT wurde das Sediment in 1% SDS inklusive Proteaseinhibitoren aufgenommen.

Gegebenenfalls erfolgte nach weiterer Inkubation bei 50°C eine weitere Zentrifugation (10.000 g, 10 min, 4°C) zur Fällung unlöslichen Materials, in diesem Fall wurde das Proteinlysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *BCA™ Protein assay Kit* der Firma Pierce entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.5.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der jeweiligen Proteinlysate wurden diese nach Denaturierung zunächst mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli ^[65] (Glycin als Zwitterion) gearbeitet, wobei die Elektrophorese in vertikaler Richtung in Gelen von ca. 1,5mm Dicke erfolgte. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem geeigneten Volumen Proben-Auftragspuffer (5x konz.) versetzt, anschließend 5min im Heizblock auf 95°C erhitzt und unmittelbar danach auf das Gel aufgetragen.

Die Gele bestanden aus einem jeweils ca. 1,5cm breitem Sammelgel, sowie einem sich daran anschließenden, ca. 5cm breiten Trenngel, dessen Polyacrylamidkonzentration in Abhängigkeit zur Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 7,5% und 15% variierte.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei maximal 35mA, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte (etwa 1,5 bis 2h).

Zusammensetzung des Trenngels:

| Acrylamid-Konzentration | 7,5% | 10% | 12,5% | 15% |
|---------------------------------|-------------|------------|--------------|------------|
| Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8) | 1,5 ml | 2 ml | 2,5 ml | 3 ml |
| 1M Tris-HCl pH 8,8 | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |
| 10% (w/v) SDS | 80 µl | 80 µl | 80 µl | 80 µl |
| 87% (v/v) Glycerin | 900 µl | 900 µl | 900 µl | 900 µl |
| H ₂ O | 3,9 ml | 3,4 ml | 2,9 ml | 2,4 ml |
| 10% (w/v) APS | 80 µl | 80 µl | 80 µl | 80 µl |
| TEMED | 4 µl | 4 µl | 4 µl | 4 µl |

Zusammensetzung des Sammelgels:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) | 750 µl |
| 1M Tris-HCl pH 6,8 | 750 µl |
| 10% (w/v) SDS | 60 µl |
| H ₂ O | 4,4 ml |
| 10% (w/v) APS | 60 µl |
| TEMED | 4 µl |

Proben-Auftragspuffer (5x konz.):

| | |
|-------------------|-----------|
| Glycerin | 50% |
| SDS | 7,5 g/l |
| Tris-HCl pH 8,0 | 250 mM |
| Bromphenolblau | 0,5 mg/ml |
| β-Mercaptoethanol | 12,5% |

SDS-PAGE-Laufpuffer:

| | |
|--------|--------|
| Tris | 25 mM |
| Glycin | 192 mM |
| SDS | 0,1% |

2.2.6 Immunologische Methoden**2.2.6.1 Western Blot**

Diese Methode diente dem spezifischen Nachweis von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe von Antikörpern. Der zunächst notwendige Transfer der Proteine auf eine geeignete Membran (*Blot*) erfolgte elektrisch unter Verwendung einer halbtrockenen (*semidry*) Blotapparatur. Zur Beurteilung der Transfereffizienz wurde die Membran anschließend mit Ponceau S gefärbt und mit 0,1%iger Essigsäure entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nachfolgend zunächst mit einer hochprozentigen Proteinlösung und anschließend mit dem in geeigneter Weise verdünnten ersten, proteinspezifischen Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines enzymgekoppelten zweiten Antikörpers, wobei das Enzym eine geeignete Nachweisreaktion katalysiert.

Transfer:

Auf die mit Wasser benetzte Anode der Blotapparatur wurden zunächst sechs Lagen in Anodenpuffer 1 (300mM Tris, 20% Methanol), sowie vier in Anodenpuffer 2 (25mM Tris, 20% Methanol) getränkte Lagen Chromatographiepapier gelegt. Es folgte die Auflage der zuvor mit Methanol, Wasser und Anodenpuffer 2 äquibrierten PVDF-

Membran bzw. der mit Wasser und Anodenpuffer 2 äquibrierten Nitrozellulose-Membran und des in Kathodenpuffer (25mM Tris, 20% Methanol, 40mM ϵ -Aminocaprönsäure) geschwenkten Trenngels sowie von sechs Lagen in Kathodenpuffer getränkten Chromatographiepapiers, worauf die ebenfalls mit Wasser benetzte Kathode aufgelegt wurde. Der Transfer erfolgte unter einer Stromstärke von 1-2 mA/cm² während 45-120 Minuten.

Inkubation mit den Antikörpern:

Sämtliche Inkubationen erfolgten unter leichtem Schwenken bei RT, lediglich Inkubationen über Nacht erfolgten bei +4°C.

| | |
|-------------------------------|---|
| Absättigung: | 1,5-4% Milchpulver in TBST, 30min |
| Primärer Antikörper: | Geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver in TBST, 2-16h |
| Waschen: | 3x 15min in TBST |
| Sekundärer Antikörper: | Geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver in TBST, 30min |
| Waschen: | 3x 15min in TBST |

| | | |
|-------------|-------------|-------------|
| TBST | NaCl | 0,15M |
| | Tris pH 8,0 | 10mM |
| | Tween 20 | 0,05% (v/v) |

Entwicklung:

ECL: Prinzip: Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) durch Wasserstoffperoxid, wodurch 3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht (425 nm) freigesetzt, wodurch eine Detektion anhand der Schwarzfärbung eines Röntgenfilms möglich ist.

Es wurde mit einem entsprechenden Kit (*ECL-Protein detection kit*) der Firma Amersham nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

2.2.6.2 Immunzytochemie

Zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation bestimmter Proteine wurden diese mittels Immunfluoreszenz *in situ* nachgewiesen. Für den Nachweis in kultivierten Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit einem auf -20°C abgekühlten 1:1-Gemisch aus Methanol und

Aceton fixiert. Nach dem Trocknen konnten die Präparate bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert werden. Vor dem Immunfluoreszenz-Nachweis wurden die Schalen zunächst kurz mit PBS äquilibriert, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 30 min mit 1 bis 5%BSA/TBST überschichtet und anschließend mit dem in geeigneter Weise in 1%BSA/TBST verdünnten ersten Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem, je 10-minütigen Waschen in TBST wurde der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte zweite Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in 1 bis 5%BSA/TBST aufgetragen. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten ab diesem Schritt unter Lichtausschluss. Nach weiterer 30- bis 45-minütiger Inkubation erfolgte erneut dreimaliges, je 10-minütiges Waschen in TBST. Abschließend wurden die Präparate eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer für den verwendeten Farbstoff geeigneten Wellenlänge betrachtet und gegebenenfalls photographiert.

Der spezifische Nachweis proliferierender Zellen erfolgte unter Verwendung des *BrdU labeling kit* der Firma Roche entsprechend den Angaben des Herstellers.

| | |
|-----------------------|------------------|
| Eindeckmedium: | 10% Glycerol |
| | 10% 10xPBS |
| | 80% dest. Wasser |

2.2.6.3 Immunhistochemie

Für den Immunfluoreszenz-Nachweis von Proteinen auf Gefrierschnitten wurden diese zunächst 10 min bei -20°C mit entsprechend vorgekühltem Ethanol oder einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Aceton fixiert. Paraffinschnitte wurden zunächst nach folgendem Schema entparaffiniert:

| | |
|---------------------|------------------|
| Xylol | 5 min |
| Xylol | 5 min |
| 100% Ethanol | 1 min |
| 100% Ethanol | 1 min |
| 96% Ethanol | 1 min |
| 80% Ethanol | 1 min |
| 70% Ethanol | 1 min |
| 50% Ethanol | 1min |
| dest. Wasser | Mindestens 2 min |

Das weitere Vorgehen entsprach im Wesentlichen der unter 2.2.6.2 genannten Behandlung.

2.2.7 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.7.1 Generierung von Exzisionswunden

Für die Wundheilungsexperimente, welche in Kollaboration mit dem Labor von Sabine Werner, ETH Zürich erfolgten, wurden weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 2,5 bis 4 Monaten verwendet. Die Tiere wurden zunächst durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketanest/Rompun (100 µg/g Körpergewicht / 5 µg/g KW) anästhesiert. Anschließend wurde das Rückenfell mit einer Schere vorsichtig entfernt und die Haut mit 70% Ethanol desinfiziert. Auf dem Rücken jeder Maus wurden zwei bis sechs Exzisionswunden generiert, wobei sämtliche Hautschichten sowie der *panniculus carnosus* durchtrennt wurden. Jede Wunde hatte einen Durchmesser von ca. 0,5 cm, der Abstand zueinander betrug jeweils ca. 1 cm. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung wurden die Tiere getötet und die Wunden isoliert, wobei jeweils ungefähr 2 mm der epithelialen Ränder präpariert wurde ^[146].

2.2.8 Histologische Methoden

2.2.8.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden unfixierte Gefrierschnitte angefertigt. Hierfür wurde das Gewebe sofort nach der Sektion auf Trockeneis in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebettet. Die weitere Aufbewahrung der Blöcke bis zum Anfertigen der Schnitte erfolgte bei -80°C. Am Kryostat wurden dann bei einer Kammertemperatur von -26°C und einer Trägertemperatur von -16°C Schnitte von 8-10 µm Dicke angefertigt und je nach Bedarf auf adhäsiv beschichtete Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel) gezogen. Nach kurzem Trocknen bei RT erfolgte die weitere Aufbewahrung ebenfalls bei -80°C.

2.2.8.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Entnommenes Gewebe wurde unverzüglich in 4% PFA/PBS eingelegt und über Nacht fixiert. Nach verschiedenen, je 30 min bei 4°C durchgeführten Wasch- und Äquibrilierungsschritten (PBS, 0,9% NaCl, 50% Ethanol in 0,9% NaCl, 70% Ethanol in 0,9% NaCl) wurde das Gewebe nach dem von Hogan *et. al.* ^[46] angegebenen Protokoll in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden am Mikrotom 8 µm dicke

Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.8.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für die histologische Analyse wurden Gewebeschnitte standardgemäß mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Unfixierte Gefrierschnitte wurden zunächst für 30 min in 4%PFA/PBS eingelegt. Nach zweimaligem je 10-minütigem Waschen in PBS erfolgte die Färbung nach folgendem Schema:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Hämatoxylin-Lösung (4 g/l) | 45 sec |
| dest. Wasser | 10 sec |
| dest. Wasser | 10 sec |
| dest. Wasser | 10 sec |
| Leitungswasser | 30 sec |
| dest. Wasser | 10 sec |
| Eosin G-Lösung (0,5% wässrig) | 10 sec |
| dest. Wasser | 10 sec |
| 70% Ethanol | 10 sec |
| 80% Ethanol | 10 sec |
| 80% Ethanol | 10 sec |
| 95% Ethanol | 10 sec |
| 95% Ethanol | 10 sec |
| 100% Ethanol | 10 sec |
| 100% Ethanol | 10 sec |
| Xylol | 10 min |
| Xylol | 10 min |

Anschließend wurden die Schnitte wie unter 2.2.6.2 beschrieben eingedeckt und versiegelt.

3 Ergebnisse

3.1 Temporale und spatiale Expression der *rip*-Gene bei der Wundheilung der Haut

3.1.1 Expressionskinetik der *rip*-Gene nach Hautverwundung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst der Frage nachgegangen, in welchem Maße die einzelnen *rip*-Gene in der Haut überhaupt exprimiert sind. Hinzukommend stellte sich die Frage, ob und gegebenenfalls in welchem Heilungsstadium diese jeweilige basale Expression nach Hautverwundung reguliert wird. Zu diesem Zwecke wurden zunächst auf dem Rücken adulter Balb/c-Mäuse Exzisionswunden, die sämtliche Hautschichten sowie den *panniculus carnosus* umfassten, generiert. Die hierbei entnommene Haut wurde nachfolgend zur Analyse der intakten Haut verwendet und diente gleichermaßen als Vergleichskontrolle für die Werte nach Verwundung. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung, welche die gesamte Wundheilungsphase in geeigneten Intervallen abdeckten, wurden die entsprechenden Mäuse getötet und das Wundareal, inklusive eines 2mm messenden Randes epithelialen Gewebes entnommen und mittels der jeweiligen Fragestellung entsprechenden Methoden für die weiteren Untersuchungen präpariert. Zur Untersuchung der Expressionskinetik wurden *Northern Blot*-Analysen mit isolierter gesamtzellulärer RNA durchgeführt.

Die jeweiligen Sonden für die einzelnen Genexpressionsanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Hierfür standen entweder bereits geeignete Plasmide zur Verfügung oder die gewünschte Sequenz wurde zunächst mit speziell entworfenen Primern aus einem cDNA-Gemisch über PCR amplifiziert, gereinigt und nachfolgend mittels Standard-Klonierungstechniken in einen geeigneten Klonierungsvektor eingefügt. Nach Linearisierung diente dieses Konstrukt als Matrize für eine *in vitro*-Transkription in *antisense*-Orientierung durch eine geeignete RNA-Polymerase.

Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Genexpressionsanalysen wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Gezeigt sind jeweils repräsentative Ergebnisse.

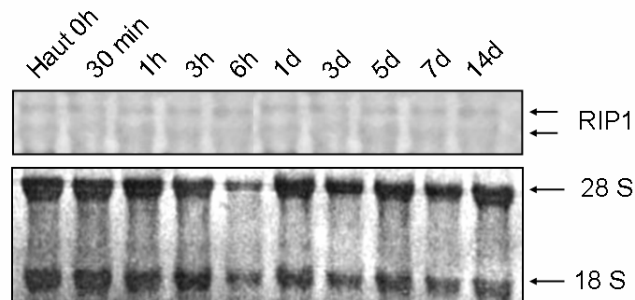


Abb. 7: Darstellung der *rip1*-Genexpression in unverwundeter muriner Haut und im Heilungsverlauf muriner Exzisionswunden. Auf dem Rücken von Balb/c-Mäusen wurden Exzisionswunden, die sämtliche Hautschichten sowie den *Panniculus Carnosus* umfassten, generiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde das verwundete Gewebe entnommen und gesamtzelluläre RNA isoliert. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte mittels *Northern Blot*-Analyse, wobei je 2 µg der gesamtzellulären RNA zunächst auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen wurden. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der RNA auf eine Membran wurde diese mit einer spezifischen, Digoxigenin-gekoppelten *rip1 antisense* RNA-Sonde hybridisiert. Abgebildet und markiert sind die typischen, sich als eine Doppelbande darstellenden, 3,8 und 4,5 kb großen *rip1*-Gentranskripte. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die ebenfalls abgebildete Methylenblaufärbung der Membran, rechts markiert sind die markante 18S- und 28S-rRNA-Bande. In der oberen Reihe sind die Zeitpunkte der Gewebepreparation nach Verwundung angegeben.

Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, war die Expression des *rip1*-Gens nach *Northern Blot*-Analyse in der intakten Haut verhältnismäßig schwach. Die Intensität der typischen Doppelbande, welche möglicherweise zwei verschiedenen *rip1*-Transkripten entspricht^[88], blieb auch im Verlauf des Wundheilungsprozesses weitgehend konstant. Aufgrund der kontinuierlichen und relativ geringfügigen Expression war davon auszugehen, dass dieses Gen im Verlauf der Wundheilung nicht wesentlich reguliert wird.

Analysen der *rip2*-Genexpression ergaben eine ähnliche Kinetik, wie aus Abbildung 8 hervorgeht. Auch die Expression des *rip2*-Gens stellt sich im Northern Blot durch eine typische Doppelbande dar^[49]. Vergleiche der Methylenblaufärbung und der Signalintensität des RIP2-spezifischen Signals zu den einzelnen Zeitpunkten ergaben auch für dieses Gen keine wesentliche Regulation im Wundheilungsverlauf.

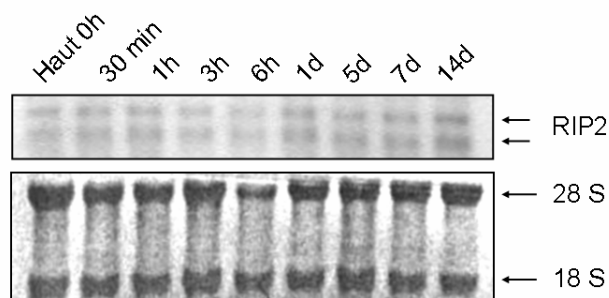


Abb. 8: Darstellung der *rip2*-Genexpression in unverwundeter muriner Haut und im Heilungsverlauf muriner Exzisionswunden. Abgebildet und markiert sind die typischen 1,9 und 2,5 kb großen *rip2*-Gentranskripte nach *Northern Blot*-Analyse intakter und verwundeter Haut. Aufgetragen wurden je 2 µg gesamtzellulärer RNA, die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer spezifischen *rip2 antisense* RNA-Sonde. Die obere Reihe zeigt die Zeitpunkte der Gewebeernte nach Verwundung, die Methylenblaufärbung unten diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren.

Die Analyse der *rip3*-Genexpression bei der Wundheilung ist in Abbildung 9 wiedergegeben. Auch die *rip3*-Expression stellt sich in *Northern Blot*-Analysen als typische Doppelbande dar ^[128].

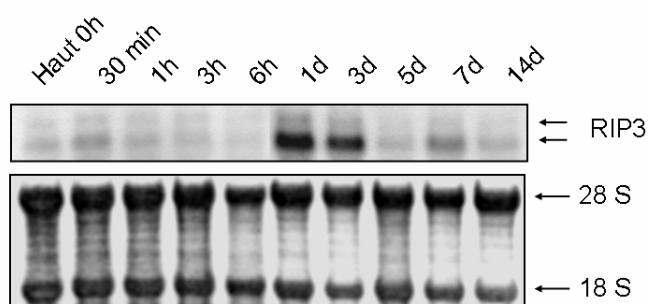


Abb. 9: Basale *rip3*-Genexpression in unverwundeter muriner Haut und deren Induktion in der frühen Heilungsphase muriner Exzisionswunden. Gezeigt ist das Ergebnis der *Northern Blot*-Analyse unverwundeter und verwundeter Haut nach Hybridisierung der Membran mit einer spezifischen *rip3 antisense* RNA-Sonde. Aufgetragen wurden je 2,5 µg gesamtzellulärer RNA. In der oberen Reihe sind die Zeitpunkte der Gewebeernte angegeben, zudem sind rechts die spezifische Doppelbande der 2,1 und 2,6 kb großen *rip3*-Gentranskripte sowie die 18S- und 28S-rRNA-Bande der Methylenblaufärbung markiert. Man beachte die starke Induktion der *rip3*-Genexpression im frühen Wundheilungsstadium.

Die basale Expression des *rip3*-Gens in der intakten Haut erschien relativ schwach, ähnlich derjenigen des *rip1*- und des *rip2*-Gens. Auffällig war jedoch die markante Steigerung der Expression dieses Gens etwa 24 Stunden nach Verwundung. Dieses hohe Expressionsniveau nahm bis zum dritten Tag nach Verwundung nur mäßig ab und erreichte den in unverwundeter Haut gemessenen Ausgangswert etwa um den fünften Tag nach Verwundung. Der zeitliche Verlauf der *rip3*-Genexpression gab daher Hinweise auf eine mögliche funktionelle Relevanz dieses Gens für die inflammatorische Phase der Wundheilung: Wie in der Einleitung bereits erwähnt, beginnt diese Phase kurz nach Verwundung und dauert in der Regel bis zum dritten bis fünften Tag der Wundheilung. Konkrete Aussagen über Art und Lokalisation der *rip3*-expriemierenden Zellen im Wundgewebe konnten jedoch anhand der vorgenommenen *Northern Blot*-Analyse nicht gemacht werden.

Eine außerordentlich wichtige Bedeutung des RIP4 für die embryonale Entwicklung epidermalen Gewebe ist bereits bekannt ^[47] und in der Einleitung näher erläutert worden. Wie Abbildung 10 wiedergibt, konnte mittels *Northern Blot*-Analyse gezeigt werden, dass auch im adulten Hautgewebe das *rip4*-Gen stark expriemiert ist. Die gezeigte Abbildung wurde mit einer extrem kurzen Expositionszeit des Films (wenige Sekunden) gewonnen, hieraus wird der erhebliche Unterschied des Expressionsniveaus der einzelnen *rip*-Gene in der Haut noch verdeutlicht.

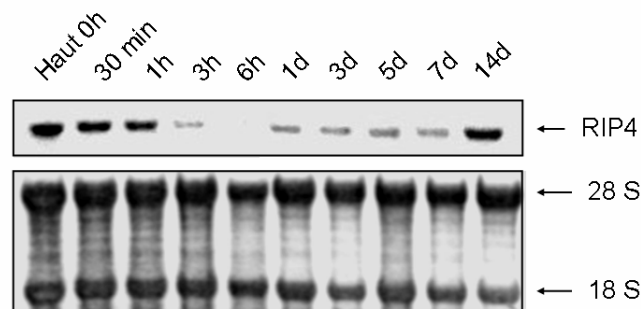


Abb. 10: Basale *rip4*-Genexpression in unverwundeter muriner Haut und deren Repression im frühen Heilungsprozess muriner Exzisionswunden. Abgebildet ist die *Northern Blot*-Analyse unverwundeter Haut sowie verschiedener Wundheilungsstadien, hybridisiert mit einer spezifischen *rip4 antisense* RNA-Sonde. Aufgetragen wurden je 2,5 µg gesamtzellulärer RNA. In der oberen Reihe sind die Zeitpunkte der Gewebsentnahme nach Verwundung angegeben, zudem sind rechts oben die Bande des 3,9 kb großen *rip4*-Gentranskriptes sowie rechts unten die 18S- und 28S-rRNA-Bande der Methylblaufärbung markiert. Man beachte die massive Verminderung der Expression wenige Stunden nach Verwundung und den allmählichen Wiederanstieg im Wundheilungsverlauf.

Des Weiteren zeigte sich für das *rip4*-Gen im Wundheilungsverlauf eine sehr starke Repression der Expression wenige Stunden nach Verwundung. Schon 30 Minuten nach Verwundung war eine deutlich reduzierte Expression zu beobachten, nach sechs Stunden ließ sich auch bei längerer Filmexposition kein Signal mehr detektieren. 24 Stunden nach Verwundung wurde die Expression des *rip4*-Gens wieder leicht induziert und nahm im weiteren Heilungsverlauf kontinuierlich wieder zu. Das relativ hohe Ausgangsniveau, das in unverwundeter Haut beobachtet worden war, wurde bis zum 14. Tag des Reparaturprozesses wieder erreicht, zu diesem Zeitpunkt ist die Reepithelisierung kutaner Wunden in der Regel vollständig abgeschlossen. Anhand der durchgeführten Analysen konnte somit zum einen das im Vergleich zu den anderen *rip*-Genen sehr hohe basale Expressionsniveau des *rip4*-Gens herausgestellt werden. Zum anderen konnte eine massive Repression der Expression dieses Gens in der sehr frühen Wundheilungsphase nachgewiesen werden.

Abschließend wurde auch das *rip5*-Gen auf sein Expressionsniveau in der Haut mittels *Northern Blot* analysiert. Sowohl in der intakten Haut als auch in den Proben der verschiedenen Wundheilungsstadien war jeweils lediglich eine minimale *rip5*-Genexpression zu detektieren (Abbildung 11). Aus der Literatur ist dabei bereits bekannt, dass das Expressionsniveau dieses Gens in der Haut extrem gering, in der Skelettmuskulatur dahingegen wesentlich ausgeprägter ist ^[152].

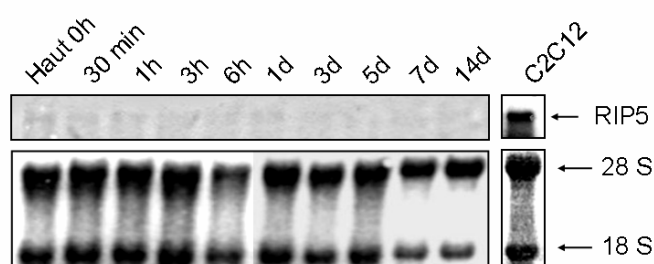


Abb. 11: Darstellung der äußerst geringgradigen *rip5*-Genexpression sowohl in unverwundeter muriner Haut als auch im Heilungsverlauf muriner Exzisionswunden. Abgebildet und markiert ist das 7,5 kb große *rip5*-Gentranskript nach *Northern Blot*-Analyse intakter und verwundeter Haut. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer spezifischen *rip5 antisense* RNA-Sonde. Zur Kontrolle der entsprechenden Sonde wurde die gleiche Menge gesamtzellulärer RNA einer Skelettmuskel-Zelllinie (C2C12-Zellen) aufgetragen und mit der entsprechenden RNA-Sonde hybridisiert. Die obere Reihe zeigt den Zelltyp sowie die Zeitpunkte der Gewebenisolierung nach Verwundung, die Methylenblaufärbung unten diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren.

Um die Effektivität der im Rahmen dieser Arbeit generierten rip5-RNA-Sonde zu kontrollieren, wurden daher gesamtzelluläre RNA-Lysate kultivierter muriner Skeltettmuskelzellen (C2C12-Zellen) ebenfalls mit dieser Sonde hybridisiert. Wie ebenfalls aus Abbildung 11 hervorgeht, konnte in diesen Zellen ein eindeutiges Signal mit der verwendeten, gegen die humane RIP5-Sequenz generierten RNA-Sonde erhalten werden. Anhand dieses direkten Vergleichs konnten daher technische Fehler als Ursache für die schwache Signalintensität ausgeschlossen und somit das minimale, im Wundheilungsverlauf der Haut nicht regulierte Expressionsniveau bestätigt werden.

3.1.2 Expressionskinetik des *traf6*-Gens nach Hautverwundung

Zur Einschätzung der Rolle weiterer TNFR-assoziiertes Proteine bei der Wundheilung und zur Analyse der Expressionskinetik der entsprechenden Gene bei diesem Prozess wurde mittels *Northern Blot*-Analyse zudem der Expressionsverlauf des *traf6*-Gens untersucht. TRAF6 stellt ebenfalls ein TNFR-assoziiertes Protein dar, welches ein relativ ubiquitäres gewebsspezifisches Verteilungsmuster aufweist ^[4]. Grundsätzlich sind jedoch die Signaltransduktionswege, die durch TRAF6 einerseits und durch die RIP-Proteine andererseits aktiviert werden, nicht völlig identisch. Auch die *traf6-antisense* RNA-Sonde wurde wie unter 4.1.2 beschrieben im Laufe dieser Arbeit hergestellt.

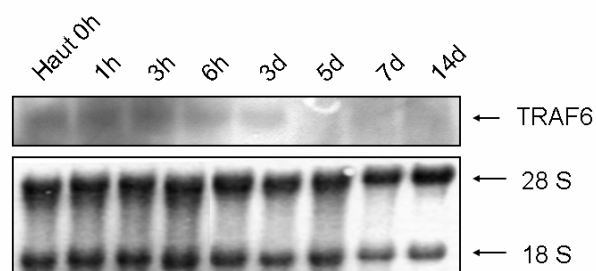


Abb. 12: Northern Blot-Analyse zur Expression des *traf6*-Gens in der Wundheilung.

Aufgetragen wurden 3 µg gesamtzellulärer RNA, die nachfolgend mit einer spezifischen *traf6 antisense* RNA-Sonde hybridisiert wurden. Oben sind die Zeitpunkte der Gewebeerhebung nach Verwundung angegeben, zudem sind das 5,5 kb große *traf6*-mRNA Transkript sowie die 18S und 28S-rRNA-Bande der Methylenblaufärbung markiert. Letztere diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren.

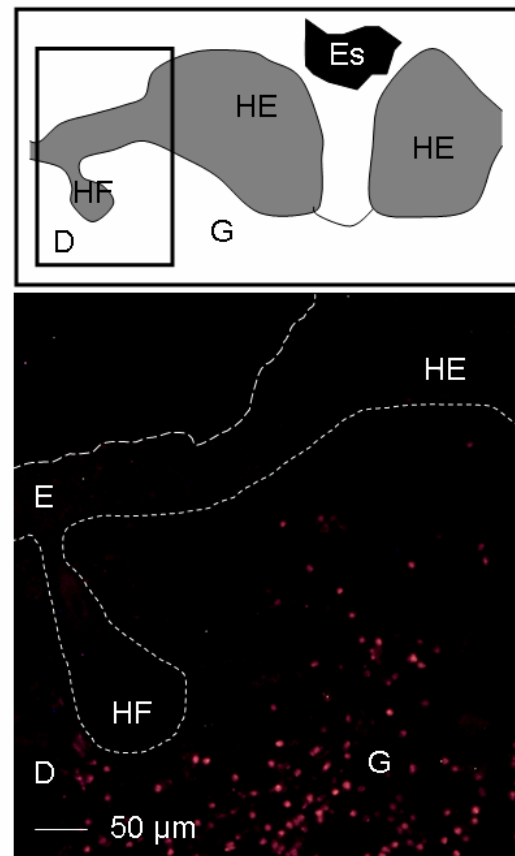
Das *traf6*-Gen war in der Haut moderat exprimiert (Abbildung 12). Eine leicht abnehmende Expression wurde im späten Wundheilungsverlauf, etwa vom fünften bis zum siebten Tag nach Verwundung der Tiere, festgestellt. Hiermit konnte insbesondere hinsichtlich der Regulation der Expression der *rip3*- und *rip4*-Gene, welche beide in einem sehr frühen Stadium der Wundheilung reguliert werden, eindeutig gezeigt werden, dass die für die unterschiedlichen Adaptorproteine des TNF-Rezeptors kodierenden Gene in der Wundheilung nicht einem einheitlichen Regulationsmodus unterworfen sind und grundsätzlich auf unterschiedliche Weise und in verschiedenen Stadien reguliert werden.

3.1.3 Immunhistochemische Untersuchung der *rip3*-Genexpression in der frühen Wundheilungsphase

Nachdem wie unter 3.1.1 dargestellt eine deutliche Induktion der Expression des *rip3*-Gens in der frühen Phase der Wundheilung detektiert werden konnte, stellte sich im weiteren Verlauf der Arbeit die Frage nach der genauen Lokalisation der *rip3*-exprimierenden Zellen. Um diese zu determinieren, wurden Paraffinschnitte von Wundgewebe verschiedener Stadien immunhistochemisch gefärbt. Diese waren nach Einbettung des isolierten Wundgewebes in Paraffin und Anfertigung von 8 µm dicken Schnitten am Mikrotom gewonnen worden.

Weder in unverwundeter Haut, noch in histologischen Schnitten der späten Wundheilungsphase (Tag 7 und Tag 14 nach Verwundung) ließ sich ein spezifisches Signal für das RIP3-Protein detektieren (nicht gezeigt). Demgegenüber konnte in entsprechenden Schnitten der Tage 1; 3 und partiell auch des 5. Tages nach Verwundung stets ein eindeutiges Signal nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der in Abschnitt 3.1.1 dargestellten Expressionskinetik des *rip3*-Gens auf RNA-Ebene. Interessanterweise war jedoch zu keinem der genannten Zeitpunkte eine wesentliche Expression im epidermalen Gewebe, also weder in der intakten Epidermis, noch im Bereich des hyperproliferativen Epithels, nachzuweisen. Lediglich im Bereich des Granulationsgewebes wurde ein spezifisches, punktuell beobachtet (siehe Abbildung 13). Aufgrund der simultanen Färbung der Zellkerne konnten die detektierten Signale mit den einzelnen Zellen kolokalisiert werden. Es ließ sich jedoch nicht eindeutig beurteilen, welche Zelltypen innerhalb des Granulationsgewebes das *rip3*-Gen exprimieren. In diesem, frühen Wundheilungsstadium kommt es jedoch zu einer massiven Invasion von Entzündungszellen, so dass die RIP3-positiven Zellen vermutlich zumindest teilweise mit Entzündungszellen identisch sind.

Abb. 13: Induktion der *rip3*-Genexpression im Granulationsgewebe drei Tage alter Exzisionswunden. Auf dem Rücken von Balb/c-Mäusen generierte Exzisionswunden wurden inklusive eines 2 mm breiten Randes intakten Hautgewebes nach definierten Zeitintervallen präpariert und für die Histologie eingebettet. 8µm dicke Schnitte wurden zunächst mit anti-RIP3 (aus Kaninchen, 1:100 in 1% BSA/PBST) und nachfolgend mit Cy3-gekoppeltem anti-Kaninchen (1:400 in 1% BSA/PBST) inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 570 nm, hierbei stellt sich Cy3 rot dar. Im oberen Bildabschnitt ist die schematische Darstellung einer Exzisionswunde abgebildet und dient als Orientierungshilfe. Das schwarze Kästchen markiert den Wundbereich, den die untere Fluoreszenzaufnahme der drei Tage alten Exzisionswunde wiedergibt. Bei einer parallel durchgeführten Kontrollfärbung, die der gleichen Färbeprozedur mit Ausnahme des primären Antikörpers unterzogen wurde, war kein Signal nachzuweisen. Man beachte die Signalintensität im Granulationsgewebe sowie die Signalausparung im epidermalen Gewebe. Vergrößerung: 150-fach. Abkürzungen: E: Epidermis, D: Dermis, HF: Haarfollikel, HE: hyperproliferatives Epithel, G: Granulationsgewebe, ES: Wundschorf.

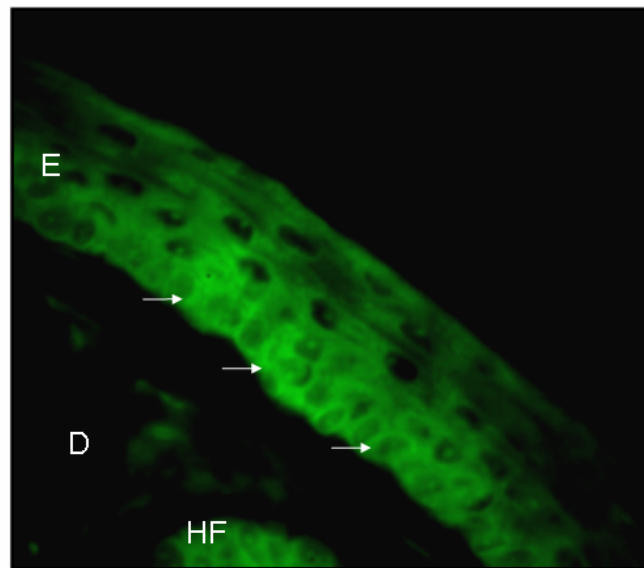


3.1.4 Immunhistochemische Untersuchung der *rip4*-Genexpression in unverwundeter muriner Schwanzhaut

Parallel zu den unter 3.1.4 beschriebenen Immunfluoreszenz-Analysen des RIP3-Proteins wurden auch Studien zur Lokalisation des RIP4-Proteins in intakter Haut sowie in Wundgewebe durchgeführt. Wie zu Beginn dieser Arbeit festgestellt und unter 3.1.1 wiedergegeben, war das *rip4*-Gen in der intakten Haut sehr stark exprimiert. Auf der anderen Seite wurde in der frühen Wundheilung jedoch eine drastische Abnahme der Expression dieses Gens beobachtet. Zunächst wurde daher der Frage nachgegangen, in welcher Gewebeschicht und in welchen Zellen das RIP4-Protein in unverwundeter Haut lokalisiert ist.

Abb. 14: *rip4*-Genexpression in der murinen Schwanzhaut.

Abgebildet ist der immunhistochemische Nachweis der *rip4*-Genexpression in der murinen Schwanzhaut. 8µm dicke Paraffinschnitte wurden mit dem primären Antikörper (anti-RIP4, aus Maus, 1:50 in 1% BSA/PBST) und einem sekundären Antikörper (Cy2-gekoppelt, 1:200 in 5% BSA/PBST) inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 475



nm, das spezifische RIP4-Signal stellt sich durch den grünen Farbton des sekundären Cy2-gekoppelten Antikörper bei dieser Wellenlänge dar. Das RIP4-spezifische Signal der epidermalen Basalschicht ist mit der Pfeilspitze gekennzeichnet. Vergrößerung: 400-fach. Abkürzungen: E: Epidermis, D: Dermis, HF: Haarfollikel.

Da die murine Rückenhaut nur eine ein- bis zweischichtige Epidermis aufweist, wurden diese Analysen an muriner Schwanzhaut, welche aufgrund ihrer zahlreichen epidermalen Schichten der menschlichen Haut eher entspricht, durchgeführt. Das Schwanzhautgewebe wurde dabei parallel zur Entnahme der Wunden entnommen und separat eingebettet.

In den durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass das RIP4-Protein in den epidermalen Schichten der Haut lokalisiert war (Abbildung 14). Weiterhin war es in den Haarfollikeln, welche sich in der embryonalen Entwicklung als Hautanhangsgebilde aus epidermalen Zellen entwickeln, nachzuweisen. Innerhalb der Epidermis wurde ein besonders starkes Signal in den Zellen der Basalschicht, jedoch, wenn auch teilweise schwächer, auch in den suprabasalen Zellschichten nachgewiesen. Der Nachweis des RIP4-Proteins mittels Immunfluoreszenz erlaubte jedoch keine exakte Zuordnung der *rip4*-Genexpression zu einer bestimmten epidermalen Schicht. Es kann lediglich die Aussage gemacht werden, dass die Basalzellen dieses Gen definitiv exprimieren. Ob und in welchem Maße dieses auch auf die differenzierenden Zellen der suprabasalen Schichten zutrifft, lässt sich mittels der durchgeführten Analysen nicht eindeutig bestimmen, da die Produkte einiger ausschließlich basal exprimierter Gene, wie beispielsweise des Keratin 14, teilweise in die oberen Zellschichten verschleppt werden ^[145].

3.1.5 Immunhistochemische Untersuchung der *rip4*-Genexpression im Wundheilungsverlauf

Zur Lokalisation der *rip4*-Genexpression im Wundheilungsverlauf wurden ebenfalls analog dem in 3.1.4 beschriebenen Vorgehen histologische Analysen mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Zur exakten Beurteilung der Proteinkinetik wurden histologische Schnitte der verschiedenen Wundheilungsstadien (Tag 1, 3, 5, 7 und 14 nach Verwundung) angefertigt und entsprechend analysiert.

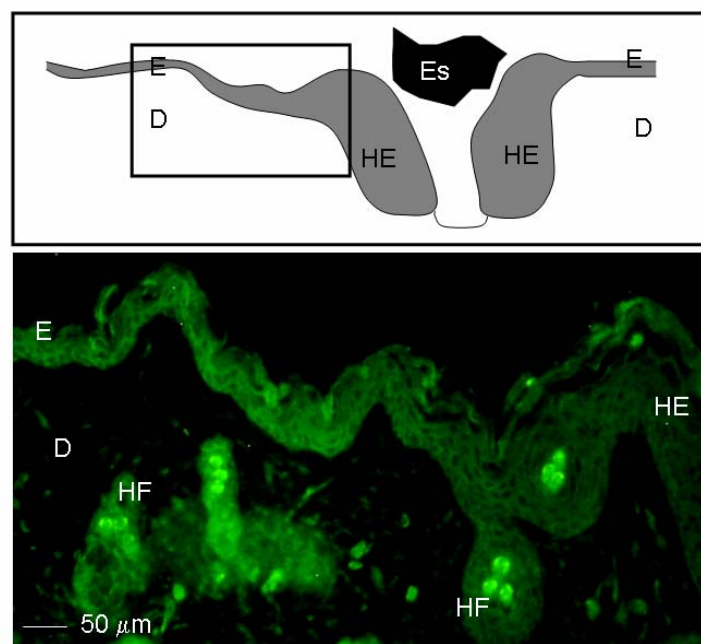


Abb. 15: Abnahme der *rip4*-Genexpression im hyperproliferativen Epithel drei Tage alter Exzisionswunden. Abgebildet ist ein Paraffinschnitt einer drei Tage alten Exzisionswunde. Die Detektion des RIP4 erfolgte immunhistochemisch wie unter Abbildung 14 beschrieben (RIP4/Cy2: grüne Fluoreszenz). Die obere schematische Darstellung einer Exzisionswunde gilt als Orientierungshilfe, der Bereich innerhalb des schwarz markierten Kästchens entspricht dem Bereich, aus dem die unten gezeigte Immunfluoreszenzaufnahme stammt. Man beachte die Signalintensität im intakten epidermalen Gewebe sowie die deutliche Abschwächung im Bereich des hyperproliferativen Epithels. Vergrößerung: 150-fach, Abkürzungen: E: Epidermis, D: Dermis, HE: hyperproliferatives Epithel, HF: Haarfollikel, ES: Wundschorf.

Für die frühe Wundheilungsphase ist mit Abbildung 15 ein repräsentatives Bild einer drei Tage alten Exzisionswunde wiedergegeben. Wie bei der intakten Schwanzhaut war auch im intakten Gewebe der Rückenhaut ein deutliches RIP4-Signal in den epidermalen Schichten zu detektieren (linker Bildrand), während im Bereich der Dermis mit Ausnahme der Haarfollikel kein Signal beobachtet wurde.

Auffällig war die deutlich schwächere Signalintensität im Bereich des hyperproliferativen Epithels. Insgesamt weisen diese Befunde im Zusammenhang mit den oben beschriebenen *Northern Blot*-Analysen darauf hin, dass die Expression des *rip4*-Gens nach Verwundung insbesondere in den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels massiv reprimiert wird.

Nach Abschluss der Reepithelisierungsphase konnte das RIP4-Protein dann wieder in größeren Mengen in den Zellen der regenerierten epidermalen Basalschicht des zuvor verwundeten Hautareals nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies steht ebenfalls im Einklang mit den oben beschriebenen Expressionskinetiken auf RNA-Ebene, die ebenfalls zeigten, dass die Expression des *rip4*-Gens nach Abschluss der Heilungsphase wieder auf den in intakter Haut gemessenen Basalwert zurückkehrt.

3.2 Expressionskinetik der *rip*-Gene in kultivierten Keratinozyten

Im späteren Verlauf dieser Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung derjenigen *rip*-Gene, welche bei der Wundheilung in der Epidermis reguliert werden – also in erster Linie das *rip4*-Gen - sowie die an dieser Regulation beteiligten Signaltransduktionswege in kultivierten Keratinozyten analysiert werden. Hierfür wurde zunächst ein entsprechendes *in vitro*-Modell etabliert. Dabei sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob in kultivierten Keratinozyten als Monokultur überhaupt eine Regulation der Expression der einzelnen *rip*-Gene nach Verwundung auftritt, und ob diese gegebenenfalls den *in vivo* beobachteten Regulationen entspricht. Für die hier beschriebenen Versuche wurden in erster Linie HaCaT-Zellen, eine humane, adulte, spontan immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie ^[8] verwendet. Nachdem die Zellen in Zellkulturschalen die vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie durch 16-stündige serumfreie Kultivierung in einen Ruhezustand (Quieszenz) überführt. Nachfolgend wurden rasterförmige, standardisierte Inzisionen mittels Skalpellklinge in die Keratinozytenkultur gesetzt. Soweit nicht anders vermerkt, wurde gleichzeitig eine Induktion mit 10% Serum durchgeführt. Nach zuvor definierten Intervallen wurden dann entsprechend der Fragestellung Protein- bzw. RNA-Lysate gewonnen. Als Vergleichskontrollen dienten jeweils Lysate un behandelter Zellen, welche sowohl zu Beginn der Verwundung (0h) als auch nach Beendigung der gesamten Versuchsreihe gewonnen wurden. Zusätzlich wurden einige der Versuche an isolierten humanen primären Keratinozyten (NHEK) durchgeführt, wobei der Versuchsablauf jeweils beibehalten wurde.

3.2.1 Die Expression der *rip*-Gene nach Verwundung *in vitro*

Wenngleich die Genexpression aufgrund posttranskriptioneller Modifikationen der mRNA nicht immer mit der Expressionskinetik auf Proteinebene korreliert, ist die Bestimmung der Proteinkonzentration im Wundheilungsverlauf im *in vivo*-Modell aufgrund der individuell recht unterschiedlichen Bildung von Wundschorf nicht etabliert. Daher wurden die Expressionskinetiken der einzelnen *rip*-Gene nach Verwundung *in vitro* sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestimmt. Im folgenden Abschnitt sind zunächst die entsprechenden Ergebnisse der Proteinanalysen wiedergegeben. Um einen Anhaltspunkt für die Konzentration der RIP-Proteine in den HaCaT-Zellen im Vergleich zur Gesamthaut zu haben, wurden außerdem jeweils gleiche Mengen Gesamt-Proteinlysat aus unverwundeter Haut aufgetragen.

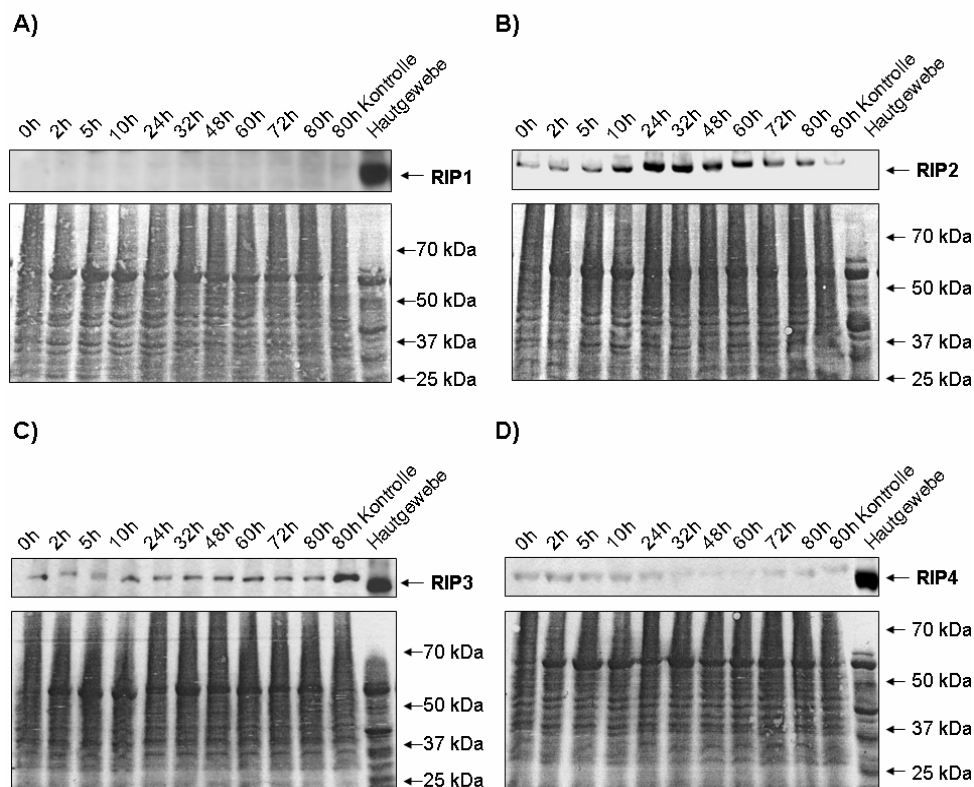


Abb. 16: Die Expressionskinetiken der *rip*-Gene auf Proteinebene nach Verwundung kultivierter Keratinozyten *in vitro*. Nach *in vitro*-Verwundung kultivierter HaCaT-Zellen wurde zu den in der oberen Reihe jeweils angegebenen Zeitpunkten zytosolisches Proteinlysat gewonnen und jeweils 12,9 µg pro Spur auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte zunächst die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern und nachfolgend diejenige mit dem jeweils entsprechenden sekundären Antikörper. Zum Vergleich wurde rechts jeweils die gleiche Menge Proteinlysat muriner Rückenhaut aufgetragen. Markiert sind die Banden des 76 kDa großen RIP1 (A), des 61 kDa großen RIP2 (B), des 57 kDa großen RIP3 (C) sowie des 46 kDa großen RIP4 (D). Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren dienten die jeweils unten abgebildeten Ponceau S-Färbungen. Man beachte die deutliche Induktion des RIP2-Proteins (B) sowie die Abnahme der RIP4-Proteinkonzentration (D) nach Verwundung *in vitro*.

Das Ergebnis der RIP1-Western Blot-Analyse nach *in vitro*-Verwundung korrelierte mit der *rip1-Northern Blot*-Studie nach *in vivo*-Verwundung: Wie in Abbildung 16A zu sehen, ließ sich in unbehandelten kultivierten HaCaT-Zellen nur eine sehr geringe RIP1-Proteinmenge detektieren, welche auch nach *in vitro*-Verwundung der Keratinozyten keiner Regulation oder Schwankung unterlag. Interessanterweise ließ sich im unverwundeten Hautgewebe, welches auch andere Zelltypen als Keratinozyten beinhaltet, eine wesentlich höhere Konzentration dieses Proteins nachweisen.

In den analog durchgeführten Analysen bezüglich des RIP2-Proteins zeigte sich nach *in vitro*-Verwundung überraschenderweise eine deutliche Zunahme dieses Proteins. Während bei den zuvor beschriebenen Genexpressionsstudien nach *in vivo*-Verwundung keine Regulation des *rip2*-Gens zu detektieren gewesen war, bewirkte die Verwundung kultivierter Keratinozyten einen sehr deutlichen Anstieg des RIP2-Proteingehaltes in diesen Zellen (siehe Abbildung 16B). Im direkten Vergleich des Proteinlysates unverwundeter muriner Haut mit den Zytosollysaten unverwundeter Keratinozyten zeigte in letzteren eine etwas höhere RIP2-Proteinkonzentration. Nach längerer Exposition des Films konnte das RIP2-Protein jedoch auch im Hautgewebe nachgewiesen werden.

Die Analyse der RIP3-Proteinkinetik verwundeter kultivierter Keratinozyten bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Expression des *rip3*-Gens bei der Wundheilung *in vivo*. Wie Abbildung 16C zeigt, war dieses Protein grundsätzlich, wenn auch in relativ geringen Mengen, in den kultivierten Keratinozyten zu detektieren. Durch die *in vitro*-Verwundung konnte jedoch keine Regulation der *rip3*-Genexpression erzielt werden. Dieser Sachverhalt bestätigte demzufolge die Hypothese, dass die in der Genexpressionsanalysen detektierte massive Induktion dieses Gens nach Verwundung *in vivo* nicht in den Keratinozyten stattfindet. Dies steht im Einklang mit den in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Analysen des murinen Wundgewebes mittels indirekter Immunfluoreszenz. Des Weiteren deutet auch der direkte Vergleich der RIP3-Mengen in den Proteinlysaten unverwundeter Haut und unbehandelter Keratinozyten darauf hin, dass das *rip3*-Gen in der Haut im Wesentlichen von anderen Zelltypen als den Keratinozyten exprimiert wird.

Nachdem die Expressionsstudie des *rip4*-Gens im Wundheilungsverlauf *in vivo*, sowie die einschlägige Literatur bereits auf eine wichtige Rolle des RIP4-Proteins in den Keratinozyten der Haut hingewiesen hatten, war die Regulation des entsprechenden Gens bei der Wundheilung kultivierter Keratinozyten *in vitro* von besonderem Interesse. Wie Abbildung 16D zeigt, konnte eine deutliche Abnahme der RIP4-Proteinkonzentration in den Keratinozyten auch nach *in vitro*-Verwundung gezeigt werden. Dennoch erschien die Konzentration des RIP4-Proteins in unbehandelten Keratinozyten im Vergleich zu derjenigen im intakten Hautgewebe verhältnismäßig gering. Weitere Analysen führten jedoch zu der Erkenntnis, dass die Sensitivität des verwendeten Antikörpers für humanes RIP4 im Gegensatz zu

murinem RIP4, gegen welches dieser ursprünglich generiert worden war, offenbar äußerst gering ist.

3.2.1.1 Die Expressionsregulation des *rip2*- und *rip4*-Gens nach Verwundung erfolgen *in vitro* zumindest partiell über einen zellautonomen Mechanismus

Nachdem sich in den Wundheilungsstudien mit gleichzeitiger Seruminduktion *in vitro* eine Regulation sowohl des *rip2*- als auch des *rip4*-Gens nachweisen ließ, stellte sich die Frage, ob die alleinige Verwundung ohne Serumzugabe ebenfalls zu einer Expressionsregulation der beiden *rip*-Gene in Keratinozyten führt. Diese zellautonome Regulation ließ sich für beide *rip*-Gene sowohl in HaCaT-Zellen als auch in primären Keratinozyten (NHEK) bestätigen.

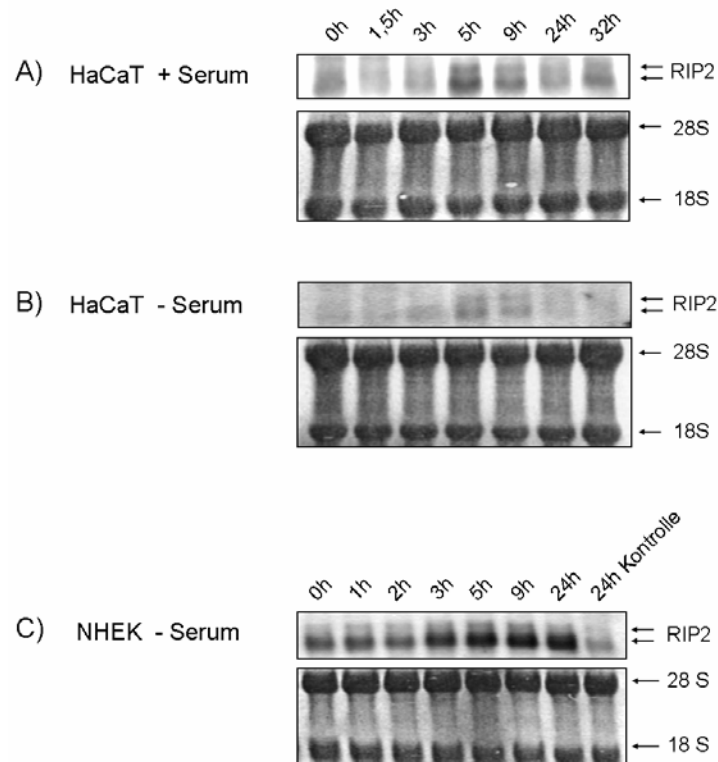


Abb. 17: *rip2*-Genexpressionskinetik nach Verwundung kultivierter Keratinozyten. Northern Blot-Analyse kultivierter HaCaT-Zellen (A und B) sowie primärer Keratinozyten (NHEK, C). Aufgetragen wurden je 4 µg (A und B) bzw. 2 µg (C) gesamtzellulärer RNA, gewonnen zu den oberhalb angegebenen Zeitpunkten nach Verwundung *in vitro*. Unter Verwendung von HaCaT-Zellen wurden zwei parallele Studien durchgeführt, wobei einmal während der Verwundung 10% Serum zugeführt wurde (A), andererseits wurde verwundet, ohne dass eine weitere Zugabe von Zusätzen erfolgte (B und C). Markiert sind die 1,9 und 2,5 kb großen *rip2*-Gentranskripte. Die abgebildeten Methylenblaufärbungen dienen jeweils zur Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung.

In den durchgeführten Analysen konnte die Induktion des *rip2*-Gens nach Verwundung sowohl in den kultivierten HaCaT-Zellen (Abbildung 17A und B) als auch in den kultivierten primären Keratinozyten (Abb. 17C) auf RNA-Ebene verifiziert werden. Dabei war die Basalexpression dieses Gens in den unbehandelten Keratinozyten-Zelllinien jeweils sehr gering. Demgegenüber ließ sich eine relativ intensive, kurzfristige Induktion der *rip2*-Genexpression im Zeitraum von fünf bis etwa neun Stunden nach Verwundung detektieren. Besonders deutlich zeigte sich diese Induktion bei gleichzeitiger Stimulierung der Zellen mit Serum, wie in Abbildung 17A zu sehen ist. Jedoch auch die alleinige Verwundung resultierte in einer leicht gesteigerten Expression des *rip2*-Gens im oben genannten Zeitraum (Abb. 17B). Die Verwundung kultivierter primärer Keratinozyten führte dagegen auch ohne weitere Zusätze zu einer sehr deutlichen Induktion der Expression, die im Gegensatz zu den untersuchten HaCaT-Zellen sogar 24 Stunden nach Versuchsbeginn noch auf gleichermaßen hohen Niveau blieb (Abb. 17C). Obwohl eine deutliche Regulation des *rip2*-Gens bei der Wundheilung der Haut *in vivo* nicht zu detektieren war, konnte folglich gezeigt werden, dass das *rip2*-Gen in Keratinozyten nach Verwundung zumindest *in vitro* verstärkt exprimiert wird.

Bei der Analyse der *rip4*-Genexpression zeigte sich eine äußerst drastische Repression des Gens sowohl in den analysierten HaCaT-Zellen als auch in den primären Keratinozyten (Abbildung 18). Insbesondere in den verwundeten HaCaT-Zellen bei gleichzeitiger Stimulierung mit Serum konnte eine äußerst drastische Repression beobachtet werden (Abb. 18A). Während die basale Expression des *rip4*-Gens in unbehandelten Keratinozyten jeweils verhältnismäßig intensiv war, waren in den ersten 24h nach Verwundung deutlich geringere Mengen des *rip4*-spezifischen-Transkripts nachweisbar, auch wenn die Verwundung ohne weitere Zusätze durchgeführt wurde. Hierbei entsprach die Expressionskinetik der HaCaT-Zellen verhältnismäßig genau derjenigen der primären Keratinozyten (Abb. 18C). Insgesamt entsprach der zeitliche Verlauf der Regulation der *rip4*-Genexpression nach der Verwundung *in vitro* zudem demjenigen, welcher in den murinen Exzisionswunden beobachtet wurden. Dies war ein starker Hinweis darauf, dass die Repression des *rip4*-Gens im Wundheilungsverlauf zumindest partiell auch über autonome Mechanismen der Keratinozyten selbst erfolgte, also nicht oder nicht ausschließlich durch Faktoren vermittelt wird, welche von anderen Zellen des Wundgewebes sezerniert werden oder aus dem Serum verletzter Blutgefäße stammen .

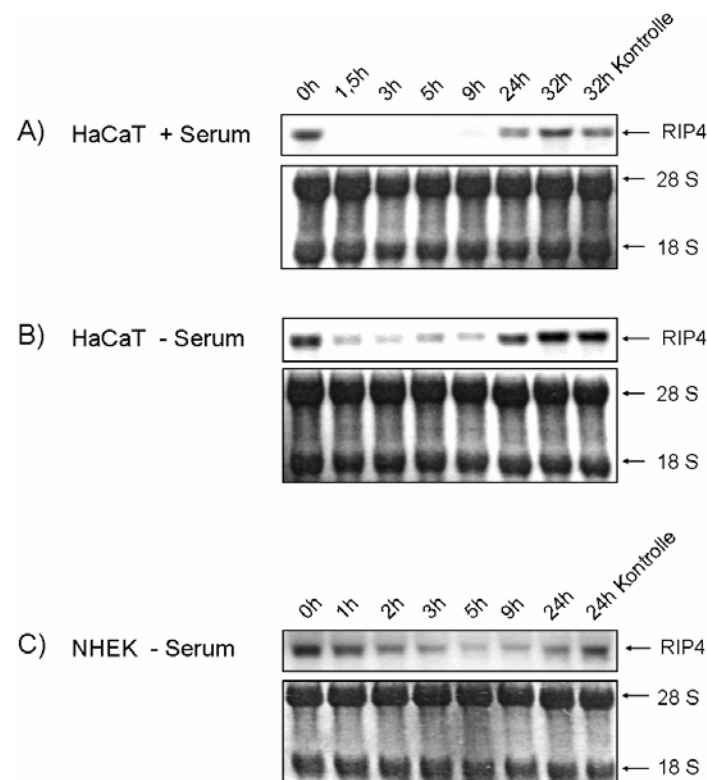


Abb. 18: Kinetik der *rip4*-Genexpression nach Verwundung kultivierter Keratinozyten. Northern Blot-Analyse kultivierter HaCaT-Zellen (A und B) sowie primärer Keratinozyten (NHEK, C). Aufgetragen wurden je 5 μ g (A und B) bzw. 2 μ g (C) gesamtzellulärer RNA, gewonnen zu den oberhalb angegebenen Zeitpunkten nach Verwundung *in vitro*. Mit HaCaT-Zellen wurden wiederum zwei parallele Studien durchgeführt: wobei einmal während der Verwundung 10% FBS zugeführt (A), und einmal verwundet wurde, ohne dass weitere Zusätze zugegeben wurden (B). Markiert sind die 3,9 kb großen Banden des *rip4*-Gentranskriptes. Die abgebildeten Methylenblaufärbungen dienen jeweils zur Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung. Man beachte die massive Hemmung der *rip4*-Genexpression bei gleichzeitiger Stimulierung der verwundeten Zellen mit Serum sowie die ebenfalls sehr deutliche Repression infolge alleiniger Verwundung sowohl in HaCaT-Zellen als auch in kultivierten primären Keratinozyten.

Auch die übrigen *rip*-Gene wurden mittels Northern Blot-Analyse auf ihre jeweilige Genexpression nach Verwundung der Zellen *in vitro* untersucht. Hierbei konnten, in Einklang mit den Western Blot-Daten, geringe Mengen der *rip1*- und *rip3*-spezifischen Transkripte in kultivierten Keratinozyten nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch für das *rip5*-Gen, dessen Expression aufgrund eines fehlenden geeigneten Antikörpers nicht mittels Western Blot analysiert werden konnte, konnte eine schwache Expression in kultivierten Keratinozyten nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.2.2 Die Expression der *rip*-Gene im Kultivierungsverlauf von Keratinozyten

Nachdem in den bisher durchgeführten Analysen eine Regulation sowohl des *rip2*- als auch des *rip4*-Gens nach *in vitro*-Verwundung nachgewiesen werden konnte, stellte sich nachfolgend die Frage, welche Faktoren die Expression dieser beiden Gene in Keratinozyten regulieren. Die vielfältigen Wachstumsfaktoren des Serums, welches in der Standardkultur dem Medium zugefügt wird, bewirken in den Zellen eine gesteigerte Proliferation. Demgegenüber führt sowohl der Mangel an diesen Faktoren, bzw. ihr vollständiger Entzug, als auch das Erreichen der vollständigen Konfluenz zu einer verminderten Proliferationsrate sowie zur Induktion der Expression differenzierungsassoziierter Gene^[109].

Vor diesem Hintergrund wurden zunächst HaCaT-Zellen in Kulturschalen überführt und in regelmäßigen Intervallen, unter Berücksichtigung verschiedener Konfluenzstadien und Kultivierungsbedingungen, gesamtzelluläre RNA gewonnen.

Während für die *rip*-Gene 1, 3 und 5 unter den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wie auch nach Verwundung von Keratinozyten keine Regulation der Expression beobachtet werden konnte, unterlagen die *rip*-Gene 2 und 4 zumindest in HaCaT-Zellen hierbei einer deutlich regulierten Expression, wie im Folgenden näher erläutert.

3.2.2.1 Die basale *rip2*-Genexpression kultivierter HaCaT-Zellen wird unter serumfreien Kultivierungsbedingungen massiv reprimiert

Für das *rip2*-Gens konnte in den kultivierten HaCaT-Zellen eine moderate Expression unter proliferationsfördernden Kultivierungsbedingungen festgestellt werden (Abbildung 19). Wurden die Zellen jedoch nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz in die serumfreie Kultivierung überführt, wurde diese Expression bereits sehr früh nahezu vollständig eingestellt. Bereits 6 Stunden nach Serumentzug war nur noch eine sehr schwache *rip2*-Expression nachzuweisen, nach ein- und zweitägiger Kultivierung unter diesen Bedingungen wurde diese nochmals leicht reduziert. Interessanterweise war nach weiterer Kultivierung (drei, bzw. vier Tage serumfreies Medium) wieder eine leichte Induktion der *rip2*-Genexpression zu beobachten. In den ebenfalls durchgeführten Analysen kultivierter primärer Keratinozyten konnte demgegenüber keine eindeutige Aussage über die Expression des *rip2*-Gens im Kultivierungsverlauf getroffen werden, wobei teilweise ein leicht erhöhte Expression infolge von Differenzierungsinduzierender Kalziumzugabe beobachtet wurde (nicht gezeigt).

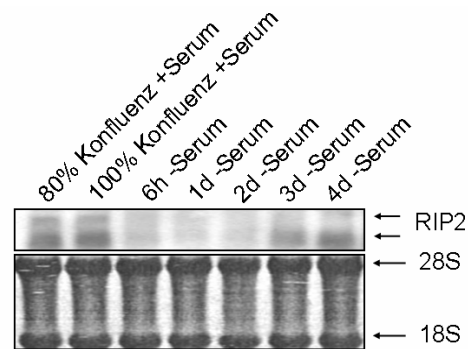


Abb. 19: Expression des *rip2*-Gens in HaCaT-Zellen unter proliferationsfördernden Kultivierungsbedingungen. Northern Blot-Analyse von HaCaT-Zellen unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Aufgetragen wurden jeweils 3 μ g gesamtzellulärer RNA, isoliert aus Zellen, die unter den jeweils in der oberen Reihe angegebenen Bedingungen kultiviert wurden. Markiert sind die 1,9 und 2,5 kb großen *rip2*-Gentranskripte sowie die 18S- und 28S-rRNA-Bande der Methylenblaufärbung. Letztere diente zur Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung mit gesamtzellulärer RNA.

3.2.2.2 Die *rip4*-Genexpression kultivierter Keratinozyten wird unter serumfreien Kultivierungsbedingungen temporär induziert und nachfolgend reprimiert

Die RNA-Lysate der unter den beschriebenen Bedingungen kultivierten HaCaT-Zellen wurden ebenfalls mittels Northern Blot-Analyse auf die Expression des *rip4*-Gens hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression dieses Gens in subkonfluenten HaCaT-Zellen zwar zu detektieren war, aber auch, dass maximale Expression erst nach dem Erreichen der vollständigen Konfluenz erreicht wurde.

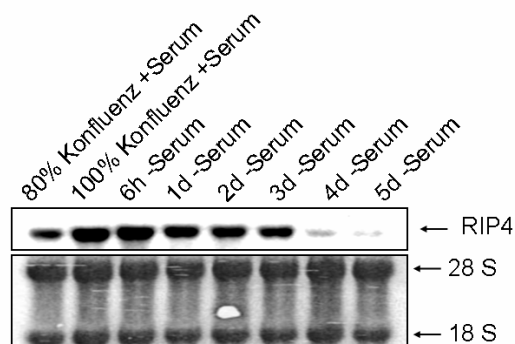


Abb. 20: Expression des *rip4*-Gens in serumhaltigem und serumfreiem Medium bei HaCaT-Zellen. Northern Blot-Analyse von HaCaT-Zellen unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Aufgetragen wurden jeweils 4 μ g gesamtzellulärer RNA, isoliert aus Zellen, die unter den jeweils in der oberen Reihe angegebenen Bedingungen kultiviert worden waren. Markiert ist das 3,9 kb große *rip4*-Gentranskript sowie die 18S- und 28S-rRNA-Bande der Methylenblaufärbung.

Der zusätzliche Entzug der Serum-Wachstumsfaktoren des Mediums führte zunächst, etwa innerhalb von sechs Stunden, zu einer weiteren Steigerung der Expression des *rip4*-Gens (Abbildung 20). Anschließend zeigte sich dann eine allmähliche, kontinuierliche Reduktion der *rip4*-Genexpression, bis diese schließlich nach viertägiger serumfreier Kultivierung in den HaCaT-Zellen ein minimales Niveau erreicht hatte.

In kultivierten primären Keratinozyten ließ sich eine ähnliche Expressionskinetik des *rip4*-Gens detektieren (Abbildung 21). Während das *rip4*-Gen in diesem Zelltyp bereits unter proliferationsfördernden Bedingungen verstärkt exprimiert war, führte die Zugabe von Ca^{2+} (CaCl_2 , 1,2 mM), welches die Differenzierung dieser Zellen induziert ^[35] nach kurzfristiger minimaler Induktion zu einer allmählichen, kontinuierlichen Abnahme der *rip4*-Genexpression.

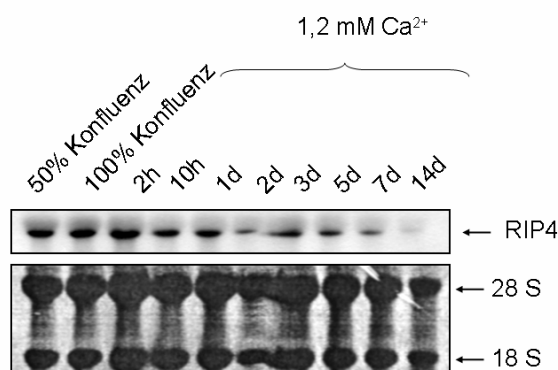


Abb. 21: Expression des *rip4*-Gens im Kultivierungsverlauf primärer Keratinozyten. Northern Blot-Analyse von primären Keratinozyten unter proliferations- und differenzierungsfördernden Kultivierungsbedingungen. Aufgetragen wurden jeweils 2µg gesamtzellulärer RNA, isoliert aus Zellen, die unter den jeweils in der oberen Reihe angegebenen Bedingungen kultiviert wurden. Markiert ist das 3,9 kb große *rip4*-Gentranskript sowie die 18S- und 28S-rRNA-Bande der Methylenblaufärbung. Letztere diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung.

3.2.3 Zwischenzusammenfassung I

Mittels Northern Blot-Analysen wurde zunächst das jeweilige basale Expressionsniveau der einzelnen *rip*-Gene in der Haut analysiert: Während die basale Expression der *rip*-Gene 1, 2, 3 und 5 verhältnismäßig gering war, stellte sich die Expression des *rip4*-Gens in diesem Gewebe sehr intensiv dar. Für das *rip3*-Gen konnte jedoch eine markante Induktion in der frühen Wundheilung *in vivo* nachgewiesen werden, die sich durch Immunfluoreszenz-Analysen den Zellen des Granulationsgewebes zuordnen ließ. Demgegenüber wurde die Expression des *rip4*-Gens, welche sich den Keratinozyten der epidermalen Basalschicht zuordnen ließ,

während der inflammatorischen Phase der Wundheilung massiv reprimiert. In kultivierten Keratinozyten *in vitro* konnten diese Befunde im Wesentlichen bestätigt werden, hier unterlag das *rip4*-Gen nach Verwundung ebenfalls einer deutlichen Repression. Zudem wurde nach Verwundung *in vitro* jedoch auch eine moderate Induktion der Expression des *rip2*-Gens beobachtet. In weiteren Untersuchungen zum Expressionsmuster der *rip*-Gene im differenzierungsförderlichen Kultivierungsverlauf ließ sich für das *rip2*-Gen jedoch keine eindeutige Expressionstendenz nachweisen, während die Expression des *rip4*-Gens unter differenzierungsfördernden Kultivierungsbedingungen insbesondere in HaCaT-Zellen deutlich induziert wurde. Im fortschreitenden Differenzierungsverlauf wurde dessen Expression dann sowohl in HaCaT-Zellen als auch in primären Keratinozyten kontinuierlich reprimiert.

3.3 Analyse der Faktoren und Signaltransduktionswege, die an der Regulation der *rip4*-Genexpression in kultivierten Keratinozyten beteiligt sind

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit eine deutliche Regulation der *rip4*-Genexpression nach Verwundung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde darauf aufbauend der Frage nachgegangen, welche Faktoren hierfür verantwortlich sind. Da bereits gezeigt werden konnte, dass unter anderem der Konfluenzstatus der Zellen einen Einfluss auf die Expression des *rip4*-Gens hat, wurde nun untersucht, ob auch Wachstumsfaktoren und Zytokine einen Einfluss auf die Expression dieses Gens haben. Diese Analysen wurden wiederum unter Verwendung von kultivierten HaCaT-Zellen *in vitro* durchgeführt.

3.3.1 Faktoren die zur Regulation der *rip4*-Genexpression führen

3.3.1.1 Die *rip4*-Genexpression wird durch Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine differentiell reguliert

Im Zuge der Wundheilung kommt es zu einer massiven Freisetzung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, deren Auswirkungen auf die Effektorzellen über unterschiedliche Rezeptoren und Signaltransduktionswege vermittelt werden. Auf Grund dessen wurde vermutet, dass diese Faktoren auch an der Regulation der *rip4*-Genexpression beteiligt sind. Zunächst wurden die kultivierten Keratinozyten daher mit ausgewählten Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert und nachfolgend auf eine differentielle *rip4*-Genexpression hin analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst in Kulturschalen bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz angezchtet, durch einen etwa 16-stündigen Serumentzug in einen Ruhezustand versetzt und nachfolgend mit den jeweiligen Faktoren

stimuliert. Zu definierten Zeitpunkten nach der jeweiligen Induktion wurde dann gesamtzelluläre RNA für die Genexpressionsstudien isoliert und mittels *Northern Blot* analysiert. Initial wurde zunächst der Effekt von Gesamtserum, welches ein Gemisch verschiedenster Faktoren darstellt und auch nach der Verwundung *in vivo* aus den ruptierten Gefäßen freigesetzt wird, analysiert.

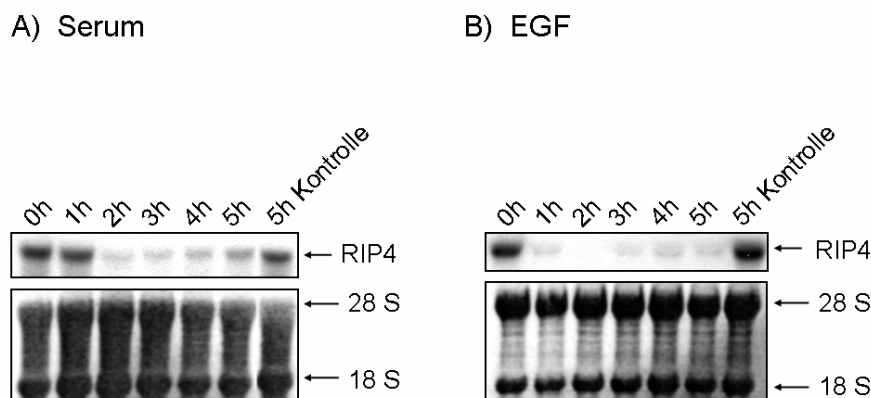


Abb. 22: Repression der *rip4*-Genexpression durch Serum und EGF in kultivierten Keratinozyten. Abgebildet sind *Northern Blot*-Analysen, in denen die untersuchten RNA-Proben mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde hybridisiert wurden. Gesamtzelluläre RNA wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten (1-5 h) nach Stimulation mit Serum (FBS, 10%, (A)) sowie EGF (20 ng/ml, (B)) aus den HaCaT-Zellen isoliert. Aufgetragen wurden 4 µg RNA (A) bzw. 3µg RNA (B), die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren.

Wie aus Abbildung 22A hervorgeht, bewirkte die Stimulation der HaCaT-Zellen mit Serum eine sehr deutliche Reduktion der *rip4*-Genexpression, wobei ein minimaler Effekt bereits nach einer Stunde, eine nahezu vollständige Repression dagegen nach zwei bis drei Stunden zu beobachten war. Im weiteren Verlauf, der stündlich kontrolliert wurde, konnte dann einen allmählichen und kontinuierlichen Wiederanstieg der Genexpression detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Serum einen oder mehrere Faktoren enthält, die die *rip4*-Genexpression reprimieren können. Um diese zu identifizieren, wurden HaCaT-Zellen mit ausgewählten Wachstumsfaktoren und Zytokinen behandelt und hinsichtlich eventueller Effekte auf die *rip4*-Genexpression analysiert. Die Induktion mit EGF (*epidermal growth factor*), ein Faktor, welcher in der frühen Wundheilung von zahlreichen Zelltypen freigesetzt wird und sowohl die Proliferation als auch die Migration von Keratinozyten aktiviert [3, 63, 113], bewirkte in den verwendeten HaCaT-Zellen eine nahezu sofortige, vollständige Repression der *rip4*-Genexpression (siehe Abbildung 22B). Während eine Stunde nach Induktion noch ein, wenn auch sehr schwaches, Signal zu detektieren war, ließ sich nach zwei bis drei Stunden keine

Expression dieses Gens mehr nachweisen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich unter Verwendung des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D in unbehandelten Zellen eine basale Halbwertszeit der *rip4*-mRNA von etwa zwei Stunden ermitteln ließ (nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden Faktoren der TGF- β -Superfamilie auf eventuelle regulatorische Effekte auf die *rip4*-Genexpression hin analysiert. Exemplarisch wurden Induktionen mit TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) sowie mit Activin A an HaCaT-Zellen durchgeführt. Beide Faktoren werden wie EGF im Verlauf der Wundheilung ebenfalls von diversen Zelltypen freigesetzt. Dabei übt TGF- β aufgrund eines inhibitorischen Effekts auf die Keratinozytenproliferation einen negativen Effekt auf die Reepithelisierung aus ^[144]. Demgegenüber stimuliert Activin A über eine Aktivierung der Produktion von Wachstumsfaktoren in dermalen Fibroblasten die Keratinozytenproliferation *in vivo* auf indirektem Wege ^[89]. Trotz dieser unterschiedlichen Effekte konnte für beide Faktoren eine Repression der *rip4*-Genexpression in den verwendeten HaCaT-Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 23).

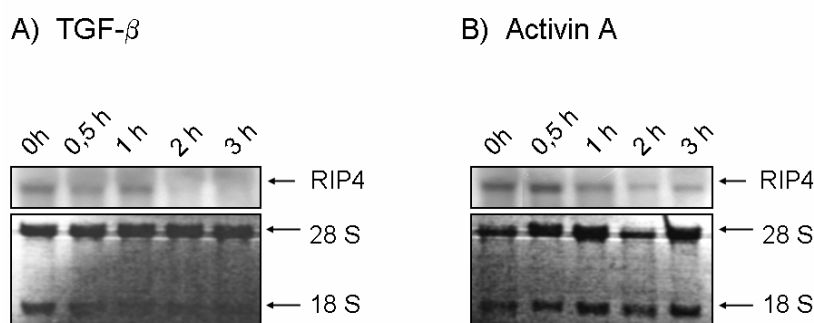


Abb. 23: Repression der *rip4*-Genexpression durch TGF- β 1 und Activin A in kultivierten Keratinozyten. Abgebildet sind *Northern Blot*-Analysen, in denen die untersuchten RNA-Proben mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde hybridisiert wurden. Gesamtzelluläre RNA wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten (0,5-3 h) nach Stimulation mit TGF- β 1 (1 ng/ml, (A)) sowie Activin A (5 ng/ml, (B)) aus den HaCaT-Zellen isoliert. Aufgetragen wurden jeweils 1,5 μ g, die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung.

Die Behandlung mit beiden Faktoren bewirkte dabei eine langsame, kontinuierliche Abnahme der *rip4*-Genexpression. Während die Stimulierung mit TGF- β jedoch eine nahezu vollständige Hemmung der *rip4*-Genexpression nach zwei bis drei Stunden bewirkte (Abb. 23A), wurde nach der Stimulierung mit Activin A eine weniger deutliche, jedoch gleichermaßen verlaufende Abnahme der Expression beobachtet (Abb. 23B).

Exemplarisch für die Gruppe der proinflammatorischen Zytokine wurden zudem die Zytokine TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) sowie IL-1 β (Interleukin-1 β) ausgewählt und ebenfalls mittels Induktionsstudien auf regulatorische Effekte auf die *rip4*-Genexpression hin untersucht. Proinflammatorische Zytokine werden in der frühen (inflammatorischen) Wundheilungsphase von einer Vielzahl von Zelltypen freigesetzt [31]. Sie bewirken in den Keratinozyten des Wundrandes in erster Linie eine Aktivierung der Migration und stellen für den Wundheilungsprozess essentielle Faktoren im Hinblick auf eine zügige Reepithelisierung dar [31, 135].

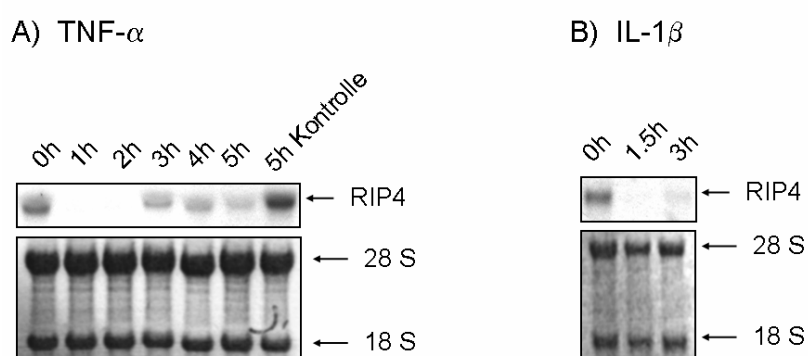


Abb. 24: Repression der *rip4*-Genexpression durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β in kultivierten Keratinozyten. Abgebildet sind *Northern Blot*-Analysen, in denen die untersuchten RNA-Proben mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde hybridisiert wurden. Gesamtzelluläre RNA wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten (1-5 h (A) bzw. 1,5 und 3 h (B)) nach Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml, (A)) sowie IL-1 β (100 U/ml, (B)) aus den HaCaT-Zellen isoliert. Aufgetragen wurden 3 μ g (A) bzw. 1,5 μ g (B), die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung.

Nach Stimulierung der HaCaT-Zellen mit TNF- α ließ sich eine sofortige, vollständige Repression der *rip4*-Genexpression beobachten (siehe Abbildung 24A). Ein bis zwei Stunden nach Versuchsbeginn konnte mittels *Northern Blot*-Analysen kein *rip4*-Signal mehr detektiert werden. Ein allmählicher Wiederanstieg der Expression wurde etwa drei Stunden nach der Induktion beobachtet, dieser unterlag im weiteren Verlauf jedoch noch einigen Schwankungen, so dass keine eindeutig steigende Tendenz innerhalb der ersten Stunden nach Induktion sichtbar war. Eine sehr massive Hemmung der *rip4*-Genexpression wurde gleichermaßen nach der Stimulierung der Zellen mit IL-1 β beobachtet. Wie aus Abbildung 24B hervorgeht, konnte im Zeitraum zwischen einer und zwei Stunden nach Versuchsbeginn im *Northern Blot* kein Signal mehr detektiert werden. Erst nach etwa drei Stunden konnte allenfalls ein minimaler Wiederanstieg der *rip4*-Expression beobachtet

werden. Ähnlich wie nach EGF-Induktion ließ sich somit auch für TNF- α und IL-1 β eine frühere Expressionshemmung nachweisen, als die basale Stabilität der *rip4*-mRNA hatte erwarten lassen.

Im Rahmen der Wundheilung bewirkt die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zudem eine massive Freisetzung von reaktiven Sauerstoffderivaten durch diese Zellen [79, 120]. Die freigesetzten Verbindungen dienen in erster Linie der Erregerabwehr, können jedoch auch auf die Keratinozyten hochtoxisch wirken. Da die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hierbei von entscheidender Bedeutung zu sein scheint [41], wurden HaCaT-Zellen zudem exemplarisch für diese Stoffgruppe mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 1mM) behandelt und auf die Expression des *rip4*-Gens hin untersucht. Auch diese Behandlung führte in den untersuchten Keratinozyten zu einer deutlichen Repression der *rip4*-Genexpression, wie in Abbildung 25 zu sehen ist.

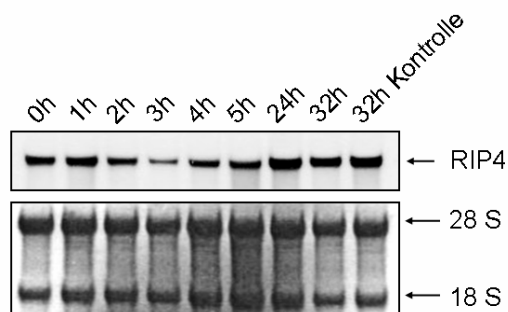


Abb. 25: Wasserstoffperoxid-induzierte *rip4*-Genrepression in kultivierten Keratinozyten. Northern Blot-Analyse gesamtzellulärer RNA-Lysate, gewonnen zu den oberhalb angegebenen Zeitpunkten nach Stimulierung von HaCaT-Zellen mit 1mM H₂O₂. Pro Spur wurden 2 μ g RNA aufgetragen und mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde hybridisiert. Die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung.

Insgesamt konnten somit Hinweise darauf erhalten werden, dass die Regulation der *rip4*-Genexpression bei der Wundheilung durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie durch reaktive Sauerstoffderivate verursacht werden könnte. Allerdings zeigte sich auch, dass einige, die Keratinozytenproliferation bzw. Migration im Wundheilungsverlauf stimulierende, essentielle Faktoren keinen Einfluss auf die *rip4*-Genexpression hatten. So wurde unter anderem nach der Induktion mit KGF (*keratinocyte growth factor*), IFN- γ (Interferon- γ) sowie FGF-2 (*fibroblast growth faktor-2*) jeweils eine unveränderte Expression des *rip4*-Gens festgestellt (nicht gezeigt). Darauf aufbauend stellte sich die Frage, welche intrazellulären Signaltransduktionswege in Keratinozyten für die Regulation der *rip4*-Expression verantwortlich sein könnten.

Da das RIP4-Protein zunächst als Interaktionspartner der Proteinkinase C (PKC) identifiziert worden war (siehe Einleitung), und eine funktionell bedeutende Rolle des PKC-Signaltransduktionsweges für die Keratinozytenproliferation und -differenzierung vor Beginn dieser Arbeit bereits bekannt gewesen war ^[15], wurde daher der Effekt eines Aktivators der PKC auf die Expression des *rip4*-Gens in den kultivierten HaCaT-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit der synthetischen Substanz Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), welche eine Aktivierung der verschiedenen PKC-Isoformen bewirkt ^[73], inkubiert. Parallel wurde eine Inkubation mit DMSO, in welchem das PMA gelöst war, in gleicher Konzentration durchgeführt, um eventuelle Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.

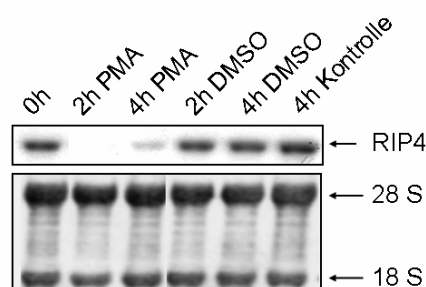


Abb. 26: Hemmung der *rip4*-Genexpression nach PMA-induzierter Proteinkinase C-Aktivierung. Gesamtzelluläre RNA wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten (2 und 4 h) nach Stimulation mit PMA (100 nM, gelöst in DMSO) aus den HaCaT-Zellen isoliert. Parallel wurde der Effekt des Lösungsmittels (DMSO) in gleicher Konzentration kontrolliert. Aufgetragen wurden jeweils 2 µg, die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung.

Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, bewirkte die PMA-induzierte Aktivierung der PKC bereits nach etwa zwei Stunden eine sehr starke Hemmung der *rip4*-Genexpression. Ungefähr nach vier Stunden konnte dann ein leichter Wiederanstieg der Expression beobachtet werden. Demgegenüber blieb die alleinige Inkubation der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO insgesamt ohne Auswirkungen auf das Expressionsniveau des *rip4*-Gens.

3.3.1.2 Die effiziente Repression der *rip4*-Genexpression erfolgt nur in vollständig konfluenten Keratinozyten

Im Zuge der oben beschriebenen Induktionsstudien mit den verschiedenen Faktoren war festgestellt worden, dass eine maximale Repression der *rip4*-Expression nur dann beobachtet werden konnte, wenn die kultivierten Keratinozyten zu Versuchsbeginn eine vollständige Konfluenz erreicht hatten. Daher stellte sich die Frage, inwiefern sich der Grad der Konfluenz der Zellen einen Einfluss die

Expressionskinetik des *rip4*-Gens nach Induktion hatte. Um diese Frage zu klären, wurden die Keratinozyten in unterschiedlichen Konfluenzstadien mit Serum stimuliert. Der oben beschriebene Versuchsablauf wurde dabei jeweils beibehalten, so dass die Zellen vor der Induktion stets 16h in serumfreiem Medium kultiviert wurden.

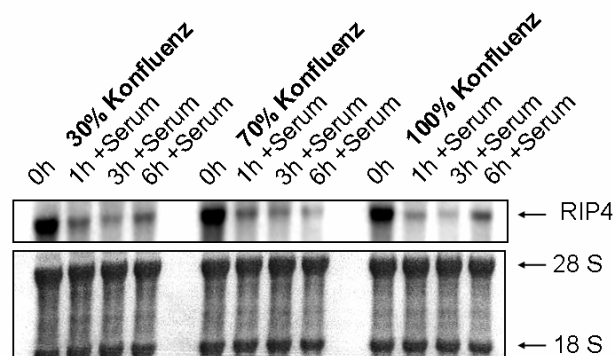


Abb. 27: Korrelation der seruminduzierten *rip4*-Expressionskinetik mit dem Konfluenzgrad kultivierter Keratinozyten. Kultivierte HaCaT-Zellen wurden in unterschiedlichen Stadien der Konfluenz mit Serum (FBS, 10%) stimuliert. Vor und nach definierten Zeitpunkten (1, 3 und 6 h) wurde jeweils gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels *Northern Blot* analysiert, wobei die Hybridisierung mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde erfolgte. Aufgetragen wurden je 3 µg RNA, die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle der gleichmäßigen Mengenauftragung. Die Kultivierungsbedingungen sowie die Zeitpunkte der RNA-Isolierungen sind in der oberen Reihe angegeben.

Dabei zeigte sich zum einen, dass unter serumfreien Kulturbedingungen bei Zellen aller Konfluenzgrade eine gleichmäßig starke *rip4*-Basalexpression zu beobachten war (Abbildung 27). Bezüglich der seruminduzierten Repression der *rip4*-Expression konnten jedoch deutliche Unterschiede beobachtet werden: Je geringer der Konfluenzgrad der Zellen bei Versuchsbeginn war, desto später erfolgte die Repression der *rip4*-Expression und desto geringer war ihr Ausmaß. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die Zelldichte einen Einfluss auf die wachstumsfaktorinduzierte Regulation der *rip4*-Expression hat.

3.3.1.3 Die Expression des *rip4*-Gens wird durch das Glukokortikoid Dexamethason und durch Retinolsäure induziert

Aus dem klinischen Alltag ist die negative Beeinflussung der Wundheilung durch übermäßige endogene Kortisolspiegel sowie durch exogene Kortisolderivat-Applikation bekannt, was in einer Vielzahl von Studien bestätigt wurde^[112]. Da diese Substanzen unter anderem zu einer verminderten Proliferationsrate von

Keratinocyten *in vitro* führen ^[124], ergab sich die Hypothese, dass sie auch die Expression des *rip4*-Gens beeinflussen könnten. Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung des Kortisolderivates Dexamethason auf die *rip4*-Genexpression in kultivierten Keratinocyten untersucht.

Weiterhin wurde der Effekt von Retinolsäure (Vitamin A) auf die *rip4*-Expression analysiert. Retinolsäurederivate finden in der Dermatologie ebenfalls eine breite Anwendung ^[1, 112]. Dabei ist bekannt, dass diese Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration und verschiedenen anderen physiologischen Rahmenbedingungen sehr unterschiedliche Auswirkungen auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Keratinocyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* haben können. Unter den Kultivierungsbedingungen, die im Rahmen dieser Arbeit für die kultivierten Keratinocyten galten sollte die Zugabe von Retinolsäure in einer Konzentration von 1 μM eine verminderte Proliferationsrate der HaCaT-Zellen zur Folge haben ^[33].

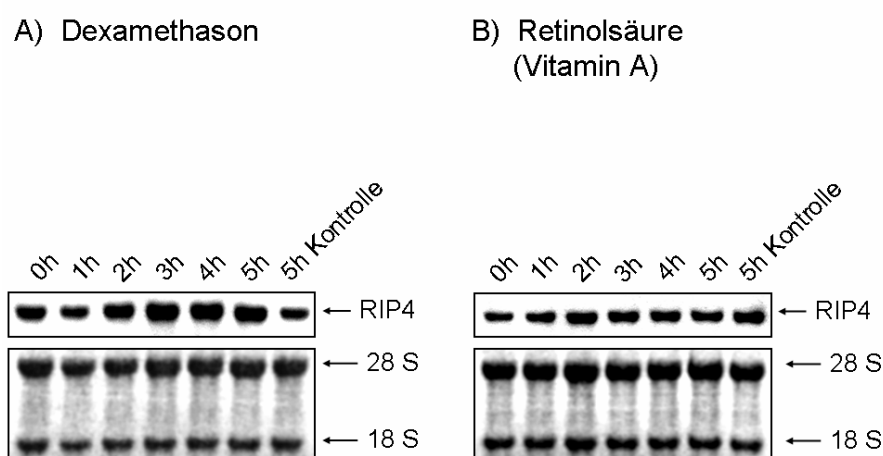


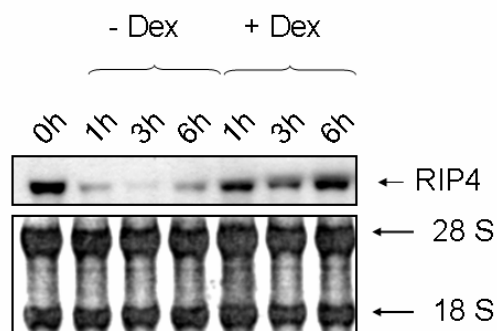
Abb. 28: Induzierte *rip4*-Genexpression nach Applikation von Dexamethason und Retinolsäure in kultivierten Keratinocyten. Gezeigt sind *Northern Blot*-Analysen, in denen die untersuchten RNA-Proben mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde hybridisiert wurden. Gesamtzelluläre RNA wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten (1-5 h) nach Zugabe von Dexamethason (10^{-5} M, (A)) sowie Retinolsäure (1 μM , (B)) aus den HaCaT-Zellen isoliert. Aufgetragen wurden jeweils 2 μg , die abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, führte die Zugabe der beiden Substanzen jeweils zu einer Induktion der *rip4*-Genexpression, wobei der Effekt des Dexamethason stärker war. Diese Daten zeigen, dass sowohl Kortisol- als auch Vitamin A-Derivate zu einer Induktion der *rip4*-Genexpression in Keratinocyten beitragen können.

3.3.1.4 Dexamethason neutralisiert die Repression des *rip4*-Gens nach Verwundung *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Dexamethason die Expression des *rip4*-Gens in intakten Keratinozyten leicht induziert, wurde vermutet, dass dieses Glukokortikoid auch die Expression des *rip4*-Gens nach Verwundung modulieren könnte. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden quieszente HaCaT-Zellen zunächst für eine Stunde mit Dexamethason (10^{-5} M) inkubiert und nachfolgend nach einem standardisierten Muster *in vitro* verwundet. Zur Untersuchung der *rip4*-Genexpression wurden RNA-Lysate der frühen Regenerationsphase isoliert, zudem wurde die Reepithelisierung der Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet.

A) *in vitro*-Verwundung, *rip4*-Expression



B) *in vitro*-Verwundung, Zytologie 2d nach Verwundung

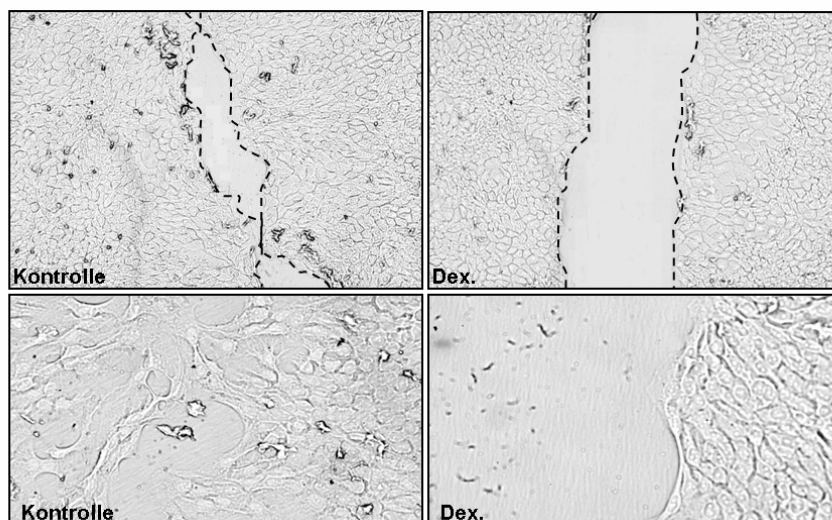


Abb. 29: Auswirkung der Dexamethason-Applikation auf die Expression des *rip4*-Gens und die Reepithelisierung von Keratinozyten nach Verwundung *in vitro*.

zu Abbildung 29: Kultivierte HaCaT-Zellen wurden zunächst für eine Stunde mit Dexamethason (10^{-5} M) inkubiert bzw. unbehandelt belassen (Kontrolle) und nachfolgend mechanisch verwundet. Vor und zu definierten Zeitpunkten nach Verwundung wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels *Northern blot*-Analyse auf die Expression des *rip4*-Gens hin untersucht (A). Parallel wurden gleichermaßen behandelte Zellen nach ein und zwei Tagen auf den Verschluss der gesetzten Inzisionen hin beobachtet (B). Vergrößerung: 100-fach (oben), 300-fach (unten). Man beachte die nahezu vollständig ausbleibende Hemmung der *rip4*-Genexpression sowie die ausbleibende Reepithelisierung der mit Dexamethason vorbehandelten Zellen.

Wie in Abbildung 29A zu sehen ist, bewirkte die Präinkubation der Zellen mit Dexamethason vor der Verwundung tatsächlich eine nahezu vollständige Aufhebung der normalerweise durch Verwundung ausgelösten Hemmung der *rip4*-Genexpression. Zudem ließ sich zu späteren Zeitpunkten nach Verwundung beobachten, dass der Verschluss der gesetzten Inzisionen in den Dexamethason-behandelten Zellen nahezu vollständig ausblieb (Abb. 29B).

3.3.2 Signaltransduktionswege, die an der Regulation der *rip4*-Genexpression beteiligt sind

3.3.2.1 Die Regulation der *rip4*-Genexpression durch Serum und durch in vitro-Verwundung erfolgt unabhängig vom Proteinkinase C-Signaltransduktionsweg

Nachdem anhand der Induktionsstudien einige Wachstumsfaktoren und Zytokine, die eine Regulation der *rip4*-Genexpression in Keratinozyten bewirkten, identifiziert wurden, wurde darauf aufbauend der Frage nachgegangen, über welche intrazellulären Signaltransduktionswege diese Regulation vermittelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass aus der Aktivierung der PKC durch PMA eine massive Repression der *rip4*-Genexpression resultiert. Auf Grund dessen wurde zunächst analysiert, ob und gegebenenfalls in welchem Maße, die Hemmung der Signaltransduktion durch die verschiedenen PKC-Isoformen die seruminduzierte Repression der *rip4*-Genexpression aufhebt. Hierfür wurden die Zellen bereits eine Stunde vor der Seruminduktion jeweils sowohl mit einem Inhibitor aller Isoformen der PKC (GF 109203X), als auch mit einem inaktiven Strukturanalogen desselben (RO-31-6045) inkubiert. Für den ausgewählten Inhibitor wurde in anderen Studien bereits eine Wirksamkeit in den verwendeten HaCaT-Zellen bestätigt^[97].

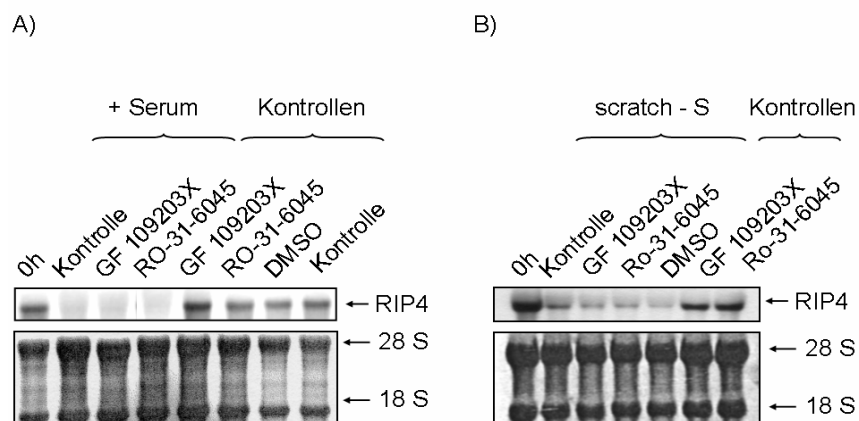


Abb. 30: Die serum- und verwundungsinduzierte *rip4*-Genrepression wird durch die Hemmung der Proteinkinase C nicht beeinflusst. Kultivierte HaCaT-Zellen wurden mit 10% Serum stimuliert (A) sowie verwundet (B) und nach drei Stunden auf die Regulation der *rip4*-Genexpression nach Hemmung der PKC hin untersucht. Je eine Charge wurde dabei mit einem Inhibitor der PKC (GF 109203X, 100 nM) bzw. mit einem inaktiven Strukturanalogon (RO-31-6045, 100 nM) inkubiert. Des Weiteren wurde der alleinige Effekt des Lösungsmittels beider Substanzen (DMSO) in gleicher Konzentration (100 nM) kontrolliert. Vor und drei Stunden nach Induktion und Verwundung wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und nach Auftragung von jeweils 2,5 µg (A), bzw. 4 µg (B) pro Spur mittels *Northern Blot* analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde, die unten abgebildeten Methylenblaufärbungen dienten zur Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung.

Wie Abbildung 30A zeigt, führte die alleinige Induktion mit Serum zu der typischen Kinetik der *rip4*-Genexpression mit einer maximalen Repression drei Stunden nach Versuchsbeginn. Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen den mit dem Inhibitor (GF 109203X) bzw. dessen Negativkontrolle (RO-31-6045) behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen zu erkennen. Auch die Behandlung nichtstimulierter Zellen (3h –Serum) mit dem Inhibitor hatte keinen Effekt auf die *rip4*-Genexpression. Ebenso hatte die Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor und der entsprechenden Negativkontrolle keinerlei Auswirkung auf die Expressionskinetik des *rip4*-Gens nach *in vitro*-Verwundung (Abb. 30B). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Hemmung der *rip4*-Genexpression durch Serum und Verwundung auch nach einer Blockade des PKC-Signaltransduktionswegs erfolgt.

Aufgrund der fehlenden Effekte musste die Wirksamkeit des Inhibitors in der verwendeten Konzentration und unter den verwendeten Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Expression des *Involucrin*-Gens mittels *Northern Blot*-Analysen analysiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression dieses Gens, das mit der frühen Keratinozytendifferenzierung assoziiert ist, durch GF 109203X nach zwei- bis dreitägiger Kultivierung der Zellen deutlich gehemmt wird ^[97]. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, konnte dieser Hemmeffekt auch in

unserer Versuchsreihe nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass GF 109203X unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen ein wirksamer Inhibitor der PKC-Signaltransduktion ist.

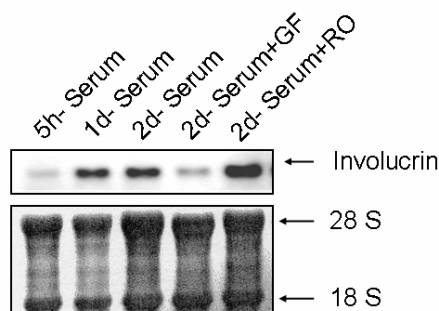


Abb. 31: Wirksamkeitskontrolle des verwendeten Inhibitors der Proteinkinase C. HaCaT-Zellen wurden nach Erreichen der vollständigen Konfluenz drei Tage in serumfreiem Medium kultiviert. Eine Charge der Zellen wurde zudem mit dem PKC-Inhibitor GF 109203X (GF, 100 nM), eine weitere mit dem inaktiven Strukturanalogon RO-31-6045 (RO, 100 nM) inkubiert. In 24-stündigen Intervallen wurde jeweils gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels *Northern Blot* auf die Expression des PKC-abhängigen *Involucrin*-Gens analysiert. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg RNA, die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen, im Rahmen dieser Arbeit generierten *Involucrin antisense* RNA-Sonde. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung ist die Methylenblaufärbung abgebildet.

3.3.2.2 Die Repression der *rip4*-Genexpression durch Serum und durch *in vitro*-Verwundung wird partiell über den p38-MAPK-Signaltransduktionsweg vermittelt

Ein weiterer Signaltransduktionsweg von ubiquitärer Relevanz ist der MAPK- (*Mitogen-Activated Protein Kinases*-) Weg. Die Familie der MAPKs umfasst wiederum mehrere Untergruppen von Kinasen, von denen mehrere von großer funktioneller Bedeutung in Keratinozyten sind ^[23]. Eine dieser Kinasen, die p38-Kinase ist insbesondere in die stressinduzierte Genregulation involviert, wobei in erster Linie überlebensfördernde Effekte vermittelt werden. Der entsprechende Signaltransduktionsweg wird dabei sowohl durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine als auch durch reaktive Sauerstoffintermediate aktiviert ^[23], welche, wie oben erwähnt, in hoher Konzentration im Wundgewebe vorliegen. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung einer Hemmung der p38-Kinase auf die seruminduzierte Repression der *rip4*-Genexpression untersucht. Der Versuchsablauf entsprach hierbei dem zuvor beschriebenen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 32 wiedergegeben und wird im Folgenden näher erläutert.

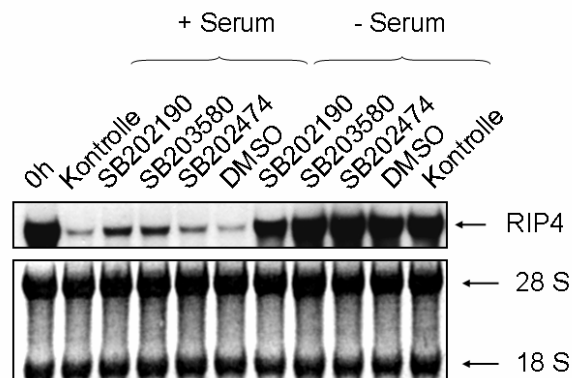


Abb. 32: Partielle Aufhebung der seruminduzierten *rip4*-Genrepression durch Inaktivierung der Mitogen-Activated Protein Kinase p38 (p38 MAPK). Kultivierte HaCaT-Zellen wurden für drei Stunden mit 10% Serum stimuliert, parallel wurde zusätzlich je ein Teil der Zellen mit zwei Inhibitoren der p38-MAPK (SB202190; SB203580, jeweils 10 μ M) bzw. mit einem inaktiven Strukturanalogon (SB202474, 10 μ M) inkubiert. Der alleinige Effekt des Lösungsmittels beider Substanzen (DMSO) in gleicher Konzentration wurde ebenfalls kontrolliert. Vor und drei Stunden nach Induktion wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und nach Auftragung von jeweils 4 μ g pro Spur mittels *Northern Blot* analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen *rip4*-RNA-Sonde, die unten abgebildete Methylenblaufärbung diente zur Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung.

Wie Abbildung 32 zeigt, führte eine Behandlung der Zellen mit den effektiven p38-Inhibitoren (SB 202190, SB 203580) zu einer sehr deutlichen Abschwächung der seruminduzierten Repression der *rip4*-Genexpression. Demgegenüber hatte eine Behandlung mit dem inaktiven Strukturanalogon des p38-Inhibitors (SB 202474) sowie mit dem Lösungsmittel beider Substanzen (DMSO) parallel zur Seruminduktion lediglich einen minimalen Effekt. Diese Daten zeigen, dass die p38-MAPK eine essentielle Rolle bei der Regulation der *rip4*-Genexpression durch Serum spielt.

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob dieser Signaltransduktionsweg auch für die verwundungsinduzierte Regulation der *rip4*-Expression *in vitro* von Bedeutung ist. Daher wurden HaCaT-Zellen parallel zur Verwundung mit SB 202190 behandelt. Hierbei zeigte sich in der Tat, dass nach Hemmung der p38-MAPK keine verwundungsinduzierte Repression der *rip4*-Genexpression mehr erfolgen konnte (Abb. 33).

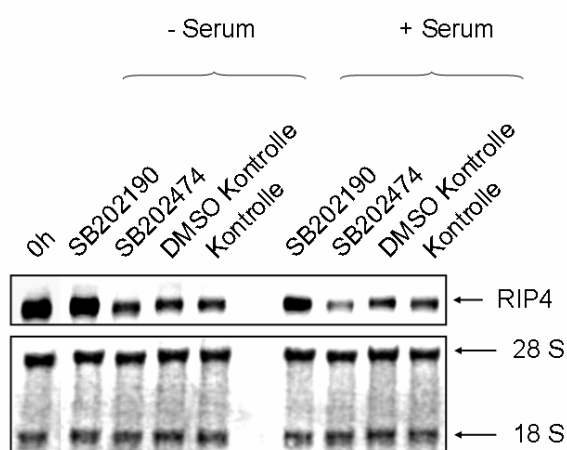


Abb. 33: Aufhebung der Repression der *rip4*-Genexpression nach *in vitro*-Verwundung durch Inaktivierung der Mitogen Activated Protein Kinase p38 (p38 MAPK). Kultivierte HaCaT-Zellen wurden zunächst jeweils mit einem Inhibitor der MAPK p38 (SB 202190, 10 μ M), einem inaktiven Strukturanalogen (SB 202474, 10 μ M) sowie mit DMSO (10 μ M) inkubiert. Nach 30-minütiger Präinkubation erfolgte die standardisierte Verwundung der Zellen, wobei teilweise eine zusätzliche Stimulation mit Serum durchgeführt wurde. Vor sowie eine Stunde nach der Verwundung wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und nach Auftragung von jeweils 1 μ g pro Spur mittels *Northern Blot* analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen *rip4*RNA-Sonde, die unten abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation der *rip4*-Genexpression in den HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Serum sowie nach Verwundung zumindest partiell über den Signaltransduktionsweg der p38-Kinase erfolgt.

3.3.2.3 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung führt *in vitro* zu einer konstitutiven Expression des *rip4*-Gens

Der Signaltransduktionsweg der p38-MAPK führt, wie eine Vielzahl weiterer Signalwege, zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Daher stellte sich die Frage, ob eine Aktivierung von NF- κ B direkt die Expression des *rip4*-Gens regulieren kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden zwei etablierte Inhibitoren dieses Transkriptionsfaktors (Curcumin und Lactacystin), auf Auswirkungen auf die *rip4*-Genexpression hin untersucht. Curcumin ist der pharmakologisch wirksame Hauptbestandteil des *curcuma longa* und galt lange als klassischer NF- κ B-Inhibitor ^[121], wenngleich inzwischen die komplexen antiinflammatorischen und direkt antioxidativen Wirkungen, die zum Teil über die Hemmung anderer Transkriptionsfaktoren als NF- κ B vermittelt werden, im Vordergrund stehen ^[22]. Das ursprünglich aus *Actinomyces* isolierte Lactacystin

wirkt dagegen als irreversibler Inhibitor der zellulären Proteasomkomplexe. Dadurch wird einerseits der Abbau des NF- κ B-Inhibitors I κ B α verhindert, was in einer Hemmung von NF- κ B resultiert, andererseits werden jedoch auch durch diese Substanz weitere Signaltransduktionswege und einzelne Transkriptionsfaktoren inhibiert^[67].

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden HaCaT-Zellen mit H₂O₂, welches ein potenter NF- κ B-Aktivator ist^[69, 77] und außerdem, wie oben beschrieben, eine Hemmung der *rip4*-Genexpression bewirkt, stimuliert. Parallelkulturen wurden wahlweise mit Curcumin oder Lactacystin behandelt. Wie in Abbildung 34 dargestellt, erfolgte in der Tat nach Behandlung mit beiden Faktoren keine H₂O₂-induzierte Repression der *rip4*-Genexpression mehr.

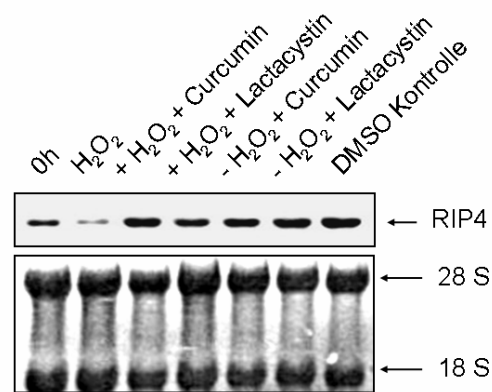


Abb. 34: Aufhebung der H₂O₂-induzierten Hemmung der *rip4*-Genexpression durch Curcumin und Lactacystin. Kultivierte HaCaT-Zellen wurden mit den NF- κ B-Inhibitoren Curcumin sowie Lactacystin inkubiert. Nach einstündiger Präinkubation erfolgte die Zugabe von 1 mM H₂O₂. Der Effekt auf die induzierte *rip4*-Genrepression wurde mittels *Northern Blot* analysiert, wobei pro Spur je 2 μ g gesamtzellulärer RNA aufgetragen wurden. Die unten abgebildete Methylenblaufärbung diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren.

Diese Daten lassen vermuten, dass die Regulation der *rip4*-Genexpression zumindest partiell über dessen Effektor NF- κ B erfolgt, wenngleich aufgrund der durchgeführten Analysen nicht auszuschließen ist, dass hierbei auch andere Faktoren eine Rolle spielen.

3.3.3 *Zwischenzusammenfassung II*

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Regulationsmechanismen der *rip4*-Genexpression *in vitro* analysiert. Hierbei konnten gezeigt werden, dass in kultivierten Keratinozyten die Expression dieses Gens sowohl durch verschiedene

für die Wundheilung relevante Wachstumsfaktoren und Zytokine als auch durch den PKC-Aktivator PMA massiv reprimiert wird. Demgegenüber ließ sich nach Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason sowie mit Retinolsäure (Vit.A) eine Induktion der Genexpression nachweisen.

Des Weiteren konnte mittels spezifischer Inhibitoren eine Partizipation des p38 MAPK-Signaltransduktionsweges an der Regulation der *rip4*-Genexpression durch Serum und durch Verwundung nachgewiesen werden. Demgegenüber ist eine Aktivierung der PKC für die serum- und verwundungsinduzierte Repression der *rip4*-Expression nicht erforderlich. Unter Verwendung von Substanzen, welche unter anderem eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bewirken, konnten zudem erste Hinweise darauf erhalten werden, dass auch die Expression des *rip4*-Gens zumindest partiell durch NF- κ B kontrolliert werden könnte.

3.4 Hemmung der *rip4*-Genexpression mittels spezifischer siRNA: Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten kultivierter Keratinozyten

Im bisherigen Verlauf dieser Arbeit konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die an der Regulation der Expression des *rip4*-Gens beteiligt sind. Darauf aufbauend wurde der Frage nachgegangen, welche funktionelle Bedeutung die Regulation der *rip4*-Genexpression in Epidermiszellen haben könnte, insbesondere in Hinblick auf die für die Wundheilung relevanten Prozesse der Keratinozytenproliferation und -differenzierung.

Hierfür sollte die *rip4*-Expression in HaCaT-Zellen mittels spezifischer siRNAs gehemmt werden. Das Prinzip der Behandlung mit siRNA (*small interfering RNA*) basiert auf einem in der Zelle natürlich vorkommenden Vorgang. Hierbei werden 21 bis 25 Basenpaar (bp) lange RNA-Oligonukleotide aus einem doppelsträngigen Präkursormolekül gespalten, vermittelt durch eine Nuklease der RNase III-Familie, welche als *Dicer* bezeichnet wird. Die sequenzspezifischen doppelsträngigen siRNA-Moleküle werden nach ihrer Aufwindung durch eine Helikase in einen aus mehreren Komponenten bestehende Komplex integriert, dem so genannten *RNA-induced silencing complex* (RISC). Der *antisense*-Strang der siRNA dirigiert diesen Komplex über dessen Sequenz zu der homologen Ziel-mRNA. Nach Bildung einer Duplex-Struktur aus siRNA und mRNA erfolgt die Degradation durch eine Endonuklease, welches letztendlich spezifisch die Hemmung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt ^[136].

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten HaCaT-Zellen mit kommerziell erhältlicher *rip4*-spezifischer siRNA transfiziert und auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten untersucht.

3.4.1 Etablierung und Optimierung der Transfektionsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit drei unterschiedlichen *rip4*-spezifischen siRNAs der Firma Ambion gearbeitet, welche zunächst bezüglich ihrer Effizienz in HaCaT-Zellen verglichen wurden. Zur Transfektion standen ebenfalls zwei verschiedene Reagenzien der Firma Ambion (siPORT™ *Amine*, siPORT™ *NeoFX*™) zur Verfügung. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass nach Transfektion unter Standardbedingungen mit zwei siRNA-Spezies (siRNA#1 und #2) eine ca. 90%-ige Hemmung der *rip4*-Genexpression erzielt werden konnte, während für die dritte (siRNA#3) kein Effekt nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Als optimales Transfektionsreagenz stellte sich siPORT™ *NeoFX*™ in einer Konzentration von 5-8 µl/ml heraus. Abbildung 35 zeigt dabei exemplarisch die nach Transfektion von *rip4*siRNA#2 erzielte Hemmung der *rip4*-Genexpression. Die im Folgenden beschriebenen funktionellen Analysen wurden dementsprechend mit beiden effizienten Spezies (*rip4*-siRNA#1, *rip4*-siRNA#2) oder lediglich mit *rip4*-siRNA#2 durchgeführt. Zudem wurde zur Überprüfung unspezifischer Effekte jeweils eine Negativkontrolle mit einer Sequenz-unspezifischen siRNA (*scrambled*) sowie unbehandelter Zellen (Kontrolle) durchgeführt.

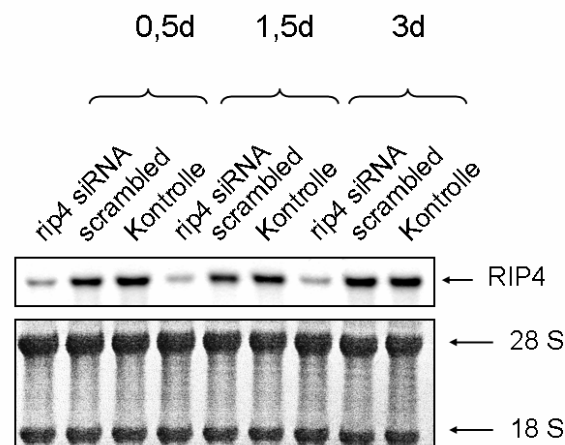


Abb. 35: Effizienz der *rip4*-RNA Interferenz. Kultivierte HaCaT-Zellen wurden während des Aussäens mit *rip4*-siRNA, bzw. einer entsprechenden Kontroll-siRNA (*scrambled*) transfiziert. Nach sechsständiger Inkubation wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches, serumfreies Medium ersetzt. 0,5, 1,5 sowie 3 Tage später wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels *Northern Blot* unter Verwendung einer *rip4*-spezifischen RNA-Sonde auf die Effizienz der RNA-Interferenz hin analysiert. Die ebenfalls abgebildete Methylenblaufärbung diente zu Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren, wobei pro Spur je 1,5 µg gesamtzellulärer RNA aufgetragen wurden.

3.4.2 Einfluss der rip4-Genexpression auf die Proliferationsrate und die Expression proliferationsassoziierter Gene in kultivierten Keratinozyten

Zunächst wurde die Auswirkung der rip4-RNA Interferenz auf das Proliferationsverhalten der kultivierten HaCaT-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen im Verlauf der Transfektion in Kammerobjektträger überführt. Nach anschließender zehnstündiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde ein Wechsel des Mediums vorgenommen, wobei jeweils eine Hälfte der Zellen in serumhaltigem, die andere Hälfte in serumfreiem Medium weiterkultiviert wurde. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Analysen als Nullstundenwert definiert. Die Markierung der proliferierenden Zellen erfolgte anschließend sowohl nach 12 als auch nach 24 Stunden mit Hilfe der BrdU-Methode. Diese basiert auf dem Prinzip, dass lediglich proliferierende Zellen das Thymidinanalogon BrdU (5-Bromo-2-Desoxyuridin) zur DNA-Synthese inkorporieren, welches nachfolgend mit Hilfe eines entsprechenden primären sowie eines fluochromkonjugierten sekundärem Antiköpers immunfluorimetrisch nachgewiesen werden kann. Bei den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden die Zellen über 30 min mit BrdU behandelt, der sekundäre FITC-gekoppelte Antikörper ermöglichte nachfolgend die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 500 nm, wobei sich FITC durch ein grünes Signal nachweisen ließ Parallel zu der BrdU-Markierung wurde jeweils eine kernspezifische Färbung mit DAPI, welches sich am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 365 nm durch ein blaues Signal nachweisen ließ, durchgeführt.

A) 24h Kultivierung - Serum

B) 24h Kultivierung + Serum

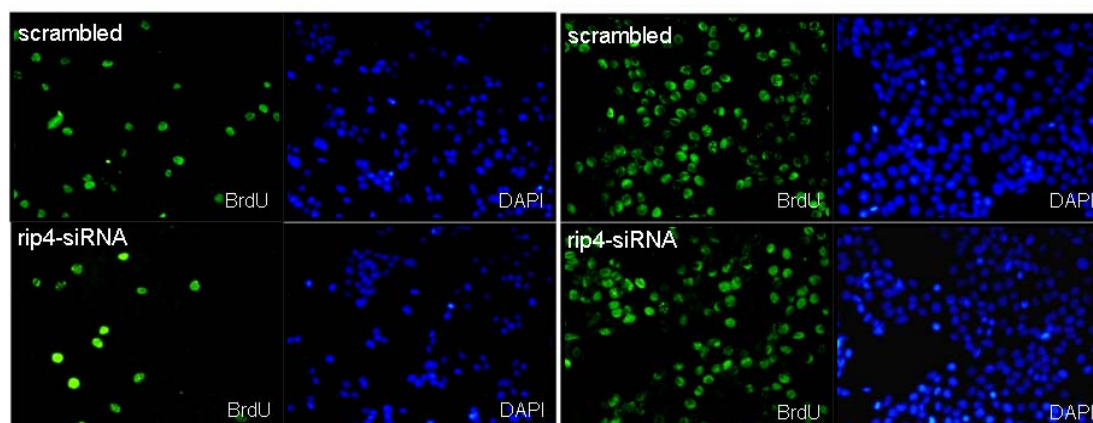


Abb. 36: Darstellung der proliferierenden Zellen mittels BrdU-Inkorporation. Exemplarisch abgebildet sind die jeweils mit rip4-siRNA, sowie mit einer Negativ-Kontrolle (*scrambled*) transfizierten Zellen nach BrdU-Markierung. Die Analyse der Proliferationsrate erfolgte 24 Stunden nach der Zugabe des serumfreien (A) bzw. serumhaltigen (B) Mediums. Rechts ist zudem jeweils die entsprechende Zellkernfärbung mit DAPI gezeigt.

Nach Auszählung wurde dann der Prozentsatz der BrdU-markierten Zellkerne im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne innerhalb eines definierten Ausschnitts berechnet. Zur statistischen Auswertung wurde so anhand der in vier unabhängig voneinander erfolgten Versuchsreihen erhaltenen Werte die Proliferationsrate ermittelt, wobei pro Versuchsreihe und Zellcharge jeweils eine statistisch relevante Anzahl der definierten Ausschnitte ausgezählt wurde. Die hierbei erhaltenen prozentualen Werte der proliferierenden (BrdU markierten) Zellen wurden nachfolgend unter Verwendung von Excel in Balkendiagrammen graphisch dargestellt (siehe Abbildung 37).

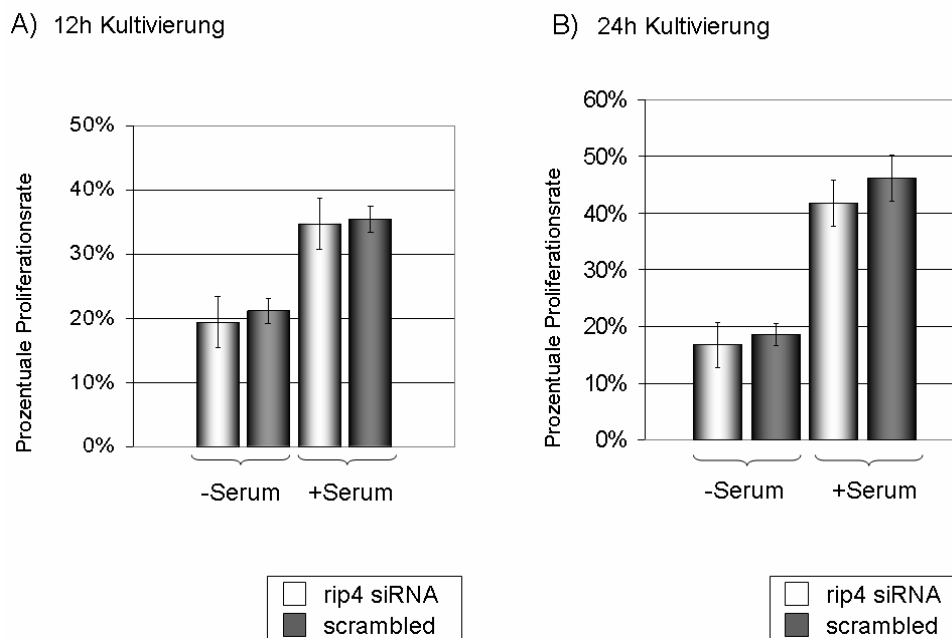


Abb. 37: Vergleichende Darstellung der Proliferationsrate kultivierter HaCaT-Zellen nach rip4-RNA Interferenz. Abgebildet ist die statistische Auswertung der Proliferationsraten von rip4-siRNA transfizierten HaCaT-Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einer Negativkontrolle (*scrambled*) transfiziert wurden. Die Identifizierung der proliferierenden Zellen erfolgte mittels BrdU-Markierung. Der prozentuale Wert der Proliferationsrate wurde aus dem Verhältnis proliferierender Zellen zu der Gesamtzellzahl eines definierten Ausschnittes ermittelt.

In den durchgeführten Analysen konnte kein statistisch signifikanter Effekt der Hemmung der *rip4*-Expression auf die Proliferationsrate der HaCaT-Zellen ermittelt werden, wenngleich eine tendenziell etwas geringere Proliferationsrate in den mit rip4-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten war (Abb. 37).

Parallel zu den BrdU-Studien wurde aus transfizierten Zellen zudem gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels *Northern blot* auf die Expression des für Zytokeratin 14 (K14) kodierenden Gens hin untersucht. In intakter Epidermis wird K14 lediglich in den proliferierenden Keratinozyten der Basalschicht exprimiert und ist daher ein epidermaler Proliferationsmarker ^[35].

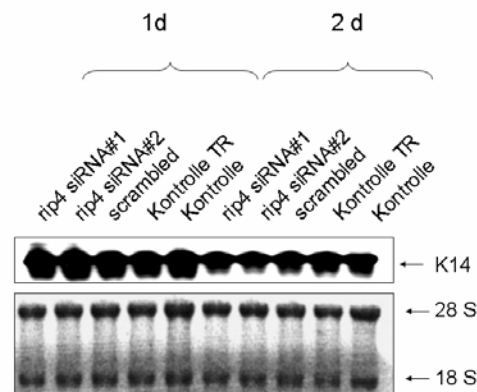


Abb. 38: Expression des *k14*-Gens nach *rip4*-RNA Interferenz. Gezeigt ist die *Northern Blot*-Analyse eines *rip4*-siRNA Versuches. Ein und zwei Tage nach Überführung der transfizierten Zellen in Standard-Medium wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und im weiteren Verlauf mit einer spezifischen *k14 antisense* RNA-Sonde hybridisiert. Die abgebildete Methylenblaufärbung diente zur Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren, wobei jeweils 1,5 µg RNA aufgetragen wurden.

Wie Abbildung 38 zeigt, war in HaCaT-Zellen eine sehr starke Basalexpression des *k14*-Gens nachweisbar. Jedoch hatte die Behandlung mit *rip4*-spezifischer siRNA keinen Einfluss auf das Expressionsniveau dieses Gens.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine Hemmung der *rip4*-Expression die Proliferationsrate kultivierter Keratinozyten nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß beeinflusst.

3.4.3 Einfluss von *RIP4* auf die Expression differenzierungsassoziierter Gene in kultivierten Keratinozyten

Nachdem eine entscheidende Rolle des *rip4*-Gens bei der Regulation der Keratinozytenproliferation nicht nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern dieses Gen eine funktionell relevante Komponente für den Differenzierungsprozesses dieser Zellen darstellt. Um diese Frage zu klären, wurde im weiteren Verlauf die Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker in den transfizierten Zellen analysiert. Hierfür wurde zunächst Proteinlysate hergestellt und

mittels *Western Blot*-Analyse auf die Expression des für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor (Cdk-Inhibitor) p21 kodierenden Gens hin untersucht. Das entsprechende Protein wird in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und bewirkt über die Hemmung der G1/S-Cdk und S-Cdk ein Verharren der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus und damit eine Hemmung der Proliferation ^[140]. Somit ist das p21-Gen ein Marker für nichtproliferierende Zellen.

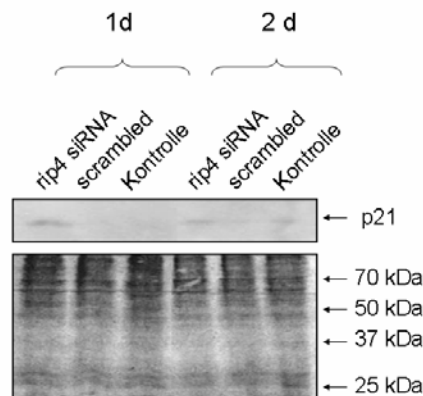


Abb. 39: Moderate Induktion des Cdk-Inhibitors p21 in mit rip4-siRNA transfizierten HaCaT-Zellen. Einen sowie zwei Tage nach Überführung der transfizierten Zellen in serumhaltiges Standardmedium erfolgte die Isolierung gesamtzellulären Proteins. Pro Spur wurden 18,4 µg desselben aufgetragen und mittels *Western Blot*-Analyse auf Expression des *p21*-Gens hin analysiert. Die dem 21 kDa großen p21 entsprechende Bande ist markiert. Die abgebildete Ponceau S-Färbung diente zur Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren. Man beachte die leichte Induktion der *p21*-Expression in den behandelten Zellen zum Zeitpunkt 1d.

Wie aus Abbildung 39 hervorgeht, ließ sich dabei zum Zeitpunkt 1d nach Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium eine minimal höhere p21-Menge in den mit rip4-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen. Bereits einen Tag später waren jedoch kaum noch Unterschiede zu beobachten.

Hierauf aufbauend wurde nun die Expression spezifischer epidermaler Differenzierungsmarker analysiert. Diese Marker sind charakteristisch für verschiedene Differenzierungszustände der Keratinozyten. Dabei wird die Expression der entsprechenden Gene in HaCaT-Zellen erst nach einer gewissen Kultivierungszeit der Zellen in serumfreiem Medium induziert ^[109], weswegen die Zellen im Zuge der nachfolgend beschriebenen Analysen im Anschluss an die Transfektion stets in Medium ohne Zusätze kultiviert wurden.

Hierbei wurde zunächst die Expression des für Zytokeratin 10 (K10) kodierenden Gens in den transfizierten Zellen analysiert. Das *k10*-Gen wird in der Haut *in vivo* ausschließlich von den Zellen der suprabasalen Zellschichten, welche aus dem

Zellzyklus ausgetreten und bereits in den Prozess der terminalen Differenzierung eingetreten sind, exprimiert ^[35].

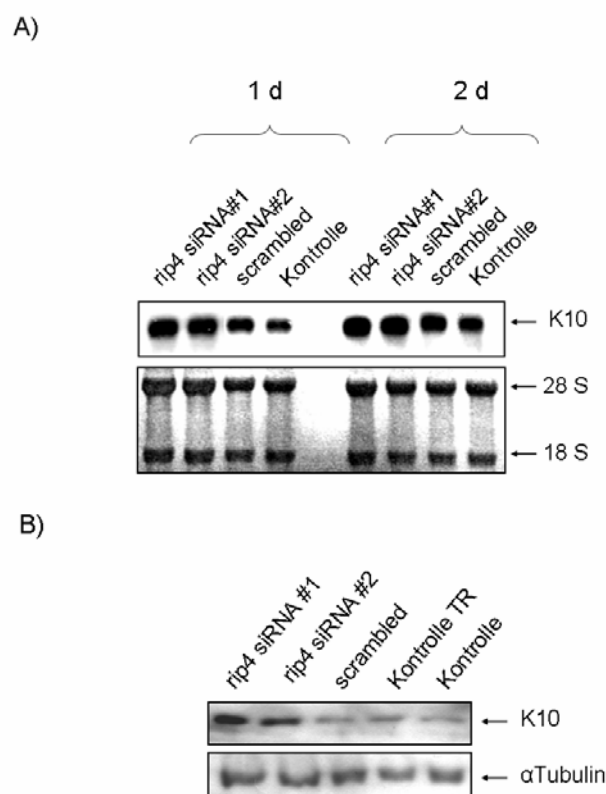


Abb. 40: Induktion der Expression des *k10*-Gens nach *rip4*-RNA Interferenz. Abgebildet ist die *Northern Blot*- (A) sowie *Western Blot*-Analyse (B) einer siRNA-Versuchsreihe. Zur Analyse der *k10*-Genexpression wurde einen und zwei Tage nach Überführung der Zellen in serumfreies Medium gesamtzelluläre RNA isoliert. Nach dem Auftragen von je 2 µg erfolgte die Hybridisierung der Membran mit einer spezifischen K10 *antisense* RNA-Sonde (A). Die abgebildete Methylenblaufärbung diente hierbei zu Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung. Zur Analyse des K10-Proteingehaltes in den Zellen wurde einen Tag nach dem Mediumwechsel gesamtzelluläres Protein isoliert (B). Aufgetragen wurden hiervon jeweils 18,4 µg, die im Rahmen der *Western Blot*-Analyse mit einem spezifischen K10-Antikörper inkubiert wurden. Die Bande des 56 kDa großen K10 sowie des 55 kDa großen αTubulin sind markiert, wobei der einheitliche Gehalt des αTubulins in den Lysaten als Nachweis für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente.

Wie Abbildung 40 zeigt, war die Expression dieses mit der frühen Keratinozyten-differenzierung assoziierten Gens in den transfizierten Zellen sehr deutlich induziert. Diese Unterschiede im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen waren sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zu beobachten.

Darauf aufbauend wurde vermutet, dass RIP4 auch für die mittlere und spätere Phase der Keratinozytendifferenzierung relevant sein könnte, weswegen die Expression weiterer, für diese Phasen charakteristischer, Markergene analysiert wurde. Das *involucrin*-Gen, welches für ein Strukturprotein kodiert, wird in der Haut im wesentlichen von den Keratinozyten des *stratum spinosum* exprimiert, welche sich in einer mittleren bis späten Phase der Differenzierung befinden^[35].

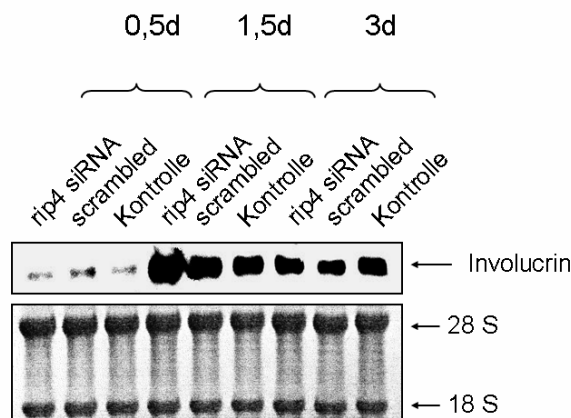


Abb. 41: Moderate Induktion der *involucrin*-Genexpression in mit rip4-siRNA behandelten HaCaT-Zellen. Northern Blot-Analyse einer rip4-siRNA Versuchsreihe zur Analyse der *involucrin*-Expression. 0,5, 1,5 sowie 3 Tage nach Überführung der transfizierten Zellen in serumfreies Medium wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und im Verlauf der Northern Blot-Analyse mit einer spezifischen Involucrin *antisense* RNA-Sonde hybridisiert. Pro Spur wurden jeweils 1,5 µg RNA aufgetragen, die abgebildete Methylenblaufärbung diente hierbei zur Kontrolle des gleichmäßigen Auftrags.

Wie Abbildung 41 zeigt, konnte in der Tat nach etwa 1,5 Tagen in den mit rip4-siRNA behandelten Zellen eine verstärkte Expression des *involucrin*-Gens im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen werden. Nach drei Tagen waren jedoch keine Unterschiede mehr nachzuweisen.

Um ein möglichst umfassendes Spektrum differenzierungsassoziierter Gene abzudecken, wurde abschließend die Expressionskinetik des *transglutaminase I*-Gens in den transfizierten Zellen untersucht. Dieses Gen kodiert für ein Enzym, das im Hautgewebe lediglich von den Zellen des *stratum granulosum* exprimiert wird und dementsprechend einen eher späten Differenzierungsmarker darstellt. *In vivo* unterliegt dieses Enzym jedoch zudem der Aktivierung durch Kalzium erst in den sich nach außen hin anschließenden Hautschichten des *stratum corneum*^[104].

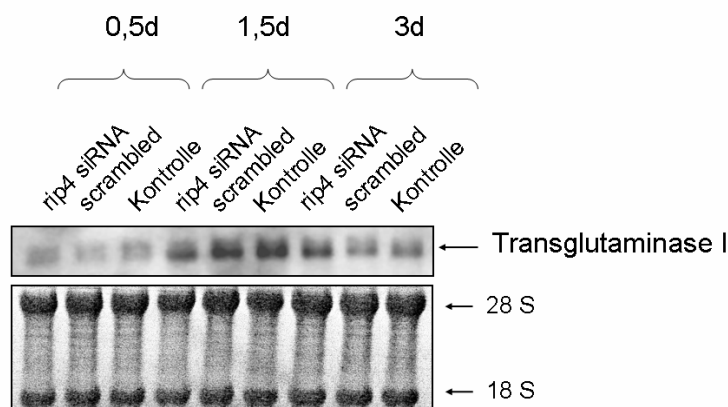


Abb. 42: Verzögerte Expression des *Transglutaminase I*-Gens als Folge der *rip4*-RNA Interferenz in HaCaT-Zellen. Northern Blot-Analyse einer *rip4*-siRNA Versuchsreihe zur Analyse der Expression des *Transglutaminase I*-Gens (TG I). 0,5, 1,5 sowie 3 Tage nach Überführung der transfizierten Zellen in serumfreies Medium wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und im Verlauf der Northern Blot-Analyse mit einer spezifischen TGI *antisense* RNA-Sonde hybridisiert. Pro Spur wurden jeweils 1,5 µg RNA aufgetragen, die abgebildete Methylenblaufärbung diente hierbei zur Kontrolle des gleichmäßigen Auftrags.

Die über einen Verlauf von drei Tagen analysierte Expressionskinetik dieses mit der späten Differenzierung assoziierten Gens zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den mit *rip4*-siRNA behandelten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (siehe Abbildung 42). Insgesamt war die TG I-Induktion in den transfizierten Zellen verzögert, was dafür spricht, dass eine Hemmung der *rip4*-Expression mit einer verzögerten Expression terminaler Differenzierungsmarker assoziiert ist.

3.4.4 Zwischenzusammenfassung III

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde eine mögliche funktionelle Bedeutung des RIP4-Proteins als Regulator der Keratinozytenproliferation und –differenzierung *in vitro* analysiert. Hierfür wurde die Expression dieses Gens in HaCaT-Zellen mittels spezifischer siRNAs gehemmt. In den nachfolgenden Untersuchungen konnte kein signifikanter Effekt von RIP4 auf die Proliferationsrate der Keratinozyten nachgewiesen werden. Demgegenüber wurden deutliche Effekte bezüglich der Expression differenzierungsassoziierter Gene beobachtet, wobei sowohl die mit der frühen als auch die mit der fortgeschrittenen Differenzierungsphase assoziierten Gene betroffen waren. Diese Daten zeigen, dass RIP4 ein Regulator der Keratinozytendifferenzierung ist.

3.5 Die RIPs und deren funktionelle Bedeutung als Aktivatoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Haut und bei der Wundheilung

Abgesehen von RIP5 sind alle RIP-Proteine Adaptorproteine für Rezeptoren des TNFR-I-Typs und auf diese Weise an der Regulation des NF- κ B-Signaltransduktionswegs beteiligt, weswegen im letzten Teil dieser Arbeit die Bedeutung von RIP4 für die NF- κ B-Aktivierung in Keratinozyten analysiert wurde. Da über eine mögliche Rolle von NF- κ B bei der Wundheilung der Haut vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt gewesen war, wurde zudem die Regulation der Aktivität dieses Transkriptionsfaktors während der Wundheilung *in vivo* mittels deskriptiver und funktioneller Studien untersucht.

3.5.1 In kultivierten Keratinozyten bewirkt RIP4 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Zunächst wurde die funktionelle Bedeutung des RIP4-Proteins für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den kultivierten Keratinozyten untersucht. Diese Analysen wurden ebenfalls mittels rip4-RNA Interferenz analog der bereits beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Der Nachweis des aktiven NF- κ B erfolgte hierbei indirekt über die Detektion des NF- κ B-Inhibitorproteins I κ B α . Der Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt im Zytosol gebunden an sein Inhibitorprotein I κ B α vor. Dessen Phosphorylierung und nachfolgende Degradation initiiert die Freisetzung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Ein hoher Gehalt der Zelle an I κ B α korreliert daher mit einem geringen Gehalt an aktivem NF- κ B.

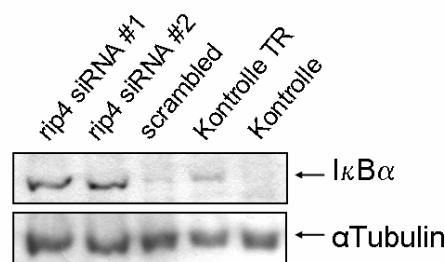


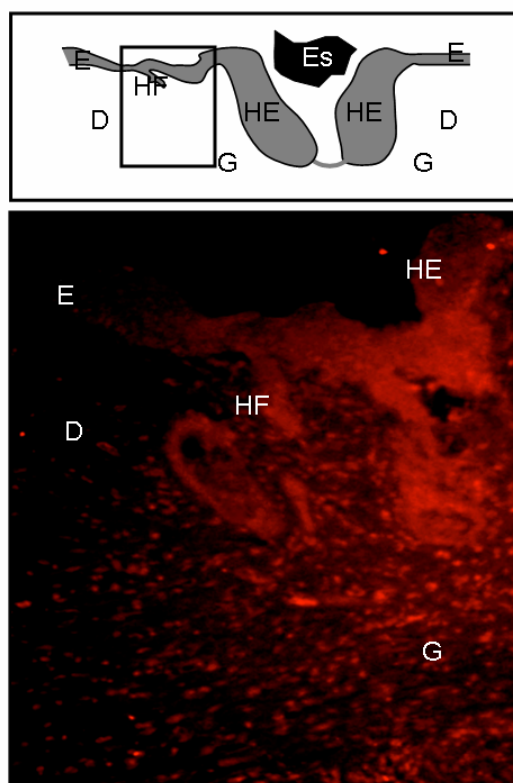
Abb. 43: Inhibierte NF- κ B-Aktivierung in HaCaT-Zellen, die mit rip4-spezifischer siRNA behandelt worden waren. Western Blot-Analyse zum Nachweis des NF- κ B-Inhibitors I κ B α nach rip4-RNA Interferenz. Gezeigt ist eine rip4-siRNA Versuchsreihe, in der 24 Stunden nach Überführung der transfizierten Zellen in serumfreies Medium gesamtzelluläres Proteinlysate isoliert wurde. Aufgetragen wurden hiervon jeweils 18,4 μ g, die im Rahmen der Western Blot-Analyse mit einem spezifischen I κ B α Antikörper inkubiert wurden. Die Bande des 36 kDa großen I κ B α sowie des 55 kDa großen α Tubulin sind markiert, wobei der einheitliche Gehalt des α Tubulins in den Lysaten als Nachweis einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren diente.

Wie in Abb. 43 veranschaulicht konnte so eine Aktivierung von NF- κ B durch das RIP4-Protein in Keratinozyten nachgewiesen werden, wobei sich bereits einen Tag nach Transfektion eine eindeutige Korrelation zwischen der *rip4*-mRNA Menge in den Zellen und deren Gehalt an aktivem NF- κ B zeigte.

3.5.2 Aktivierung von NF- κ B im Heilungsverlauf muriner Exzisionswunden

Da die Expression des *rip4*-Gens bei der Wundheilung wie beschrieben einer massiven Regulation unterliegt, wurde im Folgenden nun die Regulation der Aktivität seines Effektors NF- κ B im Wundheilungsverlauf *in vivo* analysiert. Um hierbei zu untersuchen, in welchen Zelltypen innerhalb des Wundgewebes eine Aktivierung von NF- κ B vorliegt, wurden histologische Schnitte muriner Exzisionswunden mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Dabei machte man sich die Tatsache zunutze, dass das aktivierte NF- κ B im Gegensatz zur inaktiven Form ausschließlich im Nukleus der Zelle zu finden ist. Zum Nachweis wurde ein gegen die NF- κ B-Untereinheit p65 (RelA) gerichteter primärer Antikörper verwendet.

Abb. 44: NF- κ B-Aktivierung im Granulationsgewebe einer drei Tage alten Exzisionswunde. Nachweis des aktiven NF- κ B (p65) mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die obere schematische Darstellung des Wundareals dient als Orientierungshilfe, wobei der schwarz markierte Bereich den Ausschnitt der unten abgebildeten Fluoreszenzaufnahme darstellt. Die Detektion des aktiven NF- κ B erfolgte durch einen primären Antikörper, welcher sich spezifisch gegen die Untereinheit p65 richtete, sowie einen sekundären, Cy3-gekoppelten Antikörper. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 570 nm, hierbei stellt sich Cy3 rot dar. Bei einer parallel durchgeführten Kontrollfärbung, die der gleichen Färbeprozedur mit Ausnahme des primären Antikörpers unterzogen wurde, ließ sich kein Signal nachweisen. Man beachte die Signalintensität im Bereich des Granulationsgewebes sowie im unteren Bereich des sich bildenden hyperproliferativen Epithels. Vergrößerung: 150-fach. Abkürzungen: E: Epidermis, HE: hyperproliferatives Epithel, D: Dermis, G: Granulationsgewebe, HF: Haarfollikel, ES: Wundschorf.



Wie Abb. 44 zeigt, konnte dabei bei den histologischen Präparaten der frühen Wundheilungsphase (Tag drei nach Verwundung) eine äußerst massive Aktivierung von NF- κ B insbesondere im Bereich des Granulationsgewebes nachgewiesen werden. Zudem konnte die Aktivierung des NF- κ B im Bereich des sich zu diesem Zeitpunkt formierenden hyperproliferativen Epithels gezeigt werden. Die Aktivierung in diesem Gewebe ließ sich in den histologischen Schnitten der fortgeschrittenen Wundheilung (Tag fünf nach Verwundung) noch deutlicher nachweisen, wie in Abbildung 45 dargestellt.

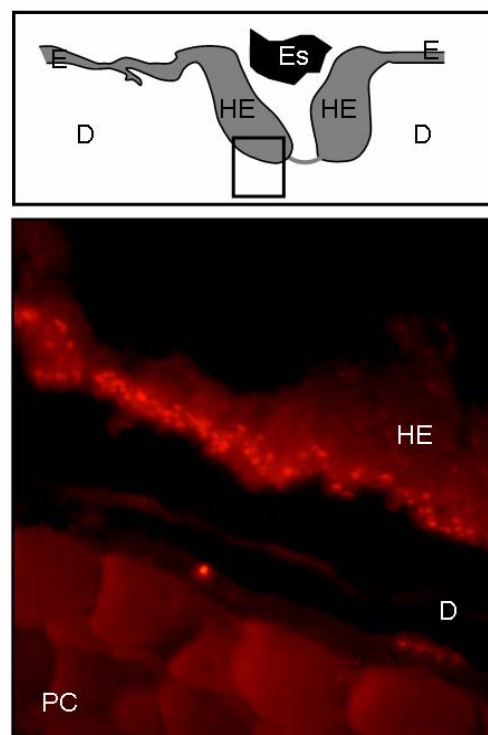


Abb. 45: NF- κ B-Aktivierung im hyperproliferativen Epithel einer fünf Tage alten Exzisionswunde. Nachweis des aktiven NF- κ B (p65) mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die obere schematische Darstellung des Wundareals dient wiederum als Orientierungshilfe, wobei der schwarz markierte Bereich den Ausschnitt der unten abgebildeten Fluoreszenzaufnahme darstellt. Die Detektion des aktiven NF- κ B erfolgte wie unter Abbildung 44 beschrieben. Man beachte die Signalintensität am unteren Rand des hyperproliferativen Epithels. Vergrößerung: 300-fach. Abkürzungen: E: Epidermis, HE: hyperproliferatives Epithel, D: Dermis, PC: *panniculus carnosus*, ES: Wundschorf.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass sowohl im Granulationsgewebe als auch im Bereich des hyperproliferativen Epithels der Transkriptionsfaktor NF- κ B zumindest teilweise in aktivierter Form vorliegt.

Die Aktivierung im Bereich des Granulationsgewebes deutet hierbei auf eine Assoziation mit eingewanderten Entzündungszellen hin, dies steht im Einklang mit der einschlägigen Literatur, in der eine substantielle Bedeutung von NF- κ B für die Entwicklung und Aktivierung unterschiedlicher Entzündungszellen bereits bekannt ist [70]. Über eine mögliche Funktion von NF- κ B in den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels ist jedoch bisher nichts bekannt.

3.5.3 Die Expression eines NF- κ B-Superrepressors *in vivo* führt zu einer aberranten Expression und Regulation der *rip*-Gene

Die differentielle Aktivierung von NF- κ B in Wundgewebe legte nahe, dass eine Funktion der RIP-Proteine beim Heilungsprozess die Regulation der Aktivität von NF- κ B sein könnte. Dies sollte nun genauer untersucht werden, wobei vor Beginn dieser Arbeit über die Aktivierungsmuster und die Funktion von NF- κ B in Wundgewebe nichts bekannt gewesen war.

Zur Analyse der Funktionen von NF- κ B *in vivo* stehen verschiedene transgene und *knockout*-Mausmodelle zur Verfügung [98]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem transgenen Mausmodell gearbeitet, das durch die ubiquitäre Überexpression eines NF- κ B-Superrepressors (IkB α DN) charakterisiert ist. Bei dieser Mutante führt der gezielte Austausch von Aminosäuren des IkB α zu einem konstitutiv exprimierten Superrepressor des NF- κ B, einhergehend mit einer nahezu vollständig aufgehobenen NF- κ B-Aktivität [64, 111].

3.5.3.1 Der Wundheilungsphänotyp von IkB α DN-Mäusen

Zur Analyse des Haut- und Wundheilungsphänotyps dieser Tiere wurden zunächst IkB α DN-Mäuse sowie jeweils altersentsprechende Kontrollmäuse verwundet und histologisch untersucht. Hierbei zeigte sich in den transgenen Mäusen bereits 24 Stunden nach Verwundung eine hochgradig verstärkte Entzündungsreaktion, deren Ausmaß bis zum dritten Tag nach Verwundung noch deutlich zunahm. Zu diesem Zeitpunkt zeigte zudem das sonst typischerweise zungenförmige Granulationsgewebe in den transgenen Mäusen eine diffuse Streuung, die sich bis unterhalb des dermalen *panniculus carnosus* erstreckte. Zudem ließen sich in den histologischen Präparaten der IkB α DN-Mäuse drei Tage nach Verwundung diffus verteilte eosinophile Matrix-Ansammlungen detektieren. Selbige stellten sich als Auflagerungen der Epidermis ebenfalls am Wundrand dar. In Abbildung 46 ist der vergleichende Befund histologischer Präparate drei Tage alter Exzisionswunden dargestellt.

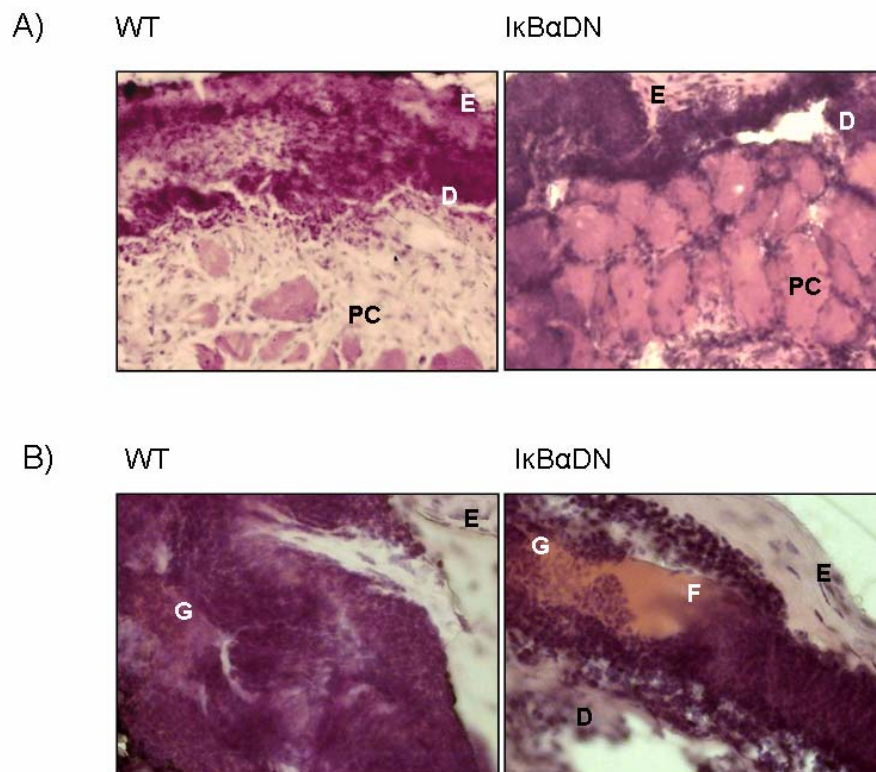


Abb. 46: HE-Färbung drei Tage alter Exzisionswunden von Wildtypmäusen (WT) sowie von Mäusen, welche einen überstabilen Inhibitor des NF- κ B exprimieren (I κ B α DN). Auf dem Rücken der jeweiligen Mäuse wurden Exzisionswunden, die sämtliche Hautschichten sowie den *panniculus carnosus* umfassten, generiert und nach drei Tagen isoliert. Zur Darstellung der Gewebestrukturen wurden 8 μ m dicke Gefrierschnitte der Wundmitte mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt. Man beachte die diffuse, bis unter den *panniculus carnosus* reichende Verteilung der Hämatoxylin-gefärbten Entzündungszellen in den Schnitten der I κ B α DN-Mäuse (A), sowie die mit F gekennzeichneten zellfreien Matrixansammlungen derselben (B). Vergrößerung: A: 100-fach, B: 300-fach. Abkürzungen: E: Epidermis, D: Dermis, G: Granulationsgewebe, PC: *panniculus carnosus*, F: Fibrin.

Abgesehen von der dargestellten hochgradigen Entzündungsreaktion erschien das sich zu diesem Zeitpunkt formierende hyperproliferative Epithel der transgenen Mäuse geringer ausgeprägt zu sein. Vor diesem Hintergrund wurden RNA-Lysate, die ebenfalls aus dem intakten und dem verwundeten Hautgewebe von transgenen Mäusen sowie von Wildtypmäusen isoliert wurden, auf die Expression des Zytokeratin 16 hin untersucht. Dieses in der intakten Haut lediglich in Zellen der Haarfollikel exprimierte Keratin wird nach Verwundung in den aktivierten Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels deutlich induziert ^[111]. Hierbei zeigte sich, dass die basale Expression dieses Markers im Hautgewebe der I κ B α DN-Mäuse bereits deutlich geringer als in den Kontrolltieren war und zudem die bei diesen

beobachtete Induktion der Expression während der Wundheilung vollständig unterblieb (siehe Abbildung 47).

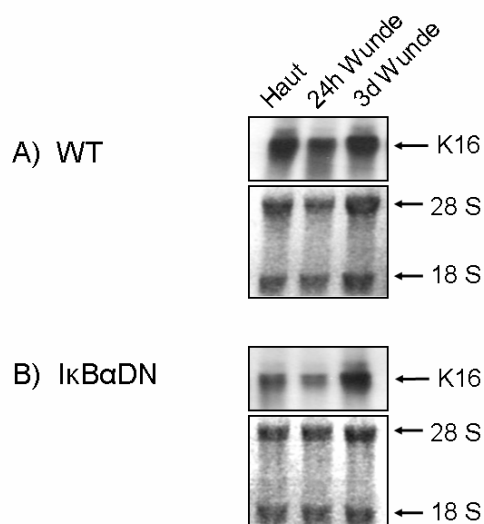


Abb. 47: Expressionskinetik des *k16*-Gens im Wundheilungsverlauf von Wildtypmäusen (WT, A) sowie von Mäusen, welche einen überstabilen Inhibitor des NF- κ B exprimieren (IkBaDN, B). Northern Blot-Analyse zur Untersuchung der *k16*-Genexpression nach Verwundung transgener (IkBaDN) sowie Wildtypmäuse. Die abgebildeten Methylenblaufärbungen dienten zur Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung, wobei pro Spur je 1 μ g gesamtzellulärer RNA aufgetragen wurde.

3.5.3.2 Expression der *rip*-Gene im Hautgewebe von IkBaDN-Mäusen

Da sich ein deutlich inflammatorischer, partiell auch kutaner Wundheilungsphänotyp der IkBaDN-Mäuse nachweisen ließ und die RIP-Proteine einerseits mit dem Entzündungsgeschehen (RIP1, 2 und 3), andererseits mit der Homöostase der Keratinozyten (RIP4) eng assoziiert sind, wurden zudem RNA-Lysate des frühen Wundheilungsverlaufs auf das Expressionsmuster der einzelnen *rip*-Gene hin analysiert. Für die *rip*-Gene 1, 2, 3 und 5 konnten hierbei weitgehend einheitliche Expressionskinetiken nachgewiesen werden, welche den zu Beginn dieser Arbeit gewonnenen Daten entsprachen (nicht gezeigt, siehe auch Abschnitt 3.1.1). Demgegenüber konnten in Bezug auf das *rip4*-Gen deutliche Unterschiede zwischen den transgenen und den Kontrollmäusen nachgewiesen werden: Bei ersteren war dieses Gen konstitutiv über den gesamten Heilungsprozess exprimiert, zeigte also nicht die für Wildtypmäuse charakteristische starke Repression sehr früh nach Verwundung (siehe Abbildung 48).

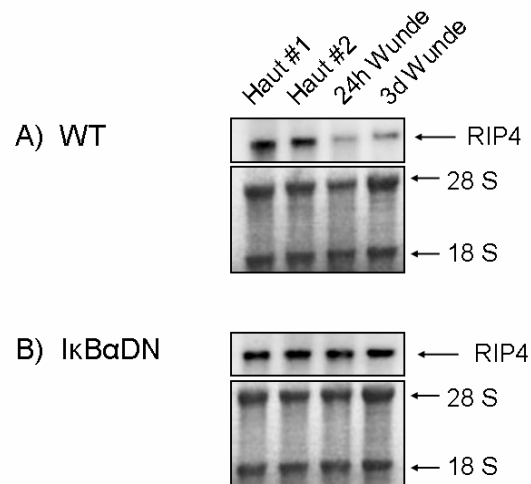


Abb. 48: Repression der *rip4*-Genexpression nach *in vivo*-Verwundung von Kontrolltieren (WT, A), sowie konstitutive Expression nach Verwundung von Mäusen, welche einen NF-κB-Superrepressor (IκBαDN, B) exprimieren. Northern Blot-Analyse zur Bestimmung der *rip4*-Genexpressionskinetik nach Verwundung von transgenen (IκBαDN) und Wildtypmäusen. Die entsprechenden Methylenblaufärbungen dienten als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren, wobei pro Spur je 1 µg gesamtzellulärer RNA aufgetragen worden waren.

Somit zeigt sich zum einen, dass die inhibierte NF-κB-Aktivierung in den transgenen Mäusen zu einer geringeren Expression des Zytokeratin 16 führte und dessen Expression im Vergleich zu den Wildtypmäusen zudem nach Verwundung nicht induziert, sondern sogar leicht reprimiert wurde. Zum anderen ließ sich bei den transgenen Tieren nicht die typische Repression des *rip4*-Gens nach Verwundung nachweisen.

Wie in Abbildung 48 zudem zu sehen ist, war das basale Expressionsniveau des *rip4*-Gens im unverwundeten Hautgewebe der IκBαDN-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen bereits deutlich erhöht. Während sich dieser Befund auf RNA-Ebene für die übrigen *rip*-Gene nicht eindeutig bestätigen ließ, zeigte sich jedoch auf Proteinebene für die RIP-Proteine 1, 3 und 4 jeweils eine deutlich höhere Konzentration im Hautgewebe der transgenen Mäuse (Abbildung 49).

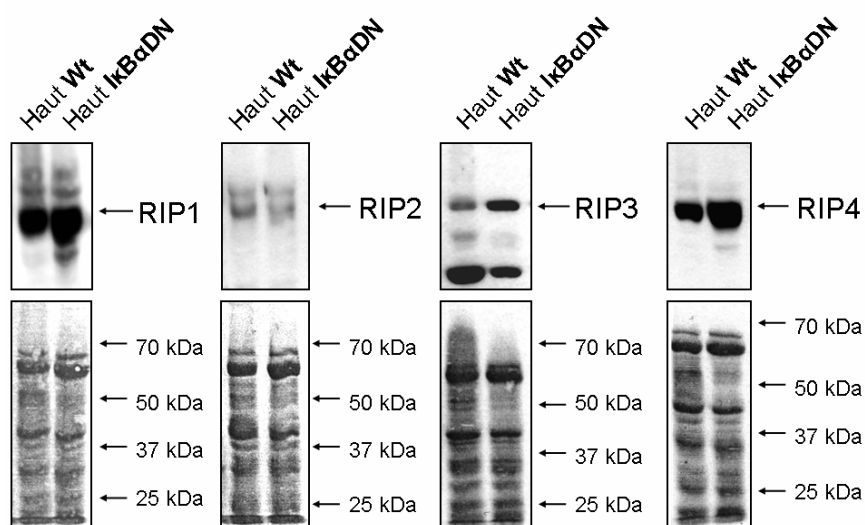


Abb. 49: Expressionsniveau der RIP-Proteine im intakten Hautgewebe von Kontrollmäusen (WT), sowie von Mäusen, die einen überstabilen Inhibitor des NF- κ B (IkBaDN) exprimieren. Western Blot-Analyse zur Bestimmung der RIP-Proteinkonzentrationen im Hautgewebe transgener und Wildtypmäuse. Die Detektion der einzelnen RIP-Proteine erfolgte unter Verwendung der jeweiligen spezifischen Antikörper. Die abgebildeten Ponceau S-Färbungen dienten als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren, wobei pro Spur jeweils 12,9 μ g der Proteinlysate aufgetragen wurden.

3.5.4 Zwischenzusammenfassung IV

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden Zusammenhänge zwischen der *rip*-Genexpression und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ -B in der Haut und bei der Wundheilung analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass RIP4 in Keratinozyten *in vitro* an der Aktivierung von NF κ B beteiligt ist. Zudem konnte mittels *in vivo*-Analysen nachgewiesen werden, dass dieser Transkriptionsfaktor bei der Wundheilung der Haut sowohl in eingewanderten Entzündungszellen, als auch in den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels aktiviert ist.

Eine Hemmung der NF κ B-Aktivität *in vivo* bewirkte zum einen eine massiv verstärkte Entzündungsreaktion, zum anderen zeigten sich leichte Veränderungen am hyperproliferativen Epithel einhergehend mit einer insgesamt verminderten Expression des für Zytokeratin 16 kodierenden Gens. Zudem war im Gegensatz zu Wildtypmäusen keine Repression des *rip4*-Gens nach Verwundung zu beobachten. In der intakten Haut ließen sich bei den transgenen Tieren zudem eine erhöhte Konzentration der RIP-Proteine 1, 3 und 4 nachweisen, während sich dieses auf RNA-Ebene nur für das *rip4*-Gen bestätigen ließ. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der NF κ B-Weg an der Regulation der *rip4*-Expression in Keratinozyten beteiligt sein könnte.

4 Diskussion

4.1 Die differentielle Regulation der *rip*-Gene bei der Wundheilung

4.1.1 **Das Expressionsmuster der *rip*-Gene bei der kutanen Wundheilung: Hinweise auf funktionelle Unterschiede der einzelnen RIP-Proteine im Hautgewebe?**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst das Expressionsmuster der einzelnen *rip*-Gene in der intakten Haut sowie im Verlauf der Wundheilung analysiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Basalexpression der einzelnen *rip*-Gene als auch die Kinetik ihrer Expression nach Verwundung sehr unterschiedlich war.

Das *rip1*-Gen wies insgesamt ein verhältnismäßig niedriges Expressionsniveau auf und unterlag im Wundheilungsverlauf zudem keiner eindeutigen Regulation. In diesem Zusammenhang ist es jedoch von Bedeutung, dass sich das RIP1-Protein zwar durch ein relativ ubiquitäres Vorkommen in verschiedenen Zelltypen und Organen auszeichnet, bezüglich seiner Aktivität jedoch posttranslational vielfältig reguliert wird ^[60, 71, 80], wie in der Einleitung näher erläutert wurde. Daher ist davon auszugehen, dass im Rahmen der Wundheilung in den verschiedenen involvierten Zelltypen durchaus eine Regulation der Aktivität des RIP1-Proteins erfolgen könnte, welche aber offenbar nicht über eine Regulation der Expression des entsprechenden Gens erfolgt.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit wurde auf die differenzielle Expression der *rip*-Gene in Keratinozyten gelegt. Da in den Prozess der Wundheilung der Haut jedoch äußerst unterschiedliche Zelltypen involviert sind, in denen die Expression der einzelnen *rip*-Gene gegenläufig zu der in Keratinozyten reguliert sein könnte, wurde die Expressionskinetik der einzelnen *rip*-Gene zudem in der Keratinozyten-Monokultur *in vitro* analysiert. Hierfür wurden quieszente HaCaT-Zellen nach einem standardisierten Muster verwundet und nach Herstellung von Proteinlysat sowie Isolierung gesamtzellulärer RNA ebenfalls auf die Expression der einzelnen *rip*-Gene untersucht. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die Expression des *rip1*-Gens nach Verwundung in Keratinozyten weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene reguliert wird.

Für das *rip2*-Gens ließ sich im Verlauf der Wundheilung *in vivo* ebenfalls keine Regulation der Expression feststellen. Wenngleich unter Verwendung der *Northern Blot*-Methodik keine absolut quantitativen Vergleiche zwischen zwei unterschiedlichen Genen möglich sind, erschien das *rip2*-Gen in der Haut jedoch deutlich stärker als das *rip1*-Gen exprimiert. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass das *rip2*- im Gegensatz zum relativ ubiquitär exprimierten *rip1*-Gen vermehrt in Zelltypen und Geweben mesodermalen Ursprungs exprimiert wird ^[11, 62]. Neben seiner wichtigen Funktion in lymphatischen Geweben und Adipozyten spielt RIP2

eine bedeutende Rolle beim Differenzierungsprozess von Muskelzellen ^[27, 88]. Daher könnte das verhältnismäßig intensive Expressionsniveau dieses Gens in der Haut auf eine Expression in der Dermis, wo sowohl Fett- als auch Muskelgewebe lokalisiert ist, zurückzuführen sein.

Interessanterweise ließen sich für das *rip2*-Gen jedoch eine schwache Basalexpression sowie eine moderate Induktion der Expression in kultivierten Keratinozyten nach *in vitro*-Verwundung detektieren. Da sich diese Induktion auch in primären Keratinozyten nachweisen ließ, ist anzunehmen, dass auch *in vivo* eine Induktion in den Keratinozyten des Wundrandes stattfindet. Diese könnte jedoch durch eine möglicherweise recht intensive und eventuell sogar gegenläufig regulierte Expression in den Zellen der Dermis überlagert werden.

Die Analyse der Expression des *rip3*-Gens bei der Wundheilung *zeigte* eine massive Induktion, beginnend 24 Stunden nach Verwundung. Das hohe Expressionsniveau blieb im weiteren Verlauf bis Tag drei nach Verwundung konstant und hatte bereits am Tag fünf das geringe Ausgangsniveau wieder erreicht. Zeitlich korreliert diese Induktion direkt mit der inflammatorischen Phase der Wundheilung, in welcher die Infiltration des verwundeten Gewebes durch aktivierte Entzündungszellen im Vordergrund steht ^[31]. Anhand immunhistologischer Färbungen konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass das RIP3-Protein tatsächlich in Zellen des Granulationsgewebes angereichert ist, welche zumindest teilweise Entzündungszellen sind.

Demgegenüber ließ sich das RIP3-Protein weder in der intakten Epidermis noch im hyperproliferativen Epithel nachweisen. Dieser Befund korrelierte mit den Ergebnissen der *in vitro*-Analysen verwundeter Keratinozyten, in denen sich keine Regulation der *rip3*-Genexpression detektieren ließ. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die vermehrte Expression des *rip3*-Gens nach Verwundung *in vivo* tatsächlich primär auf einwandernde Entzündungs- oder andere dermale Zellen zurückzuführen ist.

Für das *rip4*-Gen war bereits vor Beginn dieser Arbeit eine bedeutende Funktion in Keratinozyten beschrieben worden: Das entsprechende Protein spielt eine essentielle Rolle bei der embryonalen Entwicklung ektodermaler Gewebe ^[47]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass dieses Gen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Keratinozyten auf einem sehr hohen Niveau exprimiert war, wobei *in vivo* die Expression insbesondere in den Keratinozyten der Basalschicht sehr stark war. Diese Lokalisation wirft jedoch die Frage auf, ob RIP4 hier mit der Proliferation der basalen Keratinozyten oder mit deren Eintritt in die terminale Differenzierung assoziiert ist. Vor dem Hintergrund, dass das Fehlen des RIP4-Proteins während der Embryogenese nicht mit einer veränderten Proliferationsrate, jedoch mit einer erheblich gestörten Differenzierung einhergeht ^[47], ist zu vermuten, dass dieses Protein auch im adulten Organismus eher mit der Differenzierung assoziiert ist. Um diese Frage zu klären, wurden im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit jedoch

ausführlichere Untersuchungen vorgenommen, so dass dieser Aspekt noch aufgegriffen wird.

Nach Verwundung des Hautgewebes ist eine komplette Reorganisation der Keratinozyten am Wundrand erforderlich, um den Gewebedefekt mit einer neuen Epithelschicht zu überdecken. Für das *rip4*-Gen ließ sich hier sowohl *in vivo* als auch im *in vitro*-Modell eine massive Repression der Genexpression während der frühen Phase der Wundheilung nachweisen. Dabei konnte zudem gezeigt werden, dass diese Repression *in vitro* zumindest partiell über zellautonome Mechanismen vermittelt wird. Im Zuge der frühen Wundheilung werden die Keratinozyten des Wundrandes unter anderem durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in einen aktivierten Status versetzt. Die hierbei induzierte Modulation der Genexpression, einhergehend mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts, führt letztendlich zu einer deutlich gesteigerten Proliferationsrate der Keratinozyten, welche dementsprechend das hyperproliferative Epithel formieren und via Migration in der Lage sind, die Wunde mit neuem Epithel zu bedecken. Da die Abnahme der *rip4*-Genexpression vor allem in den Zellen des hyperproliferativen Epithels zu beobachten war, ist anzunehmen, dass RIP4 auch bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Proliferation, Migration oder bei der (Re-) Differenzierung dieser Zellen spielen könnte. Inwiefern die Repression dieses Gens tatsächlich eine essentielle Komponente der Reepithelisierung darstellt, ließe sich in Zukunft durch Verwundung *rip4*-überexprimierender Keratinozyten *in vitro* bzw. im *in vivo*-Modell determinieren.

Mit der Analyse der *traf6*-Genexpression bei der Wundheilung wurde exemplarisch die Regulation der Expression eines Gens, welches für ein mit den RIP-Proteinen nicht verwandtes Adaptorprotein des TNF-Rezeptors kodiert, untersucht. Diese Analyse wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die für unterschiedliche Adaptorproteine des TNF-Rezeptors kodierenden Gene bei der Wundheilung nach einem einheitlichen Muster reguliert werden. Diesbezüglich lagen vor Beginn dieser Arbeit ebenfalls keine Daten vor. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich für das *traf6*-Gen während der späten Phase der Wundheilung eine leichte Repression nachweisen. Somit zeigte sich, dass Gene, die für unterschiedliche Adaptorproteine des TNF-Rezeptors kodieren, bei der Wundheilung sehr heterogen reguliert werden.

4.1.2 Die Regulation der Expression der *rip*-Gene im Kultivierungsverlauf von Keratinozyten *in vitro*

Aufbauend auf die Ergebnisse der Wundheilungsstudien sollten in dieser Arbeit diejenigen *rip*-Gene, welche in Keratinozyten exprimiert und nach Verwundung differentiell reguliert wurden, hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung in Keratinozyten näher untersucht werden. Hierfür wurden zunächst die Expressions-

muster der einzelnen *rip*-Gene in proliferierenden und differenzierenden Keratinozyten verglichen. Während sich hierbei keine Regulation des *rip1*- *rip3* und *rip5*-Gens nachweisen ließ, zeigte sich wie auch nach Verwundung *in vitro* eine differenzielle Expression des *rip2*- sowie des *rip4*-Gens.

4.1.3 Das *rip2*-Gen – ein Regulator der Keratinozytenproliferation?

Die Untersuchung der Expressionskinetiken der *rip*-Gene unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen erfolgte zunächst an kultivierten HaCaT-Zellen. Innerhalb der Versuchsreihe wurde jeweils sowohl von subkonfluenten, proliferierenden, als auch von konfluenten Zellen, in welchen durch Serumentzug die Differenzierung induziert wurde, gesamtzelluläre RNA isoliert und auf die Expression der *rip*-Gene hin untersucht. Für das *rip2*-Gen konnte in den HaCaT-Zellen unter proliferationsförderlichen Bedingungen eine relativ intensive Expression nachgewiesen werden. Diese nahm bereits sechs Stunden nach Transfer der konfluenten Zellen in ein die Differenzierung förderndes Medium drastisch ab.

Zur Überprüfung der in den HaCaT-Zellen ermittelten Ergebnisse wurden zudem primäre Keratinozyten unter entsprechenden Bedingungen auf die Expression der *rip*-Gene hin untersucht. Auch hier wurde die Expression sowohl in subkonfluenten, proliferierenden als auch in Zellen untersucht, in denen durch Zugabe von 1,2mM CaCl_2 die Differenzierung induziert wurde. Während sich die Expressionsunterschiede des *rip2*-Gens jedoch in den HaCaT-Zellen sehr eindeutig zeigten, konnten sie in primären Keratinozyten nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich demgegenüber eine leichte Induktion der *rip2*-Genexpression nach Zugabe von 1,2 mM Ca^{++} . Da die HaCaT-Zellen grundsätzlich in Ca^{++} -haltigen Medium kultiviert wurden, könnte dies bedeuten, dass die *rip2*-Genexpression unter anderem durch Kalzium induziert wird, und dementsprechend in HaCaT-Zellen generell verstärkt ist. Andererseits führte in diesen Zellen der alleinige Entzug der Wachstumsfaktoren des Gesamtserums zu einer massiv reprimierten *rip2*-Expression. Daher lassen diese Ergebnisse eher vermuten, dass das RIP2-Protein mit der Regulation der Zellproliferation assoziiert ist. In diesem Zusammenhang wurde für das RIP2-Protein bereits eine funktionelle Bedeutung für die Myoblastendifferenzierung beschrieben [27, 88]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das *rip2*-Gen in proliferierenden Myoblasten relativ stark exprimiert ist, für deren Eintritt in die Differenzierung jedoch reprimiert werden muss. Die Repression des *rip2*-Gens könnte daher tatsächlich auch in Keratinozyten eine notwendige Komponente für deren Eintritt in den Differenzierungsprozess sein. Um diese These zu bestätigen, müssten jedoch weitere Analysen mittels Überexpression bzw. Inhibition der Expression des *rip2*-Gens durchgeführt werden.

4.1.4 Das *rip4*-Gen – ein Regulator der Keratinozytendifferenzierung?

Hinsichtlich der *rip4*-Genexpression konnte in beiden untersuchten Keratinozytentypen eine eindeutige Regulation beobachtet werden: Sowohl in HaCaT-Zellen, als auch in primären Keratinozyten führten differenzierungsförderliche Kultivierungsbedingungen zu einer kurzfristigen Induktion der *rip4*-Genexpression, welche mit fortschreitender Differenzierung wieder kontinuierlich abnahm. Besonders deutlich konnte dieser Effekt in den HaCaT-Zellen nachgewiesen werden; hier war das *rip4*-Gen in serumhaltigem Medium besonders schwach und nach Entzug des Serums sehr stark exprimiert. Hierbei zeigte sich zudem, dass nicht unbedingt der Konfluenzstatus der Zellen die Intensität der Expression des *rip4*-Gens determiniert, sondern auch in subkonfluenten Keratinozyten der Entzug der Wachstumsfaktoren eine gleichermaßen induzierte Expression bewirkte.

Aufgrund der Tatsache, dass das RIP4-Protein *in vivo* insbesondere in der epidermalen Basalschicht angereichert ist, stellte sich die Frage, ob es hier die Proliferation der Keratinozyten oder deren Eintritt in die Differenzierung beeinflusst. Die erläuterte Expressionskinetik im Differenzierungsverlauf deutet auf eine Assoziation des RIP4 mit der frühen Differenzierung von Keratinozyten hin. Um diese Frage näher zu beantworten, wurden im späteren Verlauf dieser Arbeit intensivere Untersuchungen durchgeführt, so dass dieser Aspekt im Folgenden noch aufgegriffen wird.

4.2 Funktionelle Charakterisierung des *rip4*-Gens in kultivierten Keratinozyten

Nachdem sich für das *rip4*-Gen eine eindeutige Regulation in Keratinozyten sowohl nach *in vivo*- als auch nach *in vitro*-Verwundung nachweisen ließ und bereits Hinweise auf eine mögliche Regulation des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten erhalten worden waren, wurde nachfolgend zunächst untersucht, welche Faktoren an der Regulation der *rip4*-Expression beteiligt sein könnten. Hierfür wurden *in vitro*-Studien an kultivierten HaCaT-Zellen durchgeführt. Für diese Keratinozyten-Zelllinie konnte, wie bereits erläutert, zuvor gezeigt werden, dass die Kinetik der *rip4*-Expression sowohl nach Verwundung als auch unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen derjenigen von primären Keratinozyten entspricht.

4.2.1 Die Regulation der *rip4*-Genexpression: ein multifaktoriell kontrollierter Prozess?

Da nach Verwundung *in vivo* große Mengen an Wachstumsfaktoren und Zytokinen freigesetzt werden ^[31, 144], ergab sich die Hypothese, dass diese auch die *rip4*-Genregulation vermitteln könnten. Um diese Annahme zu prüfen, wurden HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert und auf die Kinetik der *rip4*-Genexpression hin untersucht. Zunächst wurde dabei die Regulation der *rip4*-Genexpression nach Stimulation mit Gesamtserum, welches eine Mischung unterschiedlichster Wachstumsfaktoren darstellt, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine massive Repression der *rip4*-Expression erfolgte. Dementsprechend war zu vermuten, dass im Gesamtserum offenbar ein oder mehrere Faktoren enthalten sind, die eine Hemmung der *rip4*-Genexpression bewirken können.

Darauf aufbauend wurden nun einzelne Wachstumsfaktoren und Zytokine hinsichtlich ihrer Effekte auf die *rip4*-Genexpression in Keratinozyten untersucht. Hierfür wurden insbesondere solche Faktoren ausgewählt, die in Zusammenhang mit der Wundheilung relevant sind. So wurden insbesondere die Wachstumsfaktoren der EGF- und der TGF- β -Familie sowie die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α untersucht. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass nahezu sämtliche Faktoren eine Hemmung der *rip4*-Genexpression bewirkten, also sowohl Faktoren, welche eher die Proliferation der Keratinozyten induzieren, als auch Faktoren, die eher Migration oder Differenzierung modulieren. Im Folgenden sollen diese Aspekte im Einzelnen näher diskutiert werden.

4.2.1.1 Wachstumsfaktoren der EGF-Familie als Repressoren der *rip4*-Genexpression

Exemplarisch für die Familie der Epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFs) wurden HaCaT-Zellen mit EGF stimuliert. Hierbei ließ sich eine besonders rapide und drastische Repression der *rip4*-Genexpression nachweisen. Die EGF-Familie mitogener Wachstumsfaktoren umfasst insgesamt noch weitere Mitglieder (TGF- α , HB-EGF, Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin sowie Neuregulin), die ihre Wirkung über die Bindung an insgesamt vier verschiedene Rezeptoren vom Tyrosinkinase Transmembranrezeptor-Typ ausüben ^[149]. Die Mehrzahl dieser Mitglieder ist jedoch lediglich zur Bindung an und Aktivierung von ErbB4/EGFR1 fähig, so auch EGF. Die Ligandenbindung bewirkt an diesem Rezeptor eine Homo- oder Heterodimerisierung mit nachfolgender Aktivierung der zytosolischen Tyrosinkinase. Als den Rezeptoren nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktionswege sind vor allem der RAS/ERK-, der PI(3)K/AKT- sowie der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg beschrieben ^[45]. Jedoch ist zudem die Beteiligung der p38-MAPK unter anderem in HaCaT-Zellen beschrieben ^[2, 127]. Diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege

sind nach EGFR-Aktivierung zudem untereinander vernetzt und führen unter anderem über die Aktivierung von NF- κ B, CREB und STAT/ErbB1 zur Stimulation einer Vielzahl von Genen, die insbesondere für antiapoptotische Faktoren kodieren [45]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur *rip4*-Genexpression nach Stimulierung mit EGF lassen daher lediglich Rückschlüsse auf Effekte nach Aktivierung des EGFR1 zu.

Im Zuge der kutanen Wundheilung ist ein erhöhter Gehalt an EGF von der Anwesenheit von Entzündungszellen und Fibroblasten abhängig [151]. Dabei stimuliert EGF -wie auch TGF- α und HB-EGF- einen für den Heilungsprozess essentiellen Vorgang: die Migration der Keratinozyten [3, 42, 113]. Die Aktivierung der Keratinozytenmigration stellt im Rahmen der Wundheilung einen essentiellen Faktor für die zügige Reepithelisierung des verletzten Gewebes dar. Die beobachtete massive Repression der *rip4*-Genexpression bei der frühen Wundheilung könnte daher mit der induzierten Migration dieser Zellen in Zusammenhang stehen und eventuell eine Voraussetzung für diese darstellen. Zudem wird die Wirkung der EGFs hierbei auch über die Expression des *Egfr*-Gens reguliert: während in sehr frühen Brandwunden ein erhöhter Gehalt dieses Rezeptors sowohl in den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels und den Hautanhangsdrüsen als auch in den undifferenzierten Keratinozyten des Wundrandes nachgewiesen wurde, ließ dieser sich in späteren Stadien zwar noch an der verdickten Epidermis und den Hautanhangsdrüsen nachweisen, jedoch nicht in den Keratinozyten des Wundrandes [143]. Dementsprechend korreliert die Verteilung des EGFRs während der verschiedenen Stadien der Wundheilung ebenfalls zumindest teilweise mit der Expression des *rip4*-Gens.

Insgesamt ist anzunehmen, dass die Repression des *rip4*-Gens in den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels wenigstens zum Teil auf die Aktivierung der EGFRs zurückzuführen ist. Dabei konnte im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Regulation der Expression zumindest partiell über einen oder mehrere der erläuterten Signaltransduktionswege, nämlich demjenigen der ERK-MAPK, PI3-Kinase sowie der p38-MAPK, erfolgt, wenngleich letztere durch EGF nur geringfügig aktiviert wird [2]. Nach Stimulierung der HaCaT-Zellen mit EGF wurde zudem jedoch eine wesentlich frühere Hemmung der Expression des *rip4*-Gens beobachtet, als dessen basale mRNA-Stabilität hatte vermuten lassen. Dies deutet darauf hin, dass durch EGF zudem Faktoren aktiviert werden, die die mRNA des *rip4*-Gens destabilisieren und somit deren Degradation induzieren.

Die biologische Wirkung von EGF auf Keratinozyten ist insgesamt vielfältig und auch für die intakte Haut von substanzieller Bedeutung: Zum einen ist dieser Faktor unerlässlich für die Zellproliferation, genauer für den Eintritt von der G1- in die S-Phase [63] - zum anderen übt EGF eine essentielle zytoprotektive Wirkung aus [53, 105, 106, 125]. Im intakten Hautgewebe sind EGF-Rezeptoren im wesentlichen in der basalen Zellschicht lokalisiert, mit zunehmendem Differenzierungsgrad der

Keratinocyten reduziert sich deren Menge jedoch deutlich ^[92]. Eine aberrante Expression von EGF-Rezeptorgenen wird sowohl im Zusammenhang mit entzündlichen Hautkrankheiten wie Psoriasis ^[61] als auch mit neoplastischen Veränderungen unterschiedlicher Gewebe beschrieben ^[50]. In beiden Fällen liegt eine massiv reduzierte Differenzierungsfähigkeit der Keratinocyten vor, ähnlich wie sie bei *rip4*^{-/-}-Mäusen ^[47] beobachtet wurde. Dies gibt Hinweise darauf, dass eine verminderte Expression des *rip4*-Gens ebenfalls in die Pathogenese der Psoriasis sowie verschiedener neoplastischer Veränderungen involviert sein könnte.

4.2.1.2 Die reprimierende Wirkung von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie auf die *rip4*-Genexpression

Weiterhin wurden die Effekte zweier Mitglieder der TGF- β -Superfamilie hinsichtlich ihrer Effekte auf die *rip4*-Genexpression in Keratinocyten untersucht. Die TGF- β -Familie umfasst ebenfalls eine Reihe von Mitgliedern (TGF- β 1-5, Activine, Inhibine, BMPs (*bone morphogenetic proteins*) sowie *Mullerian inhibiting substance*) von denen TGF- β 1 und Activin A für die Untersuchung der *rip4*-Genregulation ausgewählt wurden. Die Behandlung von HaCaT-Zellen mit diesen Faktoren bewirkte jeweils eine deutliche Repression der *rip4*-Genexpression, wobei die maximale Repression später als nach Behandlung mit EGF beobachtet wurde. Zudem wurde durch TGF- β eine effizientere Repression des *rip4*-Gens als durch Activin A beobachtet. Dies spricht dafür, dass verschiedene Wachstumsfaktoren eine Regulation der *rip4*-Genexpression bewirken können, diese jedoch eventuell über unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege vermittelt wird.

Das homodimere TGF- β bindet an einen heterotrimeren Rezeptorkomplex vom Serin/Threoninkinasetyp. Das aktive, aus einem Präkursorprotein proteolytisch gespaltene TGF- β assoziiert zunächst an den extrazellulären Rezeptor Typ III, welcher die Bindung an den Typ II-Transmembranrezeptor vermittelt. Dieser initiiert nachfolgend über die Phosphorylierung der Kinasedomäne des Typ I-Transmembranrezeptors die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade. Diese mündet in eine Phosphorylierung verschiedener *Smad*-Proteine, wobei letztendlich ein heterogener Komplex aus phosphoryliertem *Smad* 2 und 3, gebunden an *Smad* 4, in den Zellkern wandert und dort direkt die Regulation von Zielgenen bewirkt ^[17]. In jüngster Zeit wurden jedoch auch verschiedene *Smad*-unabhängige TGF- β -Signaltransduktionswege beschrieben, wie unter anderem der JNK- und der p38-MAPK-Weg ^[17]. Demgegenüber sind Activine homo- oder heterodimere Proteine aus β_A und β_B -Untereinheiten. Diese binden an Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, die den TGF- β -Rezeptoren ähneln. In Bezug auf die intrazelluläre Signaltransduktion wurden auch hier *Smad*-abhängige und *Smad*-unabhängige Wege beschrieben ^[107]. Die Kinetik der *rip4*-Genexpression nach TGF- β sowie Activin-Induktion stellte sich wie bereits beschrieben sowohl zeitlich verzögert als auch weniger effizient als nach Induktion

mit EGF dar. Dies könnte in direktem Zusammenhang mit den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen stehen, die durch die jeweiligen Faktoren aktiviert werden.

TGF- β kommt bei der Initiierung der Wundheilung eine besonders wichtige Rolle zu: Neben der chemotaktischen Anlockung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten wirkt dieser Faktor hochgradig migrationsfördernd, insbesondere auf Makrophagen und Keratinozyten. In Keratinozyten inhibiert TGF- β außerdem die Zellproliferation und führt über die Aktivierung spezifischer Zielgene unter anderem zu einer verstärkten Produktion unterschiedlicher extrazellulärer Matrixproteine und Integrine. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass das *rip4*-Gen zumindest *in vitro* ebenfalls durch TGF- β reguliert zu werden scheint. Der dem EGF ähnliche Effekt der Migrationsaktivierung durch TGF- β untermauert die Hypothese, dass die Repression der *rip4*-Expression tatsächlich eine Voraussetzung für die Induktion der Keratinozyten-Migration darstellen könnte. Im späteren Wundheilungsverlauf wird TGF- β dann aufgrund der Proliferationshemmung eine negativ-regulatorische Funktion der Reepithelisierung zugeschrieben [110, 144]. In diesem Stadium wurde jedoch bereits wieder eine zunehmende Expression des *rip4*-Gens nachgewiesen, so dass die Repression von RIP4 bei der frühen Wundheilung vermutlich tatsächlich zumindest partiell durch TGF- β erfolgt, die spätere Wiederaufnahme der Expression jedoch wahrscheinlich über andere Faktoren vermittelt wird.

Im Gegensatz zu TGF- β induziert Activin *in vivo* die Proliferation von Keratinozyten, wenngleich dieser Effekt indirekt über die Induktion der Expression verschiedener Wachstumsfaktor-Gene in Fibroblasten, also auf parakrine Weise zustande kommt [89]. Dennoch bewirkte auch Activin in Keratinozyten eine Repression des *rip4*-Gens, wie im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Dieses deutet darauf hin, dass die Regulation der *rip4*-Genexpression ein äußerst vielfältig regulierter Prozess zu sein scheint, bei dem das Gesamtspektrum der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren zu berücksichtigen ist. *In vitro* konnte dagegen auch für die Activeine eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von Keratinozyten nachgewiesen werden [114, 119]. Dementsprechend lässt sich auch die synergistische Wirkung zum EGF und TGF- β auf die Expression des *rip4*-Gens *in vitro* erklären.

Insgesamt unterscheiden sich somit TGF- β und Activin in ihrer Auswirkung auf die Keratinozyten *in vivo* deutlich sowohl von EGF als auch untereinander. Dennoch scheinen beide Faktoren an der Regulation der *rip4*-Genexpression bei der Wundheilung beteiligt zu sein, wenngleich sie ihre Wirkung über grundsätzlich andere intrazelluläre Signaltransduktionswege vermitteln. Hieraus wird deutlich, dass Faktoren mit recht unterschiedlichen Effekten auf Keratinozyten eine Hemmung der *rip4*-Genexpression bewirken können. Zudem scheint sich zu bestätigen, dass auch verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege an der Regulation der Expression des *rip4*-Gens beteiligt sind.

4.2.1.3 Proinflammatorische Zytokine als Repressoren der *rip4*-Genexpression

Die proinflammatorischen Zytokine spielen, wie der Name bereits vermuten lässt, bei der Wundheilung insbesondere in der inflammatorischen Phase eine besonders wichtige Rolle. Zu dieser Gruppe werden beispielsweise die Interleukine sowie TNF gezählt, wobei insbesondere für IL-1 α , IL-1 β , IL-6 sowie TNF- α eine massive Induktion während der inflammatorischen Wundheilungsphase beschrieben wurde^[31]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HaCaT-Zellen mit TNF- α sowie IL-1 β stimuliert. Diese Behandlung führte dort zu einer besonders raschen und massiven Hemmung der *rip4*-Genexpression.

Der TNF-Rezeptor verfügt, wie in der Einleitung bereits näher erläutert, über keine eigene zytoplasmatische enzymatische Domäne wie etwa eine Kinasedomäne und ist daher nach Ligandenbindung und anschließender Homotrimerisierung auf unterschiedliche Adaptorproteine, zu denen die RIPs gehören, angewiesen, die das Signal intrazellulär weiterleiten. Das Entscheidende für die Art des weitergeleiteten Signals liegt in der Natur der jeweils an den Rezeptor bindenden Adaptorproteine, die einerseits apoptotisch, andererseits über eine NF- κ B- und AP-1 Aktivierung antiapoptotisch wirken können^[60, 71, 80]. Diese antiapoptotische Wirkung wird dabei zudem über drei unterschiedliche Signaltransduktionswege vermittelt: Die Aktivierung der JNK-MAPK, der p38-MAPK sowie über die direkte Aktivierung der IKK. Zudem ist auch PI(3)K an der Vermittlung der TNFR-Antwort beteiligt^[6]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine äußerst drastische Hemmung der Expression des *rip4*-Gens durch TNF- α nachgewiesen, ähnlich derjenigen, welche nach EGF-Induktion beobachtet wurde. In diesem Zusammenhang könnten die jeweils aktivierten Signaltransduktionswege von besonderer Bedeutung sein: So aktiviert sowohl EGF als auch TNF- α den Signaltransduktionsweg der JNK sowie der PI(3)K, welche dementsprechend in die Regulation der *rip4*-Genexpression involviert sein könnten. Die intensivere Aktivierung der p38-MAPK durch TNF- α könnte jedoch die wesentlich schnellere Repression erklären, da diese nach EGFR-Aktivierung lediglich geringfügig aktiviert wird^[2].

Für IL-1 existieren ähnlich dem TNF zwei Formen: IL-1 α und IL-1 β . Die dominierende Form im Organismus ist dabei das IL-1 β , das zur Aktivierung durch die Caspase-1 (auch ICE (*Interleukin-1 converting enzyme*)) zunächst gespalten werden muss. Dagegen besitzen gerade Keratinozyten ein zytosolisches Reservoir an IL-1 α , so dass für diesen Zelltyp letzteres die dominierende Form darstellt^[90]. Die Bindung des aktiven Liganden an den Transmembranrezeptor IL-1R1 erfolgt jedoch im Gegensatz zu TNF für IL-1 α und IL-1 β mit gleicher Affinität. und wird von *IL-1 receptor associated protein* vermittelt. Intrazellulär führt dieses wiederum über die kaskadenartige Bindung mehrerer Adaptorproteine (MyD88, IRAK-1 und 2, TRAF-6, TAK1) zur Phosphorylierung der *NF- κ B inducing kinase* (NIK), woran sich die

Aktivierung von NF- κ B anschließt. Zudem erfolgt eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 jedoch auch über die Aktivierung der JNK-MAPK sowie der p38-MAPK ^[90].

Die biologische Bedeutung des TNF- α und des IL-1 ist insbesondere für das angeborene und adaptive Immunsystem von Bedeutung. Jedoch kommt beiden auch bei der Initiierung der Wundheilung eine besondere Rolle zu, nicht zuletzt sind sie an der Aktivierung der Keratinozyten nach Verwundung beteiligt: Während TNF- α dabei die Migration der Keratinozyten induziert, führt IL-1 unter anderem zur Induktion der Expression verschiedener Wachstumsfaktor- und Zytokingene. Die Effekte von IL-1 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der Keratinozyten werden dagegen bis heute kontrovers diskutiert. Wenngleich durch diese beiden Faktoren zum Teil relativ unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert werden, deuten die erläuterten Ergebnisse darauf hin, dass die Hemmung der *rip4*-Genexpression bei der frühen Wundheilung zumindest anteilig auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zurückzuführen ist. Zudem werden sowohl TNF- α als auch IL-1 von aktivierten Keratinozyten zumindest nach Verwundung *in vivo* produziert und freigesetzt ^[34, 135]. Dies könnte daher einer der Mechanismen sein, der die zuvor beobachtete autonome Repression der *rip4*-Genexpression nach Verwundung der Keratinozyten-Monokultur *in vitro* bewirkt. Zudem deutet die Expressionskinetik des *rip4*-Gens darauf hin, dass auch durch TNF- α und IL-1 β Faktoren aktiviert werden, die eine Destabilisierung der mRNA des *rip4*-Gens bewirken.

Nach Abschluss der proliferativen Phase der Wundheilung kommt es normalerweise zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine ^[31], im Wundfluid chronischer Wunden lässt sich jedoch ein persistierender TNF- α -Gehalt nachweisen. In diesem Zusammenhang wurde in einer Studie bereits die verbesserte Heilung chronischer Wunden des Darmepithels nach Applikation des TNF- α -Antikörpers Infliximab bestätigt ^[126]. Vor diesem Hintergrund könnte es von Bedeutung sein, dass die Expression des *rip4*-Gens während der späteren Phasen des Heilungsprozesses wieder anstieg und in den basalen Keratinozyten reepithelisierter Wunden wieder genauso stark war wie in der intakten Epidermis. Dies könnte mit der geringeren Konzentration proinflammatorischer Zytokine -sowie auch Wachstumsfaktoren- in späteren, regulär heilenden Wunden zusammenhängen. In chronischen Wunden ist dagegen die *rip4*-Expression aufgrund der persistierend hohen Zytokinkonzentration möglicherweise dauerhaft vermindert, so dass der wieder ansteigenden Expression des *rip4*-Gens eine entscheidende Bedeutung für den Abschluss der Wundheilung zukommen könnte.

4.2.1.4 Wasserstoffperoxid als Modulator der *rip4*-Genexpression

Während der inflammatorischen Phase der Wundheilung produzieren und sezernieren Entzündungszellen verhältnismäßig große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dies dient der Erregerabwehr im weitgehend ungeschützten verwundeten Gewebe ^[31, 79], kann aber über die Auswirkungen des oxidativen Stresses auf die Keratinozyten auch dort zu Schädigungen führen. Aufgrund der Beteiligung der ROS am Wundheilungsprozess wurde daher im Rahmen dieser Arbeit zudem die Auswirkung des Wasserstoffperoxids auf die Expression des *rip4*-Gens analysiert. In den durchgeführten Induktionsversuchen an HaCaT-Zellen konnte nach Applikation von 1mM H₂O₂ eine moderate Hemmung der *rip4*-Genexpression nachgewiesen werden. Im Verhältnis zu den durch Wachstumsfaktoren und Zytokine vermittelten Effekten war diese jedoch wesentlich kurzfristiger zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Wundheilung nicht ausschlaggebend für die massive Repression der *rip4*-Genexpression ist.

Im Hautgewebe wird oxidativer Stress jedoch auch durch intensive UV-Bestrahlung ausgelöst, was für eine Reihe von Hautschäden, wie z. B. Photokanzerogenese, Hautalterung und Photodermatosen, verantwortlich gemacht wird. Zudem führt UV-induzierter oxidativer Stress über die Aktivierung unterschiedlicher MAPK (ERK-, JNK- sowie p38-MAPK) zu einer massiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ^[41, 77]. Eine aberrante Regulation von NF- κ B wird ebenfalls mit entzündlichen und tumorigenen Prozessen in Verbindung gebracht und ist in der Medizin bereits Angriffspunkt verschiedener chemotherapeutischer Agentien ^[40]. Folglich könnte eine durch ROS vermittelte Repression der *rip4*-Genexpression nach UV-Bestrahlung klinisch von Bedeutung sein, da neben der entzündlichen und immunsupprimierenden Komponente auch eine erhebliche Beeinträchtigung der Keratinozytenhomöostase zu beobachten ist ^[12].

Insgesamt wurde somit gezeigt, dass die Regulation der *rip4*-Genexpression in Keratinozyten zumindest *in vitro* durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht wird: Während die deutlichsten Effekte hierbei durch die proinflammatorische Zytokine TNF- α und IL-1 β sowie durch EGF hervorgerufen wurden, führten auch weitere Faktoren zu einer Hemmung der *rip4*-Genexpression. Dies lässt vermuten, dass die massive Repression der *rip4*-Genexpression bei der frühen Wundheilung durch unterschiedliche Faktoren hervorgerufen wird und somit einen multifaktoriellen Prozess darstellt.

4.2.2 Glukokortikoide und Wundheilungsstörungen: Ein Zusammenhang mit der Expression des *rip4*-Gens ?

Nachdem die Regulation der *rip4*-Genexpression durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine der Wundheilung nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, ob die Expression dieses Gen auch durch Pharmaka, welche in der Dermatologie Anwendung finden, beeinflusst wird. Die topische Applikation von Retinolsäure (Vitamin A) ist bei verschiedenen Hauterkrankungen seit längerem etabliert, wenngleich in der letzten Zeit deren irritative und teilweise teratogene Nebenwirkungen zunehmend in den Vordergrund der Diskussion gerückt sind^[112].

Retinoide vermitteln ihre Wirkung über zwei verschiedene nukleär lokalisierte Rezeptoren - RAR (*retinoic acid receptors*) und RXR (*retinoic X receptors*) -, welche der Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren angehören^[76]. Über die Bindung an spezifischer *response*-Elemente der DNA vermitteln die aktivierten und dimerisierten Rezeptoren ihre Wirkungen durch die Regulation der Expression einer Vielzahl von Genen, welche für die Proliferation und Differenzierung epithelialer Gewebe von Bedeutung sind^[74]. Hierbei stimuliert insbesondere all-trans-Retinol über den RAR-Rezeptor in der intakten Haut die Proliferation der basalen Keratinozyten. Dabei beeinflusst dieser Faktor jedoch nicht die Expression epidermaler Differenzierungsmarker^[33], führt jedoch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der kutanen Barrierefunktion. *In vitro* hingegen bewirkt die Behandlung kultivierter Keratinozyten mit Retinolsäure eine deutlich reduzierte Proliferationsrate, begleitet von einer inhibierten Expression epidermaler Differenzierungsmarker^[30, 33]. Daher wurde vermutet, dass all-trans-Retinolsäure auch Effekte auf die *rip4*-Genexpression haben könnte. In der Tat ließ sich in den untersuchten HaCaT-Zellen eine moderate Induktion der *rip4*-Genexpression nach Behandlung mit Retinolsäure nachweisen. Dies deutet an, dass die unterschiedlichen Effekte des Vitamin A zumindest partiell über eine Regulation des *rip4*-Gens erfolgen könnten. Eine Unterversorgung mit diesem Vitamin führt unter anderem zu einer folliculären Hyperplasie, bei chronischem Verlauf wird zudem eine Metaplasie der Haut sowie der oralen Mucosa beobachtet^[112]. Ein ähnlicher hyperplastischer Phänotyp, wenngleich in deutlich massiverer Form, wurde für die *rip4*^{-/-}-Mäuse beschrieben, daher könnte RIP4 eines der (Effektor-) Proteine darstellen, welches die hautspezifischen Effekte des Vitamin A vermittelt. Zur Bestätigung dieser Hypothese bedarf es jedoch zunächst gezielter Analysen, wobei beispielsweise das Expressionsniveau des *rip4*-Gens in Vitamin A-unterversorgtem Hautgewebe untersucht werden könnte, um nähere Hinweise auf eine direkte Korrelation zu erhalten.

Dexamethason stellt eines der synthetischen Kortikosteroid-Analoga dar, welche in der Medizin insbesondere als Immunsuppressiva Anwendung finden. Zwar wird die systemische Applikation aufgrund massiver Nebenwirkungen zunehmend vermieden, jedoch ist die kutane topische Applikation sehr gebräuchlich,

beispielsweise bei Psoriasis sowie verschiedenen entzündlichen Erythemen der Haut ^[20]. Die Nebenwirkungen langfristiger Kortikosteroid-Behandlungen spiegeln insgesamt die physiologische Rolle der Glukokortikoide wieder und umfassen neben der Immunsuppression zudem die typischen klinischen Symptome des Cushing Syndroms ^[14]. Zudem stellt auch die Haut eines der Effektororgane dieses Spektrums an Nebenwirkungen dar: neben der Bildung der Steroidatrophie kommt es sowohl bei endogenem Kortisolüberschuss als auch bereits bei kurzfristigem Einsatz von synthetischen Glukokortikoiden zu einer eingeschränkten Wundheilung ^[28, 100]. Während als Ursachen dieser Effekte zunächst die vielfältigen Wirkungen der Glukokortikoide auf Immunzellen im Vordergrund der Diskussion standen, ist zunehmend bekannt geworden, dass auch die Keratinozyten direkt beeinflusst werden. So konnte hinsichtlich der verzögerten Reepithelisierung gezeigt werden, dass neben der reduzierten Expression unterschiedlicher Wachstumsfaktor- und Zytokingene (TNF- α , IL-1 α und β , TGF- β , PDGF u.a.) ^[7] Dexamethason zumindest in nicht verwundeten kultivierten Keratinozyten *in vitro* zudem die Proliferationsrate negativ beeinflusst ^[66].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Dexamethason in kultivierten Keratinozyten eine Induktion der *rip4*-Genexpression bewirkt. Während Wachstumsfaktoren und Zytokine eine deutliche Repression des *rip4*-Gens bewirkten, hatte Dexamethason also einen entgegengesetzten Effekt. Diese Ergebnisse ließen sich an verwundeten Keratinozyten *in vitro* bestätigen: Während in unbehandelten Keratinozyten eine massive Repression des *rip4*-Gens nach Verwundung beobachtet werden kann, konnte dieser Effekt durch Dexamethason nahezu vollständig aufgehoben werden.

Somit könnte die Modulation der *rip4*-Genexpression durch Glukokortikoide eine zentrale Rolle bei der in Kortikosteroid-behandelten Patienten beobachteten verzögerten Reepithelisierung einnehmen. Der molekulare Mechanismus ist hierbei möglicherweise die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch Glukokortikoide ^[14]. Diese Hemmung wird über unterschiedliche Interaktionen des Glukokortikoid-Rezeptors mit Komponenten des NF- κ B- Signaltransduktionsweges auf mehreren Ebenen hervorgerufen. So konnten bislang eine direkte Interaktion von p50 und p65 mit dem Glukokortikoidrezeptor, eine Aktivierung von I κ B α und auch eine Inhibition der DNA-Bindung von p50 und p65 durch den Glukokortikoidrezeptor nachgewiesen werden ^[14]. Aufbauend auf diese Daten wurde die Korrelation zwischen NF- κ B und der *rip4*-Genexpression im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher untersucht und wird an entsprechenden Stellen im Folgenden noch aufgegriffen.

4.2.3 Welche intrazellulären Signaltransduktionswege vermitteln die Regulation der *rip4*-Genexpression?

Wie oben bereits ausführlich erläutert, führte die Behandlung von HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen, für die Wundheilung relevanten Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu teilweise unterschiedlichen Effekten auf die *rip4*-Genexpression. Auch wurde bereits erläutert, dass die Wirkung dieser Faktoren zum Teil über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege vermittelt wird, was mit den unterschiedlichen Effekten auf die Genexpression in Zusammenhang stehen könnte.

Daher sollte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit analysiert werden, welche Signaltransduktionswege in Keratinozyten die *rip4*-Genexpression modulieren können. Hierfür wurden spezifische Aktivatoren und Hemmstoffe einzelner Signalwege eingesetzt.

4.2.3.1 Die Regulation der *rip4*-Genexpression erfolgt unabhängig von der Aktivität der Proteinkinase C

Die Identifizierung des RIP4-Proteins erfolgte ursprünglich über einen *two-hybrid-screen*, bei dem nach neuen Bindungspartnern der Proteinkinase C (PKC) gesucht wurde. Hierbei wurde RIP4 als Interaktionspartner der PKC δ identifiziert ^[9]. Da der Signaltransduktionsweg der PKC zudem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten einnimmt ^[15], wurde im Verlauf dieser Arbeit vermutet, dass eine Aktivierung der PKC Regulation an der Regulation der *rip4*-Genexpression beteiligt sein könnte. In der Tat ließ sich nach der Behandlung quieszenter HaCaT-Zellen mit PMA eine massive Repression der *rip4*-Genexpression nachweisen. Hierbei bewirkt die Behandlung von Zellen mit PMA eine Aktivierung sämtlicher Isoformen der PKC.

Diesen unterschiedliche Isoformen werden besonders bedeutende, wenn auch teilweise divergierende Funktionen bei der Differenzierung von Keratinozyten zugeschrieben: Während die Aktivierung der PKC α in suprabasalen Keratinozyten einen irreversiblen Stillstand des Zellzyklus und die Induktion unterschiedlicher epidermaler Differenzierungsmarker bewirken kann ^[68], fördert insbesondere die Isoform PKC η in den Zellen der Stratum granulosum die Expression der Differenzierungsmarker Involucrin und Transglutaminase I. Auch die Isoform PKC δ vermittelt differenzierungsfördernde Effekte ^[15], die sich in einer spindelförmigen Zellmorphologie sowie der Induktion der Transglutaminase I äußern ^[95]. In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Aktivierung der PKC-Isoformen durch PMA in den untersuchten Zellen zu einer massiven Hemmung der Expression des *rip4*-Gens führt. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die Hemmung der *rip4*-Genexpression, beispielsweise nach Wachstumsfaktorbehandlung, zumindest partiell über diesen Signaltransduktionsweg erfolgen könnte. Um diese Hypothese

zu prüfen, wurden HaCaT-Zellen zunächst mit einem Inhibitor sämtlicher Isoformen der PKC sowie mit einem inaktiven Strukturhomologen inkubiert. Anschließend wurde die Auswirkung der Hemmung der PKC auf die Expression des *rip4*-Gens sowohl nach Seruminduktion als auch nach *in vitro*-Verwundung analysiert. Überraschenderweise konnte dabei die oben erwähnte Vermutung jedoch nicht bestätigt werden: Die Hemmung der PKC blieb hierbei jeweils ohne Auswirkung auf den Verlauf der *rip4*-Genexpression.

Wenngleich dem PKC-Signaltransduktionsweg eine wie oben beschrieben sehr wichtige Rolle bei der Regulation der Keratinozytendifferenzierung zukommt ^[15], und eine Interaktion der PKC mit RIP4 auf Proteinebene stattfindet, ist dieser Signaltransduktionsweg also offenbar nicht in die Regulation des *rip4*-Gens involviert. Zumindest die Aktivierung der PKC η bewirkt jedoch unter anderem auch die Aktivierung der p38-MAPK ^[25], dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die Aktivierung der PKC durch PMA Auswirkungen auf die Expression des *rip4*-Gens hat, die alleinige Hemmung der PKC jedoch ohne Auswirkungen auf die Expressionskinetik dieses Gens bleibt.

4.2.3.2 Der p38-MAPK-Signalweg könnte eine zentrale Rolle bei der Repression der *rip4*-Genexpression nach Verwundung spielen

Des Weiteren wurde die Bedeutung des p38-MAPK-Signaltransduktionsweges für die Regulation der *rip4*-Genexpression untersucht. Wie zuvor dargestellt, wird dieser Signaltransduktionsweg durch mehrere der in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert. Wie der JNK-MAPK-Signaltransduktionsweg wird der p38-Weg insbesondere durch „Stresssignale“ wie inflammatorische Zytokine, UV-Bestrahlung, Hitzeschock, osmotischen Stress und DNA-Schädigung aktiviert ^[44]. Zudem wurden in Keratinozyten differenzierungsfördernde Effekte der p38-MAPK beschrieben, welche sich in der Induktion der Expression des *Involucrin*-Gens äußern ^[24, 26]. Daher wurde angenommen, dass der p38-MAPK-Weg in die Hemmung der *rip4*-Genexpression in Keratinozyten involviert sein könnte. In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hemmung der p38-MAPK sowohl die durch Serum als auch die durch Verwundung induzierte Repression der *rip4*-Genexpression *in vitro* teilweise aufhob. Hierbei war der Effekt auf die seruminduzierte *rip4*-Genrepression moderat (etwa 30%), während der Effekt auf die *rip4*-Genrepression nach Verwundung wesentlich deutlicher ausfiel (etwa 80 bzw. 90%). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass der p38-MAPK-Signaltransduktionsweg in die Regulation der *rip4*-Genexpression in Keratinozyten involviert ist, dass jedoch auch andere Signaltransduktionswege hierbei aktiv sind.

Eine Erklärung dafür, dass insbesondere bei der seruminduzierten Hemmung des *rip4*-Gens nur eine partielle Regulation über den p38-Weg nachgewiesen werden

konnte, könnte die Tatsache sein, dass Serum ein Gemisch verschiedenster Wachstumsfaktoren, Zytokine und anderer Komponenten darstellt, deren Effekte über teilweise sehr unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege vermittelt werden: Während der p38-MAPK-Weg unter anderem durch TNF- α , IL-1 β und auch reaktive Sauerstoffderivate aktiviert wird, sind für eine Vielzahl der Faktoren des Gesamtserums grundsätzlich andere Signaltransduktionswege relevant.

Interessanterweise war die Beteiligung der p38-MAPK an der Hemmung der *rip4*-Genexpression nach *in vitro*-Verwundung wesentlich deutlicher als nach Serumbehandlung. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass zumindest nach Verwundung *in vivo* die Freisetzung von zytosolisch gespeichertem IL-1 der Keratinozyten des Wundrandes deren auto- und parakrine Aktivierung bewirkt [135]. Für IL-1 ist die Signaltransduktion durch die p38-MAPK, wie zuvor näher erläutert, bereits bekannt. Daher könnte die Aktivierung der p38-MAPK eine besonders wichtige Rolle bei der beobachteten autonomen Hemmung der *rip4*-Genexpression durch Verwundung ohne Serumzugabe spielen

Des Weiteren besitzt der Signaltransduktionsweg der p38-MAPK jedoch auch im intakten Hautgewebe eine bedeutende Funktion, da er in die Kalzium-induzierte Differenzierung von Keratinozyten involviert ist [24]. Hierbei bewirkt Kalzium zunächst die Aktivierung der PKC α , welche nachfolgend unter anderem die Aktivierung der p38-MAPK induziert [118]. Zudem erfolgt hierbei jedoch auch die Aktivierung der ERK-MAPK, welche essentiell für die PKC α -vermittelten differenzierungsinduzierenden Effekte zu sein scheint [118]. In diesem Zusammenhang wäre es in Zukunft von Bedeutung, insbesondere die Beteiligung des ERK-MAPK Signaltransduktionsweges auf eine Beteiligung an der *rip4*-Genregulation hin zu untersuchen. Zusammen mit der p38-MAPK könnte dieser an der Repression der *rip4*-Genexpression sowohl im suprabasalen Hautgewebe als auch im hyperproliferativen Epithel des Wundgewebes von Bedeutung sein.

4.2.3.3 Curcumin und Proteasomihhibitoren neutralisieren die induzierte Hemmung der *rip4*-Genexpression

Vielen der zuvor beschriebenen Faktoren, die eine Regulation der *rip4*-Genexpression bewirkten, ist ein zentraler Aspekt gemein: die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Zudem sind auch die RIPs selbst als Aktivatoren dieses Faktors identifiziert worden. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass die Expression des *rip4*-Gens ebenfalls der Regulation des NF- κ B unterliegen könnte. Um dieses zu untersuchen, wurde die Auswirkung zweier „klassischer Inhibitoren“ des NF- κ B auf die Regulation der *rip4*-Genexpression kultivierter Keratinozyten *in vitro* untersucht.

Hierfür wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, welches sowohl die Aktivierung des NF- κ B als auch, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eine Hemmung der *rip4*-Genexpression bewirkt. Parallel wurde nun ein Teil der Zellen jeweils mit den NF- κ B-Inhibitoren Curcumin sowie Lactacystin vorbehandelt. Hierbei konnte für beide Faktoren eine vollständige Aufhebung der H_2O_2 -induzierten Hemmung der *rip4*-Genexpression nachgewiesen werden. Insbesondere Curcumin (Dihydroferulol-Methan), welches der pharmakologisch hauptsächlich wirksame Extrakt des *Curcuma longa* ist, wurde lange als klassischer Inhibitor des NF- κ B bezeichnet ^[121]. Ebenso bewirkt Lactacystin, welches ursprünglich aus *Actinomyces* isoliert wurde, heute jedoch synthetisch produziert wird, eine Blockade der NF- κ B-Aktivierung ^[67]. Während hierbei für Curcumin eine komplexe Hemmung der NF- κ B-Aktivität sowohl über die Blockade der I κ B α -Degradation und der IKK-Aktivität als auch über eine inhibierte Translokation und DNA-Bindung nachgewiesen wurde ^[52, 101], beruht die Wirkung des Lactacystin im wesentlichen auf der blockierten Degradation des I κ B α an den Proteasomkomplexen ^[67]. Dennoch lassen sich für beide Substanzen aus ihrem Wirkungsmechanismus noch weit vielfältigere Wirkungen ableiten, die in der letzten Zeit auch zunehmend in den Vordergrund der Diskussionen gerückt sind.

So wurde insbesondere für Curcumin deutlich, dass dessen antiinflammatorische, antitumoröse und die antioxidative Wirkung ^[108, 147] nur partiell über die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung vermittelt wird. Neben der nachgewiesenen Hemmung unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktionswege - unter anderem der ERK- und JNK-MAPK ^[122] - beruhen die Effekte des Curcumin zudem auch partiell auf einer Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 ^[22] und der direkten antioxidativen Wirkung ^[108]. Insbesondere die antioxidative Wirkung des Curcumin könnte daher von entscheidender Bedeutung für die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Aufhebung der H_2O_2 -induzierten Hemmung der *rip4*-Genexpression sein.

Ebenso lässt auch diese Aufhebung durch Lactacystin keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Regulation der *rip4*-Genexpression durch NF- κ B zu. Da dessen Wirkung in einer allgemeinen Inhibierung der zellulären Proteasomkomplexe begründet ist, werden neben der Degradation des I κ B α am 26S-Proteasomkomplex sämtliche Abbauprozesse insbesondere kurzlebiger Proteine an den Proteasomkomplexen blockiert. Somit kann die beobachtete Kinetik der *rip4*-Genexpression auch durch unspezifische Effekte auf andere Signaltransduktionswege, insbesondere auf eine gleichermaßen blockierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, hervorgerufen sein.

Insgesamt kann jedoch vermutet werden, dass die Expression des *rip4*-Gens zumindest partiell der Kontrolle des NF- κ B unterliegt. Speziell die zuvor erläuterten Analysen zur *rip4*-Genexpression nach Dexamethason-Behandlung bekräftigen diese Hypothese, da auch Dexamethason unter anderem eine Hemmung der

Aktivität des NF- κ B bewirkt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch andere Transkriptionsfaktoren an der Regulation der *rip4*-Genexpression beteiligt sind.

4.2.4 Das RIP4-Protein – eine Schaltstelle für den Eintritt der Keratinozyten in die terminale Differenzierung?

Bereits die immunhistologischen Analysen zur Lokalisation des RIP4-Proteins im Hautgewebe hatten ja vermuten lassen, dass das RIP4-Protein mit der Proliferation oder aber der Differenzierung von Keratinozyten assoziiert sein könnte. Anhand der Expressionsanalysen im differenzierungsfördernden Kultivierungsverlauf von HaCaT-Zellen sowie primären Keratinozyten kristallisierte sich eine Assoziation des RIP4-Proteins mit der frühen Differenzierung von Keratinozyten heraus. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden schließlich *in vitro*-Studien mittels RNA-Interferenz durchgeführt, in denen die Expression des *rip4*-Gens gehemmt und der Einfluss dieser Hemmung auf die Keratinozytenproliferation und –differenzierung untersucht wurde.

Hierbei konnten nach Hemmung der *rip4*-Expression in den untersuchten HaCaT-Zellen keine signifikanten Effekte auf die Proliferationsrate von Keratinozyten nachgewiesen werden. Wie zuvor bereits erläutert, steht dies im Einklang mit den Untersuchungen der embryonalen *rip4*^{-/-}-Mäuse, in denen sich ebenfalls keine veränderte Keratinozyten-Proliferationsrate im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nachweisen ließ ^[47].

Demgegenüber war in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen das Expressionsmuster verschiedener Differenzierungsmarker nach *rip4*-mRNA-Interferenz deutlich verändert: Neben epidermalen wurde dabei zunächst die Expression eines universellen Differenzierungsmarkers, des p21-Proteins, untersucht. Letzteres übernimmt eine zentrale Funktion bei der Regulation des Zellzyklus, speziell für den Übertritt aus der G1- in die S-Phase, welcher eine Schaltstelle zwischen Proliferation und Differenzierung der Zelle darstellt. Dieser Übertritt wird über unterschiedliche Cycline (Cyclin D und Cyclin E) sowie Cyclin-abhängige Kinasen (cdk2, 4 und 6) vermittelt. Hierbei sind geringe Mengen an p21 essentiell für die Formierung eines Komplexes aus aktiven Cyclin D, cdk4 und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), welcher über die Phosphorylierung des pRb (*phospho-Retinoblasoma-Protein*) spezifische Effekte auf die zelluläre Genexpression und damit die Progression in die S-Phase induziert. Demgegenüber bewirkt die Induktion des *p21*-Gens über eine Hemmung des Cyclin E/cdk2-Komplexes, welcher ebenfalls für die Phosphorylierung des pRb notwendig ist, ein Arretieren der Zelle in der G1-Phase ^[140]. In Keratinozyten bewirkt die Induktion der Differenzierung *in vitro* eine transiente Induktion des *p21*-Gens, welche nach 4-12 Stunden maximales Niveau und bereits nach 24 Stunden den basalen Ausgangswert

wieder erreicht. Die konstitutive Expression des *p21 in vitro* verhindert jedoch auf der anderen Seite die terminale Differenzierung kultivierter Keratinozyten ^[21].

Die Expression des *p21*-Gens wurde in dieser Arbeit an subkonfluenten HaCaT-Zellen untersucht, welche in serumhaltigem Medium kultiviert wurden. Diese Bedingungen fördern die Proliferation der Zellen und führen somit normalerweise nicht zu einer Induktion des *p21*-Gens. Jedoch ließ sich in den mit *rip4*-siRNA behandelten Zellen vorübergehend eine deutlich erhöhte Konzentration dieses Proteins nachweisen. Die Details der *p21*-Aktivierung in Keratinozyten sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Während die *p53*-abhängige Aktivierung des *p21*-Promotors bereits früh nachgewiesen wurde ^[29] sind zunehmend auch *p53*-unabhängige Aktivierungen des *p21*-Promotors beschrieben worden. Insbesondere der Transkriptionsaktivator Sp1 wurde als *p53*-unabhängiger Regulator beschrieben ^[38], zudem wurden Konsensus-Sequenzen für den Aktivator Sp3 und den Kofaktor p300 als essentielle Elemente der Kalzium-induzierten *p21*-Induktion nachgewiesen ^[85, 99]. Da nach Überexpression des *rip4*-Gens keine Veränderung der *p53* – Expression nachgewiesen wurde ^[91], ist RIP4 vermutlich über die *p53*-unabhängige Kontrolle des *p21*-Promotors an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, wenngleich zum bisherigen Zeitpunkt auch unter Heranziehung der Literatur keine eindeutige Aussage über den genauen Mechanismus gemacht werden kann.

Darauf aufbauend wurden die Expressionsmuster unterschiedlicher keratinozyten-spezifischer Marker in den mit *rip4*-spezifischer siRNA behandelten Keratinozyten untersucht. Hierbei zeigte sich insbesondere für diejenigen, welche mit der frühen Differenzierung assoziiert sind – also insbesondere Zytokeratin 10 sowie Involucrin – eine transient induzierte Expression gegenüber den entsprechenden Kontrollen. Demgegenüber erfolgte jedoch die Expression des Transglutaminase I- Gens, welches mit der fortgeschrittenen Keratinozytendifferenzierung assoziiert ist, in den behandelten Zellen verzögert.

Somit zeigte sich überraschenderweise, dass RIP4 nicht grundsätzlich die Differenzierung epidermaler Zellen induziert. Dennoch konnte bestätigt werden, dass dieses Protein mit der Differenzierung von Keratinozyten assoziiert ist. Hierbei übernimmt RIP4 offensichtlich jedoch eher eine modulierende Funktion. Dementsprechend stehen die beobachteten Effekte nach *rip4*-RNA-Interferenz im Einklang mit den Befunden, die die Untersuchung der *rip4*^{-/-}-Mäuse ergeben hatten. Auch dort ließ sich insgesamt ein unstrukturiertes Expressionsmuster der epidermalen Differenzierungsmarker beobachten ^[47]. Eine mögliche regulatorische Wirkungsweise des RIP4-Proteins könnte hierbei zum einen die bereits sehr früh identifizierte Interaktion mit der PKC δ sein. Wie zuvor bereits erläutert, bewirkt diese zumindest bei Überexpression *in vitro* eine deutliche Induktion der Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker, unter anderem des Transglutaminase I.- Gens. Wie für eine Vielzahl epidermaler Differenzierungsmarker wurden sowohl im Transglutaminase I- als auch im Involucrin-Promotor Bindungsstellen des

Transkriptionsfaktors AP-1 bereits identifiziert ^[142, 148] und die Aktivierung der Transkription durch AP-1 nachgewiesen. Daher scheint zumindest partiell auch die Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des RIP4-Proteins zu stehen. Eine moderate Aktivierung von AP-1 durch RIP4 ist zumindest in HEK₂₉₃T-Zellen nachgewiesen worden ^[91], detaillierte Untersuchungen liegen jedoch nicht vor.

Zum anderen könnte die besondere Bedeutung des RIP4-Proteins für die Haut in der Aktivierung von NF-κB liegen: Die aktive Untereinheit p50 des NF-κB lässt sich insbesondere in den Zellen der Epidermis nachweisen, die gerade in die suprabasalen Schichten vorgerückt sind ^[115]. Der Hauptinteraktionspartner von p50, p65, konnte zudem in einzelnen Zellen der basalen Zellschicht nachgewiesen werden ^[131]. Unter Berücksichtigung einer Vielzahl weiterer Analysen wird heute davon ausgegangen, dass NF-κB in der Epidermis die Balance der Keratinozyten zwischen dem Austritt aus dem Zellzyklus, der Differenzierung und dem Überleben steuert. Dabei erfolgt die NF-κB-Aktivierung an dem Punkt, an dem die Keratinozyten in den Prozess der terminalen Differenzierung soeben eintreten, nämlich mit dem Eintritt in die suprabasale Zellschicht ^[58].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass RIP4 an der NF-κB-Aktivierung in Keratinozyten beteiligt ist. Zudem zeigte sich, dass die Expression des *rip4*-Gens vermutlich ebenfalls über NF-κB reguliert wird. *In vitro* wird das *rip4*-Gen unter differenzierungsförderlichen Kultivierungsbedingungen kurzfristig deutlich induziert, die Expression nimmt jedoch im weiteren Kultivierungsverlauf dann wieder kontinuierlich ab. *In vivo* wird das *rip4*-Gen insbesondere in den Keratinozyten der basalen Schicht exprimiert, während bereits in der suprabasalen Schicht deutlich geringere Mengen des entsprechenden Proteins nachgewiesen werden konnten. Dies deutet zusammen mit den Ergebnissen der siRNA-Versuche darauf hin, dass RIP4 als Aktivator von NF-κB eine Art Schaltstelle für den Eintritt der Keratinozyten in die terminale Differenzierung darstellt. Dabei könnte wiederum die NF-κB-Aktivierung, die im Zusammenhang mit dem Eintritt der Keratinozyten in die suprabasale Zellschicht erfolgt, die Repression der *rip4*-Expression und damit letztendlich eine erneute Abnahme der NF-κB-Aktivität zur Folge haben.

Abgesehen von der Integration des RIP4 in die intrazelluläre Signaltransduktion könnte jedoch zudem dessen molekulare Struktur eine weitere funktionelle Komponente determinieren: die Stabilisierung des membranständigen Zytoskeletts. Die unterschiedlichen zuvor beschriebenen Differenzierungsmarker der Epidermis übernehmen in den jeweiligen Hautschichten jeweils spezifische Funktionen, die sich in den basalen Schichten in der intrazellulären Stabilisierung des Zytoskeletts äußern. Demgegenüber bewirkt die während der fortgeschrittenen Differenzierung exprimierte Transglutaminase I die extrazelluläre Vernetzung und Stabilisierung der verhornenden epidermalen Schicht, in der die Keratinozyten degenerieren. Unter diesem Aspekt konnte für RIP4 eine membranständige Expression ^[10], mit Lokalisation in den basalen Schichten der Epidermis (vorliegende Arbeit)

nachgewiesen werden. Die C-terminal lokalisierte prominente Polyankyrin-Domäne des RIP4-Proteins könnte in diesem Zusammenhang eine fundamentale Rolle bei der Stabilisierung der Membran übernehmen. Polyankyrin-Domänen sind evolutionär hochkonservierte Proteinstrukturen, die besonders häufig an der bidirektionalen Protein-Interaktion sowie unter anderem an der Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt sind, ein prominentes Beispiel liefert hierfür die Spectrin-Stabilisierung der Erythrozytenmembran durch Ankyrin. Da diesbezüglich die Lokalisation des ankyrinhaltigen RIP4 allein jedoch nicht direkte Rückschlüsse erlaubt, sondern lediglich hypothetisch zu formulieren ist, wäre es in Zukunft von besonderem Interesse, spezifische Interaktionspartner des RIP4 oder dessen Polyankyrin-Domäne zu identifizieren, beispielsweise unter Durchführung eines *two-hybrid-screens*.

4.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B als Effektor der RIP-Proteine

Wie bereits erläutert, konnte im Laufe dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass RIP4 an der Aktivierung des NF- κ B in Keratinozyten beteiligt ist. Aufgrund der zuvor bereits erläuterten Expressionskinetiken des *rip4*-Gens nach Dexamethason-, Curcumin- sowie Lactacystin-Applikation, die sämtlich zumindest partiell als Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B wirken, wurde zudem vermutet, dass die Expression des *rip4*-Gens wiederum ebenfalls der Regulation durch NF- κ B unterliegt. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde schließlich mit einem transgenen Mausmodell gearbeitet, in welchem die Expression eines überstabilen Inhibitors (I κ B α DN) des NF- κ B dessen Aktivierung auf ein Minimum reduziert.

4.3.1 NF- κ B bei der Wundheilung: ein essentieller Faktor?

Das Wissen um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für grundlegende zelluläre Prozesse hat seit dessen Identifizierung im Jahr 1986 rasant zugenommen. Während dessen Integration in die epidermale Homöostase wie zuvor erläutert ebenfalls bereits nachgewiesen wurde, ist über die Rolle des NF- κ B bei der Wundheilung der Haut zum bisherigen Stand der Forschung nichts Genaues bekannt. Vor diesem Hintergrund stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit daher zunächst die Frage, ob dieser Effektor der RIP-Proteine auch bei der Wundheilung einer Regulation, insbesondere in den Keratinozyten, unterliegt. Anhand von Immunfluoreszenz-Analysen konnte in diesem Zusammenhang zunächst gezeigt werden, dass NF- κ B in murinen Exzisionswunden zum einen massiv in Entzündungszellen des Granulationsgewebes, zum anderen jedoch auch in Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels aktiviert wird.

Hinsichtlich der Aktivierung des NF- κ B in Zellen des Granulationsgewebes könnte dem RIP3-Protein eine besondere, bisher unbekannte Rolle zukommen. Auch für RIP3 konnte zu Beginn dieser Arbeit eine massive Expression in diesen Zellen nachgewiesen werden. Dessen Bedeutung wird bis heute insgesamt kontrovers diskutiert: während RIP3 zum einen eine inhibitorische Rolle bei der RIP1-induzierten NF- κ B-Aktivierung zugeschrieben wird [128, 129], wird andererseits eine C-terminal induzierte eigenständige Aktivierung des NF- κ B vermutet [56, 150]. Dabei ist dieses Protein in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, ohne dass bisher jedoch Beeinträchtigungen der unterschiedlichen Zellfunktionen nach RIP3-Defizienz beschrieben wurden. Da in dieser Arbeit nun eine massive Aktivierung des NF- κ B ebenfalls in den Entzündungszellen des Granulationsgewebes nachgewiesen werden konnte, könnte das RIP3-Protein im Wundheilungsverlauf eine regulatorische Funktion auf die Aktivität des NF- κ B in invasierten Entzündungszellen ausüben. Um diese regulatorische Funktion näher zu analysieren, wäre in Zukunft die *in vitro*-Analyse von *rip3*^{-/-}-Granulozyten und -Makrophagen sowie die Untersuchung verwundeter *rip3*^{-/-}-Mäuse von Bedeutung.

Insgesamt deutet das nachgewiesene Aktivierungsmuster des NF- κ B darauf hin, dass NF- κ B bei der Wundheilung der Haut über die Regulation einer Vielzahl von Genen (ein Überblick derer wurde in der Einleitung gegeben) ebenfalls eine besonders wichtige Funktion übernimmt. Dieser Aspekt wurde nachfolgend anhand von Wundheilungsstudien an den oben erwähnten transgenen Mäusen näher untersucht.

Hierbei zeigte sich in histologischen Präparaten verwundeter transgener (IkB α DN-) Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren ein äußerst massiver inflammatorischer Phänotyp: bereits 24 Stunden, wesentlich ausgeprägter dann drei Tage nach Verwundung, ließen sich anhand von HE-Färbungen deutlich vermehrt Hämatoxylin-gefärbte Zellen im Granulationsgewebe nachweisen. In den Schnitten der drei Tage alten Wunden ließ sich bei den Kontrolltieren das typische, zungenförmig den verwundeten Bereich umgebende, Granulationsgewebe nachweisen. In den IkB α DN-Mäusen hingegen erstreckte sich dieses diffus verteilt bis weit in das unverwundete Hautgewebe hinein. Zudem ließen sich die Entzündungszellen in großer Zahl sogar unterhalb des *panniculus carnosus* nachweisen. Des Weiteren ließen sich in den transgenen Mäusen auffällige, eosinophil gefärbte zellfreie Matrixansammlungen nachweisen, die sowohl innerhalb des Granulationsgewebes als auch als Auflagerungen der intakten Epidermis außerhalb der Wundränder lokalisiert waren. Deren Struktur und Anfärbung deutete darauf hin, dass es sich um Fibrinreste handelte. Zudem stellte sich das hyperproliferative Epithel der IkB α DN-Mäuse insgesamt leicht reduziert dar.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde zunächst in B-Lymphozyten identifiziert und näher charakterisiert [116]. Dessen zentrale Bedeutung für immunologische Zellen und Gewebe ist seitdem zunehmend bekannt geworden [55, 70, 72]. In der Einleitung wurde

bereits eine Übersicht über einige der Gene, die für die Wundheilung von Bedeutung sind und durch NF- κ B reguliert werden, gegeben. Der inflammatorische Wundheilungsphänotyp der I κ B α DN-Mäuse ist daher vermutlich auf die Dysregulation einer Vielzahl dieser Gene zurückzuführen. In diesem Zusammenhang wurde für das verwendete transgene Mausmodell bereits eine eingeschränkte Aktivität der Makrophagen *in vitro* nachgewiesen ^[111]. Daher ist anzunehmen, dass die Infiltration des verwundeten Gewebes durch Granulozyten und Makrophagen zwar stattfindet, die Aktivierung dieser Zellen durch die fehlende Regulation der Expression unterschiedlichster Gene jedoch weitgehend ausbleibt. Die Konsequenz hiervon scheint nicht nur die äußerst diffuse und vermehrte Ansammlung dieser Zellen im Wundareal zu sein, sondern auch die beeinträchtigte Beseitigung von Fibrinresten. Für uPA, welches einen der wichtigsten Aktivatoren des fibrinolytischen Plasmins darstellt, ist beispielsweise ebenfalls die Induktion durch NF- κ B nachgewiesen ^[103].

Des Weiteren ist jedoch anzunehmen, dass das „Kommunikationssystem“ im Gewebe insgesamt beeinträchtigt ist. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, steht auch die Expression proinflammatorischer Zytokine (wie TNF- α , IL-1 u.a.) unter der Kontrolle des NF- κ B. Diese nehmen insbesondere bei der Wundheilung eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Heilungsprozesses ein. Dies beinhaltet nicht nur die Aktivierung der Entzündungszellen, sondern auch die Aktivierung der Keratinozyten am Wundrand. Hierbei wurde insbesondere für IL-1 eine zentrale Rolle beschrieben ^[135]. Die Aktivierung dieser Zellen ist jedoch eine Voraussetzung für deren gesteigerte Proliferationsrate sowie die Induktion der Migration- beides zusammen ermöglicht letztendlich erst die Reepithelisierung des Wunddefektes. Somit konnten in dieser Arbeit die ersten Hinweise darauf erhalten werden, dass NF- κ B auch für die Regeneration des epidermalen Gewebes von essentieller Bedeutung zu sein scheint.

Aufgrund des hochgradig inflammatorischen Wundheilungsphänotyps der verwendeten I κ B α DN-Mäuse können hier jedoch keine eindeutigen Aussagen über die Bedeutung des NF- κ B für die Keratinozyten nach Verwundung gemacht werden. Wenngleich das geringfügiger ausgeprägte hyperproliferative Epithel diesbezüglich auf eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit der Keratinozyten hindeutet, wäre es in Zukunft von Bedeutung, mit einem Mausmodell zu arbeiten, in welchem die NF- κ B-Aktivität lediglich in den Keratinozyten gehemmt ist, beispielsweise unter Verwendung von I κ B α DN-Konstrukten unter der Kontrolle des K14-Promotors.

4.3.2 Die RIP-Proteine und deren Effektor NF- κ B: eine bidirektionale Regulation?

Abschließend war es nun zudem von Interesse, die Auswirkung der gehemmten NF- κ B-Aktivität auf die Expression der *rip*-Gene *in vivo* zu untersuchen. Hierbei zeigte sich auf Proteinebene im intakten Hautgewebe interessanterweise ein deutlicher Effekt auf deren Expression: abgesehen von RIP2 ließ sich für sämtliche RIP-Proteine eine erhöhte Konzentration im Hautgewebe der I κ B α DN-Mäuse nachweisen. Auf mRNA-Ebene ließ sich eine vermehrte Expression dagegen lediglich für das *rip4*-Gen nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf dessen Aktivatorproteine zumindest im Hautgewebe unterschiedliche Effekte nach sich zieht. Während eine Aktivität des NF- κ B für RIP1 und RIP3 offenbar posttranslationale Modifikationen nach sich zieht, scheint die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors für RIP4 zudem auch Auswirkungen auf dessen Genexpression zu haben.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Superrepressors I κ B α DN größtenteils ohne Auswirkungen auf die Expression der *rip*-Gene bei der Wundheilung der Haut blieb. Doch zeigte sich hierbei ebenfalls für das *rip4*-Gen ein äußerst drastischer Effekt: während sich in den Kontrolltieren die typische Repression dieses Gens bei der frühen Wundheilung bestätigen ließ, bewirkte die Expression des Superrepressors I κ B α eine vollständig konstitutive Expression des *rip4*-Gens nach Verwundung, ähnlich wie sie nach Dexamethason-Applikation und Verwundung *in vitro* beobachtet wurde. Ursächlich kommen hierfür nun zwei Aspekte in Betracht: wie bereits erläutert, steht die Expression einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen unter der Kontrolle des NF- κ B. Somit ist die ausbleibende Repression des *rip4*-Gens nach Verwundung der I κ B α DN-Mäuse vermutlich zumindest partiell auf eine verringerte Anzahl von aktiven Wachstumsfaktoren und Zytokinen zurückzuführen. Zudem ist es jedoch wahrscheinlich, dass auch die Expression des *rip4*-Gens direkt unter der Kontrolle seines Effektors NF- κ B steht. Wie in vorangegangenen Abschnitten bereits dargestellt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufhebung einer induzierten Hemmung des *rip4*-Gens in Keratinozyten gleichermaßen nach Applikation von Dexamethason, Curcumin sowie Lactacystin *in vitro* nachgewiesen. Sämtliche dieser Substanzen vermitteln ihre Effekte ebenfalls zumindest partiell über die Hemmung des NF- κ B. Die Hypothese, dass die Expression des *rip4*-Gens über NF- κ B reguliert wird, konnte anhand der *in vivo*-Daten somit deutlich untermauert werden, wenngleich hier der indirekte Effekt über die Wachstumsfaktoren und Zytokine vermutlich ebenfalls eine Rolle spielt.

Schließlich bestätigte sich anhand der Wundheilungsstudien eine weitere, zu Beginn dieser Arbeit formulierte Hypothese, nämlich die, dass die Repression der *rip4*-Genexpression bei der frühen Wundheilung eine Voraussetzung für die normale

Reepithelisierung der Wunde sein könnte. Wie bereits beschrieben, stellte sich das drei Tage nach Verwundung formierte hyperproliferative Epithel der I κ B α DN-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren leicht reduziert dar, begleitet von einer stagnierenden Expression des *rip4*-Gens. Ähnlich wurde ja zuvor *in vitro* festgestellt, dass die Applikation von Dexamethason -ebenfalls ein Inhibitor des NF- κ B- sowohl eine Hemmung der Reepithelisierung, als auch der Repression des *rip4*-Gens bewirkte. Demzufolge scheint die Repression des *rip4*-Gens in den Keratinozyten am Wundrand tatsächlich eine Voraussetzung für den normalen Heilungsprozess darzustellen, wenngleich zum jetzigen Zeitpunkt noch keine konkreten Aussagen über den hierdurch initiierten Prozess gemacht werden können. Da die Hemmung der endogenen *rip4*-mRNA zumindest *in vitro* keine Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten von Keratinozyten hatte, ist es denkbar, dass die Repression der *rip4*-Genexpression in einer Induktion der Migration von Keratinozyten resultiert. Schließlich könnte dieser Aspekt auch für die Funktion des RIP4 bei der epidermalen Differenzierung von Bedeutung sein: auch das „Wandern“ der Keratinozyten in die suprabasale epidermale Schicht, einhergehend mit der Induktion der terminalen Differenzierung, wird bis heute in der Literatur als eine spezielle Form der Migration interpretiert. Auch dort erfolgt, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte, eine drastische Repression der *rip4*-Genexpression.

5 Zusammenfassung

Die *Receptor Interacting Proteins* (RIPs) übernehmen als zytoplasmatische Adaptorproteine insbesondere des TNF-Rezeptors Typ I fundamentale Funktionen bei der intrazellulären Feinabstimmung lebenswichtiger Prozesse. Während für RIP4 bereits eine essentielle Rolle bei der embryonalen Entwicklung ektodermaler Gewebe nachgewiesen wurde, war ansonsten über die Bedeutung dieser Proteinfamilie für die Haut sowie deren Wundheilung vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Dabei erfordert insbesondere die Verletzung des feinstrukturierten Gewebes der Haut eine komplexe Reorganisation, welche über exakt abgestimmte Mechanismen durch eine Vielzahl beteiligter Zelltypen gesteuert wird. Dies erfolgt in einem hohen Maße über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, deren Signale über unterschiedliche Rezeptoren in das Zellinnere weitergeleitet werden. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Rezeptoren vom TNFR-Typ für den Wundheilungsprozess war es das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, die keratinozytenspezifische Bedeutung der RIPs in der Haut sowie bei der Wundheilung zu analysieren.

Hierfür wurde zunächst die basale Expression der einzelnen *rip*-Gene im intakten Hautgewebe sowie deren Regulation im Heilungsverlauf muriner Exzisionswunden untersucht. Bei diesen *in vivo*-Expressionsanalysen wurde keine Regulation der moderat exprimierten *rip*-Gene 1, 2 und 5 beobachtet. Demgegenüber ließ sich für das *rip3*-Gen eine massive Induktion während der inflammatorischen Phase der Wundheilung nachweisen, welche sich in den Zellen des Granulationsgewebes lokalisieren ließ. Hingegen wurde für das in den Keratinozyten der Basalschicht stark exprimierte *rip4*-Gen eine massive Repression während der frühen Wundheilung beobachtet, die sich in den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels lokalisieren ließ.

Darauf aufbauend wurden zudem die Expressionsmuster der *rip*-Gene unter proliferations- sowie differenzierungsförderlichen Kultivierungsbedingungen von Keratinozyten *in vitro* untersucht. Auch hierbei ließ sich keine Regulation der Expression der *rip*-Gene 1, 3 und 5 nachweisen, während das Expressionsniveau des *rip2*-Gens bei HaCaT-Zellen mit deren Proliferationsrate korrelierte, was sich jedoch in primären Keratinozyten nicht bestätigen ließ. Die Expression des *rip4*-Gens wies hingegen sowohl in HaCaT-Zellen als auch in primären Keratinozyten eine enge Assoziation mit der frühen Differenzierung auf, womit sich bereits andeutete, dass RIP4 an der Regulation der Keratinozytendifferenzierung beteiligt sein könnte.

Vor diesem Hintergrund wurde *in vitro* untersucht, welche Faktoren an der Repression des *rip4*-Gens in Keratinozyten nach Verwundung beteiligt sein könnten. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sehr unterschiedliche Faktoren, welche größtenteils auch wichtige Regulatoren der Wundheilung *in vivo* sind, eine Repression der *rip4*-Genexpression bewirken können: sowohl Serum als auch EGF,

TGF- β 1, Activin A, proinflammatorische Zytokine und Wasserstoffperoxid führten zu einer Hemmung der *rip4*-Expression. Diese Hemmung ließ sich jedoch teilweise durch Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B blockieren, wobei sich insbesondere nach Applikation von Dexamethason eine komplette Aufhebung der *rip4*-Genrepression nach Verwundung *in vitro* nachweisen ließ. Begleitet wurde diese Dysregulation von einem vollständig unterbleibenden Wundverschluss der Keratinozyten-Monokultur, was auf eine besondere Bedeutung der Regulation der *rip4*-Expression für die Reepithelisierung nach Verwundung hinweist.

Zur näheren Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von RIP4 in Keratinozyten wurde schließlich die Expression des *rip4*-Gens in kultivierten HaCaT-Zellen mittels siRNA gehemmt. Anschließende Untersuchungen der Keratinozyten zeigten, dass die Hemmung der *rip4*-Genexpression weder eine veränderte Proliferationsrate noch eine Regulation von proliferationsassoziierten Genen nach sich zog. Demgegenüber ließ sich insbesondere für Gene, welche mit der frühen und mittleren Differenzierungsphase von Keratinozyten assoziiert sind, eine temporär induzierte Expression nachweisen. Zusammen mit den Ergebnissen der *in vivo*-Analysen zur Lokalisation der *rip4*-Genexpression im Hautgewebe konnte somit gezeigt werden, dass das RIP4-Protein an der Regulation der frühen Differenzierung von Keratinozyten beteiligt ist.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass RIP4 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Keratinozyten bewirkt. Da auch über die Bedeutung von NF- κ B für die Wundheilung der Haut vor Beginn dieser Arbeit wenig bekannt war, wurde auch dessen Aktivierung im Verlauf der Wundheilung untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von NF- κ B bei der Wundheilung der Haut einer differentiellen Regulation unterliegt. Insbesondere in Zellen des Granulationsgewebes sowie des hyperproliferativen Epithels ließ sich eine massive Aktivierung nachweisen. Wundheilungsstudien an I κ B α DN-Mäusen, in denen die Aktivität des NF- κ B auf ein Minimum reduziert ist, zeigten zudem, dass die mangelnde NF- κ B-Aktivierung zu einem ausgeprägten inflammatorischen Wundheilungs-Phänotyp führt, der mit einer verminderten Ausbildung des hyperproliferativen Epithels einhergeht. Ähnlich wie nach Dexamethason-Applikation *in vitro* führte die eingeschränkte NF- κ B-Aktivität zudem auch *in vivo* zu einer stagnierenden, hohen Expression des *rip4*-Gens nach Verwundung.

Insgesamt konnte somit nachgewiesen werden, dass die Gene, die für die verschiedenen *Receptor Interacting Proteins* kodieren, in Keratinozyten charakteristische Expressionsmuster aufweisen. Während *rip1-3* sowie *rip5* größtenteils lediglich moderat exprimiert und nicht reguliert werden, unterliegt das *rip4*-Gen einer komplexen Regulation und übernimmt in Keratinozyten eine bedeutende Funktion sowohl bei der Reepithelisierung nach Verwundung als auch bei der epidermalen Differenzierung.

6 Summary

Receptor Interacting Proteins: the role of the NF- κ B-activators in cutaneous wound healing and epidermal differentiation

Receptor Interacting Proteins (RIPs) were initially identified as adapter proteins of the intracellular domain of members of the TNFR I family. Meanwhile, they are known to be crucial integrators of intracellular vital processes and central regulators of cell proliferation and differentiation. Although a previous publication could demonstrate that RIP4 is an important modulator of ectodermal tissue formation during embryonic development, nothing was known about a potential role of the RIP proteins in cutaneous wound healing and epidermal differentiation at the beginning of our study. Cutaneous wound repair requires a tight and coordinated regulation of various different processes, such as cell proliferation, differentiation, and migration. This regulation is performed by a complex system of growth factors and cytokines, which bind to various types of specific receptors and thus initiate complex signal transduction pathways. Due to the particular importance of receptors of the TNFR type for cutaneous wound healing, the aim of this thesis was to analyse the role of the Receptor Interacting Proteins in the regeneration and differentiation of the epidermal tissue.

Initially, basal expression patterns of the *rip* genes in skin tissue and their regulation after wounding were analysed via *Northern blot*. Even though there was no obvious regulation of the moderately expressed genes of *rip1*, *2* and *5*, a strong induction of *rip3* gene expression was observed during the inflammatory stage of wound healing. Further analysis using the immunofluorescence technology could show that this was primarily due to increased expression in the granulation tissue. By contrast, the intense *rip4*-expression seen in intact skin was strongly downregulated early after wounding, particularly in the keratinocytes of the hyperproliferative epithelium. These results could be confirmed after scratch-wounding of keratinocytes *in vitro*.

Furthermore, the patterns of *rip* gene expression were analysed in proliferating and differentiating keratinocytes *in vitro*. Whereas expression levels of the *rip1*, *3* and *5* genes were unaltered upon differentiation, *rip2*-expression was decreased in differentiating HaCaT-cells but not in differentiating primary keratinocytes. Upregulation of *rip4* gene expression was associated with the early differentiation stage of both cell types, suggesting a role of RIP4 in keratinocyte differentiation.

Based on these findings, the regulation of *rip4* gene expression by different biological factors was studied in cultured keratinocytes *in vitro*. For this purpose, cells were treated with various growth factors and cytokines. Thus, we could show that a broad variety of factors such as whole serum, as well as EGF, TGF- β , Activin A, proinflammatory cytokines and reactive oxygen species lead to a repression of *rip4* gene expression. Interestingly, this repression could be at least partially abolished

by factors which act as inhibitors of the transcription factor NF- κ B. Particularly, treatment with the glucocorticoid dexamethasone totally blocked the scratch-induced repression of *rip4* gene, accompanied with an absence of reepithelialisation of the wounded keratinocytes, indicating a pivotal role of *rip4* gene downregulation after wounding.

To get further information about the precise function of RIP4 in epidermal keratinocytes, additional studies using specific siRNA were performed. Despite the fact that inhibition of *rip4* gene expression had no effect on keratinocyte proliferation, a temporary induction especially of early markers of keratinocyte differentiation was observed in *rip4*-mRNA deficient cells, confirming the essential role of this protein in epidermal homeostasis.

Finally, it could be demonstrated that activation of the transcription factor NF- κ B is dependent on *rip4* gene expression in keratinocytes. Since at the beginning of this study, nothing was known about the role of NF- κ B in cutaneous wound healing, the activation patterns of this transcription factor in murine excisional wounds were determined: Thereby, we observed a strong NF- κ B activation in certain cells of the granulation tissue, as well as in the keratinocytes of the hyperproliferative epithelium. Consistently, wounding of transgenic mice expressing a dominant negative inhibitor of NF- κ B resulted in a distinct inflammatory phenotype, accompanied by a slightly delayed formation of the hyperproliferative epithelium. In addition, the restricted NF- κ B activation *in vivo* led to constitutive expression of *rip4* gene after wounding, as observed after dexamethasone application and wounding *in vitro*.

In summary, it was shown that *rip* genes are differentially expressed in cutaneous wound repair and keratinocyte differentiation. Whereas most *rip* genes are only slightly expressed and not regulated in keratinocytes, it could be shown that RIP4 is an important modulator of epidermal regeneration upon wounding and a crucial regulator of keratinocyte differentiation.

7 Literaturverzeichnis

1. Abdelmalek, M. and Spencer, J., *Retinoids and wound healing*. Dermatol Surg, 2006. **32**(10): p. 1219-30.
2. Amit, I., et al., *A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling*. 2007. **39**(4): p. 503-512.
3. Ando, Y. and Jensen, P.J., *Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration*. J Invest Dermatol, 1993. **100**(5): p. 633-9.
4. Arch, R.H., Gedrich, R.W., and Thompson, C.B., *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)---a family of adapter proteins that regulates life and death*. Genes Dev., 1998. **12**(18): p. 2821-2830.
5. Bahr, C., et al., *DIK, a Novel Protein Kinase That Interacts with Protein Kinase Cdelta . CLONING, CHARACTERIZATION, AND GENE ANALYSIS*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(46): p. 36350-36357.
6. Baud, V. and Karin, M., *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
7. Beer, H.D., Fassler, R., and Werner, S., *Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair*. Vitam Horm, 2000. **59**: p. 217-39.
8. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J. Cell Biol., 1988. **106**(3): p. 761-771.
9. Cerutti, P.A., *Prooxidant states and tumor promotion*. Science, 1985. **227**(4685): p. 375-81.
10. Chen, L., et al., *Protein Kinase C-associated Kinase (PKK), a Novel Membrane-associated, Ankyrin Repeat-containing Protein Kinase*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(24): p. 21737-21744.
11. Chin, A.I., et al., *Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses*. 2002. **416**(6877): p. 190-194.
12. Coldiron, B.M., *The UV Index: a weather report for skin*. Clin Dermatol, 1998. **16**(4): p. 441-6.
13. Courtois, G., *The NF-kappaB signaling pathway in human genetic diseases*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(15): p. 1682-91.
14. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G., *Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6868-86.
15. Denning, M.F., *Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1141-6.
16. Department of Dermatology, College of Medicine, University of Iowa, *Normal Epidermis and Dermis*, 1995, <http://tray.dermatology.uiowa.edu/DPT/Hist/Nrml-002.htm>
17. Derynck, R. and Zhang, Y.E., *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
18. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 19-30.
19. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.

20. Deutsche Dermatologische Gesellschaft, *Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG)*, 2005, <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/013-034.htm>
21. Di Cunto, F., et al., *Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control*. *Science*, 1998. **280**(5366): p. 1069-72.
22. Dorai, T. and Aggarwal, B.B., *Role of chemopreventive agents in cancer therapy*. *Cancer Lett*, 2004. **215**(2): p. 129-40.
23. Eckert, R.L., et al., *p38 Mitogen-Activated Protein Kinases on the Body Surface - A Function for p38[delta]*. 2003. **120**(5): p. 823-828.
24. Efimova, T., Broome, A.-M., and Eckert, R.L., *A Regulatory Role for p38{delta} MAPK in Keratinocyte Differentiation: EVIDENCE FOR p38{delta}-ERK1/2 COMPLEX FORMATION*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(36): p. 34277-34285.
25. Efimova, T., et al., *Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activating a p38 delta mitogen-activated protein kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein alpha*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 31753-60.
26. Efimova, T., et al., *Regulation of Human Involucrin Promoter Activity by a Protein Kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 Signal Transduction Pathway*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**(38): p. 24387-24395.
27. Ehlers, S., et al., *RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells*. *Eur J Cell Biol*, 2008. **87**(3): p. 163-72.
28. Ehrlich, H.P. and Hunt, T.K., *Effects of cortisone and vitamin A on wound healing*. *Ann Surg*, 1968. **167**(3): p. 324-8.
29. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 817-25.
30. Elias, P.M., et al., *Retinoid effects on epidermal structure, differentiation, and permeability*. *Lab Invest*, 1981. **44**(6): p. 531-40.
31. Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M., *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(3): p. 514-25.
32. Feng, S., et al., *Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain*. *Cellular Signalling*, 2007. **19**(10): p. 2056-2067.
33. Fisher, G. and Voorhees, J., *Molecular mechanisms of retinoid actions in skin*. *FASEB J.*, 1996. **10**(9): p. 1002-1013.
34. Freedberg, I.M., et al., *Keratins and the keratinocyte activation cycle*. *J Invest Dermatol*, 2001. **116**(5): p. 633-40.
35. Fuchs, E., *Epidermal differentiation: the bare essentials*. *J. Cell Biol.*, 1990. **111**(6): p. 2807-2814.
36. Fuchs, E., *Keratins and the skin*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 123-53.
37. Fuchs, E. and Green, H., *Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte*. *Cell*, 1980. **19**(4): p. 1033-1042.
38. Gartel, A.L. and Tyner, A.L., *Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene*. *Exp Cell Res*, 1999. **246**(2): p. 280-9.
39. Geneser, *Histologie*. 1990, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
40. Gilmore, T.D. and Herscovitch, M., *Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6887-99.

41. Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J., *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
42. Greenhalgh, D.A., et al., *Paradoxical tumor inhibitory effect of p53 loss in transgenic mice expressing epidermal-targeted v-rasHa, v-fos, or human transforming growth factor alpha*. *Cancer Res*, 1996. **56**(19): p. 4413-23.
43. Grimm, S., Stanger, B.Z., and Leder, P., *RIP and FADD: Two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(20): p. 10923-10927.
44. Hagemann, C. and Blank, J.L., *The ups and downs of MEK kinase interactions*. *Cell Signal*, 2001. **13**(12): p. 863-75.
45. Henson, E.S. and Gibson, S.B., *Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy*. *Cell Signal*, 2006. **18**(12): p. 2089-97.
46. Hogan B., B.R., Costantini F. and Lacy E., *Manipulating the mouse embryo*. Second edition ed. 1994, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 217-252.
47. Holland, P.M., et al., *RIP4 Is an Ankyrin Repeat-Containing Kinase Essential for Keratinocyte Differentiation*. *Current Biology*, 2002. **12**(16): p. 1424-1428.
48. Hsu, H., et al., *TNF-Dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex*. *Immunity*, 1996. **4**(4): p. 387-396.
49. Inohara, N., et al., *RICK, a Novel Protein Kinase Containing a Caspase Recruitment Domain, Interacts with CLARP and Regulates CD95-mediated Apoptosis*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**(20): p. 12296-12300.
50. Janmaat, M.L. and Giaccone, G., *The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy*. *Drugs Today (Barc)*, 2003. **39 Suppl C**: p. 61-80.
51. Jiang, C., et al., *Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor {alpha} Specifically Induce the Activation- and Hyperproliferation-Associated Keratins 6 and 16*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. **90**(14): p. 6786-6790.
52. Jobin, C., et al., *Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity*. *J Immunol*, 1999. **163**(6): p. 3474-83.
53. Jost, M., et al., *A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(4): p. 443-9.
54. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
55. Karin, M. and Lin, A., *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 221-7.
56. Kasof, G.M., et al., *The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-[kappa]B nuclear translocation and localizes to mitochondria*. *FEBS Letters*, 2000. **473**(3): p. 285-291.
57. Kato, T., et al., *CK2 Is a C-Terminal I[kappa]B Kinase Responsible for NF-[kappa]B Activation during the UV Response*. *Molecular Cell*, 2003. **12**(4): p. 829-839.
58. Kaufman, C.K. and Fuchs, E., *It's got you covered. NF-kappaB in the epidermis*. *J Cell Biol*, 2000. **149**(5): p. 999-1004.

59. Kelliher, M.A., et al., *The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF- κ B Signal*. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 297-303.
60. Kim, J.W., Choi, E.J., and Joe, C.O., *Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP*. *Oncogene*, 2000. **19**(39): p. 4491-9.
61. King, L.E., Jr., et al., *The EGF/TGF alpha receptor in skin*. *J Invest Dermatol*, 1990. **94**(6 Suppl): p. 164S-170S.
62. Kobayashi, K., et al., *RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems*. 2002. **416**(6877): p. 194-199.
63. Kobayashi, T., et al., *Endogenous EGF-family growth factors are necessary for the progression from the G1 to S phase in human keratinocytes*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(4): p. 616-20.
64. Krappmann, D., Wulczyn, F.G., and Scheidereit, C., *Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo*. *Embo J*, 1996. **15**(23): p. 6716-26.
65. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
66. Lee, B., et al., *From an enhanceosome to a repressosome: molecular antagonism between glucocorticoids and EGF leads to inhibition of wound healing*. *J Mol Biol*, 2005. **345**(5): p. 1083-97.
67. Lee, D.H. and Goldberg, A.L., *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. *Trends Cell Biol*, 1998. **8**(10): p. 397-403.
68. Lee, Y.S., Yuspa, S.H., and Dlugosz, A.A., *Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C signaling pathway*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(5): p. 762-6.
69. Li, N. and Karin, M., *Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?* *FASEB J*, 1999. **13**(10): p. 1137-1143.
70. Li, Q. and Verma, I.M., *NF- κ B regulation in the immune system*. 2002. **2**(10): p. 725-734.
71. Lin, Y., et al., *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. *Genes Dev*, 1999. **13**(19): p. 2514-26.
72. Liou, H.C., *Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB*. *J Biochem Mol Biol*, 2002. **35**(6): p. 537-46.
73. Liu, W.S. and Heckman, C.A., *The sevenfold way of PKC regulation*. *Cell Signal*, 1998. **10**(8): p. 529-42.
74. Love, J.M. and Gudas, L.J., *Vitamin A, differentiation and cancer*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(6): p. 825-31.
75. Mackool, R.J., Gittes, G.K., and Longaker, M.T., *Scarless healing. The fetal wound*. *Clin Plast Surg*, 1998. **25**(3): p. 357-65.
76. Mangelsdorf, D.J., *Vitamin A receptors*. *Nutr Rev*, 1994. **52**(2 Pt 2): p. S32-44.
77. Mantena, S.K. and Katiyar, S.K., *Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling in human epidermal keratinocytes*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(9): p. 1603-14.
78. Markova, N.G., et al., *Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein*. *Mol. Cell. Biol.*, 1993. **13**(1): p. 613-625.
79. Martin, P., *Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 75-81.

80. Martinon, F., et al., *Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF- κ B-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP*. FEBS Letters, 2000. **468**(2-3): p. 134-136.
81. McCarthy, J.V., Ni, J., and Dixit, V.M., *RIP2 Is a Novel NF- κ B-activating and Cell Death-inducing Kinase*. J. Biol. Chem., 1998. **273**(27): p. 16968-16975.
82. Mehrel, T., et al., *Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin*. Cell, 1990. **61**(6): p. 1103-12.
83. Meylan, E., et al., *RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF- κ B and is processed during apoptosis*. EMBO Rep, 2002. **3**(12): p. 1201-8.
84. Meylan, E. and Tschopp, J., *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(3): p. 151-159.
85. Missero, C., et al., *Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5451-5.
86. Mosavi, L.K., et al., *The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition*. Protein Sci, 2004. **13**(6): p. 1435-48.
87. Moynagh, P.N., *The NF- κ B pathway*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4589-92.
88. Munz, B., et al., *RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5879-86.
89. Munz, B., et al., *Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair*. Embo J, 1999. **18**(19): p. 5205-15.
90. Murphy, J.E., Robert, C., and Kupper, T.S., *Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 602-8.
91. Muto, A., et al., *Protein Kinase C-associated Kinase (PKK) Mediates Bcl10-independent NF- κ B Activation Induced by Phorbol Ester*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(35): p. 31871-31876.
92. Nanney, L.B., et al., *Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendages*. J Invest Dermatol, 1984. **83**(5): p. 385-93.
93. Neumann, M. and Naumann, M., *Beyond I κ Bs: alternative regulation of NF- κ B activity*. Faseb J, 2007. **21**(11): p. 2642-54.
94. Newton, K., Sun, X., and Dixit, V.M., *Kinase RIP3 Is Dispensable for Normal NF- κ Bs, Signaling by the B-Cell and T-Cell Receptors, Tumor Necrosis Factor Receptor 1, and Toll-Like Receptors 2 and 4*. Mol. Cell. Biol., 2004. **24**(4): p. 1464-1469.
95. Ohba, M., et al., *Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5199-207.
96. Okamoto, T., Sanda, T., and Asamitsu, K., *NF- κ B Signaling and Carcinogenesis*. Current Pharmaceutical Design. **13**: p. 447-462.
97. Papp, H., et al., *Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes*. Exp Dermatol, 2003. **12**(6): p. 811-24.
98. Pasparakis, M., Luedde, T., and Schmidt-Supprian, M., *Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice*. 2006. **13**(5): p. 861-872.

99. Prowse, D.M., et al., *Involvement of the Sp3 transcription factor in induction of p21Cip1/WAF1 in keratinocyte differentiation*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1308-14.
100. Reed, B.R. and Clark, R.A., *Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge. II*. J Am Acad Dermatol, 1985. **13**(6): p. 919-41.
101. Renard, P., et al., *Is the effect of interleukin-1 on glutathione oxidation in cultured human fibroblasts involved in nuclear factor-kappaB activation?* Antioxid Redox Signal, 2001. **3**(2): p. 329-40.
102. Resing, K., Walsh, K., and Dale, B., *Identification of two intermediates during processing of profilaggrin to filaggrin in neonatal mouse epidermi*. J. Cell Biol., 1984. **99**(4): p. 1372-1378.
103. Reuning, U., et al., *Inhibition of NF-kappa B-Rel A expression by antisense oligodeoxynucleotides suppresses synthesis of urokinase-type plasminogen activator (uPA) but not its inhibitor PAI-1*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(19): p. 3887-93.
104. Rice, R.H. and Green, H., *Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions*. Cell, 1979. **18**(3): p. 681-94.
105. Rodeck, U., et al., *Regulation of Bcl-xL expression in human keratinocytes by cell-substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5067-72.
106. Rodeck, U., et al., *EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 2): p. 113-21.
107. Rodgarkia-Dara, C., et al., *The activin axis in liver biology and disease*. Mutat Res, 2006. **613**(2-3): p. 123-37.
108. Ruby, A.J., et al., *Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids*. Cancer Lett, 1995. **94**(1): p. 79-83.
109. Ryle, C.M., et al., *Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones*. Differentiation, 1989. **40**(1): p. 42-54.
110. Santoro, M.M. and Gaudino, G., *Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing*. Experimental Cell Research, 2005. **304**(1): p. 274-286.
111. Schmidt-Ullrich, R., et al., *Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices*. Development, 2001. **128**(19): p. 3843-53.
112. Schmuth, M., et al., *Nuclear hormone receptors in human skin*. Horm Metab Res, 2007. **39**(2): p. 96-105.
113. Schultz, G.S., et al., *Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor*. Science, 1987. **235**(4786): p. 350-2.
114. Seishima, M., et al., *Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(4): p. 432-6.
115. Seitz, C.S., et al., *Alterations in NF-kappa B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(5): p. 2307-2312.
116. Sen, R. and Baltimore, D., *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
117. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a Second, Evolutionary Conserved, NF-kappa B Signaling Pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-1499.

118. Seo, H.R., et al., *PKC α induces differentiation through ERK1/2 phosphorylation in mouse keratinocytes*. *Exp Mol Med*, 2004. **36**(4): p. 292-9.
119. Shimizu, A., et al., *Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signalling in a human epidermal keratinocyte cell line*. *Genes Cells*, 1998. **3**(2): p. 125-34.
120. Singer, A.J. and Clark, R.A.F., *Cutaneous Wound Healing*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(10): p. 738-746.
121. Singh, S. and Aggarwal, B.B., *Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(42): p. 24995-5000.
122. Squires, M.S., et al., *Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(3): p. 361-76.
123. Stanger, B.Z., et al., *RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death*. *Cell*, 1995. **81**(4): p. 513-523.
124. Stojadinovic, O., et al., *Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(6): p. 4021-34.
125. Stoll, S.W., et al., *EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL*. *Oncogene*, 1998. **16**(11): p. 1493-9.
126. Streit, M., Belezny, Z., and Braathen, L.R., *Topical application of the tumour necrosis factor-alpha antibody infliximab improves healing of chronic wounds*. *Int Wound J*, 2006. **3**(3): p. 171-9.
127. Sudbeck, B.D., et al., *Selective loss of PMA-stimulated expression of matrix metalloproteinase 1 in HaCaT keratinocytes is correlated with the inability to induce mitogen-activated protein family kinases*. *Biochem J*, 1999. **339** (Pt 1): p. 167-75.
128. Sun, X., et al., *RIP3, a Novel Apoptosis-inducing Kinase*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(24): p. 16871-16875.
129. Sun, X., et al., *Identification of a Novel Homotypic Interaction Motif Required for the Phosphorylation of Receptor-interacting Protein (RIP) by RIP3*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**(11): p. 9505-9511.
130. Szpaderska, A.M., et al., *The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(6): p. 1130-7.
131. Takeda, K., et al., *Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α* . *Science*, 1999. **284**(5412): p. 313-6.
132. Tergaonkar, V., et al., *I{kappa}B Kinase-Independent I{kappa}B{alpha} Degradation Pathway: Functional NF-{kappa}B Activity and Implications for Cancer Therapy*. *Mol. Cell. Biol.*, 2003. **23**(22): p. 8070-8083.
133. Thome, M., et al., *Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1*. *Current Biology*, 1998. **8**(15): p. 885-889.
134. Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X., and Seed, B., *RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis*. *Embo J*, 1996. **15**(22): p. 6189-96.
135. Tomic-Canic, M., et al., *Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes*. *J Dermatol Sci*, 1998. **17**(3): p. 167-81.
136. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. *Genes Dev*, 2006. **20**(5): p. 515-24.

137. Watt, F.M., *Terminal differentiation of epidermal keratinocytes*. *Curr Opin Cell Biol*, 1989. **1**(6): p. 1107-15.
138. Watt, F.M., *Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998. **353**(1370): p. 831-7.
139. Weber, C.H. and Vincenz, C., *The death domain superfamily: a tale of two interfaces?* *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(8): p. 475-81.
140. Weinberg, W.C. and Denning, M.F., *P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**(6): p. 453-64.
141. Weiss, R., Eichner, R., and Sun, T., *Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes*. *J. Cell Biol.*, 1984. **98**(4): p. 1397-1406.
142. Welter, J.F., et al., *Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(21): p. 12614-22.
143. Wenczak, B.A., Lynch, J.B., and Nanney, L.B., *Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(6): p. 2392-401.
144. Werner, S. and Grose, R., *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(3): p. 835-70.
145. Werner, S. and Munz, B., *Suppression of keratin 15 expression by transforming growth factor beta in vitro and by cutaneous injury in vivo*. *Exp Cell Res*, 2000. **254**(1): p. 80-90.
146. Werner, S., et al., *The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds*. *Science*, 1994. **266**(5186): p. 819-22.
147. Xu, Y.X., et al., *Curcumin, a compound with anti-inflammatory and anti-oxidant properties, down-regulates chemokine expression in bone marrow stromal cells*. *Exp Hematol*, 1997. **25**(5): p. 413-22.
148. Yamada, K., et al., *Transcriptional regulation of human transglutaminase 1 gene by signaling systems of protein kinase C, RAR/RXR and Jun/Fos in keratinocytes*. *Biochem Mol Biol Int*, 1994. **34**(4): p. 827-36.
149. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. *Eur J Cancer*, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
150. Yu, P.W., et al., *Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB*. *Curr Biol*, 1999. **9**(10): p. 539-42.
151. Yu, W., Naim, J.O., and Lanzafame, R.J., *Expression of growth factors in early wound healing in rat skin*. *Lasers Surg Med*, 1994. **15**(3): p. 281-9.
152. Zha, J., et al., *RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. **319**(2): p. 298-303.
153. Zhang, S.Q., et al., *Recruitment of the IKK Signalosome to the p53 TNF Receptor: RIP and A20 Bind to NEMO (IKK[gamma]) upon Receptor Stimulation*. *Immunity*, 2000. **12**(3): p. 301-311.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------|---|----------------|--|
| Abb. | Abbildung | HB-EGF | heparin binding-EGF |
| bp | Basenpaare | I κ B | Inhibitor kappa B |
| BrdU | 5-Bromo-2'-Desoxyuridin | IKK | Kilodalton |
| BSA | Bovines Serum Albumin | KGF | keratinocyte growth factor |
| CARD | caspase activating and recruitment domain | K-SFM | keratinocyte serum-free medium |
| cDNA | complementary DNA | l | Liter |
| cm | Zentimeter | LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| Cy | Carbocyanin | M | Molar |
| d | Tag | mA | Milliampere |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid | MAPK | mitogen activated protein kinase |
| DD | death domain | mg | Milligramm |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat | min | Minute |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle's medium | ml | Milliliter |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | mM | Millimolar |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | mm | Nanometer |
| ECL | enhanced chemiluminescence | μ g | Mikrogramm |
| E.coli | Escherichia Coli | μ l | Mikroliter |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | μ m | Mikrometer |
| EGF | epidermal growth factor | μ M | Mikromolar |
| EGFR | epidermal growth factor receptor | mRNA | messenger RNA |
| ERK | extracellular signal regulated kinase | NEMO | NF- κ B essential modulator |
| et al. | et alii | NF- κ B | nuclear factor kappa B |
| FADD | Fas associated death domain | NHEK | normale humane ektodermale Keratinozyten |
| FBS | fötales bovines Serum | NIK | NF- κ B inhibitor kinase |
| FGF | fibroblast growth factor | nm | Nanometer |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat | PCR | polymerase chain reaction |
| g | Gramm | PDGF | platelet derived growth factor |
| h | Stunde | PMA | Phorbol 12-Myristat 13-Acatat |
| HaCaT | human adult keratinocytes, calcium, temperature | RHIM | RIP homotypic interaction motif |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------|------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
| RIP | receptor interacting protein | TGF- β | transforming growth factor beta |
| PKC | Proteinkinase C | TNF- α | tumor necrosis factor alpha |
| RNA | Ribonukleinsäure | TRAF | TNFR associated factor |
| RNase | Ribonuklease | Tris | Tris(hydroxymethyl)-Amino- methan |
| ROS | reactive oxygen species | U | Unit |
| rRNA | ribosomale RNA | upm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur | UV | Ultraviolettes Licht |
| SDS | Natriumdodecylsulfat | V | Volt |
| siRNA | small interfering RNA | Vit. | Vitamin |
| SSC | standard sodium citrat | v/v | Volumenanteil pro Volumen |
| PMA | Phorbol 12-Myristat 13-Acatat | w/v | Gewichtsanteil pro Volumen |
| RHIM | RIP homotypic interaction motif | | |

9 Publikationen

Adams, S., Pankow, S., Werner, S. and Munz, B. "Regulation of NF-kappaB activity and keratinocyte differentiation by the RIP4 protein: implications for cutaneous wound repair." J Invest Dermatol. 2007 **127**(3): 538-44.

Ehlers, S., Mueck, T., Adams, S., Landuzzi, L., Lollini, P. L. and Munz, B. "RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells." Eur J Cell Biol. 2008. **87**(3): p. 163-72.

Neu, R., Adams, S. and Munz, B. "Differential expression of entactin-1/nidogen-1 and entactin-2/nidogen-2 in myogenic differentiation." Differentiation 2006 **74**(9-10): 573-82.

Adams, S., Munz B. "Regulation of epidermal differentiation and regeneration: signal transduction pathways which regulate *rip4* gene expression." *Manuscript in preparation.*

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Munz für die exzellente Betreuung und die weit über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung bedanken. Insbesondere die vielen Tipps, die motivierende Begeisterung und die stete Bereitschaft zu kritischen und konstruktiven Diskussionen haben nicht nur viele Ergebnisse dieser Arbeit weit vorgebracht.

Ganz herzlich danke ich auch Prof. Einspanier für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der Betreuung am Fachbereich für Veterinärmedizin.

Vor allem möchte ich mich auch bei allen Laborkollegen für das ausgezeichnete Arbeitsklima bedanken, wobei vor allem Renate Noske-Reimers ein großes Dankeschön für die unzähligen Hilfen und die schöne Zeit gilt. Stefanie Maibaum, Ricarda Neu und Melanie Busse danke ich für die angenehme Wegbegleitung und Svenja Ehlers zudem für die vielen tiermedizinischen Fachsimpelien. Pinar Akman gilt darüber hinaus ein ganz besonderer Dank für die stets amüsante und erfrischende Pausenbegleitung. Tobias Mück danke ich zudem auch für das Zustandekommen unterschiedlichster Grillabende sowie die neuartigen Einblicke in den Fußball, Max Schwarzbürger für seine unbeschreibliche Art und die gemeinsamen Einblicke in die detaillierte Anatomie diverser Mäuse. Ein großes Dankeschön auch an Christine Hacker und Felicitas Berger für zahlreiche neue Ansätze im Labor und die hilfreichen Erfahrungsberichte.

Zudem danke ich den Mitarbeitern der AG Pries, insbesondere Louis Da Silva für das Bereitstellen und die Einarbeitung in diverse Gerätschaften und Gabi Beyer für das Einarbeiten in die Zellkultur. Ein ganz großer Dank sei auch den Damen der Spülküche und all denjenigen, die seltsame Computerprobleme zu beheben wussten.

Prof. Sabine Werner und ihren Mitarbeitern gilt ein besonderer Dank für die intensive Unterstützung während der gesamten Zeit sowie für den interessanten Einblick in die Arbeit ihres Labors.

Gleichermaßen danke ich auch Prof. Eberhard Hildt für die zahlreichen Hilfen, die einige Projekte entscheidend vorangetrieben haben. Auch Frau Dr. Ruth Schmidt-Ullrich möchte ich für die Verfügungsstellung der transgenen Mauslinie danken.

Schließlich danke ich auch der DFG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie einen ganz großen Dank für die große Unterstützung und die regelmäßige Abwechslung, die ihr alle so mit euch bringt aussprechen.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Stephanie Adams