

**Analyse der Cytokin-vermittelten Wachstumsregulation in
Homöostase und Wundheilung der Haut -
Interleukin-18 in der dermal-epidermalen Kommunikation**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium*

vorgelegt von

Anja Fritsch

Diplom-Biochemikerin

geboren am 10. Januar 1977 in Hildburghausen

dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich Schiller-Universität Jena

2004

Hiermit versichere ich, die angeführten Arbeiten selbständig und ausschließlich mit Hilfe der angegebenen Quellen und Hilfsmittel durchgeführt zu haben.

Heidelberg, den 14. April 2004

Ort, Datum


.....
Unterschrift

Gutachter

Prof. Dr. C. Liebmann	Friedrich-Schiller-Universität Jena Institut für Biochemie und Biophysik Philosophenweg 12 07743 Jena
Prof. Dr. P. Angel	Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg Signaltransduktion/Wachstumskontrolle Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg
PD Dr. P. Boukamp	Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg Genetik der Hautkarzinogenese Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg

Prüfung 24. Februar 2004

Verteidigung 5. April 2004

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungsschwerpunkt Tumorzellregulation des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg) in der Abteilung „Differenzierung und Karzinogenese *in vitro*“ unter der Betreuung von Prof. N. Fusenig und PD N. Maas-Szabowski angefertigt. An der Friedrich Schiller-Universität Jena wurde die Arbeit durch Prof. C. Liebmann vertreten.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit maßgeblichen Anteil hatten.

Besonderen Dank schulde ich Prof. Norbert Fusenig, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen und der meine wissenschaftliche Entwicklung stark gefördert hat, nicht zuletzt durch eine sehr kritische Diskussion aller Ergebnisse und Versuchsvorhaben. Gleichermäßen gilt mein Dank Prof. Claus Liebmann für seine Bereitschaft, meine Arbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena zu vertreten und es mir so zu ermöglichen, trotz der Bearbeitung des Themas am Deutschen Krebsforschungszentrum meiner Heimat-Universität verbunden zu bleiben.

Meiner Betreuerin, PD Nicole Maas-Szabowski möchte ich meinen Dank aussprechen für die geduldige Einarbeitung in die Arbeitstechniken dieses Labors und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Sie ermöglichte mir die selbständige und eigenverantwortliche Bearbeitung meines Themas und war doch immer präsent, um mir in schwierigen Phasen der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Ihrem Mann, Dr. Axel Szabowski, verdanke ich viele „Augenöffner“ im Hinblick auf die Interpretation meiner Daten.

Ich danke allen Mitgliedern der Abteilung für die freundliche Aufnahme und die vielen Gespräche und Diskussionen, die letztendlich am Gelingen meiner Arbeit wesentlichen Anteil hatten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann bedanken, der nie müde wurde, sich die Erfolge und Probleme meiner täglichen Arbeit anzuhören und mich immer liebevoll unterstützt hat.

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	6
2.1	Die Haut	6
2.1.1	Die Epidermis	6
2.1.2	Die Dermis	7
2.2	Cytokine und Wachstumsfaktoren	7
2.2.1	Cytokine in der Wundheilung	8
2.2.2	Fibroblast Growth Factor 7 / Keratinocyte Growth Factor	10
2.2.3	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor	11
2.2.4	Cytokine in der Tumorentwicklung	13
2.3	Modellsysteme	14
2.3.1	Haut- und Wundheilungsmodelle <i>in vitro</i>	14
2.3.2	Das HaCaT-Modell der Hautkarzinogenese	15
2.4	Fragestellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Zellkultur	18
3.1.1	Medien und Lösungen	18
3.1.2	Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten	19
3.1.3	Isolierung und Kultivierung primärer humaner Fibroblasten	21
3.1.4	Kultivierung muriner Fibroblasten	22
3.1.5	Kultivierung von Standard-HaCaT und HaCaT-ras-Klonen	22
3.1.6	Kultivierung von Zellen zur Analyse der mRNA und Proteinexpression	23
3.1.7	Organotypische Cokulturen	23
3.2	Expressionsanalysen	24
3.2.1	Nachweis der mRNA-Expression – RT-PCR	24
3.2.2	Nachweis der mRNA-Expression – cDNA Array	29
3.2.3	Nachweis der Proteinexpression – Western Blot	33
3.2.4	Nachweis der Proteinexpression – indirekte Immunfluoreszenz	37
3.2.5	Nachweis der Proteinseznernierung – ELISA	38
3.3	Funktionsanalysen	39
3.3.1	Proliferation in submersen Kulturen	39
3.3.2	Migration in submersen Keratinozyten/Fibroblasten-Cokulturen	40
3.3.3	Proliferation, Differenzierung und Apoptose in organotypischer Cokultur	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Induktion Proliferations-assoziiierter Transkripte durch FGF-7 und GM-CSF	42
4.2	Expression von Regulatoren, Strukturproteinen und Signalmolekülen	45
4.3	Interleukin-11	49

4.4	Interleukin 18.....	50
4.4.1	Interleukin-18 und seine Rezeptoren in Keratinozyten und Fibroblasten.....	51
4.4.2	Regulation der IL-18-Expression durch FGF-7 und GM-CSF.....	54
4.4.3	Wirkung von IL-18 auf Keratinozyten und Fibroblasten.....	57
4.4.4	Bedeutung von IL-18 für die Epithelbildung unter Einfluss von FGF-7.....	61
4.4.5	Bedeutung von IL-18 für die Epithelbildung unter Einfluss von GM-CSF.....	64
4.5	Änderungen der IL-18 Expression im Verlauf der Tumorprogression.....	67
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	70
5	Diskussion.....	72
6	Anhang.....	82
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	82
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	83
6.3	Literaturverzeichnis.....	84

1 Zusammenfassung

Homöostase und Regeneration der Haut basieren auf einer präzisen Steuerung von Proliferation und Differenzierung der epithelialen Zellen. Diese Prozesse werden über direkte Zell-Zell-Kontakte, sowie über Cytokin-vermittelte Interaktionen verschiedener Zelltypen reguliert. *In vitro*-Studien belegen die Existenz einer dermal-epidermalen Kommunikation, deren Auslöser die Freisetzung von *Interleukin-1* (IL-1) durch Keratinozyten ist. Dieses löst in dermalen Fibroblasten die Freisetzung von *Fibroblast Growth Factor 7* (FGF-7) und *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) aus, die ihrerseits die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten modulieren und *in vivo* die Wundheilung beschleunigen.

Um die komplexen Veränderungen, die durch FGF-7 oder GM-CSF in Epithelien induziert werden, näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss der Faktoren auf die Genexpression in Keratinozyten analysiert. Dazu wurden Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten, die aufgrund ihres Genotyps zur Synthese von FGF-7 und GM-CSF nicht in der Lage sind, mit jeweils einem der beiden Cytokine stimuliert und die Expressionsprofile der Keratinozyten mit Hilfe eines cDNA-Arrays erstellt. Die so gewonnenen Daten wurden nachfolgend durch die Analyse der Expression der jeweiligen Proteine ergänzt und schließlich deren Funktion in der dermal-epidermalen Kommunikation an *in vitro* gezüchteten Epithelien analysiert.

Neben der Expression von Strukturproteinen und Zellzyklusregulatoren modulieren FGF-7 und GM-CSF auch die Synthese eines löslichen Faktors, *Interleukin-18* (IL-18). Die Transkription dieses Genes wird durch FGF-7 und GM-CSF verstärkt. Dies ist gefolgt von einer erhöhten Translation und Prozessierung des pro-Proteins. Das von Keratinozyten freigesetzte IL-18 wirkt mitogen auf die Epithelzellen selbst und kann in *in vitro*-Epithelien die Wirkung von FGF-7 und GM-CSF teilweise ersetzen. Um die Bedeutung von IL-18 für die Wirkung von FGF-7 oder GM-CSF zu zeigen, wird die Aktivität des Cytokins bei gleichzeitiger Applikation von FGF-7 oder GM-CSF neutralisiert. Das Fehlen von IL-18 hat kaum negative Auswirkungen auf die Proliferation der Keratinozyten nach FGF-7-Zugabe, die mitogene Wirkung von GM-CSF wird dagegen durch die Inaktivierung von IL-18 blockiert. Dies weist auf eine indirekte Wirkung von GM-CSF auf Keratinozyten hin, wobei IL-18 als Mediator-Molekül fungiert.

Cytokine und Wachstumsfaktoren werden im Prozess der Tumorentwicklung häufig in ihrer Expression verändert, so dass eine Wachstumsautonomie der Tumorzellen ermöglicht wird. Diese Anpassungen können *in vitro* anhand eines Modellsystems analysiert werden, das verschiedene Stadien der Tumorprogression ausgehend von immortalen Keratinozyten bis hin zu hochmalignen, metastasierenden Zellen beinhaltet. In diesem Modellsystem nimmt die Expression von IL-18 mit der Tumorprogression stark ab, wobei bereits immortale, nicht tumorigene Keratinozyten das aktive Protein nicht mehr freisetzen.

Zusammengefasst konnte eine neue und entscheidende Rolle für IL-18 in der Wachstumsregulation von Keratinozyten gezeigt werden, die im Lauf der Tumorentwicklung verloren geht.

2 Einleitung

2.1 Die Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von durchschnittlich 1,6 m² das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie stellt seine äußere Begrenzung zur Umwelt dar und schützt das darunterliegende Gewebe vor mechanischen, chemischen und physikalischen Einflüssen. Um dieser Funktion gerecht werden zu können, ist die Haut aus einer sich ständig erneuernden Oberschicht, der Epidermis, sowie einer mechanisch stabilen Unterschicht, der Dermis, aufgebaut. Darüber hinaus dienen in die Haut eingebettete Haare und Drüsen der Regulation des Flüssigkeitshaushalts und der Körpertemperatur. Ein dichtes Netz von Nervenendigungen in Dermis und Epidermis macht die Haut zu einem empfindlichen Sinnesorgan.

2.1.1 Die Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das je nach Alter, Geschlecht und Körperpartie eine Dicke von 0,8 bis 1,4 mm erreichen kann.

Der vorherrschende Zelltyp in der Epidermis sind die Keratinozyten, zwischen denen Melanozyten eingebettet sind, die der Pigmentproduktion dienen. Daneben enthält die Epidermis Merkel-Zellen als Mechanorezeptoren, Lymphozyten sowie dendritische Langerhans-Zellen (Abb. 2.1).

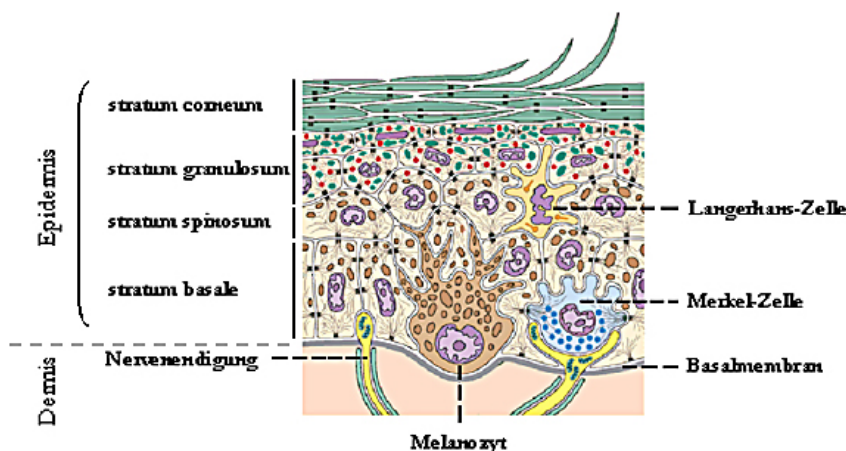


Abb. 2.1 Aufbau der Haut (Sobotta, 1997), geändert

Die Epidermis befindet sich in einem kontinuierlichen Erneuerungsprozess, der durch eine fortwährende Proliferation der basalen Keratinozyten bei gleichzeitiger Abstoßung von Hornzellen an der Außenseite der Epidermis aufrechterhalten wird.

Das proliferative Kompartiment der Epidermis, das *Stratum basale*, besteht aus palisadenartig angeordneten Keratinozyten, deren mitotisch aktive Population aus Stammzellen ständig regeneriert wird. Mit Beginn der terminalen Differenzierung migrieren die Keratinozyten zur Außenseite der Epidermis, womit zunächst eine Vergrößerung der Zellen und eine Veränderung der Cytokeratinexpression einhergeht. Anstelle der basalen Keratine K5 und K14 werden ab dem *Stratum spinosum* vor allem K1 und K10 exprimiert. Durch Keratinfilamente und zwischen den

Keratinocyten vermehrt gebildete Desmosomen wird die Keratinocyten-schicht gegenüber der Einwirkung von mechanischem Stress stabilisiert. Die Keratinocyten im *Stratum spinosum* sind durch eine hohe Proteinsyntheseleistung und das Auftreten membranumschlossener ceramidhaltiger Vesikel gekennzeichnet. Mit dem Übergang zum *Stratum granulosum* werden Hüllproteine, wie z.B. Involucrin, synthetisiert, die von innen an die Plasmamembran angelagert werden und diese verstärken. Außerdem treten Keratohyalin granula auf, die vor allem Filaggrin enthalten.

Im oberen *Stratum granulosum* werden Zellkerne und Organellen abgebaut und der Zellkörper stark abgeflacht. Lipidvesikel werden in den Interzellularräum abgegeben und verschmelzen dort zu einer wasserabweisenden Schicht. Diese bildet zusammen mit den toten, ineinander verzahnten Keratinocyten das *Stratum corneum*, das kontinuierlich abgetragen wird.

Die Epidermis enthält keine Blutgefäße. Ihre Zellen werden ausschließlich über Diffusion von der darunterliegenden, gefäßreichen Dermis versorgt (Matoltsy, 1986b).

2.1.2 Die Dermis

Die Dermis besteht aus einem Gerüst von Kollagenfasern und Proteoglykanen. Dieses wird durch die darin eingelagerten Fibroblasten synthetisiert und ist durch die Basalmembran - eine netzartige Struktur aus Proteoglykanen und Kollagen - von der Epidermis getrennt. Neben den Fibroblasten finden sich in der Dermis auch Mastzellen, Makrophagen und Melanozyten. In die Dermis eingebettet liegen Lymph- und Blutgefäße sowie Haarwurzeln und Drüsengewebe epidermalen Ursprungs (Matoltsy, 1986a).

2.2 Cytokine und Wachstumsfaktoren

Die Homöostase der Haut sowie ihre Regeneration nach einer Verletzung erfordern eine präzise Regulation von Proliferation und Differenzierung von Keratinocyten und Fibroblasten sowie weiterer am Aufbau der Gewebestruktur beteiligter Zellen. Das Verhalten der Zellen wird durch ein komplexes intra- und interzelluläres Kommunikationsnetzwerk kontrolliert, in dem außer direkten Interaktionen zwischen Zellen bzw. Zellen und der extrazellulären Matrix Interaktionen über Cytokine und Wachstumsfaktoren eine herausragende Rolle spielen (Hanahan und Weinberg, 2000; Clark, 2003).

Cytokine und Wachstumsfaktoren sind lösliche Peptide, die in der Regel nur transient als Reaktion auf externe Stimuli exprimiert werden und die in nano- bis picomolaren Konzentrationen das Verhalten von Zellen oder Zellverbänden beeinflussen. Cytokine wurden aufgrund ihrer Wirkung auf hämatopoetische Zellen beschrieben, während Wachstumsfaktoren hauptsächlich außerhalb des hämatopoetischen Systems wirksam sind. Aufgrund ihrer meist geringen Halbwertszeit zeigen Cytokine und Wachstumsfaktoren lokal begrenzte Wirkungen und

beeinflussen autokrin die Aktivität der sezernierenden Zelle selbst oder parakrin die ihrer Nachbarzellen, wobei allerdings auch Cytokine mit endokriner oder systemischer Wirkung beschrieben sind. Die ausgelösten Reaktionen umfassen dabei die positive oder negative Regulation der Proliferation oder die Veränderung des Differenzierungszustandes der Zielzellen (Vilcek, 1998).

2.2.1 Cytokine in der Wundheilung

Die Heilung einer Wunde ist ein komplexer Mehrschrittprozess, der die Aktivierung der Proliferation und Migration von Keratinozyten und Fibroblasten beinhaltet, und an dessen Regulation Cytokine und Wachstumsfaktoren maßgeblich beteiligt sind.

Nach einer Verletzung wird die entstandene Wunde zunächst durch ein Blutgerinnsel verschlossen. Dieses schützt die Wundoberfläche vor Flüssigkeitsverlust und setzt gleichzeitig bei Auflösung der Blutplättchen Cytokine und Wachstumsfaktoren frei (z.B. *Platelet Derived Growth Factor*, PDGF und *Transforming Growth Factor β* , TGF- β). Neutrophile Granulozyten wandern in die Wunde ein, begleitet von Monozyten, die im Wundbett und dem Blutgerinnsel zu Makrophagen differenzieren und weitere Cytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, unter anderem PDGF und *Interleukin-1* (Singer und Clark, 1999).

Binnen Stunden nach der Verletzung beginnen basale und suprabasale Keratinozyten vom Wundrand in das Wundbett einzuwandern (Coulombe, 2003). Dazu werden desmosomale Verbindungen der Keratinozyten untereinander und hemidesmosomale Kontakte zur Basalmembran aufgelöst, was die Wanderung der Keratinozyten unterhalb des Blutgerinnsels erlaubt. Durch die in basalen Keratinozyten einsetzende Proliferation werden die abgewanderten Keratinozyten am Wundrand ersetzt. Einige Tage nach der Verletzung wandern Fibroblasten in das Wundbett ein und beginnen mit der Synthese einer provisorischen Matrix, dem Granulationsgewebe, das von einer Vielzahl neugebildeter Blutgefäße durchzogen wird. Neugebildete Myofibroblasten kontrahieren die Wunde, wodurch eine schnellere Besiedlung der Wundoberfläche durch die migrierenden Keratinozyten möglich wird (Singer und Clark, 1999).

Wenn die Wundoberfläche mit Keratinozyten bedeckt ist, kommt die Migration zum Stillstand und die neugebildete Basalschicht nimmt das normale epidermale Programm von Proliferation und Differenzierung wieder auf. Die durch die Fibroblasten gebildete provisorische Matrix wird nach und nach durch eine permanente Matrix ersetzt. Im Laufe dieses Prozesses sterben die Fibroblasten in der Matrix ab, was zur Ausbildung eines weitgehend zellfreien Narbengewebes führt (Singer und Clark, 1999).

In allen Stadien der Wundheilung spielen Cytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Neben Blutplättchen und ins Wundbett eingewanderten Makrophagen stellen dermale Fibroblasten und epidermale Keratinozyten eine wesentliche Quelle der Faktoren dar (siehe Tabelle 2.2), die über autokrine oder parakrine Wirkmechanismen die Regeneration des Epithels

Tabelle 2.2 Quellen und wesentliche Wirkungen ausgewählter Cytokine im Verlauf der Wundheilung

Cytokin/ Wachstumsfaktor	Produzenten	Wirkung
<i>Platelet derived Growth factor</i> (PDGF)	Makrophagen Blutplättchen Keratinozyten	Mitogene Wirkung auf Fibroblasten, Stimulation der Migration von Fibroblasten und Differenzierung zu Myofibroblasten (Singer und Clark, 1999)
<i>Transforming Growth Factor α</i> (TGF- α)	Makrophagen Keratinozyten	Migration und Proliferation der Keratinozyten (Martin et al., 1992)
<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	Makrophagen Keratinozyten	Proliferation und Migration von Endothelzellen (Werner und Grose, 2003)
<i>Transforming Growth Factor β</i> (TGF- β)	Makrophagen Blutplättchen Keratinozyten Fibroblasten	verlangsamt die Reepithelialisierung durch Hemmung der Proliferation von Keratinozyten, fördert die Ausbildung des Granulationsgewebes durch Anlockung von Neutrophilen, Makrophagen und Fibroblasten (Werner und Grose, 2003)
<i>Fibroblast Growth Factor 7</i> (FGF-7)	Fibroblasten $\gamma\delta$ -T-Zellen	Proliferation der Keratinozyten (Werner und Grose, 2003)
<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (GM-CSF)	Makrophagen Keratinozyten Fibroblasten	Induktion der Keratinozytenproliferation sowie Stimulation der Proliferation und Migration von Endothelzellen (Werner und Grose, 2003)

unterstützen. Die Bedeutung einzelner Cytokine für den Verlauf der Wundheilung kann *in vivo* durch Faktorapplikation oder -depletion in Wundmodellen an Mäusen gezeigt werden. So resultiert beispielsweise die Applikation von *Fibroblast Growth Factor 7* (FGF-7) sowie die topische Überexpression von *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) in einer Beschleunigung der Reepithelialisierung, was unter anderem auf eine Steigerung der proliferativen Aktivität der Keratinozyten zurückzuführen ist (Rubin et al., 1995; Mann et al., 2001). Wird dagegen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), das von Keratinozyten und Makrophagen freigesetzt wird, im Verlauf der Wundheilung in Mäusen neutralisiert, führt dies zu einer Verringerung der Wundangiogenese, nicht jedoch zu einer Verzögerung der Wundheilung (Werner und Grose, 2003).

Wundheilungs-Studien *in vivo* werden durch die große Vielfalt der im Wundbett präsenten Zelltypen kompliziert. Im Gegensatz dazu lassen sich im *in vitro* Modell der organotypischen Cokultur (siehe 2.3.1) dermal-epidermale Interaktionen zwischen Keratinozyten und Fibroblasten unabhängig von inflammatorischen Zellen unter-

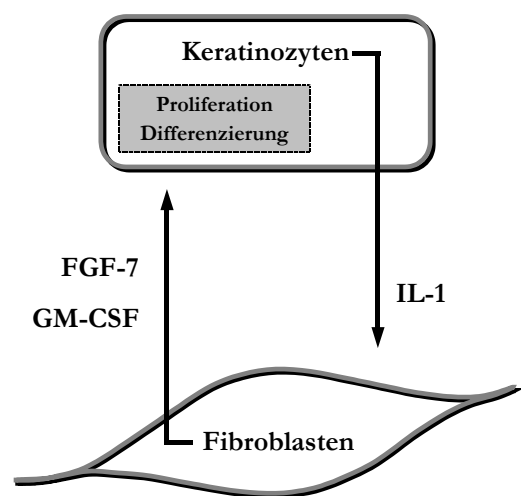


Abb. 2.3 Parakrine Interaktion zwischen Fibroblasten und Keratinozyten
(Szabowski et al., 2000)

suchen. In diesem Modell der Epithelneubildung schütten Keratinozyten entsprechend der Wundsituation *in vivo* *Interleukin-1* (IL-1) aus, das in den Fibroblasten die Synthese von FGF-7 und GM-CSF induziert (vgl. Abb. 2.3). Diese beiden Faktoren stimulieren die Proliferation von Keratinozyten und beschleunigen die Epithelialisierung (Smola et al., 1993; Maas-Szabowski et al., 1999; Szabowski et al., 2000).

2.2.2 Fibroblast Growth Factor 7 / Keratinocyte Growth Factor

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*Fibroblast Growth Factors*, FGFs) bilden eine Familie strukturell verwandter Proteine, die derzeit 22 Mitglieder umfasst (Ornitz und Itoh, 2001). Aus dem Überstand humaner embryonaler Fibroblasten erstmals isoliert, wird der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 7 (FGF-7) von einer Vielzahl mesenchymaler Zellen, darunter dermale Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Der Rezeptor für FGF-7 kann ausschließlich auf der Oberfläche epithelialer Zellen nachgewiesen werden (Werner, 1998; Ornitz und Itoh, 2001). Nach Bindung an den Rezeptor auf Keratinozyten induziert FGF-7 deren Proliferation und wird daher auch als Keratinozyten-Wachstumsfaktor (*Keratinocyte Growth Factor*, KGF) bezeichnet.

Die Expression von FGF-7 in mesenchymalen Zellen wird durch viele Cytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert. Insbesondere inflammatorische Cytokine wie IL-1 α , - β und IL-6, die in der Haut im Verlauf der Wundheilung auftreten, regen die Freisetzung von FGF-7 aus dermalen Fibroblasten stark an (Brauchle et al., 1994; Chedid et al., 1994; Maas-Szabowski et al., 2000). Die Regulation der Expression von FGF-7 kann dabei über verschiedene Transkriptionsfaktoren erfolgen, z.B. NF-IL6 (*Nuclear Factor for Interleukin 6*) und Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (*Activator Protein 1*) (Finch et al., 1995; Szabowski et al., 2000).

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren werden auf der Zelloberfläche durch Rezeptortyrosinkinasen gebunden. Es sind 4 FGF-Rezeptoren beschrieben, die als gemeinsames Strukturmerkmal 3 extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzen. Die Affinität eines Rezeptors für seine Liganden wird hauptsächlich durch die membran-proximale Immunglobulin-ähnliche Domäne bestimmt, wobei generell verschiedene FGFs durch einen Rezeptor gebunden werden können. Für die FGF-Rezeptoren 1 bis 3 stehen alternative Exons zur Codierung dieser Immunglobulin-ähnlichen Domäne zur Verfügung, wodurch Variationen in der Ligandspezifität eines Rezeptors ermöglicht werden. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren sind häufig in die Kommunikation zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen involviert, wobei die Direktionalität der Interaktion durch die differentielle Expression der Spleißvarianten einzelner FGF-Rezeptoren sowie der entsprechenden Liganden bestimmt wird (Ornitz und Itoh, 2001). Die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren wird weiter kompliziert durch die zur Signaltransduktion notwendige Bindung von Heparansulfat-Proteoglykanen an den Rezeptor (Schlessinger et al., 2000; Ornitz und Itoh, 2001).

Die Bindung von FGF-7 an seinen Rezeptor, die Spleißvariante FGFR2-IIIb des FGF-Rezeptors 2, löst dessen Homodimerisierung aus und ermöglicht die intermolekulare Phosphorylierung der Rezeptormoleküle. Über die phosphorylierten Tyrosine werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, wie z.B. die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) oder der Phospholipase-C γ (PLC γ) (Boilly et al., 2000).

FGF-7 wirkt mitogen auf eine Reihe von epithelialen Zellen, neben Keratinozyten auch Epithelzellen der Lunge, der Pankreasgänge sowie der Augenhornhaut (Wilson et al., 1993; Chedid et al., 1994; Krakowski et al., 1999; Lebeche et al., 1999; Parrott et al., 2000). Die Applikation von FGF-7 nach einer Verletzung der Haut oder der Lunge beschleunigt die Regeneration des Gewebes in Schweinen und Mäusen (Rubin et al., 1995; Ware und Matthay, 2002). Das Fehlen von FGF-7 führt allerdings nicht zu einer Verzögerung der Wundheilung (Guo et al., 1996), wohingegen die funktionelle Inaktivierung des FGFR2-IIIb in der Epidermis schwere Defekte in Homöostase und Regeneration der Haut nach sich zieht (Werner et al., 1994). Diese Diskrepanz basiert wahrscheinlich auf einer Kompensation des fehlenden FGF-7 durch ein oder mehrere andere FGFs, möglicherweise den strukturell sehr nahe verwandten FGF-10 oder -22 (Emoto et al., 1997; Beyer et al., 2003).

In basalen und suprabasalen Keratinozyten psoriatischer Läsionen, die durch eine hohe Proliferationsrate der Keratinozyten charakterisiert sind, ist der FGFR2-IIIb stark exprimiert, begleitet von einer erhöhten Expression von FGF-7 in den darunterliegenden dermalen Fibroblasten (Finch et al., 1997). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von FGF-7 an der Entstehung von Prostatakarzinomen diskutiert (Ropiquet et al., 1999).

2.2.3 Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF, wurde erstmals aus dem Überstand von Lungen-Explantaten isoliert und aufgrund seiner positiven Wirkung auf die Koloniebildung von Makrophagen und Granulozyten in Soft-Agar charakterisiert. Als Produzenten dieses Glykoproteins von 23 kDa wurden eine Vielzahl von Zellen identifiziert, darunter T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten (Gasson, 1991). Epithelzellen in Lunge oder Haut sezernieren während der normalen Gewebhomöostase nur sehr geringe Mengen an GM-CSF, die Expression wird allerdings in Wund- und Entzündungssituationen stark erhöht (Pastore et al., 1997; Reibman et al., 2000; Mann et al., 2001).

Die Freisetzung von GM-CSF wird durch Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie IL-1 α / β und *Tumor Necrosis Factor α* , TNF α , induziert (Reibman et al., 2000; Crane et al., 2001), wobei die transkriptionelle Regulation über die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie NF-AT (*Nuclear Factor for Activated T cells*), AP-1 (*Activator Protein 1*) oder NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) erfolgt (Szabowski et al., 2000; Crane et al., 2001; Smith et al., 2001). GM-CSF kann durch Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebunden und gespeichert werden (Gordon et al., 1987).

An der Oberfläche von Zellen wird GM-CSF von einem Rezeptor der Familie der Typ-I Cytokin-Rezeptoren gebunden. Neben den extrazellulären Strukturmerkmalen, die für Typ-I Rezeptoren typisch sind (4 konservierte Cysteine und ein WSXWS-Motiv) ist der GM-CSF-Rezeptor durch das Fehlen einer intrinsischen Kinase-Aktivität gekennzeichnet (Kastelein und Shanafelt, 1993). Der Rezeptor besteht aus 2 Komponenten, einer GM-CSF-spezifischen, ligandbindenden α -Untereinheit und einer β -Untereinheit, die außer dem GM-CSF-R α auch die α -Untereinheiten der Rezeptoren für Interleukin 3 und 5 binden kann. Nach Bildung des Komplexes aus GM-CSF und beiden GM-CSF-Rezeptor-Untereinheiten werden Tyrosine der β -Untereinheit durch eine assoziierte Proteinkinase (*Janus Kinase-2*, JAK2) phosphoryliert. Im Anschluss werden beispielsweise Transkriptionsfaktoren (*Signal Transducers and Activators of Transcription*, STATs) oder nachgelagerte Effektoren (PI-3-Kinase) aktiviert (Guthridge et al., 1998).

Neben seiner Wirkung auf Zellen des hämatopoetischen Systems, hauptsächlich der Stimulation von Proliferation, Differenzierung und Aktivität von Granulozyten und Makrophagen (Guthridge et al., 1998), ist GM-CSF auch ein Wachstumsfaktor für Keratinozyten, Endothelzellen, Osteoblasten und Fibroblasten (Vaillant et al., 1993; Braunstein et al., 1994; Modrowski et al., 1997; Valdembrì et al., 2002).

Trotz der großen Anzahl von GM-CSF-sensitiven Zelltypen führt das Fehlen des Cytokins in transgenen Mäusen lediglich zu einer Ansammlung von Oberflächenproteinen in der Lunge (Dranoff et al., 1994). Eine systemische Überexpression dagegen ruft Augen- und Muskeldefekte hervor, die auf eine massive Infiltration von Makrophagen in diese Gewebe zurückgehen (Lang et al., 1987). Durch topische Überexpression von GM-CSF in der Lunge werden Fibrosen verursacht (Xing et al., 1996), nach dermalen Überexpression entwickelt sich eine Hyperplasie der Epidermis mit gehäuft auftretenden Makrophagen und Langerhans-Zellen (Xing et al., 1997). Die Expression von GM-CSF unter Kontrolle des Keratin-5-Promoters, der im *Stratum basale* aktiv ist, führt dagegen nicht zu Hyperplasie, da in diesem Fall neben der Proliferation auch die Apoptose der basalen Keratinozyten stimuliert wird (Breuhahn et al., 2000). Die Regeneration der Haut nach Verletzung wird ebenfalls durch GM-CSF beschleunigt, und zwar durch Induktion des Keratinozytenwachstums sowie durch eine Steigerung der Wundangiogenese (Kaplan et al., 1992; Braunstein et al., 1994; Mann et al., 2001). Die Applikation von GM-CSF während einer Chemotherapie reduziert den Schweregrad der durch die Chemotherapie ausgelösten oralen Mucositis (Plevova, 1999). Neben diesen positiven Wirkungen wird GM-CSF allerdings auch im Rahmen der Karzinogenese diskutiert. So werden die Rezeptoren für GM-CSF in einer Reihe von Tumorzellen exprimiert, z.B. von Melanomen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Guthridge et al., 1998). Eine hohe Expression des Faktors in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf Bereiches ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Young et al., 1997).

2.2.4 Cytokine in der Tumorentwicklung

Tumorzellen weisen Defekte in dem präzisen Regulationsnetzwerk auf, das die Proliferation und Differenzierung von Zellen innerhalb eines Gewebes kontrolliert. Im Verlauf der Entwicklung eines Tumors werden Veränderungen in der interzellularen Kommunikation akkumuliert, die eine andauernde Proliferation der Tumorzellen ermöglichen. Dabei werden sowohl die Expression von Cytokinen und Wachstumsfaktoren - sowie deren Rezeptoren - als auch die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen modifiziert.

Die Grundlagen einer Wachstumsautonomie können zum Beispiel in einer zunehmenden Unabhängigkeit der Tumorzellen von Faktoren liegen, die im Rahmen der normalen Gewebemöostase von benachbarten Zellen sezerniert werden. Durch die Neoexpression mitogener Faktoren können Tumorzellen autokrin ihre Proliferation stimulieren. So tritt in der Progression von Melanomen beispielsweise eine Neoexpression von *Fibroblast Growth Factor 2* auf, der über den konstitutiv exprimierten Rezeptor die Proliferation der Melanomzellen fördert (Lazar-Molnar et al., 2000).

Neben der Freisetzung autokrin wirkender Cytokine treten intrazelluläre Modifikationen in Signaltransduktionskaskaden auf, so dass mitogene Signale von Rezeptoren unabhängig von den entsprechenden Liganden weitergeleitet werden oder Signale, die die Proliferation hemmen bzw. Differenzierung oder Apoptose auslösen, wirkungslos bleiben. Im Verlauf der Tumorprogression können im normalen Gewebe antimitogen wirkende Faktoren sogar in ihrer Wirkung verändert werden. Melanomzellen reagieren beispielweise mit verstärkter Proliferation auf Interleukin 6, das das Wachstum normaler Melanozyten hemmt (Lazar-Molnar et al., 2000).

Ein weiterer wesentlicher Aspekt der Tumorentstehung, der durch Cytokine und Wachstumsfaktoren bestimmt wird, ist die Tumorangiogenese. Durch parakrine Interaktionen zwischen Tumor- und Endothelzellen wird das Einwachsen von Blutgefäßen in den Tumor angeregt. Neben ihrer Bedeutung für die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und

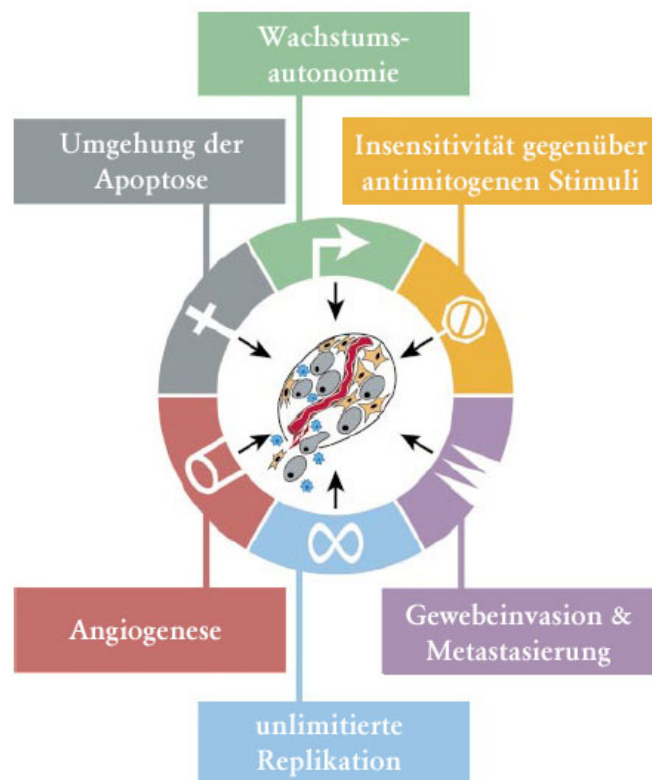


Abb. 2.4 Modifikationen in Tumorzellen (Hanahan und Weinberg, 2000)

Sauerstoff sind Blut- und Lymphgefäße in direktem Kontakt mit den Tumorzellen auch Voraussetzung für die Metastasierung des Tumors (Hanahan und Weinberg, 2000).

In der Entstehung und Progression von Tumoren sind, ebenso wie in der Wundheilung, Interaktionen zwischen unterschiedlichen Zelltypen zur Regulation der Wachstums- und Differenzierungsprozesse von wesentlicher Bedeutung. Diese können *in vivo* aufgrund der Komplexität der Gewebe nur unzulänglich charakterisiert werden, da Ursprung und Wirkort von Cytokinen und Wachstumsfaktoren häufig nicht eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden können. Zur Analyse der Kommunikation zwischen dermalen und epidermalen Zellen werden daher verschiedene Modellsysteme entwickelt, von der submersen Cokultur bis hin zu *in vitro*-Hautäquivalenten auf der Basis genetisch veränderter Zellen.

2.3 Modellsysteme

2.3.1 Haut- und Wundheilungsmodelle *in vitro*

Die Kommunikation von Keratinozyten und Fibroblasten kann *in vitro* in submerser oder organotypischer Cokultur der beiden Zelltypen untersucht werden. In der konventionellen Submerskultur werden die Keratinozyten zusammen mit bestrahlten und damit irreversibel postmitotischen Fibroblasten kultiviert. Dieses Modellsystem erlaubt die Analyse der Proliferation und Migration der Keratinozyten, gibt jedoch keinen Aufschluss über die Wirkung von Faktoren auf ihre Differenzierung. In der organotypischen Cokultur sind Fibroblasten – mitotisch aktiv oder postmitotisch – in eine Kollagenmatrix eingebettet. Auf diesem Dermis-Äquivalent werden die Keratinozyten luftexponiert kultiviert, was zur Ausbildung mehrschichtiger Epithelien führt, die alle Charakteristika der normalen Epidermis aufweisen (Fusenig et al., 1994; Stark et al., 1999; Stark et al., 2001). In der organotypischen Cokultur kann die Wirkung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten charakterisiert werden.

In Cokulturen humaner Keratinozyten mit humanen Fibroblasten ist es häufig schwierig, die Herkunft eines endogenen Cytokins zu ermitteln. Durch die Verwendung von murinen Fibroblasten-Zelllinien anstelle der humanen Fibroblasten wird es möglich, die Quelle eines Faktors über die Spezies zu bestimmen. Genetisch modifizierte Maus-Fibroblasten ermöglichen darüber hinaus weitere Einblicke in die Signalketten der epidermal-dermalen Kommunikation (Maas-Szabowski et al., 2001).

In diesem heterologen Cokultursystem wurde die Bedeutung von FGF-7 und GM-CSF in der Epithelialisierung gezeigt. Die funktionelle Inaktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun in murinen Fibroblasten führt zu einem Verlust eines ganzen Spektrums von Faktoren, darunter beispielsweise FGF-7 und GM-CSF. Aus diesem Grund sind *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten nur bedingt in der Lage, das Wachstum von Keratinozyten zu fördern, so dass eine Cokultivierung in

hypoplastischen Epithelien resultiert. Die Zugabe von FGF-7 und GM-CSF führt zu einer Normalisierung der Epithelialisierung (Szabowski et al., 2000; Maas-Szabowski et al., 2001). FGF-7 und GM-CSF haben allerdings voneinander abweichende Wirkungen in diesen *in vitro* Epithelien und auch die Phänotypen nach Überexpression *in vivo* unterscheiden sich voneinander (Werner, 1998; Breuhahn et al., 2000). Die Verwendung von *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten erlaubt jetzt einerseits die Kultivierung von Keratinozyten in Anwesenheit von Fibroblasten – in Analogie zur *in vivo*-Situation – bei gleichzeitiger Abwesenheit von FGF-7 und GM-CSF. Durch die Applikation der beiden Faktoren zu diesen Cokulturen können so deren unterschiedliche Wirkmechanismen näher untersucht werden. Durch den Einsatz weiterer genetisch modifizierter Fibroblasten können andererseits auch die Auswirkungen von anderen Mediatoren der Signaltransduktion in Fibroblasten auf das Verhalten der Keratinozyten näher charakterisiert werden.

2.3.2 Das HaCaT-Modell der Hautkarzinogenese

Im Verlauf der Tumourprogression werden Steuerungsmechanismen, die im normalen Gewebe die Proliferation der Zellen regulieren, zunehmend umgangen oder in ihrer Bedeutung verändert. Eine häufig auftretende Modifikation ist dabei beispielsweise die Neuexpression von ursprünglich parakrin wirksamen Faktoren durch die Tumorzellen, was in einer autokrinen Stimulation des Tumourwachstums resultieren kann (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Bedeutung einzelner Veränderungen der zellulären Kommunikation kann an Tumormaterial charakterisiert werden. Allerdings fällt es schwer, an *in vivo*-Tumoren die Sequenz zu beurteilen, mit der die Modifikationen im Lauf der Entstehung des Tumors auftreten. An *in vitro* transformierten Zelllinien dagegen kann gezielt die Auswirkung einzelner Veränderungen charakterisiert werden und durch sequentiell eingeführte genetische Modifikationen auch ein Bild über den Verlauf der Tumorentwicklung und –progression gewonnen werden.

Plattenepithelkarzinome sind Tumore, die sich ausgehend von Oberflächen-Epithelien entwickeln. Verschiedene Stadien in dieser Entwicklung werden durch Zellen des HaCaT-Modellsystems *in vitro* nachgestellt. Die Grundlage des HaCaT-Modells bilden spontan immortalisierte Keratinozyten eines adulten humanen Spenders (Boukamp et al., 1988). Diese Standard-HaCaT-Zellen sind genetisch relativ stabil, hypotetraploid, nicht tumorigen nach Injektion in die Nacktmaus und differenzierungsfähig (Schoop et al., 1999). Durch Transfektion der Standard-HaCaT-Zellen mit einer konstitutiv aktiven Variante des zellulären Ras - eine Mutation, die häufig in Tumoren gefunden wird – konnten tumorigene Klone erhalten werden, deren Verhalten *in vivo* nach subkutaner Injektion von benignem, zystischem Wachstum (z.B. HaCaT-ras A-5), bis hin zu invasivem Wachstum reicht (z.B. HaCaT-ras II-4)(Boukamp et al., 1990). Eine weitere Progression konnte durch die wiederholte Injektion und Rekultivierung der Tumoren („*in vivo*-Passagierung“) erreicht werden, was zu hochmalignen, metastasierenden

Zelllinien führte (z.B. HaCaT-ras A-5RT1 und A-5RT3) (Fusenig und Boukamp, 1998). Anhand dieser HaCaT-Zelllinien können Modifikationen in der Wachstumsregulation in Plattenepithelkarzinomen durch die verschiedenen Stadien der Tumorigenese verfolgt werden. Die genetische Modifikation der Zellen eröffnet weitere Möglichkeiten zur Analyse der Bedeutung einzelner Faktoren für Progression dieser Tumore (Mueller und Fusenig, 1999).

Die Tumorentwicklung hängt allerdings nicht nur von der Fähigkeit der Tumorzellen ab, ihr eigenes Wachstum aufrechtzuerhalten. Die Interaktion mit anderen Zelltypen, beispielsweise Fibroblasten oder Endothelzellen, leistet ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung eines Tumors (Hanahan und Weinberg, 2000). In Cokulturen der HaCaT-Zelllinien mit normalen Fibroblasten kann diese Tumor-Stroma-Interaktion ebenfalls *in vitro* nachgestellt werden.

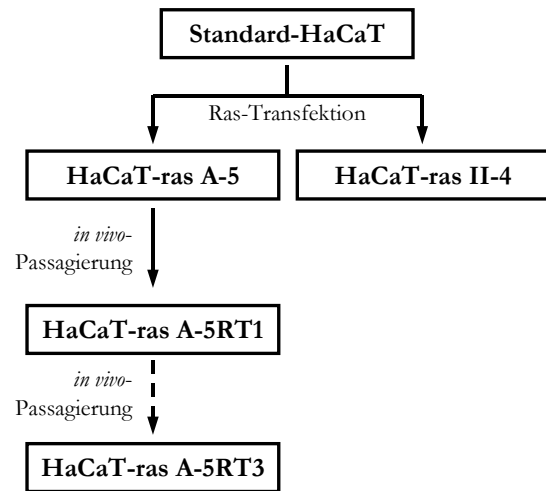


Abb. 2.5 HaCaT-Modell der Hautkarzinogenese (Mueller und Fusenig, 1999)

2.4 Fragestellung

Während der Homöostase der Haut und im Verlauf der Regeneration nach einer Verletzung werden Proliferation und Differenzierung der am Aufbau der Gewebestruktur beteiligten Zellen präzise koordiniert. An der Wachstumskontrolle ist die interzelluläre Kommunikation über direkte Kontakte, aber auch die Interaktion räumlich getrennter Zellen über lösliche Faktoren beteiligt.

In organotypischen Kokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten ist eine parakrine Interaktion zwischen den beiden Zelltypen gezeigt worden, über die die Epithelbildung kontrolliert wird. Keratinozyten sezernieren IL-1, das in Fibroblasten die Expression von FGF-7 und GM-CSF induziert. Diese beiden Faktoren modulieren die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten, allerdings auf unterschiedliche Weise. Während die Applikation von FGF-7 ein hyperplastisches, geringer differenziertes Epithel hervorruft, zeichnen sich Hautäquivalente unter GM-CSF-Einfluss durch eine starke Proliferation bei gleichzeitiger verstärkter Differenzierung aus. Die Ursache dieser differentiellen Wirkung ist bisher unklar (Maas-Szabowski et al., 1999; Szabowski et al., 2000).

In Kulturen humaner Keratinozyten und muriner *c-jun*^{-/-} Fibroblasten, die kein FGF-7 oder GM-CSF sezernieren, soll daher die Frage geklärt werden:

1. welche Veränderungen in der Genexpression werden durch FGF-7 und GM-CSF in Keratinozyten verursacht?

Dazu sollen mit Hilfe eines cDNA-Arrays Gene identifiziert werden, deren Transkription durch FGF-7 bzw. GM-CSF verstärkt oder gehemmt wird. Nach der Analyse der Expression der entsprechenden Genprodukte in Keratinozyten und Fibroblasten sollen diese appliziert sowie neutralisiert werden, um die Frage zu beantworten:

2. welche Funktion haben die von FGF-7 oder GM-CSF beeinflussten Genprodukte im Verlauf der Epithelbildung?

Darüber hinaus soll durch Analyse der Expression der entsprechenden Gene in bzw. ihrer Wirkung auf verschiedene Zelllinien des HaCaT-Modellsystems folgende Frage geklärt werden:

3. Welche Rolle spielen Modifikationen der Wirkung von FGF-7 und GM-CSF in der Entwicklung von epithelialen Tumoren?

3 Material und Methoden

Die Versuche, die in dieser Arbeit dargestellt werden, wurden in einem molekularbiologischen Labor der Sicherheitsstufe S1, sowie einem Zellkulturlabor mit Sterilbank der Klasse 2, mit dafür üblicher Ausstattung durchgeführt. Chemikalien und Geräte, die zur Grundausrüstung eines Labors gehören, werden nicht im Einzelnen aufgeführt; bei Verwendung spezieller Geräte und Chemikalien, deren Einsatz das Versuchsergebnis beeinflussen könnte, wird auf Hersteller und Bezugsquellen hingewiesen.

3.1 Zellkultur

3.1.1 Medien und Lösungen

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l	Serva, Heidelberg
EDTA	Ethylendiamintetraacetat 0,05% in PBS mit Phenolrot	Merck, Darmstadt
Trypsin	2,5% Trypsin in PBS	Roche Diagnostics, Mannheim
10x HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , mit 8 mg/l Phenolrot	Biochrom, Berlin
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	Biochrom, Berlin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> gebrauchsfertiges Medium enthält zusätzlich: 1 mM Natrium-Pyruvat C ₃ H ₃ NaO ₃ 100 U/ml Penicillin 10 µg/ml Streptomycin	} Biochrom, Berlin
FAD _{komplett}	DMEM + Ham's F12 3:1 0,75 mM Natrium-Pyruvat C ₃ H ₃ NaO ₃ 100 U/ml Penicillin 10 µg/ml Streptomycin 5% FCS 1 ng/ml hEGF 5 µg/ml Insulin 0,4 µg/ml Hydrocortison 10 ⁻¹⁰ M Cholera toxin 24 ng/ml Adenin	} Biochrom, Berlin } Promocell } Sigma-Aldrich, München
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i> Keratinocyte Basal Medium (KBM) 0,5 µg/ml Hydrocortison 5 µg/ml Insulin 0,1 ng/ml EGF 0,4 % Bovine Pituitary Extrakt Gentamicin/Amphotericin B	} Cambrex BioScience, Apen

4xMEM	<i>Modified Eagle's Minimal Essential Medium</i> 100 U/ml Penicillin 10 µg/ml Streptomycin	nach (Fusenig und Worst, 1975) Biochrom, Berlin
Thermolysin	0,5 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, München

Medienzusätze

<u>Faktoren</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Bezugsquelle</u>
rhFGF-7	10 ng/ml (0,4 x 10 ⁻¹⁵ M)	BTS, St.- Leon-Rot bzw. R&D Systems, Wiesbaden
rhGM-CSF	100 ng/ml (4 x 10 ⁻¹⁵ M)	} R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-18	10 bzw. 50 ng/ml (0,5 bzw. 2,5 x 10 ⁻¹⁵ M)	
rhIL-11	10 bzw. 50 ng/ml (0,4 bzw. 2 x 10 ⁻¹⁵ M)	

Antikörper

α-human GM-CSF AK	0,75 bzw. 1,25 µg/ml	} R&D Systems, Wiesbaden
α-murine GM-CSF AK	0,75 bzw. 1,25 µg/ml	
α-human IL-11 AK	1 µg/ml	
α-murine IL-11 AK	1 µg/ml	
α-human IL-18 AK	1 µg/ml	

Inhibitoren

Actinomycin D	1 µg/ml Stocklsg. 0,5 mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich, München
Cycloheximid	10 µg/ml Stocklösung 1g/ml in DMSO	Sigma-Aldrich, München
GolgiStop DMSO	0,06% in Medium	BD Biosciences, Heidelberg Merck, Darmstadt

Medien und Lösungen werden, soweit nicht anders erwähnt, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Inkubationen, sowie die Kultivierung der Zellen finden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank statt.

3.1.2 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

Isolierung

Zur Isolierung von Keratinozyten werden Hautproben adulter Spender verwendet. Nach gründlicher Desinfektion der Hautstücke (Betaisodona[®]-Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg) werden diese in schmale Streifen geschnitten und die Streifen mindestens 12 h bei 4°C mit Thermolysin behandelt (0,5 mg/ml Thermolysin in PBS, Sigma-Aldrich, München). Der Verdau mit dieser Metalloproteinase ermöglicht die mechanische Trennung der Hautprobe in Dermis und Epidermis. Die Zellen der Epidermis werden anschließend durch Verdau mit Trypsin (0,4% Trypsin/0,025% EDTA in PBS, 10 min bei 37°C) und die Passage durch einen Zellfilter mit 70 µm Porengröße (BD Bioscience, Heidelberg) vereinzelt. Mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Casy1[®], Schärfe-System, Reutlingen) wird die Zellzahl bestimmt und die frisch isolierten Keratinozyten werden in einer Dichte von 4-7 x 10⁴ Zellen/cm² auf vorkultivierte Feeder-Fibroblasten (siehe 3.1.3) ausgesät. Die Zellen werden in FAD_{komplett} kultiviert, bis die

Kultur eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hat, dann können die Keratinozyten unterkultiviert oder kryokonserviert werden.

Unterkultivierung

Sobald die Keratinozyten auf dem Feeder-Layer große Inseln gebildet haben, die sich berühren, bzw. Keratinozyten in Monokultur die gesamte Zellkulturschale dicht besiedelt haben, wird der Zellrasen zunächst 10 min mit EDTA (0,05% in PBS) behandelt, was über die Ca^{2+} -Komplexierung desmosomale und hemidesmosomale Verbindungen der Zellen lockert. Die Feeder-Fibroblasten können bereits nach 2- bis 3-minütiger Einwirkzeit des EDTA von der Platte abgespült werden. Anschließend werden die Keratinozyten mit Hilfe von Trypsin (0,4% Trypsin, 0,025% EDTA in PBS) vereinzelt und die Enzymeinwirkung durch Zugabe von serumhaltigem Medium (FAD_{komplett}) beendet. Bereits differenzierte, verhornte Zellaggregate werden durch Filtration über ein Zellsieb (70 µm Poren, BD Bioscience, Heidelberg) entfernt. Die Keratinozyten können entweder als Monokultur oder in Cokultur mit Feeder-Fibroblasten weiterkultiviert werden. Keratinozyten werden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² in FAD_{komplett} ausgesät; für Cokulturen werden Feeder-Fibroblasten verwendet, die 24 h vorkultiviert wurden. Am Tag nach der Aussaat wird das Medium in Keratinozyten-Monokulturen durch KGM ersetzt, während für Keratinozyten-Fibroblasten-Cokulturen weiterhin FAD_{komplett} verwendet wird. Der Medienwechsel erfolgt alle 2 bis 3 Tage.

Primäre Keratinozyten werden in Passage 2 oder 3 für Experimente eingesetzt.

Kryokonservierung

Keratinozyten, die nicht sofort verwendet werden, werden nach der Isolierung eingefroren und über flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu werden die Zellen nach der Ablösung von der Platte zu 2×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium (FAD_{komplett} + 15% FCS + 10% Glycerin) aufgenommen und in kältebeständige Röhrchen zu je 1 ml aliquotiert. Die Zellsuspension wird mit einer Abkühlungsrate von ca. 1°C/min bis auf -80°C abgekühlt und anschließend bei ca. -160°C gelagert.

Zum Auftauen werden die Kryokonserven im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Keratinozyten werden in FAD_{komplett} in einer Dichte von $1,4 \times 10^4$ Zellen/cm² auf Feeder-Fibroblasten ausgesät. Sollen die Keratinozyten in späteren Passagen in Monokultur gehalten werden, kann das FAD_{komplett} 1 bis 2 Tage nach dem Auftauen durch KGM ersetzt werden. Die zum Auftauen notwendigen Feeder-Fibroblasten sterben bei Weiterkultivierung in KGM langsam ab.

3.1.3 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Fibroblasten

Isolierung

Primäre humane Fibroblasten werden, ebenso wie die Keratinozyten aus Hautproben adulter Spender isoliert. Die Hautproben werden desinfiziert und nach dem Thermolysinverdau in Dermis und Epidermis getrennt (siehe 3.1.2). Die Dermisstreifen werden anschließend in sehr kleine Stücke geschnitten (ca. 1 mm³) und diese auf Zellkulturschalen gesetzt. Nach dem vorsichtigen Überschichten der angetrockneten Stücke mit DMEM mit 20% FCS stehen die Schalen 2 bis 3 Wochen, bis ausreichend Fibroblasten aus der Dermis ausgewachsen sind. Der Mediumwechsel erfolgt nach Aufbringen der Dermisstücke alle 4 bis 5 Tage, nach Beginn des Auswachsens alle 2 bis 3 Tage. Wenn die ausgewachsenen Fibroblasten die ganze Schale bedecken, können die Zellen unterkultiviert werden. Die Dermisstücke verbleiben auf der Zellkulturschale und werden erneut mit Medium überschichtet. Frisch isolierte Fibroblasten werden zunächst 2 bis 3 Passagen expandiert, bevor sie eingefroren werden.

Unterkultivierung

Der konfluente Zellrasen wird mit PBS gespült, um das Medium vollständig zu entfernen. Anschließend werden die Fibroblasten durch Behandlung mit Trypsin (0,05% Trypsin, 0,025% EDTA in PBS) voneinander und von der Zellkulturschale gelöst. Nach gründlicher Vereinzlung wird die Trypsineinwirkung durch Zugabe von serumhaltigem Medium (DMEM mit 10% FCS) beendet und die Zellzahl der Suspension bestimmt. Um das Trypsin vollständig zu entfernen, werden die Zellen vor der Aussaat abzentrifugiert und in DMEM mit 10% FCS resuspendiert. Die Fibroblasten werden in einer Dichte von 7×10^3 Zellen/cm² ausgesät. Der Medienwechsel erfolgt am Tag nach der Aussaat und anschließend alle 2 bis 3 Tage.

Kryokonservierung

Fibroblasten werden zu 1×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium suspendiert (DMEM + 20% FCS + 10% Glycerin) und in Aliquots zu 1 ml in Kryoröhrchen eingefroren (siehe 3.1.2). Zum Auftauen der Fibroblasten werden die Kryokonserven im Wasserbad auf 37°C erwärmt und in DMEM mit 10% FCS zu $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät. Das Medium wird am Tag nach der Aussaat gewechselt, danach alle 2 bis 3 Tage.

Herstellung von Feeder-Fibroblasten

Feeder-Fibroblasten sind irreversibel postmitotische Zellen, die durch γ -Bestrahlung von Fibroblasten hergestellt werden. Die durch die Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden unterbinden eine weitere Proliferation der Fibroblasten, allerdings nicht die Proteinsynthese, ihre Reaktionen auf exogene Stimuli und das Überleben der Zellen in Kultur (Maas-Szabowski und Fusenig, 1996).

Die Fibroblasten werden nach dem Ablösen von der Zellkulturschale zu $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in DMEM mit 10% FCS resuspendiert und einer Strahlungsdosis von 70 Gy ausgesetzt (γ -Bestrahlungsanlage mit Cs-Strahlungsquelle). Anschließend werden die Zellen in einer Dichte von 7×10^3 Zellen/cm² in FAD_{komplett} ausgesät. Nach 24 h können Keratinozyten zu diesen Feeder-Fibroblasten ausgesät werden.

3.1.4 Kultivierung muriner Fibroblasten

In dieser Arbeit werden neben primären humanen Fibroblasten auch murine embryonale *c-jun*^{-/-} oder *mt*-Fibroblasten verwendet, die nach dem 3T3 Protokoll immortalisiert worden sind (Schreiber et al., 1999) und die freundlicherweise von Dr. Angel, Abt. „Signaltransduktion/Wachstumsregulation“ (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Die Kultivierung der murinen Fibroblasten-Zelllinien unterscheidet sich nur unwesentlich von der Kultivierung primärer humaner Fibroblasten und wird daher nur kurz erläutert. Murine Fibroblasten werden in DMEM mit 10% FCS gehalten und alle 3 Tage unterkultiviert. Die Zellen werden nach dem Ablösen und Vereinzeln in einer Dichte von $0,7 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und das Medium am Tag nach der Aussaat gewechselt. Zur Herstellung von Feeder-Fibroblasten ist bei murinen Fibroblasten eine Strahlungsdosis von 15 Gy ausreichend.

3.1.5 Kultivierung von Standard-HaCaT und HaCaT-ras-Klonen

Im Unterschied zu primären humanen Keratinozyten werden die immortalen Keratinozyten-Zelllinien (HaCaT-Zellen und die verschiedenen HaCaT-ras-Klone) in Monokultur in 4xMEM mit 10% FCS kultiviert. Dem Medium für die HaCaT-ras-Klone wird zusätzlich das Selektionsantibiotikum Geneticin zugesetzt (Geneticinsulfat, G 418, 100 µg/ml, Sigma-Aldrich, München). HaCaT-Zellen und HaCaT-ras-Klone werden à 1×10^6 Zellen eingefroren (siehe 3.1.2) und in 4xMEM mit 10% FCS (ohne G 418) aufgetaut.

Die Kultivierung der HaCaT-Zellen unterscheidet sich lediglich in wenigen Punkten von der Kultivierung primärer humaner Keratinozyten. Die Zellen werden in einer Dichte von 7×10^3 Zellen/cm² ausgesät und die Kulturen sind nach ca. 7 bis 10 Tagen konfluent. Zur Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale werden sie 10 min mit EDTA (0,05% EDTA in PBS) behandelt und anschließend durch Trypsinverdau vereinzelt (0,05% Trypsin, 0,025% EDTA in PBS). Die Abtrennung von Zellaggregaten mit Hilfe eines Zellfilters ist nicht nötig, da die HaCaT-Zellen kaum differenzieren und daher keine verhornten Bereiche ausbilden.

Sollen HaCaT-Klone in Cokultur mit Feeder-Fibroblasten kultiviert werden, so werden zunächst bestrahlte Fibroblasten ($0,7 \times 10^4$ Zellen/cm²) in 4xMEM mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h können dann die HaCaT-Zellen hinzugefügt werden ($0,7 \times 10^4$ Zellen/cm²). Die weitere Kultivierung erfolgt in 4xMEM + 10% FCS (ohne G 418).

3.1.6 Kultivierung von Zellen zur Analyse der mRNA und Proteinexpression

Primäre humane Keratinozyten werden in einer Dichte von $0,7-1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² auf 24 h vorkultivierte Feeder-Fibroblasten ($0,45 \times 10^4$ /cm²) ausgesät. Die Cokulturen werden in FAD_{komplett} kultiviert, dem verschiedene Faktoren oder Inhibitoren zugesetzt werden. Die Faktorzugabe erfolgt dabei nicht zeitgleich mit einem Mediumwechsel.

HaCaT-Zellen werden in einer Dichte von $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in Monokultur oder in Cokultur zu primären humanen Feeder-Fibroblasten ausgesät ($0,45 \times 10^4$ /cm²). Die Zellen werden in 4x MEM mit 10% FCS kultiviert.

3.1.7 Organotypische Cokulturen

In der organotypischen Cokultur werden Keratinozyten luftexponiert auf einem Kollagengel kultiviert, in das Fibroblasten – mitotisch aktiv oder postmitotisch – eingebettet sind. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt dabei über Diffusion durch das Kollagengel, das über einen Filter mit einem Mediumreservoir in Verbindung steht.

Isolierung von Kollagen aus Rattenschwänzen

Rattenschwänze von unbehandelten Kontrolltieren (Tierlabor des DKFZ) werden ca. 1 h in 80% Ethanol desinfiziert und der Alkohol durch Waschen mit sterilem H₂O entfernt. Die Haut wird längs eingeschnitten und abgezogen. Danach werden die Schwanzwirbel nacheinander entfernt und die Schwanzsehnen von den Blutgefäßen getrennt. Die isolierten Kollagenstränge werden durch Rühren in steriler verdünnter Essigsäure (0,1%, ca. 100faches Volumen) binnen 2 Tagen gelöst. Der unlösliche Rückstand wird abzentrifugiert, das Kollagen wird lyophilisiert und ist bei Raumtemperatur haltbar. Zur Verwendung wird es zu 4 mg/ml in 0,1%iger Essigsäure gelöst und dann bei 4°C gelagert.

Ansetzen der Kulturen

Das Kollagengel wird aus einer Lösung von 4 mg/ml lyophilisiertem Rattenskollagen in 0,1% Essigsäure angesetzt. Dazu werden je Gel 2 ml Kollagenlösung mit 0,25 ml Hanks-Salzlösung gemischt und das essigsäurehaltige Gemisch durch Zugabe von 5 M NaOH neutralisiert (4°C). Die Fibroblasten werden von der Zellkulturschale abgelöst, gegebenenfalls γ -bestrahlt und in FCS zu 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Je Gel werden 0,25 ml der Zellsuspension zu dem Kollagen/Salz-Gemisch zugegeben, woraus eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml resultiert. 2,5 ml der Kollagen-Zellsuspension werden luftblasenfrei in ein Filterinsert (Porengröße 3 μ m, in BioCoat Deep-well-Platten, BD Bioscience, Heidelberg) pipettiert und ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Auf die ausgehärteten Gele werden Glasringe (Wenzel Laborbedarf, Heidelberg) aufgesetzt und vorsichtig angeedrückt. Nach ca. 1 h haben die Glasringe die Gele stark komprimiert; die

ausgetretene Flüssigkeit kann entfernt werden. Die Gele werden inklusive der Glasringe mit FAD_{komplett} bedeckt. Die Keratinozyten werden ca. 24 h nach Ansetzen der Gele ausgesät. Dazu wird das Medium innerhalb des Glasringes abgesaugt und $0,8-1 \times 10^6$ Zellen in FAD_{komplett} in den Glasring gegeben. Am Tag nach der Aussaat haben sich die Keratinozyten am Kollagengel angeheftet und der Glasring kann entfernt werden. Gleichzeitig erfolgt ein Medienwechsel, bei dem das FAD_{komplett} gegen DMEM mit 10% FCS und 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, München) ausgetauscht wird. Bei diesem Mediumwechsel wird die Deep-well-Platte nur noch bis auf Höhe des Filters gefüllt, so dass die Keratinozyten luftexponiert sind. Den Kulturen können nun Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Antikörper zugesetzt werden, die mit dem Medium im folgenden alle 2 Tage erneuert werden.

Ernte und Konservierung der Kulturen

Nach einer Standzeit von 7 bis 14 Tagen werden die organotypischen Cokulturen geerntet. Dazu wird die Kultur aus dem Filter-Insert herausgeschnitten und in der Mitte geteilt. Ein Teil wird mit Formaldehydlösung (3,7% Formaldehyd in PBS) überschichtet und ca. 1 min vorfixiert. Danach wird der Filter entfernt und das Präparat 2 Tage in Formaldehydlösung fixiert. Nach 24 h in PBS kann das Präparat dann in Agar (3% in H₂O, Bacto-Agar, Merck, Darmstadt) eingebettet werden. Die Agar-Blöckchen werden zum Entwässern sequentiell Alkohollösungen steigender Konzentration ausgesetzt (70%, 80%, 90%, 96% Ethanol in H₂O, Xylol), und in Paraffin eingegossen. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Reichert & Jung Hn40, Bensheim) werden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger (HistoBond[®], Breuzinger + Partner GdbR, Walldorf) aufgezogen. Nach der Trocknung der Schnitte (24 h, 37°C) können diese über die Umkehrung der Entwässerungsprozedur rehydratisiert und die Gewebe mit Hämalaun (10 min) und Eosin (30 s) gefärbt werden. Nach der erneuten Entwässerung der Schnitte werden sie in Eukitt (Medim, Gießen) luftblasenfrei eingebettet.

Der zweite Teil des Präparates wird in TissueTek (Sakura Finetek, Zoeterwonde, NL) eingebettet und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Von den Kryopräparaten werden bei -30°C 6 µm dicke Schnitte angefertigt (FrigoCut 2700, Reichert & Jung, Bensheim) und auf Objektträger aufgezogen (SuperFrost[®], NeoLab, Heidelberg).

3.2 Expressionsanalysen

3.2.1 Nachweis der mRNA-Expression – RT-PCR

Der Nachweis der Transkription einzelner Gene wird mit Hilfe der Reversen Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erbracht. Die mRNA der Zellen wird mit Hilfe von oligo-dT-Primern revers in cDNA transkribiert und aus diesem cDNA-Gemisch werden einzelne Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert.

Isolierung von RNA

RNeasy Mini Kit	Säulen zur RNA-Aufreinigung inkl. Lyse- und Waschpuffer	Qiagen, Hilden
QiaShredder		Qiagen, Hilden
H ₂ O _{DEPC}	0,1% DEPC in H ₂ O 2x autoklaviert	
70% Ethanol	in H ₂ O _{DEPC}	

Vor der Ernte der Zellen wird der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen, um das Medium vollständig zu entfernen. Die Zellen werden in β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer (Puffer RLT) lysiert und mit einem Zellschaber homogenisiert. Das Homogenisat kann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Gewebe, wie z.B. Maus-Gesamthaut, müssen vor der Lyse der Zellen gut zerkleinert werden, beispielsweise indem sie in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben werden.

Zur Isolierung der RNA wird das Homogenisat 15 min bei 37°C aufgetaut und anschließend durch Zentrifugation (2 min, 10000 g) durch eine QiaShredder-Säule nochmals homogenisiert. Durch Zugabe von 1 Volumen 70% Ethanol werden Proteine und RNA gefällt und das Gemisch auf RNeasy-Mini-Säulen gegeben. Durch Zentrifugation (10000 g, 1 min) werden Proteine und DNA abgetrennt. Die an die Säule gebundene RNA wird mit Puffer RW1 und anschließend mit Puffer RPE gewaschen. Die Säule wird trocken zentrifugiert (10000 g, 2 min) und mit H₂O_{DEPC} eluiert. Über die Messung der Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bzw. 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteine, werden die Konzentration und die Reinheit der RNA photometrisch bestimmt. Die Integrität der RNA wird anhand eines Agarosegels beurteilt. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

Reverse Transkription (RT)

Omniscript RT Kit	Puffer, Enzym und dNTPs zur cDNA-Synthese	Qiagen, Hilden
Oligo-dT Primer	50 μM	ThermoHybaid, Ulm
Random-Hexamer Primer	50 μM	ThermoHybaid, Ulm
RNase Inhibitor	40 U/ μl	Roche Diagnostics, Mannheim

Durch reverse Transkription wird die mRNA aus der isolierten Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu werden 2 Primer benutzt, die entweder spezifisch die polyA-Sequenzen am Ende der mRNA-Moleküle binden oder sich unspezifisch an die RNA anlagern.

Reaktionsansatz:	1 µg	RNA in 15,25 µl H ₂ O _{DEPC}
	2,5 µl	10x RT-Puffer
	1,25 µl	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	0,5 µl	Random-Hexamer-Primer (50 µM)
	0,5 µl	Oligo-dT-Primer (50 µM)
	0,625 µl	RNase Inhibitor
	0,625 µl	MuLV Reverse Transkriptase
	25 µl	Gesamtansatz

Die RNA wird zunächst in H₂O_{DEPC} verdünnt und 5 min bei 65°C denaturiert. Die übrigen Komponenten des Reaktionsansatzes werden gemischt und zur RNA-Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wird 80 min bei 37°C inkubiert und durch anschließendes Erhitzen auf 95°C (5 min) die RNA zerstört und die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die cDNA kann dann bei -20°C gelagert werden.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Taq PCR Core Kit	Enzym, MgCl ₂ (25 mM)	Qiagen, Hilden
RT-PCR Core Kit	10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, TTP, je 10 mM	Sigma-Aldrich, München
Primer	5 mM	TermoHybaid, Ulm

Die PCR beruht auf der Vervielfältigung von cDNA-Sequenzen mit Hilfe zweier Oligonukleotid-Primer, deren 3'-Enden als Startpunkte für die Anlagerung weiterer Nukleotide durch eine DNA-Polymerase dienen. Durch ein mehrfaches Durchlaufen der Prozesse cDNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und -Verlängerung können einzelne cDNA-Sequenzen soweit amplifiziert werden, dass sie auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden können.

Reaktionsansatz:	2 µl	cDNA
	2 µl	10x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)
	je 0,4 µl	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 0,8 µl	Primer (5 mM)
	bis zu 0,8 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	0,1 µl	Taq Polymerase
	ad 20 µl	H ₂ O

Reaktion:	5 min	95°C	Denaturierung
x Zyklen	}	60 s	95°C Denaturierung
(abhängig von		90 s	x °C Annealing (Temperatur abhängig von den verwendeten Primern)
der Menge an		90 s	72°C Primer-Verlängerung
Ausgangs-cDNA)		120 s	72°C Fertigstellung aller Amplifikate

Die Effizienz der Reaktion ist hauptsächlich von den verwendeten Primern abhängig, bei deren Auswahl eine Reihe von Parametern beachtet werden müssen.

Um eine Amplifikation genomischer Sequenzen zu vermeiden, werden die Primer aus unterschiedlichen Exons eines Genes gewählt. Genomische DNA führt damit zu größeren Amplifikaten bzw. wird nicht amplifiziert, wenn das Produkt durch die Introns eine Größe jenseits des Amplifikationsmaximums der verwendeten Taq-Polymerase erreicht. Die Primer

dürfen weder intra- noch intermolekulare Sekundärstrukturen ausbilden, da diese die Bindung an die cDNA beeinträchtigen (Primerdesign mit Oligo, Molecular Biology Insights Inc., Plymouth, USA).

Von besonderer Bedeutung für die Spezifität der Reaktion ist die Temperatur, bei der die Primer an die cDNA binden (Annealing-Temperatur). Diese muss für jedes Primerpaar individuell bestimmt werden und ist von der Länge und der Nukleotidsequenz der Primer, sowie von dem MgCl₂-Gehalt des Reaktionsansatzes abhängig. MgCl₂ stabilisiert doppelsträngige DNA, erhöht deren Schmelzpunkt sowie die Aktivität der Taq-Polymerase. Es erhöht damit die Effizienz der Reaktion, allerdings auch die Häufigkeit, mit der unspezifische Produkte auftreten. Die Annealing-Temperatur und der MgCl₂-Gehalt können nur parallel optimiert werden, da diese Parameter sich gegenseitig beeinflussen.

Für die semiquantitative Auswertung der PCR ist außerdem die Anzahl der Amplifikationszyklen zu bestimmen. Die Produktmenge ist theoretisch direkt abhängig von der Anzahl der Ausgangs-cDNA-Moleküle (Kopienzahl = Zahl der Ausgangsmoleküle $\times 2^{\text{Zykluszahl}}$, für Zykluszahlen größer 3). Praktisch werden jedoch in jedem Amplifikationszyklus Ausbeuten unter 100% realisiert, daneben nimmt die Aktivität der Polymerase im Verlauf der Reaktion ab und die Produktmenge erreicht somit ein Plateau. Es ist daher für jede Amplifikation die Anzahl der Reaktionszyklen zu bestimmen, bei der Produktmenge und Ausgangs-cDNA noch direkt korrelieren.

Primer	Sequenz	Produkt-Länge	Annealing-Temperatur	MgCl ₂	Zyklen
β/γ-Actin-forw. β/γ-Actin-rev.	5'-GCGGCTACAGCTTCACCACCAC-3' 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTGCG-3'	RNA: 364 bp Gen: 459 bp	58,0 °C	1,5 mM	40
mβ-Tubulin-for. mβ-Tubulin-rev.	5'-GGAACATAGCCGTAAACTGC-3' 5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'	317 bp	55,0 °C	1,0 mM	23-25
BAD-forward BAD-reverse	5'-GTCACCAGCAGGAGCAGCCAACC-3' 5'-CACAGCACCGGAAGGGAATCTG-3'	519 bp	65,0 °C	1,5 mM	25-27
BIRC1-forward BIRC1-reverse	5'-CTGGCCAGCATTCTCCTCTATT-3' 5'-CCCAGATTTTACCCAGTGAA-3'	333 bp	56,8 °C	1,0 mM	35-37
CLDN1-forward CLDN1-reverse	5'-CTTCTGCACCTGCCACCCCTGAG-3' 5'-GCACCCCAATGACAGCCATCCC-3'	418 bp	62,0 °C	1,5 mM	25-27
Dsg2-forward Dsg2-reverse	5'-GCGTACGCCTGCTGCTTCTC-3' 5'-TGGCAATTGGATTCTTCTTGGAC-3'	192 bp	56,0 °C	1,5 mM	30-32
Galectin1-forw. Galectin1-rev.	5'-CCTGCCCCGGGAACATC-3' 5'-TGGGAAGGGAAAGACAGCCTC-3'	273 bp	59,0 °C	1,5 mM	25-27
GAPDH-forw. GAPDH-rev.	5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3' 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3'	240 bp	62,0 °C	1,5 mM	22-24

Primer	Sequenz	Produkt-Länge	Annealing-Temperatur	MgCl ₂	Zyklen
K14-forward K14-reverse	5'-TTTGCTGGTGGTGGTGGGCTTCT-3' 5'-GCTCTGGCCAGGGCTAGTTCGT-3'	389 bp	62,0 °C	2,0 mM	19-21
K17-forward K17-reverse	5'-CCCGCCCGTGACTACAGCCAGTA-3' 5'-ACTGGTCACGCATCTCGTTG-3'	398 bp	61,0 °C	2,0 mM	20-22
IL-11-forward IL-11-reverse	5'-CGCCGGCTGCAGCTCCTGATGT-3' 5'-GCCTCCCACCCCTGCTCCTGAAA-3'	383 bp	65,0 °C	1,0 mM	33-35
hIL-18-forward hIL-18-reverse	5'-GCTGCTGAACCAGTAGAAGACAA-3' 5'-TCCTGGGACACTTCTCTGAAAG-3'	429 bp	52,0 °C	2,0 mM	25-27
IL-18R α -forward IL-18R α -reverse	5'-TACTTCACGGTCCCCACATTAC-3' 5'-ACTGCGATCTTCCACTATTGTTA-3'	568 bp	54,0 °C	1,5 mM	35-37
IL-18R β -forward IL-18R β -reverse	5'-GATGATTAAGAGCCCCTATG-3' 5'-GCTGAGTGACTTTTTTCCAA-3'	599 bp	50,0 °C	2,0 mM	35-37
mIL-18-forward mIL-18-reverse	5'-GCTGCCATGTGAGAAGACTC-3' 5'-TTACAGATTTTATCCCCATTTTCA-3'	544 bp	54,0 °C	1,5 mM	28-30
SKALP-forward SKALP-reverse	5'-TAGCTCTTAGCCAAACACCTTCC-3' 5'-CTTCTTGATTCTGGGCAGTC-3'	339 bp	55,0 °C	2,0 mM	25-27
SPRR1-forward SPRR1-reverse	5'-TCTTCACACCAGGACCAGCCACT-3' 5'-TGGGATAGGGGATTGAGCATCTG-3'	360 bp	62,0 °C	2,0 mM	21-23
TRAIL-forward TRAIL-reverse	5'-AAGAAGATGACAGTTATTGGGAC-3' 5'-TTCCCAGGAGTTATTTTGC-3'	290 bp	52,0 °C	2,0 mM	33-35

Auftrennung der Amplifikate über ein Agarosegel

Agarose	SeaKem Agarose	Biozym, Oldendorf
Laufpuffer TAE	500 mM Tris/HCl, pH 7,5-8,0 200 mM CH ₃ COONa 20 mM EDTA	
Ethidiumbromid	EtBr, 0,5 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Größenstandard	100-Basepair Ladder	PeqLab, Erlangen

Die amplifizierten cDNA-Moleküle werden in einem Agarosegel im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Für cDNA-Sequenzen, die kürzer als 1000 Nukleotide sind, werden 2 g Agarose in 100 ml TAE unter Erhitzen gelöst, 25 ng/ml EtBr zugesetzt und das Gel gegossen. Nach dem Gelieren der Agarose werden die Proben und der Größenstandard geladen und das DNA-Gemisch bei ca. 70 V aufgetrennt. Das EtBr interkaliert in die DNA und ermöglicht eine Visualisierung der cDNA-Moleküle.

3.2.2 Nachweis der mRNA-Expression – cDNA Array

Die Untersuchung von mRNA durch Hybridisierung mit einem cDNA-Array erlaubt es, durch eine Stimulation ausgelöste Veränderungen im Genexpressionsmuster von Zellen festzustellen. Dabei wird die Expression einer großen Anzahl von Transkripten simultan analysiert. Die mRNA der Zellen wird revers transkribiert, dabei radioaktiv markiert und bindet an PCR-Produkte, die auf einem Nylon-Filter immobilisiert sind. Die Bindung kann anhand der radioaktiven Strahlung nachgewiesen werden.

Kultivierung und Stimulation der Zellen

Zur Analyse der Genexpression von Zellen über ein cDNA-Array wird eine große Menge an RNA benötigt. Die Keratinozyten werden daher in Passage 1 und 2 in KGM expandiert und in Passage 3 auf murine *c-jun*^{-/-}-Feeder-Fibroblasten ($3,5-4 \times 10^4$ Keratinozyten/cm² auf $0,4 \times 10^4$ Fibroblasten/cm², in FAD_{komplett}) ausgesät. Durch die Expansion in KGM befinden sich die Keratinozyten in einem proliferativen, weitgehend undifferenzierten, Zustand. Innerhalb von 24 h nach Aussaat der Keratinozyten werden dem Medium rhFGF-7 (10 ng/ml, BTS, St.-Leon Roth) oder rhGM-CSF (100 ng/ml, R&D Systems, Wiesbaden) zugesetzt. Als Kontrolle werden Kulturen von humanen Keratinozyten mit murinen *wt*-Fibroblasten herangezogen.

Nach einer Stimulationsdauer von 10 h bzw. 24 h werden die Feeder-Fibroblasten durch Behandlung mit EDTA (0,05% in PBS, siehe 3.1.2) abgelöst und die Keratinozyten mit kaltem PBS gewaschen.

Isolierung von mRNA

RNeasy Maxi Kit	Säulen zur Aufreinigung von RNA inkl. Lyse- und Waschpuffer	Qiagen, Hilden
Oligotex mRNA Kit	oligo-dT-Partikel zur Aufreinigung von mRNA, inkl. Puffer	Qiagen, Hilden
RiboGreen® RNA Quantitation Kit		Molecular Probes, Leiden, NL
H ₂ O _{DEPC}	0,1% DEPC in H ₂ O 2x autoklaviert	
70% Ethanol	in H ₂ O _{DEPC}	

Die Isolierung von RNA mit Hilfe des RNeasy Maxi Kits wird analog 3.2.1 durchgeführt. Im Unterschied zu diesem Protokoll wird das Zellysate hier durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (18 Gauge) homogenisiert und alle Zentrifugationen werden 5 min bei 4000 g durchgeführt.

Nachdem die RNA mit H₂O_{DEPC} von der Säule eluiert wurde, wird sie durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (100%) und 0,1 Volumen Natriumacetat (2 M, pH 4) 2 h auf Eis gefällt. Nach

der Pelletierung (10000 g, 4°C, 15 min) wird die RNA mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das RNA-Pellet wird in 50 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Die Konzentration und die Reinheit der RNA werden photometrisch bestimmt und die RNA auf eine Konzentration von 0,5 bis 2 µg/µl verdünnt.

Unter Verwendung von partikelgebundenen oligo-dT-Sequenzen wird die mRNA aus der Gesamt-RNA angereichert. Die RNA wird mit 1 Volumen an Pufferlösung (OBB, Oligotex mRNA Kit) und 15 µl Partikelsuspension je 250 µg Gesamt-RNA versetzt. Die RNA wird bei 70°C denaturiert und bindet während einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur an die oligo-dT-Sequenzen. Die Partikel werden pelletiert (14000 g, 3 min), in Waschpuffer resuspendiert (OW2, Oligotex mRNA Kit) und in eine Säule überführt. Nachdem durch mehrfaches Waschen der Säule der Anteil der mRNA an tRNA und rRNA nochmals verringert wurde, wird die mRNA bei 70°C von den Partikeln eluiert (Puffer OEB, Oligotex mRNA Kit, Zentrifugationen jeweils 14000 g, 1 min).

Da die Konzentration des mRNA-Eluats sehr niedrig ist, wird sie nicht photometrisch, sondern über die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt. Dazu werden 2 µl der mRNA-Lösung in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und 200 µl RiboGreen[®] RNA Quantitation Reagent zugegeben (1:2000 in TE-Puffer vorverdünnt). Die Fluoreszenz der Lösung wird gemessen (96-well-Platte, Anregung bei 485 nm, Messung bei 525 nm, Fluorocan Ascent, ThermoElectron, Waldbronn) und die RNA-Konzentration anhand von Proben bekannten RNA-Gehaltes bestimmt. Die mRNA wird bei -80°C gelagert.

Qualitätssicherung der mRNA

Vor einer Verwendung der mRNA zur Generierung von cDNA-Sonden, die mit dem cDNA-Array hybridisiert werden können, muss die Qualität der mRNA, d.h. ihre Reinheit und Integrität sichergestellt werden. Unter den Verunreinigungen, die das Ergebnis der Hybridisierung verfälschen können, sind vor allem nicht abgetrennte DNA und mRNA aus den murinen Feeder-Fibroblasten von Bedeutung.

Um eine Kontamination der mRNA durch DNA auszuschließen, wird die mRNA bzw. DNA von β/γ -Actin amplifiziert. Dabei werden Primer verwendet, die in verschiedenen Exons des β -Actin-Genes liegen und damit bei der Amplifikation aus DNA und RNA Produkte verschiedener Größe erzeugen. Zur Synthese von cDNA werden 100 ng der isolierten mRNA

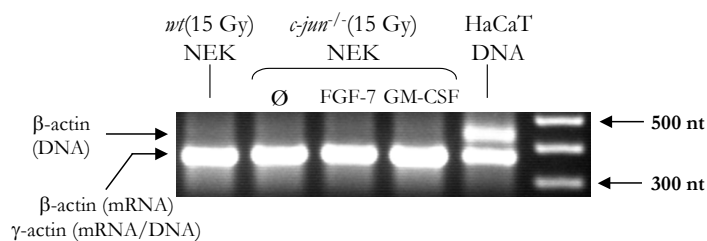


Abb. Nr. 3.1 Nachweis der DNA-Kontamination

Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-} bzw. *wt*-Fibroblasten wurden, wie angegeben, 10 h mit FGF-7 oder GM-CSF behandelt. Anschließend wurden die Feeder-Fibroblasten entfernt, die Keratinozyten-mRNA isoliert und β -actin mittels RT-PCR amplifiziert (35 Zyklen). Als Kontrolle wurde HaCaT-DNA verwendet.

revers transkribiert (Protokoll siehe 3.2.1). Aus der cDNA wird β/γ -Actin amplifiziert (Protokoll siehe 3.2.1). Abb. 3.1 zeigt einige Ergebnisse für DNA und DNA-freie RNA.

Kontaminationen der humanen mRNA mit muriner mRNA werden über eine spezies-spezifische Amplifikation von β -tubulin analysiert. Abb. 3.2 zeigt ein typisches Ergebnis der RT-PCR. Die hier isolierte mRNA humaner Keratinozyten aus Cokultur mit murinen Feeder-Fibroblasten enthält Anteile muriner mRNA.

Die Integrität der mRNA wird mit Hilfe des Agilent 2100

Bioanalyzers (Agilent Technologies, Waldbronn) überprüft. 50-200 ng mRNA in einem Volumen von 1 μ l werden auf den RNA-Chip (RNA 6000 Nano LabChip, Agilent Technologies, Waldbronn) aufgetragen. Die Proben werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gemischt und in einer Kapillarelektrophorese auf dem Chip aufgetrennt. Die Fluoreszenzintensität wird gegen die Laufzeit aufgetragen. Anhand dieses virtuellen Gels lassen sich der Fragmentierungsgrad der mRNA und die Verunreinigung durch rRNA beurteilen. Der Gehalt an rRNA wird aufgrund der Menge an 18S und 28S rRNA berechnet. Bei der Verwendung der mRNA zur Sonden-Synthese ist darauf zu achten, dass der Gehalt an rRNA in den verwendeten Proben gleich ist.

Herstellung der cDNA-Sonden

Array-Advantage™ UA LifeGrid™	cDNA Labeling and Hybridization Kit Arrays & Reagent kit inkl. dATP, dGTP, dTTP (10 mM)	Ambion Inc., Austin, USA Incyte Genomics, Palo Alto, USA
Redivue α - ³³ P-dCTP H ₂ O _{DEPC}	1000-3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ml 0,1% DEPC in H ₂ O, 2x autoklaviert	Amersham, Buckinghamshire, GB

Die isolierte mRNA wird revers transkribiert und gleichzeitig durch Einsatz von α -³³P-dCTP radioaktiv markiert. Zur Kontrolle der Reaktion wird dem Ansatz eine definierte Menge an Hefe-DNA zugesetzt (Protokoll nach Array Advantage™ UA und LifeGrid™, verändert).

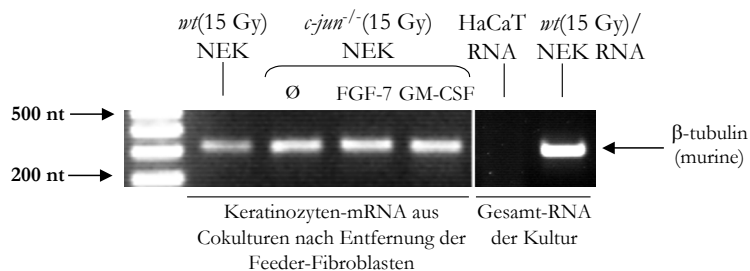


Abb. 3.2 Nachweis muriner RNA

Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}- bzw. *wt*-Fibroblasten wurden, wie angegeben, 24 h mit FGF-7 oder GM-CSF behandelt. Anschließend wurden die Feeder-Fibroblasten entfernt, die Keratinozyten-mRNA isoliert und murines β -tubulin mittels RT-PCR amplifiziert (23 Zyklen). Die Speziespezifität wurde anhand der Amplifikation des murinen Transkriptes aus HaCaT-RNA überprüft und der Maximalgehalt an muriner RNA anhand der Gesamt-RNA einer heterologen Cokultur bestimmt.

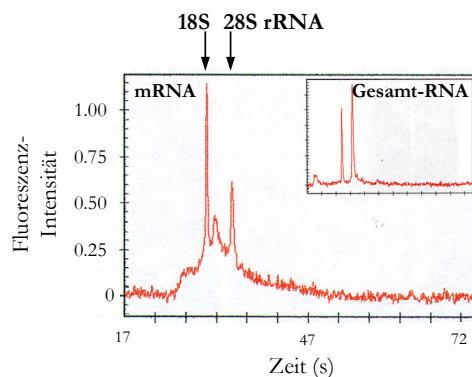


Abb. 3.3 Beispiel einer Bioanalyzer-Messung Gesamt-RNA im Vergleich mit mRNA

Reaktionsansatz 1:	250 ng	mRNA in 7 μ l H ₂ O _{DEPC}
	2 μ l	Oligo-dT-Primer (Array Advantage™ UA)
	1 μ l	Hefe-Kontroll-DNA (LifeGrid™)
	10 μ l	Gesamtansatz

Während einer Inkubation bei 70°C (10 min) wird die mRNA im Reaktionsansatz denaturiert, was während und nach der Abkühlung die Anlagerung der Oligo-dT-Primer an die mRNA erlaubt.

Reaktionsansatz 2:	2 μ l	10x RT-Puffer (Array Advantage™ UA)
	je 1 μ l	dATP, dGTP, dTTP (10 mM, LifeGrid™)
	3 μ l	α - ³³ P-dCTP
	2 μ l	MuLV Reverse Transkriptase (LifeGrid™)
	10 μ l	Gesamtansatz

Reaktionsansatz 2 wird mit dem Ansatz 1 gemischt, 2 h bei 42°C inkubiert und anschließend mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 70 μ l verdünnt. Dieses wird auf eine rehydratisierte NucAway-Säule gegeben (Array-Advantage™ UA). Die Säulenzentrifugation (4000 g, 1 min) entfernt nicht gebundene Nukleotide und kurze cDNA-Fragmente aus dem Sondenansatz. Vor und nach der Säulenzentrifugation werden 2 μ l des Reaktionsansatzes entnommen, mit 5 ml Szintillationslösung (Beckman, Fullerton, USA) versetzt und die Aktivität (cpm) mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beckman LS5000TD, Fullerton, USA) bestimmt. Die enzymatische Aktivität im Sondenansatz wird durch Zugabe von 1,5 μ l EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8) gestoppt und der Ansatz bis zur Hybridisierung auf Eis gehalten.

Aus den gemessenen Aktivitäten des Gesamtansatzes und der gebundenen Nukleotide wird die Inkorporationsrate berechnet. Zur Hybridisierung werden ausschließlich Proben verwendet, deren Inkorporationsrate über 25% und deren Aktivität über 1 x 10⁶ cpm liegt.

cDNA-Array-Hybridisierung

LifeGrid™	human cDNA-Array (Nylon) 8400 doppelt gespottete PCR-Produkte Arrays & Reagent kit	Incyte Genomics, Palo Alto, USA
Array-Advantage™ UA	cDNA Labeling and Hybridization Kit	Ambion Inc., Austin, USA
Heringssperma-DNA	10 mg/ml	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
20fach SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , pH 7	Ambion Inc., Austin, USA

Die cDNA-Arrays werden mit der PCR-Produkt-haltigen Seite nach innen in ein Plastiknetz (Amersham, Buckinghamshire, GB) eingerollt und in einem Glasbehälter (Biometra, Göttingen) mit dem Hybridisierungspuffer (Array-Advantage™ UA) 1 h bei 60°C vorhybridisiert (Hybridisierungsofen, Biometra, Göttingen). Die Heringssperma-DNA, die zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Sonden-cDNA an die cDNA-Arrays verwendet wird, wird 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gehalten.

Nach Ablauf der Vorhybridisierung wird der Puffer im Glasbehälter erneuert und es werden 30 µg/ml Heringssperma-DNA zugegeben. Nach der Denaturierung der Sonden-cDNA (5 min, 95°C) wird diese zugegeben und die cDNA-Arrays bei 60°C 14 bis 16 h inkubiert. Anschließend wird die Hybridisierungslösung verworfen und ungebundene Sondenfragmente werden durch mehrfaches Waschen mit zunehmender Stringenz entfernt (2x 2fach SSC, 2x 2fach SSC mit 0,5% SDS, 2x 0,5fach SSC mit 0,5% SDS; alle Waschschritte 30 min bei 60°C). Die Nylon-Membranen werden in Klarsichthüllen eingeschlagen und bis zu 24 h mit einem Imaging Plate inkubiert (Fujifilm, Tokyo, Japan). Nach Ablauf der Exposition werden die Signale mit Hilfe eines Phospho-Imagers (Bas-1500, Auflösung 100 µm, Fujifilm, Tokyo, Japan) erfasst. Die cDNA-Arrays können nach Entfernung der gebundenen Sonden-cDNA (0,5fach SSC mit 1% SDS, 10 und 50 min, 85°C) wiederverwendet werden.

Auswertung

Die mit Hilfe des Phospho-Imagers gewonnenen Daten werden extern ausgewertet (IncyteGenomics, Palo Alto, USA). Dabei wird aus den Signalintensitäten eines cDNA-Arrays der globale Mittelwert berechnet und unterschiedliche Arrays unter Berücksichtigung dieses Mittelwertes normalisiert, wodurch Unterschiede in Hybridisierungsintensität oder Sondenaktivität ausgeglichen werden. Die Qualität dieser Normalisierung lässt sich anhand der Kontrollsignale (Hefe-DNA) beurteilen. Die Signalintensität des Hintergrundes wird abgezogen. Anschließend werden die Signalintensitäten der beiden Spots, die dasselbe Transkript repräsentieren, gemittelt und Intensitätsunterschiede zwischen verschiedenen cDNA-Arrays berechnet.

Zur weiteren Analyse werden Transkripte herangezogen, die entweder mehr als 2x induziert oder reprimiert werden oder die in verschiedenen Versuchen auf Basis von Keratinozyten unterschiedlicher Spender reproduzierbar reguliert sind.

3.2.3 Nachweis der Proteinexpression – Western Blot

Die Translation eines Transkriptes und somit die Präsenz des Proteins innerhalb der Zelle kann mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen werden. Der Western Blot bietet neben quantitativen Aussagen zur Proteinexpression auch Daten zur Proteingröße, die in Eukaryotenzellen aufgrund von posttranslationellen Modifikationen – wie Glykosylierungen eines Proteins - variieren kann. Die Proteine des Zelllysats werden im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf einer Membran immobilisiert. Somit sind sie zugänglich für Primärantikörper, die ihrerseits durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper gebunden werden. Die Bindung und Position der Sekundärantikörper wird über die enzymatische Umsetzung eines chemolumineszenten Substrates sichtbar gemacht.

Isolierung zytosolischer Proteine

RIPA-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,2 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1% TritonX-100 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) 0,1% Natriumdesoxycholat 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin A 0,5 mM NaVO ₄ (Natriumorthovanadat) 0,05 mM [®] Pefabloc SC	Biomol, Hamburg Biomol, Hamburg Biomol, Hamburg Sigma-Aldrich, München Biomol, Hamburg
Bradford-Lösung		Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Vor der Lysierung werden die Zellen durch mehrfaches Waschen des Zellrasens mit kaltem PBS vollständig von Medium befreit. Die Zellen werden mit einem Zellschaber in RIPA-Puffer homogenisiert und das Homogenisat wird ca. 1h auf Eis gehalten. Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile – Zellmembran und Zellkerne – durch Zentrifugation entfernt (14000 g, 4°C, 15 min).

Der Proteingehalt des Überstandes wird mit Hilfe der Bradford-Lösung in 96-well-Platten bestimmt. Dazu wird das Lysat 1:10 verdünnt und 2 bzw. 4 µl der Verdünnung mit 200 µl Bradford-Lösung versetzt. Proben bekannter Proteinmenge (0,5 bis 4 µg BSA) werden zur Konzentrationsbestimmung genutzt. Der Farbumschlag der Bradford-Lösung, der durch die Bindung des Farbstoffes an Arginin oder aromatische Aminosäuren hervorgerufen wird, wird durch Messung der Absorption der Lösung (ELISA-Reader SLT Spectra, SLT Labinstrument, Crailsheim) quantifiziert. Die Lysate werden bei –20 °C gelagert.

Gesamtproteinextrakte

Lyse/Proben-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 6,8 20% Glycerin 4% SDS (Natriumdodecylsulfat) 100 mM β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau
--------------------	--

Soll die Expression von membrangebundenen Proteinen, wie z.B. Rezeptoren, nachgewiesen werden, so müssen Gesamtproteinextrakte hergestellt werden. Diese haben den Nachteil, dass aufgrund der hohen SDS-Konzentration, die zum vollständigen Aufschluss der Zellen notwendig ist, keine Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat möglich ist.

Die Zellen werden vor dem Lysieren mehrfach mit kaltem PBS gewaschen und im Lysepuffer mit einem Zellschaber homogenisiert. Durch das Aufkochen der Probe (5 min, 95°C) werden die Proteine im Lysat denaturiert und die Proben können bei –20°C gelagert werden.

Auftrennung der Proteine über ein Polyacrylamidgel

Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% SDS (Natriumdodecylsulfat)	
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% SDS (Natriumdodecylsulfat)	
Laufpuffer	33mM Tris (4g) 191 mM Glycin (14,4 g) 0,1% SDS	
Proben-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 6,8 20% Glycerin 4% SDS (Natriumdodecylsulfat) 100 mM β -Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau	
Größenstandard	Full Range Rainbow-Marker 10 bis 250 kDa	Amersham, Buckinghamshire, GB
Acrylamid	40% Acrylamid + 2,6% Methylenbisacrylamid in H ₂ O	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin	Sigma-Aldrich, München
APS	10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	50% in H ₂ O	Sigma-Aldrich, München
<u>Trenngel (12%)</u>	0,75 ml Glycerol 3,75 ml H ₂ O 2,5 ml Trenngel-Puffer 3 ml Acrylamid 100 μ l APS 10 μ l TEMED	<u>Sammelgel</u> 2,6 ml H ₂ O 0,95 ml Sammelgel-Puffer 0,3 ml Acrylamid 22,5 μ l APS 7,5 μ l TEMED

Die Proteinlysate werden über Mini-Polyacrylamidgele (Mighty Small II, Amersham, Buckinghamshire, GB) aufgetrennt. Dazu werden 10 bis 30 μ g Protein auf 30 μ l ergänzt und mit 30 μ l Proben-Puffer versetzt. Bei Gesamtproteinextrakten erfolgt die Standardisierung der Auftragsmenge empirisch. Sowohl zytosolische als auch Gesamtprotein-Extrakte, sowie der Größenstandard werden im Proben-Puffer durch Aufkochen denaturiert (5 min, 95°C) und bis zur Beladung des Gels auf Eis gehalten.

Das Trenngel wird vorbereitet und nach dem Gießen mit Wasser überschichtet. Wenn es auspolymerisiert ist, wird das Wasser entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel bedeckt. Nach ca. 1 h werden die Protein-Proben und der Größenstandard geladen und im elektrischen Feld aufgetrennt (2 bis 3 h, 30 mA, 100 V, in Lauf-Puffer).

Immobilisierung der aufgetrennten Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran - Nassblot

Transfer-Puffer	33 mM Tris (4 g) 191 mM Glycin (14,4 g) 20% Methanol	
Nitrozellulose-Membran	0,45 µm BA-S 85	Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel
Filterpapier	Whatman-Filter	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PonceauS-Lösung		Sigma Diagnostics, St. Louis, USA

Nach der Auftrennung der Proteine wird das Gel in Transfer-Puffer äquilibriert und auf 4 Blatt in Transfer-Puffer eingeweichte Filterpapiere aufgelegt. Nachdem das Gel luftblasenfrei mit der Nitrozellulose-Membran bedeckt ist, wird ein weiterer Filterpapierstapel aufgelegt. Die Proteine werden durch das angelegte elektrische Feld aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran transferiert (3 h, 48 V, 4°C, Mini Trans Blot[®] Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Der Erfolg des Transfers wird anschließend durch die Anfärbung der membrangebundenen Proteine durch PonceauS überprüft. Dazu wird die Membran ca. 1 min in PonceauS-Lösung gefärbt und danach unter fließendem Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Die gefärbte Membran wird fotokopiert, die Banden des Größenstandards werden mit Bleistift nachgezeichnet und die Membran wird vollständig entfärbt (in PBS).

Nachweis der Proteine über Antikörper

Block-Lösung	PBS 10% Milch (0,3% Fett, frisch) 0,1% Tween-20	
Wasch-Lösung	PBS + 0,1% Tween-20	
ECL-Reagenz		Amersham, Buckinghamshire, GB
Primäre Antikörper	humanes IL-18 (0,2 µg/ml, Maus) humaner IL-18 R (0,2 µg/ml, Maus) humanes pro-IL-18 (0,2 µg/ml, Maus) humanes Keratin I/II (0,2 µg/ml, Maus) humanes α-Tubulin (1 µg/ml, Maus)	} R&D Systems, Wiesbaden Progen, Wieblingen Sigma-Aldrich, München
Sekundäre AK	Ziege-α-maus-HRP (0,1 µg/ml)	Dianova, Hamburg

Die auf der Membran immobilisierten Proteine werden durch Bindung spezifischer primärer Antikörper nachgewiesen, die über die Bindung enzymgekoppelter sekundärer Antikörper sowie die entsprechende enzymatische Reaktion detektiert werden.

Die Membran wird dazu zunächst 1 h mit der Block-Lösung inkubiert und anschließend über Nacht dem primären Antikörper ausgesetzt (1. Antikörper in Block-Lösung verdünnt, 4°C). Nach mehrfachem Waschen der Membran wird der sekundäre Antikörper in Block-Lösung verdünnt und 1h mit der Membran inkubiert (Raumtemperatur), die dann mindestens 6x gewaschen wird. Der sekundäre Antikörper ist gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase und wird

über die enzymatische Umsetzung eines lumineszierenden Substrates (ECL, Substrat und Enhancer 1:1) sichtbar gemacht.

3.2.4 Nachweis der Proteinexpression – indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz erlaubt den Nachweis von Proteinen am Ort ihrer Synthese, d.h. innerhalb von Zell- und Gewebestrukturen. Die Methode basiert – ähnlich dem Western Blot - auf der Bindung eines Antikörpers an das nachzuweisende Protein und der nachfolgenden Visualisierung des gebundenen Antikörpers mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers.

PBS [⊕]	<i>Phosphate Buffered Saline</i> + Ca ²⁺ , Mg ²⁺ NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l CaCl ₂ * 2 H ₂ O 0,132 g/l, MgCl ₂ 0,1 g/l	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Mowiol Bisbenzimid	Polyvinylalkohol 4-88	Sigma-Aldrich, München Roche Diagnostics, Mannheim
<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Bezugsquelle</u>
FGF-7-Fc-Fragment	Maus	S. Aaronson, New York
Filaggrin	Maus	Cell Systems, Remagen
GM-CSF-Rezeptor	Maus	Serotec, Düsseldorf
Involucrin	Maus	Dianova, Hamburg
hIL-18	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
hIL-18R α	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
K1/10 (Klon 6.80)	Maus	Sigma-Aldrich, München
Loricrin	Kaninchen	D. Hohl, Lausanne
Transglutaminase 1	Maus	Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, GB
<u>Sekundäre Antikörper</u>	<u>Kopplung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
α -maus	TexasRed	Dianova, Hamburg
α -maus	Cy2	Dianova, Hamburg
α -kaninchen	TexasRed	Dianova, Hamburg

Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper müssen die Gefrierschnitte organotypischer Cokulturen (vgl. 3.1.6) oder die Zellen auf Objektträgern zunächst fixiert werden. Das Gewebe wird durch Behandlung mit Methanol (80% Methanol in H₂O, 5 min, 4°C) und Aceton (100% Aceton, 3 min, -20°C) am Objektträger immobilisiert und getrocknet. Anschließend werden die Schnitte in PBS[⊕] rehydratisiert. Paraffinschnitte (vgl. 3.1.6) werden in Xylol entparaffiniert und durch Inkubation in Lösungen abnehmender Alkoholkonzentration (96%, 90%, 80%, 70% Ethanol in H₂O) rehydratisiert. Die Epitope werden durch Behandlung mit TUF-Lösung (5 min, 95°C, *Target Unmasking Fluid*, Advanced Biotechnologies, Hamburg) und nachfolgendem Verdau mit 0,1% Trypsin in PBS (37°, 30 min) freigelegt. Im Anschluss werden Gefrier- und Paraffinschnitte mit 2% BSA in PBS[⊕] 30 min blockiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper (in 2% BSA in PBS[⊕], 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C) werden die

Schnitte 3x mit PBS[⊕] (5 min) gewaschen und der sekundäre Antikörper wird dazugegeben (in 2% BSA in PBS[⊕], 1 h, Raumtemperatur). Zur Anfärbung der Kerne werden der Lösung 5 µg/ml Bisbenzimid zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Schnitte nochmals gewaschen (PBS[⊕], 4x 5 min) und luftblasenfrei in Mowiol eingedeckelt. Die Schnitte können dann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops fotografiert werden.

3.2.5 Nachweis der Proteinseznernierung – ELISA

Die funktionelle Aktivität von Proteinen wie Cytokinen und Wachstumsfaktoren setzt im Allgemeinen voraus, dass die Proteine sezerniert, d.h. von den Zellen ins Medium abgegeben werden. Mit Hilfe des ELISAs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) können Proteine aus dem Überstand von Zellen quantifiziert werden. Im Unterschied zu Western Blot und Immunfluoreszenz werden bei dieser Methode die Zielproteine durch Bindung an den primären Antikörper immobilisiert. Über einen enzym-gekoppelten Sekundärantikörper wird der Komplex aus Primärantikörper und Zielprotein nachgewiesen.

Gewinnung der Medien

Nach 48 h Kultivierung wird das konditionierte Medium über dem Zellrasen abgenommen und nach Abzentrifugation von Zelltrümmern (5 min, 1000 g) bei –80°C eingefroren und gelagert. Aufgrund der geringen Stabilität von Cytokinen und Wachstumsfaktoren wird das Medium grundsätzlich nur einmal aufgetaut und dann vollständig verwendet.

ELISA

ELISA zum Nachweis von
hIL-11
hIL-18

Bezugsquelle
R&D Systems, Wiesbaden
R&D Systems, Wiesbaden

Die konditionierten Medien werden auf Eis aufgetaut. Rekombinantes Protein wird nach den Angaben des Herstellers verdünnt. In einer 96-well-Platte werden Proben und Probenpuffer (1:1) gemischt und die Platte zur Bindung des Zielproteins an den Primärantikörper 1 h bis 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden ungebundene Proteine abgewaschen und der enzymgekoppelte Sekundärantikörper zugegeben (1-2 h, Raumtemperatur). Die Menge an gebundenem Sekundärantikörper wird über die Umsetzung eines chromogenen Substrates und die Messung der Absorption der Probe bestimmt (ELISA-Reader SLT-Spectra, SLT Labinstruments, Crailsheim). Über die Verdünnungen des rekombinanten Proteins lässt sich der Gehalt des Zielproteins in den konditionierten Medien berechnen.

3.3 Funktionsanalysen

Cytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Aktivität von Zellen, unter anderem durch Stimulation oder Hemmung der Proliferation und Migration oder der Differenzierung und Apoptose (Vilcek, 1998). Durch Applikation rekombinanter Faktoren *in vitro* kann ihre Wirkung auf einzelne Zelltypen näher charakterisiert werden.

3.3.1 Proliferation in submersen Kulturen

Primäre humane Keratinozyten werden in 12-well-Platten in einer Dichte von $1,7 \times 10^4$ Zellen/cm² in Monokultur bzw. in Cokultur auf vorkultivierte $0,75 \times 10^4$ /cm² Feeder-Fibroblasten ausgesät (FAD_{komplett}). In Cokultur mit primären Keratinozyten werden sowohl humane als auch murine Feeder-Fibroblasten eingesetzt. HaCaT-Zellen sowie die verschiedenen HaCaT-ras-Klone werden in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² für Mono- und Cokulturen (mit humanen Feeder-Fibroblasten) verwendet (Aussaat in 4xMEM mit 10% FCS). Unbestrahlte humane Fibroblasten werden in DMEM mit 10% FCS ausgesät ($0,75 \times 10^4$ /cm²).

Am Tag nach der Aussaat der Keratinozyten wird der Zellrasen mit dem entsprechenden Kulturmedium gespült. Für Keratinozyten in Monokultur wird KBM (serumfrei) verwendet, für HaCaT-Zellen 4xMEM und für Fibroblasten DMEM. Cytokine, Wachstumsfaktoren und Antikörper werden in diesen Basalmedien verdünnt und zu den Zellen gegeben. Keratinozyten in Cokultur mit Feeder-Fibroblasten müssen weiterhin in FAD_{komplett} kultiviert und stimuliert werden, da die Keratinozyten aus diesen Cokulturen eine serumfreie Kultivierung nicht tolerieren. Alle Kulturen werden in Triplikaten angesetzt.

Das Medium wird jeden 2. Tag gewechselt und die Faktoren/Antikörper erneuert. Zum Zeitpunkt der Messung werden die Zellzahlen in den einzelnen wells entweder direkt durch Trypsinierung der Zellen bestimmt oder indirekt über die Färbung der DNA gemessen. Dazu werden die Zellen auf den Platten mit PBS gespült, getrocknet und eingefroren (-20°C). Die Zellen werden mit einem SybrGreen[®]-haltigen Lysepuffer (Verdünnung 1:5000, 1 ml/well, Molecular Probes, Leiden, NL) aufgeschlossen. Der Farbstoff kann nach Bindung an DNA über seine Fluoreszenz quantifiziert werden (Anregung bei 485 nm, Messung bei 525 nm, Fluoroscant Ascent, ThermoElectron, Waldbronn). Das Wachstum der Zellen unter Einfluss von Faktoren/Antikörpern wird dann anhand der gemessenen DNA-SybrGreen-Fluoreszenzen relativ zu unbehandelten Kontrollkulturen berechnet.

3.3.2 Migration in submersen Keratinozyten/Fibroblasten-Cokulturen

Keratinozyten ($1,7 \times 10^4/\text{cm}^2$) werden auf vorkultivierte Feeder-Fibroblasten ($0,75 \times 10^4/\text{cm}^2$) ausgesät und in FAD_{komplett} bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert. Aus dem Zellrasen wird durch Abkratzen mit einem Zellschaber ein gleichmäßig breiter Streifen entfernt. Die Ränder des Streifens werden auf der Unterseite der Zellkulturschale markiert und mehrere Beobachtungspunkte markiert. Im Folgenden können dem Medium Faktoren zugesetzt werden, um deren Wirkung auf das Migrationsverhalten der Keratinozyten zu analysieren (Faktoren siehe 3.2.1). An den markierten Punkten wird die Migration der Keratinozyten in das „Wundbett“ fotografiert. Die Strecke, die die Keratinozyten zurückgelegt haben, kann anhand der Fotos ausgemessen werden.

3.3.3 Proliferation, Differenzierung und Apoptose in organotypischer Cokultur

Das Verhalten von Zellen im Gewebeverband oder in der organotypischen Cokultur lässt sich nicht direkt beobachten, sondern lediglich anhand des Auftretens und der Verteilung von spezifischen Markern analysieren. Der Nachweis dieser Marker wird über indirekte Immunfluoreszenz erbracht.

Nachweis der Proliferation

Die proliferative Aktivität der Zellen in organotypischer Kultur wird durch Einbau eines markierten Nukleotids (Bromo-Desoxyuridin, BrdU, 65,1 μM , ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) während der DNA-Replikation quantifiziert.

Das BrdU wird 24h vor der Ernte und Fixierung der Kulturen zum Medium hinzugegeben. Gefrierschnitte der Kulturen (vgl. 3.1.6) werden in Methanol (80% in H_2O , 4°C, 5 min) und Aceton (100%, -20°C, 3 min) fixiert, getrocknet und in PBS[®] rehydriert. Anschließend werden die Zellkerne durch Behandlung mit Salzsäure (2 M HCl, 1 min, Raumtemperatur) aufgeschlossen, was eine Bindung des Primärantikörpers an die DNA erlaubt. Die weitere Behandlung der Schnitte erfolgt wie in 3.2.4 beschrieben.

<u>Primärer Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Bezugsquelle</u>
BrdU	Maus	Progen, Wieblingen
<u>Sekundäre Antikörper</u>	<u>Kopplung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
α -maus	TexasRed	Dianova, Hamburg

Das Verhältnis von BrdU-positiven zu negativen Kernen liefert einen Wert für die proliferative Aktivität der Zellen. Dabei kann auch eine Auswertung innerhalb der einzelnen Strata des Epithels einer organotypischen Kultur erfolgen, so z.B. die Bestimmung der Anzahl der proliferativ aktiven Keratinozyten innerhalb der Basalschicht.

Nachweis der Differenzierung

Der Differenzierungszustand der organotypischen Kulturen lässt sich über den Nachweis differenzierungsassoziierter Proteine im Epithel beurteilen. Die Proteine werden mittels indirekter Immunfluoreszenz (vgl. 3.2.4) angefärbt. Eine Auswahl differenzierungsassoziierter Proteine und ihre Verteilung innerhalb der Epidermis ist in Abb. 3.4 dargestellt.

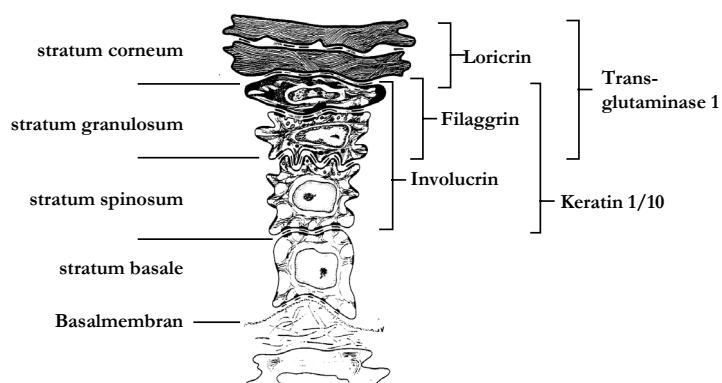


Abb. 3.4 Lokalisation von Differenzierungsmarkern in der Epidermis

Nachweis der Apoptose

In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red

Roche Diagnostics, Mannheim

Apoptotische Zellen können im Gewebeverband anhand der im Verlauf dieses Prozesses fragmentierten DNA identifiziert werden. Dazu wird ein Enzym benutzt, das freiliegende 3'-DNA-Enden um markierte dUTP-Nukleotide verlängert (*Terminal-desoxynucleotidyltransferase-dUTP-Nick-End-Labeling* – TUNEL).

Gefrierschnitte von organotypischen Kulturen werden Methanol/Aceton-fixiert (vgl. 3.1.6), nach dem Trocknen in PBS rehydriert und einem Gemisch aus Enzym und markiertem dUTP ausgesetzt (60 min, 37°C). Anschließend werden die Schnitte gewaschen (0,1% Triton X-100, 0,2% BSA in PBS) und die Kerne mit Bisbenzimid angefärbt (1 µg/ml Bisbenzimid in PBS, 15 min, Raumtemperatur). Nach mehrfachem Waschen mit PBS werden die Schnitte luftblasenfrei in Mowiol eingedeckelt.

Das Verhältnis von Signal-positiven zu nicht-apoptotischen Kernen wird anhand der Fluoreszenz der markierten Nukleotide sowie des Bisbenzimids bestimmt. Die Auszählung muss für die einzelnen Differenzierungsschichten getrennt erfolgen, da DNA auch im Verlauf der terminalen Differenzierung fragmentiert wird, was in den oberen Strata eine große Anzahl positiver Signale erzeugt.

4 Ergebnisse

Das Verhalten dermalen und epidermalen Zellen während der Gewebemöostase und Wundheilung wird maßgeblich durch lösliche Mediatoren bestimmt, die eine interzelluläre Kommunikation innerhalb des Gewebes ermöglichen. FGF-7 und GM-CSF gehören zu den Cytokinen und Wachstumsfaktoren, die von dermalen Fibroblasten in Reaktion auf epidermal freigesetztes IL-1 produziert werden. Beide Faktoren wirken *in vivo* und *in vitro* mitogen auf Keratinozyten. Die Überexpression oder Applikation der Faktoren *in vivo* resultiert allerdings in komplexen Phänotypen, die durch eine ausschließliche Stimulation der Proliferation der Keratinozyten nicht erklärt werden können. Um die Wirkung von FGF-7 und GM-CSF in der dermal-epidermalen Kommunikation genauer zu analysieren, werden die durch Zugabe der Faktoren ausgelösten Veränderungen der Genexpression in Keratinozyten identifiziert und die Bedeutung der induzierten oder reprimierten Genprodukte für die Epithelialisierung *in vitro* charakterisiert.

4.1 Induktion Proliferations-assoziiierter Transkripte durch FGF-7 und GM-CSF

Primäre humane Keratinozyten in Cokultur mit postmitotischen murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten, die weder FGF-7 noch GM-CSF sezernieren, bleiben in ihrer Proliferation hinter Keratinozyten in Cokultur mit murinen *wt*-Fibroblasten zurück. Sie bilden kleine Inseln aus, die im Lauf der Differenzierung der Keratinozyten verhornen. Nach Zugabe von FGF-7 oder GM-CSF kann

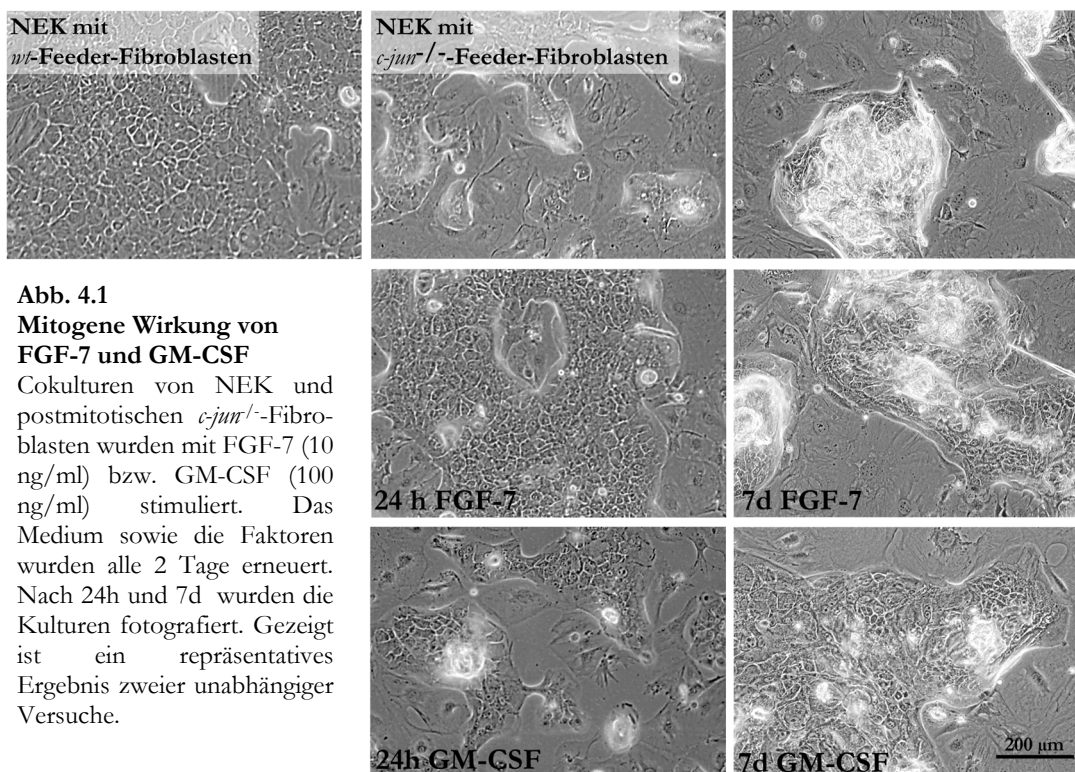


Abb. 4.1
Mitogene Wirkung von FGF-7 und GM-CSF
 Cokulturen von NEK und postmitotischen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wurden mit FGF-7 (10 ng/ml) bzw. GM-CSF (100 ng/ml) stimuliert. Das Medium sowie die Faktoren wurden alle 2 Tage erneuert. Nach 24h und 7d wurden die Kulturen fotografiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

eine Vergrößerung der Zell-Inseln beobachtet werden, begründet in einem deutlichen Anstieg der Keratinozyten-Proliferation. Die mitogene Wirkung von FGF-7 ist bereits nach 24-stündiger Stimulation deutlich erkennbar, wohingegen die Reaktion der Keratinozyten auf GM-CSF verzögert erfolgt (vgl. Abb. 4.1).

Um die durch FGF-7 bzw. GM-CSF in den Keratinozyten ausgelösten Prozesse zu charakterisieren, wurde das Genexpressionsmuster vor und nach der Stimulation mit FGF-7 oder GM-CSF mit Hilfe eines cDNA-Arrays erfasst. Dazu wurden Keratinozyten zweier verschiedener Spender auf einem *c-jun*^{-/-}-Feeder-Layer mit 10 ng/ml FGF-7 bzw. 100 ng/ml GM-CSF stimuliert und nach Ablauf von 10 sowie 24 Stunden die Feeder-Fibroblasten entfernt und die Keratinozyten-mRNA isoliert. Die Qualität der mRNA wurde im Hinblick auf Integrität, DNA-Verunreinigung und den Gehalt an muriner mRNA überprüft (siehe 3.2.2). Nach der reversen Transkription wurde das cDNA-Array mit der Keratinozyten-cDNA hybridisiert. Von den 8400 Transkripten, die durch das cDNA-Array nachgewiesen werden können, sind in Keratinozyten etwa 2000 exprimiert. Die Expression von etwa 200 dieser Gene wird durch FGF-7 oder GM-CSF um einen Faktor größer 2 induziert bzw. reprimiert.

Beide Faktoren wirken mitogen auf Keratinozyten (siehe 2.2.2 und 2.2.3) und erhöhen somit die Expression einer Reihe von Genen, die in proliferierenden Zellen im Gegensatz zu ruhenden Zellen stärker exprimiert werden (vgl. Tabelle 4.2). So induzieren sowohl FGF-7 als auch GM-CSF beispielsweise die Transkription von *cyclin B1*, dessen Genprodukt über die Bindung an p34^{cdc2} den Eintritt der Zellen in die Mitose reguliert (Gautier et al., 1989; Brandeis et al., 1998). Die Expression von Histonen und chromatinbindenden Nicht-Histon-Proteinen wird ebenfalls durch beide Mitogene erhöht (vgl. Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Induktion Proliferations-assoziiierter Transkripte durch FGF-7 und GM-CSF

Angegeben sind die Intensitätswerte hybridisierter Spots auf dem cDNA-Array, die mit dem Zellzyklus assoziierte Transkripte repräsentieren.

Zellzyklusregulation		Spender A		Spender A		Spender B	
		(NEK8.2.00) 10h		(NEK8.2.00) 24h		(NEK30.3.98) 10h	
Gen	Accession number	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7
<i>cyclin B1</i>	AI972071	0,18	0,03	2,99	7,29	16,33	29,77
<i>H2A histone family, member N</i>	BG109927	0,29	0,43	7,15	8,84	21,49	31,35
<i>H2B histone family, member B</i>	BF509675	0,02	0,03	1,28	1,85	61,15	102,2
<i>regulator of mitotic spindle assembly 1</i>	AU139950	0	0	4,12	8,67	20,59	27,96
<i>replication factor C 2 (40 kDa)</i>	BE295474	1,95	1,1	1,43	3,25	5,75	8,61
<i>high-mobility group 20A</i>	BF196736	2,17	3,07	1,2	3,39	6,94	10,12
		<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF
<i>cyclin B1</i>	AI972071	0,18	0	2,99	6,73	16,33	30,73
<i>H2B histone family, member B</i>	BF509675	0,02	0,03	38,69	49,14	61,15	108,79
<i>high-mobility group 20A</i>	BF196736	2,17	2,4	1,2	1,77	6,94	10,95

Außer den Transkripten, die mit der Zellzyklusregulation oder DNA-Replikation in Verbindung stehen, werden insbesondere Gene, die in Energie- und Proteinstoffwechsel involviert sind, transkriptionell aktiviert (vgl. Tabelle 4.3). Die erhöhte Expression von RNA-Polymerasen, Histondeacetylasen sowie Elongationsfaktoren der Translation und Hitzeschockproteinen steht in Zusammenhang mit einer generellen Beschleunigung der Proteinbiosynthese in Keratinozyten auf *c-jun*^{-/-}-Feeder-Layer nach Zugabe von FGF-7 oder GM-CSF.

Tabelle 4.3 Induktion Proliferations-assoziiierter Transkripte durch FGF-7 und GM-CSF

Angegeben sind die Intensitätswerte hybridisierter Spots auf dem cDNA-Array, die mit dem Energie- und Proteinstoffwechsel assoziierte Transkripte repräsentieren.

Protein- und Energiestoffwechsel		Spender A (NEK8.2.00) 10h		Spender A (NEK8.2.00) 24h		Spender B (NEK30.3.98) 10h	
Gen	Accession number	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7
<i>NADH dehydrogenase 1 α subcomplex, 1</i>	AW006760	0,22	0,11	1,76	3,61	5,89	9,27
<i>L3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain</i>	BF340259	0	0,26	0,38	1,51	2,18	3,62
<i>aspartyl aminopeptidase</i>	BC000653	0,87	0,77	2,67	5,5	11,9	16,28
<i>fucosyltransferase 4</i>	AI370004	0,13	0,03	4,56	9,27	13,25	26,66
<i>polymerase (RNA) II polypeptide L</i>	F24474	0,7	3,46	2,78	4,2	8,16	9,88
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 ϵ1</i>	BF243409	0,12	0,08	2,43	6,15	12,13	26,57
<i>histone deacetylase 6</i>	AL041491	0,1	0	0,7	3,94	5,4	8,85
		<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF
<i>fucosyltransferase 4</i>	AI370004	0,13	0,02	4,56	5,29	13,25	25,05
<i>YME1-like 1 (mitochondrial metabolism)</i>	AJ295618	4,01	6,97	1,7	2,42	8,04	12,57
<i>polymerase (RNA) III</i>	AL558755	0,24	0,02	2,56	4,69	11,32	16,31
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 ϵ1</i>	BF243409	0,12	0,09	2,43	5,28	12,13	25,29
<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2</i>	AL567229	0,17	0	7,49	20,98	37,83	83,81

Die Hybridisierung der cDNA-Arrays mit der Keratinozyten-mRNA zeigt eine Induktion bzw. Steigerung der Expression von Transkripten, deren Genprodukte für proliferierende Zellen essentiell sind. Sie spiegelt die phänotypischen Veränderungen, die nach Zugabe der Faktoren beobachtet werden, damit exakt wider. Darüber hinaus ist die Anzahl der Transkripte, die durch FGF-7 in Keratinozyten induziert werden, größer als die Zahl der durch GM-CSF aktivierten Gene. Die Hybridisierungsergebnisse gehen in diesem Punkt konform mit den beobachteten zellulären Reaktionen, da die Proliferation nach GM-CSF-Applikation im Beobachtungszeitraum wesentlich schwächer ist als die Reaktion auf FGF-7.

4.2 Expression von Regulatoren, Strukturproteinen und Signalmolekülen

Neben der Induktion von Proliferations-assoziierten Transkripten regulieren FGF-7 und GM-CSF die Aktivität weiterer Gene, unter anderem die von Strukturproteinen, Signalmolekülen wie Liganden, Rezeptoren und Signaltransduktionsproteinen, und von Regulatoren von Apoptose- und Differenzierungsprozessen.

Tabelle 4.4 Modulation von ausgewählten Transkripten durch FGF-7 und GM-CSF

Dargestellt sind die Intensitätswerte, die in 3 cDNA-Array-Hybridisierungen gemessen wurden.

Gen	Accession number	Spender A (NEK8.2.00) 10h			Spender A (NEK8.2.00) 24h			Spender B (NEK30.3.98) 10h		
		<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF	<i>c-jun</i> ^{-/-}	<i>c-jun</i> ^{-/-} FGF-7	<i>c-jun</i> ^{-/-} GM-CSF
<i>baculoviral LAP repeat-containing 1</i>	NM_004536	13,7	3,55	9,16	5,88	3,28	2,1	2,27	0,33	0,74
<i>BCL-2 antagonist of cell death</i>	AW007022	0,32	0,07	0	14,6	12,7	6,89	4,51	5,69	2,03
<i>keratin 14</i>	BE614947	12,39	36,9	39,57	5,18	6,54	5,71	2,99	0,82	2,43
<i>keratin 17</i>	AI521362	9,09	23,51	53,05	16,74	22,63	19,06	11,48	5,93	7,9
<i>desmoglein 2</i>	XM_008801	0,4	1,61	2,11	0,15	0,25	0,1	0,08	0,02	0,04
<i>claudin 1</i>	AF101051	0,26	0,11	0,01	16,91	19,8	9,73	5,96	8,84	2,78
<i>small proline-rich-protein 1B (cornifin)</i>	BE932403	14,66	32,05	18,79	9,21	6,95	3,25	6,2	0,87	2,32
<i>galactin 1</i>	BF977413	0,44	2,32	1,67	0	0,11	0,06	0,01	0	0,05
<i>protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)</i>	L10343	5,34	11,18	3,15	5,08	6,04	3,93	3,3	1,76	2,2
<i>interleukin-11</i>	AI620537	2,75	1,5	1,87	12,01	9,98	4,75	4,32	4,2	2,23
<i>interleukin-18</i>	AV733501	2,48	9,08	5,69	1,19	1,23	0,52	0,48	0,08	0,16
<i>TRAIL</i>	AW022060	2,16	5,81	5,73	2,21	1,59	0,54	0,51	0,09	0,24

Die Expression einiger Vertreter dieser Gruppen in Keratinozyten sowie ihre Abhängigkeit von FGF-7 oder GM-CSF wird zur Kontrolle der Ergebnisse der cDNA-Array-Hybridisierung über RT-PCR untersucht. Dies ist notwendig, da Schwankungen in der Hybridisierungs-Intensität innerhalb eines cDNA-Arrays auftreten können, die beim Vergleich mit anderen Hybridisierungen falsch-positive oder falsch-negative Resultate liefern. Außerdem enthalten alle verwendeten mRNAs von Keratinozyten murine mRNA der Feeder-Fibroblasten, die möglicherweise ebenfalls die Ergebnisse beeinflusst. Die durchgeführten 3 Hybridisierungen mit Keratinozyten von zwei verschiedenen Spendern sind nicht ausreichend, um diese Intensitätsschwankungen statistisch auszumitteln. Daher werden Keratinozyten weiterer Spender in die Analyse einbezogen und in Cokultur mit *c-jun*^{-/-}-Feeder-Fibroblasten mit FGF-7 oder GM-CSF behandelt. Die Expression der ausgewählten Transkripte (vgl. Tabelle 4.4) wird nach 10- und 24-stündiger Stimulation durch semiquantitative RT-PCR analysiert.

Die Analyse der Keratinozyten-Genexpression nach Stimulation mit FGF-7 oder GM-CSF mit Hilfe des cDNA-Arrays ergibt, dass die Expression zweier Regulatoren der Apoptose durch beide Faktoren in gleicher Weise moduliert wird. Die Expression von *birc 1* und *bad* wird durch beide Faktoren negativ beeinflusst, trotz der gegensätzlichen Wirkung der Genprodukte auf die Apoptose.

Das Genprodukt von *birc 1* (*baculoviral LAP repeat-containing 1*) ist ein neuronal exprimiertes, anti-apoptotisch wirkendes Protein (Gotz et al., 2000).

In Cokulturen humaner Fibroblasten mit humanen Keratinozyten ist das Transkript nicht nachweisbar, sondern tritt lediglich in heterologen Cokulturen auf, unabhängig vom Genotyp der murinen Fibroblasten (vgl. Abb. 4.5). Die Expression von *birc 1* wird von FGF-7 oder GM-CSF nicht moduliert; die semiquantitative RT-PCR zur Amplifikation des Transkriptes aus RNA von 5 verschiedenen Keratinozyten ergibt keine konsistente Regulation der Expression (Daten nicht gezeigt), was im Gegensatz zu den Ergebnissen der cDNA-Array-Hybridisierung steht.

Die transkriptionelle Aktivität des Genes *bad* (*bcl-2 antagonist of cell death*), dessen Genprodukt abhängig von seinem Phosphorylierungszustand pro-apoptotisch wirkt (Datta et al., 2002) wird dagegen durch FGF-7 und GM-CSF reproduzierbar gesenkt (vgl. Abb. 4.6). Die mitogene Wirkung beider Faktoren wird also möglicherweise durch eine gleichzeitige Hemmung des Zellsterbens ergänzt. Eine Verlängerung der Überlebensdauer von Zellen ist unter anderem für GM-CSF-behandelte neutrophile Granulozyten gezeigt worden (Epling-Burnette et al., 2001).

Die **Keratine 14 und 17** sorgen als Intermediärfilamente und Bestandteile des Zytoskeletts für die Stabilität der Epidermis. Beide werden vor allem in proliferativ aktiven Schichten stratifizierter Epithelien exprimiert (El Ghalbzouri et al., 2003). Die Stimulation von Keratinozyten mit FGF-7 und GM-CSF führt zu einer Erhöhung des Anteils proliferativ aktiver Zellen in der Kultur, was das vermehrte Auftreten von Keratin 14- und 17-Transkripten erklären könnte. Eine direkte Regulation der Transkription dieser Gene durch FGF-7 oder GM-CSF konnte in der RT-PCR jedoch nur für Keratin 17 gezeigt werden (vgl. Abb. 4.6). Die Expression von Keratin 14 wird durch die Applikation beider Faktoren nicht beeinflusst. Die Modulation der *keratin 17*-Transkription durch FGF-7 steht im Widerspruch zu Studien, die die Insensitivität des Promoters gegenüber FGF-7 zeigen (Latkowski et al., 1995).

Die hohe Stabilität der Epidermis gegenüber mechanischem Stress wird nicht nur durch Zytoskelett-Komponenten, sondern auch durch die Verbindungen der Keratinozyten untereinander und zur Basalmembran realisiert. FGF-7 und GM-CSF verstärken die Expression von *desmoglein 2*, (vgl. Abb. 4.6) dessen Genprodukt einer der Bestandteile von Desmosomen ist.

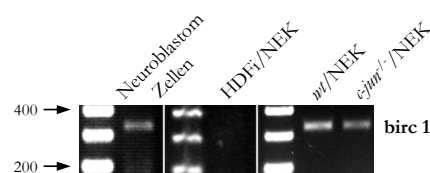


Abb. 4.5 Expression von *birc 1* in homologen und heterologen Cokulturen
Keratinozyten in Cokultur mit humanen oder murinen Feeder-Fibroblasten wurden lysiert und aus der RNA das *birc 1*-Transkript mittels RT-PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle diente RNA von Neuroblastomzellen (D. Willen, Abt. Apoptoseregulation, DKFZ-Heidelberg).

Diese Zell-Zell-Verbindungen führen durch Verknüpfung der Intermediärfilamente benachbarter Zellen zur Stabilisierung des Gewebeverbandes (Matoltsy, 1986b). Desmoglein 2 wird hauptsächlich von undifferenzierten Keratinozyten in der Basalschicht der Epidermis exprimiert, in den differenzierenden Strata ist das Protein dagegen nicht nachweisbar (Wu et al., 2003). Das gesteigerte Auftreten des Desmoglein 2-Transkriptes könnte also, wie die Induktion von *keratin 17*, eine Folge der erhöhten Präsenz proliferativ aktiver Keratinozyten in den mit FGF-7 oder GM-CSF behandelten Kulturen sein.

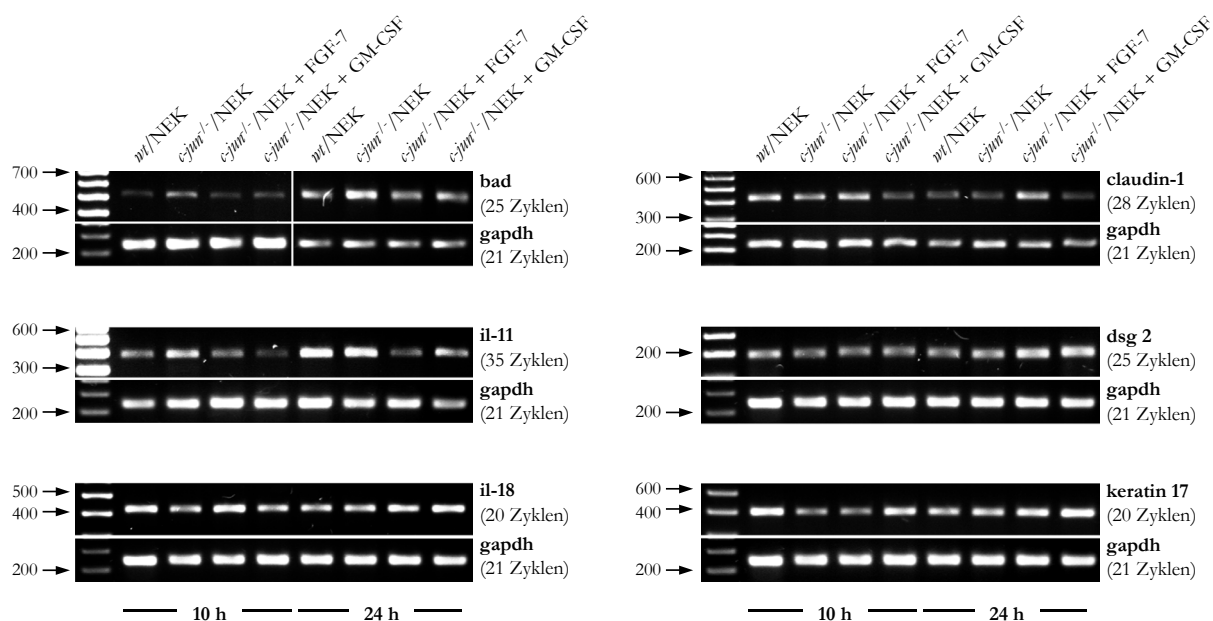


Abb. 4.6 Modulation der Transkription durch Applikation von FGF-7 und GM-CSF

Keratinozyten auf *c-jun*^{-/-}-Feeder-Layer wurden 10h und 24h mit den jeweiligen Faktoren stimuliert (10 ng/ml FGF-7 bzw. 100 ng/ml GM-CSF) und die verschiedenen Transkripte durch RT-PCR aus der Keratinozyten-RNA amplifiziert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus 7 Versuchen mit Keratinozyten von 5 verschiedenen Spendern.

Die transkriptionelle Aktivität von *claudin 1*, einem Bestandteil der „tight junction“, dessen funktionelle Inaktivierung *in vivo* zu einem Verlust der Barrierefunktion der Haut führt (Furuse et al., 2002), wird durch FGF-7 induziert und durch GM-CSF reprimiert (vgl. Abb. 4.6). Die Expression dieses Proteins ist im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* besonders hoch, so dass die Aktivierung dieses Promotors auf eine Induktion der Keratinozyten-Differenzierung hindeutet. Die beobachtete Hemmung der *claudin 1*-Transkription durch GM-CSF und seine Aktivierung durch FGF-7 sind daher unerwartet, da GM-CSF in organotypischer Cokultur von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten Proliferation und Differenzierung induziert, FGF-7 dagegen hauptsächlich eine mitogene Wirkung zu haben scheint (Szabowski et al., 2000).

Die Funktion der Epidermis als Barriere gegen das Eindringen von Umweltsubstanzen und das Verdunsten von Wasser wird durch eine wasserabweisende Lipid-Protein-Schicht in den höheren Schichten der Epidermis gewährleistet. *Small proline-rich protein 1* codiert ein Protein, das von Keratinozyten in den suprabasalen Schichten der Epidermis exprimiert wird und

einen hohen Gehalt an Prolin, Glutamin und Cystein aufweist (Marvin et al., 1992). Die enzymatische Vernetzung dieses Proteins durch Transglutaminasen trägt zur Entstehung der wasserabweisenden Schicht des *Stratum corneum* bei. Die Hybridisierung der Keratinozyten-mRNA mit dem cDNA-Array ergibt eine überwiegend negative Regulation der Transkription von *Small proline-rich protein 1*, was mit der mitogenen Wirkung von FGF-7 und GM-CSF vereinbar ist. Dies ist mit Hilfe der RT-PCR nicht verifizierbar (Daten nicht gezeigt).

Das Genprodukt von *galectin 1* ist ein Galactose-bindendes Säuger-Lectin, das allerdings eine Vielzahl von zellulären Effekten hervorruft, die unabhängig von seiner Bindung an Glykane sind. Galectin 1 inhibiert das Wachstum von Fibroblasten und löst deren Differenzierung zu Myofibroblasten aus (Goldring et al., 2002; Scott und Zhang, 2002). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression zur Transformation von Fibroblasten (Paz et al., 2001). Nach Bindung an einen bislang uncharakterisierten Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten löst Galectin-1 deren Apoptose aus (Fajka-Boja et al., 2002). Die Verstärkung der *galectin 1*-Transkription, die anhand der cDNA-Array-Hybridisierung von FGF-7 und GM-CSF ausgelöst wird, konnte in der RT-PCR nicht bestätigt werden. Die Analysen von RNA aus Keratinozyten von 5 unterschiedlichen Spendern ergeben keine konsistente Regulation der *galectin 1*-Transkription nach Addition der Faktoren (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der cDNA-Array-Hybridisierung beinhalten auch die FGF-7-vermittelte Verstärkung der Expression von *skalp* (*skin-derived anti-leukoproteinase, proteinase inhibitor 3*), einem Protein, dessen Expression mit pathogenen Hautveränderungen verbunden ist. Die Sekretion dieses Protease-Inhibitors kann durch IL-1 β und TNF- α gesteigert werden (Tanaka et al., 2000). GM-CSF scheint einen negativen Einfluss auf die Transkription von *skalp* zu haben. Die RT-PCR zeigt allerdings, dass die transkriptionelle Aktivität von *skalp* unabhängig von FGF-7 und GM-CSF ist (Daten nicht gezeigt).

Interleukin-11 und -18 sind Cytokine, die beide in Epithelien exprimiert werden (Ameglio et al., 1997; Koizumi et al., 2001). Ihre Wirkung auf Keratinozyten oder Fibroblasten ist allerdings bisher wenig untersucht (Gyotoku et al., 2001; Nakanishi et al., 2001). Die Aktivität des *il-11* Genes wird durch FGF-7 und GM-CSF gesenkt, wohingegen die Transkription von *il-18* von beiden Faktoren verstärkt wird (vgl. Abb. 4.6).

Der dritte lösliche Faktor, der aus den Ergebnissen der cDNA-Array-Hybridisierung zur näheren Analyse ausgewählt wurde, ist **TRAIL** (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). Dieses Protein kann nach Bindung an einen der 2 funktionellen TRAIL-Rezeptoren (*Death Receptor 3* und 4) die Apoptose der Rezeptor-exprimierenden Zelle auslösen (Bhardwaj und Aggarwal, 2003). Die cDNA-Array-Hybridisierung zeigt überwiegend eine Hemmung der *trail*-Transkription durch FGF-7 und GM-CSF (vgl. Tabelle 4.4), ein Ergebnis, das durch die RT-PCR nicht verifiziert werden konnte.

Die Ergebnisse des cDNA-Arrays, die anhand der ausgewählten 12 Kandidaten-Transkripte überprüft werden sollten, konnten zu 50% durch RT-PCR an RNA von Keratinozyten weiterer

Spender verifiziert werden. Die Gene, deren Transkription reproduzierbar durch FGF-7 und GM-CSF reguliert wird, sind die Gene für die Strukturproteine Keratin 17, Desmoglein 2 und Claudin 1, das Gen des Apoptose-Induktors Bad und die Gene der Cytokine IL-11 und IL-18. Im Kontext der dermal-epidermalen Kommunikation und der Regulation des Verhaltens von Keratinozyten und Fibroblasten stellen die löslichen Faktoren die interessanteste Gruppe der regulierten Gene dar, da über sie eine parakrine Interaktion zwischen den Zelltypen möglich wird. Daher soll im folgenden die Modulation der Expression von IL-11 und IL-18 durch FGF-7 und GM-CSF auf der Ebene der Transkription, Translation und Sekretion genauer charakterisiert werden.

4.3 Interleukin-11

Die Hybridisierung der mRNA von Keratinozyten aus Cokultur mit *c-jun*^{-/-}-Feeder-Fibroblasten nach Zugabe von FGF-7 oder GM-CSF zeigt, dass die Transkription von *interleukin-11* durch beide Faktoren reprimiert wird. Dieses Ergebnis konnte in unabhängigen Versuchen an RNA von 5 Spendern mittels RT-PCR bestätigt werden (vgl. Abb. 4.8).

Interleukin-11

Interleukin-11 ist ein hochgradig basisches, Prolin-reiches Protein, das von einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird, darunter Epithelzellen der Lunge und des Verdauungstraktes, sowie Lungenfibroblasten, Endothelzellen und Osteoblasten (Elias et al., 1994a; Elias et al., 1994b; Du und Williams, 1997; Heymann und Rousselle, 2000; Mahboubi et al., 2000). In den epithelialen und stromalen Zellen der Lunge wird die Synthese von IL-11 durch IL-1 und TGF β induziert (Elias et al., 1994a; Elias et al., 1994b), während Kortikoide (z. B. Dexamethason) die Expression negativ beeinflussen (Wang et al., 1999).

Der Rezeptor für IL-11 ist ein Heterodimer aus einer ligandspezifischen Untereinheit, dem IL-11-Rezeptor α , und dem Transmembranprotein gp130, das außer dem IL-11-Rezeptor α auch die α -Untereinheiten der Rezeptoren für IL-6, Oncostatin, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) und Cardiotrophin 1 binden kann. Nach Bildung des Komplexes aus Ligand und beiden Rezeptor-Untereinheiten werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, so z.B. die Phospholipase C γ oder STATs, die durch JAK2 phosphoryliert werden (Du und Williams, 1997).

IL-11 reguliert hauptsächlich die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen und stimuliert damit die Differenzierung von Megakaryozyten, Thrombozyten und Erythrozyten (Du und Williams, 1997). Unter den IL-11-responsiven Zelltypen befinden sich auch Mast-Zellen, deren Proliferation durch IL-11 angeregt wird (Gyotoku et al., 2001), und Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, die IL-11 in ihrem Wachstum hemmt (Booth und Potten, 1995). Die Überexpression von IL-11 führt in der Lunge zu Fibrosen, zur Infiltration von Monozyten und resultiert in verengten Atemwegen (Tang et al., 1996).

IL-11 wird von Keratinozyten produziert, wobei seine Synthese nach UV-Bestrahlung verstärkt nachgewiesen werden kann. Das Interleukin schützt die Keratinozyten vor UV-induzierter Apoptose (Scordi et al., 1999). Keratinozyten aus psoriatischen Läsionen sezernieren ebenfalls verstärkt IL-11, wobei ein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf bislang nicht gezeigt werden konnte (Ameaglio et al., 1997).

Abb. 4.7 Literaturhinweise zu Interleukin-11

Der Nachweis von humanem IL-11 in den konditionierten Medien von heterologen Cokulturen zeigt, dass IL-11 von Keratinozyten freigesetzt wird, was in Übereinstimmung mit der Literatur steht (Scordi et al., 1999). Daneben wird IL-11 allerdings in hohem Maße von Fibroblasten sezerniert, und in Überständen von Cokulturen humaner Keratinozyten mit humanen Feeder-Fibroblasten sind ebenfalls sehr große Mengen an IL-11 nachweisbar (vgl. Abb. 4.8). Fibroblasten in Cokultur mit Keratinozyten verstärken möglicherweise ihre IL-11-Synthese, was über die IL-1-Freisetzung durch Keratinozyten induziert werden könnte (Elias et al., 1994b).

Die Messung der IL-11-Konzentration nach Stimulation der Cokulturen zeigt, dass im Gegensatz zur transkriptionellen Regulation des *il-11*-Genes die Applikation von FGF-7 oder GM-CSF nur geringen Einfluss auf die Translation und Freisetzung des Proteins hat. Die Konzentration von humanem IL-11 in konditionierten Medien von Keratinozyten und murinen *wt*-Feeder-Fibroblasten ist geringfügig höher als die in Medien von *c-jun*^{-/-}/NEK-Cokulturen. Die Applikation von FGF-7 oder GM-CSF verändert die Konzentration des von Keratinozyten freigesetzten IL-11 nicht signifikant (vgl. Abb. 4.8). Die Effekte von FGF-7 oder GM-CSF auf die Epithelialisierung *in vitro* und *in vivo* gehen daher wahrscheinlich nicht auf eine Reduktion der IL-11-Freisetzung durch die Keratinozyten zurück.

4.4 Interleukin 18

Wie gezeigt wurde, tritt *in vitro* in heterologen Cokulturen humaner Keratinozyten und muriner *c-jun*^{-/-}-Feeder-Fibroblasten unter Einfluss von FGF-7 oder GM-CSF eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des *il-18*-Genes auf (siehe Abb. 4.6). Bevor die Wirkung von FGF-7 und GM-CSF auf die Synthese von IL-18 genauer charakterisiert wird, soll zunächst die Expression des Faktors sowie die Synthese beider Rezeptoren in Keratinozyten und Fibroblasten untersucht werden.

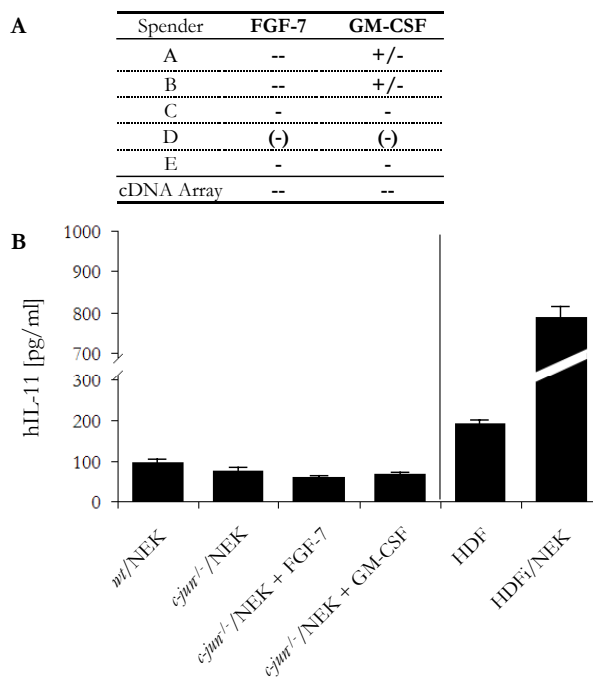


Abb. 4.8 Expression von IL-11 in homologen und heterologen Cokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten

Keratinozyten verschiedener Spender wurden auf Feeder-Layern von murinen *c-jun*^{-/-} oder *wt*-Fibroblasten bzw. humanen Fibroblasten kultiviert und mit FGF-7 (10 ng/ml) oder GM-CSF (100 ng/ml) behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und aus der RNA IL-11 mittels RT-PCR amplifiziert (A). Gezeigt sind die Ergebnisse für 5 unabhängige Versuche (,-,-': stark reduziert gegenüber *c-jun*^{-/-}/NEK; ,-'' reduziert; ,(-)' schwach reduziert; ,+/-': nicht reguliert). In 48 Stunden konditionierten Medien wurde humanes IL-11 durch ELISA quantifiziert (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen. angegeben sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Interleukin-18

Interleukin 18 ist ein nichtglykosyliertes Protein, das in PBMC (mononukleären Zellen des peripheren Blutes) die Synthese und Freisetzung von *Interferon γ* (IFN γ) induziert (Ushio et al., 1996). Es verfügt nicht über eine klassische Signalsequenz zur Sekretion und wird, wie Interleukin-1, durch proteolytische Spaltung des Pro-Proteins durch Caspase 1 (*Interleukin-1 Converting Enzyme*, ICE) aktiviert (Gu et al., 1997; Fantuzzi und Dinarello, 1999). Es wird in Epithelzellen der Lunge und des Verdauungstraktes, sowie in Bauchspeicheldrüse, Niere und Skelettmuskulatur exprimiert (Ushio et al., 1996; Nakanishi et al., 2001). Daneben ist eine epidermale Synthese von IL-18 durch Keratinozyten und Langerhans-Zellen, sowie die dermale Freisetzung durch dendritische Zellen nachgewiesen worden (Companjen et al., 2000; Koizumi et al., 2001). Die transkriptionelle Aktivität des Genes wird unter anderem durch STAT5 und NF- κ B verstärkt (Kalina et al., 2000; Nakanishi et al., 2001), wobei die IL-18-mRNA sehr stabil ist und die Synthese von IL-18 auch posttranskriptionell reguliert werden kann (Dinarello et al., 1998).

Der Rezeptor für IL-18 besteht aus 2 Komponenten, die große Homologien zu den Untereinheiten des IL-1-Rezeptors aufweisen. IL-18 wird an der Zelloberfläche durch den IL-18-Rezeptor α (*IL-1 Receptor related protein*, IL1Rrp) gebunden, der zusammen mit dem IL-18-Rezeptor β (*IL-1 Receptor Accessory Protein like protein*, IL1RAPL) intrazellulär nachgeschaltete Effektoren aktiviert. Dabei wird vor allem die Phosphorylierung von I κ B (*Inhibitor of κ B*) induziert, was in der Mobilisierung von NF- κ B aus dem Cytoplasma resultiert (Nakanishi et al., 2001).

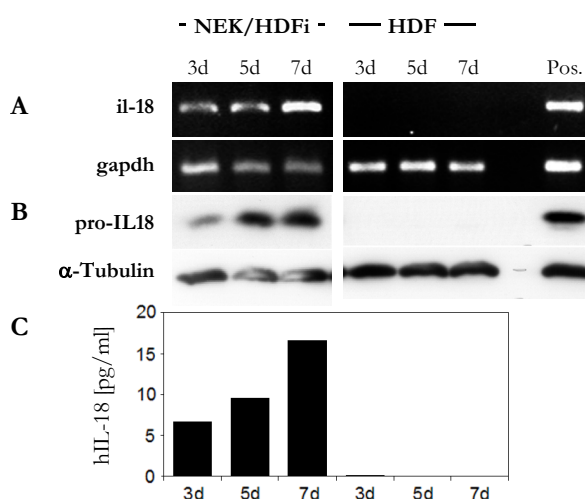
IL-18 ruft neben der Induktion von IFN γ auch die Synthese von Interleukin-8, IL-1 β und GM-CSF in PBMC hervor (Ushio et al., 1996; Puren et al., 1998). In Abhängigkeit von costimulatorischen Interleukinen steuert IL-18 die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th₁- oder Th₂-Zellen und ist damit in die Regulation der zellulären Immunantwort involviert (Nakanishi et al., 2001). Darüber hinaus induziert IL-18 die Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis zu den Lymphknoten (Cumberbatch et al., 2001). Nach einer Verletzung der Haut tritt IL-18 verstärkt auf und wird dabei hauptsächlich von infiltrierenden neutrophilen Granulozyten und den Keratinozyten am Wundrand synthetisiert (Kampfer et al., 1999). Die topische Überexpression von IL-18 im *Stratum basale* führt zur Verdickung des *Stratum spinosum* (Akanthose), in Verbindung mit einem verstärkten *Stratum granulosum* (Lichenifizierung) sowie einer erhöhten Präsenz von Mast-Zellen in der Epidermis (Konishi et al., 2002). Die Überexpression des IL-18-aktivierenden Enzyms ICE resultiert dagegen in einer chronischen Hautentzündung, was auf die erhöhte Präsenz von aktivem IL-1 neben IL-18 zurückzuführen ist. (Yamanaka et al., 2000).

In Überständen psoriatischer Läsionen werden erhöhte IL-18-Konzentrationen gemessen, wobei die IL-18-synthetisierenden Zellen in diesem Fall nicht identifiziert werden konnten (Ohta et al., 2001).

Abb. 4.9 Literaturhinweise zu Interleukin-18

4.4.1 Interleukin-18 und seine Rezeptoren in Keratinozyten und Fibroblasten

Interleukin-18 wird in Kulturen primärer humaner Keratinozyten auf Feeder-Layern aus humanen postmitotischen Fibroblasten transkribiert, translatiert und sezerniert, wobei die Synthese und die Freisetzung von IL-18 mit steigender Zellzahl in der Kultur zunimmt. Fibroblasten in Monokultur synthetisieren dagegen weder die IL-18-mRNA, noch ist das Protein im Zytoplasma bzw. im Medienüberstand nachweisbar (vgl. Abb. 4.10).



Fibroblasten produzieren auch dann kaum IL-18, wenn sie mit Keratinozyten kokultiviert werden. In heterologen Kokulturen humaner Keratinozyten mit murinen Feeder-Fibroblasten wird vorwiegend das humane *il-18*-Gen transkribiert, wohingegen die murine IL-18-mRNA nur in sehr geringen Mengen durch RT-PCR nachgewiesen werden kann. In Maus-Haut ist das murine Transkript dagegen gut sichtbar (Abb. 4.11), was auf die Expression von IL-18 in der Epidermis zurückzuführen ist.

IL-18 wird damit im Gegensatz zu IL-11 in der interzellulären Kommunikation von Fibroblasten und Keratinozyten hauptsächlich von den epidermalen Zellen synthetisiert und freigesetzt.

Die Gene, die den IL-18-Rezeptor α bzw. β codieren, werden gleichermaßen in Keratinozyten und Fibroblasten transkribiert (vgl. Abb. 4.12). Keratinozyten exprimieren die Rezeptor-Untereinheiten unabhängig von Spezies und Genotyp der kokultivierten Fibroblasten, da die humanen IL-18-Rezeptor-Transkripte in homologen und heterologen Kokulturen gleichermaßen

Abb. 4.10 IL-18-Expression in Keratinozyten und Fibroblasten

Die Fibroblasten sowie Keratinozyten in Kokultur mit postmitotischen humanen Feeder-Fibroblasten wurden bis zu 7d kultiviert. Aus dem Zelllysat wurden RNA und zytosolische Proteine isoliert und die IL-18-mRNA über RT-PCR (A) sowie das Pro-Protein durch Western Blot (B) und freigesetztes IL-18 durch ELISA (C) nachgewiesen. Zur Sicherstellung gleicher Ausgangsmengen an cDNA bzw. Protein werden die GAPDH-mRNA sowie die Expression von α -Tubulin quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen (Pos.: RNA bzw. Protein von HaCaT/HDFi-Cokulturen).

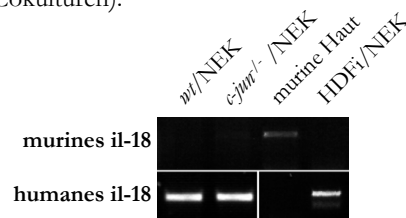


Abb. 4.11 Expression von murinem und humanem IL-18 in heterologen Kokulturen

Aus Kulturen von Keratinozyten auf Fibroblasten-Feeder-Layern wurde RNA isoliert und die IL-18 Transkripte unter Verwendung speziesspezifischer Primer amplifiziert (murines IL-18: 25 Zyklen, humanes IL-18: 21 Zyklen)

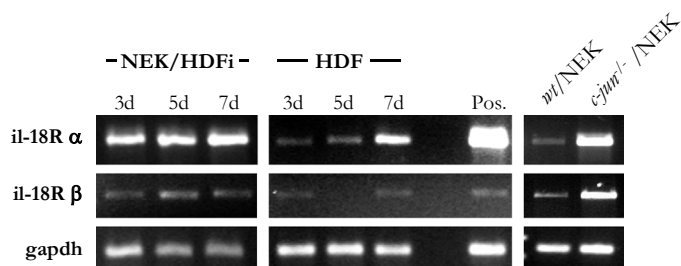


Abb. 4.12 Expression der IL-18-Rezeptoren

Aus Fibroblasten bzw. Keratinozyten in Kokultur mit postmitotischen humanen oder murinen Feeder-Fibroblasten wurde RNA isoliert und die Expression der humanen IL-18-Rezeptoren α und β über RT-PCR nachgewiesen. Zum Vergleich der cDNA-Mengen ist die Amplifikation des GAPDH-Transkriptes gezeigt (Pos.: RNA von HaCaT/HDFi-Cokulturen).

nachweisbar sind. Das Vorliegen der funktionell aktiven Rezeptor-Proteine kann nicht nachgewiesen werden, da die Proteinkonzentrationen in den Zellysaten unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Antikörper liegt. Dies ist möglicherweise auf eine unzureichende Mobilisierung der Rezeptoren aus der Plasmamembran während der Lyse der Zellen zurückzuführen.

Die beschriebenen Expressionsmuster von IL-18 und seinen Rezeptoren in Submerskulturen können auch in *in vitro*-Epithelien gezeigt werden. In organotypischen Cokulturen ist unabhängig von Spezies und Genotyp der in das Gel eingebetteten Fibroblasten eine starke IL-18-Immunreaktivität im Epidermisäquivalent sichtbar. Die Fibroblasten weisen dagegen kein IL-18-Signal auf (vgl. Abb. 4.13). In homologen Cokulturen humaner Keratinozyten und humaner Fibroblasten ist die Signalintensität im *Stratum basale* am höchsten, was in Übereinstimmung mit Literaturdaten steht, die eine vorwiegend basale Expression von IL-18 *in vivo* und *in vitro* zeigen (Koizumi et al., 2001; Ohta et al., 2001). Die Verwendung muriner Fibroblasten im Dermis-Äquivalent führt allerdings zu einer gleichmäßigen Expression von IL-18 in allen Strata des Epithels (vgl. Abb. 4.13). IL-18 wird auch in Cokulturen humaner Keratinozyten mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten exprimiert, wobei anhand der Immunfluoreszenz nicht ersichtlich ist, ob die Expression hier geringer ist als in Epithelien auf Dermisäquivalenten mit *wt*-Fibroblasten. Der verwendete Antikörper gegen IL-18 erkennt im Immunoblot lediglich ein Protein von ca. 20 kDa und ist damit spezifisch für IL-18 (Daten nicht gezeigt). Die Speziespezifität wurde nicht untersucht.

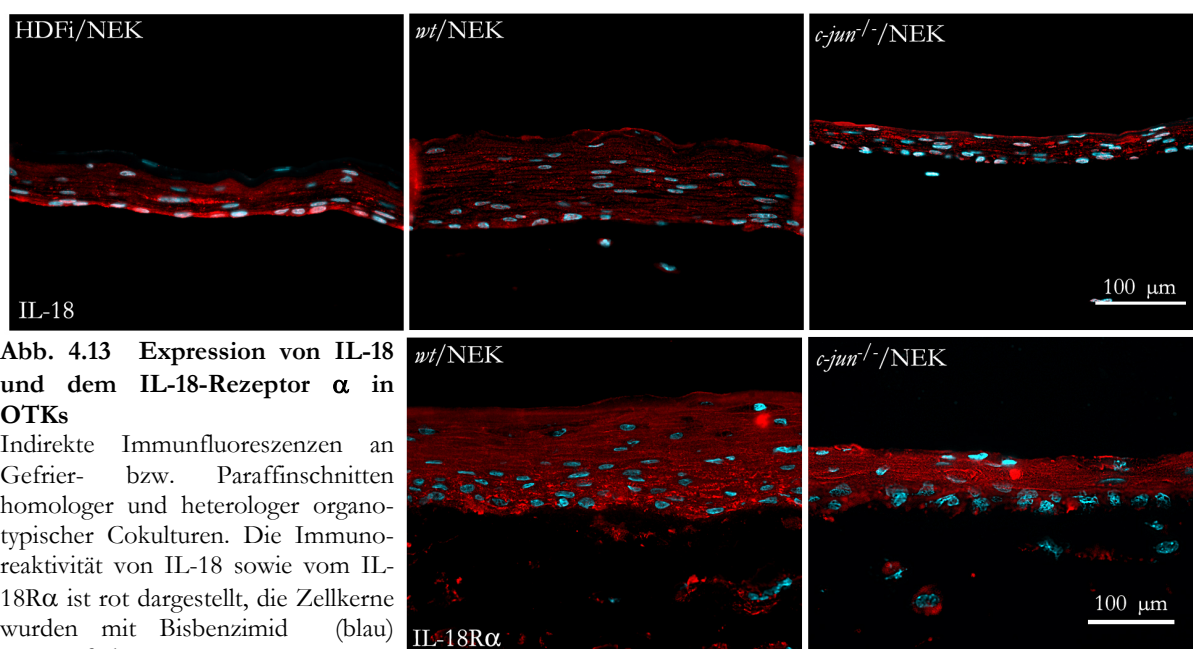


Abb. 4.13 Expression von IL-18 und dem IL-18-Rezeptor α in OTKs

Indirekte Immunfluoreszenzen an Gefrier- bzw. Paraffinschnitten homologer und heterologer organotypischer Cokulturen. Die Immunreaktivität von IL-18 sowie vom IL-18R α ist rot dargestellt, die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid (blau) gegengefärbt.

Die Expression der ligandbindenden α -Untereinheit des IL-18-Rezeptors ist in *in vitro*-Epithelien vergleichbar mit der Expression *in vivo* (Koizumi et al., 2001). Die IL-18-Rezeptor- α -Immunreaktivität in der Epidermis ist dabei teilweise membranständig, teilweise allerdings auch

im Zytosol sichtbar (vgl. Abb. 4.13). Da der verwendete humanspezifische Antikörper mit dem murinen Rezeptorprotein kreuzreagiert, sind auch die murinen Fibroblasten im Dermisäquivalent angefärbt. Der IL-18-Rezeptor α wird also in *in vitro*-Epithelien von Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert. Die Präsenz der β -Untereinheit des IL-18-Rezeptors konnte nicht bestätigt werden, da die verfügbaren Antikörper nicht für die indirekte Immunfluoreszenz geeignet sind.

In submersen sowie organotypischen Cokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten wird IL-18 somit von den Keratinozyten produziert, während in Fibroblasten die Transkription des *il-18*-Genes nicht nachweisbar ist. Die Transkripte beider Untereinheiten des IL-18-Rezeptors sind in Keratinozyten und Fibroblasten vorhanden, wobei die Präsenz des IL-18-Rezeptor- α -Proteins auch in organotypischer Cokultur in Keratinozyten und Fibroblasten gezeigt werden konnte. Von den Keratinozyten sezerniertes IL-18 könnte damit in Cokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten autokrin das Verhalten der Keratinozyten selbst bzw. parakrin das der Fibroblasten beeinflussen.

4.4.2 Regulation der IL-18-Expression durch FGF-7 und GM-CSF

Analysen der Genexpression in Keratinozyten unter Einfluss von FGF-7 oder GM-CSF haben eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des *il-18*-Genes gezeigt (siehe Abb. 4.6). Der Einfluss der beiden Faktoren auf die Expression von IL-18 wird im folgenden näher charakterisiert.

Wird FGF-7 zu Cokulturen von Keratinozyten und postmitotischen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten zugegeben, so ist nach 4 bis 6 Stunden eine Erhöhung der Transkription von *il-18* zu erkennen. Die Menge an Transkript bleibt bis zu 12 Stunden stabil und nimmt anschließend wieder ab. Die Applikation von GM-CSF resultiert ebenfalls in einer Verstärkung der *il-18*-Transkription, die nach 4 bis 6 Stunden sichtbar ist, allerdings weniger lang anhält (vgl. Abb. 4.14).

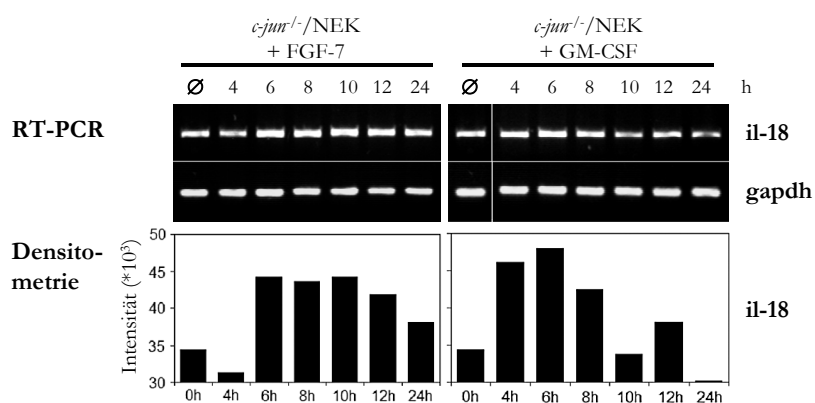


Abb. 4.14 Induktion der IL-18-mRNA durch FGF-7 bzw. GM-CSF

Cokulturen von humanen Keratinozyten und postmitotischen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wurden bis zu 24h mit FGF-7 (10 ng/ml) oder GM-CSF (100 ng/ml) behandelt. Aus der Gesamt-RNA der Kultur wurde anschließend das humane IL-18-Transkript amplifiziert. Die Amplifikation von GAPDH dient zur Kontrolle der für die RT-PCR eingesetzten RNA-Mengen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

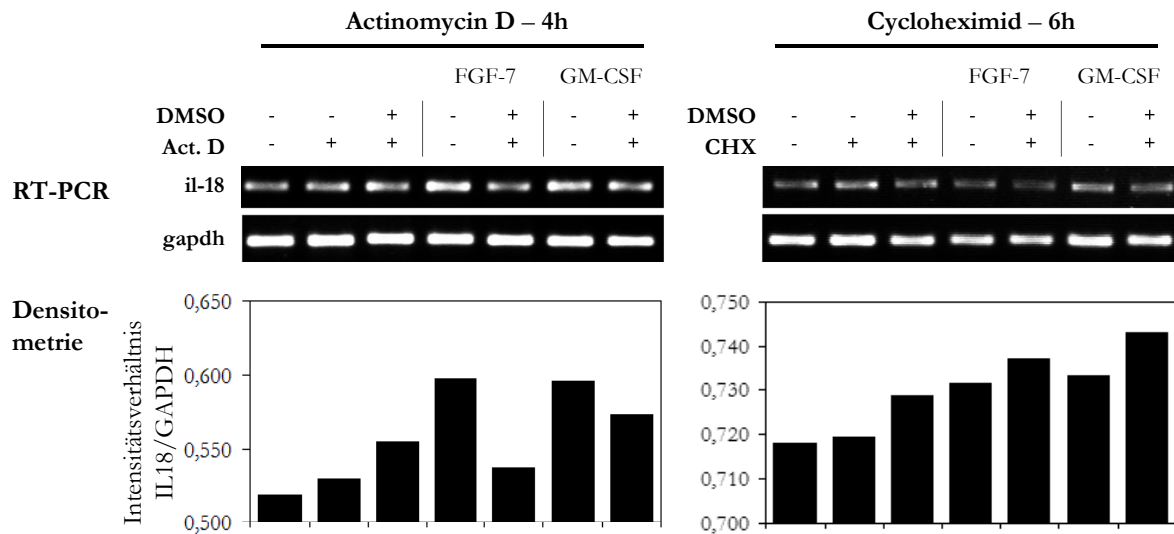


Abb. 4.15 Induktion der IL-18-mRNA unter Actinomycin D/Cycloheximid-Einfluss

Cokulturen von Keratinozyten und postmitotischen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wurden mit FGF-7 (10 ng/ml) bzw. GM-CSF (100 ng/ml) 4 h bzw. 6 h in An- oder Abwesenheit von Actinomycin D (1 µg/ml) bzw. Cycloheximid (10 µg/ml) kultiviert. Da beide Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde jeweils eine Kultur mit der entsprechenden Konzentration an DMSO versetzt. Aus der Gesamt-RNA wurden die Transkripte für IL-18 und GAPDH amplifiziert.

Die Erhöhung der Menge an IL-18-Transkripten in den Keratinozyten ist sowohl bei Applikation von FGF-7 als auch bei Zugabe von GM-CSF auf eine direkte Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des *il-18*-Genes zurückzuführen. Die Präsenz von Actinomycin D, einem Inhibitor der eukaryotischen Transkription, führt zu einer Hemmung dieser Wirkung von FGF-7 und GM-CSF, die Blockierung der Translation mit Hilfe von Cycloheximid beeinflusst die Wirkung von FGF-7 und GM-CSF dagegen nicht (vgl. Abb. 4.15).

Das erhöhte Auftreten der IL-18-mRNA ist auch im Verlauf der Wundheilung zu beobachten. In Maushaut-Wunden wird IL-18 nach 3 bis 5 Tagen nach Verletzung verstärkt transkribiert. Die Expression des Proteins in Keratinozyten am Wundrand von 3 bis 5 Tage alten Wunden ist bereits gezeigt worden (Kampfer et al., 1999). Auffallend ist, dass die Induktion von IL-18 im Anschluss an die Erhöhung der FGF-7- und GM-CSF-Transkription erfolgt, was darauf hindeutet, dass auch *in vivo* eine Regulation der IL-18-Expression durch die beiden Faktoren gegeben sein kann (vgl. Abb. 4.16).

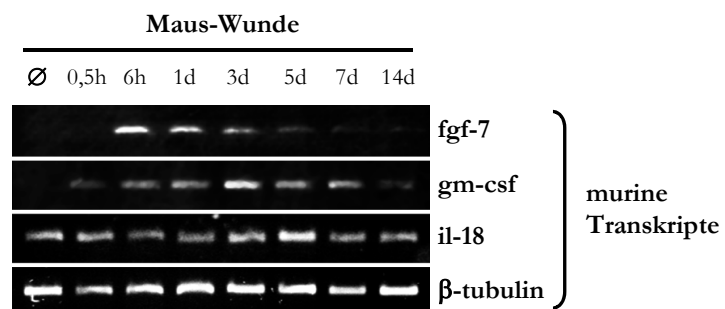


Abb. 4.16 mIL-18-Expression im Verlauf der Wundheilung

Aus Wunden in der Rückenhaut von Mäusen wurde Gesamt-RNA isoliert und die Transkripte für mFGF-7, mGM-CSF und mIL-18 amplifiziert (die Wund-RNA wurde von S. Werner, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt). Als interner Standard wird die mβ-Tubulin-mRNA verwendet.

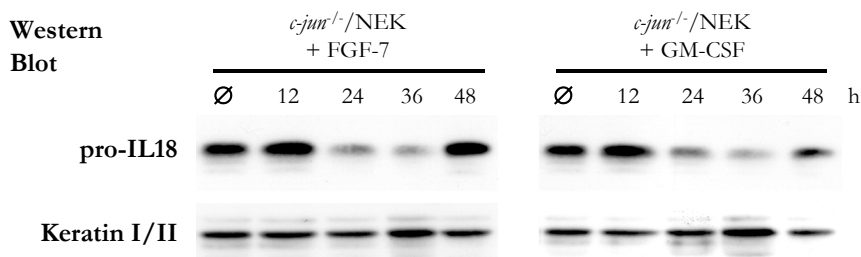


Abb. 4.17 Expression des hIL-18-pro-Proteins in Cokulturen unter Einfluß von FGF-7 oder GM-CSF

Aus zytosolischen Extrakten von Keratinozyten/*c-jun*^{-/-}-Fibroblasten-Cokulturen unter Einfluß von FGF-7 (10 ng/ml) oder GM-CSF (100 ng/ml) wurde pro-IL18 durch Western Blot quantifiziert. Zur Kontrolle gleicher Ausgangsmengen an Protein wurde die Membran nach dem Nachweis von pro-IL18 mit spezifischen Antikörpern gegen Keratin Typ I und II hybridisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

In vitro verstärken FGF-7 und GM-CSF die Transkription des *il-18*-Genes in Keratinozyten binnen 4 bis 6 Stunden nach Applikation der Faktoren. Bereits 12 Stunden nach der Faktoraddition lässt sich eine Erhöhung der Konzentration des humanen pro-Proteins im Zytoplasma der Zellen nachweisen. Im weiteren Verlauf der Stimulation sinkt die Menge an zytosolischem pro-IL18 stark ab, was auf eine verstärkte Prozessierung und Sezernierung des aktiven Proteins hindeutet. Binnen 48 h nach Faktorzugabe kehrt die pro-IL18-Konzentration auf das Niveau der konstitutiven Expression zurück (vgl. Abb. 4.17).

In den Zellkulturüberständen der behandelten Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kann nach 48 Stunden eine erhöhte Konzentration an sezerniertem humanem IL-18 gemessen werden (vgl. Abb. 4.18).

IL-18 wurde ursprünglich aufgrund seiner positiven Wirkung auf die Expression von Interferon γ beschrieben (Ushio et al., 1996, vgl. Abb. 4.9). Auch wenn gezeigt werden konnte, dass humane Keratinozyten während allergischer Hautreaktionen *in vivo* in der Lage sind, das Gen für IFN γ zu transkribieren (Howie et al., 1996), so wurde in humanen Wunden jedoch kein IFN γ -Transkript gefunden (Kampfer et al., 2000). Um auszuschließen, dass eventuelle Wirkungen von IL-18 auf Keratinozyten oder Fibroblasten indirekt über die Produktion von IFN γ vermittelt werden, wird die Konzentration an IFN γ vor und nach der Behandlung der Kulturen mit FGF-7 bzw. GM-CSF quantifiziert. Trotz der Synthese und Freisetzung von IL-18 durch die Keratinozyten

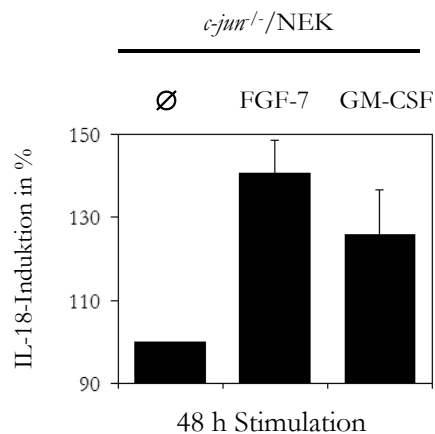


Abb. 4.18 Freisetzung von humanem IL-18

In Medien von Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten unter Einfluß von FGF-7 (10 ng/ml) oder GM-CSF (100 ng/ml) wurde der Gehalt an IL-18 durch ELISA bestimmt. Gezeigt ist die prozentuale Steigerung der IL-18-Konzentration durch Steigerung der IL-18-Konzentration durch FGF-7 und GM-CSF (bezogen auf die Zellzahl), im Mittel aus 4 unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen.

kann IFN γ in den Kulturüberständen nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.19). Primäre humane T-Zellen dagegen synthetisieren konstitutiv IFN γ , und diese Expression lässt sich durch Zugabe von IL-18 stark erhöhen.

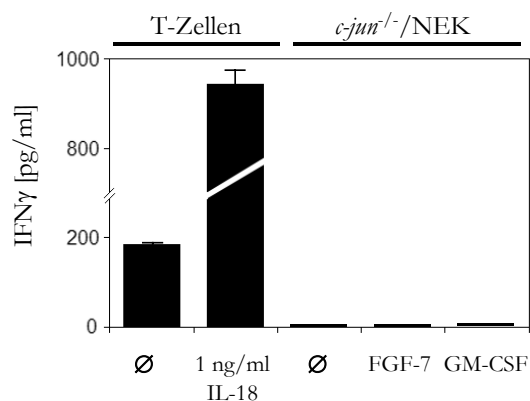


Abb. 4.19 Expression von Interferon γ

In konditionierten Medien von heterologen Keratinozyten/*c-jun*^{-/-}-Fibroblasten-Cokulturen, die 48 h mit FGF-7 (10 ng/ml) bzw. GM-CSF (100 ng/ml) behandelt wurden, wurde IFN γ durch ELISA nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die IFN γ -Freisetzung durch T-Zellen vor und nach der Stimulation mit IL-18 quantifiziert (die T-Zellen wurden von C. Fritsch, Abt. „Immungenetik“, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche mit Doppelbestimmungen.

Zusammengefasst führt die Applikation von FGF-7 oder GM-CSF zu Cokulturen humaner Keratinozyten und muriner *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des Genes in Keratinozyten, das humanes IL-18 codiert. Diese Induktion ist nicht abhängig von der Fähigkeit der Zellen zur Proteinsynthese, wird allerdings durch die Hemmung der mRNA-Synthese blockiert. Im Anschluss an die verstärkte Transkription tritt eine erhöhte Konzentration des pro-Proteins im Zytoplasma auf, gefolgt von einer Steigerung der Konzentration an prozessiertem IL-18 im Kulturmedium. Das freigesetzte IL-18 löst jedoch keine Produktion von IFN γ in den Keratinozyten in Cokultur aus.

Im Anschluss soll die Bedeutung der durch FGF-7 und GM-CSF erhöhten IL-18-Präsenz in den Cokulturen analysiert werden. Da beide Zelltypen die Transkripte für die IL-18-Rezeptor-Untereinheiten exprimieren, und zumindest der IL-18-Rezeptor α auch auf der Oberfläche der Zellen präsentiert wird, könnte das von Keratinozyten freigesetzte IL-18 autokrin auf Keratinozyten und parakrin auf Fibroblasten einwirken. Neben der Charakterisierung der Wirkung von IL-18 in Submerskulturen ist dabei die Rolle von IL-18 in *in vitro*-Epithelien von Interesse, insbesondere im Hinblick auf seine potentielle Funktion als Mediator der Wirkungen von FGF-7 und GM-CSF.

4.4.3 Wirkung von IL-18 auf Keratinozyten und Fibroblasten

IL-18 in Submerskulturen

Um die Funktion von IL-18 in der Regulation des Wachstums und der Differenzierung von Keratinozyten und Fibroblasten zu charakterisieren, wurden zunächst Monokulturen der beiden Zelltypen mit rekombinantem humanen IL-18 behandelt. Primäre humane Keratinozyten werden durch die Applikation von IL-18 in ihrer Proliferation stimuliert, was zu einer deutlichen Erhöhung der Zellzahl in den behandelten Kulturen gegenüber der Kontrolle führt (vgl. Abb.

4.20). Die Zugabe von rekombinantem IL-18 zu Monokulturen primärer humaner Fibroblasten hat dagegen keinen signifikanten Effekt (Daten nicht gezeigt). In Cokulturen humaner Keratinozyten mit murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kann ebenfalls eine positive Wirkung von IL-18 auf die Proliferation der Keratinozyten beobachtet werden (vgl. Abb. 4.21).

Abb. 4.20 IL-18 induziert die Proliferation von Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten wurden in Basalmedium (KBM), Vollmedium (KGM) oder Basalmedium mit 10 bzw. 50 ng/ml IL-18 kultiviert. Nach 2, 4 und 6 Tagen Behandlung wurden die Zellzahlen der Kulturen bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche, wobei die Zellzahlen jeweils Mittelwerte von Triplikaten darstellen.

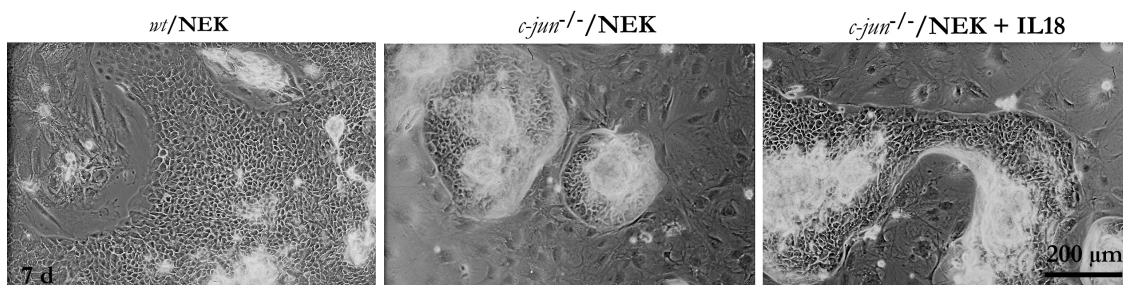
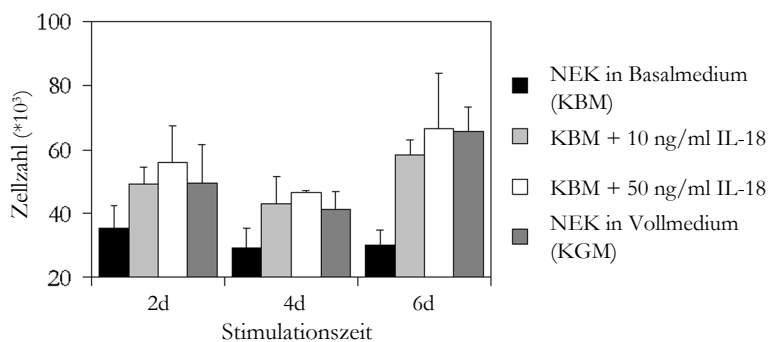


Abb. 4.21 IL-18 induziert die Proliferation von Keratinozyten in heterologen Cokulturen

Humane Keratinozyten auf einem Feeder-Layer aus *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wurden 7 Tage unter Anwesenheit von 10 ng/ml IL-18 kultiviert. Als Positivkontrolle dienten Keratinozyten in Cokultur mit *wt*-Fibroblasten. Nach 7 Tagen wurden die Kulturen fotografiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von 2 unabhängigen Versuchen.

Die Zugabe von IL-18 hat auf der anderen Seite auch eine positive Wirkung auf die Migration der Keratinozyten in Cokultur mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten. Durch Abkratzen der Keratinozyten entstandene Lücken in den Zellinseln werden unter Einfluss von IL-18 deutlich schneller geschlossen als die Lücken in den entsprechenden Kontrollkulturen (vgl. Abb. 4.22). Bereits nach 2 Stunden beginnen die Keratinozyten unter Einfluss von IL-18 mit der Einwanderung in das „Wundbett“, wohingegen in unbehandelten Kulturen zu diesem Zeitpunkt noch keine Migration sichtbar ist. Durch den kumulativen Effekt der verstärkten Migration und der nach 10 bis 24 Stunden deutlich werdenden mitogenen Wirkung von IL-18 ist nach 24 Stunden ein hoher Anteil an Lücken vollständig oder nahezu vollständig geschlossen. Auch dies wird in unbehandelten Kulturen nicht erreicht. In Cokulturen humaner Keratinozyten mit *wt*-Fibroblasten ist eine Wanderung der Keratinozyten nach 5 Stunden sichtbar. Auch hier wird ein Teil der Lücken vollständig geschlossen, der allerdings geringer ist als in *c-jun*^{-/-}/NEK-Cokulturen unter Einfluss von IL-18.

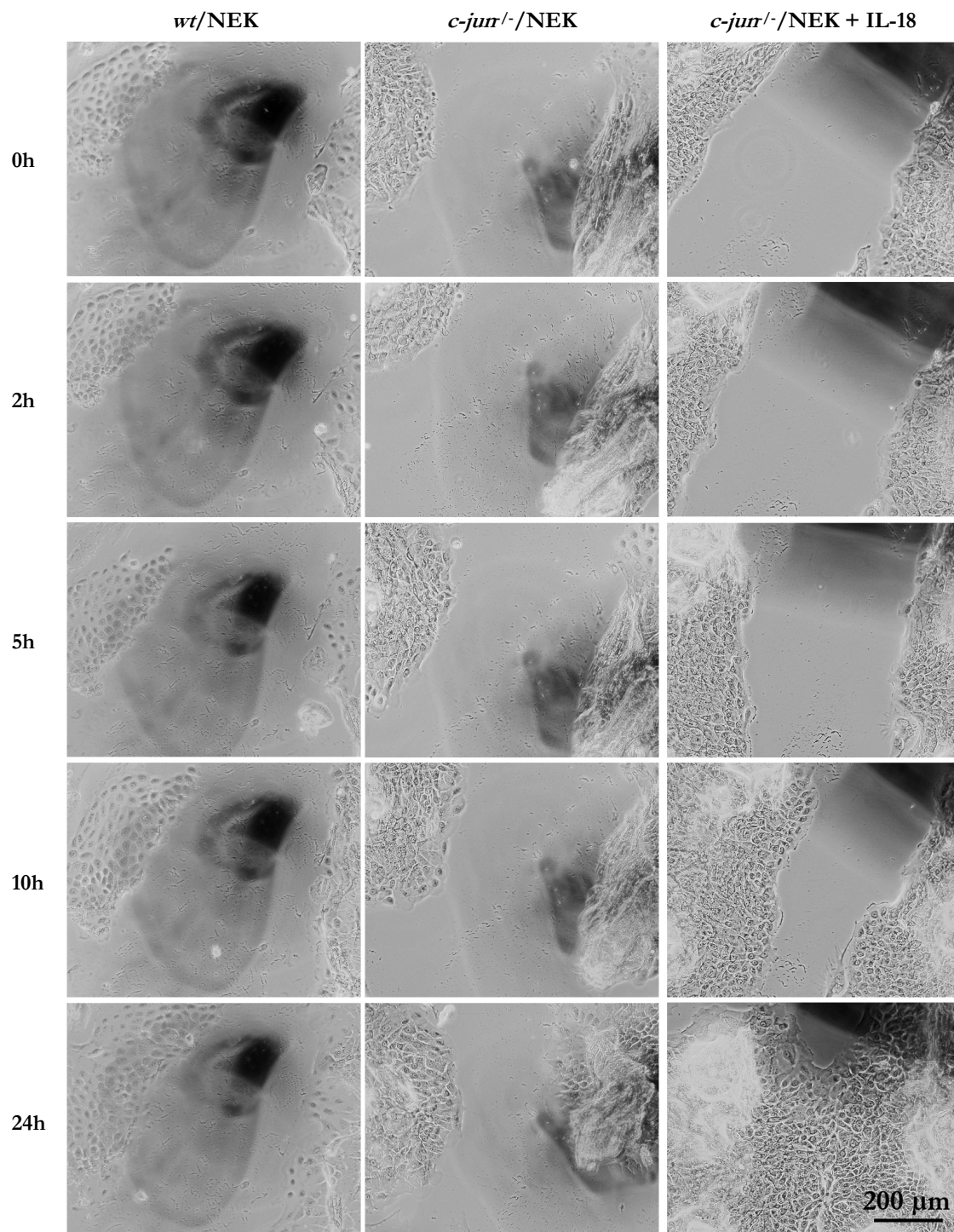


Abb. 4.22 Stimulation der Keratinozyten-Migration durch IL-18

Cokulturen humaner Keratinozyten mit *wt*- oder *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wurden 6 Tage vorkultiviert. Aus dem Zellrasen wurden Streifen von Zellen mit Hilfe eines Zellschabers entfernt und die Besiedlung der Lücken an mindestens 4 Stellen je Versuchbedingung dokumentiert (*wt*/NEK; *c-jun*^{-/-}/NEK; *c-jun*^{-/-}/NEK + 50 ng/ml IL-18). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.

IL-18 in *in vitro*-Epithelien

Die Applikation von rekombinantem humanem IL-18 stimuliert in Submerskultur die Proliferation und Migration von Keratinozyten. In organotypischen Cokulturen humaner Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten bildet sich in Anwesenheit von IL-18 ein deutlich besser entwickeltes Epithel aus (vgl. Abb. 4.23), das sich von den Kontrollepithelien hauptsächlich durch eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Zellschichten abhebt. In Cokulturen muriner *wt*-Fibroblasten mit humanen Keratinozyten kann dagegen keine wesentliche Veränderung nach Applikation von IL-18 beobachtet werden (vgl. Abb. 4.23). Die Präsenz von FGF-7 und GM-CSF, sowie anderer Stimuli, die in *wt*-Fibroblasten im Gegensatz zu *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten exprimiert werden, sorgen dafür, dass die mitogene Wirkung von IL-18 in diesen Kulturen keine zusätzliche Steigerung der Zell-Proliferation bewirken kann.

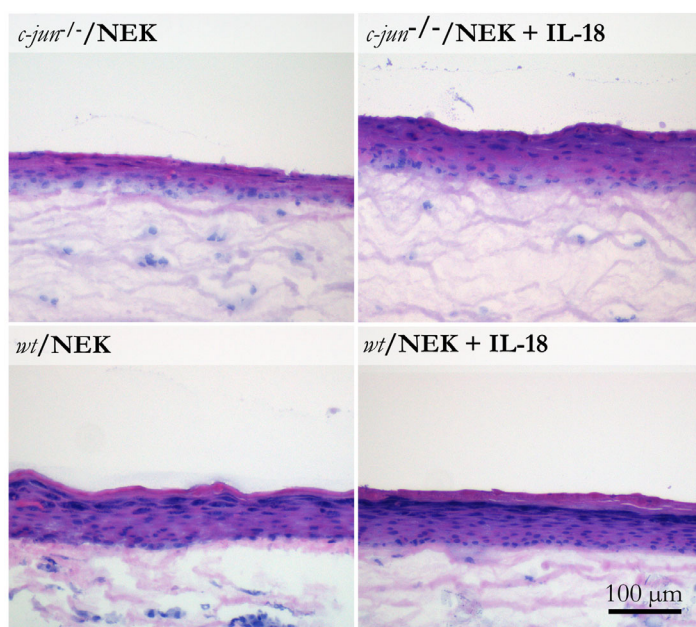


Abb. 4.23 Organotypische Cokulturen humaner Keratinozyten mit *c-jun*^{-/-}- bzw. *wt*-Fibroblasten unter Einfluss von IL-18

Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-}- oder *wt*-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes IL-18 (50 ng/ml) zugesetzt und mit dem Medium alle 2 Tage erneuert. Nach 9 Tagen wurden die Kulturen entnommen, die Epithelien eingefroren und die Gefrierschnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die Expression von Markerproteinen der Keratinozyten-Differenzierung, wie Cytokeratin 1 und 10 sowie des Hüllproteins Filaggrin, bleibt unverändert (vgl. Abb. 4.24), ebenso wie die Anzahl und Verteilung der apoptotischen Zellen im Epithel (Daten nicht gezeigt). Neben einem sehr geringen Anteil basaler Zellen, in denen eine Fragmentierung der DNA nachweisbar ist, sind Signal-positive Zellen hauptsächlich suprabasal lokalisiert, wo DNA-Fragmentierung im Verlauf der Differenzierung auftritt. Proliferierende Keratinozyten sind durch BrdU-Einbau in die DNA fast ausschließlich im *Stratum basale* nachweisbar (vgl. 4.24). Nach 9 Tagen Standzeit der Kulturen ist ihr Anteil in den mit IL-18-behandelten organotypischen Kulturen mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten im Durchschnitt noch doppelt so hoch wie in den Kontrollepithelien.

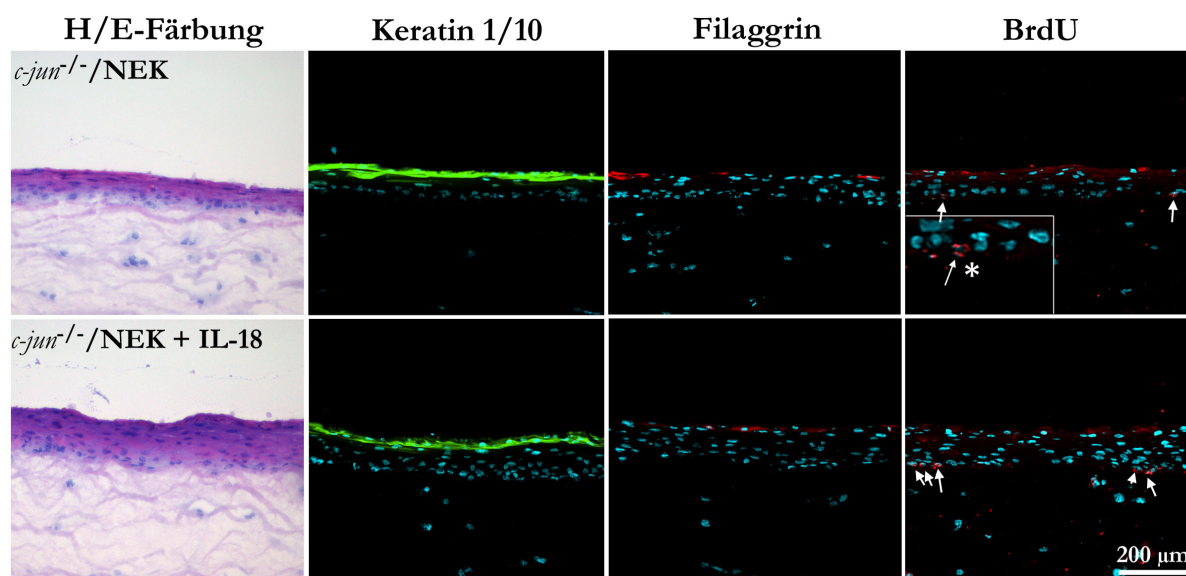


Abb. 4.24 Organotypische Cokulturen humaner Keratinozyten mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten unter Einfluss von IL-18

Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes IL-18 (50 ng/ml) zugesetzt und mit dem Medium alle 2 Tage erneuert. Nach 9 Tagen wurden die Kulturen entnommen und die Epithelien eingefroren, wobei den Kulturen 24h vor der Entnahme BrdU zugesetzt wurde. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden Markerproteine des Differenzierungsprozesses sowie inkorporiertes BrdU nachgewiesen (Keratin 1/10: grün; Filaggrin: rot; BrdU: rot; Zellkerne mit Bisbenzimid gegengefärbt). BrdU-positive Kerne sind durch Pfeile gekennzeichnet (*: Ausschnittvergrößerung zur Demonstration eines BrdU-positiven Zellkerns; die BrdU-Markierung ist assoziiert mit einem Bisbenzimid-gefärbten Kern, die Immunoreaktivität in den oberen Schichten des Epithels dagegen nicht). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

IL-18 fördert den Epithelaufbau in organotypischen Cokulturen humaner Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten, wahrscheinlich hauptsächlich durch eine Stimulation der Proliferation und Migration der Keratinozyten, wie sie in Submerskulturen bereits gezeigt werden konnte. Die Applikation von IL-18 hat in diesen Kulturen keinen Einfluss auf den Differenzierungsprozess. In Anwesenheit von FGF-7, GM-CSF und anderen Faktoren, die von *wt*-Fibroblasten im Gegensatz zu *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten bereitgestellt werden können, scheint IL-18 die Differenzierung der Keratinozyten etwas zu verzögern.

In Cokulturen humaner Keratinozyten mit murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wirkt IL-18, durch die Applikation von FGF-7 oder GM-CSF induziert, somit direkt mitogen und motogen auf die Keratinozyten. Es bleibt die Frage zu klären, inwieweit die Induktion von IL-18 und seine Wirkung die Effekte von FGF-7 und GM-CSF auf die Epithelialisierung vermitteln oder modulieren.

4.4.4 Bedeutung von IL-18 für die Epithelbildung unter Einfluss von FGF-7

Keratinozyten, die submers in Cokultur mit *c-jun*^{-/-}-Feeder-Fibroblasten kultiviert werden, bilden aufgrund reduzierter Stimuli von den Fibroblasten nur kleine Zellinseln aus, die durch den

Differenzierungsprozess der Keratinozyten eine Art der Verhornung aufweisen. Die Zugabe von FGF-7 stimuliert die Proliferation der Keratinozyten, was sich in einer deutlichen Vergrößerung der Zellinseln bei geringerer Verhornung äußert (vgl. Abb. 4.25).

Die Neutralisierung von IL-18 bei gleichzeitiger Applikation von FGF-7 führt lediglich zu einer unwesentlichen Reduktion der Proliferation, was darauf hindeutet, dass die Anwesenheit von funktionell aktivem IL-18 für die mitogene Wirkung von FGF-7 auf Keratinozyten nicht erforderlich ist und lediglich als nachgeschaltetes, unterstützendes Signal wirkt (vgl. Abb. 4.25).

Die mitogene Wirkung von FGF-7 ist in organo-

typischer Cokultur noch deutlicher zu beobachten, da die Zugabe von FGF-7 zu Epithelien auf *c-jun*^{-/-}-Dermisäquivalenten eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Zellschichten im Epithel bewirkt. FGF-7 steigert die Proliferation der Keratinozyten, was zu einer erhöhten Anzahl von Zellen in der Basalschicht führt, die BrdU inkorporieren. Gleichzeitig verzögert sich der Differenzierungsprozess, so dass hyperplastische Epithelien entstehen. Insbesondere die Expression der frühen Differenzierungsmarker Cytokeratin 1 und 10 verschiebt sich zu den höheren suprabasalen Strata (vgl. Abb. 4.27). Die Neutralisierung von IL-18 in diesen Kulturen führt lediglich zu einer geringfügigen Reduktion der Keratinozyten-Proliferation, was auch bei Keratinozyten auf Dermis-Äquivalenten mit *wt*-Fibroblasten beobachtet werden kann (vgl. Abb. 4.26). Der Differenzierungsprozess wird durch die Neutralisierung von IL-18 in keinem Fall beeinflusst (vgl. Abb. 4.27). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in Submerskultur (vgl. Abb. 4.25) ist die mitogene Wirkung von FGF-7 in organotypischer Kultur ebenfalls weitgehend unabhängig von der Anwesenheit von funktionell aktivem IL-18. FGF-7 beeinflusst damit das Verhalten der Keratinozyten direkt und seine Wirkung wird durch die Induktion von IL-18 offenbar nur geringfügig verstärkt.

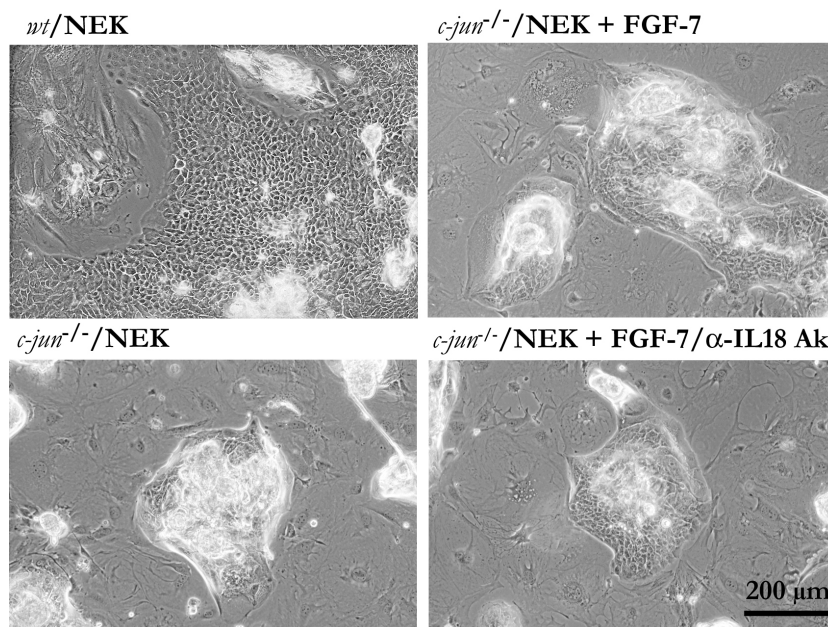


Abb. 4.25 Neutralisierung von IL-18 in FGF-7-stimulierten Cokulturen

Humane Keratinozyten auf einem Feeder-Layer aus *c-jun*^{-/-} bzw. *wt*-Fibroblasten wurden 7 Tage unter Anwesenheit von FGF-7 bzw. FGF-7 und neutralisierenden Antikörpern gegen humanes IL-18 kultiviert und anschließend fotografiert.

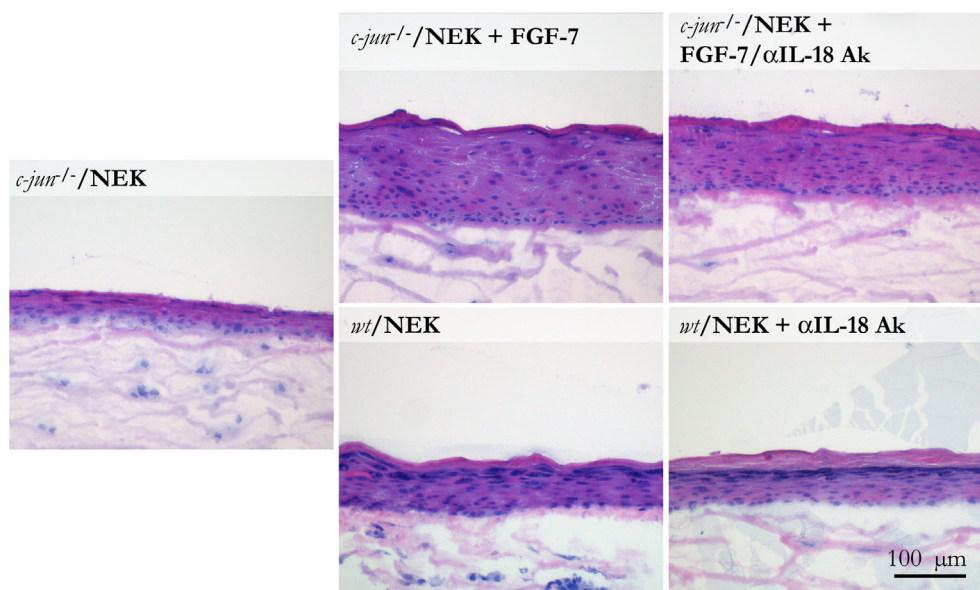


Abb. 4.26 Neutralisierung von IL-18 in OTKs humaner Keratinozyten mit *c-jun*^{-/-}- bzw. *wt*-Fibroblasten
Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-}- bzw. *wt*-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes FGF-7 (10 ng/ml), ein neutralisierender Antikörper gegen IL-18 (1 μg/ml) bzw. Kombinationen von Faktor und Antikörper zugesetzt und mit dem Medium alle 2 Tage erneuert. Nach 9 Tagen wurden die Kulturen entnommen, die Epithelien fixiert und die Gefrierschnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

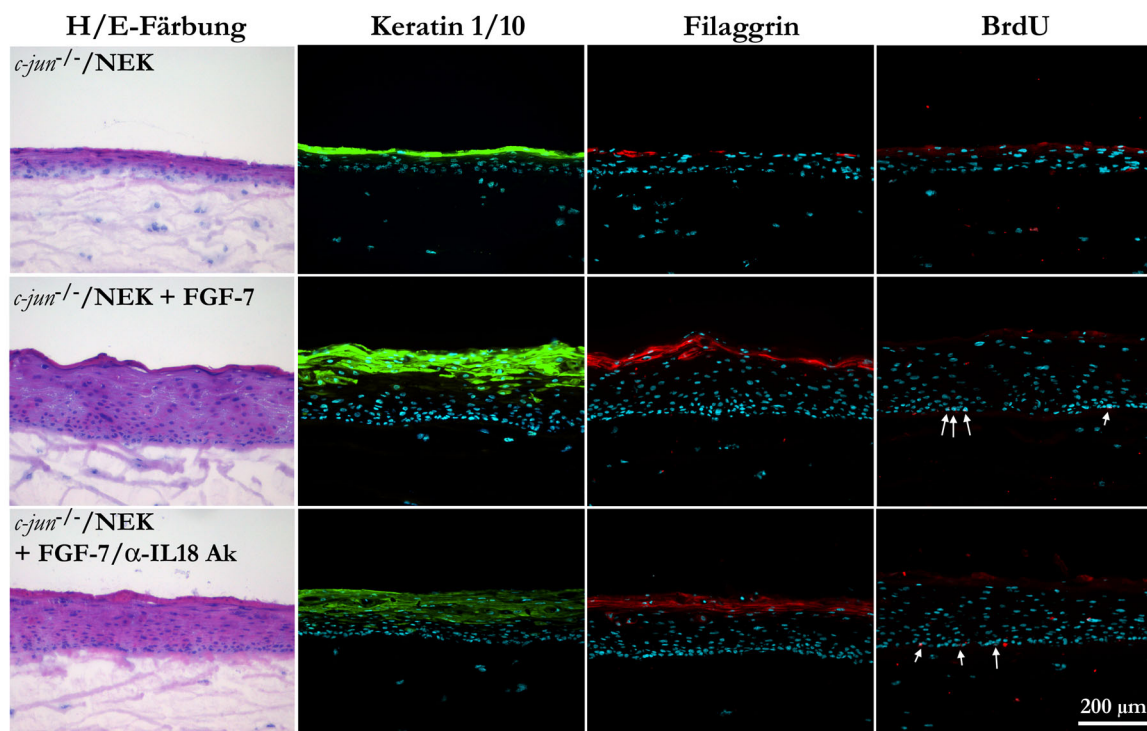


Abb. 4.27 Neutralisierung von IL-18 in organotypischen Kokulturen unter FGF-7-Einfluss

Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes FGF-7 (10 ng/ml) bzw. FGF-7 in Kombination mit neutralisierenden Antikörpern gegen humanes IL-18 (1 μg/ml) zugesetzt und mit dem Medium alle 2 Tage erneuert. Den Kulturen wurde 24h vor der Ernte BrdU zugegeben und die Epithelien wurden nach 9 Tagen fixiert. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden Markerproteine des Differenzierungsprozesses sowie inkorporiertes BrdU nachgewiesen (Keratin 1/10: grün; Filaggrin: rot; BrdU: rot; Zellkerne mit Bisbenzimid gegengefärbt). BrdU-positive Kerne sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.4.5 Bedeutung von IL-18 für die Epithelbildung unter Einfluss von GM-CSF

In submerser Kokultur von Keratinozyten mit postmitotischen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten fördert GM-CSF, wie FGF-7, die Proliferation der Keratinozyten, wobei allerdings die Reaktion der Keratinozyten auf das Cytokin im Vergleich zu FGF-7 verzögert erfolgt. Die Wirkung von FGF-7 ist bereits nach 24 Stunden deutlich sichtbar (vgl. Abb. 4.1), wohingegen ein signifikanter Effekt von GM-CSF erst nach 4 Tagen Stimulation zu erkennen ist (vgl. Abb. 4.29). Wird GM-CSF in Kombination mit

einem neutralisierenden Antikörper gegen IL-18 appliziert, so wird die mitogene Wirkung von GM-CSF auf die Keratinozyten vollständig aufgehoben (vgl. Abb. 4.28). Eine Neutralisierung von IL-18 in Kokulturen von Keratinozyten mit *wt*-Fibroblasten bleibt dagegen ohne Wirkung (Daten nicht gezeigt). Der DNA-Gehalt und damit die Zellzahl der *c-jun*^{-/-}/NEK-Cokulturen sinkt bei Behandlung mit GM-CSF und dem IL-18-Antikörper unter das Niveau der unbehandelten Kokulturen ab (Abb. 4.29).

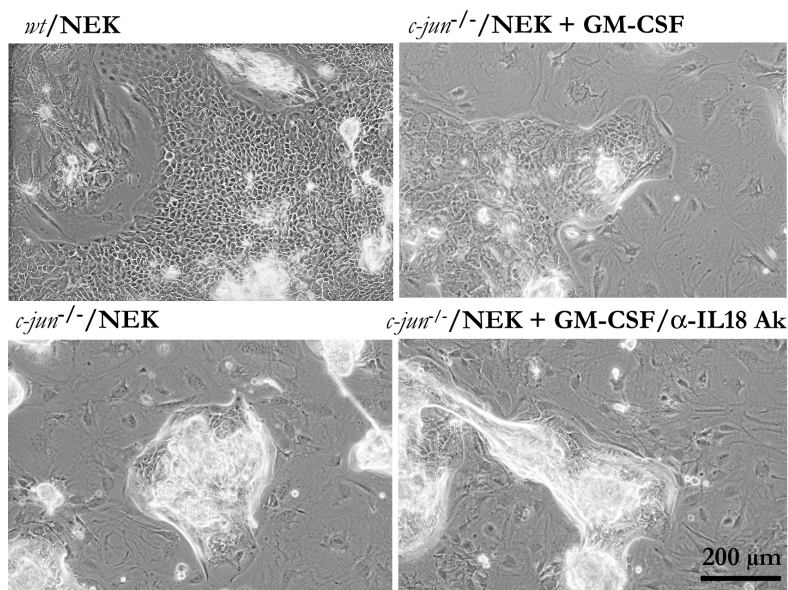


Abb. 4.28 Neutralisierung von IL-18 in GM-CSF-stimulierten Kokulturen

Humane Keratinozyten auf einem Feeder-Layer aus *c-jun*^{-/-} bzw. *wt*-Fibroblasten wurden 7 Tage unter Anwesenheit von GM-CSF (100 ng/ml) bzw. GM-CSF und neutralisierenden Antikörpern gegen humanes IL-18 (0,5 µg/ml) kultiviert und anschließend fotografiert.

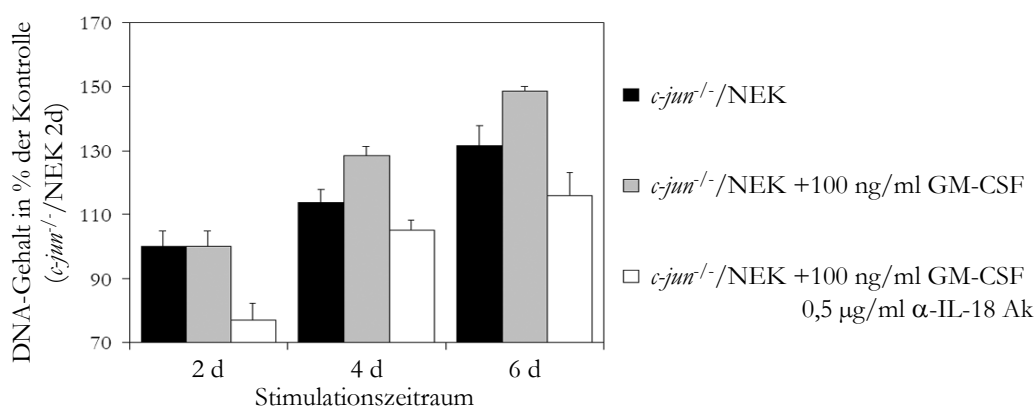


Abb. 4.29 Neutralisierung von IL-18 in Kokulturen in Anwesenheit von GM-CSF

Humane Keratinozyten auf einem Feeder-Layer aus *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten wurden bis zu 6 Tage unter Anwesenheit von GM-CSF bzw. GM-CSF und neutralisierenden Antikörpern gegen humanes IL-18 kultiviert. Die Antikörper und Faktoren wurden alle 2 Tage erneuert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die DNA-Gehalte der einzelnen Kulturen bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus 2 unabhängigen Versuchen, wobei die Einzelwerte Mittelwerte aus Triplikaten darstellen.

Daneben setzt der inhibitorische Effekt des IL-18-Antikörpers bereits nach 2 Tagen ein und kann damit früher als die mitogene Wirkung von GM-CSF beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass die konstitutive IL-18-Expression in Abwesenheit von GM-CSF ebenfalls zur Proliferation der Keratinozyten beiträgt. In den Submerskulturen ist demnach die Anwesenheit von funktionell aktivem IL-18 erforderlich zur Vermittlung des mitogenen Effekts von GM-CSF sowie zur Aufrechterhaltung der Keratinozyten-Proliferation in den Cokulturen mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten.

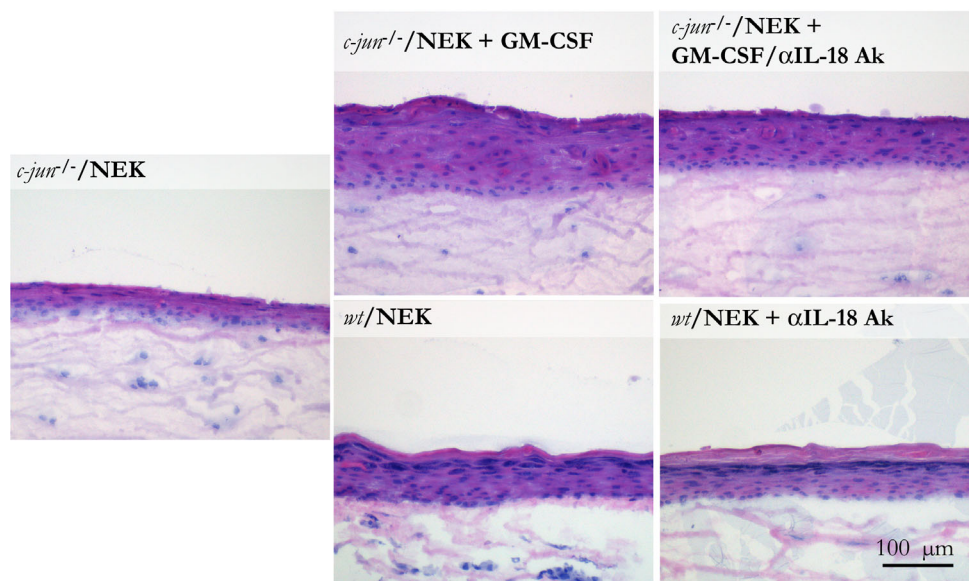


Abb. 4.30 Neutralisierung von IL-18 in organotypischen Cokulturen humaner Keratinozyten mit *c-jun*^{-/-}- bzw. *wt*-Fibroblasten

Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-} bzw. *wt*-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes GM-CSF (100 ng/ml), ein neutralisierender Antikörper gegen IL-18 (1 μg/ml) bzw. Kombinationen von Faktor und Antikörper zugesetzt und mit dem Medium alle 2 Tage erneuert. Nach 9 Tagen wurden die Kulturen entnommen, die Epithelien fixiert und die Gefrierschnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

In der organotypischen Cokultur bilden Keratinozyten auf Dermisäquivalenten mit eingebetteten *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten lediglich dünne Epithelien mit wenigen Zellschichten aus. Die Zugabe von GM-CSF stimuliert die Proliferation der Keratinozyten und damit die Epithelialisierung. Wie in submerser Cokultur, so führt auch in organotypischer Cokultur die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen humanes IL-18 zu einer Reduktion der Reaktion der Zellen auf appliziertes GM-CSF. In Kulturen von *wt*-Fibroblasten mit primären humanen Keratinozyten zeigt die Neutralisierung von IL-18 dagegen nur einen geringen Effekt. Die Epithelien der *c-jun*^{-/-}/NEK-Kulturen, denen sowohl GM-CSF als auch IL-18-Antikörper zugesetzt wurden, zeigen signifikant weniger Zellschichten als ausschließlich mit GM-CSF behandelte Kulturen. In Anzahl der Zellschichten und Verteilung der Differenzierungsmarker entsprechen sie den Kontrollkulturen von Keratinozyten mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten (vgl. Abb. 4.31).

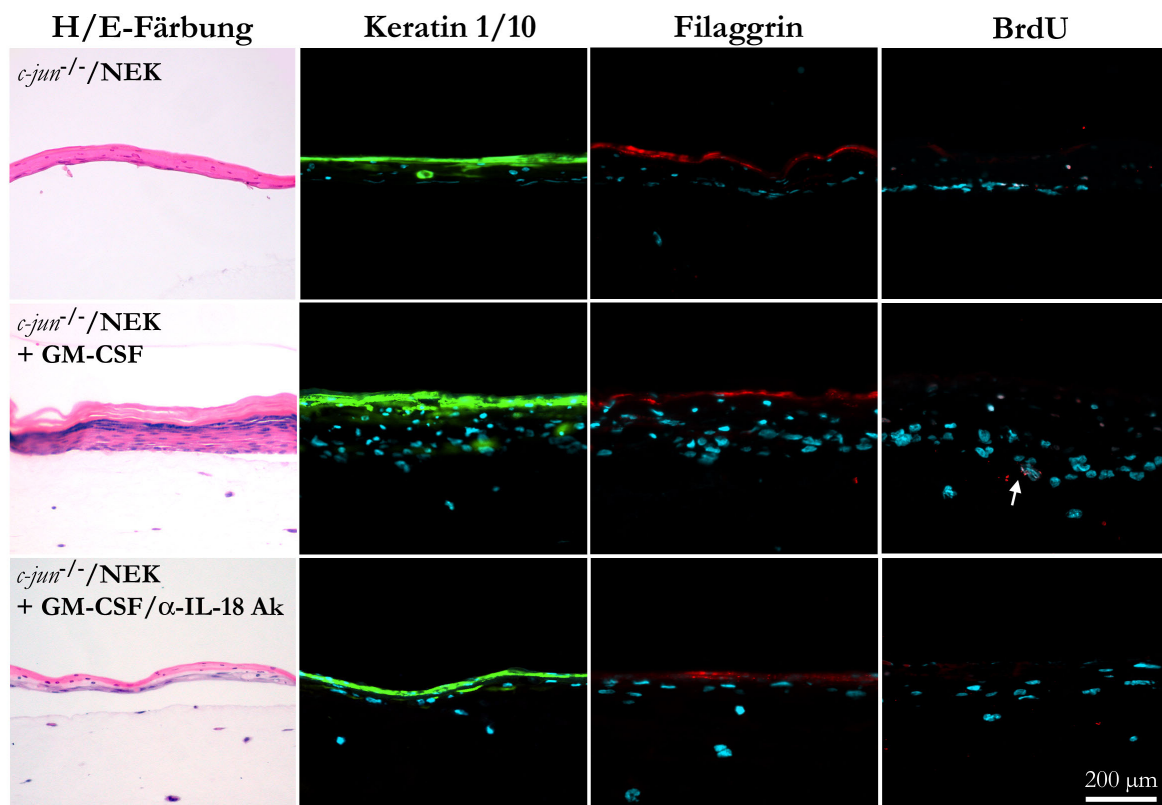


Abb. 4.31 Neutralisierung von IL-18 in organotypischen Kokulturen unter GM-CSF-Einfluss

Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes GM-CSF (100 ng/ml) bzw. GM-CSF in Kombination mit neutralisierenden Antikörpern gegen humanes IL-18 zugesetzt (1 μg/ml) und diese mit dem Medium alle 2 Tage erneuert. Nach 9 Tagen wurden die Kulturen entnommen und die Epithelien fixiert, wobei den Kulturen 24h vor der Entnahme BrdU zugesetzt wurde. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden Markerproteine des Differenzierungsprozesses sowie inkorporiertes BrdU nachgewiesen (Keratin 1/10: grün; Filaggrin: rot; BrdU: rot; Zellkerne mit Bisbenzimid gegengefärbt). BrdU-positive Kerne sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

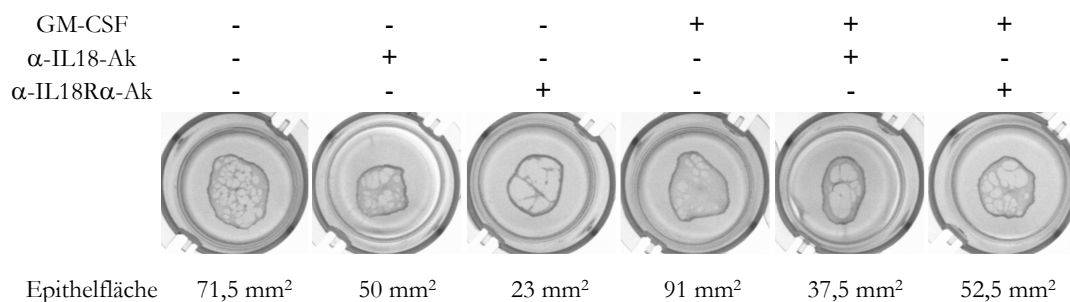


Abb. 4.32 Neutralisierung von IL-18 und IL-18-Rezeptor α in OTKs unter GM-CSF-Einfluss

Primäre humane Keratinozyten wurden luftexponiert auf Kollagengelen mit eingebetteten murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes GM-CSF (100 ng/ml), IL-18-Antikörper (1 mg/ml) oder Antikörper gegen den IL-18-Rezeptor α (2 μg/ml) oder Kombinationen aus Faktor und Antikörper zugesetzt. Nach 9 Tagen wurden die Kulturen entnommen, auf dem Filter fotografiert und die mit Epithel bedeckte Fläche ausgemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.

Die Neutralisierung der Wirkung von IL-18 mit Hilfe eines Antikörpers gegen den IL-18-Rezeptor α führt in Gegenwart von GM-CSF ebenfalls zu einer Hemmung der mitotischen Wirkung von GM-CSF und somit zu hypoplastischen, teilweise sogar lückenhaften Epithelien (vgl. Abb. 4.32).

Durch die Zugabe von GM-CSF induziertes IL-18 vermittelt damit in Submers- und organotypischer Kultur den mitogenen Effekt von GM-CSF, was auch eine Erklärung für die verzögerte Reaktion der Keratinozyten auf eine Stimulation mit diesem Cytokin ist. Im Gegensatz dazu wirkt FGF-7 direkt, was in einer deutlich schnelleren Reaktion der Zellen auf den Wachstumsfaktor sichtbar wird.

IL-18 stimuliert somit die Proliferation und Migration von primären humanen Keratinozyten und hat einen deutlich positiven Einfluss auf die Entwicklung von *in vitro*-Epithelien. Diese Eigenschaften machen IL-18 allerdings auch zu einem Zielmolekül der Modifikationen, die in Tumorzellen zu autonomem Wachstum führen.

4.5 Änderungen der IL-18 Expression im Verlauf der Tumorprogression

Im Verlauf der Prozesse, die zur Etablierung eines Tumors führen, akkumulieren in den Tumorzellen Veränderungen, die zu einer Wachstumsautonomie der Zellen beitragen (Hanahan und Weinberg, 2000). IL-18 als mitogener und motogener Faktor für Keratinozyten könnte in die Entstehung und Progression von Plattenepithelkarzinomen, die von normalen Keratinozyten ausgehen, involviert sein. Im folgenden soll daher die Expression von IL-18 in und seine Wirkung auf Zellen aus verschiedenen Stadien der Tumorprogression charakterisiert werden. Als Modellsystem werden dafür die immortalen, nicht tumorigenen HaCaT-Zellen sowie die auf der Basis dieser Zellen durch Transfektion mit dem Gen für eine konstitutiv aktive Variante des Ras-Proteins etablierten HaCaT-ras-Klone verwendet. Als Modell für benigne Tumorzellen werden HaCaT-ras A5-Zellen herangezogen. Re-kultivate von *in vivo*-Tumoren, die sich aus HaCaT-ras A5 entwickelt haben, stehen als maligne und hochmaligne Zellen zur Verfügung (HaCaT-ras A5-RT1 und -RT3).

Das *il-18*-Gen ist in allen untersuchten HaCaT- oder HaCaT-ras-Klonen transkriptionell aktiv. Die Aktivität nimmt aller-

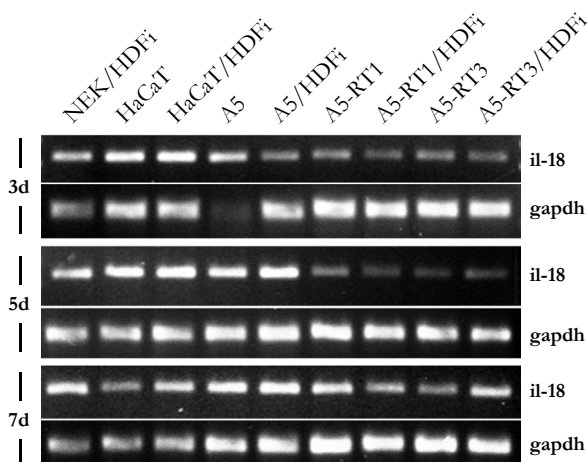


Abb. 4.33 Expression von IL-18-mRNA in HaCaT- und HaCaT-ras-Zellen

HaCaT-Zellen sowie die verschiedenen HaCaT-ras-Klone wurden in Monokultur oder in Cokultur mit postmitotischen humanen Fibroblasten bis zu 7 Tage kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Das Transkript für humanes IL-18 wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Als interne Kontrolle dient die Amplifikation des GAPDH-Transkriptes. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

dings in den hochmalignen, durch *in vivo*-Passagierung generierten HaCaT-ras-Klonen stark ab, wohingegen HaCaT-Zellen und HaCaT-ras A5-Zellen die mRNA noch in Konzentrationen enthalten, wie sie auch in primären Keratinozyten nachgewiesen werden können. Die Kokultivierung von Feeder-Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die Menge an synthetisiertem IL-18-Transkript (vgl. Abb. 4.33).

Zusätzlich zur gezeigten transkriptionellen Aktivität des *il-18*-Genes wird die Translation der IL-18-Transkripte in den benignen und malignen HaCaT-ras-Klonen reduziert (vgl. Abb. 4.34). Das pro-Protein ist bereits in den benignen HaCaT-ras A5 kaum noch nachweisbar, wobei die HaCaT-Zellen pro-IL18 noch auf dem Niveau der primären Keratinozyten synthetisieren. Die Kokultivierung der HaCaT-Zellen mit humanen Feeder-Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die IL-18-Expression.

Die Prozessierung und Freisetzung des funktionell aktiven Proteins lässt sich, trotz der Präsenz von intrazellulärem pro-IL18 in HaCaT-Zellen und HaCaT-ras A5-Zellen, lediglich für primäre humane Keratinozyten zeigen. Bereits die nicht tumorigenen HaCaT-Zellen sezernieren kein IL-18 mehr (vgl. Abb. 4.35).

Die Expression von IL-18 nimmt im HaCaT-Modellsystem mit der steigenden Tumorigenität der Zellen stark ab. Die mRNA der Rezeptoren für IL-18 wird dagegen von allen verwendeten HaCaT-Zellen exprimiert (vgl. Abb. 4.36).

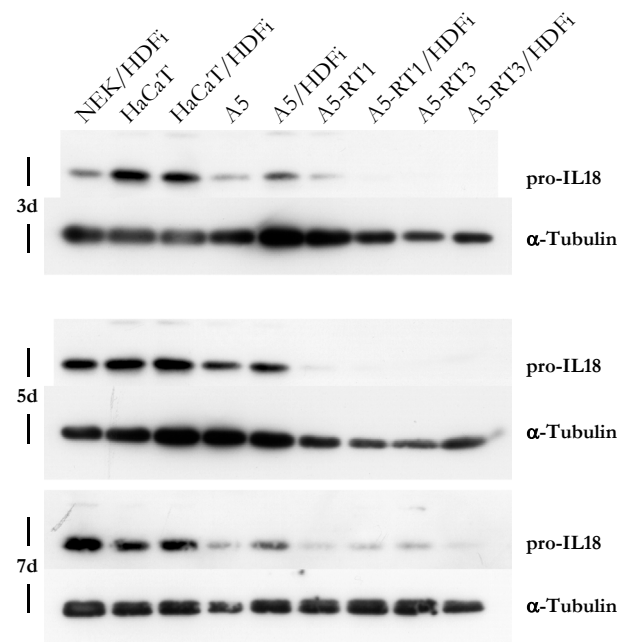


Abb. 4.34 Expression von pro-IL-18 in HaCaT- und HaCaT-ras-Zellen

HaCaT-Zellen sowie die verschiedenen HaCaT-ras-Klone wurden in Monokultur oder in Kokultur mit postmitotischen humanen Fibroblasten bis zu 7 Tage kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die zytosolischen Proteine isoliert. In den Proteinlysaten wurde durch Western Blot die Menge an pro-IL-18 und, zur Kontrolle der Proteinmenge, α -Tubulin quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

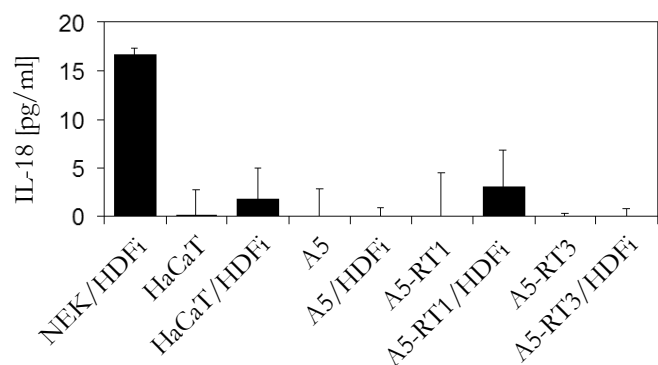


Abb. 4.35 Freisetzung von IL-18 durch HaCaT- und HaCaT-ras-Zellen

In 48h konditionierten Medien von HaCaT- und HaCaT-ras-Zellen in Monokultur sowie in Kokultur mit postmitotischen humanen Fibroblasten (HDFi) wurde IL-18 mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen.

Die Transkription der IL-18-Rezeptoren α und β scheint, wie die Expression des Faktors, unabhängig von der Cokultivierung der Zellen mit Feeder-Fibroblasten zu sein.

Angesichts der konstitutiven Expression der IL-18-Rezeptoren ist es auffällig, dass weder HaCaT-Zellen noch einer der untersuchten HaCaT-ras-Klone *in vitro* auf rekombinantes humanes IL-18 mit einer Steigerung der Proliferationsrate reagieren, wie sie bei primären Keratinozyten beobachtet werden kann (vgl. Abb. 4.37). Auch in Cokultur mit Feeder-Fibroblasten zeigen die verschiedenen HaCaT-Zellen keine Reaktion auf appliziertes IL-18.

IL-18 wird demnach von den verschiedenen HaCaT-Zellen weder freigesetzt noch sind die Zellen in der Lage, *in vitro* auf IL-18 mit einer Beschleunigung des Zellwachstums zu reagieren. Es ist somit unwahrscheinlich, dass IL-18 in seiner Eigenschaft als Mitogen die Tumorprogression im HaCaT-Modellsystem positiv beeinflusst.

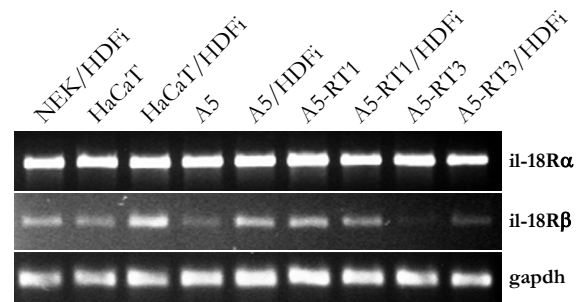


Abb. 4.36 Expression der IL-18-Rezeptoren im HaCaT-Modellsystem

HaCaT-Zellen sowie verschiedene HaCaT-ras-Klone wurden in Monokultur oder in Cokultur mit postmitotischen humanen Fibroblasten 5 Tage kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und aus der RNA wurde das Transkript für die humane IL-18-Rezeptoren α und β durch RT-PCR amplifiziert. Als interne Kontrolle dient die Amplifikation des GAPDH-Transkriptes. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

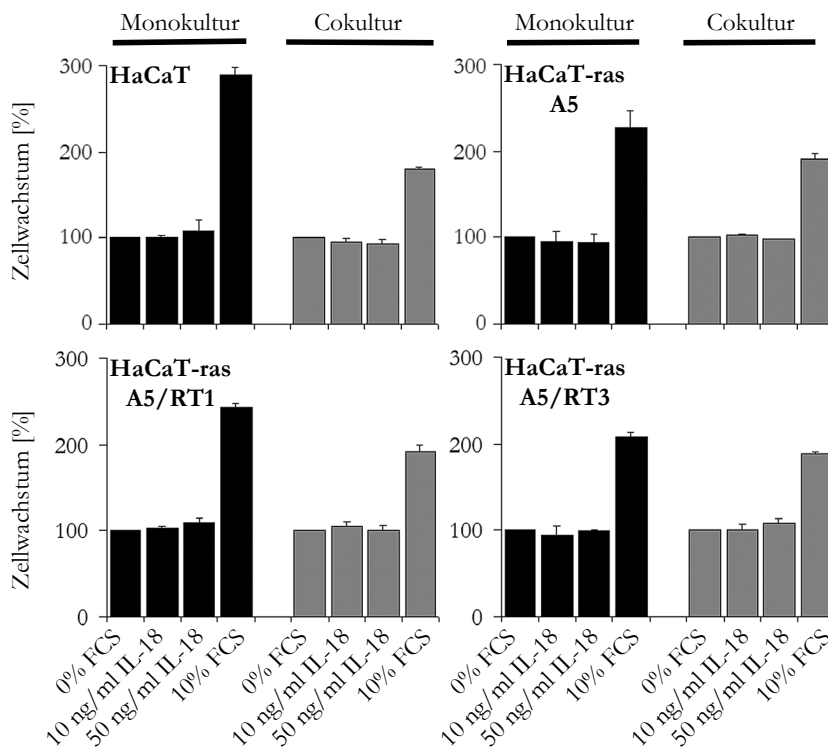


Abb. 4.37 Prozentuale Zellzunahme in den verschiedenen HaCaT-Zellen unter Einfluss von IL-18

HaCaT-Zellen und verschiedene HaCaT-ras-Klone wurden in Mono- oder Cokultur mit humanen Feeder-Fibroblasten ausgesät. Am Tag nach der Aussaat wurde das Medium (4x MEM, 10% FCS) durch serumfreies Medium ersetzt, dem IL-18 zugesetzt wurde (10 und 50 ng/ml). Das Medium wurde im folgenden alle 2 Tage erneuert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen eingefroren und die Zellzahl über die Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Aus den Triplikaten wurden die Mittelwerte bestimmt und die Zellzahl anschließend prozentual auf die Kontrolle (serumfreies 4x MEM) bezogen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Murine *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten, die aufgrund ihres Genotyps unter anderem nicht in der Lage sind, FGF-7 und GM-CSF zu synthetisieren, können sowohl in Submerskultur als auch in organotypischer Cokultur das Wachstum von humanen Keratinozyten nicht in dem Maße unterstützen, wie dies bei *wt*-Fibroblasten der Fall ist. Die Applikation von FGF-7 und GM-CSF behebt diesen Defekt und induziert ein beschleunigtes Wachstum der Keratinozyten, wobei die Proliferation der Zellen nach Zugabe von FGF-7 bereits nach 24 Stunden sichtbar ist, wohingegen der Effekt von GM-CSF stark verzögert ist. Auch *in vivo* haben FGF-7 und GM-CSF eine positive Wirkung auf die Proliferation von Keratinozyten, die nach Überexpression der Faktoren im *Stratum basale* erhaltenen Phänotypen unterscheiden sich jedoch grundlegend (Werner, 1998; Breuhahn et al., 2000).

Veränderungen in der Genexpression in Keratinozyten auf *c-jun*^{-/-}-Feeder-Layern nach Applikation von FGF-7 und GM-CSF sollen Hinweise auf die Wirkmechanismen der beiden Faktoren und damit eine Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungen von FGF-7 und GM-CSF *in vivo* und *in vitro* geben. Der Vergleich der Genexpressionsmuster behandelter und Kontroll-Keratinozyten durch cDNA-Array-Hybridisierung zeigt neben der zu erwartenden Induktion Proliferations-assoziiierter Transkripte eine Modulation von Regulatoren der Apoptose, Signalmediatoren und Strukturproteinen. Weitere Versuche unter Verwendung von Keratinozyten fünf verschiedener Spender bestätigen die Regulation von etwa der Hälfte der anhand der Ergebnisse der cDNA-Array-Hybridisierung ausgewählten Transkripte, unter diesen interleukin-11 und interleukin-18.

Die Expression der IL-11-mRNA durch Keratinozyten geht nach Applikation von FGF-7 und GM-CSF zurück. Diese negative Regulation bleibt allerdings ohne Auswirkungen auf die Menge an synthetisiertem Protein, da sich in den Medien der Cokulturen kein Rückgang der IL-11-Konzentration zeigt. Zusätzlich wird IL-11 in Cokulturen von Keratinozyten und Feeder-Fibroblasten in hohem Maße von den Fibroblasten freigesetzt.

Die Transkription von *il-18* wird durch FGF-7 und GM-CSF verstärkt, wobei das Maximum des Effektes bereits nach 4 bis 8 Stunden erreicht ist. Die erhöhte Konzentration an IL-18-mRNA in den Zellen geht dabei auf eine direkte Verstärkung der transkriptionellen Aktivität des *il-18*-Genes zurück. Diese führt bereits nach 12 Stunden zu einer höheren Konzentration an pro-IL-18 im Zytoplasma der Zellen. Im weiteren Verlauf sinkt die Menge an intrazellulärem pro-IL-18 stark ab, was wahrscheinlich auf eine beschleunigte Prozessierung und Freisetzung des funktionell aktiven Proteins zurückzuführen ist, die nach 48 Stunden in einer erhöhten IL-18-Konzentration im Zellkulturüberstand resultiert.

Der durch FGF-7 und GM-CSF induzierte Anstieg der IL-18-Freisetzung hat funktionelle Konsequenzen für die behandelten Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten. IL-18 hat eine positive Wirkung auf die Proliferation und Migration von Keratinozyten. Es unterstützt die Epithelbildung in organotypischer Cokultur von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten und

kann somit das Fehlen von FGF-7 und GM-CSF in diesen Kulturen teilweise kompensieren, kommt allerdings auch als Mediator der Effekte von FGF-7 und GM-CSF in Frage. Die Neutralisierung von IL-18 in submersen und organotypischen Cokulturen, deren Entwicklung mit FGF-7 stimuliert wurde, beeinträchtigt die Wirkung von FGF-7 kaum. Die Induktion von IL-18 ist damit für die proliferative Wirkung von FGF-7 von nachrangiger Bedeutung, IL-18 könnte allerdings den mitogenen Effekt von FGF-7 unterstützen. In GM-CSF-behandelten Cokulturen resultiert die Neutralisierung von IL-18 dagegen in einer starken Hemmung der Wirkung von GM-CSF. GM-CSF induziert die Proliferation der Keratinozyten offensichtlich über die Induktion von IL-18 und wirkt damit indirekt. Ein derartiger Wirkmechanismus könnte auch eine Erklärung für die verzögerte Reaktion der Zellen auf GM-CSF sein.

Die gezeigten mitogenen und motogenen Wirkungen von IL-18 auf Keratinozyten machen dieses Cytokin zu einem Zielmolekül der intrazellulären Modifikationen, die zur Wachstumsautonomie von Tumorzellen führen. Im HaCaT-Modellsystem, das verschiedene Stadien der Tumorprogression ausgehend von humanen Keratinozyten repräsentiert, sinkt die IL-18-Expression mit steigender Malignität der Zellen stark ab. Bereits immortalisierte Zellen sind nicht mehr in der Lage, pro-IL-18 zu prozessieren und biologisch aktives IL-18 freizusetzen. Mit der Tumorprogression ist außerdem ein Rückgang der Synthese von IL-18 mRNA und pro-Protein verbunden. Auffälligerweise reagiert keine der untersuchten Zelllinien des HaCaT-Modellsystems auf IL-18 mit einer erhöhten Proliferationsrate.

5 Diskussion

In der Gewebemöostase und während der Regeneration der Haut nach einer Verletzung spielen lösliche Faktoren eine entscheidende Rolle, die die Proliferation und Differenzierung der am Aufbau der Gewebestruktur beteiligten Zellen kontrollieren. Zwei Faktoren, die nach Verletzung verstärkt freigesetzt werden, sind FGF-7 und GM-CSF (Marchese et al., 1995; Mann et al., 2001). Sowohl FGF-7 als auch GM-CSF wirken positiv auf die Proliferation von humanen und murinen Keratinozyten (Braunstein et al., 1994; Werner, 1998; Breuhahn et al., 2000; Andreadis et al., 2001). Bei Überexpression *in vivo* führt FGF-7 zur Entwicklung einer hyperplastischen Epidermis (Werner, 1998), wohingegen GM-CSF zwar die Proliferation der Keratinozyten fördert, allerdings ebenfalls den Differenzierungsprozess beschleunigt, so dass insgesamt keine Hyperplasie zu beobachten ist (Braunstein et al., 1994; Breuhahn et al., 2000). Das deutet darauf hin, dass FGF-7 und GM-CSF das Verhalten der Keratinozyten auf unterschiedliche Weise beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit sollte ihr Wirkmechanismus über die Erfassung von Veränderungen der Genexpressionsmuster in Keratinozyten charakterisiert werden, die durch die Applikation von FGF-7 oder GM-CSF ausgelöst werden.

Analyse der Genexpression über Hybridisierung der RNA mit einem cDNA-Array

Zur Identifikation von Genen, deren Transkription von FGF-7 oder GM-CSF abhängig ist, wurden primäre humane Keratinozyten auf postmitotischen murinen *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten kultiviert. Diese sind aufgrund ihres Genotyps nicht in der Lage, FGF-7 und GM-CSF zu produzieren, unterstützen aber dennoch das Überleben von kokultivierten Keratinozyten. In diesen Kokulturen ist die Proliferation der Keratinozyten geringer als in Kokultur mit murinen *wt*-Fibroblasten. Durch die Zugabe von FGF-7 oder GM-CSF zu Kulturen von Keratinozyten auf *c-jun*^{-/-}-Feeder-Layern wird durch die mitogene Wirkung beider Faktoren der Defekt im Wachstum im Vergleich zu Zellen auf *wt*-Fibroblasten ausgeglichen.

Die Analyse der Genexpression nach Stimulation der Keratinozyten mit FGF-7 oder GM-CSF zeigte eine hohe Anzahl von Genen, deren Transkription durch die beiden Faktoren reguliert wird. Allerdings war auffällig, dass die Ergebnisse der drei durchgeführten cDNA-Array-Hybridisierungen, bei denen Keratinozyten zweier unterschiedlicher Spender verwendet wurden, untereinander nur schlecht vergleichbar waren.

Dies liegt zum einen an der biologischen Varianz der primären humanen Zellen sowie an der Inhomogenität innerhalb der Keratinozytenkulturen. Die Kokulturen werden, um das Überleben der Fibroblasten zu gewährleisten, in Medium mit hohem Ca²⁺-Gehalt kultiviert. Dies erlaubt eine gewisse Differenzierung der Keratinozyten (Bikle et al., 2001). Der Differenzierungsprozess führt zur Entwicklung von Subpopulationen an Keratinozyten, die verschiedenen Stadien der terminalen Differenzierung entsprechen. Diese Zellen unterscheiden sich voneinander im

Hinblick auf ihre Genexpression (Matoltsy, 1986b; Bikle et al., 2001) und reagieren auch unterschiedlich auf externe Stimuli. Die Applikation von FGF-7 und GM-CSF ruft folglich in den einzelnen Keratinozyten-Subpopulationen unterschiedliche Veränderungen der Genexpression hervor, abhängig vom jeweiligen Ausgangszustand der Zellen. Das Ausmaß, in dem Keratinozyten differenzieren bzw. das Verhältnis der einzelnen Subpopulationen zueinander kann in Cokulturen von Keratinozyten und Feeder-Fibroblasten nicht kontrolliert und standardisiert werden, da es abhängig vom Spender und der Qualität der Isolierung der primären humanen Zellen stark schwankt. Damit ist es schwierig, bei einer Analyse der gesamten Keratinozytenpopulation einer Kultur reproduzierbare Veränderungen des Expressionsmusters zu identifizieren, insbesondere da die schwankende Größe der einzelnen Subpopulationen zu variierenden Signalstärken beiträgt. Diese Variationen können nur durch eine hohe Anzahl von unabhängigen Experimenten statistisch ausgemittelt werden.

Auf der anderen Seite erschweren technisch bedingte Schwankungen in der Hybridisierungsintensität innerhalb eines cDNA-Arrays (vgl. Abb. 5.1) deren Auswertung, die durch die Hintergrundkorrektur nicht ausgeglichen werden können. Das führt dazu, dass auf jedem cDNA-Array Bereiche existieren, die nicht ausgewertet werden können und damit im Vergleich zu anderen Hybridisierungen falsch-negative Resultate hervorrufen. Trotz dieser Schwankungen war es jedoch möglich, durch die Analyse einzelner Gene in der zur Hybridisierung mit dem cDNA-Array verwendeten RNA mittels RT-PCR über 90% der Aussagen des cDNA-Arrays zu reproduzieren.

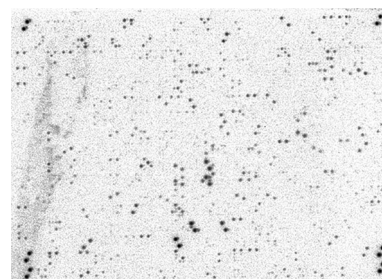


Abb. 5.1 Ausschnitt aus einem cDNA-Array nach Hybridisierung
Maßstab 1:2

Die beschriebenen Variationen in den Ergebnissen machen es allerdings notwendig, die Expression der Gene, die laut Hybridisierung der mRNA mit dem cDNA-Array durch FGF-7 oder GM-CSF reguliert werden, durch RT-PCR in unabhängigen Versuchen zu überprüfen. In weiteren Untersuchungen an RNA-Präparationen von Keratinozyten-Populationen fünf verschiedener Spender konnten noch 50% der Ergebnisse des cDNA-Arrays anhand ausgewählter Gene verifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass im vorliegenden Fall die biologische Variation der primären Zellen weit mehr ins Gewicht fällt als die technisch bedingten Schwankungen.

Anhand der cDNA-Array-Hybridisierungen und der anschließenden Analyse der Genexpression in Keratinozyten mittels RT-PCR konnten einige Zielgene von FGF-7 und GM-CSF in diesen Zellen identifiziert werden, von denen insbesondere das Cytokin IL-18 im Hinblick auf seine Rolle in der Geweberegeneration der Epidermis näher untersucht wurde.

IL-18 wird durch FGF-7 und GM-CSF induziert und wirkt mitogen und motogen

Die Analyse der Genexpression in Keratinozyten nach Stimulation der Zellen mit FGF-7 oder GM-CSF ergab reproduzierbar eine Verstärkung der Transkription von Interleukin-18, wobei nachfolgend auch erhöhte Konzentrationen an intrazellulärem pro-Protein und extrazellulärem IL-18 nachweisbar waren. Anhand von Literaturdaten kann darüber hinaus für die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des *il-18*-Genes durch GM-CSF ein möglicher Wirkmechanismus postuliert werden: GM-CSF induziert in einer Reihe von Zelltypen nach Bindung an seinen Rezeptor die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT5 (Bhattacharya et al., 2001; Lehtonen et al., 2002) und die Aktivität des *il-18*-Promoters kann durch die Bindung von STAT5 gesteigert werden (Kalina et al., 2000). Für den Mechanismus der Induktion von IL-18 durch FGF-7 liegen derzeit keine Anhaltspunkte vor.

Als hauptsächliche Quelle von IL-18 in Cokulturen humaner Keratinozyten und muriner Fibroblasten wurden die Keratinozyten identifiziert. Hingegen werden beide Komponenten des IL-18-Rezeptor-Komplexes, der ligandbindende IL-18-Rezeptor α und der signaltransduzierende IL-18-Rezeptor β , von dermalen und epidermalen Zellen gleichermaßen exprimiert. Damit ist eine autokrine Wirkung von IL-18 auf die Keratinozyten sowie eine parakrine Beeinflussung des Verhaltens der Fibroblasten in Cokultur mit Keratinozyten möglich.

Die Expression von IL-18 sowie der ligandbindenden Rezeptoruntereinheit in epidermalen Zellen ist bereits in der Literatur beschrieben (Koizumi et al., 2001). Das IL-18-Transkript wird im Verlauf der Wundheilung der Haut synthetisiert und kann in Keratinozyten am Wundrand von 3 bis 5 Tage alten Wunden der Maushaut verstärkt nachgewiesen werden (Kampfer et al., 1999). In RNA aus Maushaut-Wunden konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die verstärkte Transkription des *il-18*-Genes der Induktion der Expression von FGF-7 und GM-CSF zeitlich nachfolgt, womit auch *in vivo* eine Regulation der IL-18-Expression durch FGF-7 und GM-CSF gegeben sein könnte (vgl. Abb. 4.16).

Um die Auswirkungen der verstärkten Expression von IL-18 auf Cokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten zu charakterisieren, wurde zunächst die Wirkung von

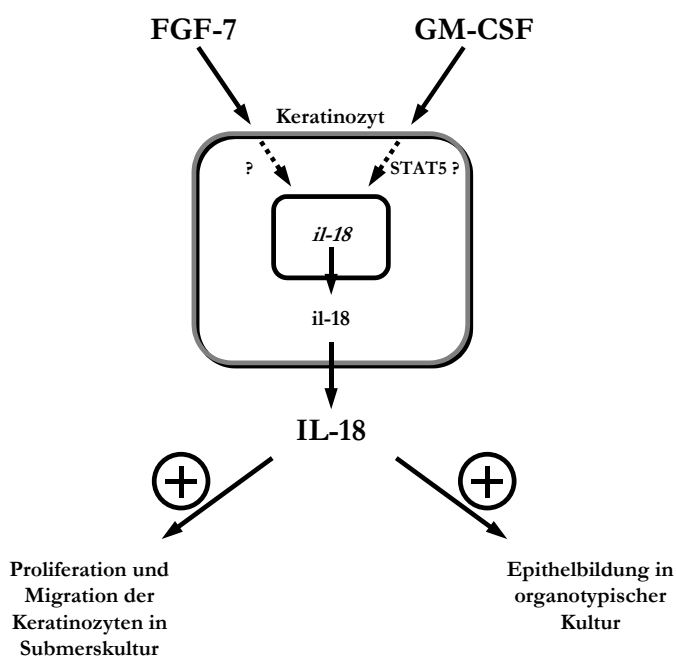


Abb. 5.2 Induktion von IL-18 in Keratinozyten und seine Wirkungen

rekombinanten humanen IL-18 auf Monokulturen der beiden Zelltypen untersucht. Während IL-18 das Verhalten von Fibroblasten nicht signifikant beeinflusst, stimuliert es die Proliferation und Migration der epidermalen Zellen auf Feeder-Layern aus postmitotischen Fibroblasten. Damit konnte erstmals eine positive Wirkung von IL-18 auf Zellen gezeigt werden, die nicht dem hämatopoetischen System zuzuordnen sind. Bisher ist lediglich eine inhibitorische Wirkung von IL-18 auf die Proliferation von Endothelzellen beschrieben, über die IL-18 möglicherweise die Tumorangio-genese hemmt (Cao et al., 1999). In Cokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten lässt sich trotz der Präsenz von IL-18 kein IFN γ nachweisen, was darauf hindeutet, dass die mitogene und motogene Wirkung von IL-18 auf Keratinozyten unabhängig von IFN γ ist.

Die hier gezeigten Resultate werden durch *in vivo*-Untersuchungen gestützt, die bei basaler Überexpression von IL-18 unter Kontrolle des Cytokeratin-14-Promoters die Entwicklung einer atopischen Dermatitis mit verdicktem *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* zeigen, wobei diese Effekte bisher auf die in transgenen Tieren erhöhte Präsenz von Mast-Zellen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in der Dermis zurückgeführt wurden (Konishi et al., 2002). Die Ausprägung dieses Phänotyps kann allerdings auch aus einer direkten mitogenen Wirkung von IL-18 auf Keratinozyten resultieren. Im Gegensatz zur basalen Überexpression unter Kontrolle des Cytokeratin-5-Promoters, die nicht zur Hyperplasie führt (Breuhahn et al., 2000), resultiert die viral vermittelte dermale Überexpression von GM-CSF, wahrscheinlich aufgrund der höheren Gendosis, in epidermaler Hyperplasie bei gleichzeitiger Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der Dermis (Xing et al., 1997). Auffällig ist hierbei, dass die Phänotypen nach dermalen Überexpression von GM-CSF und epidermaler Überexpression von IL-18 sich sehr stark ähneln. Im Gegensatz dazu führt die epidermale Überexpression von FGF-7 zu einem hyperplastischen Epithel ohne eine entsprechende Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Dermis.

FGF-7 stimuliert die Proliferation der Keratinozyten direkt

Die Applikation von FGF-7 und GM-CSF zu Keratinozyten in Cokultur mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten verstärkt die IL-18-Expression in den Keratinozyten. Um die Folgen dieser Induktion für die Wirkung von FGF-7 und GM-CSF zu charakterisieren, wurde humanes IL-18 in submersen und organotypischen Cokulturen von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten unter Einfluss von FGF-7 oder GM-CSF neutralisiert.

Die funktionelle Inaktivierung von IL-18 beeinträchtigt die mitogene Wirkung von

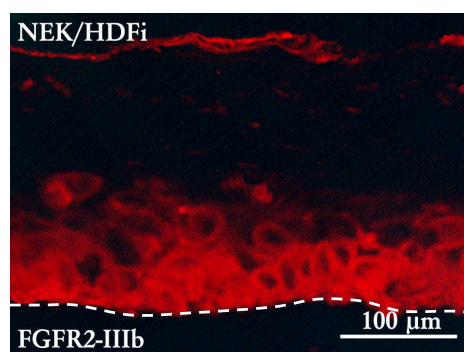


Abb. 5.3 Expression des FGFR-2-IIIb in organotypischen Epithelien

Primäre humane Keratinozyten wurden auf Gelen mit eingebetteten humanen postmitotischen Fibroblasten luftexponiert kultiviert. Nach 8 Tagen wurden die Kulturen entnommen, in Paraffin eingebettet und der FGFR2-IIIb an Schnitten durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Immunoreaktivität in rot dargestellt).

FGF-7 in submerser und organotypischer Kultur kaum, was auf eine direkte Wirkung des Wachstumsfaktors hindeutet. Die Induktion der IL-18-Expression hat somit in Keratinozyten, deren Proliferation durch FGF-7 angeregt wurde, höchstens eine unterstützende Wirkung in der Vermittlung des mitogenen Effektes. Dies korreliert mit der räumlichen Lokalisation des Rezeptors für FGF-7, dem FGFR2-IIIb, der in der Epidermis *in vitro* (vgl. Abb. 5.3) und *in vivo* vorwiegend in der Basalschicht exprimiert wird (Danilenko et al., 1995a; Danilenko et al., 1995b).

Da der Rezeptor für FGF-7 vor allem von basalen Keratinozyten exprimiert wird, wirkt der von dermalen Fibroblasten freigesetzte Wachstumsfaktor in erster Linie auf die Zellen der proliferativ aktiven Schicht. Die Bindung von FGF-7 an seinen Rezeptor löst damit direkt die Proliferation der Keratinozyten aus, wohingegen die Induktion der IL-18-Expression eher ein Nebeneffekt ist (vgl. Abb. 5.4). Das sezernierte IL-18 kann ebenfalls die Proliferation der Keratinozyten induzieren; dieser Effekt kommt aber bei gleichzeitiger Aktivität von FGF-7 kaum zum Tragen. Daher löst die Neutralisierung von IL-18 in submersen und organotypischen Cokulturen unter Einfluss von FGF-7 keine signifikante Reduktion der Keratinozyten-Proliferation aus.

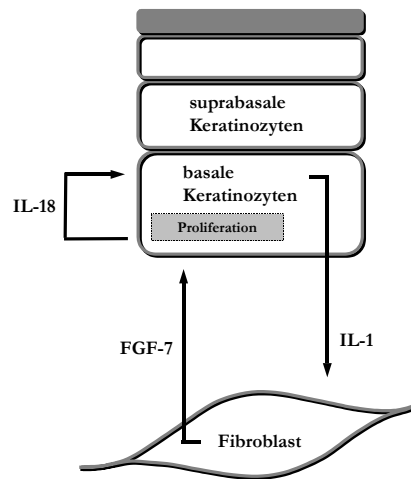


Abb. 5.4 FGF-7 und IL-18 in der dermal-epidermalen Interaktion

IL-18 vermittelt die mitogene Wirkung von GM-CSF

Bei Applikation von GM-CSF zu Cokulturen humaner Keratinozyten mit murinen *c-jun*^{-/-} Fibroblasten wird die transkriptionelle Aktivität des *il-18*-Genes in ähnlichem Maß verstärkt wie nach Zugabe von FGF-7. Auch die Konzentrationen an daraufhin synthetisiertem pro-IL-18 sowie die Menge an prozessiertem und freigesetztem Protein sind bei beiden Faktoren ähnlich. Im Gegensatz zu Cokulturen unter Einfluss von FGF-7 ist die Präsenz von funktionell aktivem IL-18 allerdings unbedingt notwendig zur Vermittlung des mitogenen Effektes von GM-CSF, wie die funktionelle Inaktivierung

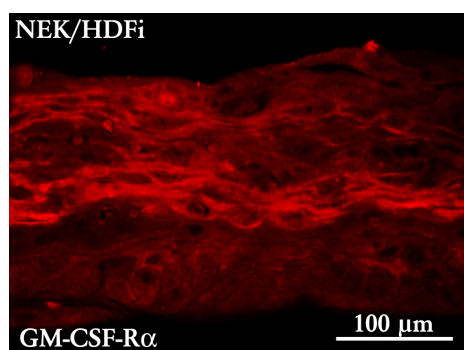


Abb. 5.5 Expression des GM-CSF-R α in organotypischen Epithelien

Primäre humane Keratinozyten wurden auf Gelen mit eingebetteten humanen postmitotischen Fibroblasten luftexponiert kultiviert. Nach 8 Tagen wurden die Kulturen entnommen, in Paraffin eingebettet und der GM-CSF-R α an Schnitten durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Immunoreaktivität in rot dargestellt).

von IL-18 durch Zugabe neutralisierender Antikörper zeigt. Diese führt in submersen und organotypischen Cokulturen unter Einfluss von GM-CSF zu einer vollständigen Hemmung der Proliferation der Keratinozyten. Dieses Ergebnis lässt sich bei Betrachtung der Rezeptorlokalisierung im Epithel erklären. In organotypischen Epithelien humaner Keratinozyten auf Dermisäquivalenten mit eingebetteten humanen Feeder-Fibroblasten wird die ligandbindende Komponente des GM-CSF-Rezeptor-Komplexes (GM-CSF-R α) vor allem im *Stratum spinosum* exprimiert, daneben ist auch das *Stratum granulosum* schwach positiv. Auf der Oberfläche von Keratinozyten der Basalschicht ist dagegen keine GM-CSF-R α -Immunoreaktivität feststellbar (vgl. Abb. 5.5). Somit ist der Rezeptor für GM-CSF hauptsächlich auf Zellen lokalisiert, die weniger auf mitogene Signale reagieren können, da sie sich im terminalen Differenzierungsprozess befinden.

Die Bindung von GM-CSF an seinen Rezeptor löst damit nicht unmittelbar die Proliferation der Keratinozyten aus, sondern führt in erster Linie zur verstärkten Freisetzung von IL-18 aus den suprabasalen Zellen. Dieses Cytokin kann dann in Interaktion mit den basalen Zellen treten, die den IL-18-Rezeptor auf der Zelloberfläche präsentieren, und somit deren Proliferation stimulieren (vgl. Abb. 5.6). Der mitogene Effekt von GM-CSF auf Keratinozyten in Cokultur mit *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten hängt also von der Aktivität von IL-18 ab und kann, wie gezeigt wurde, durch die Neutralisierung von IL-18 vollständig gehemmt werden. Es ist möglich, dass das dargestellte mechanistische Modell noch um eine positive Rückkopplung zu ergänzen ist, denn es ist beschrieben, dass IL-18 in PBMC und Osteoblasten die Expression von GM-CSF verstärkt (Ushio et al., 1996; Udagawa et al., 1997).

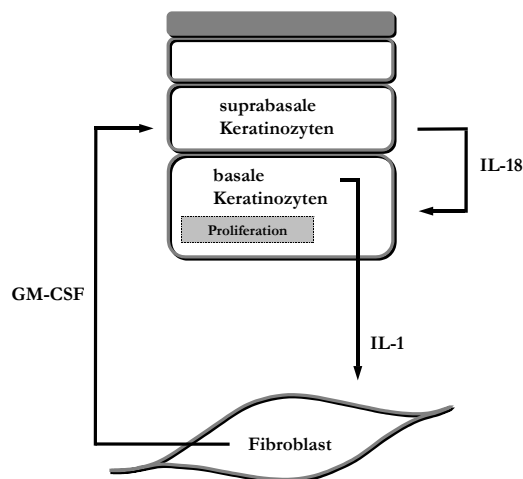


Abb. 5.6 GM-CSF und IL-18 in der dermal-epidermalen Interaktion

Bedeutung von IL-18 in der epidermalen Wundheilung

Nach einer Verletzung der Haut von Mäusen ist eine starke Induktion der IL-18-Synthese in der Wunde bereits nach wenigen Stunden nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wird IL-18 vor allem von den in das Wundbett einwandernden Monozyten freigesetzt. Eine Expression des Proteins in Keratinozyten beginnt frühestens in 3 Tage alten Wunden und ist vorwiegend in den Keratinozyten am Wundrand zu sehen (Kampfer et al., 1999). An Gesamt-RNA aus Maushaut-Wunden konnte allerdings gezeigt werden, dass die Induktion der IL-18 mRNA der Erhöhung der Expression von FGF-7 und GM-CSF zeitlich folgt und erst in 5 bis 7 Tage alten Wunden

deutlich sichtbar wird (vgl. Abb. 4.16). Das deutet darauf hin, dass zu früheren Zeitpunkten, bzw. in den Monozyten, eher eine posttranskriptionelle Regulation der IL-18-Synthese vorliegt, was durch die ungewöhnlich hohe Lebensdauer der IL-18-mRNA ermöglicht wird (Nakanishi et al., 2001). In späten Wunden wird dann neben dieser posttranskriptionellen Induktion der IL-18 Expression in den Monozyten auch die Transkription des Gens in Keratinozyten verstärkt. Die hier gezeigten Daten weisen darauf hin, dass diese transkriptionelle Regulation von der Aktivität von FGF-7 und GM-CSF abhängig ist.

Unabhängig vom zellulären Ursprung des Proteins ist eine Beteiligung von IL-18 an einer Reihe von Prozessen im Verlauf der Wundheilung bereits gezeigt worden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten ergänzen dieses Bild (vgl. Abb. 5.7).

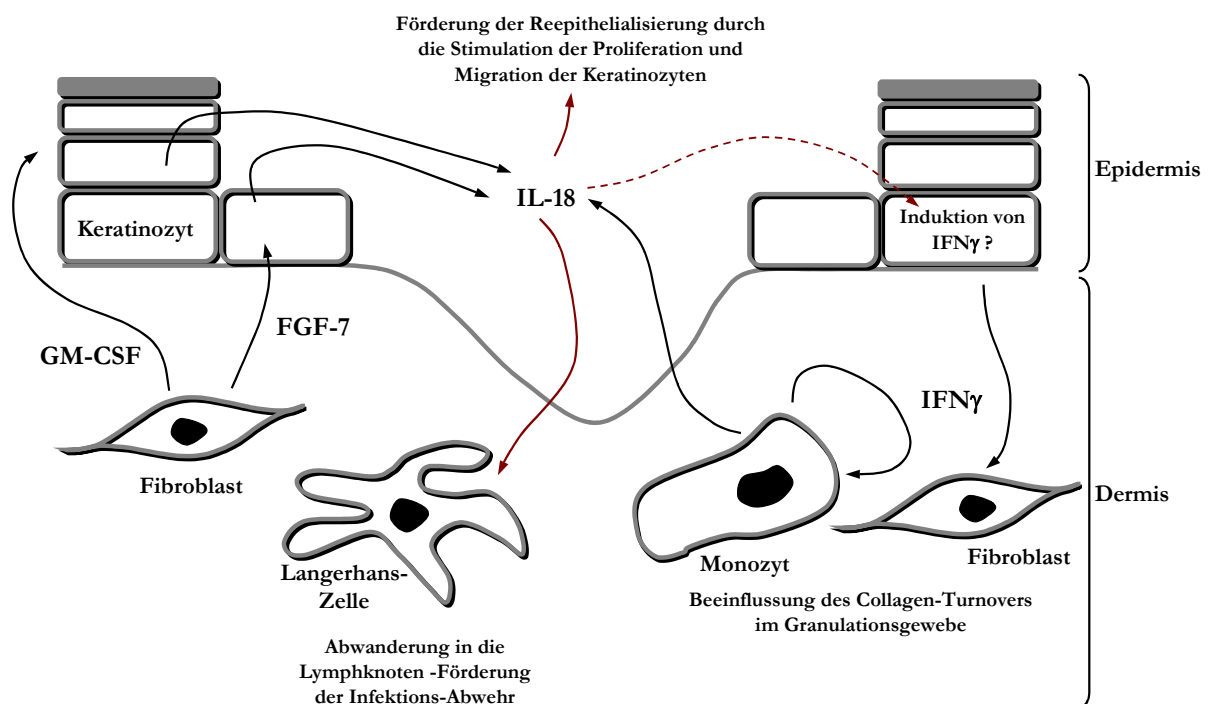


Abb. 5.7 Bedeutung von IL-18 in der Wundheilung der Haut

Die innerhalb kurzer Zeit nach Verletzung erhöhten Konzentrationen an IL-18 lösen unter anderem die Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis in die nächstgelegenen Lymphknoten aus, wo diese durch Präsentation von Antigenen T- und B-Lymphozyten aktivieren (Cumberbatch et al., 2001). Langerhans-Zellen sind in ihrer Eigenschaft als dendritische Zellen der Epidermis die ersten Zellen des Immunsystems, die mit in die Haut eindringenden pathogenen Organismen in Berührung kommen. Die durch IL-18 gesteigerte Abwanderung dieser Zellen in die Lymphknoten nach ihrem Kontakt mit Pathogenen stellt somit eine Stimulation der Immunabwehr durch IL-18 dar.

Eine der ersten Wirkungen, die IL-18 zugeschrieben wurde, ist die Induktion der Expression von IFN γ in T-Zellen (Ushio et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten in Entzündungssituationen *in vivo* in der Lage sind, IFN γ zu synthetisieren (Howie et al., 1996). Andererseits sprechen die Arbeiten von Kampfer et al., 2000 gegen eine Freisetzung von IFN γ in der Wunde, was dort auf die Wirkung von TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) zurückgeführt wird, das in PBMC die Induktion von IFN γ durch IL-18 unterbindet. IFN γ induziert gemeinsam mit GM-CSF in Monozyten die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), unter diesen vorrangig MMP-1 und MMP-9, die Collagen zersetzen (Zhou et al., 2003). Auf der anderen Seite hemmt IFN γ die Proliferation von Fibroblasten und reduziert deren Collagensynthese (Czaja et al., 1987), was in der späten Wunde die Rückkehr zur normalen Gewebemöostase unterstützen würde.

Wie gezeigt werden konnte, ist IL-18 in der Lage, die Proliferation und Migration epidermaler Zellen zu stimulieren. Im *in vitro*-Modell der organotypischen Kokultur, das den Prozess der Reepithelialisierung im Verlauf der Wundheilung nachstellt, fördert IL-18 eindeutig die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels (Abb. 4.23 und 4.24). Damit bekommt die stark erhöhte Freisetzung von IL-18 in der Wunde eine weitere funktionelle Bedeutung. So kann auf der Basis der hier gezeigten Daten angenommen werden, dass IL-18 in frühen Phasen der Wundheilung die Migration der Keratinozyten in das Wundbett fördert und gleichzeitig die Proliferation der Keratinozyten verstärkt, was die abgewanderten Keratinozyten ersetzen und nach erfolgter vollständiger Besiedlung der Wundoberfläche zu einem beschleunigten Epithelaufbau beitragen könnte. Derzeit liegen leider keine Wundheilungsstudien an transgenen Mäusen vor, die entweder kein IL-18 synthetisieren oder das Cytokin überexprimieren. Somit kann die positive Wirkung, die für IL-18 in der Wundheilung postuliert wird, nicht anhand von *in vivo*-Experimenten belegt werden.

Bisher wurde die Wirkung von IL-18 auf die Wundheilung unabhängig von der Herkunft des Cytokins diskutiert. Die in dieser Arbeit gezeigte Induktion der Expression von IL-18 durch FGF-7 und GM-CSF scheint angesichts der Freisetzung des Proteins durch Monozyten während des gesamten Verlaufes der Wundheilung von nur geringer Bedeutung zu sein. Andererseits heilen embryonale Wunden auch in Abwesenheit inflammatorischer Zellen im Wundbett (Ley, 2003); unter diesen Umständen wird IL-18 nur von den epidermalen Keratinozyten synthetisiert. Die Modulation der Expression von IL-18 durch FGF-7 und GM-CSF könnte somit in der embryonalen Wundheilung eine sehr viel größere Rolle spielen als in adulten Wunden (vgl. Abb. 5.7). Die Tatsache, dass unter diesen Bedingungen die IL-18-Expression sehr viel später einsetzen würde, da in frühen Wunden die Monozyten die hauptsächlichen Produzenten des Cytokins sind, hat wahrscheinlich nur geringen Einfluss auf den Wundschluss, da dieser in Embryos eher durch die starke Kontraktion der Wunde als durch die Migration der Keratinozyten herbeigeführt wird (Singer und Clark, 1999). Nachfolgend würde IL-18 wiederum die Reepithelialisierung unterstützen.

IL-18 in der Entstehung und Progression von Tumoren

Neben seiner positiven Wirkung auf die epitheliale Wundheilung ist IL-18 auch im Kontext der Karzinogenese von Interesse. Die Tatsache, dass IL-18 von Keratinozyten exprimiert wird und autokrin die Proliferation und Migration dieser Zellen stimuliert, machen dieses Cytokin zu einem Kandidaten für die zellulären Modifikationen, die eine Wachstumsautonomie von Tumorzellen vermitteln. In Plattenepithelkarzinomen, die sich ausgehend von Keratinozyten entwickeln, wäre eine verstärkte IL-18-Freisetzung vorstellbar, die autokrin das Wachstum der entarteten Zellen fördert.

Im HaCaT-Modellsystem, in dem immortale und genetisch modifizierte Keratinozyten unterschiedlicher Tumorigenität als Modelle für verschiedene Entwicklungsstadien von Plattenepithelkarzinomen dienen (Fusenig und Boukamp, 1998), wird jedoch eine deutliche Abnahme der IL-18-Expression im Lauf der Tumourprogression beobachtet. Die Prozessierung des pro-Proteins und damit verbunden die Freisetzung des aktiven Moleküls ist bereits in den immortalisierten Zellen nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig kann eine mitogene Wirkung des Cytokins auf die Tumorzellen nicht mehr festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu Literaturdaten, die eine Expression von funktionell aktivem IL-18 durch Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen zeigen (Park et al., 2001; Moore et al., 2003). Auf der anderen Seite unterliegt die Expression von IL-18 in einer ganzen Reihe von Tumoren unterschiedlicher Gewebe einer starken negativen Regulation, so zum Beispiel in Tumorzellen der Leber sowie der Ovarien (Chia et al., 2002; Wang et al., 2002). In Tumoren der Eierstöcke konnte in Analogie zu den hier gezeigten Daten auch eine Hemmung der IL-18-Produktion auf der Ebene der Prozessierung und Aktivierung nachgewiesen werden (Wang et al., 2002).

Eine Anzahl von Studien deutet darauf hin, dass eine verringerte Expression von IL-18 in Tumorzellen möglicherweise das Tumourwachstum eher fördert als hemmt. So konnte für Fibrosarkome in Mäusen eine Hemmung des Tumourwachstums bis hin zur Regression nach Behandlung mit IL-18 beobachtet werden, ein Effekt, den die Autoren auf eine Hemmung der Tumourangiogenese über die Verringerung der Endothelzellproliferation zurückführen (Cao et al., 1999). IL-18 verringert daneben auch die Anwachsrate muriner Tumorzellen im Knochenmark und damit die Entstehung von Knochenläsionen (Yamashita et al., 2002). Die wesentlichste Wirkung von IL-18 in der Kontrolle des Tumourwachstums besteht jedoch in seiner Induktion der Differenzierung von Lymphozyten zu Th1-Zellen (Ju et al., 2001). Diese lösen eine inflammatorische Reaktion aus, in deren Verlauf Tumorzellen nach Erkennung tumorspezifischer Marker abgetötet werden. Somit stellt die Unterdrückung der Differenzierung der Th1-Zellen, beispielsweise über die Verringerung der Expression des IL-18-Rezeptors auf der Oberfläche von PBMC, wie sie in Krebspatienten gezeigt werden konnte, einen wichtigen Prozess im Verlauf der Tumourprogression dar (Kobashi et al., 2001).

Es existieren allerdings auch Daten, die eine positive Wirkung von IL-18 auf das Tumourwachstum zeigen, beispielsweise als wesentlichem Faktor für das Überleben von

Melanomzellen (Cho et al., 2000) oder als Wachstumsfaktor für Lebermetastasen von Melanomen nach Injektion der Tumorzellen (Carrascal et al., 2003). Die Diskrepanzen in den vorliegenden Studien zur Wirkung von IL-18 in der Tumorprogression sind wahrscheinlich auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der untersuchten Tumorzelllinien zurückzuführen.

Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Wirkmechanismus von FGF-7 und GM-CSF in der Regeneration der Epidermis *in vitro* zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Faktoren, die von dermalen Fibroblasten freigesetzt werden, in Keratinozyten die Synthese von IL-18 verstärken. Der Rezeptor für IL-18 wird *in vitro* von Keratinozyten und Fibroblasten in submerser und organotypischer Cokulturen exprimiert, wobei Fibroblasten auf das Cytokin nicht mit einer Steigerung ihrer Proliferationsrate reagieren. Dagegen fördert IL-18 autokrin die Proliferation und Migration der Keratinozyten, unterstützt auf diese Weise die Epithelbildung in organotypischer Cokultur von Keratinozyten und *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten und kann somit teilweise das Fehlen von FGF-7 und GM-CSF in diesen Kulturen kompensieren. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die mitogene Wirkung von FGF-7 unabhängig von der Induktion von IL-18 ist, während die proliferationsfördernde Wirkung von GM-CSF durch IL-18 vermittelt wird. Dies wirft allerdings die Frage auf, inwieweit andere Effekte von GM-CSF, beispielsweise die Modulation der Differenzierung und Apoptose, die *in vivo* beobachtet werden (Breuhahn et al., 2000; Mann et al., 2001), auf IL-18 bzw. andere, durch GM-CSF induzierte Faktoren zurückgehen. Diese Fragestellung kann experimentell allerdings nur schwer bearbeitet werden, da durch die in Abwesenheit von IL-18 fehlende Proliferation nicht genügend Zellen zur Ausbildung stratifizierter Epithelien zur Verfügung stehen, anhand derer der Differenzierungsprozess beurteilt werden könnte. Es ist lediglich möglich, die Genexpressionsmuster in Keratinozyten in Submerskultur unter Einfluss von GM-CSF in An- und Abwesenheit von IL-18 zu vergleichen und darüber eine Aussage zur Induktion von Faktoren zu treffen, die an Differenzierungsvorgängen beteiligt sind.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals eine wichtige Rolle für IL-18 in der Regulation der Epithelialisierung und damit in der dermal-epidermalen Interaktion zwischen Keratinozyten und Fibroblasten beschrieben werden. Da IL-18 in Verletzungen der Haut stark erhöht nachweisbar ist, kann angenommen werden, dass die Wirkung auf die Epithelbildung nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* von Bedeutung ist und IL-18 durch seine mitogene und motogene Wirkung auf Keratinozyten die Wundheilung fördert.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	<i>Activator Protein 1</i>	PLC- γ	Phospholipase C- γ
APS	Ammoniumpersulfat	SDS	Sodium-Dodecylsulfat
BAD	<i>Bcl-2 Antagonist of Cell Death</i>	SKALP	<i>Skin-derived Anti-Leukoproteinase</i>
BIRC 1	<i>Baculoviral LAP-Repeat Containing 1</i>	SPRR1	<i>Small Proline-Rich Protein 1</i>
BrdU	Bromo-Desoxyuridin	STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
CLDN 1	Claudin-1	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>	TGF α/β	<i>Transforming Growth Factor α/β</i>
DSG2	Desmoglein 2	TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
EtBr	Ethidiumbromid	TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>	TUNEL	<i>Terminal-desoxynucleotidyltransferase-dUTP-Nick-End-Labeling</i>
FGFR2-IIIb	FGF-Rezeptor 2, Spleißvariante IIIb	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase		
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>		
GM-CSFR α	GM-CSF-Rezeptor α		
HDF	humane dermale Fibroblasten		
HDFi	humane dermale Fibroblasten, postmitotisch		
IFN γ	Interferon γ		
I κ B	<i>Inhibitor of κB</i>		
IL	Interleukin		
IL-18Ra	Interleukin-18-Rezeptor α		
JAK2	Janus Kinase 2		
K14/17	Cytokeratin 14/17		
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>		
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>		
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>		
MMP	Matrix-Metalloproteinase		
NEK	normale epidermale Keratinozyten		
NF-AT	<i>Nuclear Factor for Activated T cells</i>		
NF-IL6	<i>Nuclear Factor for Interleukin 6</i>		
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>		
OTK	Organotypische Cokultur		
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>		
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>		
PI3-K	Phosphatidylinositid-3-Kinase		

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Aufbau der Haut.....	6
Tab. 2.2	Quellen und wesentliche Wirkungen ausgewählter Cytokine in der Wundheilung.....	9
Abb. 2.3	Parakrine Interaktion zwischen Fibroblasten und Keratinozyten.....	9
Abb. 2.4	Modifikationen in Tumorzellen.....	13
Abb. 2.5	Das HaCaT-Modell der Hautkarzinogenese.....	16
Abb. 3.1	Nachweis von DNA-Kontamination in mRNA.....	30
Abb. 3.2	Nachweis muriner RNA.....	31
Abb. 3.3	Beispiel einer Bioanalyser-Messung.....	31
Abb. 3.4	Lokalisation von Differenzierungsmarkern in der Epidermis.....	41
Abb. 4.1	Mitogene Wirkung von FGF-7 und GM-CSF.....	42
Tab. 4.2	Induktion Proliferations-assoziiertes Transkripte durch FGF-7 und GM-CSF Zellzyklus.....	43
Tab. 4.3	Induktion proliferations-assoziiertes Transkripte durch FGF-7 und GM-CSF Energie- und Proteinstoffwechsel.....	44
Tab. 4.4	Modulation von ausgewählten Transkripten durch FGF-7 und GM-CSF.....	45
Abb. 4.5	Expression von <i>birv 1</i> in homologen und heterologen Cokulturen.....	46
Abb. 4.6	Modulation der Transkription durch Applikation von FGF-7 und GM-CSF.....	47
Abb. 4.7	Literaturhinweise zu Interleukin-11.....	49
Abb. 4.8	Expression von IL-11 in homologen und heterologen Cokulturen.....	50
Abb. 4.9	Literaturhinweise zu Interleukin-18.....	51
Abb. 4.10	IL-18-Expression in Keratinozyten und Fibroblasten.....	52
Abb. 4.11	Expression von murinem und humanem IL-18 in heterologen Cokulturen.....	52
Abb. 4.12	Expression der IL-18-Rezeptoren.....	52
Abb. 4.13	Expression von IL-18 und dem IL-18-Rezeptor α in OTKs.....	53
Abb. 4.14	Induktion der IL-18-mRNA durch FGF-7 bzw. GM-CSF.....	54
Abb. 4.15	Induktion der IL-18-mRNA unter Actinomycin D/Cycloheximid-Einfluss.....	55
Abb. 4.16	mIL-18-Expression im Verlauf der Wundheilung.....	55
Abb. 4.17	Expression des hIL-18-pro-Proteins in unter Einfluss von FGF-7 oder GM-CSF.....	56
Abb. 4.18	Freisetzung von humanem IL-18.....	56
Abb. 4.19	Expression von Interferon γ	57
Abb. 4.20	IL-18 induziert die Proliferation von Keratinozyten in Monokultur.....	58
Abb. 4.21	IL-18 induziert die Proliferation von Keratinozyten in heterologen Cokulturen.....	58
Abb. 4.22	Stimulation der Keratinozyten-Migration durch IL-18.....	59
Abb. 4.23	Organotypische Cokulturen unter Einfluss von IL-18 - Histologie.....	60
Abb. 4.24	Organotypische Cokulturen unter Einfluss von IL-18 - Differenzierungszustand.....	61
Abb. 4.25	Neutralisierung von IL-18 in FGF-7-stimulierten Cokulturen.....	62
Abb. 4.26	Neutralisierung von IL-18 in OTKs unter Einfluss von FGF-7 - Histologie.....	63
Abb. 4.27	Neutralisierung von IL-18 in OTKs unter FGF-7-Einfluss - Differenzierung.....	63
Abb. 4.28	Neutralisierung von IL-18 in GM-CSF-stimulierten Cokulturen.....	64
Abb. 4.29	Neutralisierung von IL-18 in Cokulturen in Anwesenheit von GM-CSF.....	64
Abb. 4.30	Neutralisierung von IL-18 in OTKs unter Einfluss von GM-CSF - Histologie.....	65
Abb. 4.31	Neutralisierung von IL-18 in OTKs unter GM-CSF-Einfluss - Differenzierung.....	66
Abb. 4.32	Neutralisierung von IL-18 und IL-18R α in OTKs unter GM-CSF-Einfluss.....	66
Abb. 4.33	Expression von IL-18-mRNA in HaCaT -und HaCaT-ras-Zellen.....	67

Abb. 4.34	Expression von pro-IL18 in HaCaT- und HaCaT-ras-Zellen.....	68
Abb. 4.35	Freisetzung von IL-18 durch HaCaT- und HaCaT-ras-Zellen.....	68
Abb. 4.36	Expression der IL-18-Rezeptoren im HaCaT-Modellsystem.....	69
Abb. 4.37	Zellzunahme in den verschiedenen HaCaT-Zellen unter Einfluss von IL-18.....	69
Abb. 5.1	Ausschnitt aus einem cDNA-Array nach Hybridisierung.....	73
Abb. 5.2	Induktion von IL-18 in Keratinozyten und seine Wirkungen.....	74
Abb. 5.3	Expression des FGFR-2-IIIb in organotypischen Epithelien.....	75
Abb. 5.4	FGF-7 und IL-18 in der dermal-epidermalen Interaktion.....	76
Abb. 5.5	Expression des GM-CSF-R α in organotypischen Epithelien.....	76
Abb. 5.6	GM-CSF und IL-18 in der dermal-epidermalen Interaktion.....	77
Abb. 5.7	Bedeutung von IL-18 in der Wundheilung der Haut.....	78

6.3 Literaturverzeichnis

- Ameglio, F., C. Bonifati, M. Fazio, A. Mussi, E. Trento, P. Cordial Fei, P. Donati, F. Pimpinelli, L. D'Auria and M. Carducci (1997). "Interleukin-11 production is increased in organ cultures of lesional skin of patients with active plaque-type psoriasis as compared with nonlesional and normal skin. Similarity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8." *Arch Dermatol Res* 289(7): 399-403.
- Andreadis, S. T., K. E. Hamoen, M. L. Yarmush and J. R. Morgan (2001). "Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system." *Faseb J* 15(6): 898-906.
- Beyer, T. A., S. Werner, C. Dickson and R. Grose (2003). "Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair." *Exp Cell Res* 287(2): 228-36.
- Bhardwaj, A. and B. B. Aggarwal (2003). "Receptor-mediated choreography of life and death." *J Clin Immunol* 23(5): 317-32.
- Bhattacharya, S., B. A. Stout, M. E. Bates, P. J. Bertics and J. S. Malter (2001). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 activate STAT5 and induce CIS1 mRNA in human peripheral blood eosinophils." *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(3): 312-6.
- Bikle, D. D., D. Ng, C. L. Tu, Y. Oda and Z. Xie (2001). "Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation." *Mol Cell Endocrinol* 177(1-2): 161-71.
- Boilly, B., A. S. Vercoutter-Edouart, H. Hondermarck, V. Nurcombe and X. Le Bourhis (2000). "FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways." *Cytokine Growth Factor Rev* 11(4): 295-302.
- Booth, C. and C. S. Potten (1995). "Effects of IL-11 on the growth of intestinal epithelial cells in vitro." *Cell Prolif* 28(11): 581-94.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-71.
- Boukamp, P., E. J. Stanbridge, D. Y. Foo, P. A. Cerutti and N. E. Fusenig (1990). "c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy." *Cancer Res* 50(9): 2840-7.
- Brandeis, M., I. Rosewell, M. Carrington, T. Crompton, M. A. Jacobs, J. Kirk, J. Gannon and T. Hunt (1998). "Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4344-9.

- Brauchle, M., K. Angermeyer, G. Hubner and S. Werner (1994). "Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts." *Oncogene* 9(11): 3199-204.
- Braunstein, S., G. Kaplan, A. B. Gottlieb, M. Schwartz, G. Walsh, R. M. Abalos, T. T. Fajardo, L. S. Guido and J. G. Krueger (1994). "GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin in vivo." *J Invest Dermatol* 103(4): 601-4.
- Breuhahn, K., A. Mann, G. Muller, A. Wilhelmi, P. Schirmacher, A. Enk and M. Blessing (2000). "Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis." *Cell Growth Differ* 11(2): 111-21.
- Cao, R., J. Farnebo, M. Kurimoto and Y. Cao (1999). "Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor." *Faseb J* 13(15): 2195-202.
- Carrascal, M. T., L. Mendoza, M. Valcarcel, C. Salado, E. Egilegor, N. Telleria, F. Vidal-Vanaclocha and C. A. Dinarello (2003). "Interleukin-18 binding protein reduces b16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing adhesiveness and growth factors of sinusoidal endothelium." *Cancer Res* 63(2): 491-7.
- Chedid, M., J. S. Rubin, K. G. Csaky and S. A. Aaronson (1994). "Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1." *J Biol Chem* 269(14): 10753-7.
- Chia, C. S., K. Ban, H. Ithnin, H. Singh, R. Krishnan, S. Mokhtar, N. Malihan and H. F. Seow (2002). "Expression of interleukin-18, interferon-gamma and interleukin-10 in hepatocellular carcinoma." *Immunol Lett* 84(3): 163-72.
- Cho, D., H. Song, Y. M. Kim, D. Houh, D. Y. Hur, H. Park, D. Yoon, K. H. Pyun, W. J. Lee, M. Kurimoto, Y. B. Kim, Y. S. Kim and I. Choi (2000). "Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates." *Cancer Res* 60(10): 2703-9.
- Clark, R. A. (2003). "Epithelial-mesenchymal networks in wounds: a hierarchical view." *J Invest Dermatol* 120(6): ix-xi.
- Companjen, A. R., V. H. van der Velden, A. Vooy, R. Debets, R. Benner and E. P. Prens (2000). "Human keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form." *Eur Cytokine Netw* 11(3): 383-90.
- Coulombe, P. A. (2003). "Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery." *J Invest Dermatol* 121(2): 219-30.
- Crane, I. J., C. A. Wallace and J. V. Forrester (2001). "Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human retinal pigment epithelial cells by IL-1beta and IFN-gamma." *Cell Immunol* 209(2): 132-9.
- Cumberbatch, M., R. J. Dearman, C. Antonopoulos, R. W. Groves and I. Kimber (2001). "Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha and IL-1beta-dependent mechanism." *Immunology* 102(3): 323-30.
- Czaja, M. J., F. R. Weiner, M. Eghbali, M. A. Giambrone and M. A. Zern (1987). "Differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression." *J Biol Chem* 262(27): 13348-51.
- Danilenko, D. M., B. D. Ring, J. E. Tarpley, B. Morris, G. Y. Van, A. Morawiecki, W. Callahan, M. Goldenberg, S. Hersenson and G. F. Pierce (1995a). "Growth factors in porcine full and partial thickness burn repair. Differing targets and effects of keratinocyte growth factor, platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, and neu differentiation factor." *Am J Pathol* 147(5): 1261-77.
-

- Danilenko, D. M., B. D. Ring, D. Yanagihara, W. Benson, B. Wiemann, C. O. Starnes and G. F. Pierce (1995b). "Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia." *Am J Pathol* 147(1): 145-54.
- Datta, S. R., A. M. Ranger, M. Z. Lin, J. F. Sturgill, Y. C. Ma, C. W. Cowan, P. Dikkes, S. J. Korsmeyer and M. E. Greenberg (2002). "Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis." *Dev Cell* 3(5): 631-43.
- Dinarello, C. A., D. Novick, A. J. Puren, G. Fantuzzi, L. Shapiro, H. Muhl, D. Y. Yoon, L. L. Reznikov, S. H. Kim and M. Rubinstein (1998). "Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor." *J Leukoc Biol* 63(6): 658-64.
- Dranoff, G., A. D. Crawford, M. Sadelain, B. Ream, A. Rashid, R. T. Bronson, G. R. Dickersin, C. J. Bachurski, E. L. Mark, J. A. Whitsett and et al. (1994). "Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis." *Science* 264(5159): 713-6.
- Du, X. and D. A. Williams (1997). "Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use." *Blood* 89(11): 3897-908.
- El Ghalbzouri, A., M. Jonkman, J. Kempenaar and M. Ponc (2003). "Recessive epidermolysis bullosa simplex phenotype reproduced in vitro: ablation of keratin 14 is partially compensated by keratin 17." *Am J Pathol* 163(5): 1771-9.
- Elias, J. A., T. Zheng, O. Einarsson, M. Landry, T. Trow, N. Rebert and J. Panuska (1994a). "Epithelial interleukin-11. Regulation by cytokines, respiratory syncytial virus, and retinoic acid." *J Biol Chem* 269(35): 22261-8.
- Elias, J. A., T. Zheng, N. L. Whiting, T. K. Trow, W. W. Merrill, R. Zitnik, P. Ray and E. M. Alderman (1994b). "IL-1 and transforming growth factor-beta regulation of fibroblast-derived IL-11." *J Immunol* 152(5): 2421-9.
- Emoto, H., S. Tagashira, M. G. Mattei, M. Yamasaki, G. Hashimoto, T. Katsumata, T. Negoro, M. Nakatsuka, D. Birnbaum, F. Coulier and N. Itoh (1997). "Structure and expression of human fibroblast growth factor-10." *J Biol Chem* 272(37): 23191-4.
- Epling-Burnette, P. K., B. Zhong, F. Bai, K. Jiang, R. D. Bailey, R. Garcia, R. Jove, J. Y. Djeu, T. P. Loughran, Jr. and S. Wei (2001). "Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils." *J Immunol* 166(12): 7486-95.
- Fajka-Boja, R., M. Szemes, G. Ion, A. Legradi, M. Caron and E. Monostori (2002). "Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines." *Immunol Lett* 82(1-2): 149-54.
- Fantuzzi, G. and C. A. Dinarello (1999). "Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1)." *J Clin Immunol* 19(1): 1-11.
- Finch, P. W., C. Lengel and M. Chedid (1995). "Cloning and characterization of the promoter region of the human keratinocyte growth factor gene." *J Biol Chem* 270(19): 11230-7.
- Finch, P. W., F. Murphy, I. Cardinale and J. G. Krueger (1997). "Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis." *Am J Pathol* 151(6): 1619-28.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo and S. Tsukita (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." *J Cell Biol* 156(6): 1099-111.
- Fusenig, N. E. and P. Boukamp (1998). "Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes." *Mol Carcinog* 23(3): 144-58.
-

- Fusenig, N. E., A. Limat, H. J. Stark and D. Breitkreutz (1994). "Modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes of the hair follicle and from epidermis." *J Dermatol Sci 7 Suppl*: S142-51.
- Fusenig, N. E. and P. K. Worst (1975). "Mouse epidermal cell cultures. II. Isolation, characterization and cultivation of epidermal cells from perinatal mouse skin." *Exp Cell Res 93(2)*: 443-57.
- Gasson, J. C. (1991). "Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood 77(6)*: 1131-45.
- Gautier, J., T. Matsukawa, P. Nurse and J. Maller (1989). "Dephosphorylation and activation of Xenopus p34cdc2 protein kinase during the cell cycle." *Nature 339(6226)*: 626-9.
- Goldring, K., G. E. Jones, R. Thiagarajah and D. J. Watt (2002). "The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro." *J Cell Sci 115(Pt 2)*: 355-66.
- Gordon, M. Y., G. P. Riley, S. M. Watt and M. F. Greaves (1987). "Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment." *Nature 326(6111)*: 403-5.
- Gotz, R., C. Karch, M. R. Digby, J. Troppmair, U. R. Rapp and M. Sendtner (2000). "The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells." *Hum Mol Genet 9(17)*: 2479-89.
- Gu, Y., K. Kuida, H. Tsutsui, G. Ku, K. Hsiao, M. A. Fleming, N. Hayashi, K. Higashino, H. Okamura, K. Nakanishi, M. Kurimoto, T. Tanimoto, R. A. Flavell, V. Sato, M. W. Harding, D. J. Livingston and M. S. Su (1997). "Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme." *Science 275(5297)*: 206-9.
- Guo, L., L. Degenstein and E. Fuchs (1996). "Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing." *Genes Dev 10(2)*: 165-75.
- Guthridge, M. A., F. C. Stomski, D. Thomas, J. M. Woodcock, C. J. Bagley, M. C. Berndt and A. F. Lopez (1998). "Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors." *Stem Cells 16(5)*: 301-13.
- Gyotoku, E., E. Morita, Y. Kameyoshi, T. Hiragun, S. Yamamoto and M. Hide (2001). "The IL-6 family cytokines, interleukin-6, interleukin-11, oncostatin M, and leukemia inhibitory factor, enhance mast cell growth through fibroblast-dependent pathway in mice." *Arch Dermatol Res 293(10)*: 508-14.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell 100(1)*: 57-70.
- Heymann, D. and A. V. Rousselle (2000). "gp130 Cytokine family and bone cells." *Cytokine 12(10)*: 1455-68.
- Howie, S. E., R. D. Aldridge, E. McVittie, R. J. Forsey, C. Sands and J. A. Hunter (1996). "Epidermal keratinocyte production of interferon-gamma immunoreactive protein and mRNA is an early event in allergic contact dermatitis." *J Invest Dermatol 106(6)*: 1218-23.
- Ju, D. W., Q. Tao, G. Lou, M. Bai, L. He, Y. Yang and X. Cao (2001). "Interleukin 18 transfection enhances antitumor immunity induced by dendritic cell-tumor cell conjugates." *Cancer Res 61(9)*: 3735-40.
- Kalina, U., K. Ballas, N. Koyama, D. Kauschat, C. Miething, J. Arnemann, H. Martin, D. Hoelzer and O. G. Ottmann (2000). "Genomic organization and regulation of the human interleukin-18 gene." *Scand J Immunol 52(6)*: 525-30.
- Kampfer, H., U. Kalina, H. Muhl, J. Pfeilschifter and S. Frank (1999). "Counterregulation of interleukin-18 mRNA and protein expression during cutaneous wound repair in mice." *J Invest Dermatol 113(3)*: 369-74.
- Kampfer, H., J. Paulukat, H. Muhl, C. Wetzler, J. Pfeilschifter and S. Frank (2000). "Lack of interferon-gamma production despite the presence of interleukin-18 during cutaneous wound healing." *Mol Med 6(12)*: 1016-27.
-

- Kaplan, G., G. Walsh, L. S. Guido, P. Meyn, R. A. Burkhardt, R. M. Abalos, J. Barker, P. A. Frindt, T. T. Fajardo, R. Celona and et al. (1992). "Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing." *J Exp Med* 175(6): 1717-28.
- Kastelein, R. A. and A. B. Shanafelt (1993). "GM-CSF receptor: interactions and activation." *Oncogene* 8(2): 231-6.
- Kobashi, K., H. Iwagaki, T. Yoshino, Y. Morimoto, H. Kohka, M. Kodama, M. Nishibori, T. Akagi and N. Tanaka (2001). "Down-regulation of IL-18 receptor in cancer patients: its clinical significance." *Anticancer Res* 21(5): 3285-93.
- Koizumi, H., K. C. Sato-Matsumura, H. Nakamura, K. Shida, S. Kikkawa, M. Matsumoto, K. Toyoshima and T. Seya (2001). "Distribution of IL-18 and IL-18 receptor in human skin: various forms of IL-18 are produced in keratinocytes." *Arch Dermatol Res* 293(7): 325-33.
- Konishi, H., H. Tsutsui, T. Murakami, S. Yumikura-Futatsugi, K. Yamanaka, M. Tanaka, Y. Iwakura, N. Suzuki, K. Takeda, S. Akira, K. Nakanishi and H. Mizutani (2002). "IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11340-5.
- Krakowski, M. L., M. R. Kritzik, E. M. Jones, T. Krahl, J. Lee, M. Arnush, D. Gu and N. Sarvetnick (1999). "Pancreatic expression of keratinocyte growth factor leads to differentiation of islet hepatocytes and proliferation of duct cells." *Am J Pathol* 154(3): 683-91.
- Lang, R. A., D. Metcalf, R. A. Cuthbertson, I. Lyons, E. Stanley, A. Kelso, G. Kannourakis, D. J. Williamson, G. K. Klintworth, T. J. Gonda and et al. (1987). "Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage." *Cell* 51(4): 675-86.
- Latkowski, J. M., I. M. Freedberg and M. Blumenberg (1995). "Keratinocyte growth factor and keratin gene regulation." *J Dermatol Sci* 9(1): 36-44.
- Lazar-Molnar, E., H. Hegyesi, S. Toth and A. Falus (2000). "Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma." *Cytokine* 12(6): 547-54.
- Lebeche, D., S. Malpel and W. V. Cardoso (1999). "Fibroblast growth factor interactions in the developing lung." *Mech Dev* 86(1-2): 125-36.
- Lehtonen, A., S. Matikainen, M. Miettinen and I. Julkunen (2002). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation." *J Leukoc Biol* 71(3): 511-9.
- Ley, K. (2003). "Healing without inflammation?" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(4): R718-9.
- Maas-Szabowski, N. and N. E. Fusenig (1996). "Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts." *J Invest Dermatol* 107(6): 849-55.
- Maas-Szabowski, N., A. Shimotoyodome and N. E. Fusenig (1999). "Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism." *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 1843-53.
- Maas-Szabowski, N., H. J. Stark and N. E. Fusenig (2000). "Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts." *J Invest Dermatol* 114(6): 1075-84.
- Maas-Szabowski, N., A. Szabowski, H. J. Stark, S. Andrecht, A. Kolbus, M. Schorpp-Kistner, P. Angel and N. E. Fusenig (2001). "Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation." *J Invest Dermatol* 116(5): 816-20.
-

- Mahboubi, K., B. C. Biedermann, J. M. Carroll and J. S. Pober (2000). "IL-11 activates human endothelial cells to resist immune-mediated injury." *J Immunol* 164(7): 3837-46.
- Mann, A., K. Breuhahn, P. Schirmacher and M. Blessing (2001). "Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization." *J Invest Dermatol* 117(6): 1382-90.
- Marchese, C., M. Chedid, O. R. Dirsch, K. G. Csaky, F. Santanelli, C. Latini, W. J. LaRochelle, M. R. Torrisi and S. A. Aaronson (1995). "Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin." *J Exp Med* 182(5): 1369-76.
- Martin, P., J. Hopkinson-Woolley and J. McCluskey (1992). "Growth factors and cutaneous wound repair." *Prog Growth Factor Res* 4(1): 25-44.
- Marvin, K. W., M. D. George, W. Fujimoto, N. A. Saunders, S. H. Bernacki and A. M. Jetten (1992). "Cornifin, a cross-linked envelope precursor in keratinocytes that is down-regulated by retinoids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 11026-30.
- Matoltsy, A. G. (1986a). *Dermis. Biology of the Integument, Vol. 2, Vertebrates*. K. S. Richards. Berlin, Springer-Verlag: 272-277.
- Matoltsy, A. G. (1986b). *Structure and Function of the Mammalian Epidermis. Biology of the Integument, Vol. 2, Vertebrates*. K. S. Richards. Berlin, Springer-Verlag: 255-268.
- Modrowski, D., A. Lomri and P. J. Marie (1997). "Endogenous GM-CSF is involved as an autocrine growth factor for human osteoblastic cells." *J Cell Physiol* 170(1): 35-46.
- Moore, M. B., Z. B. Kurago, C. A. Fullenkamp and C. T. Lutz (2003). "Squamous cell carcinoma cells differentially stimulate NK cell effector functions: the role of IL-18." *Cancer Immunol Immunother* 52(2): 107-15.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (1999). "Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression." *Int J Cancer* 83(6): 780-9.
- Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui and H. Okamura (2001). "Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses." *Annu Rev Immunol* 19: 423-74.
- Ohta, Y., Y. Hamada and K. Katsuoka (2001). "Expression of IL-18 in psoriasis." *Arch Dermatol Res* 293(7): 334-42.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome Biol* 2(3): REVIEWS3005.
- Park, H., D. Byun, T. S. Kim, Y. I. Kim, J. S. Kang, E. S. Hahm, S. H. Kim, W. J. Lee, H. K. Song, D. Y. Yoon, C. J. Kang, C. Lee, D. Houh, H. Kim, B. Cho, Y. Kim, Y. H. Yang, K. H. Min and D. H. Cho (2001). "Enhanced IL-18 expression in common skin tumors." *Immunol Lett* 79(3): 215-9.
- Parrott, J. A., R. Mosher, G. Kim and M. K. Skinner (2000). "Autocrine interactions of keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit-ligand in the regulation of normal ovarian surface epithelial cells." *Endocrinology* 141(7): 2532-9.
- Pastore, S., E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, L. M. Chinni, A. Giannetti and G. Girolomoni (1997). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin." *J Clin Invest* 99(12): 3009-17.
- Paz, A., R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan and Y. Kloog (2001). "Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation." *Oncogene* 20(51): 7486-93.
- Plevova, P. (1999). "Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: a review." *Oral Oncol* 35(5): 453-70.
-

- Puren, A. J., G. Fantuzzi, Y. Gu, M. S. Su and C. A. Dinarello (1998). "Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^+$ human blood mononuclear cells." *J Clin Invest* 101(3): 711-21.
- Reibman, J., A. T. Talbot, Y. Hsu, G. Ou, J. Jover, D. Nilsen and M. H. Pillinger (2000). "Regulation of expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human bronchial epithelial cells: roles of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases." *J Immunol* 165(3): 1618-25.
- Ropiquet, F., S. Huguenin, J. M. Villette, V. Ronfle, G. Le Brun, N. J. Maitland, O. Cussenot, J. Fiet and P. Berthon (1999). "FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostatic epithelial PNT1A cells." *Int J Cancer* 82(2): 237-43.
- Rubin, J. S., D. P. Bottaro, M. Chedid, T. Miki, D. Ron, G. Cheon, W. G. Taylor, E. Fortney, H. Sakata, P. W. Finch and et al. (1995). "Keratinocyte growth factor." *Cell Biol Int* 19(5): 399-411.
- Schlessinger, J., A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahim, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt and M. Mohammadi (2000). "Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization." *Mol Cell* 6(3): 743-50.
- Schoop, V. M., N. Mirancea and N. E. Fusenig (1999). "Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts." *J Invest Dermatol* 112(3): 343-53.
- Schreiber, M., A. Kolbus, F. Piu, A. Szabowski, U. Mohle-Steinlein, J. Tian, M. Karin, P. Angel and E. F. Wagner (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." *Genes Dev* 13(5): 607-19.
- Scordi, I. A., M. Nassiri, A. J. Hanly and V. Vincek (1999). "Interleukin 11 reduces apoptosis in UVB-irradiated mouse skin." *Dermatology* 199(4): 296-301.
- Scott, K. and J. Zhang (2002). "Partial identification by site-directed mutagenesis of a cell growth inhibitory site on the human galectin-1 molecule." *BMC Cell Biol* 3(1): 3.
- Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." *N Engl J Med* 341(10): 738-46.
- Smith, P. J., D. J. Cousins, Y. K. Jee, D. Z. Staynov, T. H. Lee and P. Lavender (2001). "Suppression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by glucocorticoids involves inhibition of enhancer function by the glucocorticoid receptor binding to composite NF-AT/activator protein-1 elements." *J Immunol* 167(5): 2502-10.
- Smola, H., G. Thiekotter and N. E. Fusenig (1993). "Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction." *J Cell Biol* 122(2): 417-29.
- Sobotta, J. (1997). *Histologie*. U. Welsch. München, Urban & Schwarzenberg.
- Stark, H., N. Maas-Szabowski, H. Smola, D. Breitkreutz, N. Mirancea and N. Fusenig (2001). *Organotypic Keratinocyte-Fibroblast Cocultures: in Vitro Skin Equivalents to Study the Molecular Mechanisms of Cutaneous Regeneration. Cultured Human Keratinocytes and Tissue Engineered Skin Substitutes*. B. Achauer. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 163-172.
- Stark, H. J., M. Baur, D. Breitkreutz, N. Mirancea and N. E. Fusenig (1999). "Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation." *J Invest Dermatol* 112(5): 681-91.
- Szabowski, A., N. Maas-Szabowski, S. Andrecht, A. Kolbus, M. Schorpp-Kistner, N. E. Fusenig and P. Angel (2000). "c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin." *Cell* 103(5): 745-55.
- Tanaka, N., A. Fujioka, S. Tajima, A. Ishibashi and S. Hirose (2000). "Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α stimulate its secretion in vitro." *Br J Dermatol* 143(4): 728-32.
-

- Tang, W., G. P. Geba, T. Zheng, P. Ray, R. J. Homer, C. Kuhn, 3rd, R. A. Flavell and J. A. Elias (1996). "Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction." *J Clin Invest* 98(12): 2845-53.
- Udagawa, N., N. J. Horwood, J. Elliott, A. Mackay, J. Owens, H. Okamura, M. Kurimoto, T. J. Chambers, T. J. Martin and M. T. Gillespie (1997). "Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation." *J Exp Med* 185(6): 1005-12.
- Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura and M. Kurimoto (1996). "Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein." *J Immunol* 156(11): 4274-9.
- Vaillant, P., V. Muller, Y. Martinet and N. Martinet (1993). "Human granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors are chemotactic and "competence" growth factors for human mesenchymal cells." *Biochem Biophys Res Commun* 192(2): 879-85.
- Valdembri, D., G. Serini, A. Vacca, D. Ribatti and F. Bussolino (2002). "In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF." *Faseb J* 16(2): 225-7.
- Vilcek, J. (1998). *The Cytokines: An Overview. The Cytokine Handbook*. A. Thomson. San Diego, Academic Press: 1-20.
- Wang, J., Z. Zhu, R. Nolfo and J. A. Elias (1999). "Dexamethasone regulation of lung epithelial cell and fibroblast interleukin-11 production." *Am J Physiol* 276(1 Pt 1): L175-85.
- Wang, Z. Y., A. Gaggero, A. Rubartelli, O. Rosso, S. Miotti, D. Mezzanatica, S. Canevari and S. Ferrini (2002). "Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: evidence for defective processing in tumor cells." *Int J Cancer* 98(6): 873-8.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay (2002). "Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(5): L924-40.
- Werner, S. (1998). "Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes." *Cytokine Growth Factor Rev* 9(2): 153-65.
- Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." *Physiol Rev* 83(3): 835-70.
- Werner, S., H. Smola, X. Liao, M. T. Longaker, T. Krieg, P. H. Hofschneider and L. T. Williams (1994). "The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds." *Science* 266(5186): 819-22.
- Wilson, S. E., J. W. Walker, E. L. Chwang and Y. G. He (1993). "Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(8): 2544-61.
- Wu, H., J. R. Stanley and G. Cotsarelis (2003). "Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation." *J Invest Dermatol* 120(6): 1052-7.
- Xing, Z., T. Braciak, Y. Ohkawara, J. M. Sallenave, R. Foley, P. J. Sime, M. Jordana, F. L. Graham and J. Gauldie (1996). "Gene transfer for cytokine functional studies in the lung: the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation." *J Leukoc Biol* 59(4): 481-8.
- Xing, Z., J. Gauldie, G. M. Tremblay, B. R. Hewlett and C. Addison (1997). "Intradermal transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces
-

- neutrophilia, epidermal hyperplasia, Langerhans' cell/macrophage accumulation, and dermal fibrosis." *Lab Invest* 77(6): 615-22.
- Yamanaka, K., M. Tanaka, H. Tsutsui, T. S. Kupper, K. Asahi, H. Okamura, K. Nakanishi, M. Suzuki, N. Kayagaki, R. A. Black, D. K. Miller, K. Nakashima, M. Shimizu and H. Mizutani (2000). "Skin-specific caspase-1-transgenic mice show cutaneous apoptosis and pre-endotoxin shock condition with a high serum level of IL-18." *J Immunol* 165(2): 997-1003.
- Yamashita, K., T. Iwasaki, T. Tsujimura, A. Sugihara, N. Yamada, H. Ueda, H. Okamura, H. Futani, S. Maruo and N. Terada (2002). "Interleukin-18 inhibits lodging and subsequent growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow." *Oncol Rep* 9(6): 1237-44.
- Young, M. R., M. A. Wright, Y. Lozano, M. M. Prechel, J. Benefield, J. P. Leonetti, S. L. Collins and G. J. Petruzzelli (1997). "Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells." *Int J Cancer* 74(1): 69-74.
- Zhou, M., Y. Zhang, J. A. Ardans and L. M. Wahl (2003). "Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8." *J Biol Chem* 278(46): 45406-13.