

**Funktionale Charakterisierung von Rac1
in der epidermalen Wundheilung
in vivo und *in vitro***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Michael Tschardtke

aus Bonn

Copy Team Cologne GmbH

2006

Berichterstatter:

Prof. Dr. Helmut Klein

Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf

Vorsitzender:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

5. Juli 2006

für meine Familie

1	Einleitung.....	1
1.1	Struktur und Funktion der Haut.....	1
1.1.1	Epithelien: allgemeine Charakteristika.....	1
1.1.2	Epidermis.....	1
1.1.2.1	Funktion der Epidermis.....	1
1.1.2.2	Aufbau der Epidermis.....	2
1.1.3	Charakterisierung der Zelldifferenzierung.....	4
1.1.4	Migration von Keratinozyten.....	6
1.1.5	Proliferation von Keratinozyten und epidermalen Stammzellen.....	7
1.2	Kleine GTPasen (G-Proteine).....	9
1.2.1	Struktur der Kleinen GTPasen.....	9
1.2.2	Zyklische Aktivierung und Inaktivierung von Kleinen GTPasen.....	11
1.2.3	Rho GTPasen.....	12
1.2.4	Aufgaben der Kleinen GTPasen der Rho Familie.....	13
1.2.4.1	Rho GTPasen in nicht-epithelialen Zellen.....	13
1.2.4.2	Rho GTPasen in epithelialen Zellen.....	14
1.3	Rac 1, 2 und 3.....	15
1.3.1	Rac1.....	16
1.3.1.1	Rolle von Rac1 bei der Zellmigration und der Bildung einer Zellgestalt.....	16
1.3.1.2	Rolle von Rac1 in der Zellproliferation.....	18
1.3.1.3	Spleissvariante Rac1b.....	19
1.3.2	Rac2.....	19
1.3.3	Rac3.....	20
1.4	Kutane Wundheilung.....	21
1.4.1	Hämostase.....	21
1.4.2	Entzündung.....	22
1.4.3	Epithelialisierung.....	22
1.4.4	Bildung von Narbengewebe.....	24
1.5	Fragestellung.....	25
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Materialien.....	26
2.1.1	Chemikalien.....	26
2.1.2	Zellkulturmaterialien.....	26
2.1.3	Häufig verwendete Lösungen und Puffer.....	26
2.1.4	Enzyme.....	27
2.1.5	Kits und weitere Materialien.....	27
2.1.6	Antikörper.....	28

2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1 Bakterientransformation mit chemokompetenten Zellen.....	29
2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen.....	29
2.2.1.3 DNA Isolation aus Mausschwänzen.....	30
2.2.1.4 DNA Isolation aus Keratinocyten.....	30
2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA.....	31
2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.1.8 Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	31
2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.2.1.10 Southern Blot Analyse.....	33
2.2.1.10.1 Nukleinsäuretransfer auf Cellulosemembran.....	33
2.2.1.10.2 Hybridisierung mit DNA-Sonden.....	33
2.2.1.11 Bestimmung der Kopienzahl von Genen.....	34
2.2.2 Zellkultur.....	34
2.2.2.1 Isolation von murinen Keratinozyten.....	34
2.2.2.1.1 Isolation von Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen.....	34
2.2.2.1.2 Isolation von Keratinozyten aus adulten Mäusen.....	35
2.2.2.2 Einfrieren von Maus Keratinozyten.....	36
2.2.2.3 Transfektion humaner Keratinozyten.....	36
2.2.2.4 Analyse des Ausbreitungsverhalten von murinen Keratinozyten...	37
2.2.2.5 Analyse des Adhäsionsverhalten von murinen Keratinozyten.....	37
2.2.2.6 <i>In vitro</i> Wundheilungsversuche mit murinen Keratinozyten.....	38
2.2.2.7 FACS-Analyse humaner Keratinozyten.....	38
2.2.2.8 Integrin-Analyse muriner Keratinozyten.....	38
2.2.2.9 Time-lapse Videomikroskopie.....	39
2.2.3 Biochemische Methoden.....	39
2.2.3.1 Proteinextraktion.....	39
2.2.3.2 Western Blot Analyse.....	40
2.2.3.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	40
2.2.3.2.2 Immundetektion von Proteinen.....	40
2.2.4 Immunhistologische Untersuchungen.....	41
2.2.4.1 Färbung des Myc-Tags.....	41
2.2.4.2 Immunfloreszenzfärbung von Bromdeoxyuridin (BrdU).....	41
2.2.4.2.1 BrdU-Färbung in der Maushaut.....	41
2.2.4.2.2 BrdU-Färbung in Mauskeratinozyten.....	42
2.2.4.3 Färbung von Differenzierungsmarkerproteinen in der Maushaut...	42
2.2.4.4 Färbung von Adhäsions- und Basalmembranmarkerproteinen in der Maushaut.....	43
2.2.4.5 Hämatoxilin und Eosinfärbung (HE-Färbung).....	44
2.2.4.6 Färbung von pERK und pStat3 in Mauswunden.....	44
2.2.4.7 Färbung von Vinculin in Mauskeratinozyten.....	44
2.2.5 Mausexperimente <i>in vivo</i>	45
2.2.5.1 Wundheilung in Mäusen.....	45
2.2.5.2 Tumorinduktion durch Bestrahlung von Mäusen.....	45

3	Ergebnisse.....	46
3.1	Transiente Transfektion humaner Keratinozyten.....	46
3.1.1	Beschreibung der Ausgangsplasmide.....	46
3.1.2	Etablierung der transienten Transfektion durch Elektroporation.....	47
3.1.2.1	1. Testreihe der Transfektion.....	47
3.1.2.2	2. Testreihe der Transfektion.....	48
3.1.3	Überprüfung der Funktionalität der Ausgangsplasmide.....	50
3.2	Klonierung in eine Keratin14-Expressionskassette.....	52
3.3	Charakterisierung der N17Rac1 transgenen Mäuse.....	55
3.3.1	Nachweis der Integration des Transgens auf DNA-Ebene.....	55
3.3.2	Nachweis der Expression von N17Rac1 und der Lokalisation des Transgens.....	56
3.3.3	Isolation von N17Rac1 transgenen primären Keratinozyten.....	58
3.3.4	Untersuchungen in der Epidermis von N17Rac1 transgenen Mäusen.....	59
3.4	Wundheilung <i>in vivo</i>	62
3.4.1	Charakterisierung der Wundheilung an N17Rac1 transgenen und epidermisspezifischen konditionalen Rac1 Knockout-Mäusen.....	62
3.4.1.1	Vermessung der epithelialen Zunge von N17Rac1 transgenen Mauswunden.....	62
3.4.1.2	Vermessung der epithelialen Zunge aus Wunden von Konditionalen Rac1 Knockout Mäusen (Rac1 ^{E-KO}).....	65
3.4.2	Bestimmung der Proliferation.....	66
3.5	Wundheilung <i>in vitro</i>	70
3.5.1	Migrationsstudien an Keratinozyten.....	72
3.5.2	Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens.....	76
3.5.3	Charakterisierung des Ausbreitungs-Verhaltens.....	78
3.5.4	Untersuchungen von Zell-Matrixkontakten.....	79
3.5.5	Bestimmung der Kopienzahl des N17Rac1-Transgens in Keratinozyten.....	82
3.6	Auswirkungen von N17Rac1 im Tumormodell Keratin14-HPV8.....	84
3.7	Charakterisierung der L61Rac1 transgenen Mäuse.....	88
3.7.1	Nachweis der Integration des Transgens auf DNA-Ebene.....	88
3.7.2	Nachweis der Expression von L61Rac1.....	89
3.7.3	Auswirkungen von N17Rac1 im Tumormodell Keratin14-Δlef.....	90

4	Diskussion.....	94
4.1	Generierung und Charakterisierung der transgenen Mäuse.....	94
4.2	Funktionen von Rac1 in der epithelialen Wundheilung in vivo.....	97
4.2.1	Regulation der Keratinozytenproliferation durch Rac1.....	98
4.2.2	Die Rolle von Rac1 in der Migration.....	100
4.3	Funktion von Rac1 in der Tumorentwicklung und -differenzierung.....	104
4.3.1	Die Expression von N17Rac1 in der Epidermis von HPV8 transgenen Mäusen führt zur Reduktion der Tumorentwicklung.....	104
4.3.2	Expression von L61Rac1 in der Epidermis von Δ Nlef transgenen Mäusen führt zu einer Entdifferenzierung von Talgdrüsentumoren....	107
5	Zusammenfassung - Abstract.....	109
5.1	Zusammenfassung.....	109
5.2	Abstract.....	110
6	Abkürzungsverzeichnis.....	113
7	Literatur.....	116

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion der Haut

1.1.1 Epithelien: allgemeine Charakteristika

Epithelien sind in sich geschlossene Zellverbände. Sie bedecken die Außenseite des Körpers sowie Organe und Körperhöhlen und dienen als Schutz, zur Exkretion von Abfällen oder der Sekretion von Hormonen oder Enzymen. Die freie Seite der Epithelien kommt mit Luft oder Flüssigkeit in Berührung, während die Zellen an der Basis der Epithelien auf einer Basalmembran angewachsen sind. Diese besonderen Zellverbände werden klassifiziert nach der Anzahl der Zellschichten und der Form der Zellen. Man unterscheidet zwischen Plattenepithelien, Pflasterepithelien, Zylinderepithelien, mehrschichtigen Epithelien und Wimperepithelien.

1.1.2 Epidermis

Die Epidermis ist ein Plattenepithel, welches aus bis zu 20 horizontalen Zelllagen besteht. Jede dieser Lagen besitzt besondere morphologische und funktionale Eigenschaften. Die dominierenden Zellen in der Epidermis sind mit 90 % die Keratinozyten. Zusätzlich befinden sich in ihr noch Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen, die für die Antigenpräsentation, Pigmentierung und für die Verarbeitung mechanischer Reize gebraucht werden. Die Epidermis wird von der Dermis durch die Basalmembran getrennt (Abbildung 1.1).

1.1.2.1 Funktion der Epidermis

Das Hautorgan erfüllt Sinnesfunktionen sowie Kontakt- und Schutzfunktionen. Die ersteren erfolgen über Sinnesrezeptoren für Wärme, Tastreize und Schmerz. Die Schutzfunktionen sind sehr vielfältig. Man spricht vor allem von der sogenannten Barrierefunktion der Haut. Durch sie wird der Stoffaustausch zwischen Organismus und Umwelt weitgehend kontrolliert. Die Hornschicht der Epidermis verhindert hierbei das Austrocknen und das Eindringen von Mikroorganismen. Gleichfalls schützt die Haut vor Schäden in Folge von UV Lichteinstrahlung durch die Melaninpigmentierung

und bietet immunologischen Schutz, beispielsweise mittels antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen der Epidermis.

1.1.2.2 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis und das angrenzende Gewebe der Dermis werden durch die Basalmembran getrennt (Abbildung 1.1). Die Keratinozytenschicht mit direktem Kontakt zur Basalmembran wird auch Stratum basale genannt. Diese Zellen sind proliferationskompetent und undifferenziert. Nachkommen dieser Zellen durchwandern die Epidermis und durchlaufen währenddessen einen streng regulierten Differenzierungsprozess. Nach etwa vier Wochen sind sie vollständig verhornt und sterben ab. Diese Zellen stammen von sogenannten Stammzellen ab, die hauptsächlich in der „Bulge“-Region der Haarfollikel vorkommen. Ein geringer Anteil der Stammzellen kommt auch in der interfollikularen Epidermis vor.

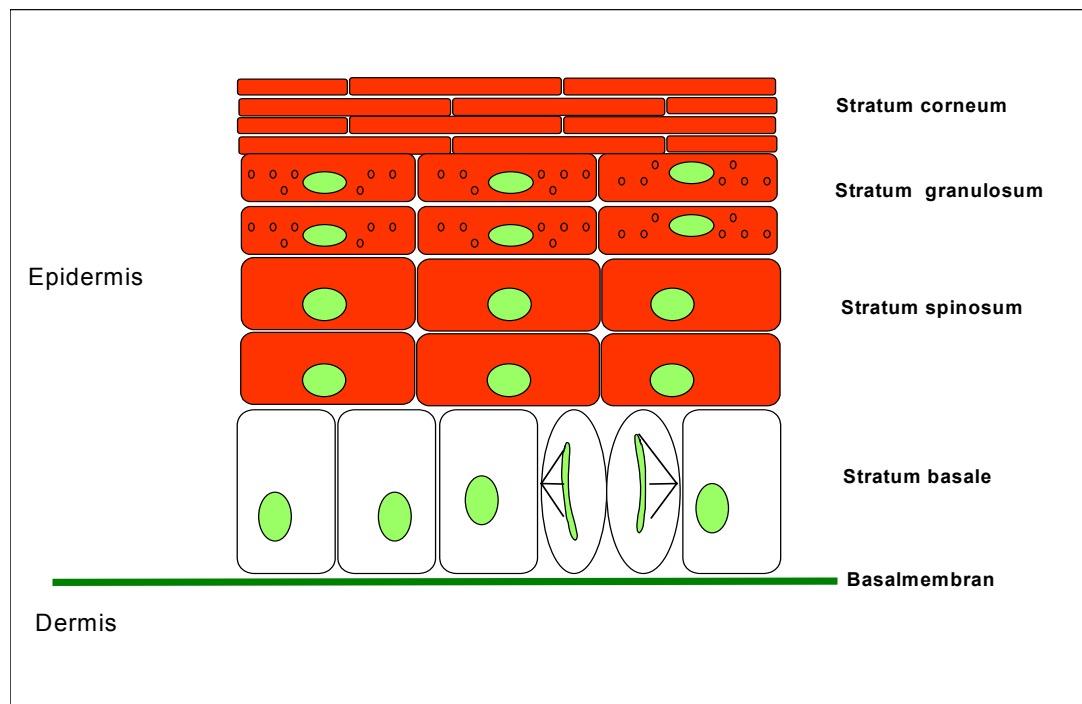


Abbildung 1.1: Aufbau der Epidermis

Auf der basalen Zellschicht aufliegend, befindet sich das zwei bis fünf Zellschichten dicke Stratum spinosum, auch Stachelzellschicht genannt. Die Zellen nehmen hier an Zellvolumen zu und beginnen mit einer horizontalen Umorientierung ihrer Zellachse. Darüber liegt die Zellschicht des Stratum granulosum, oder auch Körnerschicht. In dieser zwei- bis dreilagigen Zellschicht durchlaufen die Keratinozyten, vor allem im

oberen Bereich, rapide ablaufende Differenzierungsvorgänge. Die Zellen werden flacher durch den Abbau von Zellkernen und Organellen. In ihnen befinden sich Granula, die bereits die Bestandteile für die Korneozytenmembran beinhalten. Durch Dehydratation und Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum und des „cornified envelope“ an der Plasmamembran, bestehend unter anderem aus Loricrin, Filaggrin und Cystatin a, verhornen die Zellen (Fuchs, 1990; 1993).

Das Stratum granulosum geht abrupt in die äußerste Zellschicht des Stratum corneum, oder auch die Hornschicht genannt, über. Diese besteht aus zehn bis zwanzig Zellschichten fester, kohärenter, plättchenartiger, kernloser, hexagonaler Korneozyten. In diesen Zellen befinden sich Keratinfilamente umgeben von einer amorphen Proteinmatrix. Sie besteht aus den Proteinen der Granula, welche durch Transglutaminasen und Disulfidbrücken quervernetzt wurden.

Ein Haarfollikel ist ein epidermaler Anhang, welcher aus einer oberen permanenten Region und aus einer unteren, zyklischen Veränderungen unterliegenden Region besteht, die das Haar produziert (Abbildung 1.2). Die äußere epitheliale Wurzelscheide ähnelt biochemisch dem Stratum basale und geht in diese Schicht über. Die inneren Schichten des Haarfollikels beinhalten drei konzentrische Schichten der inneren epithelialen Wurzelscheide und drei konzentrische Schichten aus Haar produzierenden Zellen. Die Bildung des Haares erfolgt im Bereich des Bulbus, einer zwiebelartigen Verdickung der Haarwurzel. In ihn wölbt sich von unten die Haarpapille vor. Das Haar wird von einer Anhäufung undifferenzierter, sich schnell teilender Epithelzellen gebildet, die die Haarpapille glockenförmig umgeben. Die „Bulge“-Region der Haarfollikel befindet sich innerhalb der äußeren epithelialen Wurzelscheide unterhalb der Talgdrüse (Alonso und Fuchs, 2003).

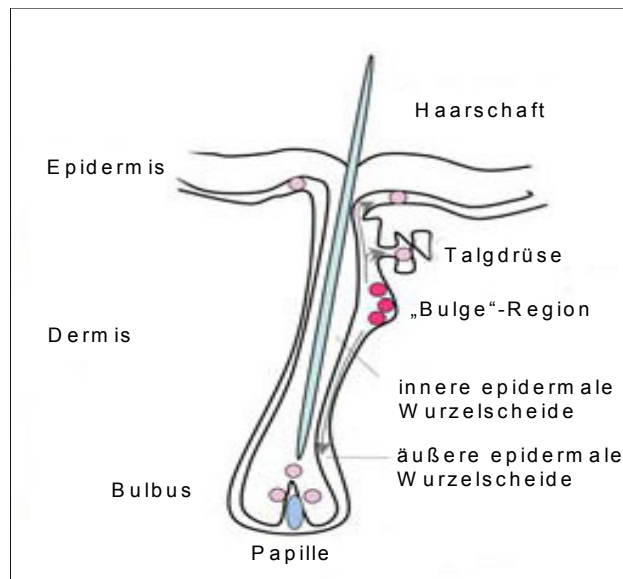


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Haarfollikels mit multipotenten Stammzellen (rot) in der „Bulge“-Region. Diese Zellen migrieren, um die Bulbus-Region des Haarfollikels, die Talgdrüse und die interfollikulare Epidermis zu besiedeln (pink). Abbildung modifiziert nach Morasso und Tomic-Canic, 2005.

1.1.3 Charakterisierung der Zelldifferenzierung

Um die verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten erkennen zu können, werden bestimmte Strukturproteine herangezogen. Diese werden in der Epidermis nach einem bestimmten Muster exprimiert. Es werden unter anderem Keratine gebildet. Diese werden unterteilt in epitheliale Keratine (weiche Keratine oder Zytokeratine), die differentiell exprimiert in verschiedenen Epitheltypen vorkommen und in Haarkeratine (harte Keratine), welche unter anderem die harten keratinisierten Strukturen der Haare, der Nägel, der Klauen und Zähne bilden. Die epithelialen Keratine werden in zwei Gruppen eingeteilt, in den sauren Typ I und den basischen bis neutralen Typ II. Diese Typen bilden ein 10 nm breites intermediäres Netzwerk des Zytoskelettes der epidermalen Zellen durch die Kombination gleicher Anteile von Typ I und Typ II Keratinen (Steinert, 1990; Fuchs und Weber, 1994). Das Typ II Keratin 5 und Typ I Keratin 14 kommen nur in der basalen Zellschicht vor und machen etwa 15-25 % der Zellproteine aus (Fuchs und Green, 1980; Nelson und Sun, 1983). Durch die Differenzierung der Keratinozyten wird das Paar Keratin 5/Keratin 14 herabreguliert. Typ II Keratin 1 und Typ I Keratin 10 werden erst ab dem Stratum spinosum exprimiert. Die Bildung von Typ II Keratin 6 und Typ I Keratin 16 findet in den suprabasalen Schichten der Epidermis statt und wird unter anderem durch den Prozess der Wundheilung ausgelöst (Mansbridge und Knapp, 1987).

Weitere suprabasale Keratine wie Keratin 4 und Keratin 13 werden nicht in der Haut exprimiert sondern kommen in anderen stratifizierten Plattenepithelien wie in der oralen Mukosa, den mukosen Membranen der Nase, des Ösophagus, der Genitalien und des Rectums vor (Sun et al., 1984). Suprabasale Keratine machen mehr als 85 % einer differenzierten Zellschicht aus, die hochstabil in filamentösen Formen vorliegen. Wenn die Stachelzellen aus dem Stratum spinosum die granuläre Schicht erreichen, findet eine finale Proteinsynthese statt. Zu diesem Zeitpunkt wird die Produktion von Filaggrin gestartet, einem histidinreichen, basischen Protein, welches bei der Bildung der großen makrofibrillären Kabel der Keratinfibrillen eine Rolle spielt (Dale et al., 1978). Zu einem früheren Zeitpunkt produzierte membranauskleidende Granula fusionieren mit der Plasmamembran und entlassen Lipide in den Interzellularraum zwischen den Zellen des Stratum granulosum und des Stratum spinosum (Schurer et al., 1991). Glutamin- und lysinreiche Proteine werden an der inneren Seite der Plasmamembran abgelegt und bilden somit das „cornified envelope“.

Das Strukturprotein Involucrin wird in den oberen Schichten des Stratum spinosum und im Stratum granulosum exprimiert, Loricrin und Filaggrin dagegen erst im Stratum granulosum. Diese und andere Proteine werden kovalent verbunden mit Hilfe der epidermalen Transglutaminase durch e-(γ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptid-Brücken (Steven und Steinert, 1994). Loricrin macht hierbei 70 % der Masse des „cornified envelope“ aus.

Die Mechanismen der Regulation von Proliferation und der terminalen Differenzierung der Keratinozyten sind bis jetzt nur unvollständig verstanden. Man geht davon aus, dass extrazelluläre Signale den Differenzierungsprozess einleiten und lenken. Bereits identifizierte Faktoren sind unter anderem Moleküle der extrazellulären Matrix wie zum Beispiel Kollagen, Laminin oder Fibronectin und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder der Insulin ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1). Diese Regulatoren nehmen Einfluss auf das Adhäsions-, Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten der Keratinozyten (Li et al., 2004). Die Suche nach signalaktiven Faktoren innerhalb der Zellen, die extrazelluläre Signale weiterleiten, ist Gegenstand intensiver Forschung. Neben bereits schon länger bekannten Faktoren wie die kleine GTPase Ras, β -Catenin und die MAP-Kinase, werden vor allem die Regulatoren der Aktin-

Polymerisation erforscht. Diese können durch Veränderungen in der Expression und Verteilung von Aktin und aktinassoziierten Proteinen den Differenzierungsprozess von Keratinozyten beeinflussen. Die wichtigsten bereits bekannten Modulatoren des Aktin-Zytoskelettes sind die kleinen GTP bindenden Proteine der Rho-Familie aus der Superfamilie der Ras-GTPasen.

1.1.4 Migration von Keratinozyten

In der Haut sind die Keratinozyten mit den Fibroblasten die primären Zelltypen, die migrieren, um Wunden zu heilen und um die Haut zu remodulieren. Die Aktivierung der Wundheilung und der Hautremodulation erfolgt durch Bestandteile der extrazellulären Matrix und durch lösliche Wachstumsfaktoren (Eliceiri, 2001). Solche Bestandteile der extrazellulären Matrix sind zum Beispiel (dermales) Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und Fibronectin (Basalmembran). Wachstumsfaktoren, die die Migration von Keratinozyten auslösen können, sind zum Beispiel EGF (Barrandon und Green, 1987), IGF-1 (Ando und Jensen, 1993), der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF; Tsuboi et al., 1993), die Interleukine 1 (IL-1; Chen et al., 1995) und -8 (IL-8, O'Toole et al., 2000).

Damit sich eine Zelle bewegen kann, benötigt sie eine polarisierte Anordnung ihrer zellulären Bestandteile. Die frontale Seite einer sich bewegenden Zelle erzeugt eine Zugkraft, die normalerweise mit der Bildung eines Lamellipodiums in Migrationsrichtung und der Entstehung von neuen Zellkontakten zu einem extrazellulärem Substrat einhergehen. Die Membranpotrusionen werden somit durch die Bildung von adhäsiven Komplexen auf der extrazellulären Matrix stabilisiert. Diese Komplexe sind Integrin-Rezeptorbündel, Aktinfilamente und assoziierte Proteine auf der Plasmamembran. Eine migrierende Zelle bildet an ihrer Vorderseite höher organisierte adhäsive Proteinkomplexe, die fokalen Adhäsionen (Gumbiner, 1996). Diese dienen bei der Kontraktion der Zelle als Zugkraftstellen, damit der Zellkörper und der hintere Teil der Vorderseite folgen können (Ridley, 2001).

Es wird postuliert, dass das Aktinzytoskelett die Antriebskraft für die Zellmigration liefert. Dabei wird die Aktinpolymerisierung und die Bildung von Integrin-Adhäsionskomplexen an der Zellperipherie aktiviert. Dies führt zur Membranprotrusionen, und ist unabdingbar für die Zellbewegung (Ridley et al., 1992). Diese Protrusionen werden Lammellipodien und Ruffles (Membrankrause) genannt. Ein Lammellipodium ist eine dünne protrusive Struktur, die von der

Vorderseite einer migrierenden Zelle ausgestülpt wird. In ihr sind Aktinfilamente zu einem senkrecht zur Zellmembran stehenden Netzwerk polymerisiert. Dies wird durch den Arp2/3-Komplex gebildet, der an den Seiten und wahrscheinlich auch an den Enden von bereits bestehenden Aktinfilamenten bindet und an diesen neue Aktinzweige initiiert (Millard et al., 2004). Aus Lamellipodien können Ruffles entstehen, wenn diese Membranausstülpungen nicht am Untergrund adhären können und in den hinteren Bereich auf die dorsale Oberfläche geschoben werden. Ruffles können auch auf der dorsalen Zelloberfläche neu entstehen. Die Signifikanz dieser Strukturen ist unsicher, wird aber im Zusammenhang mit der Pinozytose diskutiert (Ridley et al. 1992).

1.1.5 Proliferation von Keratinozyten und epidermalen Stammzellen

Zellen reproduzieren sich durch den Vorgang des Zellzyklus. Dieser umfasst eine Reihe von Ereignissen, die zur Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen führt (Mitchison, 1971). In eukaryontischen Zellen sind diese Vorgänge zeitlich voneinander getrennt. Chromosomenreplikation findet früh in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus statt. Die Trennung der replizierten Chromosomen folgt während der M-Phase oder Mitose am Ende des Zellzyklus. Die Phase vor der S-Phase wird G1-Phase und die Phase vor der Mitose wird G2-Phase genannt.

Die postnatale Epidermis repliziert sich durch Stammzellen, die sich in oder in der Nähe der „Bulge“-Region der Haarfollikel und in der interfollikulären Epidermis auf einer Basalmembran befinden, siehe Abbildung 1.2 (Niemann und Watt, 2002). Die Identifizierung und Charakterisierung der multipotenten murinen Haarfollikelstammzellen der „Bulge“-Region konnte durch Markierungsversuche und Isolation dieser langsam zyklierenden Zellen erreicht werden (Cotsarelis et al., 1990; Morris und Potten, 1999). Mit Hilfe von *in vitro* Analysen mit isolierten putativen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass sich aus diesen Zellen alle möglichen epithelialen Zellen bilden können (Morris et al., 2004). Die langsam zyklierenden Zellen der interfollikulären Epidermis führen zur Bildung von Keratinozyten ohne Stammzellcharakter. Diese Keratinozyten werden „transit amplifying cells“ genannt, die durch Differenzierung in die oberen Schichten der Epidermis einwandern und diese ständig erneuern. Im Menschen ist die Epidermis alle drei Wochen komplett erneuert (Brouard und Barrandon, 2003).

Studien über den Signalweg, von der Aktivierung von Stammzellen hin zur terminalen Differenzierung von Keratinozyten, belegten die Bedeutung der Bindung an die extrazelluläre Matrix (Watt, 2002). Eine gezielte Deletion der wichtigsten Integrine führte jedoch nicht zu der Depletion von Stammzellen wie vermutet (Watt, 2002).

Durch die Aktivierung des Onkogens c-Myc konnte allerdings eine Stammzellverarmung herbeigeführt werden (Arnold und Watt, 2001). Diese korrelierte mit einer reduzierten Integrinexpression aber auch mit der Abnahme der Expression von Komponenten des Aktinzytoskelettes. Durch die epidermale Deletion der kleinen GTPase Rac1 konnten Benitah et al. (2005) zeigen, dass dies zu einer starken Depletion der epidermalen Stammzellen führt. In der interfollikulären Epidermis (IFE) traten die basalen Zellen in das Kompartiment der „transit amplifying cells“ ein, welches einen transienten Anstieg in der Proliferation zur Folge hatte, dann aber in einer terminalen Differenzierung mündete. Somit erhöhte sich initial die Anzahl der Zellschichten, gefolgt durch eine drastische Verdünnung der IFE, da die differenzierten Zellen abgeworfen und nicht ersetzt wurden. Das gleiche konnte bei differenzierten Sebozyten beobachtet werden. Dadurch wurden die „Bulge“- und die Bulbus-Region der Haarfollikel stark depletiert. Rac1 scheint also eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung von epidermalen Zellen zu spielen.

Durch Verwundung der Haut wird am Wundrand neben der Migration auch die Proliferation der Stammzellen zur Reepithelialisierung aktiviert. Diese migrieren und proliferieren, um eine dichte hyperproliferative Epidermis zu bilden, die ihre Zellen an die epitheliale Zunge weitergibt. Um die volle Schichtdicke und Gewebeintegrität der Haut wiederherstellen zu können, wird die Proliferation der Keratinozyten durch Wachstumsfaktoren wie EGF und KGF aufrechterhalten. Diese Vorgänge wurden durch Integrine und Matrix-Metalloproteinasen vermittelt (MMP; Sternlicht und Werb, 2001; Werner und Grose, 2003;). Dieser Vorgang wird im Kapitel 1.4.3 Epithelialisierung detaillierter beschrieben.

1.2 Kleine GTPasen (G-Proteine)

Kleine GTPasen sind, im Gegensatz zu der Familie der trimären G Proteine, monomäre Proteine mit einem Molekulargewicht von 20–40 kDa. Als erste Vertreter dieser Genfamilie wurden um 1980 die *Ha-Ras* und *Ki-Ras* Gene als *v-Ha-Ras* und *v-Ki-Ras*- Onkogene des *Harvey murine sarcoma virus* und des *Kirsten murine sarcoma virus* entdeckt (Shih et al., 1978). Ihre zellulären Onkogene wurden kurz danach im Menschen gefunden und ihre mutierten Formen in menschlichen Karzinomen (Shimizu et al., 1983). Diese Mutanten führten bei in Zellkultur gehaltenen Zellen zu Proliferation und Transformation (Stacey und Kung, 1984).

Zurzeit sind über 100 kleine GTPasen in Eukarionten, von Hefe bis Mensch bekannt. Diese werden in der Ras Superfamilie zusammengefasst. Ihre Mitglieder werden in 5 Familien klassifiziert: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf, und Ran Familie (Takai et al. 1992). Die Ras Familienmitglieder regulieren hauptsächlich die Genexpression, die Rho/Rac/Cdc42 Familienmitglieder der Rho Familie regulieren die Reorganisation des Zytoskelettes und die Genexpression, die Rab und Sar1/Arf Familienmitglieder regulieren den interzellulären Vesikeltransport und die Mitglieder der Ran Familie regulieren den nukleozytoplasmatischen Transport während der G1-, S- und G2-Phasen des Zellzyklusses und der Mikrotubuli-Organisation während der S-Phase (Takai et al., 2001).

1.2.1 Struktur der Kleinen GTPasen

Ein Vergleich der Aminosäurestruktur von Ras Proteinen aus verschiedenen Spezies zeigt, dass sie in ihrer Primärstruktur konserviert und 30–50 % homolog zueinander sind. Unter Ras Proteinen besteht eine 50–55 %ige Aminosäureidentität, wobei Rab und Rho/Rac/Cdc42 Proteine eine 30 %ige Aminosäure-Identität mit Rasproteinen haben (Hall, 1990). Kleine GTPasen haben eine Konsensusaminosäuresequenz. Diese ist verantwortlich für die spezifische Interaktion mit GDP und GTP und für die GTPase-Aktivität, welche gebundenes GTP zu GDP und Pi hydrolysiert. Zusätzlich besitzen sie eine Region für die Interaktion mit nachgeschalteten Effektoren.

Die GTPasen der Ras, Rho/Rac/Cd42 und Rab Familie haben zusätzlich an ihrem COOH-Terminus Sequenzen, die posttranslational modifiziert werden. Zu diesen Modifizierungen gehört das Anhängen von Lipidresten wie zum Beispiel Farnesyl-,

Geranylgeranyl- und Palmitoylresten, aber auch von Methylresten sowie der Vorgang der Proteolyse (Glomset et al., 1994).

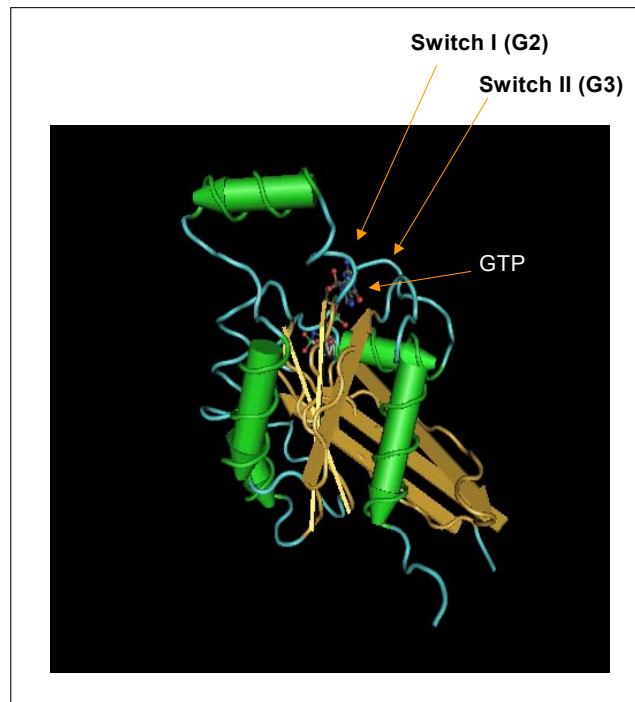


Abbildung 1.3: Dreidimensionale Darstellung des Rac1-Moleküls, gebunden an GTP, funktionelle Loopregionen (G2 und G3) mit Pfeilen gekennzeichnet; Abbildung modifiziert nach Hirshberg et al., 1997

In Abbildung 1.3 ist dreidimensionale Struktur von Rac1 dargestellt. Die katalytische Domäne, auch G Domäne genannt, der Kleinen GTPasen ist 20 kDa groß und ist aus fünf α Helices (A1-A5), 6 β -Strängen (B1-B6) und fünf Polypeptidloops (G1-G5) aufgebaut. Entgegen einer generellen Regel sind hier die Loopregionen der G-Domäne stärker konserviert als die Sekundärstrukturelemente (Bourne et al., 1991). Es existieren zwei funktionelle Loopregionen: Switch I (G2) und Switch II (G3), die die γ -phosphat Gruppe des Nukleotids umgeben (Jurnak, 1985). Der G3-Loop stellt die Aminosäurereste für die Bindung an das Mg^{2+} -Ion und an die γ -phosphat-Gruppe zur Verfügung. Der G2-Loop beinhaltet ein konserviertes Threonin, ebenfalls für die Bindung an das Mg^{2+} -Ion. Dieses Ion ist essentiell für eine funktionierende GTP/GDP-Bindung, da es die Sauerstoffatome der β - und γ -phosphat-Gruppen koordiniert. Die Koordination des Mg^{2+} Ions selbst wird durch ein einzelnes Wassermolekül und den konservierten Asparaginrest des G3-Loops ermöglicht (Paduch et al., 2001).

1.2.2 Zyklische Aktivierung und Inaktivierung von Kleinen GTPasen

Alle GTPasen funktionieren als molekulare Schalter. Sie durchlaufen dabei zyklisch ein inaktives GDP gebundenes und ein aktives GTP gebundenes Stadium (Hall, 1990), dargestellt in Abbildung 1.4. Das Vorkommen dieser beiden Zustände wird durch die Aktivität von regulatorischen Faktoren bestimmt.

GTPase aktivierende Proteine (GAPs) sorgen für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes, indem sie die Aktivität der ansonsten niedrigen intrinsischen GTPase zur Nukleotid-Hydrolyse verstärken. Die Guanin Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI's) stabilisieren diesen Zustand. Des Weiteren unterstützen die Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren (GEF) den aktiven GTP gebundenen Zustand und binden die GTPasen an einer spezifischen Stelle, um ein aktives Signal zu erzeugen. GTP gebundene GTPasen nehmen Kontakt zu stromabwärts liegenden Effektoren auf, die besondere zelluläre Antworten auslösen. Die GTP-Hydrolyse erfolgt nach dem sogenannten S_N2 -Mechanismus. Dieser steht für den direkten Transfer von der GTP γ -Phosphat-Gruppe zu Wasser mit einer Inversion der Konfiguration um das Phosphatom. Die zentrale Rolle in der Katalyse spielt hierbei ein Glutaminrest vom G3-Loop. Dieser Rest fungiert als katalytische Base um ein Wassermolekül zu aktivieren, welches wiederum den nukleophilen Angriff startet (Paduch et al., 2001).

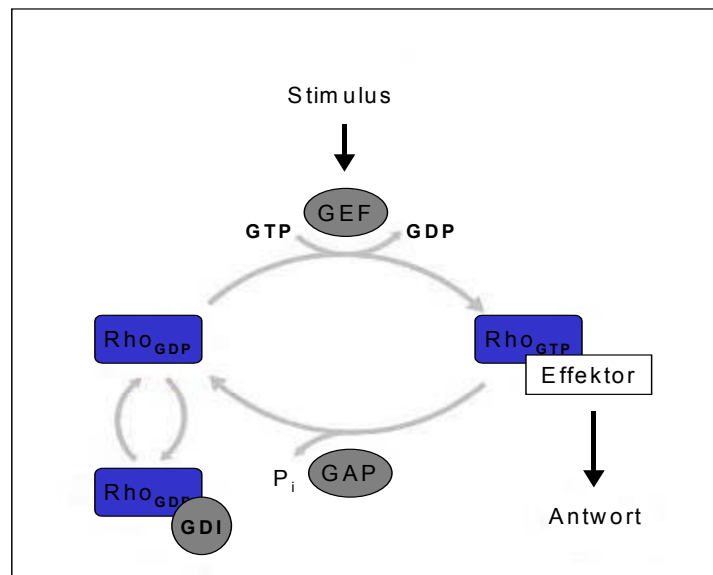


Abbildung 1.4: Schema der Aktivierung und Inaktivierung von kleinen GTPasen nach Raftopoulou und Hall 2004. (GDI: Guanin-Nukleotid Dissoziations-Inhibitor, GAP: GTPase aktivierende Proteine, GEF: Guanin Nukleotidaustauschfaktor)

Dominant aktive Mutanten wie zum Beispiel RasV12, Cdc42V12, RacL61 und RhoV14 entsprechen dem permanenten GTP-gebundenen Zustand. Dominant

negative Mutanten (RasN17, Cdc41N17, RacN17 und RhoN17) haben eine niedrige Affinität zu GTP und eine hohe Affinität zu den GEF's und hemmen somit die Signalkaskaden ihres endogenen Gegenspielers (Ridley et al., 1992).

1.2.3 Rho GTPasen

Die Rho Familie der Säugetiere besteht aus mindestens 22 verschiedenen Mitgliedern (Abbildung 1.5). Diese werden wiederum in sechs verschiedene Untergruppen eingeteilt. Die RhoA ähnlichen Mitglieder umfassen RhoA, RhoB und RhoC. Die Rac1 ähnliche Untergruppe besteht aus Rac1 (mit seiner Spleissvariante Rac1b) Rac2, Rac3 und RhoG. Die Mitglieder der Cdc42 ähnlichen Unterfamilie umfassen Cdc42 (und ihre Gehirn-spezifische Spleissvariante G25K), TC10, TCL, Chp/Wrch-2 sowie Wrch-1.

Die Rnd Unterfamilie umfaßt Rnd1, Rnd2 und RhoE/Rnd3, die RhoBTB Unterfamilie RhoBTB 1-3 und die in 2004 beschriebenen Mitglieder der Miro Familie. Zusätzlich existieren noch Rho-GTPasen wie RhoD, Rif und TTF/RhoH, die nicht den sechs Unterfamilien angehören (Weenerberg und Der, 2004).

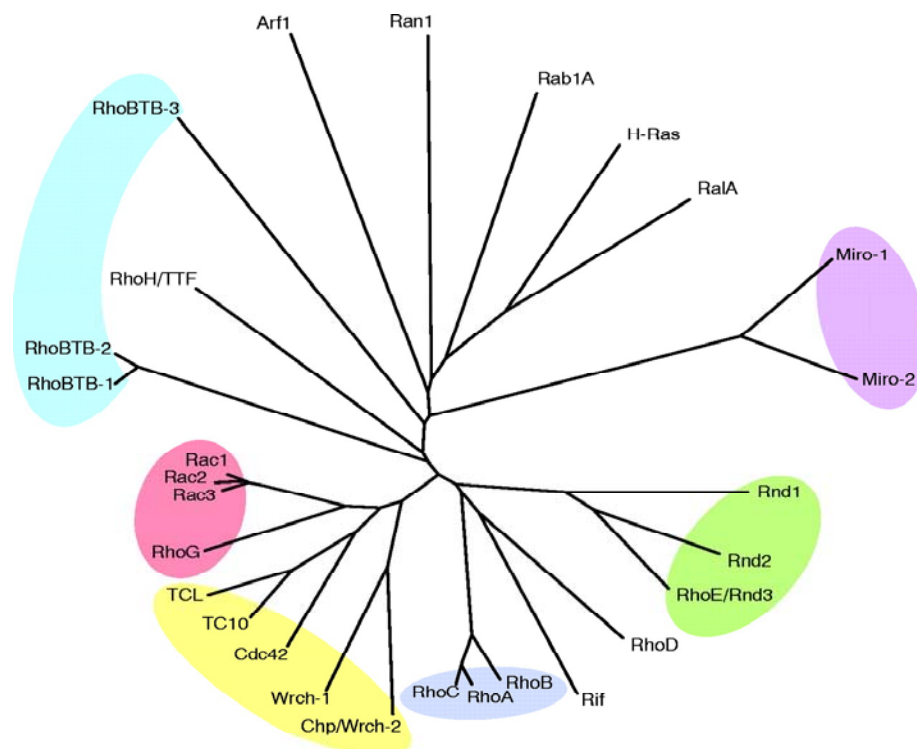


Abbildung 1.5: Phylogenetischer Baum der Rho GTPase Familie (farbig unterlegt) und Vertreter anderer Ras-Familien (Weenerberg und Der, 2004)

1.2.4 Aufgaben der Kleinen GTPasen der Rho Familie

Die Funktion der Rho Familie wurde zuerst in Hefe demonstriert (Adams et al., 1990). Die Phänotypen bestimmter Mutanten mit Veränderungen in diesen Genen zeigten, dass Rho/Cdc42 Proteine in den Knospungsprozess eingebunden sind, vermutlich durch die Reorganisation des Aktinzytoskelettes (Johnson und Pringle, 1990). In Säugetieren wurden die Funktionen der Rho-Proteine durch die Verwendung eines Exoenzyms von *Clostridium botulinum* C3 untersucht, welches diese ADP-spezifisch ribosyliert (Aktories et al., 1988). C3 ribosyliert eine Aminosäure (ASN-41) in der Effektor-Region von Rho GTPasen und inhibiert seine Funktion durch die Unterbindung der Interaktion mit stromabwärts liegenden Effektoren. Durch die Verwendung von C3 konnte das erste Mal gezeigt werden, dass Rho GTPasen an der Zytoskelett-Kontrolle beteiligt sind (Ridely et al., 1992).

Die Rho GTPasen sind beteiligt an einer großen Anzahl von verschiedenen zellulären Prozessen. Sie regulieren unter anderem die Zelladhäsion, die Zellpolarität und die transkriptionelle Aktivierung. Sie sind am besten für ihre klaren Effekte auf das Aktinzytoskelett bekannt. Dabei führen diese Effekte in nichtepithelialen Zellen primär zur Zellbewegung und in epithelialen Zellen zur Verstärkung von Zell-Zelladhäsion. Ein Forschungsschwerpunkt liegt hierbei auf drei Mitgliedern dieser Familie, Cdc42, Rho und Rac.

1.2.4.1 Rho GTPasen in nichtepithelialen Zellen

Cdc42, Rho und Rac haben entscheidenden Einfluss auf die Reorganisation des Zytoskelettes, zeichnen sich jedoch durch unterschiedliche Effekte auf die Zellform und -bewegung aus (Hall, 1998; Schmitz et al., 2000). Cdc42 bewirkt die Bildung von Filopodien. Diese dünnen fingerartigen zytoplasmatischen Ausstülpungen, beinhalten dünne Aktinbündel und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Erkennung der extrazellulären Umwelt. RhoA steuert die Aktin-Myosinkontraktilität und dadurch die Bildung von Stressfasern und Fokalkontakten, die die Zellform, -adhäsion und -bewegung regulieren. Die Aktivierung von Rac1 führt zur Bildung von Lamellipodien. Dies sind vorhangartige Ausstülpungen aus einem dünnen Aktinnetzwerk an der Vorderseite einer migrierenden Zelle (Abbildung 1.6).

Die Umordnung des Zytoskelettes, die durch die Aktivierung von Rho GTPasen ausgelöst wird, spielt eine Schlüsselrolle bei der Zellbewegung. Die Adhäsion, die darauffolgende Ablösung vom Substrat und die Re-Adhäsion von Lamellipodien und

Filopodien am vorderen Rand einer Zelle sind Elemente einer koordinierten und polarisierten Bewegung der Zelle.

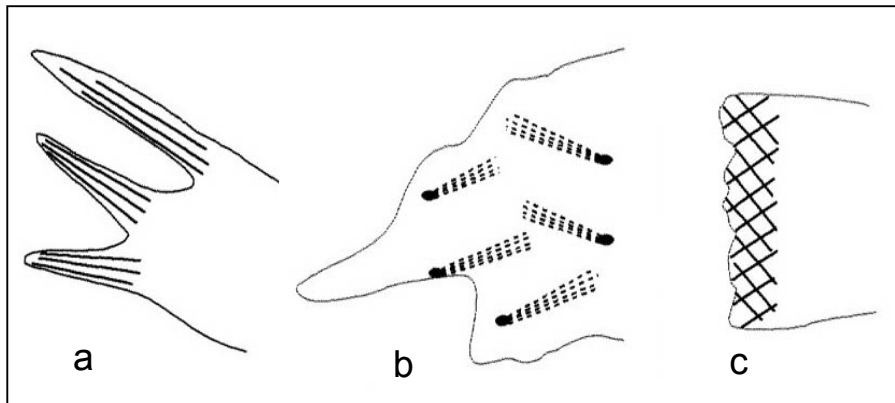


Abbildung 1.6: Umordnung des Aktinzytoskeletts und dadurch bedingte Zellmembranänderungen durch die Aktivierung von a: Rho, b: Cdc42 und c: Rac. Abbildung verändert nach Takai et al., 2001.

1.2.4.2 Rho GTPasen in epithelialen Zellen

Für die Bildung und Aufrechterhaltung der Morphologie und Funktion von Epithelien ist die Zell-Zelladhäsion ein essentieller Faktor. Epitheliale Zellen binden sich sehr eng an ihre Nachbarzellen mit Hilfe von einigen spezialisierten adhäsiven Strukturen. Diese adhäsiven Strukturen sind entweder mit Intermediärfilamenten (Desmosomen) oder mit Mikrofilamenten (Adherens Junctions oder Tight Junctions) verbunden. Diese Verbindung mit dem Netzwerk des Zytoskelettes ist nötig für eine stabile Zell-Zell-Adhäsion und für die Einbindung von Zell-Zell-Kontakten in die Zellmorphologie, die charakteristisch ist für epitheliale Zellen (zum Beispiel cuboidale Zellform oder polarisierter Phänotyp).

Die Kleinen GTPasen der Rho Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und der Aufrechterhaltung von Adherens- und Tight Junctions. Man geht davon aus, dass in der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen, Cadherin-Rezeptoren (wichtige Bestandteile von Adherens Junctions) mit den selben Typen von Rezeptoren einer angrenzenden Zelle interagieren und sich am Ort des Zell-Zell-Kontaktes ansammeln. Diese Cadherine sind innerhalb der Zelle mit Proteinen namens Cateninen assoziiert.

Die Vorgänge des initialen Zell-Zellkontaktes lösen die Aktivierung von Rho Proteinen aus (Hordijk et al., 1997). Die Kleinen GTPasen binden sich nun spezifisch an Effektoren und aktivieren bestimmte Signalwege, die einerseits eine wichtige Rolle bei der Bildung des epithelialen Phänotyps spielen und andererseits durch ein Rückführungssignal die adhäsiven Rezeptoren weiter stabilisieren (Noritake et al., 2004). Die Funktion der GTPase Rho ist hierbei wichtig für die Zellverdichtung,

Formänderungen und während der Bildung von neuen Zell-Zellkontakten (Vaezi et al., 2002). Cdc42 induziert eine Aktinanhäufung an den Kontakten. Aktiviertes Rac ist notwendig für den Aktintransport zu Cadherinrezeptoren.

1.3 Rac 1, 2 und 3

Im humanen sowie im murinen System wurden drei verschiedene Rac GTPasen beschrieben: Rac1-3. Rac1 wird ubiquitär exprimiert (Didsbury et al., 1989), Rac2 nur im hämatopoetischen System (Shirsat et al., 1990) und Rac3 überwiegend im Nervensystem (Haataja et al., 1997).

Der Name Rac steht für die Abkürzung „*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*“. Rac ist ein potentieller Bindungspartner für das Exoenzym C3 von *Clostridium botulinum*, welches überwiegend Rho-Proteine ADPriboyliert (Aktories et al., 1988). Innerhalb der Unterfamilie haben Rac1, 2 und 3 eine Sequenzidentität von ca. 88 %. Der Sequenzunterschied befindet sich hauptsächlich in den letzten 15 AS am C-Terminus.

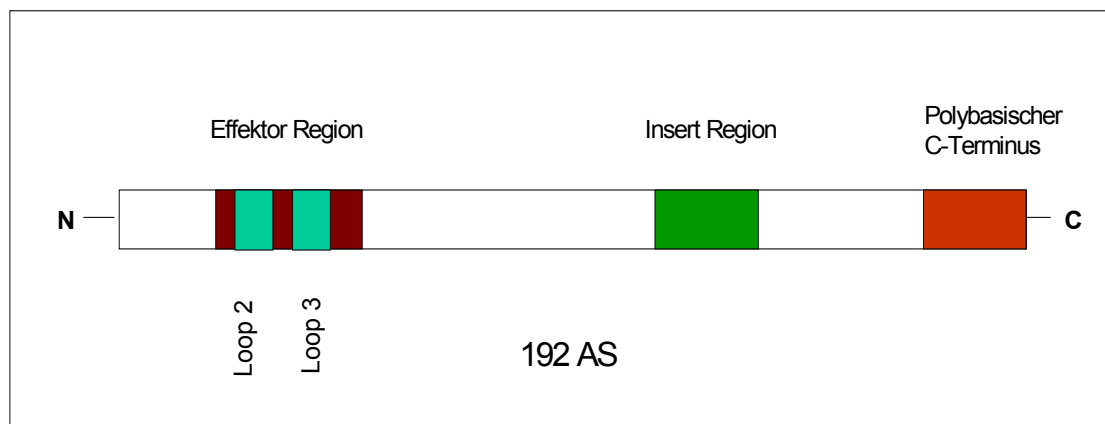


Abbildung 1.6: Primärstruktur des Rac1 Proteins, (AS: Aminosäure)

1.3.1 Rac1

Das humane *Rac1* Gen, auf welches der Fokus der hier vorliegenden Arbeit gerichtet ist, besteht aus sieben kodierenden Exons über eine Länge von 27 kb und befindet sich auf dem Chromosom 7p22 (Matos et al., 2000). Die cDNA hat eine Länge von 579 bp und das Protein somit eine Größe von 21 kDa. Rac1 wird ubiquitär exprimiert. Ein Fehlen von Rac1 führt bereits embryonal zur Lethalität (Sugihara et al., 1998). Zusätzlich ist eine alternativ gespleisste Rac1-Variante bekannt, die eine 19-Aminosäure Insertion hinter der sogenannten Switch II Region besitzt (Jordan et al., 1999). Der Rac1 Promotor ist sehr CG-reich. Es fehlen ihm aber eine TATA- und eine CCAT-BOX. Um die Transkriptionsstelle befindet sich eine CpG-Insel. Der Promotor besitzt somit alle Charakteristika eines Housekeeping Genes.

1.3.1.1 Rolle von Rac1 bei der Zellmigration und der Bildung einer Zellgestalt

Die kleine GTPase Rac induziert die Ausbildung der Lamellipodien sowie der Ruffles durch die in Kapitel 1.2.4.1 genannten Veränderungen des Aktinzytoskeletts. Als mögliche Effektoren für Rac während der Migration werden verschiedene Proteine diskutiert, unter anderem IRSp53 (Miki et al., 2000), die Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase (Tolias et al., 1995) und p65Pak (Sells et al., 1997; Bokoch, 2003). Mit Hilfe von „Fluorescence Resonance Energy Transfer“-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass das Level von aktiviertem Rac (RacGTP) am höchsten an der Vorderseite einer sich bewegenden Zelle ist (Kraynov et al., 2000). Der Mechanismus, der zu einer lokalen Rac-Aktivierung bei einer Einzel-Zell-Migration führt, ist noch nicht vollständig bekannt. Man geht davon aus, dass Integrin-Matrix-Interaktionen eine wichtige Rolle hierbei spielen (Kraynov et al., 2000).

In Rac1 defizienten Makrophagen konnte eine veränderte Zellmorphologie beobachtet werden. Jedoch wurden keine Änderungen im Migrations- oder Chemotaxisverhalten beobachtet (Wells et al., 2004). In einer C6 Ratten Glioma Zelllinie führte die Expression der dominant negativen Rac1 Mutante (RacN17) zu einer gesteigerten Zellmigration, die nach Bestrahlung weiter anstieg (Hwang et al., 2006).

Während der Embryogenese wandern viele Zellen als zusammenhängende Formation oder als einzelne assoziierte Gruppen, aber nicht als einzelne Zelle. Das am besten untersuchte und beschriebene *in vivo* Beispiel ist der dorsale Schluss bei *Drosophila melanogaster*. Rac1 zusammen mit Cdc42 fallen hierbei zwei Aufgaben

zu. Die aufeinander zukommenden Zellschichten bilden zuerst Lamellipodien und Filopodien aus, die mit den jeweiligen gegenüberliegenden Zellen Kontakt aufnehmen und somit die dorsale Schließung auslösen (Jacinto et al. 2001). Zusätzlich regulieren sie die Mitogen aktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPK-Kaskade), die benötigt wird für die Transkription des Wachstumsfaktors Dpp an der Vorderseite einer sich bewegenden Zelle. Dieses Protein wird sezerniert und wirkt parakrin, um die koordinierte Bewegung von epithelialen Zellschichten auszulösen (Knust, 1997).

Eine Möglichkeit, Zellmigration von Säugetierzellen *in vitro* zu zeigen, ist die Verwundung einer monomeren Zellschicht. Diese artifizielle Wunde induziert die geordnete Bewegung der gesamten Zellschicht. In primären Fibroblasten oder Astrozyten ist die Aktivität von Rac1 essentiell für die Zellmigration. Die Zellen polarisieren, so dass die protrusive Aktivität auf den vorderen Bereich beschränkt ist und das Mikrotubuli-Organisationszentrum sich vor den Zellkern in Richtung der Bewegung orientiert. Somit wird die Sekretion primär in den vorderen Bereich der polarisierten Zelle fokussiert (Etienne-Manneville et al., 2002). Zellen in einer monomeren Zellschicht bekommen zusätzlich Signale von benachbarten Zellen.

Man kann festhalten, dass die Mechanismen innerhalb einer Zelle, die zur Migration führen, immer besser aufgeklärt worden sind. Dagegen sind die Mechanismen, die eine koordinierte Migration verursachen, noch weitgehend unaufgeklärt (Etienne-Manneville et al., 2002).

Während der Bildung von Epithelien führt ein entstehender Zell-Zell-Kontakt zuerst zur Bildung von Adherens Junctions. Dabei werden Rac1 und Cdc42 von Cadherin-Cadherin Bindungen aktiviert, die sich zwischen zwei benachbarten Zellen bilden und auch an diesen Ort rekrutiert. In Versuchen mit epidermalen Zellen während der Entwicklung von *C. elegans*, mit ektodermalen Zellen während der dorsalen Schließung in *Drosophila* und mit kultivierten Mauskeratinozyten konnte gezeigt werden, dass Filopodien und/oder Lamellipodien von Zellen ausgestülpt werden können und damit benachbarte Zellen berühren (Raich et al., 1999; Vasioukhin et al., 2000; Jacinto et al., 2001). Dieser Vorgang scheint die treibende Kraft zu sein, um enge Zell-Zellkontakte herzustellen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Rac-Effektor IQGAP1 eine anti-GTPase Funktion besitzt (Hart et al., 1996). Dies könnte zur Aufrechterhaltung von GTP gebundenem Rac1 an den Zell-Zell-Kontakten führen und somit zu einer stabilen Adhäsion.

Zur Ausbildung einer definierten Zellgestalt in einem Zellverband oder Gewebe muss sich eine Zelle polarisieren. Die Polarität einer epithelialen Zelle ist abhängig von der Interaktion der Zellen durch Integrine an der basalen Oberfläche der Zellmembran mit der extrazellulären Matrix. Die Bildung von vollständigen Zysten (apical-innen, basolateral-außen) durch Platzierung von zum Beispiel Madin Darby Canine Kidney-Zellen (MDCK) in eine dreidimensionale Matrix benötigt die Erkennung von Laminin. Die Aktivität von Rac1 wird hierbei für die korrekte Bildung von extrazellulärem Laminin gebraucht und beeinflusst somit die Orientierung der apikobasalen Achse (Yu et al., 2005).

Rac1 ist zusätzlich ein positiver Regulator für das Wachstum von Nervenzellenneuriten (Nakayama, 2000). Die kleine GTPase aktiviert dabei den Nerven Wachstumsfaktor (NGF) und erhöht somit die Anzahl der dendritischen Fortsätze (Li et al., 2000).

1.3.1.2 Rolle von Rac1 in der Zellproliferation

Rho GTPasen sind zusätzlich zu ihren Auswirkungen auf die Organisation des Zytoskelettes auch an der Regulierung des Zell-Zyklus beteiligt. Als ein gut beschriebenes Beispiel hierfür zählt die Antigenstimulation von T-Zellen. Ihre Rezeptoren können über die Aktivierung des hämopoetisch spezifischen GEF Vav1, die Beladung von Rac1 mit GTP induzieren und somit die Stimulation der JNK MAP Kinase Kaskade aktivieren. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT und der Expression von IL-2. Dadurch wird das Eintreten der inaktiven T-Zellen in die G1-Phase eingeleitet und dies führt zur klonalen Vermehrung von Antigen spezifischen Lymphozyten (Cantrell, 1998). Zusätzlich kontrolliert Rac1 in diesen Zellen auch die Änderungen des Aktinzytoskeletts, die essentiell für die Induktion der Proliferation sind. Rac1 und Vav1 sind ebenso essentiell für die Proliferation von B-Zellen. Hierbei wird die Expression des Cyclin D1 Gens durch einen unbekanntem Signalweg reguliert (Glassford et al., 2001). In Endothelzellen ist Rac nötig für die Cyclin D1 Expression während der G1-Phase. Hierbei reguliert die GTPase die mRNA Translation und nicht die Transkription des Gens (Mettouchi et al., 2001). Walmsley et al. (2003) generierten Mäuse mit einer konditionalen Rac1 Defizienz, spezifisch für B-Zellen. In der Abwesenheit von Rac1 und Rac2 war die Entwicklung von B-Zellen fast komplett blockiert. Rac1 und Rac2 werden für die Weiterleitung von B-Zellrezeptorsignalen

benötigt, die zu Proliferation und Überleben der Zelle führen. Rac1 hat durch seine wichtige Rolle als Regulator der Proliferation und Migration auch Einfluß auf die Tumorgenese. Die Aktivierung von NfκappaB durch Rac1 kann, beispielweise durch gesteigerte Transkription von Cyclin D, die Tumorgenese fördern (Joyce et al., 1999). Ebenso konnte ein Einfluss von Rac1 auf das Zellwachstum von Rattenbrustkrebszellen *in vitro* und in Nacktmäusen *in vivo* gezeigt werden (Bouzahzah et al., 2001).

1.3.1.3 Spleissvariante Rac1b

Die Spleissvariante von Rac1, Rac1b, wird hauptsächlich in Brust- und Colon-Krebsformen exprimiert (Schnelzer et al., 2000). Rac1b besitzt 19 zusätzliche Aminosäuren zwischen Rac Kodon 75 und 76. Es hat eine gesteigerte intrinsische Guanin Nukleotid Austauschrate und eine verminderte intrinsische GTPase Aktivität (Fiegen et al., 2004). Rac1b kann nicht an GDI's binden (Matos et al., 2003). Es ähnelt somit einem konstitutiv aktivierten Protein. Rac1b hat zudem, auch im Vergleich zu Rac1, ein verändertes Aktivierungsmuster. Es kann die JNK stress-aktivierte Kinase nicht aktivieren, aber den Transkriptionsfaktor NFκB (Matos et al., 2005). Die Spleissvariante zu Rac1 besitzt außerdem eine stark reduzierte Affinität zu der PAK Serin/Threonin Kinase (Fiegen et al., 2004). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Expression von Rac1b ansteigen kann, während MMP-3 induzierter epithelialer-mesenchymaler Transition von epithelialen Säugetierzellen (Radsiky et al., 2005). Welchen biologischen Sinn diese Form von Rac1 hat, ist derzeit noch weitgehend ungeklärt.

1.3.2 Rac2

Rac2 (Didsbury et al., 1989) ist eine GTPase, die von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Das Enzym reguliert die Superoxidbildung über die NADPH Oxidase (Mizuno et al., 1992; Dorseuil et al., 1996). Der Verlust, die eingeschränkte Funktion oder die Inaktivierung von Rac2 korrelieren mit Defekten in der Lymphozytenfunktion, der Phagozytose und der Neutrophilen-Funktion (Ambruso et al., 2000; Kasper et al., 2000; Li et al., 2000). Mäuse mit einer Rac2 Defizienz entwickeln sich normal, haben aber die oben genannten Defekte in ihren hämatopoetischen Zellen (Roberts et al., 1999).

In Rac2 defizienten T-Lymphozyten zeigte sich eine reduzierte Proliferation nach der Stimulation mit anti-CD3-Antikörper oder mit T-Zell spezifischem Antigen. Diese Defekte wurden begleitet von reduzierter Aktivierung von ERK1/2 und p38 (Yu et al., 2001).

Studien mit murinen Rac2-defizienten neutrophilen Zellen und humanen Neutrophilen aus Patienten mit einer dominant negativen Mutation im *Rac2* Gen zeigten Beeinträchtigungen in der F-Aktin-Polymerisierung, der Chemotaxis und der Exozytose von primären Granula als Antwort auf chemische Reize (Li et al., 2002; Abdel-Latif et al., 2004).

Rac2-null Makrophagen zeigten Defekte in der Aktivierung der NADPH Oxidase und der Phagozytose als Antwort auf Phorbol ester und durch Akkumulation von Makrophagen während einer peritonealen Endzündung (Yamauchi et al., 2004).

1.3.3 Rac3

Die Expression von Rac3 findet überwiegend im Gehirn statt, kann aber durch Serum-Stimulation von Fibroblasten, bei diesen hochreguliert werden (Haataja et al., 1997). In aktivierter Form findet man die kleine GTPase zu einem höheren Anteil an der Zellmembran als Rac1 (Mira et al., 2000). Rac3 zeigt eine Hyperaktivität in Patienten mit Brustkrebs. Das *Rac3* Gen befindet sich nahe der Region von Chromosom 17, welche bei Brustkrebs oft deletiert ist. Dies könnte ein möglicher Grund für eine Deregulation der Expression sein (Morris et al., 2000). Zusätzlich konnten Paige et al. (2005) zeigen, dass eine Rac3-Aktivierung in humanen Brustkrebszellen *in vitro* die metastasierenden Eigenschaften erhöht.

Rac3 Knockoutmäuse durchlaufen die Embryogenese und zeigen keine offensichtlichen Defekte in der Entwicklung. Es zeigten sich jedoch Unterschiede im Verhalten. Die Rac3 defizienten Tiere waren den Kontrolltieren in ihrer Motorik überlegen (Corbetta et al., 2005). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass ein Fehlen der Rac3-Aktivität einen positiven Effekt auf die Lebenserwartung von Mäusen mit chronisch myeloischer Leukämie hatte (Cho et al., 2005).

1.4 Kutane Wundheilung

Die Wundheilung ist notwendig, um die stabilisierende und schützende Funktion der Haut wiederherzustellen. Wundheilungsprozesse finden auch in anderen Geweben statt, wobei die vollständige Regeneration der Haut nur in epithelialen Anteilen stattfinden kann. Die Regenerationsfähigkeit des erwachsenen Organismus ist im Gegensatz zu den Föten reduziert, so dass es zu Vernarbung mit verringerter Funktionalität kommt (Ferguson et al., 2004).

Die Heilung einer kutanen Wunde kann in mehrere zeitlich überlappende Stadien unterschieden werden. Es handelt sich um die vier Phasen der Hämostase, der Entzündung, der Reepithelialisierung und des Narbenumbaus.

1.4.1 Hämostase

Als Hämostase bezeichnet man die Summe der physiologischen Prozesse, die den Stillstand einer Blutung herbeiführen.

Um die Barrierefunktion der Haut kurzfristig wiederherzustellen und die Blutung zu stillen, wird die Bildung eines Thrombus ausgelöst. Dazu wird die Gerinnungskaskade eingeleitet, die über verschiedene Stufen lösliches Fibrinogen des Blutes durch aktiviertes Thrombin in unlösliches Fibrin umwandelt. Das so veränderte Fibrin aggregiert mit Thrombozyten zu einem Netzwerk, welches sich zu einer provisorischen Matrix entwickelt, welche die Einwanderung und Anheftung von Endzündungszellen erleichtert. Die Thrombozyten wurden zuvor von durch die Verwundung frei zugänglichem Kollagen, Mikrofibrillen oder Trümmern der Basalmembran aggregiert und gleichzeitig aktiviert (Thomas, 2002). Diese Zellen schütten ihrerseits verschiedene Faktoren wie Fibrinogen, Fibronectin, Thrombosporin oder den von Willebrand Faktor aus, die die Aggregation weiterer Zellen erleichtern. Von den Thrombozyten werden außerdem biologisch aktive Stoffe wie der Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF) und der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF) freigesetzt, die im Laufe der weiteren Wundheilung eine wichtige Rolle spielen (Martin, 1997).

1.4.2 Entzündung

In einer frühen Phase der Entzündung wandern neutrophile Granulozyten in die Wunde ein. Diese werden chemotaktisch durch IL-1 angelockt, welches von den Thrombozyten in der Wundmatrix sezerniert wird. Die Aufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht darin, eindringende Bakterien durch Phagozytose und Ausschüttung proteolytischer Enzyme zu vernichten. Zusätzlich von diesen Immunzellen ausgeschüttete Enzyme, wie zum Beispiel MMP-8 und MMP-13, Proteinase 3 und Cathepsin G, sind beim Abbau von Zell- und Gewebstrümmern beteiligt (Owen und Campbell, 1999). Die neutrophilen Granulozyten sezernieren währenddessen Wachstumsfaktoren, welche die Vorgänge der Proliferationsphase initiieren und Entzündungsmediatoren, die Monozyten ab dem zweiten und Lymphozyten ab dem fünften Tag in großer Zahl rekrutieren (Deuel et al., 1982). Die Monozyten differenzieren im Wundmilieu zu Makrophagen und phagozytieren nekrotisches Wundmaterial und pathogene Keime (Leibovich et al., 1975). Die Makrophagen setzen Mediatoren frei wie zum Beispiel PDGF, TGF- α , TGF- β und den vaskulären Endothelwachstumsfaktor (VEGF). Diese Faktoren wirken mitogen, chemotaktisch und stimulieren die Synthese von Faktoren die für die Wundheilung essentiell sind, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Proteasen und Komponenten der extrazellulären Matrix (Martin, 1997). Somit werden die frühen Wundsignale von degranulierenden Thrombozyten und neutrophilen Zellen amplifiziert.

1.4.3 Epithelialisierung

Bereits wenige Stunden nach der Verletzung beginnen Keratinozyten, Fibroblasten und vaskuläre Endothelzellen ihr Expressionsprofil zu verändern und sich in Richtung eines migratorischen Phänotyps zu entwickeln (Martin, 1997). Um in die provisorische Matrix einzuwandern, müssen diese Zellen entsprechende Oberflächenproteine (zum Beispiel Integrine und den Hyaluronsäurerezeptor CD44) exprimieren und mittels Proteasen die provisorische Matrix degradieren (Oksala et al., 1995; Gailit et al., 1994). Diese Vorgänge sind die zeitbegrenzenden Faktoren für den Beginn der Proliferationsphase, auch Granulationsphase genannt (McClain et al., 1996). Vor allem KGF und EGF stimulieren die Reepithelialisierung. Ohne diese Wachstumsfaktoren kommt es zu einer Störung der Proliferation beziehungsweise der Migration von Keratinozyten, was in Tiermodellen durch Inhibierung der jeweiligen Rezeptoren gezeigt werden konnte (Werner et al., 1994).

Die Reepithelialisierung beginnt ein bis zwei Tage nach der Verwundung, indem sich basale Keratinozyten durch MMP2- und MMP9 vermittelte Proteolyse des Kollagen Typ IV von der Basalmembran lösen (Makela et al., 1999). Die zusätzlich vermehrte Expression von Proteasen am Epithelrand, insbesondere von dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), ist hierbei essentiell für die Zellmigration (Grondahl-Hansen et al., 1988; Romer et al., 1994). Die aktivierten epidermalen Keratinozyten unterwandern den Thrombus in Form einer epithelialen Zunge. Sollten durch eine Verwundung ebenfalls Stümpfe von Haarfollikeln bestehen bleiben, beteiligen sich diese genauso wie epidermale Wundränder an der Reepithelialisierung, indem sie sich wie wachsende Inseln verhalten. Dafür werden Fibrin und Fibrinogen der provisorischen Matrix durch die proteolytischen Enzyme MMP2 (Makela et al., 1999) und Plasmin degradiert. Zusätzlich unterstützt Plasmin den Katabolismus der extrazellulären Matrix durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen wie zum Beispiel MMP3 und MMP9 (Murphy et al., 1999). Die Keratinozyten benötigen darüber hinaus Adhäsionsmoleküle, um über die provisorische Wundmatrix migrieren zu können. Dafür müssen neue Integrine wie $\alpha_5\beta_1$, welches als Rezeptor für Fibronectin dient und Intergrin $\alpha_v\beta_6$, welches als Vitronectinrezeptor fungiert, exprimiert und bereits vorhandene Integrine wie der Kollagenrezeptor $\alpha_2\beta_1$ relokalisiert werden. Diese Integrine scheinen hierbei am wichtigsten zu sein, da sie sich an der Wanderungsfront der Keratinozyten nachweisen lassen (Martin, 1997). Bestimmte Faktoren sind während der Reepithelialisierung für die Proliferation der Keratinozyten verantwortlich. Sie wirken sowohl autokrin wie zum Beispiel TGF- α (Derynck, 1988) oder parakrin wie zum Beispiel KGF (Werner et al., 1992), IGF (Tavakkol et al., 1992) und EGF (Carpenter, 1993). Nach Abschluss der Reepithelialisierung kehren die Keratinozyten wieder in ihren „Ruhezustand“ zurück. Es kommt zur Ausbildung von Desmosomen und somit zu Zell-Zell-Verbindungen. Zusätzlich gebildete Hemidesmosomen stellen letztendlich wieder die Verankerung der Keratinozyten mit der Basalmembran her (Compton et al., 1989).

Durch weitere chemotaktische Signale von Makrophagen kommt es zur Einwanderung von Fibroblasten und zur Einsprossung von Blutgefäßen in das Wundbett. Die Fibroblasten synthetisieren und bauen in die bestehende provisorische Matrix Kollagenfasern und hexosaminhaltige saure Mucopolysaccharide ein. Diese fördern als Grundsubstanz den Zusammenhalt des Granulationsgewebes. Angiogene Faktoren wie PDGF, VEGF oder TGF- α sind

Auslöser für die Einsprossung von Kapillaren aus bereits vorhandenen Blutgefäßen (Folkman und Klagsbrun, 1987). Diese Vorgänge ermöglichen die Versorgung der Wunde mit Sauerstoff und erlauben den Transport von Abbau- und Syntheseprodukten.

1.4.4 Bildung von Narbengewebe

Die letzte Phase der kutanen Wundheilung ist die Bildung von Narbengewebe. Hierbei wird aus dem zeldichten und matrixarmen späten Granulationsgewebe ein zellarmes und matrixreiches Narbengewebe gebildet. Ein Teil der Fibroblasten differenziert zu Myofibroblasten, die für eine Kontraktion der Wunde sorgen (Skalli et al, 1987). Zusätzlich wird die Zellzahl der Fibroblasten und Endothelzellen durch Apoptose stark reduziert (Desmouliere et al., 1995). Das in der provisorischen Matrix hauptsächlich vorkommende Kollagen Typ III wird durch Kollagen Typ I ersetzt. Zusätzlich wird der Anteil von Fibrin, Fibronektin und Glukosaminoglykanen stark reduziert und es entsteht eine dauerhafte Matrix. Anschließend folgt eine Vernetzung der Kollagenfibrillen, die zu einer erhöhten Reißfestigkeit der ehemaligen Wunde führt. Das Endresultat des Wundheilungsprozesses ist das Narbengewebe. Dieses Gewebe besitzt nur noch 70 % der Festigkeit des Ausgangsgewebes (Levenson et al., 1965).

1.5 Fragestellung

Die kleine GTPase Rac1 hat viele verschiedene Funktionen in der Zellphysiologie. Sie ist unter anderem ein wichtiger Regulator des Aktinzytoskelettes, der Proliferation und Migration von Zellen sowie der Zelltransformation und der Tumorinvasivität. Welche Funktion Rac1 in der Epidermis besitzt ist noch nicht eindeutig geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Rac1 in der Epidermis von Mäusen und in murinen primären epidermalen Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* näher untersucht werden. Dazu sollten transgene Mäuse mit organspezifischer Expression einer dominant negativen Rac1 Punktmutante (N17Rac1) und einer konstitutiv aktiven Rac1 Punktmutante (L61Rac1) etabliert werden. Mit Hilfe dieser Mutanten sollten Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Morphogenese der Epidermis sowie das Regenerationsverhalten nach Verwundung *in situ* studiert werden. Die dabei wirkenden Mechanismen sollten durch Untersuchungen an kultivierten Keratinozyten *in vitro* näher charakterisiert werden.

Zusätzlich sollte die Rolle von Rac1 in der Pathogenese von Tumoren der Epidermis durch Kreuzung mit Tumormodellen der Maus untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war somit, aus den Ergebnissen neue Erkenntnisse über die Rolle von Rac1 in der Biologie der Epidermis zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Materialien stammten, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Biozym (Oldendorf), Roche (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), Biorad (München), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Peclab Biotechnologie (Erlangen) sowie Sigma (Taufkirchen) und wurden im analytischen Reinheitsgrad eingesetzt.

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Die allgemeinen Zellkulturmaterialien stammten von den Firmen Greiner (Solingen), TPP (Trasadingen, Schweiz) und Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), nichtessentielle Aminosäuren sowie SFM-Medium von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) und fötales Kälberserum von der Firma PAA (Cölbe). Die Zusätze L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin sowie DMEM/Ham's F12 (3:1) wurden von der Firma Biochrom (Berlin) bezogen.

2.1.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

ABC-Lösung	PBS, 0,1 % (w/v) CaCl ₂ , 0,1 % (w/v) MgCl ₂
DNA-Probenpuffer (6x)	10 % (v/v) TAE, 50 % Glycerin, 60 mM EDTA; pH 7,0
DNA-Extraktionspuffer	200 mM NaCl, 0.2 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA; pH 8,0 100 mM Tris, pH 8,5
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl
MES-Puffer (20x)	1 M MES, 1 M Tris, 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 8,4 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Puffer A	100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl; pH 9,5
SSC (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
TAE	40 mM Tris, 2 mM EDTA; pH 8,0
TBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl; pH 7,6

TBS-T	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,6
TE-Puffer	0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,6
Trypsin/EDTA	0,1 % (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA

2.1.4 Enzyme

BssHII	NEB, Frankfurt
Clal	NEB, Frankfurt
EcoRI	NEB, Frankfurt
Polymerase K	SIGMA-ALDRICH Chemie, Taufkirchen
Stul	NEB, Frankfurt
Taq Polymerase	NEB, Frankfurt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Xbal	NEB, Frankfurt

2.1.5 Kits und weitere Materialien

Qia Amp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Quiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Gene Images Random Prime Labelling Module	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gene Images CDP-Star Detection Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nucleofaktor Kit 4657	Amara, Köln
CytoTox 96	Promega, Mannheim
Fibronectin	Sigma Chemie, Taufkirchen
Kollagen I	Gibco BRL, Eggenstein
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Braunschweig
Seebue Invitrogen	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Protein Assay	Pierce Rockford, IL, USA
DAKO Pen	DAKO, Hamburg
Tissue-Tek O.C.T.	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Gene Ruler 1 kB-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Bezugsquelle</u>
anti-Maus- α 2 Integrin	Ratte	Mix of 3, Emfret, Würzburg
anti-Maus- α 2 Integrin	Hamster	Klon 12C6 FITC; Emfret, Würzburg
anti-Maus- α 5 Integrin	Ratte	Klon 25B11 FITC, Emfret, Würzburg
anti-Maus- β 1 Integrin	Hamster	Klon Ha45 FITC, Emfret, Würzburg
anti-Maus- β 1 Integrin	Ratte	Klon gEG7, BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-BrdU	Maus	Klon B44, BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-KollagenIV	Kaninchen	Biozol, Eching
anti-human-H2kk	Maus	PE-labeled, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
anti-Maus-Keratin 10	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-Keratin 14	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-Laminin 5	Kaninchen	Biozol, Eching
anti-Maus-Loricrin	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-human-Myc	Maus	Klon 9B11, Cell Signalling, Beverly, MA, USA
anti-human-Myc	Maus	Klon 4A6, HRP, Upstate, Dundee, Großbritannien
anti-human-Rac1	Maus	Klon 23A8, Upstate, Dundee, Großbritannien
anti-Maus-pSTAT3	Kaninchen	Klon 58E12, Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti-Maus-p44/42 MAPK	Maus	Klon 20G11, Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA, USA
anti-human-Vinculin	Maus	Klon 7F9, Chemicon, Hofheim

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Bezugsquelle</u>
IgG (H+L), anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	Molecular Pobes, Eugene, OR, USA
IgG (H+L), anti-Ratte Alexa 488	Ziege	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
IgG Subtyp 1, anti-Maus Alexa 488	Ziege	Molecular Pobes, Eugene, OR, USA
IgG Subtyp 2a, anti-Maus Alexa 488	Ziege	Molecular Pobes, Eugene, OR, USA
HRP konjugiert anti-Maus	Ziege	Dako, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterientransformation mit chemokompetenten Zellen

Bei -80 °C gelagerte kompetente *Escherichia coli* DH5 α Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurde die zu transformierende DNA mit 50 μ l der Bakterien gemischt und der Ansatz weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, fünf Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 μ l vorgewärmten LB-Mediums (ohne Antibiotika) eine Stunde lang bei 37 °C geschüttelt. Verschiedene Volumina dieser Ansätze wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden etwa 4 ml einer 5 ml Übernachtskultur mit Ampicillin als Antibiotikum (Endkonzentration 100 mg/l) verwendet und die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm 6 min sedimentiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) und wurde nach Herstellerangaben mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt, wobei die DNA an Anionenaustauschersäulen bindet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Nach der Präparation wurde die Konzentration der Plasmide photometrisch bestimmt.

2.2.1.3 DNA Isolation aus Mausschwänzen

Von zu genotypisierenden Mäusen wurden etwa 1 cm der Schwanzspitze abgeschnitten, in ein Eppendorfggefäß mit 500 µl Lysispuffer + 10 µl Proteinase K (20 mg/ml, Peqlab, Erlangen) überführt und über Nacht unter Schütteln bei 55 °C gelöst. Am folgenden Tag wurden die Lysate 15 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand in ein mit 1000 µl Isopropanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Schütteln fiel die genomische DNA aus und wurde erneut für 10 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70 % Alkohol gewaschen und 5-10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in ein mit 150 µl TE-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 50 °C unter Schütteln gelöst.

2.2.1.4 DNA Isolation aus Keratinocyten

Bis zur Konfluenz gewachsene Keratinozyten wurden mit Trypsin-Lösung abgelöst mit dem dreifachen Volumen Medium (FAD low Ca²) versetzt und bei 8000 rpm 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in 200 µl PBS gemischt. Die DNA-Isolierung erfolgte nun nach den Vorschriften des Qia Amp DNA Blood Mini Kits.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch (Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg) nach Sambrook et al. (1989) bestimmt. Eine DNA-Lösung hat bei einer optischen Dichte von 1 und einer Wellenlänge von 260 nm eine Konzentration von 50 µg/ml und eine RNA-Lösung unter denselben Bedingungen eine Konzentration von 40 µg/ml. Dies gilt für eine Schichtdicke von 1 cm.

Bei zu geringen Nukleinsäuremengen, die nicht mehr photometrisch quantifiziert werden konnten, wurde deren Konzentration durch Vergleich mit einem Mengenstandard im Agarosegel abgeschätzt. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler 1 kB-Leiter eingesetzt.

2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Das sequenzspezifische Schneiden von Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen in Puffern entsprechend den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt. Es wurden Reaktionsvolumina von 20, 50 und 100 μ l eingesetzt und zwischen 3 und 4 Units Enzym pro μ g DNA verwendet. Die Überprüfung der Größe der dabei entstandenen Fragmente erfolgte anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Elektrophorese erfolgte hauptsächlich in 1 %igen horizontalen Agarosegelen (8,5 cm x 6,8 cm und 13,8 cm x 11,8 cm). Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet (Sambrook et al., 1989).

Die Herstellung der Gele erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Um die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar zu machen, wurden 10 μ g Ethidiumbromid pro 100 ml Agaroselösung dazugegeben. Bei Betrachtung des Gels mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm zeigt das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid eine orange-rote Fluoreszenz. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 1x Ladepuffer (6x Ladepuffer, MBI Fermentas, St. Leon Roth) versetzt. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler 1 kB-Leiter verwendet.

Weiter zu analysierende DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit einer Rasierklinge unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt

2.2.1.8 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zusatz von 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 fachem Volumen Ethanol für 30 min bei -20 °C. Nach 30 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) bei 13000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes 10 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden Fragmente einer DNA-Vorlage zwischen den Bindungsstellen zweier entgegengesetzt liegender Primer synthetisiert. Das Potential der PCR liegt in der zyklischen Wiederholung von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Synthese der DNA-Fragmente, wodurch sich die Menge neusynthetisierter DNA bei einem Zyklus theoretisch verdoppelt. Dadurch können Teile der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge exponentiell (2^n) vervielfältigt werden. Als Matrize für die PCR wurde cDNA, genomische DNA und Plasmid-DNA eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in T3 Thermocyclern (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

PCR-Nachweis für das RacN17 oder RacL61 Transgen

Primer (MWG Biotech AG):

5'-Primer SF5-23: TTG GTT GTG TAA CTG ATC AGT AGG C

3'-Primer SF3-25: TGG AGA GCT AGC AGG AAA CTA GG

PCR-Ansatz: 40 μ l

2,5 μ l DNA

4,0 μ l 10x PCR Puffer (NEB, Frankfurt)

1,2 μ l 10 mM dNTP Mix

1,2 μ l SF3-25, 10 pmol/ μ l

1,2 μ l SF5-23, 10 pmol/ μ l

0,6 μ l Taq Polymerase (NEB, Frankfurt)

29,3 μ l H₂O

Programm:

Denaturierung: 94 °C 3 min

Denaturierung: 94 °C 30 sec |
Annealing: 58 °C 30 sec | 39 Zyklen
Elongation: 72 °C 30 sec |

End-Elongation: 72 °C 5 min

Bandengröße: ca. 500 bp

2.2.1.10 Southern Blot Analyse

2.2.1.10.1 Nukleinsäuretransfer auf Cellulosemembran

Nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen wurde die DNA mit Hilfe des Southern Blots (Southern, 1975) auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Das Gel wurde zunächst 20 min in 250 mM HCl-Lösung geschwenkt, einige Male mit Wasser gespült und dann weitere 30 min in Alkali-Transfer-Lösung (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer auf die Membran erfolgte über Nacht durch die Kapillarwirkung von Whatmanpapier und Papiertüchern mit Alkali-Transfer-Lösung. Die Membran wurde anschließend zur Fixierung der DNA im UV-Crosslinker (Stratagene, Heidelberg) bestrahlt und bis zu weiter führenden Hybridisierung bei -20 °C eingefroren.

2.2.1.10.2 Hybridisierung mit DNA-Sonden

Die zu hybridisierenden Membranen wurden zunächst in Prähybridisierungs-Lösung (5x SSC, 1 % (v/v) Liquid Block (Amersham Pharmacia), 0,1 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) Dextransulfat) bei 65 °C für mindestens 2 h vorhybridisiert. Im Anschluss daran wurde die Prähybridisierungs-Lösung gegen die Hybridisierungs-Lösung (5x SSC, 1 % (v/v) Liquid Block, 0,1 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) Dextransulfat, 200 ng mit Fluorescein markierter Sonde) ausgetauscht und die Membranen über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen zunächst 15 min bei 65 °C mit 1 x SSC / 0,1 % SDS, dann bei gleicher Temperatur 15 min mit 0,5 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit Blockierungslösung (90 % (v/v) Puffer A, 10 % (v/v) Liquid Block, 0,1 % (w/v) Natriumazid) 1h bei RT

inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit der anti-Fluorescein Alkalische Phosphatase Konjugat Lösung (90 % (v/v) Puffer A, 0,5 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) Natriumazid, 1/5000 AP-Konjugat (Amersham Pharmacia, Braunschweig) für eine 1 h bei RT. Anschließend wurden die Membranen 3x 15 min mit Tween 20 (0,3 % (v/v)) in Puffer gewaschen und mit 2 ml CDP-Star TM (Amersham Pharmacia, Braunschweig) inkubiert und bei RT in Röntgenkassetten exponiert.

Sollten die Membranen mit einer weiteren Probe hybridisiert werden, wurden sie zum Entfernen der alten Sonde zweimal für je 30 min bei 80 °C mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen.

2.2.1.11 Bestimmung der Kopienzahl von Genen

Zur Bestimmung der Kopienzahl des in Mauskeratinozyten integrierten Transgens wurden jeweils 6 µg genomische DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI für 4 h bei 37 °C verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurden 6 µg genomische DNA mit dem Restriktionsenzym Stul unter gleichen Bedingungen verdaut und ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden beide Ansätze wie Kapitel 2.2.1.10.1 und Kapitel 2.2.1.10.2 behandelt. Der mit EcoRI verdaute Ansatz wurde dabei mit einer Sonde gegen das Il-2-Rezeptor Gen inkubiert. Dieses Gen kommt im Mausgenom nur mit einer Kopie vor. Der mit Stul verdaute Ansatz wurde währenddessen mit einer Sonde gegen das RacN17 Transgen inkubiert. Nach Detektion beider Ansätze konnte durch Vergleich der jeweiligen Intensitäten mit Hilfe der Densitometrie die Kopienzahl in den jeweiligen Zelllinien ermittelt werden.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Isolation von murinen Keratinozyten

2.2.2.1.1 Isolation von Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen

Zur Isolation von murinen Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen, die nicht älter als drei Tage waren, wurden diese dekapitiert und die Torsi etwa eine Stunde auf Eis gekühlt, um ein leichteres Ablösen der Haut zu ermöglichen. Die Mäuse wurden nun kurz in PBS-Lösung und danach mindestens 1 min in Betaisodona-Lösung gewaschen, anschließend erneut kurz in PBS getaucht, für 1 min in 70 % Ethanol desinfiziert und abschließend kurz in PBS-Lösung gewaschen. Unter sterilen

Bedingungen wurden Schwanz und Pfoten entfernt und die Haut vom Körper abgetrennt. Die Maushaut wurde mit der Epidermisseite nach oben in eine Petrischale gelegt und mit einer 2 %igen Trypsinlösung unterspült, dass nur die dermale Seite Kontakt mit der Lösung hatte. Die Schalen wurden nun über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Epidermis vorsichtig von der Dermis abgelöst und mit Skalpell zerkleinert. Die so entstehenden Gewebestücke wurden anschließend 1 h bei RT in 1 ml FAD low Ca²⁺-Medium geschüttelt und anschließend auf mit Kollagen I beschichteten 6-well-Schalen auf Feederzellen ausgesät.

Das FAD low Ca²⁺-Medium bestand aus dem Gemisch der Medien Ham's F12/DMEM im Verhältnis 1:3, 10 % FCS (chelatiert), 0,5 µg/ml Hydrocortison, 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml EGF, 1,8 x 10⁻¹⁰ M Adenin und 10⁻¹⁰ M Cholera toxin. Zuletzt wurden 10 ml Zusätze dazugegeben. Diese wurden aus 2 x 50 ml Penicillin/Streptomycin, 2 x 50 ml Glutamin und 0,5 g Vitamin C angemischt und zu 10 ml aliquotiert. Das in diesem Medium verwendete FCS wurde vorher mit Chelex resin (Biorad, München) versetzt. Durch Inkubation ü.N bei 4 °C wurde dem FCS das Kalzium entzogen (50 ml FCS/ 2g Chelex resin). Anschließend wurde das FCS sterilfiltriert.

2.2.2.1.2 Isolation von Keratinozyten aus adulten Mäusen

Zur Isolation von Keratinozyten aus adulten Mäusen wurden etwa 2 Monate alte Mäuse durch die Behandlung mit Kohlendioxid getötet und der Rücken rasiert. Zur Desinfektion wurde die getötete Maus in Betaisodona-Lösung getaucht und so ihr Fell und die Haut komplett durchgeweicht. Anschließend wurde sie zweimal in sterilem Wasser gewaschen, für 2 min in 70 % Ethanol getaucht und nochmals in sterilem Wasser gewaschen. Die von Haaren befreite Haut wurde mit Skalpell vom Rücken geschnitten und das Fettgewebe entfernt. Anschließend wurde die Haut mit der haarigen Seite nach unten in PBS/2 x Antibiotika-Lösung (PBS mit 1/5 (v/v) Penicillin/Streptomycin (10⁴ U Penicillin/ml, 10⁴ µg Streptomycin/ml, 1/2000 (v/v) Amphotericin B (5mg/ml)) gelegt. Nun wurde das subkutane Gewebe mit einem Skalpell entfernt, bis die verbleibende Haut durchscheinend wirkt. Die Haut wurde daraufhin mit der haarigen Seite nach oben auf der Oberfläche von einer 0,2 %igen Trypsinlösung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Haut in 10 ml Erntemedium (FAD-Lösung, FCS und 2 x Antibiotikallösung) gewaschen und die Epidermis in weiteren 10 ml Erntemedium abgekratzt. Die Epidermisbruchstücke

wurden nun in ein 15 ml Falcon-Gefäß mit Rührfisch überführt, 2 x mit Ernte-Medium gewaschen und in 10 ml frischem Erntemedium für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden die Epidermistrümmer durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm geführt, um Haare und feste Teilchen zu beseitigen und danach für 10 min bei 1000 rpm (Megafuge1.0, Heraeus Sepatech, Hanau) bei 4 °C zentrifugiert. Nun konnten, die somit vereinzelt adulten Keratinozyten, auf mit Kollagen I beschichteten 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und bei 32 °C kultiviert werden.

2.2.2.2 Einfrieren von murinen Keratinozyten

Um Mauskeratinozyten einzufrieren, wurden in Kultur gehaltene Zellen 2 x in PBS/0,02 % EDTA gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden danach 1 ml Trypsinlösung auf die Schalen gegeben und diese bei 32 °C 8-10 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 3 ml FAD low Ca²⁺-Medium resuspendiert und bei 1200 g für 5 min zentrifugiert (Megafuge1.0, Heraeus Sepatech, Hanau) der Überstand abgenommen und die pelletierten Zellen in 1 ml Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxid in FCS) in Cryo-Röhrchen überführt, erneut resuspendiert und bei -80 °C im Isopropanol-Bad langsam eingefroren.

2.2.2.3 Transfektion humaner Keratinozyten

Humane Keratinozyten der Passagen zwei bis fünf, die aus Vorhäuten isoliert worden waren, wurden vor der Transfektion auf Feederzellen (NIH3T3 Mausfibroblasten) nach einem Standardprotokoll (Watt, 1994) kultiviert und auf ca. 50-60 %ige Konfluenz gebracht. Nach Ablösen der Feederzellen wurden die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen, durch Trypsinlösung abgelöst und anschließend analog dem "General Protokoll for adherent cells" (Amaxa, Köln) behandelt. Unter Verwendung des Elektroporators (Programm U28) und dem Nukleofaktor Kit (Test Solution 4657; Amaxa, Köln) wurden 4 µg Plasmid und im Durchschnitt 6 x 10⁵ Zellen benutzt.

2.2.2.4 Analyse des Ausbreitungsverhaltens von murinen Keratinozyten

Zuerst wurden Objektträger mit 10 µg/ml Kollagen I oder 20 µg/ml Polylysin in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Zusätzlich wurde eine 6,5 cm Kulturschale mit poly-HEMA (0,4 % poly-HEMA in 50 % Aceton/50 % Ethanol) 1 min bei RT beschichtet.

Am Versuchstag wurde eine Schale Keratinozyten (human oder murin) von Feederzellen befreit und die Zellen mit Trypsinlösung abgelöst. Diese wurden danach in 6 ml Methylcellulose-Medium (3,5 g Methylcellulose, 180 ml FAD 60 °C, 30 min bei RT dann 18 h bei 4 °C rühren, 20ml Serum zugeben und 30min bei 9500 rpm abzentrifugieren, bei -20 °C lagern) resuspendiert, auf poly-HEMA beschichteten Schalen ausgesät und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 10 fachen Volumen PBS/EDTA ausgewaschen und 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Megafuge1.0, Heraeus Sepatech, Hanau). Danach wurden die Keratinozyten 2x mit DMEM gewaschen und in DMEM (Zellzahl 100000/ml) aufgenommen. Je nach Vorgabe wurden nun 20000 Zellen pro ml Ansatz zu verschiedenen Stimuli gegeben und diese 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf die, wie oben beschriebenen beschichteten Objektträger (2 h bei 37 °C vorgewärmt) gegeben und diese für 40 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun mit 4 % Formaldehyd für 10 min fixiert, 1x in PBS/ABC gewaschen und für weitere 5 min mit 0,5 % Triton/PBS bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden sie erneut gewaschen, 30 min mit 50 % FCS bei 37 °C blockiert und nochmals gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen 15 min mit TRITC-Phalloidin (1:100) bei RT gefärbt, nochmals gewaschen und mit Gelvatol eingedeckt. Die Auswertung des Ausbreitungsverhaltens wurde mit Hilfe digitaler Bilder vorgenommen

2.2.2.5 Analyse des Adhäsionsverhaltens von murinen Keratinozyten

Die Adhäsion von murinen Keratinozyten an unterschiedliche Substrate wie Kollagen I oder Fibronectin wurde mit Hilfe des Cyto Tox96 Assays (Promega, Mannheim) durchgeführt. Hierbei wird die Adhäsion indirekt durch die Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität bestimmt. Dieses Enzym ist im Cytoplasma von intakten Zellen lokalisiert. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf einer 96-well Zellkulturplatte zusammen mit den Zellen für eine Eichkurve ausgesät und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Danach wurde das Medium abgesaugt und mit Ausnahme der Zellen für die Eichkurve die Wells 2x mit PBS/ABC gewaschen. Im folgenden wurden 15 µl 10x Lysislösung (9 % (v/v) Triton X-100 in sterilem Wasser) per 100 µl Kulturmedium 60

min bei 37 °C auf die Zellen gegeben, um diese zu lysieren. Die so behandelten Zellen wurden 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert (Megafuge1.0, Heraeus Sepatech, Hanau) und 50 µl der Überstände wurden anschließend in eine neue 96-well Platte überführt. Von dem Substratmix wurden 50 µl auf jeden Zellüberstand gegeben, um die enzymatische Reaktion zu starten. Nach 30 min Inkubation unter Lichtausschluss wurde die enzymatische Reaktion durch eine Stopplösung (50 µl/Well) abgestoppt. Die Absorption der Zellen konnte nun mit Hilfe eines Elisa Readers (Immuno Reader NJ-2000, Intermed, Wiesbaden) bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden und die Zellzahl der angehafteten Zellen mit Hilfe der Eichkurve ermittelt werden. Die Zahl der Zellen war direkt proportional zu den Absorptionsergebnissen, welche die LDH-Aktivität repräsentieren.

2.2.2.6 *In vitro* Wundheilungsversuche mit murinen Keratinozyten

Mauskeratinozyten wurden auf mit Kollagen I beschichteten 6-well-Schalen zur Konfluenz gebracht. Anschließend wurde mit der Spitze einer abgeschmolzenen Pasteurpipette ein etwa 1 mm breiter Spalt in die Zellschicht gesetzt. Danach wurden die Zellen für 18 h bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dabei die Schließung der Lücke durch Aufnahme eines Kamerabildes (OBS CCD FV2T Kamera, Olympus, Hamburg) alle 10 min dokumentiert. Anschließend wurde die Breite des Spaltes mit der OBS CellR Software (Olympus, Hamburg) ausgewertet.

2.2.2.7 FACS-Analyse humaner Keratinozyten

Humane Keratinozyten wurden trypsiniert und in DMEM, versetzt mit 10 % FCS, resuspendiert. Der Antikörper gegen H2kk (PE-labeled, BD Biosciences, San Jose, CA) wurde 1:100 verdünnt und mit den Zellen auf Eis für 10 min abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei mal in PBS gewaschen und mit einem FACS Calibur Gerät (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) analysiert.

2.2.2.8 Integrin-Analyse muriner Keratinozyten

Von einer konfluenten 6 cm-Zellkulturschale wurden die Mauskeratinozyten abtrypsiniert und in 800 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf 4 Ansätze mit je 200 µl PBS verteilt. Die vier Ansätze dienten der Bestimmung eines Leerwertes, der α2-, β1- und der α5-Integrinuntereinheit. Jeder Ansatz wurde mit 20 µl des jeweiligen Antikörpers (anti-α2 Integrin Klon 12C6 FITC-konjugiert; anti-α5

Integrin Klon 25B11 FITC-konjugiert; anti- β 1 Integrin Klon Ha45 FITC-konjugiert; Emfret, Würzburg) versetzt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit PBS gewaschen, mit 1 ml PBS versetzt und 5 min bei 2750 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden nun in 100 μ l 1 % PFA/PBS resuspendiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) und für die Messung mit je 400 μ l FACS FLOW verdünnt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem FACS Calibur Gerät.

2.2.2.9 Time-lapse Videomikroskopie

Jeweils 5000 Mauskeratinozyten wurden auf 24-well-Zellkulturschalen (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) auf einer Kollagen I (20 μ g/ml) oder Fibronektin (10 μ g/ml) Matrix ausgesät und 16 h bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen in SFM-Medium ohne Serum weiter kultiviert. Zur Stimulation der Migration wurde kurz vor Beginn der Filmaufnahme IGF-1 (100 ng/ml) zum Medium gegeben. Die Zellen wurden danach in die Inkubationskammer des IX81 Olympus Migrationsmikroskopes bei 32 °C, 5 % CO₂, und 60 % Luftfeuchtigkeit bis zu 18 h beobachtet. Alle 5 min wurde ein Bild von der OBS CCD FV2T Kamera aufgenommen. Für die Visualisierung und Quantifizierung der Zellbewegung wurden das Computerprogramm OS Cell R und DIAS (Solltech, Oakdale, IA, USA) genutzt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion

Die in 6 cm-Zellkulturschalen kultivierten Keratinozyten (human und murin) wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 0,5 ml Lysispuffer (50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 % NP-40) versetzt mit einem Proteinase-Inhibitormix (20 mM Leupeptin, 10 μ l; 20 mM Leupeptin, 10 μ l; 1 g/ml p-Nitrophenylphosphat, 100 μ l; 100 mg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 50 μ l; 100 mM Orthovanadat, 50 μ l) bei 4 °C von den Kulturschalen geschabt. Die abgeschabten Zellen wurden nun mit PMSF (2 μ l/ 100 ml) versetzt, 30 sec mit Ultraschall (Ultraschallprozessor UP-2005, Dr. Hielscher GmbH, Teltow) behandelt, und für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde danach abgenommen und mit 1/3 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Proteinkonzentration wurde durch die BCA-Methode mit Reagenzien von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.3.2 Western Blot Analyse

2.2.3.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Polyacrylamidgele entstehen aus der Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Porengröße wird durch die Gesamtacrylamidkonzentration T und den Vernetzungsgrad C definiert und beeinflusst das Migrationsverhalten der Moleküle im Gel.

$T \text{ in } \% = (\text{g Acrylamid} + \text{g Bisacrylamid} \times 100) / 100 \text{ ml}$

$C \text{ in } \% = (\text{g Bisacrylamid} \times 100) / (\text{g Acrylamid} + \text{g Bisacrylamid})$

Zur Analyse von Proteinextrakten mittels Western Blot wurden 30 µg Protein mit Probenpuffer versetzt, 5 min aufgekocht und in 10 oder 4-12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Invitrogen, Karlsruhe). Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe eines Tankblotsystemes (Invitrogen, Karlsruhe) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

2.2.3.2.2 Immundetektion von Proteinen

Die Membran wurde anschließend für 2 h bei RT in einer Magermilchlösung (5 % fettfreies Milchpulver/TBS, 0,1 % Tween 20 (TBST)) blockiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 5 % Magermilchlösung in TBST (1:500 für anti-Rac1 (Klon 23A8; Upstate, Großbritannien), 1:1000 für anti-Myc (Klon 9B11, Cell Signalling, USA; Klon 4A6, Upstate, Großbritannien) ü.N. bei 4 °C im Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran für 5 min in TBST gewaschen und mit dem HRP konjugierten sekundären Antikörper (Sigma, Taufkirchen) 1:2000 in Magermilchlösung für anti-Rac1, 3 % BSA/TBS für anti-Myc 1 h bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nun wurde die Membran dreimal 30 min in TBST bei RT gewaschen und mit dem Chemilumineszenz Reagenz Plus Kit (Perkin ElmerTM, Rodgau) auf Röntgenfilmen entwickelt.

2.2.4 Immunhistologische Untersuchungen

Immunhistologische Untersuchungen wurden an 6-8 µm dicken Paraffinschnitten, sowie an humanen wie murinen Keratinozyten durchgeführt. Die Kryoschnitte (4-14 µm) wurden von TissueTek O.C.T. eingebetteten Gewebeproben angefertigt und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.1 Färbung des Myc-Tags

Mauskeratinozyten auf mit Kollagen I beschichteten Chamberslides oder Cryoschnitte von Maushaut wurden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min fixiert, 5 min in PBS gewaschen und in 0,5 % Triton-x 100 in PBS für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben erneut in PBS gewaschen und mit 10 % Ziegenerum (DAKO, Hamburg) in PBS 30 min bei RT blockiert. Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation der Proben mit dem primären Antikörper Maus-anti-Myc in der Verdünnung von 1:1000 in 3 % BSA/TBS ü.N. bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Proben 10 min in TBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Maus 1:500 in 3 % BSA/TBS mit 1:1000 DAPI (10 mg DAPI in 1 ml Methanol) und TRITC-Phalloidin 1:100 als Gegenfärbung 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal für 15 min mit PBS gewaschen, in 4 % PFA für 10 min nachfixiert, kurz in sterilem Wasser gewaschen und mit Gelvatol eingedeckelt.

2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von Bromdeoxiuridin (BrdU)

2.2.4.2.1 BrdU-Färbung in der Maushaut

In Paraffin eingebettete Hautschnitte von Mäusen wurden durch Inkubation in Xylol zunächst entwacht und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Schnitte wurden anschließend 5 min in Automation-Puffer (AP, Biomedica Corp) gewaschen, in 2 N HCl für 30 min bei 37 °C demaskiert und 3 min bei RT in Boratpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in 0,01 % Trypsin /0,05 M Tris für 3 min bei 37 °C verdaut, 2 min in sterilem Wasser und 5 min in AP gewaschen. Danach erfolgten eine zwanzigminütige Blockierung mit 10 % Ziegenerum und die Inkubation mit einem BrdU-Antikörper (Klon B44, BD Biosciences, Heidelberg) in der Verdünnung 1:25 in 1 % BSA für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit AP für 5 min gewaschen und mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Maus (Subtyp IgG 2a) 1:2000 verdünnt in 1 % BSA 20 min bei RT inkubiert. Danach

wurden die Schnitte 2x 5 min bei RT in AP gewaschen mit TRITC-Phalloidin 1:100 gegengefärbt, 3x in sterilem Wasser gewaschen und in Gelvatol eingebettet. Die Quantifizierung der BrdU-positiven Färbungen erfolgte anhand digitaler Bilder (Leica DM 4000 B Mikroskop, Leica, Wetzlar; KY-F75U Digital-Kamera, JVC, Wayne, USA).

2.2.4.2 BrdU-Färbung in Mauskeratinozyten

Es wurden etwa 3000 Zellen auf die mit Kollagen I beschichteten Chamberslidewells ausgesät und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Hungermedium (40 Teile DMEM Ca² frei/ 1 Teil DMEM) mit 1 µM BrdU und 10 ng EGF/ml (Stimulans zur Proliferation) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 70 %igem Ethanol für 30 min bei RT fixiert und danach 30 min getrocknet. Im Anschluss daran wurden die Zellen 2 min in 0,07 N NaOH bei RT und dann kurz in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper anti-BrdU (1:5 in PBS/0,5 % Tween 20) für 45 min bei RT. Wiederum wurde mit PBS gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Maus (Subtyp IgG1) für 1 h bei RT inkubiert und mit DAPI 10 min bei RT gegengefärbt. Abschließend wurden die Zellen 3x 15 min mit PBS gewaschen, in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT nachfixiert, kurz in sterilem Wasser gewaschen und schließlich mit Gelvatol eingedeckt.

2.2.4.3 Färbung von Differenzierungsmarkerproteinen in der Maushaut

Die Färbung mit Differenzierungsmarkern wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, dazu wurden die Protokolle der Antikörperhersteller mit leichten Modifizierungen verwendet. In Paraffin eingebettete Maushautschnitte wurden durch Inkubation in Xylol zunächst entwachst und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte bei 37 °C mit einer Trypsinlösung für 15 min behandelt, 2x mit PBS/ABC für je 5 min gewaschen und mit 10 % Ziegen Serum für 60 min bei RT blockiert. Die folgenden primären Antikörper wurden in 2 % Fischhaut-Gelatine (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) angesetzt: polyklonaler Antikörper gegen Keratin 10 (MK10, Babco, USA) 1:1000, polyklonaler Antikörper gegen Keratin 14 (MK14; Babco, USA) 1:200 und polyklonaler Antikörper gegen Loricrin (Babco, USA) 1:1000. Die Schnitte wurden 1 h bei RT mit den primären Antikörpern inkubiert und anschließend 5 min in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege anti-Kaninchen IgG 1:500 in Fischhaut-

Gelatine mit Propidiumiodid als Gegenfärbung (1:100) für 1 h bei RT. Die Schnitte wurden nun dreimal für 10 min in PBS gewaschen und für weitere 10 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd nachfixiert. Nach kurzem Tauchen in sterilem Wasser wurden die murinen Hautschnitte mit Gelvatol eingedeckelt. Digitale Bilder der Immunfärbungen wurden unter einem konfokalen Lasermikroskop (Leica DMRE2, Heidelberg) aufgenommen. Dabei erfolgte die Aufnahme der Signale für eine erfolgreiche Differenzierungsmarkerfärbung bei 520 ± 20 nm und die Färbung der Zellkerne mit Propidiumiodid bei etwa 620 nm.

2.2.4.4 Färbung von Adhäsions- und Basalmembranmarkerproteinen in der Maushaut

Die Färbung von Adhäsions- und Basalmembranmarkerproteinen wurde an Cryoschnitten durchgeführt. Dabei wurden die Protokolle der Antikörperhersteller mit leichten Modifizierungen verwendet. Cryoschnitte von Maushaut wurden 10 min in eiskaltem Aceton fixiert, getrocknet und dreimal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 30 min in 10 % Ziegen Serum inkubiert. Die folgenden primären Antikörper wurden in 0,5 % BSA/PBS angesetzt: monoklonaler Antikörper gegen $\alpha 2$ -Integrin (1:500), monoklonaler Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrin (1:200), monoklonaler Antikörper gegen Laminin 5 (1:100), monoklonaler Antikörper gegen Kollagen IV (1:100). Die Schnitte wurden ü.N. bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert und anschließend 5 min mit PBS/0,2 % Tween 20, 5 min mit PBS/0,02 % Tween 20 und weitere 5 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Ratte beziehungsweise -anti-Kaninchen IgG 1:500 in 0,5 % BSA/PBS mit Propidiumiodid als Gegenfärbung (1:100) für eine 1 h bei RT. Die Schnitte wurden nun dreimal für 10 min in PBS gewaschen und für 10 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd nachfixiert. Nach kurzem Tauchen in sterilem Wasser wurden die murinen Hautschnitte mit Gelvatol eingedeckelt.

2.2.4.5 Hämatoxin und Eosinfärbung (HE-Färbung)

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaunlösung nach Mayer (Merck, Darmstadt) und das Zytoplasma mit Eosin (0,5 %ige wässrige Lösung, Thermo Shandon, Frankfurt) gefärbt.

2.2.4.6 Färbung von pERK und pSTAT3 in Mauswunden

Cryoschnitte von Maushaut wurden 15 min in 4 % Paraformaldehyd, 2 % Eisessig in PBS fixiert, danach zweimal in PBS gewaschen und 2 min in 5 % Eisessig in Methanol bei 0 °C permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min mit PBS gewaschen und 30 min in 8 % BSA/PBS bei RT blockiert. Folgende primäre Antikörper wurden in „Antibody Diluent Solution Background Reducing Agent“ (ADSBRA, Dako, Hamburg) verwendet: anti-p44/42 MAPK (Erk, 1:100, Klon 20G11, Santa Cruz, USA), anti-pSTAT3 (1:100, Klon 58E12, Cell Signalling, USA). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C ü.N.. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und 45 min mit Alexa 488 Ziege-gegen Kaninchen 1:500 in ADSBRA-Lösung bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen, 5-8 min mit TRITC-Phalloidin 1:150 gegengefärbt, die Schnitte erneut 5 min in PBS gewaschen, kurz in sterilem Wasser abgespült und mit Gelvatol eingedeckt.

2.2.4.7 Färbung von Vinculin in Mauskeratinozyten

Die Färbung von Vinculin wurde an Mauskeratinozyten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 5-10 min mit 2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) wurden die Zellen 5 min mit 0,2 % Triton X 100 in PBS behandelt. Danach wurden diese nach dreimaligen Waschen für 5 min in PBS für 60 min mit 10 % Ziegenserum in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem anti-Vinculin Antikörper (1:500, 1 % BSA in PBS) erfolgte ü.N. bei 4 °C. Nach dreimaligem waschen für 5 min in PBS, wurden die Keratinozyten mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Maus (1:500) 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal 5 min in PBS gewaschen und mit Gelvatol eingedeckt.

2.2.5 Mausexperimente *in vivo*

2.2.5.1 Wundheilung in Mäusen

Die Mäuse wurden mit 200-250 ml Narkosemittel (1ml Ketanest 50, Porke-Davis, 250 µl Rompun 2 % (Bayer, Leverkusen) in 4 ml 0,9 % NaCl). durch intraperitoneale Injektion narkotisiert und der Rücken rasiert. Anschließend wurden die Augen mit Bepanthen-Salbe abgedeckt und mit Hilfe von 4-mm Biopsiestanzen (pfm, Köln) je zwei Wunden auf dem Rücken der Tiere gesetzt. Die Tiere wurden nach 2 oder 5 Tagen nach der Verwundung durch Kohlendioxidinhalation getötet und die gesamte Wunde einschließlich etwa 1 cm Wundrand entnommen. Die Wunden wurden in Formalin fixiert und in Paraffin oder Tissue Tek nach Routine-Protokollen eingebettet. Morphometrische Messungen der Länge und des Flächeninhaltes der Wundzungen wurden an mit HE-gefärbten Schnitten mit Hilfe eines Leica DM 4000 B Mikroskops (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Dieses Mikroskop war ausgestattet mit einer KY-F75U Digital-Kamera (JVC, Wayne, USA) und dem Programm Diskus (Carl H. Hilgers, Technisches Büro, Königswinter).

2.2.5.2 Tumorinduktion durch Bestrahlung von Mäusen

Zur Induktion von Tumoren in der murinen Epidermis wurden transgene Mäuse mit 200 µl Narkosemittel (100 mg Ketaminhydrochlorid, 2 mg Xylamine in 20 ml PBS) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert, auf dem Rücken rasiert und die Augen mit Bepanthen-Salbe abgedeckt. Die rasierten Rücken wurden mit Alufolie bedeckt, die ein 4 cm² großes Fenster frei ließ. Anschließend wurden die betäubten Mäuse mit einer Dosis von 10 Joule UVA/ cm² und 1 Joule UVB/ cm² für etwa 25 min bestrahlt (Waldmann UV-Lampe, Schweningen). Dies entsprach 1,4 mW/s UVA und 5,5 mW/s UVB. Die bestrahlten Mäuse wurden nach 2, 4 und 6 Wochen getötet und das bestrahlte Stück Rückenhaut entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin oder Tissue Tek nach Routine-Protokollen eingebettet.

3 Ergebnisse

3.1 Transiente Transfektion humaner Keratinozyten

3.1.1 Beschreibung der Ausgangsplasmide

Zur Analyse von Rac1 in Keratinozyten von Mensch und Maus wurden von Allan Hall (London, Großbritannien) die Plasmide pRK5 Myc N17Rac1, pRK5 Myc L61Rac1 und pRK5 Myc WtRac1 zur Verfügung gestellt. Die pRK5 Plasmide besitzen vom 5'- bis zum 3'-Ende einen CMV-Promotor aus dem Zytomegalovirus, eine Kozak-Sequenz für die effiziente Initiation der Translation, einen Myc-Tag (EQKLISEEDL), eine multiple Klonierungsstelle und eine vom Simian Virus 40 (SV40) stammende Poly-A-Sequenz. In Abbildung 3.1 ist exemplarisch das Konstrukt mit der cDNA von N17Rac1 als Insertion in der multiplen Klonierungsstelle dargestellt.

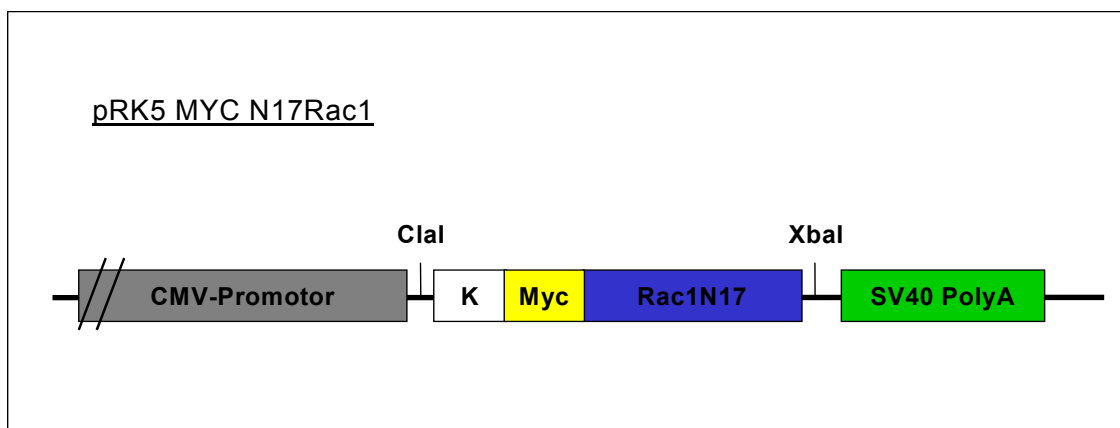


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des pRK5 Myc N17Rac1 Konstruktes. Dem CMV (Zytomegalovirus)-Promotor folgt, eingerahmt durch eine Clal und eine Xbal Restriktionsschnittstelle, eine Kozak-Sequenz (K), eine N-terminale Myc-Tag (16 Aminosäuren), die cDNA von N17Rac1 und die SV40 Poly-A-Sequenz.

N17Rac1 ist eine Punktmutante von Rac1. Hierbei wurde ein Serin zu Asparagin Aminosäureaustausch an Position 17 durchgeführt. Dies führt zu einem Protein welches die Eigenschaften einer dominant negativen Mutante aufweist. Das Plasmid pRK5 Myc L61Rac1 hat die cDNA der Punktmutante L61 Rac1 inseriert. Bei diesem Protein wurde an der Position 61 die Aminosäure Glutamin zu Leucin ausgetauscht, was zu einer konstitutiv aktiven Mutante führt. Das Plasmid pRK5 Myc WtRac1 besitzt als Insertion die cDNA der Wildtypsequenz von Rac1.

3.1.2 Etablierung der transienten Transfektion durch Elektroporation

Um die Funktionalität dieser Konstrukte zu testen, wurde in einem ersten Schritt eine Methode zur transienten Expression durch Elektroporation in humanen primären Keratinozyten etabliert. Andere Transfektionsmethoden wie die Lipofektion (mit Hilfe von Liposomen) oder der Gebrauch von Polykationen (wie das Polybren) waren bei diesem Zelltyp nur mit geringem Erfolg anwendbar. Somit wurde mit der Firma Amaxa (Köln) kooperiert und deren Elektroporationstechnologie für eukaryontische Zellen an die zu untersuchenden Zellen angepasst. Als Ausgangsmaterial dienten primäre humane Keratinozyten, der Passagen 2-5, isoliert aus Vorhäuten. Diese Zellen wurden vor der Transfektion auf Feederzellen (NIH3T3 Fibroblasten) nach einem Standardprotokoll (Watt, 1994) kultiviert.

3.1.2.1 1. Testreihe der Transfektion

In der ersten Testreihe wurde als Transfektions-Reagenz das Plasmid pIRES-EGFP (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieses Plasmid exprimiert das Protein EGFP welches leicht in der Immunfluoreszenz zu detektieren ist. In dieser Versuchsreihe wurden die Keratinozyten bis zu einer Konfluenz von 80-90 % vermehrt. Nach Ablösen der Feederzellen wurden die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen, durch Trypsinlösung abgelöst und anschließend analog zu dem "General Protocol for adherent cells" von der Firma Amaxa behandelt. Dabei wurde die Zellzahl mit 5×10^5 Zellen pro Versuch konstant gehalten, die Plasmidkonzentration und die ausgewählten Programme variiert.

Programme: U16, U15, U22, U25, U29, U27, U08, U12, U21

Transfektions-Plasmid: pIRES-EGFP (Invitrogen)

Plasmid-Konzentration: (0 µg), 0,5 µg, 1-5 µg pro Ansatz.

Zellzahl: 5×10^5 Zellen

Nach erfolgter Transfektion wurden die Keratinozyten wieder auf Feederzellen ausgesät und über Nacht bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Expression von EGFP wurde durch FACS-Analyse untersucht.

	U16,	U15,	U22,	U25,	U29,	U27,	U08,	U12,	U2
0,0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,0 µg	+	-	-	+	-	-	-	-	-
4,0 µg	++	-	-	++	-	-	-	-	-
5,0 µg	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabelle 1: Paarungen der ersten Testreihe mit eingesetzter Plasmidkonzentration und verwendeten Programmen; Mit 4 µg des pIRES-EGFP-Plasmids und den Programmen U16 und U25 konnten Transfektionsraten von knapp 30 % erzielt werden. (-: keine Transfektion; +: leichte Transfektion, ++: mittelstarke Transfektion)

Hierbei zeigte sich, wie in Abbildung 3.2 zu entnehmen ist, bei den Programmen U16 und U25 eine reproduzierbare Transfektionseffizienz zwischen 20-30 %.

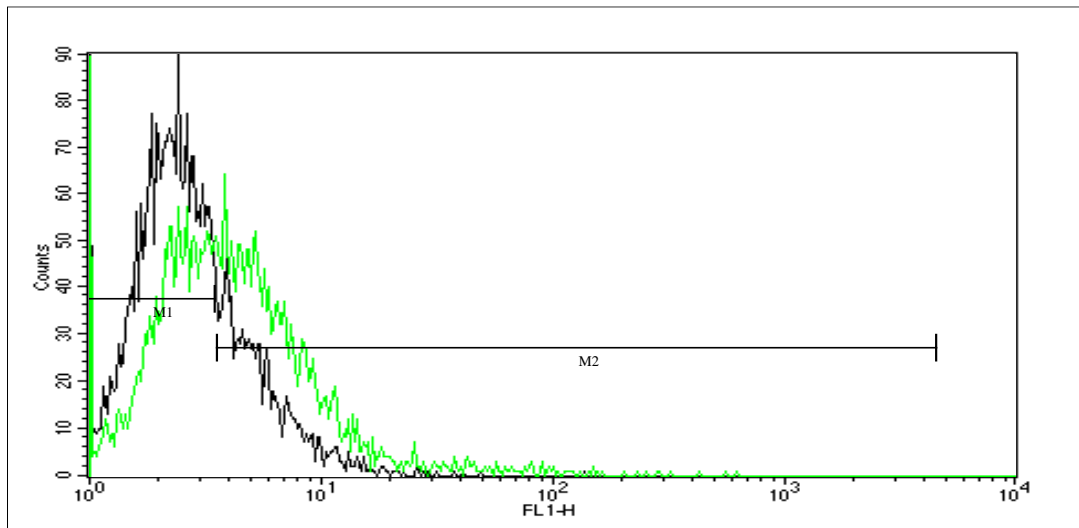


Abbildung 3.2: Darstellung einer mittelstarken Transfektion durch FACS-Analyse mit folgenden Parametern: Programm U16; Plasmid: pIRES-EGFP, schwarze Kurve: 0 µg Plasmid, grüne Kurve: 4 µg Plasmid, Differenz (M1-M2): 28,15 %

3.1.2.2 2. Testreihe der Transfektion

In einer weiteren Testreihe wurden uns von der Firma Amaxa das Plasmid pH₂kk zur Expression des Oberflächenproteins H2Kk (H-2 Klasse Histokompatibilitätsantigen, K-K alpha-Kettenvorläufer) und Nachweisreagenzien zu Verfügung gestellt. Für diese Reihe wurden die humanen Keratinozyten zu 50-60 % der Oberfläche der Zellkulturschale kultiviert. Zusätzlich wurden von der Firma Amaxa (Köln) weitere veränderte Programme vorgeschlagen: U28, U22, U20, U07, U23.

	U28	U22	U20	U07	U23
0 µg	-	-	-	-	-
0,5 µg	-	-	-	-	-
1,0 µg	-	-	-	-	-
2,0 µg	+	-	+	+	-
3,0 µg	++	-	++	++	-
4,0 µg	+++	-	+++	+++	-
5,0 µg	+	-	+	+	-

Tabelle 2: Paarungen der ersten Testreihe mit eingesetzter Plasmidkonzentration und verwendeten Programmen. Mit 4µg des pH₂kk Plasmides konnten mit den Programmen U28, U20 und U07 Transfektionsraten von bis zu 50 % erreicht werden. (-: keine Transfektion; +: leichte Transfektion, ++: mittelstarke Transfektion:, +++: starke Transfektion)

Bei den Programmen U28, U20 und U07 zeigten bei 3 µg Plasmid eine ca. 40 %ige und bei 4 µg Plasmid eine ca. 50 %ige Transfektionsrate, bei jeweils 5×10^5 Zellen (Abbildung 3.3)

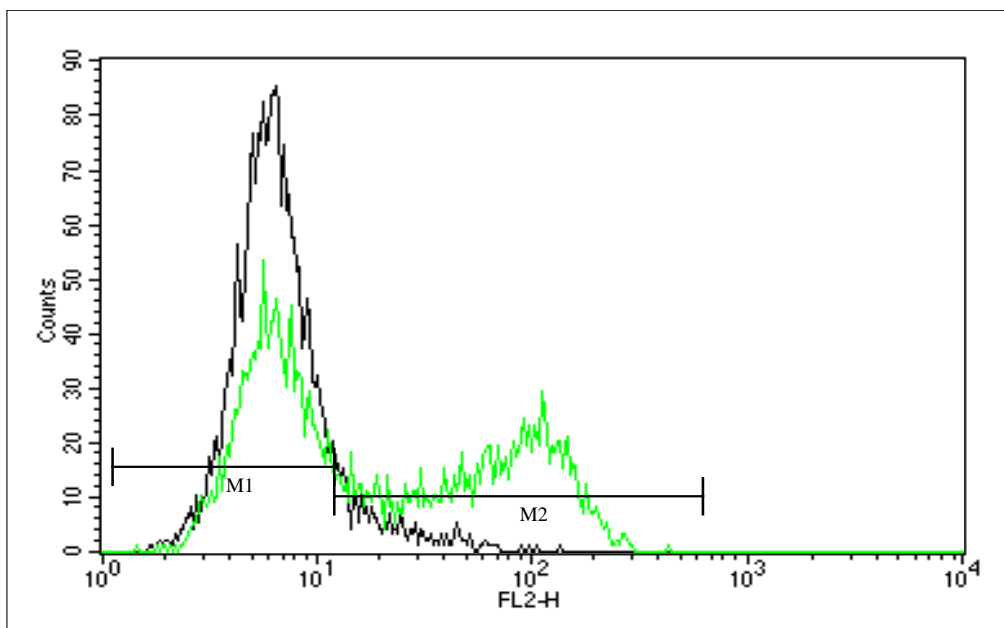


Abbildung 3.3: Darstellung einer sehr effektiven Transfektion durch FACS-Analyse mit folgenden Parametern; Programm: U28, humane Keratinozyten; Plasmid: H₂KK, schwarze Kurve: 0µg Plasmid, grüne Kurve: 4 µg Plasmid, Differenz (M1-M2): 48,19 %

Die Erhöhung der Zellzahl über 6×10^5 Zellen, sowie der Plasmidkonzentration über 5 µg pro Transfektionsansatz verringerte die Transfektionseffizienz.

Zusammengefasst wurde festgestellt, dass optimale Bedingungen für die transiente Transfektion humaner primärer Keratinozyten mittels Elektroporation mit Hilfe der

Programme U28 oder U20 erreicht werden konnten. Dabei war es notwendig, humane Keratinozyten auf Feederlayern der Passagen 3-5 zu benutzen, die eine Konfluenz zwischen 50-60 % aufwiesen. Die eingesetzte Zellzahl pro Versuch sollte nicht $5-7 \times 10^5$ Zellen übersteigen und die Plasmidkonzentration sollte zwischen 3-5 μg pro Probe liegen.

3.1.3 Überprüfung der Funktionalität der Ausgangsplasmide

Um die Funktionalität der pRK5 Myc Konstrukte zu testen, wurden diese unter den in Kapitel 3.1.2 genannten optimalen Bedingungen durch Elektroporation in humane primäre Keratinozyten transient transfiziert. Anschließend wurde bei diesen Zellen die Expression des jeweiligen Konstruktes durch Immunfluoreszenz überprüft (Abbildung 3.4). Mit TRITC-Phalloidin wurde das Aktinzytoskellet angefärbt. Eine erfolgreiche Transfektion konnte mit einem Antikörper gegen den am N-Terminus der Konstrukte befindlichen Myc-Tag gezeigt werden. Eine Überlagerung beider Färbungen sieht man in der rechten Reihe.

Die Kontrollzelle in Abbildung 3.4 a ist elektroporiert, aber nicht transfiziert, was durch das fehlende Fluoreszenzsignal mit dem Antikörper gegen Myc-Tag gezeigt wurde. Die mit WtRac1 transfizierten Zellen wiesen ein Signal mit dem Antikörper gegen Myc-Tag auf. Der Sekundär-Antikörper ist mit dem Alexa Fluor 488 (grün) konjugiert. Sie waren somit erfolgreich transfiziert worden (Abbildung 3.4 b und c). Durch die Überlagerung der beiden Färbungen zeigte sich eine gelblich bis rote Einfärbung im Bereich einer Kolo-kalisation von Aktin und WtRac1 im Bereich des Lamellipodiums (Abbildung 3.4 b, Pfeil) und im Bereich eines Zell-Zell-Kontaktes zweier transfizierter Keratinozyten (Abbildung 3.4 c, Pfeil). Morphologisch zeigten diese Zellen keine Veränderungen zu Kontrollzellen mit endogener Expression von Rac1. Zusätzlich ist in Abbildung 3.4 c ein nicht transfizierter Fibroblast zu sehen. Zellen, die erfolgreich mit L61Rac1 oder N17Rac1 transfiziert worden waren, zeigten dagegen morphologische Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen und den mit WtRac1 transfizierten Zellen. Die L61Rac Zellen waren wesentlich stärker ausgebreitet (Abbildung 3.4 d). Die N17Rac1 Zellen hatten nach der Elektroporation eine stark reduzierte Überlebensrate und wiesen eine deutlich reduzierte Zelloberfläche im Gegensatz zu den Kontrollzellen auf (Abbildung 3.4 e).

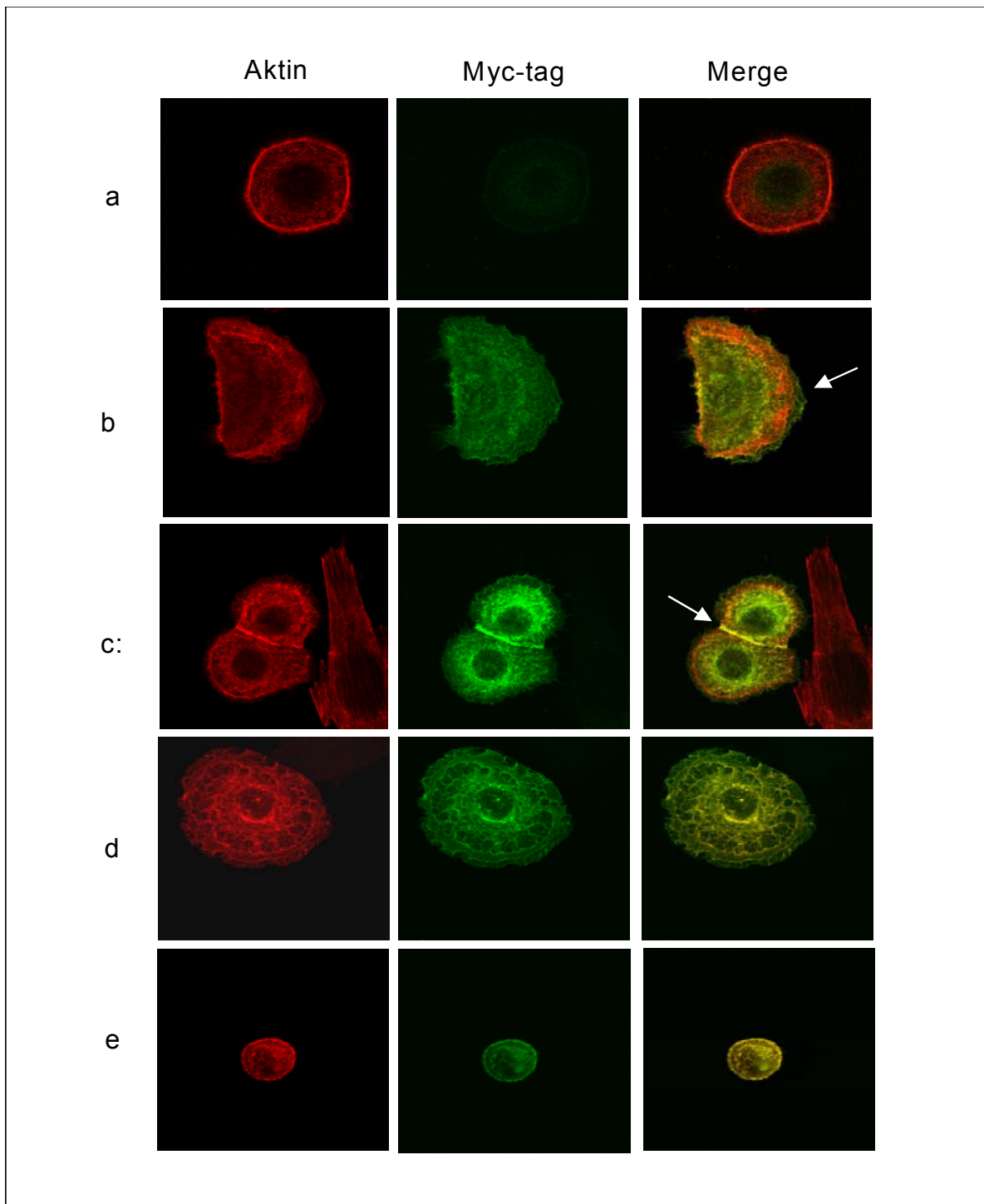


Abbildung 3.4: Bilder von Immunfluoreszenzfärbungen transient transfizierter humaner Keratinozyten mit TRITC-Phalloidin gegen polymerisiertes Aktin mit einem Antikörper gegen Myc-Tag (Klon 9B11) und beide Bilder übereinander gelegt (gelbe Färbung bei Kolokalisation). a: elektroporierter, aber nicht transfizierter Keratinozyt, b: mit WtRac1 transfizierter Keratinozyt, Pfeil kennzeichnet Front eines Lamellipodiums, c: Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei mit WtRac1 transfizierten Keratinozyten (Pfeil), mit nicht transfiziertem Fibroblasten, d: Zelle mit L61Rac1 transfiziert, e: Zelle mit N17Rac1 transfiziert; Vergrößerung: 400x

Von den transfizierten Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und im Western Blot hinsichtlich der Expression der Rac1 Mutanten untersucht. Abbildung 3.5 zeigt

exemplarisch den Nachweis von L61Rac1. Hierbei wurden 30, 60 und 100 µg Protein von Kontrollzellen und von Zellen, die mit dem Plasmid pRK5 Myc L61Rac1 transfiziert worden waren aufgetragen. Der Nachweis der Expression erfolgte mit dem anti-Myc Antikörper Klon 9B11. Die Banden bei etwa 68 kDa dienen dem Nachweis von endogenem Myc-Protein, die Banden bei 21 kDa dem der Expression von L61Rac1.

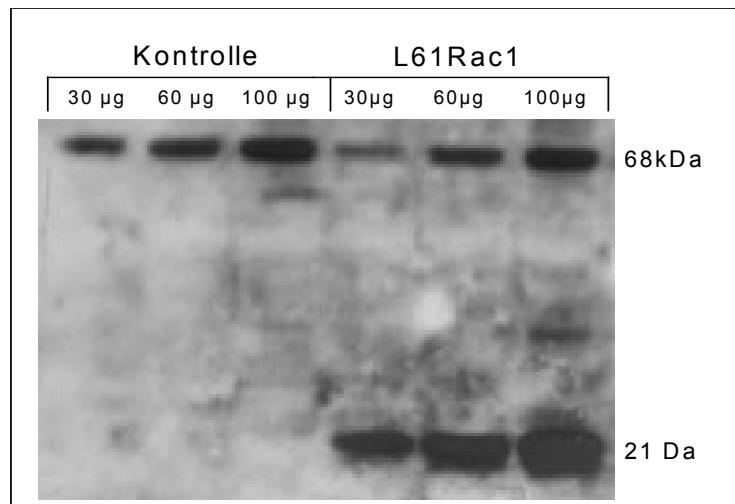


Abbildung 3.5: Western Blot Analyse von Kontrollkeratinozyten und mit L61Rac1 transfizierten Zellen. Jeweils 30, 60 und 100 µg Lysat wurden aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit anti-Myc (Klon 9B11). Erfolgreiche Detektion von endogenem Myc-Protein (ca. 68 kDa) und der Expression von L61Rac1 (21 kDa).

Durch die Beladung des Gels mit 100 µg Protein aus L61Rac1 transfizierten Keratinozyten, wurde zusätzlich eine Bande bei ca. 40 kDa detektiert. Hierbei kann es sich um ein Artefakt oder um eine beginnende Oligomerisierung von Rac1 handeln nach Zhang et al.. (2001).

3.2 Klonierung in eine Keratin 14 Expressionskassette

Um die Expression von N17Rac1 und L61Rac1 in den Mauskeratinozyten der basalen Zellschicht der Epidermis zu ermöglichen, wurden deren cDNAs aus den pRK5Myc-Plasmiden in den Vektor pBBEB K14-10 kloniert. In diesem Plasmid befindet sich eine Expressionskassette unter Kontrolle des humanen Keratin 14 Promotors und eine SV40 Poly-A-Sequenz mit dazugehörigem Intron (Abbildung 3.6).

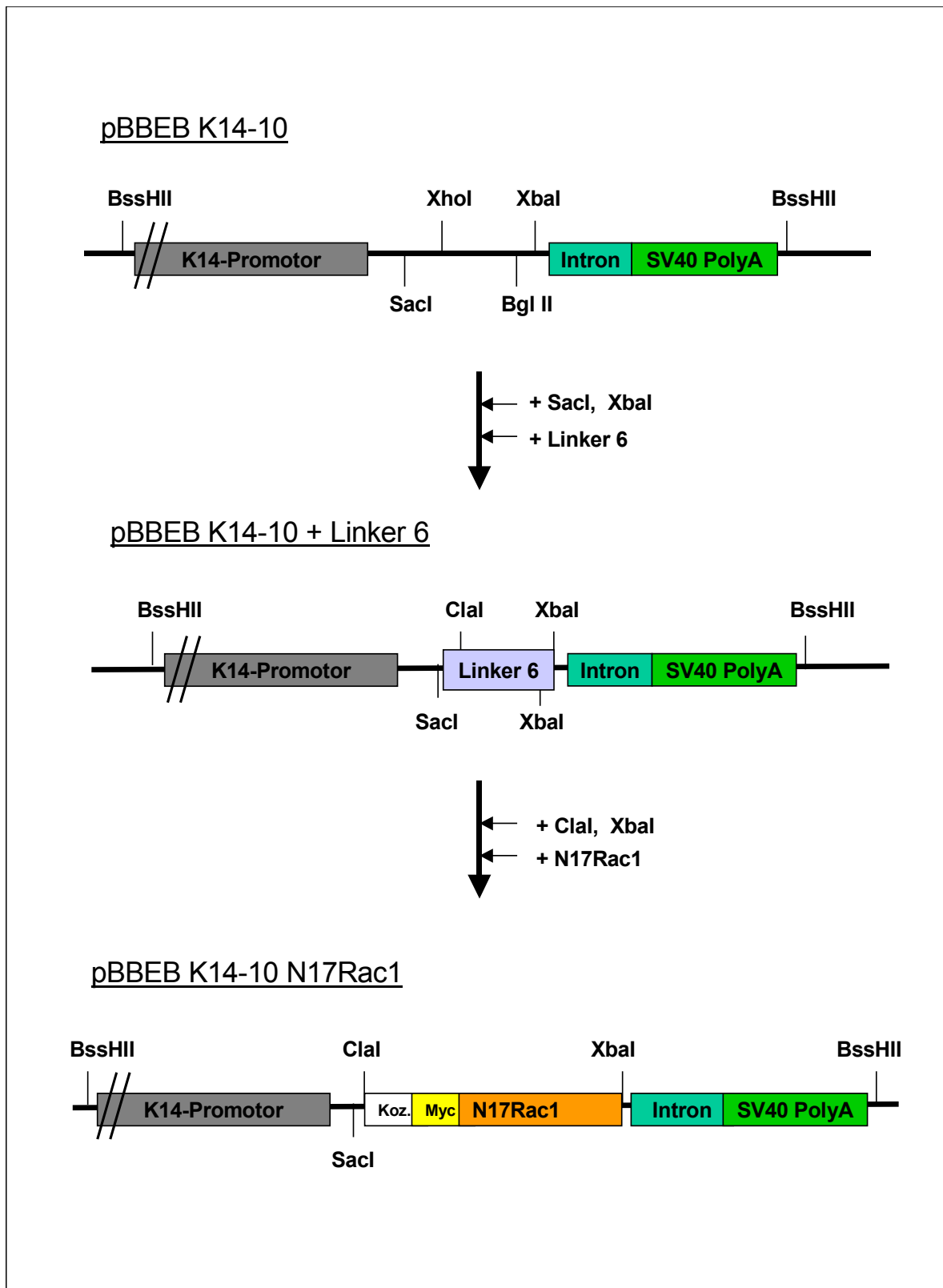


Abbildung 3.6: Darstellung der Klonierungsstrategie für die Rac1 Punktmutante N17Rac1. Die Strategie für L61Rac1 wurde analog verfolgt. Mit Hilfe eines Linkers (Linker 6) mit den Restriktionsschnittstellen ClaI und XbaI erfolgt die Klonierung aus der pRK5 Plasmidreihe in die Expressionskassette des Plasmids pBBEB K14-10; (Koz.: Kozak-Sequenz, Myc: Myc-Tag; K14-Promotor: Keratin 14-Promotor, Restriktionsschnittstellen: BssHII, SacI, XhoI, BglII, XbaI und ClaI; SV40 PolyA: Simian Virus 40 Poly-A-Sequenz)

Die Konstrukte der Rac1 Mutanten konnten zusammen mit der Kozak-Sequenz mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen ClaI und XbaI aus den pRK Myc-Plasmiden geschnitten werden. Da in dem Zielvektor pBBEB K14-10 im Bereich der multiplen Klonierungsstelle (Abbildung 3.6) keine ClaI Schnittstelle vorhanden war, musste eine Linker-Sequenz in diesen Bereich des Plasmides inseriert werden. Der Vektor wurde dazu mit den Restriktionsendonukleasen SacI und XbaI aufgeschnitten und mit dem Linker 6 religiert. Der Linker 6 besteht aus den miteinander hybridisierten Oligonukleotiden „Sac-Cla-Xba-Xba-5“ (CATCGATTCTAGACGCT) und „Sac-Cla-Xba-Xba-3neu“ (CTAGAGCGTCTAGAATCGATGAGCT). In der Linkersequenz befinden sich die Erkennungssequenzen für die Enzyme ClaI und XbaI. Nach der erfolgreichen Linkerligation wurde das so veränderte Plasmid mit diesen Endonukleasen aufgeschnitten und die Konstrukte für N17Rac1 oder L61Rac1 in die Keratin 14-Expressionskassette kloniert.

Um die Funktionalität der Konstrukte zu testen, wurden die Plasmide pBBEB K14-10 N17Rac1 und pBBEB K14-10 L61Rac1 durch Elektroporation in humane Keratinozyten transfiziert. Anschließend wurden die so behandelten Zellen mit einem anti-Myc Antikörper gefärbt, um eine erfolgreiche Transfektion nachweisen zu können. Als Gegenfärbung wurde zusätzlich eine Aktinfärbung durchgeführt (Abbildung 3.7).

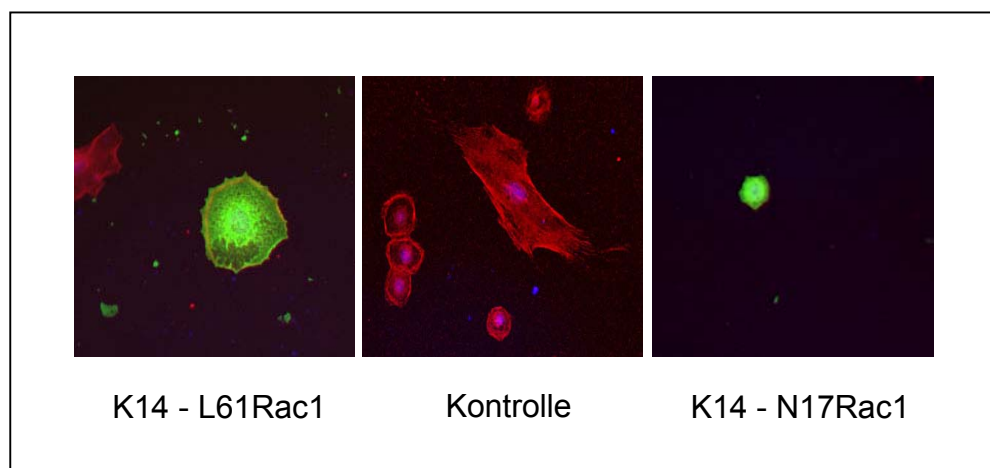


Abbildung 3.7: Bilder von Immunfluoreszenzfärbungen transient transfizierter humaner Keratinozyten mit TRITC-Phalloidin gegen polymerisiertes Aktin und mit einem Antikörper gegen Myc-Tag (Klon 9B11, gelbe Färbung bei Kolokalisation). Nachweis der erfolgreichen Transfektion in humane Keratinozyten mit den Plasmiden pBBEB K14-10 L61Rac1 (K14-L61Rac1), pBBEB K14-10 N17Rac1 (K14-N17Rac1) und nicht transfizierte Kontrollen. Vergrößerung: 100x

Im linken Bereich der Abbildung 3.7 ist eine typische morphologische Veränderung mit pBBEB K14-10 L61Rac1 und im rechten Bereich der Abbildung 3.7 ist eine typische morphologische Veränderung mit pBBEB K14-10 N17Rac1 erfolgreich transfizierten Keratinozyten zu sehen. Diese Zellen zeigen die gleichen Veränderungen, die auch schon bei den Transfektionsversuchen im Kapitel 3.13 gezeigt werden konnten. In dem mittleren Bild erkennt man humane Keratinozyten als Negativkontrollen, die elektroporiert, aber nicht transfiziert wurden. Die Effizienz dieser Transfektionen mit der humanen Keratin14-Expressionskassette betrug in diesem Falle nur etwa 30 % im Vergleich zu der Effizienz der CMV-Promotor gesteuerten Expression. Da die Funktionalität der erzeugten Konstrukte durch die Transfektion in humanen Keratinozyten hiermit bewiesen war, wurden beide Konstrukte mit der Restriktionsendonuklease BssHII verdaut, so dass die Keratin 14 Expressionskassette isoliert werden konnte.

Die linearisierten DNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft, nochmals gereinigt und für die Injektion in Mausoozyten vorbereitet. Die Oozyten wurden dann scheinsschwangeren Mäusen eingesetzt. Diese Prozedur fand in der Arbeitsgruppe von Dr. Neil Smyth am Institut für Medizinische Biochemie in Köln statt. In der F0-Generation wurden für L61Rac1 62 Tiere und für N17Rac1 41 Tiere geboren. Diese Mäuse befanden sich in einem FVB/N Hintergrund. Makroskopische Begutachtungen der Mäuse zeigten keine morphologische Auffälligkeiten.

3.3 Charakterisierung der N17Rac1 transgenen Mäuse

3.3.1 Nachweis der Integration des Transgens auf DNA-Ebene

Zur Identifizierung der transgenen Mäuse für N17Rac1 wurden von allen geborenen Tieren Schwanzbiopsien genommen und mit der isolierten DNA eine PCR durchgeführt. Das dadurch amplifizierte DNA-Fragment beinhaltete das 3'-Ende des Keratin 14 Promotors und erstreckte sich über den Myc-Tag bis in die cDNA von N17Rac1 (Abbildung 3.8 a). Es wurden dabei 3 positive Tiere für das N17Rac1 Konstrukt gefunden. Von diesen Tieren wurde das amplifizierte PCR-Fragment sequenziert, um so die Punktmutation zu finden. Zur weiteren Verifizierung der Transgenität der Mäuse wurden Southern Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 3.8 d, e). Hierbei erstreckte sich die benutzte DNA-Sonde ebenfalls von dem 3'-Ende des K14-Promotors, über den Myc-Tag hinweg in die cDNA von N17Rac1 (Abbildung 3.8, a).

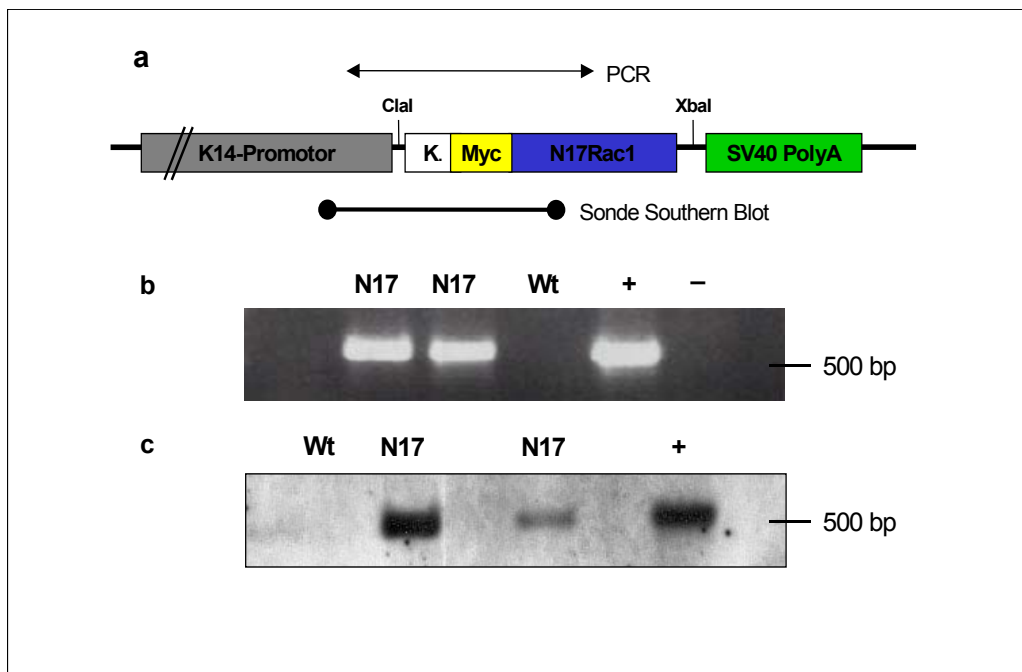


Abbildung 3.8: Typisierung der transgenen Tiere für N17Rac1 auf genomischer Ebene. a: Schematische Darstellung des Keratin-14-Konstruktes mit den jeweiligen Hybridisierungsstellen für PCR-Primer und für die DNA-Sonde des Southern Blots. b: Nachweis der Integration der Rac1-Mutanten in das Mausgenom durch PCR, c: Nachweis der Integration von N17Rac1 in das Mausgenom durch Southern Blot-Analyse. (K.: Kozak-Sequenz.; Myc: Myc-Tag; N17: N17Rac1; Wt: Wildtyp; +: Plasmidkontrolle; -: Negativkontrolle)

In Abbildung 3.8 b und c ist die PCR-Typisierung von jeweils 2 transgenen Mäusen für N17Rac1 (N17) dargestellt. Als Positivkontrolle (+) wurde hierbei als Template das Ursprungsplasmid pBBEB K14-10 N17Rac1 verwendet. Als Negativkontrolle wurde Wildtyp-DNA genommen. Die F0-Generation zeigte auch bei näherer makroskopischer Betrachtung keinerlei Auffälligkeiten. Die Mäuse waren gesund, zeigten keine Größenunterschiede und auch keine Veränderungen an der Haut oder den Haaren. Die transgenen Tiere wurden nun mit Mäusen des Stammes C57Bl/6 verpaart und über drei Generationen zurückgekreuzt. Anschließend erfolgte die Verpaarung von jeweils zwei N17Rac1 transgenen Mäusen.

3.3.2 Nachweis der Expression von N17Rac1 und der Lokalisation des Transgens

Um die Expression von N17Rac1 in der Epidermis der Mäuse zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot Analysen zum Nachweis des Myc-Tags durchgeführt. In Abbildung 3.9 a sieht man im linken Teil den Nachweis der Expression von N17Rac1 mit Hilfe eines anti-Myc-Antikörpers. Zu erkennen ist ein

membranöses Signal in der basalen Keratinozytenschicht der Epidermis und auch leicht in den primären Zellen der hier quer angeschnittenen Haarfollikel. Bei einer Überexpression von endogenem Myc-Protein würde man eine nukleare Lokalisation erwarten (Kato und Dang, 1992). Dies zeigte neben einer erfolgreichen Expression *in situ* auch eine richtige Lokalisation von N17Rac1. Wird endogenes Rac1 aktiviert, findet durch das enzymatische Hinzufügen eines Geranylgeranyl-Isoprenoidrestes eine Verankerung mit der Membran statt (Cox und Der, 1992). Im rechten Bild wurden Epidermisproben von Wildtypmäusen angefärbt. Die Epidermis zeigt hier keine nennenswerte Färbung und die Dermis nur eine grüne Hintergrundfärbung.

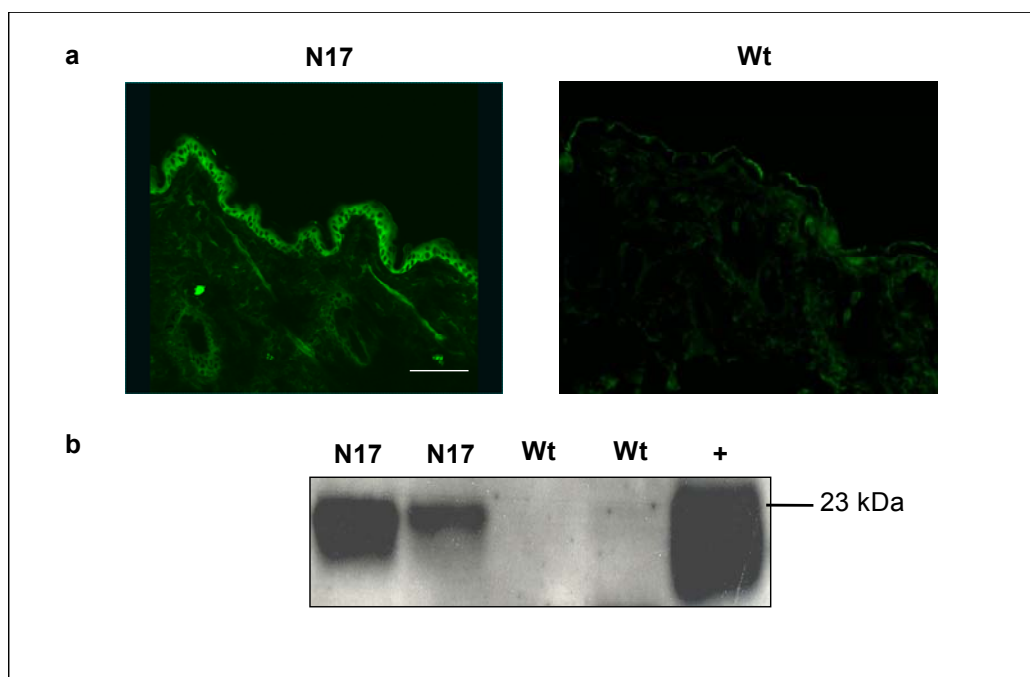


Abbildung 3.9: Überprüfung der Expression von dominant negativem N17Rac1; a: Immunfluoreszenzfärbungen von Maushaut mit dem anti-Myc Antikörper (Klon 9B11), b: Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus adulten Keratinozyten von N17Rac1 (N17) transgenen- und Wildtypmäusen; Detektion erfolgte mit dem anti-Myc Antikörper (Klon 9B11) bei 23 kDa. Skalierungsbalken = 100 μ m (+: Positivkontrolle aus Lysaten von pRKMyc RacL61 transfizierten humanen Keratinozyten, N17: transgene Maushaut, Wt: Kontroll-Maushaut)

Zur weiteren Analyse der Expression beider Rac1 Mutanten wurden für die Durchführung von Western Blots Proteinlysate aus Keratinozyten adulter Mäuse hergestellt. Proteinlysate aus Vollhaut oder abgekratzter Epidermis nach Stickstoffbehandlung konnten nicht verwendet werden, weil diese einen zu starken Hintergrund mit dem eingesetzten Myc-Antikörper (aus Maus stammend) verursachten. In Abbildung 3.9 b ist der erfolgreiche Nachweis des transgenen

Proteins für N17Rac1 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde jeweils Proteinlysate aus pRKMyc RacL61 transfizierten humanen Keratinozyten aufgetragen. Proben von Kontrolltieren wurden als Negativkontrollen verwendet. In diesem Experiment konnte reproduzierbar eine Expression von N17Rac1 gezeigt werden.

3.3.3 Isolation von N17Rac1 transgenen primären Keratinozyten

Für die Charakterisierung von N17Rac1 transgenen primären Keratinozyten *in vitro* wurden primäre Keratinozyten von bis zu vier Tage alten Mäusen isoliert. Anschließend wurden diese Zellen auf mit Kollagen I beschichteten Kulturschalen und mit Hilfe von Mausfibroblasten als Feederzellen kultiviert. Diese Keratinozyten zeigten im Vergleich zu Wildtypzellen keine eindeutigen morphologischen Unterschiede. Die Zellen, die aus N17Rac1 transgenen Mäusen isoliert wurden, konnten in der Immunfluoreszenz durch Färbung mit dem Myc-Antikörper als transgene Zellen identifiziert werden.

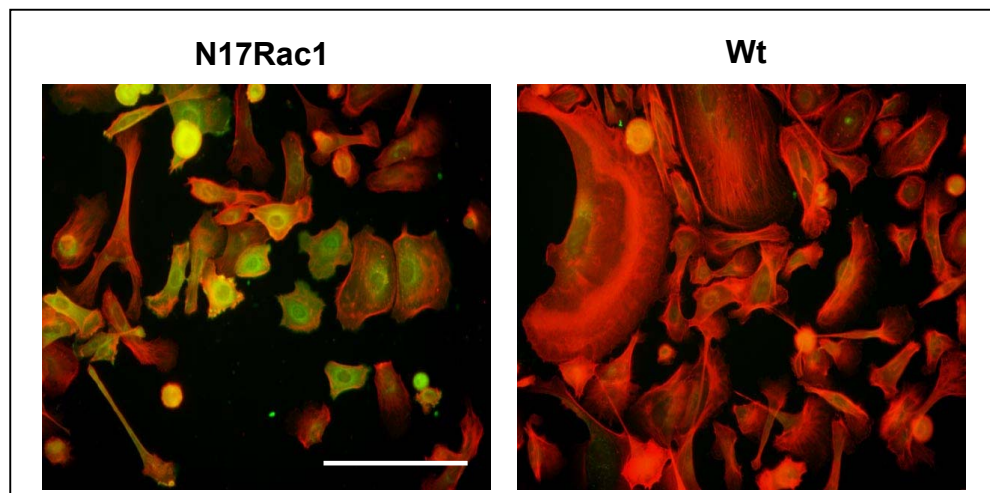


Abbildung 3.10: Detektion von N17Rac1 durch Immunfluoreszenz in isolierten Keratinozytenlinien aus neugeborenen Mäusen (linkes Bild) mit Hilfe des anti-Myc Antikörpers (Klon 9B11). Gegenfärbung erfolgte mit TRITC-Phalloidin gegen polymerisiertes Aktin (rote Färbung). Wildtypzellen (Wt) zeigen nur leichte grüne Hintergrundfärbung des endogenen nuklären Myc-Proteins. Skalierungsbalken = 100 μ m

Zur Überprüfung der Expression der beiden Rac1 Mutanten in diesen Zellkulturlinien wurden Proteinlysate hergestellt und diese jeweils im Western Blot untersucht (Abbildung 3.10). Im Falle der Keratinozyten, die von N17Rac1 positiven Mäusen isoliert wurden, konnte sowohl mit einem Antikörper gegen das Rac1 Protein als auch mit dem Antikörper gegen den Myc-Tag die transgene Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 a, b). Die Verwendung des Rac1-Antikörpers

zeigte bei 21 kDa eine Bande für die endogene Expression von Rac1. Durch den aus 16 Aminosäuren bestehenden Myc-Tag wurde das Transgen bei etwa 23 kDa detektiert (a). Mit dem Myc-Antikörper konnte bei N17Rac1 transgenen Zellen ebenfalls bei ca. 23 kDa das Transgen detektiert werden. Die zweite kleinere Bande scheint ein Artefakt zu sein. In 50 % der transgenen Linien, die aus Nachkommen von Rückkreuzungen einer transgenen mit einer Wildtypmaus isoliert wurden, konnte keine Expression von N17Rac1 festgestellt werden. Dieser Wert reduzierte sich auf 30 % bei N17Rac1 transgenen Linien, die aus den Nachkommen von Verpaarungen zweier transgener Mäuse isoliert wurden.

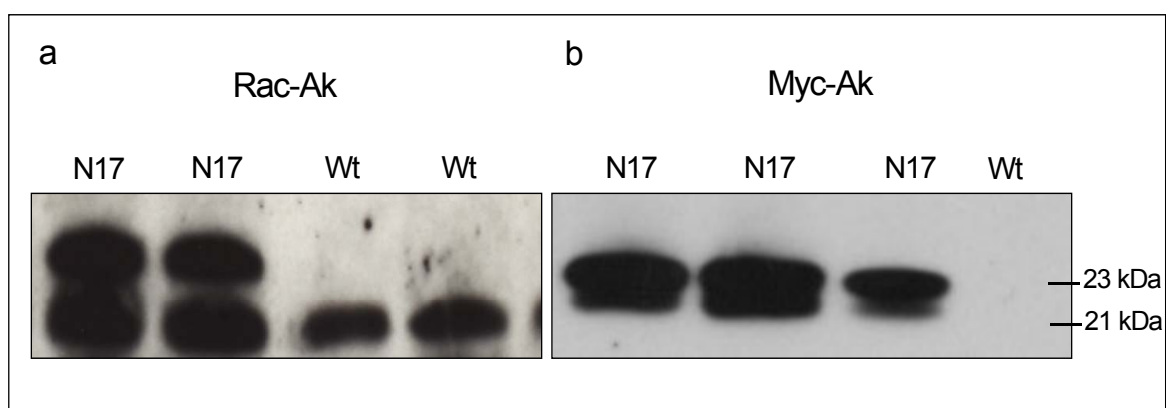
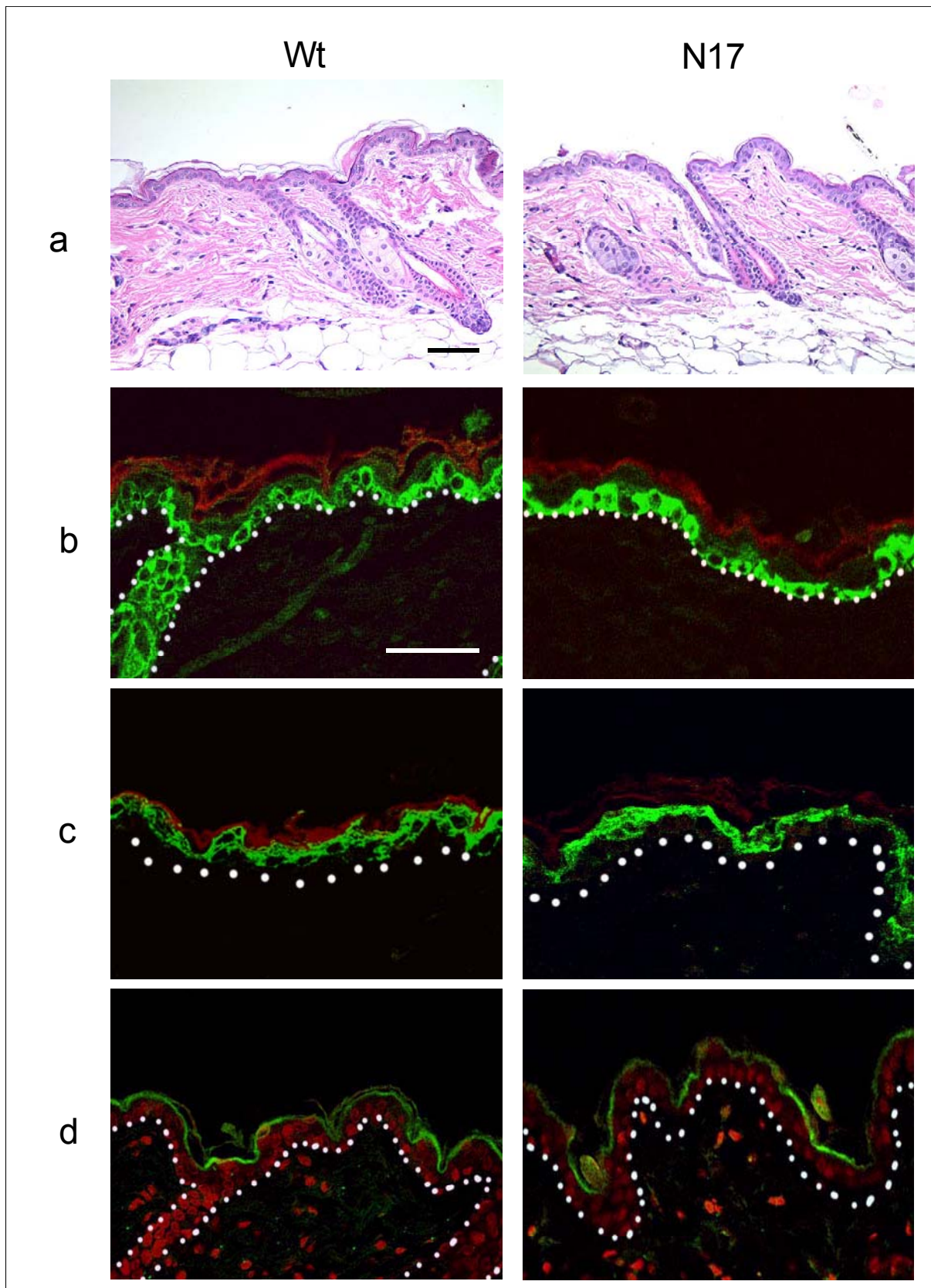


Abbildung 3.11: Nachweis der Expression von N17Rac1 in Lysaten von primären Keratinozytenlinien durch Western Blot Analyse mit einem a: anti-Rac1-Antikörper (Klon 23A8) und einem b: anti-Myc Antikörper (Klon 9B11); (Wt: Wildtypkontrolle; N17: N17Rac1)

3.3.4 Untersuchungen in der Epidermis von N17Rac1 transgenen Mäusen

Um feststellen zu können, ob trotz fehlender makroskopischer Unterschiede sich die Expression bestimmter Marker in der Haut von transgenen N17Rac1 Mäusen zu Wildtypmäusen unterscheidet, wurden Hautproben durch Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) und Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. In Abbildung. 3.12 a sind HE-Färbungen von transgener- und Kontrollmaushaut zu sehen. Hierbei konnte kein Unterschied in der Kompartimentierung und der Struktur zwischen der Haut der N17Rac1 transgenen Tiere und der Maushaut der Wildtypiere festgestellt werden.



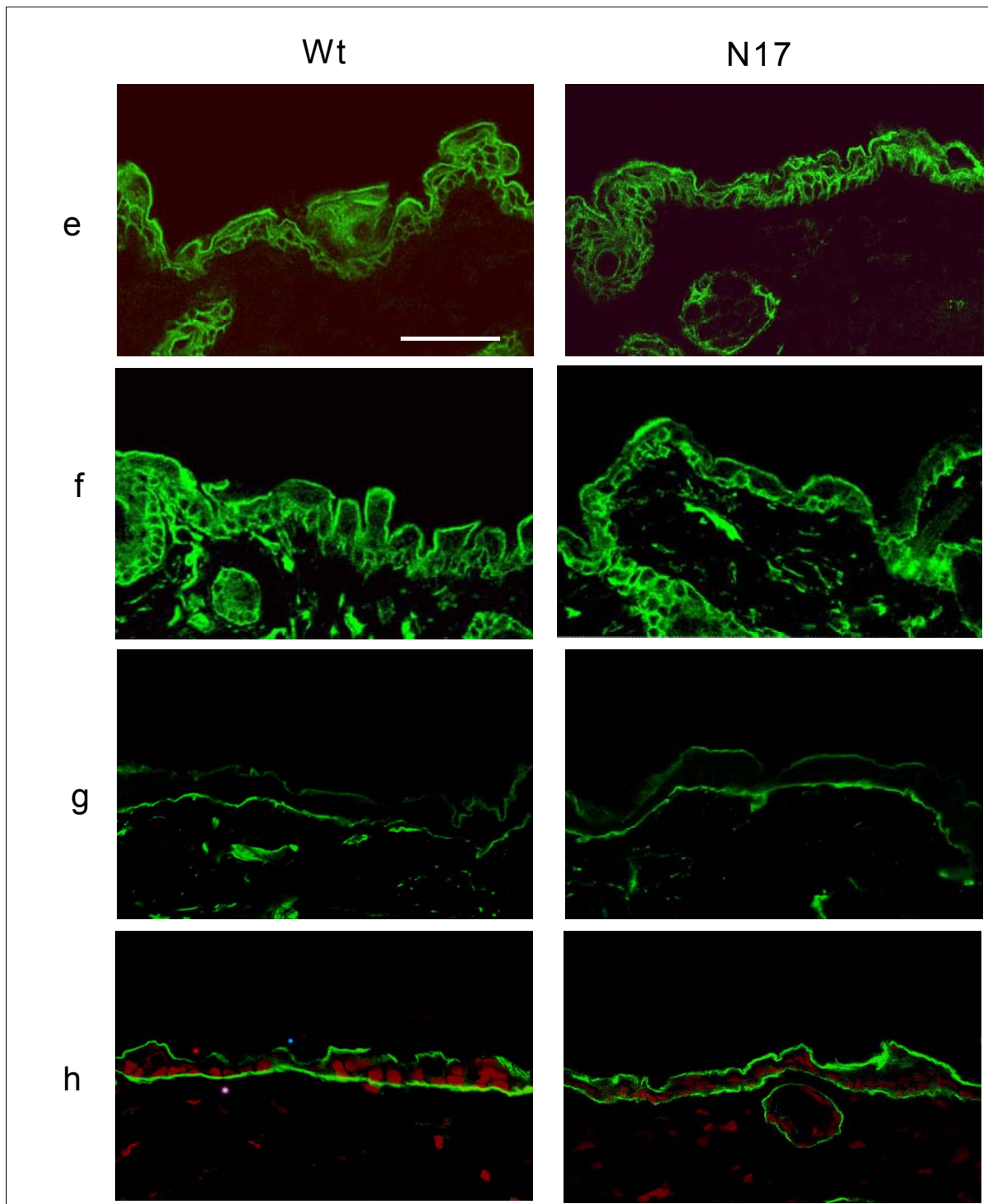


Abbildung 3.12: Charakterisierung der N17Rac1 transgenen Mausepidermis a: Hämatoxylin/Eosin-Färbungen von Kontrollmaus- und N17Rac1 transgener Epidermis, Vergrößerung: 200x. b-h Überprüfung der Expressionsmuster von epidermisspezifischen Markern durch Immunfluoreszenz, Vergrößerung: 400x, b-d: gepunktete Linie kennzeichnet die Basalmembran. b: Keratin 14, c: Keratin 10, d: Loricrin, e: E-Cadherin, f: β 1-Integrin, g: KollagenIV, h: LamininV; grünes Signal kommt vom Sekundär-Antikörper, der mit Alexa 488 konjugiert ist. Zur Gegenfärbung der Kerne wurde Propidiumiodid verwendet. Skalierungsbalken = 100 μ m; (Wt: Wildtypkontrolle; N17: N17Rac1).

Zur Detektion der wichtigsten Differenzierungsmarker des Stratum basale und des Stratum spinosum wurde gegen die Proteine Keratin 14 (b) und Keratin 10 (c) gefärbt. Als Marker für die Beschaffenheit des Stratum granulosum wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen das Protein Loricrin (d) angefertigt. Zur Überprüfung der Zell-Basalmembran- und der Zell-Zell-Kontakte wurde gegen E-Cadherin (e) und β 1-Integrin (f) gefärbt. Um die Beschaffenheit der Basalmembran zu überprüfen, wurden die Expressionsmuster von Kollagen IV (g) und Laminin V (h) untersucht. Bei allen untersuchten Markern konnten keine epidermalen Unterschiede im Expressionsmuster festgestellt werden.

3.4 Wundheilung *in vivo*

Rac1 spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* (Harden et al. 1995). Die Expression von N17Drac1 (dominant negatives Homolog von Rac1 in *D. melanogaster*) führte zu Defekten während des dorsalen Schlusses durch Veränderungen am Aktin/Myosin-Zytoskelett. Da der dorsale Schluss sehr der Wundheilung in Vertebraten ähnelt (Jakinto et al., 2001), wurden zunächst an N17Rac1 transgenen Mäusen Wundheilungsversuche durchgeführt. Mindestens sechs Wochen alte N17Rac1 transgene Mäuse und Wildtypmäuse wurden narkotisiert, auf dem Rücken rasiert und mit einer Biopsiestanze einmal durch das Fell verwundet. Dadurch entstanden zwei 4 mm im Durchmesser große Wundareale. Nach zwei und nach fünf Tagen wurden die Mäuse getötet. Anschließend wurden die Wunden entnommen und an ihren längsten Stellen in zwei Hälften geteilt. Die Eintrittswunde wurde jeweils für die Einbettung in Paraffin und die Austrittswunde jeweils für die Einbettung in Tissue Tek verwendet.

3.4.1 Charakterisierung der Wundheilung an N17Rac1 transgenen und epidermis-spezifischen konditionalen Rac1 Knockout-Mäusen

3.4.1.1 Vermessung der epithelialen Zunge von N17Rac1 transgenen Mauswunden

Im Zuge der Reepithelisierung beginnen nach der Verwundung Keratinozyten am Wundrand in die Wunde zu migrieren. Keratinozyten, die sich hinter der Migrationsfront befinden, beginnen zu proliferieren. Diese Zellen schieben sich somit zungenartig vom Rand der Wunde in das Wundbett hinein, um diese zu schließen

(Abbildung 3.13 a). Bei der Analyse von HE-Schnitten aus der Mitte des jeweiligen Wundbereiches wurde zuerst die epitheliale Zunge näher charakterisiert. Diese Zunge ist zwei Tage nach der Verwundung bei den Kontrollwunden klar zu erkennen (Abbildung 3.13 b). Am Wundrand befindliche Keratinozyten sind bereits in das Wundbett eingewandert. An der Basis des Randes ist das Epithelium durch Hyperproliferation verdickt. Im Gegensatz dazu war die epitheliale Zunge bei N17Rac1-Wunden nur sehr kurz oder gar nicht zu erkennen (Abbildung 3.13 c). Es war auch zu diesem Zeitpunkt keine Verdickung des Epithels am Wundrand zu beobachten. Nach fünf Tagen nach der Verwundung sind die Zungen in den Wunden der Kontrolltiere weiter verlängert (Abbildung 3.13 d). Bei den Kontrolltieren haben sowohl die Länge als auch der Flächeninhalt der Zunge drastisch zugenommen. Dabei ist die Form der Zunge sehr heterogen. Bei den zwei Tagen alten Wunden hatte ebenfalls eine Verlängerung der epithelialen Zunge stattgefunden, die aber wesentlich schwächer ausgeprägt war als bei den Kontrollwunden (Abbildung 3.13 e). Fünf Tage nach der Verwundung setzte bei den Wunden der transgenen Tiere eine verstärkte Proliferation am Wundrand ein (Verdickung des Epithels). Diese fiel ebenfalls wesentlich schwächer als bei den Kontrollwunden aus. Von HE-Färbungen aus der Mitte der Wunden wurden jeweils die Länge und der Flächeninhalt der epithelialen Zunge ausgemessen und berechnet. Für die Auswertung der Wunden zwei Tage nach der Verwundung wurden 8 transgene- und 8 Kontrolltiere verwundet. Die Daten der nach fünf Tagen der Verwundung ausgemessenen Wunden wurden aus 10 N17Rac1 transgenen und 13 Wildtypkontrollen ermittelt (Abbildung 3.13 a). Als Maß für das Migrationsverhalten der Keratinozyten am Wundrand wurde eine Längenmessung durchgeführt. Die graphische Auswertung dieser Längenmessung (Abbildung 3.13 f) ergab bei den zwei Tage alten Wunden eine Reduktion der Zungenlänge bei N17Rac1-Wunden um ca. 60 % und bei den fünf Tage alten Wunden um etwa 30 % im Vergleich zu den Zungen von Kontrollwunden. Als Maß für das Proliferationsverhalten der Keratinozyten am Wundrand wurde der Flächeninhalt der Wundzungen ermittelt. Bei der graphischen Auswertung dieser Messung konnte eine mittlere Reduzierung der Fläche bei den transgenen Wunden nach 2 und nach 5 Tagen um etwa je 50 % ermittelt werden.

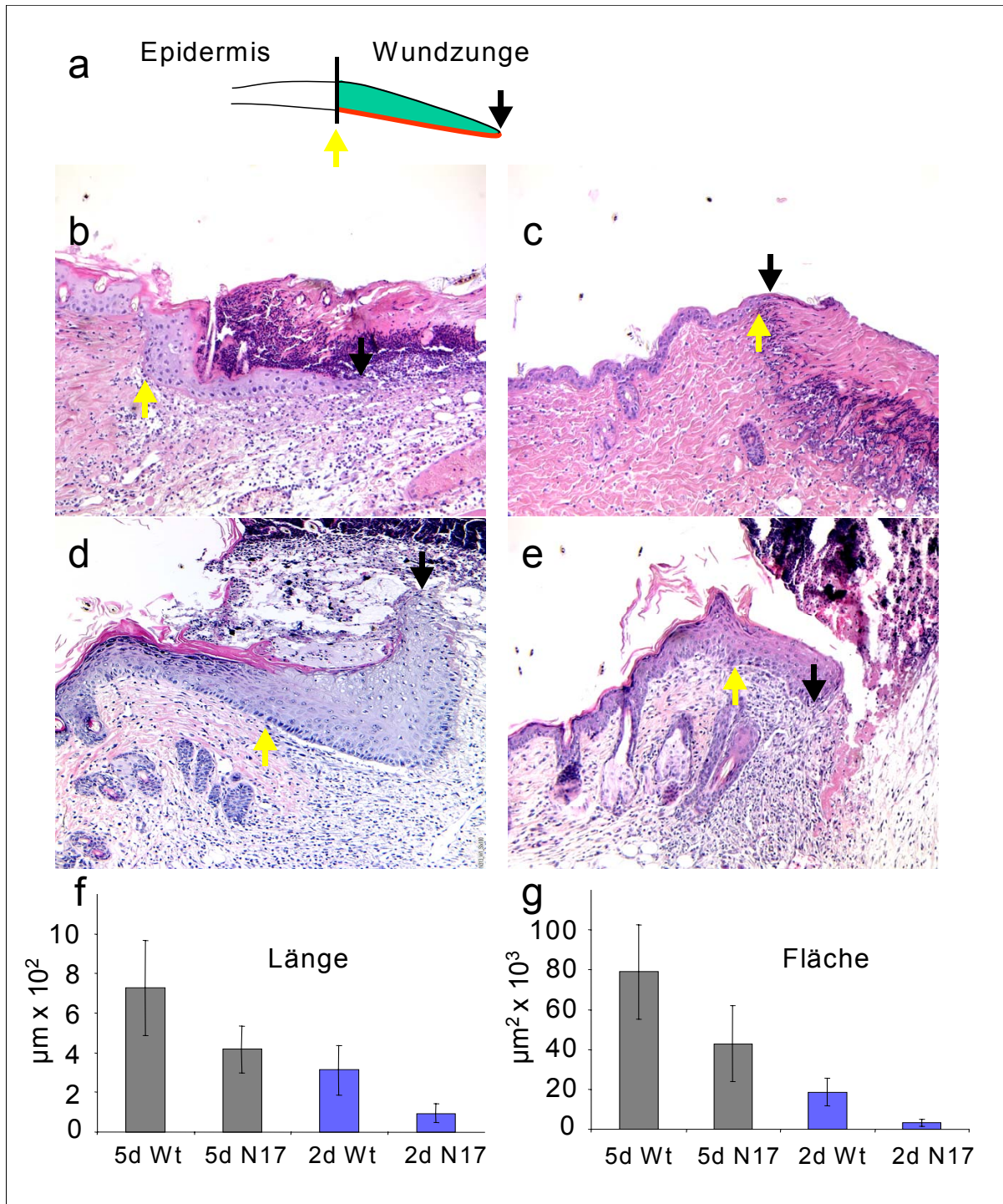


Abbildung 3.13: Nachweis einer verzögerten Reepithelialisierung in N17Rac1 transgenen Mäusen. a: Vereinfachte Darstellung einer Wunde bezüglich der Epithelialisierung, Epidermis: Wundrandepidermis; Neopidermis: direkt nach der Verwundung gebildete Epidermis (grün). Der Gelbe Pfeil und die schwarze Linie kennzeichnen den Wundrand. Schwarzer Pfeil zeigt die Frontseite der Epithelzunge (Neopidermis). b-e: Mikroskopische Abbildungen von H/E gefärbten Wundrändern; Vergrößerung: 10x. Proben wurden von Wildtypmäusen (b, d) oder N17Rac1 transgenen Mäuse (c, e) zwei Tage (b, c) und fünf Tage (d, e) nach der Verwundung untersucht. Gelbe Pfeile zeigen den Wundrand an. Schwarze Pfeile zeigen die Frontseite der Neopidermis an. f, g: Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse der Länge (f) und des Flächeninhalts (g) in den Wunden von Wildtypmäusen (Wt) und N17Rac1 Mäusen (N17). Blaue Balken: Ergebnisse von 8 Wildtyp- und 8 transgenen Mäusen zwei Tage nach Verwundung. Graue Balken: Resultate von 13 Wildtyp- und 10 transgenen Mäusen fünf Tage nach der Verwundung

Somit schien bei den N17Rac1 transgenen Mäusen ein Defekt in der Reepithelialisierung nach einer Verwundung vorzuliegen. Dieser Wundheilungsphänotyp ist nach zwei Tagen stärker ausgeprägt als fünf Tage nach Wundsetzung, wo er sich wieder abschwächt. Sieben Tage nach der Verwundung waren die meisten Wunden der N17Rac1 transgenen Tiere und der Wildtypmäuse geschlossen und zeigten keine messbaren Unterschiede mehr auf.

3.4.1.2 Vermessung der epithelialen Zunge aus Wunden von Konditionalen Rac1 Knockout Mäusen (Rac1^{E-KO})

An epidermisspezifischen konditionalen Rac1 Knockout Mäusen (Chrostek et al., 2006) wurden ebenfalls Wundheilungsversuche durchgeführt. Diese Mäuse besitzen keine epidermale endogene Expression von Rac1 und verlieren etwa eine Woche nach ihrer Geburt langsam ihr Fell. Nach sechs Wochen sind sie fast haarlos, sonst aber phänotypisch unauffällig. Bei diesen Rac1 defizienten (Rac1^{E-KO}) - und heterozygot geflochten Kontrolltieren (Rac1^{E-HET}) wurden Wunden gesetzt und diese nach fünf Tagen entnommen. Die Aufarbeitung und Auswertung der Wunden erfolgte analog zu den N17Rac1 transgenen Mäusen. Es wurden dabei die Wunden von 8 Rac1^{E-KO}- und 6 Rac1^{E-HET}-Mäusen untersucht. An den Wundrändern der heterozygot geflochten Kontrollmäuse war die epitheliale Zunge nach fünf Tagen ähnlich stark verlängert und verdickt wie bei den Wildtyptieren (vergleiche Kapitel 3.4.1.1). Bei den Wunden der Rac1^{E-KO}-Mäuse war die epitheliale Zunge wesentlich kürzer und auch weniger stark verdickt als bei den Rac1^{E-HET}-Mäusen (Abbildung 3.14. b-e). Als Maß für das Migrations- und Proliferationsverhalten der Keratinozyten in diesen Wundzungen wurden ebenfalls ihre Länge und der Flächeninhalt bestimmt. Die graphische Auswertung der Messungen ergab für die epithelialen Zunge der Wunden von Rac1 Knockouttieren eine Reduktion von ca. 60 % bei der Länge und der Fläche der Wundzunge, im Vergleich zu den Kontrollwunden (Abbildung 3.14 c und d). Die Mäuse mit einem epidermalen Rac1 Knockout besaßen einen Wundheilungsphänotyp der fünf Tage nach der Verwundung etwas stärker ausgeprägt war als die N17Rac1 transgenen Tiere.

Dieses Ergebnis zeigte somit, dass sowohl die Expression einer dominant negativen Mutante von Rac1 als auch die spezifische Deletion von Rac1 in der Epidermis zu Störungen in der Wundheilung führen kann.

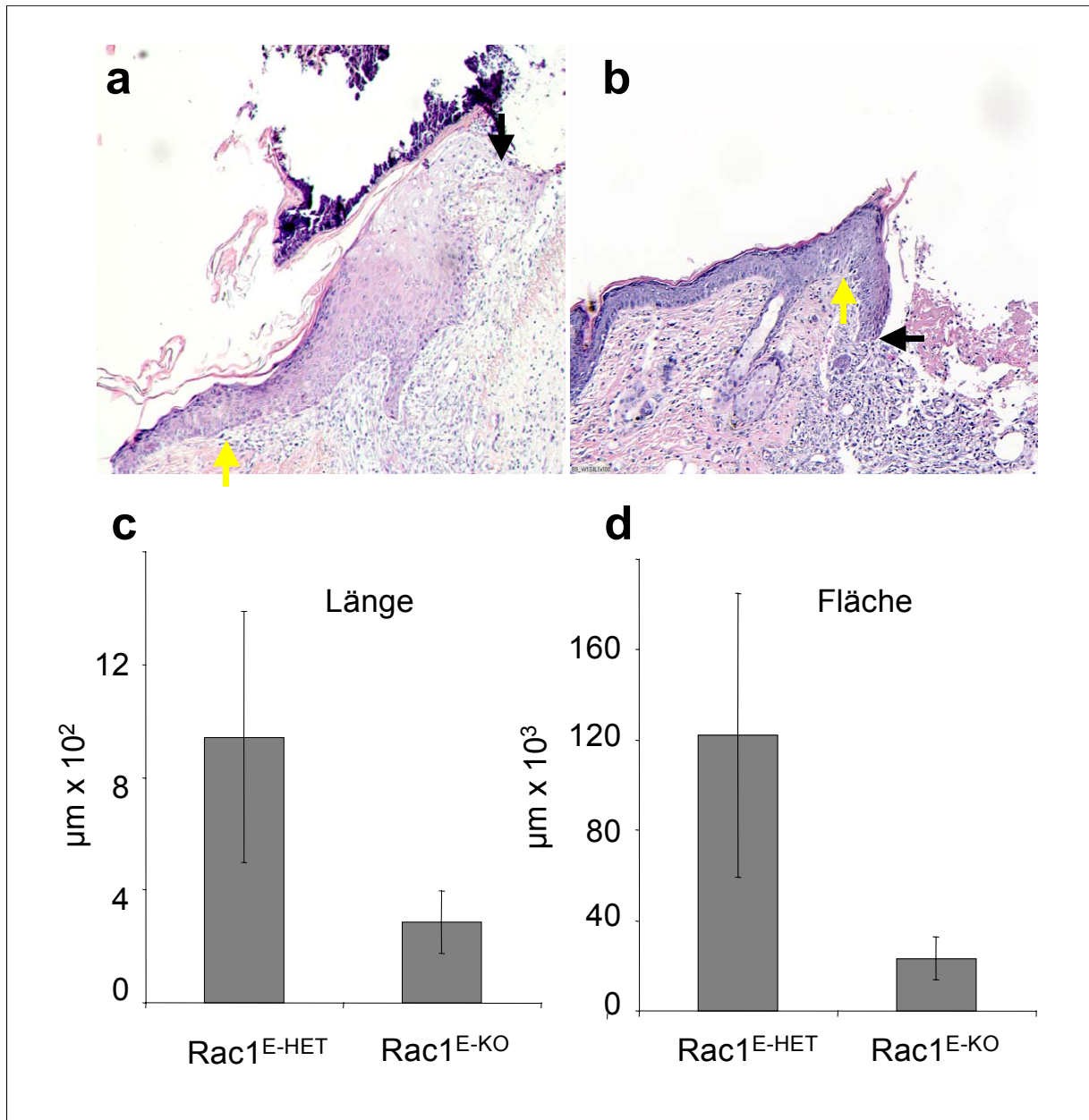


Abbildung 3.14: a, b: Mikroskopische Aufnahmen HE gefärbter Wundränder. Diese Proben stammen von $Rac1^{E-HET}$ - (a) und $Rac1^{E-KO}$ Mäusen (b) fünf Tage nach der Verwundung. Gelbe Pfeile kennzeichnen den Wundrand. Schwarze Pfeile kennzeichnen den Bereich der Neopidermis. c, d: Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse der Länge (c) und des Flächeninhalts (d) von 6 $Rac1^{E-HET}$ - und 8 $Rac1^{E-KO}$ Mäusen; Vergrößerung: 10x

3.4.2 Bestimmung der Proliferation

Um zu analysieren, ob diese Defekte in der Wundheilung in den N17Rac1 und den Mäusen mit konditionaler epidermaler Deletion von Rac1 auf ein verändertes Proliferationsverhalten zurückzuführen sind, wurde den verwundeten Mäusen zwei Stunden vor der Tötung 3,2 mg Bromodeoxyuridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. BrdU ist ein Nukelotidanalogen, welches sich bei der Replikation in die DNA-Stränge einbaut. Nach erfolgter Färbung mit einem spezifischen Antikörper können BrdU-

positive Zellen in der Immunfluoreszenz in Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden und können als Maß für das Proliferationsverhalten eines Gewebes oder einer Zellpopulation angesehen werden. Es wurden Schnitte von 15 N17Rac1 transgenen Mäusen, 11 Rac1^{E-KO}-Mäusen, 8 Rac1^{E-HET}-Mäusen und 19 Wildtypkontrollen analysiert. Für die Zählung wurden nur BrdU-positive Zellen im basalen Zungenbereich herangezogen, da in diesem Bereich die Proliferationsrate bei der Wundheilung am stärksten stimuliert ist. In Abbildung 3.15 ist die graphische Auswertung der Ergebnisse dargestellt. In den zwei Tage alten Wunden der N17Rac1 Tiere (c) konnte eine Abnahme der BrdU-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollen um 60 % gezeigt werden. In den Wunden fünf Tage nach der Verwundung von den N17Rac1 (a) und den Mäusen mit konditionalen Rac1^{E-KO} (c) findet man eine Verminderung der proliferierenden Zellen um etwa 30 % im Vergleich zu den entsprechenden Wunden der Kontrolltiere. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation epidermaler Keratinozyten in einer Wundsituation von N17Rac1 transgenen Mäusen und Rac1^{E-KO}-Mäusen reduziert ist. Somit demonstrieren diese Ergebnisse erstmals eine Funktion von Rac1 in der Regulation der Proliferation von Keratinozyten.

Um feststellen zu können, ob das veränderte Proliferationsverhalten ein zellautonomes Phänomen darstellt, wurde der BrdU-Einbau in das Genom von isolierten primären Keratinozyten der N17Rac1 transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtypkeratinozyten überprüft. Es wurden 3 transgene sowie 3 Wildtypzelllinien untersucht. Zur Stimulation der Zellteilung wurden die Keratinozyten mit IGF-1 oder mit EGF versetzt. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen BrdU in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. BrdU-positive Zellen wurden gezählt und deren prozentualer Anteil, bezogen auf alle Keratinozyten, ermittelt. Dabei zeigte sich bei den N17Rac1 transgenen Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen eine um jeweils 50 % verringerte Proliferationsrate. Somit kann man von einem intrinsischen Defekt der von Wachstumsfaktoren stimulierten Proliferation, ausgehen.

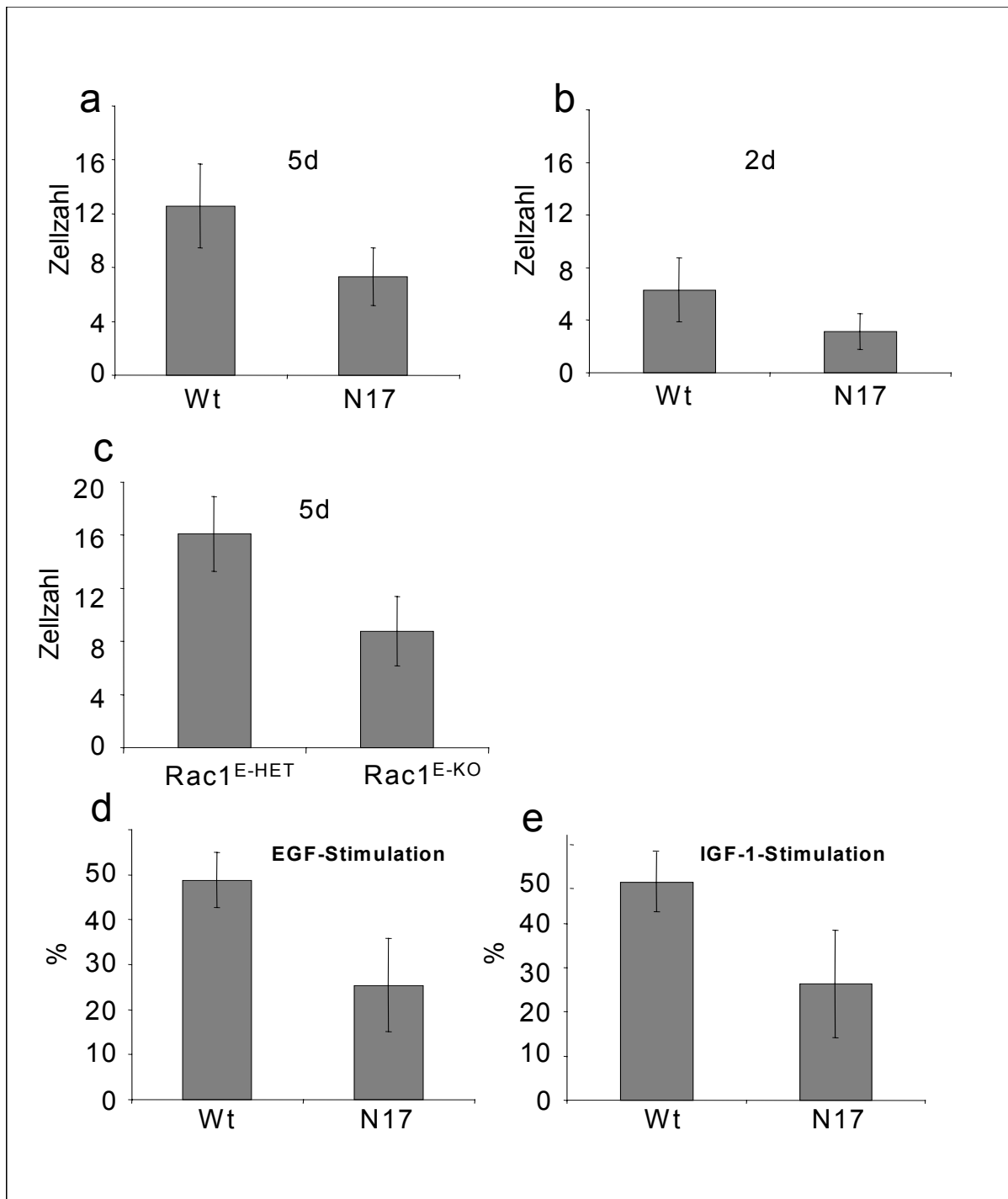


Abbildung 3.15: Bestimmung der Proliferation von Keratinozyten, a-c: Ergebnisse des BrdU-Einbaus in das Genom von Keratinozyten, der durch Immunfluoreszenz in Wundrändern detektiert werden konnte. Es wurden Proben von fünf Tage alten Wunden von (a, c; 5d) 7 Wildtyp- (a, Wt) und 6 N17Rac1 transgenen Mäusen (a, N17) und von 8 Rac1^{E-HET} und 11 Rac1^{E-KO} Mäusen verwendet (c). Zur Analyse von 2 Tage alten Wunden (b, 2d) wurden Proben von 12 Wildtyp- und 8 N17Rac1 transgenen Tieren gefärbt. d, e: Ergebnisse des BrdU-Einbaus in das Genom von Mausepithelzelllinien. Prozentualer Anteil BrdU-positiver Zellen supplementiert mit EGF (d) und IGF-1 (e). Es wurden jeweils drei verschiedene N17Rac1 transgene- und 3 Wildtypzelllinien untersucht.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, über welche Signalwege die epidermale Deletion von Rac1 in Keratinozyten die verringerte Proliferationsrate in einer Wundheilungssituation verursachen könnte, wurden zwei dieser Wege, durch die Zellproliferation angeregt werden kann, untersucht.

Zuerst wurde durch Immunfluoreszenzfärbung die Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK, einem Protein des MAP-Kinase Signalweges, in Wundrändern von Rac1^{E-KO}-Mäusen und Kontrolltieren (Rac1^{E-HET}) nachgewiesen. Die Aktivierung von ERK in proliferierenden Keratinozyten in Wundrändern von Mäusen konnte von Haase et al. (2001) gezeigt werden. In Abbildung 3.16 ist der Nachweis des aktivierten pERK in fünf Tage alten Wunden von Rac1^{E-KO} und Rac1^{E-HET}-Mäusen dargestellt. Aktiviertes ERK transloziert in den Zellkern und kann in der Immunfärbung im Zellkern detektiert werden. In beiden zu vergleichenden Gewebeschnitten zeigen im Bereich der basalen Keratinozyten am unteren Rand der Wundzunge fast alle Zellen ein nukleares Signal. Suprabasal kommen Keratinozyten mit einer Aktivierung von ERK in beiden Proben gleichmäßig verteilt vor. Es konnte dabei kein Unterschied in der pERK Aktivierung festgestellt werden.

Zusätzlich wurde die Aktivierung eines Vertreters des JAK/STAT Signalweges untersucht, STAT3. Dieses Enzym ist ein Regulator verschiedener essentieller zellulärer Prozesse wie Zelldifferenzierung und Proliferation und gilt als potentielles Onkogen (Bromberg et al., 1999). Die Aktivierung von STAT3 führt zur Translokation dieses Enzyms in den Zellkern. In Abbildung 3.16 ist das Ergebnis der Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen STAT3 in Wundrändern von Rac1^{E-KO} und Rac1^{E-HET}-Mäusen dargestellt. Es zeigte sich eine vermehrte Aktivierung von STAT3 in den basalen bis in die unteren suprabasalen Keratinozytenschichten. In den höheren Schichten war die Aktivierung von STAT3 nur in vereinzelten Zellen nachzuweisen. Es konnte kein Unterschied im Aktivierungsmuster von STAT3 in epidermalen Wundrändern von Rac1^{E-KO}- Mäusen im Vergleich zu Rac1^{E-HET} Wunden festgestellt werden.

Somit ließ sich die festgestellte Reduktion im Proliferationsverhalten in den Wundrändern der Rac1^{E-KO}-Mäuse nicht auf eine veränderte Aktivierung von ERK oder STAT3 zurückführen.

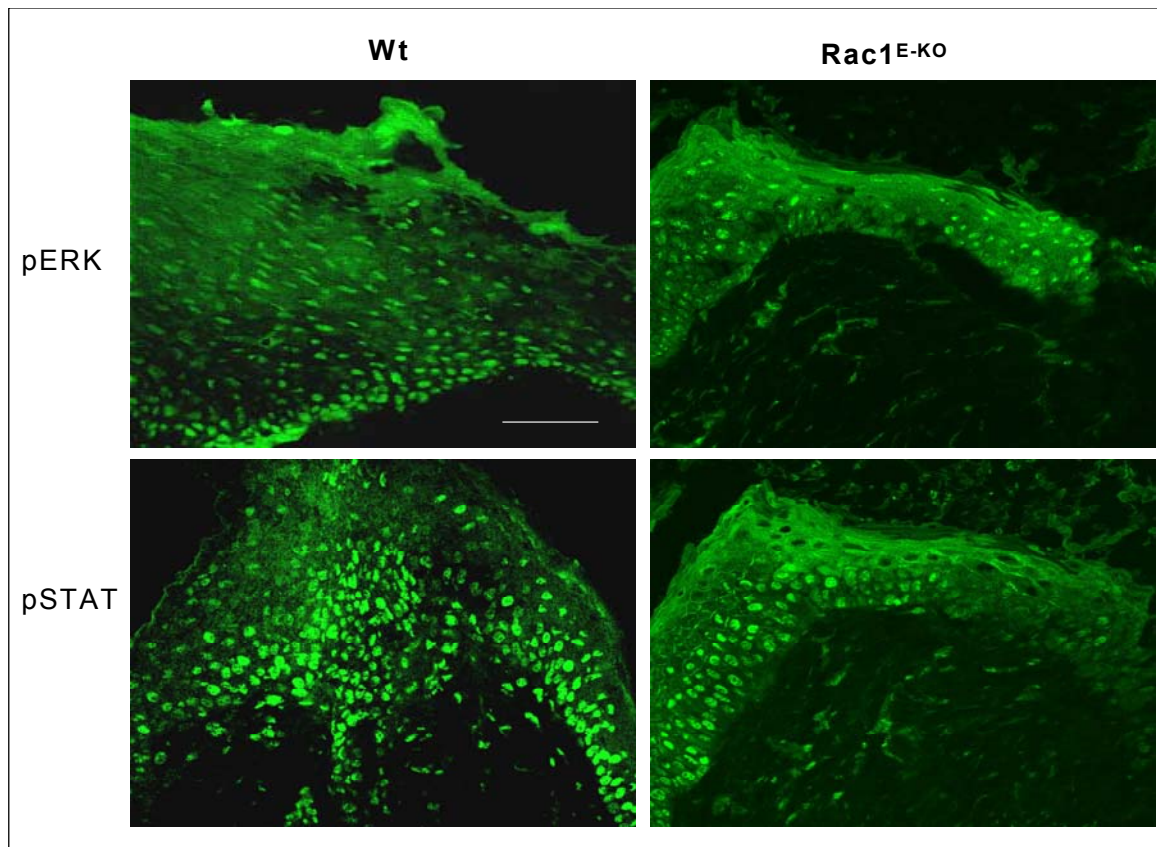


Abbildung 3.16: Nachweis von pERK und pSTAT3 durch Immunfluoreszenz in Wundrändern von konditionalen $Rac1^{E-KO}$ - und Wildtypmäusen als Negativkontrollen. Das grüne Signal kommt vom Sekundär-Antikörper, der mit Alexa 488 konjugiert ist. Skalierungsbalken = 100 μm

3.5 Wundheilung *in vitro*

Eine Zelle bewegt sich durch eine räumlich und zeitlich getrennte Anheftung, Ausbildung von Membran-Protrusionen, Zellkontraktion und Ablösung vom Untergrund (Santoro et al., 2005). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Rac1 eine essentielle Rolle bei diesen Abläufen spielt (Fukata et al., 2003). Eine Störung oder der Verlust der Aktivität von Rac1 heißt aber nicht gleichzeitig der Verlust der migratorischen Fähigkeiten (Wells et al., 2004).

Um festzustellen, ob das Migrationsverhalten der N17Rac1 transgenen Keratinozyten gestört ist, wurden primäre Keratinozyten von 3 transgenen und 3 Wildtypmäusen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, artifizielle Wunden zu schließen. Hierfür wurden primäre N17Rac1 transgene- und Wildtypzellen (der Passagen 1-4) auf 6-well-Schalen (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät, die zuvor mit Kollagen I oder humanem Fibronectin beschichtet wurden. Schalen mit konfluenten Zellen wurden mit dem Zytostatikum Mitomycin C für zwei Stunden behandelt, um die Zellteilung zu hemmen. Anschließend wurden die Zellschichten mit einer Spitze einer

Glasspipette verwundet. Dies entspricht dem Setzen einer Wunde *in vivo*. Für bis zu 24 h wurden nun alle fünf Minuten Phasenkontrastbilder mit einer „Time lapse“-Kamera aufgenommen um den Wundschluss zu dokumentieren.

Diese Substrate wurden ausgesucht, da sie eine wichtige Rolle in der Wundheilung spielen. Keratinozyten benötigen Kollagen I und Fibronectin zur Migration in das Wundbett (Grinnel, 1992). Dabei zeigte sich, dass die drei getesteten transgenen Keratinozytenlinien auf Kollagen I als Substrat nicht in der Lage waren, die artifizielle Wunde durch Zellmigration zu schließen. Bei den N17Rac1 transgenen Keratinozyten blieb eine Lücke offen, die 35 % der Ausgangsspalte betrug. Die Wildtypkontrollen hatten dagegen zum Zeitpunkt 1000 min (Abbildung 3.17 a, b) die Lücke fast vollständig geschlossen. Mit Fibronectin als Substrat hatten sowohl die primären Zellen der N17Rac1 transgenen- als auch die der Wildtypmäuse Probleme, die Spalte durch Migration zu schließen. Zum Zeitpunkt 1000 min zeigte sich bei beiden Gruppen eine nur zu 40 % geschlossene Lücke.

Somit konnte gezeigt werden, dass *in vitro* primäre N17Rac1 transgene Keratinozyten auf Kollagen I als Substrat eine ähnlich gestörte Wundheilung in artifiziellen Wunden aufwiesen wie *in vivo*.

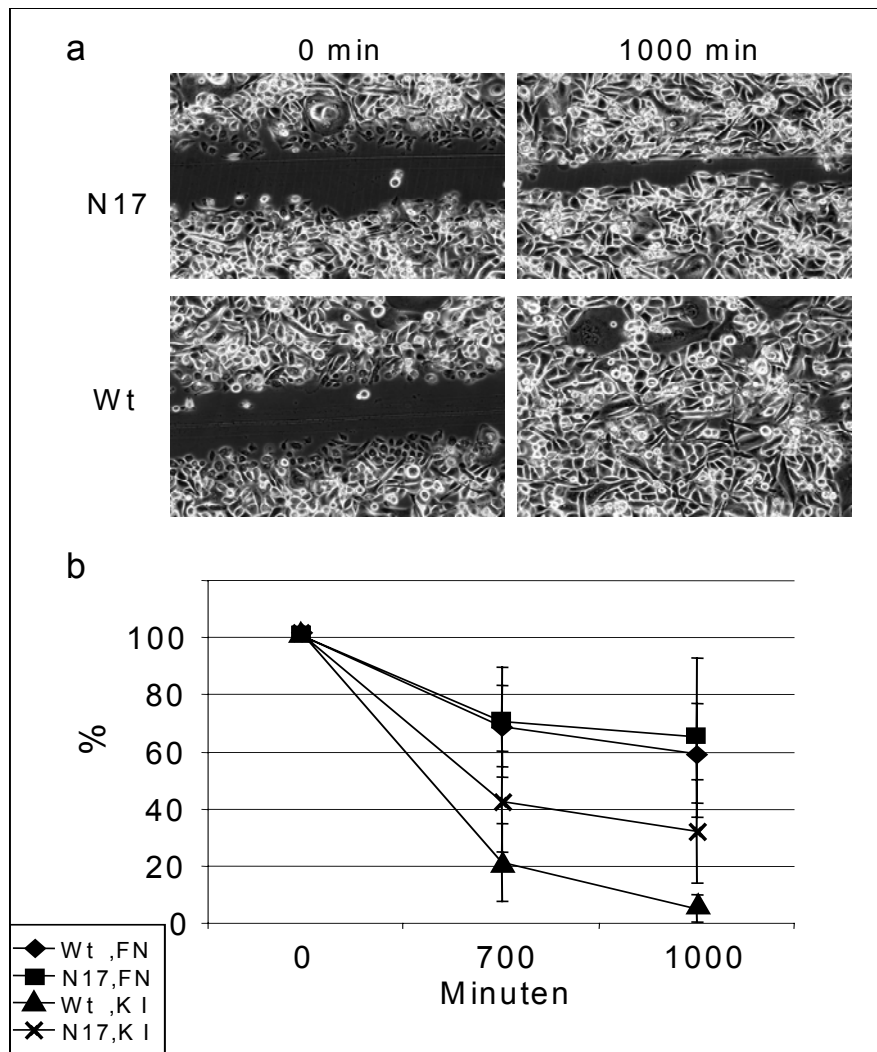


Abbildung 3.17: Verzügerte Schließung artifizierender Wunden von N17Rac1-Zellen auf Kollagen I. a: Darstellung verwundeter Keratinozytenzellschichten von N17Rac1 transgenen (N17) und Wildtypzellen (Wt) auf Kollagen I. Zum Zeitpunkt 0 sind beide Wunden gleich breit. Zum Zeitpunkt 1000 min schließen Wildtypzellen die Lücke. Die N17Rac1 Zellen lassen eine Lücke offen. Vergrößerung: 100x; b: Ergebnisse der artifizierender Wundheilung auf Kollagen I (K1) und Fibronectin (FN) in %, gemessen zum Zeitpunkt 0 min, 700 min und 1000 min. ◆: Wildtypzellen auf Fibronectin, ■: N17Rac1 transgene Zellen auf Fibronectin, ▲: Wildtypzellen auf Kollagen I, ✕: N17Rac1 transgene Zellen auf Kollagen I

3.5.1 Migrationsstudien an Keratinozyten

Auf Grund dieses veränderten Migrationsverhaltens der N17Rac1 Keratinozyten im konfluenten Zellverband wurde nun die Migration von Einzelzellen detaillierter untersucht. Dabei wurden Keratinozyten verschiedener transgener- und Wildtyp-Zelllinien auf Kollagen I oder Fibronectin als Untergrundmatrix in der Gegenwart oder Abwesenheit von IGF-1 ausgesät. Haase et al. (2003) konnten zeigen, dass bei humanen Keratinozyten durch die Zugabe von IGF-1 Migration ausgelöst werden konnte. Die Zellen wurden kurz vor Versuchsbeginn mit einem Minimalmedium (SFM-Medium, ohne FCS) versetzt, um zur Stimulation der Migration IGF-1 gezielt

einsetzen zu können. Das Verhalten der Zellen wurde bis zu 20 Stunden mit einer „Time lapse“- Kamera gefilmt. Nach Abschluss der Aufnahmen wurden jeweils ≥ 191 Zellen ausgewertet, die bis zum Ende der Aufnahmezeit im Bildfeld noch überlebensfähig waren. Die Ergebnisse der verschiedenen Linien der N17Rac1 transgenen- und der Kontrollzellen wurden gemittelt und statistisch ausgewertet. Als Parameter für die Zellmigration wurden die zurückgelegte Strecke, die gerichtete Strecke und die Geschwindigkeit herangezogen. Als gerichtete Strecke ist hier die Länge einer Gerade definiert, die den Start- mit dem Endpunkt der zurückgelegten Strecke verbindet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde jeweils ein t)-Test von je zwei korrespondierenden (N17Rac1 / Wt) Datensätzen durchgeführt.

	Kollagen I				Fibronectin			
	N17Rac1	Wt	N17Rac1	Wt	N17Rac1	Wt	N17Rac1	Wt
Stimulation	+ IGF1	+ IGF1	- IGF1	- IGF1	+ IGF1	+ IGF1	- IGF1	- IGF1
Zellzahl	261	266	259	238	261	229	259	191
Wegstrecke (mm)								
MW	0,34	0,55	0,38	0,68	0,49	0,62	0,54	0,68
Differenz	0,21 (38 %)		0,3 (44 %)		0,13 (21 %)		0,14 (21 %)	
SA	0,18	0,29	0,17	0,26	0,23	0,28	0,26	0,32
P-Wert	< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001	
Geschwindigkeit ($\mu\text{m sec}^{-1}$)								
MW	1,2	1,8	1,3	2,3	2,0	2,4	1,9	2,6
Differenz	0,6 (33 %)		1 (43 %)		0,4 (17 %)		0,7(27 %)	
SA	1,2	1,7	1,2	1,9	1,6	1,9	1,6	2,1
P-Wert	< 0,0001		< 0,0001		< 0,0101		< 0,0001	
Gerichtete Strecke (mm)								
MW	0,08	0,11	0,079	0,13	0,12	0,14	0,12	0,16
Differenz	0,03 (27 %)		0,05 (39 %)		0,02 (14 %)		0,04 (25 %)	
SA	0,07	0,10	0,075	0,11	0,09	0,11	0,10	0,12
P-Wert	< 0,0001		< 0,0001		< 0,0006		< 0,0048	

Table 3: Ergebnisse der Migrationsanalyse von einzelnen Zellen auf Kollagen I und Fibronectin. (Stimulation: IGF1, Mittelwert: MW, Standardabweichung: SA)

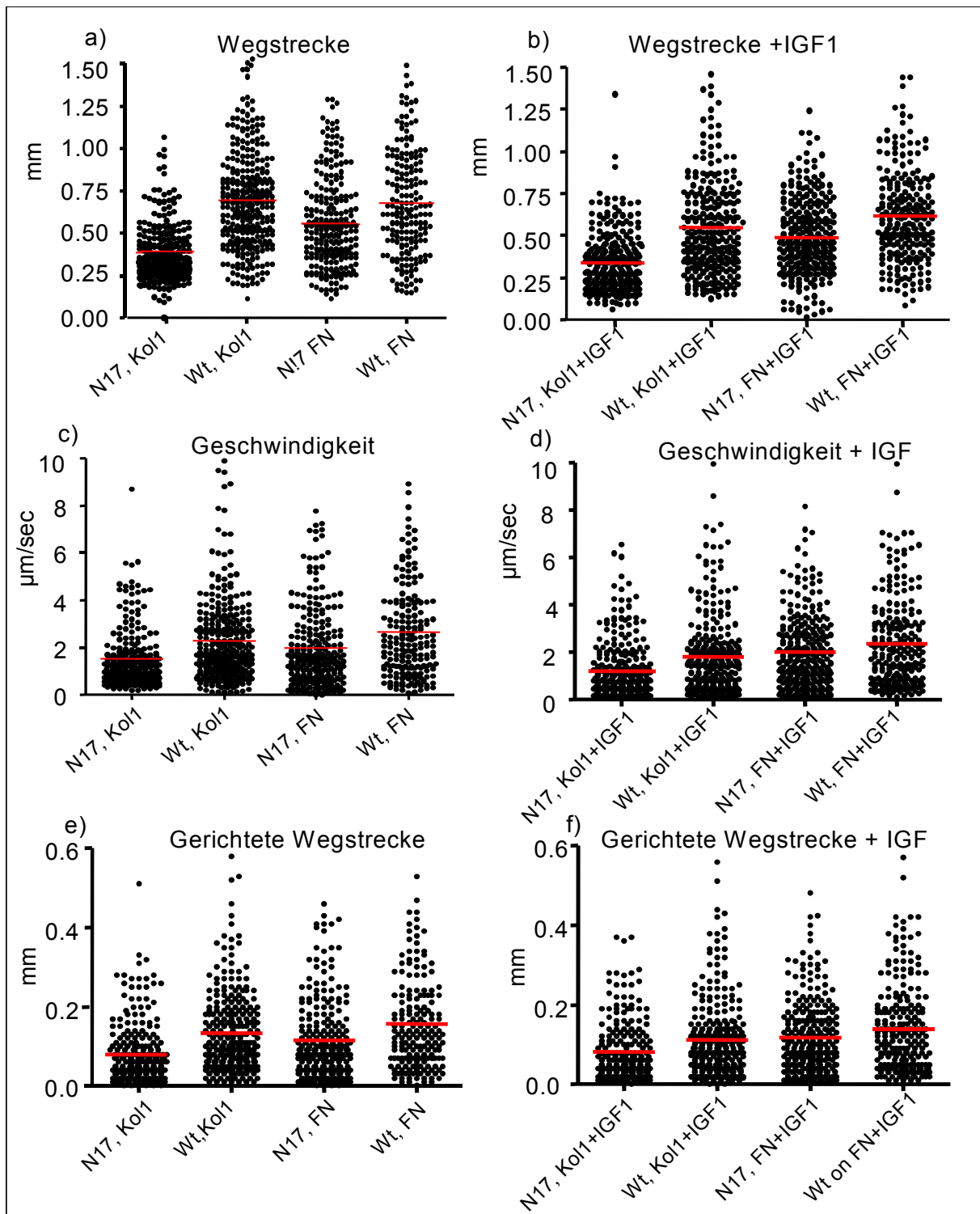


Abbildung 3.18: Wolkendiagramme der Migrationsstudien an einzelnen Zellen; (N17: N17Rac1 transgene Zellen, Wt: Wildtyp-Zellen, Kol1: Kollagen I, FN: Fibronektin, IGF-1: Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1)

In Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse der Migrationsstudien in Tropfendiagrammen dargestellt. In Tabelle 3 sind die dazugehörigen Werte dokumentiert. Es wurden die Ergebnisse verschiedener transgener- und Kontrollzelllinien gemittelt. Die Anzahl der untersuchten Zellen betrug mindestens 191 und maximal 266. Des Weiteren wurden

der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der P-Wert aus der jeweiligen Signifikanzbestimmung durch einen t)-Test ermittelt. Bei der Analyse der zurückgelegten Wegstrecke auf Kollagen I zeigte sich, dass die transgenen Zellen ohne Zugabe von IGF-1, im Durchschnitt 0,3 mm (44 %) weniger Strecke zurückgelegt hatten als die Kontrollzellen. Die Stimulation mit IGF-1 brachte die Zellen beider Gruppen nicht dazu weiter zu migrieren (0,21 mm; 38 %). Es wurde eher eine Abnahme der zurückgelegten Strecke beobachtet. Die Messung der Geschwindigkeit ohne IGF-1 zeigte, dass die N17Rac1 transgenen Keratinozyten um 1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ im Mittel (43 %) langsamer waren als die Kontrollen. Die Zugabe von IGF-1 führte zu einer Abnahme der Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit um 0,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (33 %). Bei der Messung der gerichteten Strecke legten die transgenen Zellen ohne Zugabe von IGF-1 0,05 mm (39 %) weniger Weg als die Kontrollen zurück. Die Zugabe von IGF-1 führte auch hier zu einer leichten Abnahme der gerichteten Wegstrecke (0,03 mm, 27 %).

Bei den Untersuchungen des Migrationsverhaltens der N17Rac1 transgenen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen auf Fibronectin als Matrix konnte generell festgestellt werden, dass beide Zellgruppen längere Wegstrecken zurücklegten und eine höhere Geschwindigkeit dabei aufwiesen als bei Kollagen I als Matrix. Auch hier konnte die Zugabe von IGF-1 keine Steigerung im untersuchten Migrationsparameter auslösen, sondern eher eine Abnahme. Bei den zurückgelegten Strecken bewegten sich die Kontrollzellen im Durchschnitt um 0,14 mm (25 %) weiter als die transgenen Zellen. Die Zugabe von IGF-1 brachte keine Veränderung (0,13 mm; 21 %). Ohne Zugabe von IGF-1 waren die Kontrollzellen 0,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (27 %) schneller als die transgenen Zellen, mit IGF-1 um 0,02 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (17 %). Bei der Messung der gerichteten Strecke migrierten die Kontrollzellen auf Fibronectin im Mittel um 0,04 mm (25 %) weiter als die N17Rac1 transgenen Keratinozyten. Durch die Zugabe von IGF-1 wanderten die Wildtypkontrollen nur noch 0,02 mm (14 %) weiter als die N17Rac1-Zellen. Durch die Anwendung des t)-Testes konnte bei allen Messungen eine starke bis mittelstarke Signifikanz der Unterschiede festgestellt werden.

Generell ist zu sagen, dass bei allen drei untersuchten Parameter (zurückgelegte Wegstrecke, gerichtete Wegstrecke und Geschwindigkeit) für die transgenen Keratinozyten geringere Werte ermittelt wurden, als für die Kontrollzelllinien. Die Zugabe von IGF-1 konnte keine Steigerung des Migrationsverhalten bei beiden Zellgruppen auslösen. Die größten Unterschiede zwischen transgene Keratinozyten

und Kontrollzellen waren bei der Messung der zurückgelegten Wegstrecke festzustellen.

Damit zeigen auch einzelne primäre Keratinozyten von N17Rac1 transgenen Mäusen einen zellautonomen Migrationsdefekt auf Kollagen I, der durch die Inhibition von endogenem Rac1 auf Grund der Expression von dominant negativem N17Rac1 ausgelöst wurde.

3.5.2 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens

Anhand der Migrationsstudien wurde festgestellt, dass sich mehr N17Rac1 transgene Keratinozyten als Wildtypzellen von der Kollagen I Matrix ablösen. In Abbildung 3.19 sind exemplarisch Aufnahmen (jeweils am Ende der 20 Stunden) von N17Rac1 transgenen Zellen und Wildtypkeratinozyten auf Kollagen I und Fibronektin als Untergrundmatrix, die für die Migrationsanalysen in Kapitel 3.5.1 verwendet wurden, dargestellt. In der Aufnahme der N17Rac1 transgenen Zellen auf Kollagen I haben sich wesentlich mehr Zellen abgelöst und schwimmen im Medium als bei N17Rac1 transgenen Keratinozyten auf Fibronektin oder den Wildtypkontrollen auf Kollagen I beziehungsweise Fibronektin. Um die Ursachen für die vermehrte Ablösung von der Kollagen I Matrix zu erforschen, wurde das Adhäsionsverhalten der Keratinozyten näher untersucht.

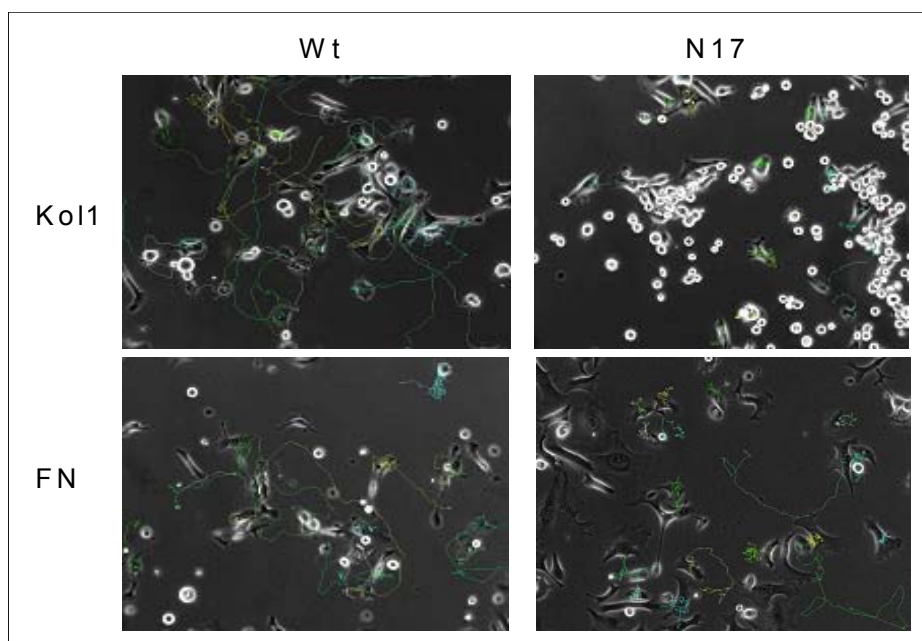


Abbildung 3.19: Aufnahmen von Keratinozyten mit Kollagen Typ I als Untergrundmatrix und Fibronektin. Farbige Linien kennzeichnen den Verlauf der Migration der Zellen über 20 h. Die N17Rac1 transgenen Zellen auf Kollagen 1 haben sich teilweise schon abgelöst. Vergrößerung: 100x; (N17: N17Rac1; Wt: Wildtyp; Kol1: Kollagen Typ I; FN: Fibronektin)

Dafür wurden von N17Rac1 transgenen Keratinozyten und Wildtypkontrollen eine Adhäsionsmessungen mit Hilfe des Cyto Tox Kits (Promega, Mannheim) durchgeführt. Hierbei wird die Adhäsion indirekt durch die Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität bestimmt, die sich im Zytoplasma von intakten Zellen befindet.

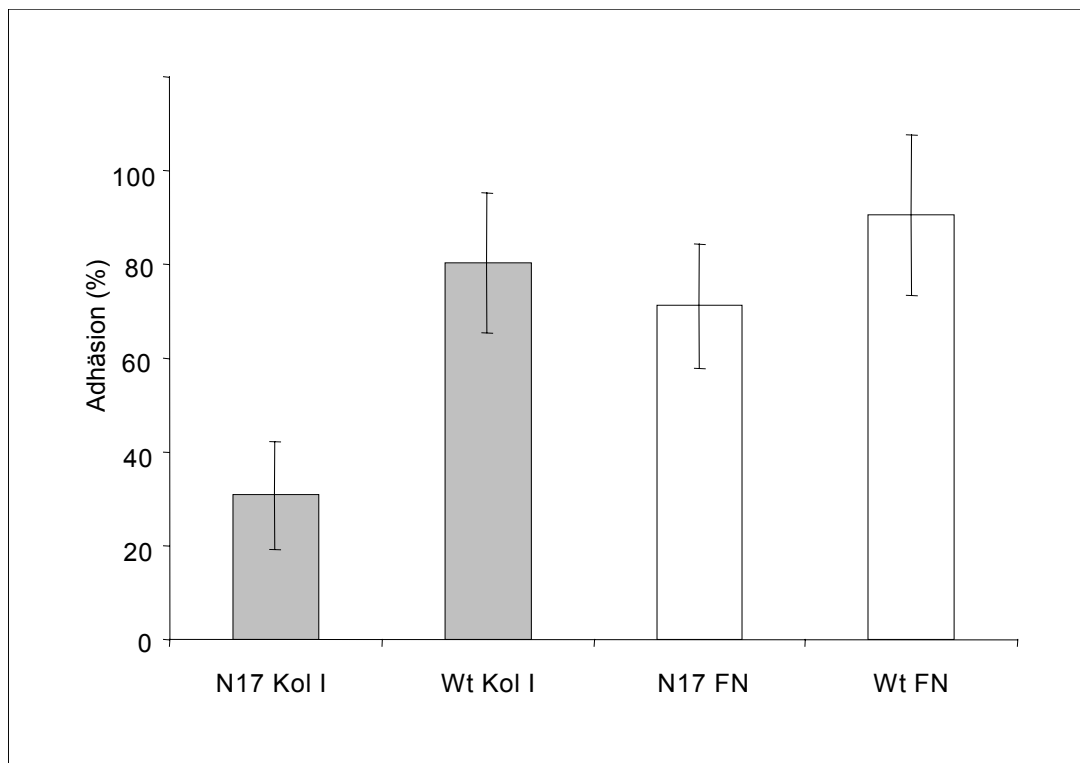


Abbildung 3.20. Ergebnisse der Adhäsionsmessung in prozentualen Anteilen (%); Eine Adhäsion von 100 % entspricht der angehafteten Zellen auf einer Polylysinmatrix; graue Balken: Adhäsion in Prozent auf Kollagen Typ I von N17Rac1- und Wildtypkeratinozyten, weiße Balken: Adhäsion in Prozent auf Fibronectin von N17Rac1 und Wildtypzellen (Kol1: Kollagen I, FN: Fibronectin, Wt: Wildtypkeratinozyten, N17: N17Rac1)

In Abbildung 3.20 ist die Adhäsion für die N17Rac1 transgenen Keratinozyten und Kontrollzellen auf Kollagen I und Fibronectin in Prozent dargestellt. Eine Adhärenz von 100 % entspricht der Bindung an eine Polylysinmatrix. Polylysin ist ein unspezifisches Adhäsionsmolekül, das durch chemische Bindung an Proteine der Membranoberfläche zu einer Adhäsion der ausplattierten Keratinozyten führt.

Die transgenen Zellen zeigten auf Kollagen I eine Adhäsion von 30 %, wobei die Kontrollzellen im Durchschnitt zu 80 % adhärten. Die Differenz zwischen beiden Gruppen betrug somit 50 %. Auf Fibronectin erreichten die transgenen Zellen eine Adhärenz von etwa 70 % und die Kontrollzellen von 90 %. Die Durchführung eines t)-Testes ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Adhäsion zwischen

N17Rac1 transgenen Keratinozyten und Wildtypkontrollen auf Fibronektin. Somit haben die N17Rac1 transgenen Zellen einen Defekt in der Adhäsion auf einer Kollagen I Matrix.

3.5.3 Charakterisierung des Ausbreitungsverhaltens

Als weitere individuelle Funktion des Migrationsprozesses wurde das Ausbreitungsverhalten (Spreading) der transgenen Zellen näher untersucht. Einem frühen Ablösen der N17Rac1 Mauskeratinozyten von einer Kollagenmatrix könnte auch eine Veränderung des Ausbreitungsverhalten zu Grunde liegen. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, konnten sich die N17Rac1 transgenen Zellen nach 40 min Anhaftungsdauer nicht so stark ausbreiten wie die Wildtypzellen. Die N17Rac1 Zellen blieben klein und abgerundet. Die Kontrollzellen waren im Gegensatz dazu wesentlich größer und zeigten eine Zellmorphologie mit eindeutigen lamellipodialen Ausstülpungen (Abbildung 3.21, Pfeil).

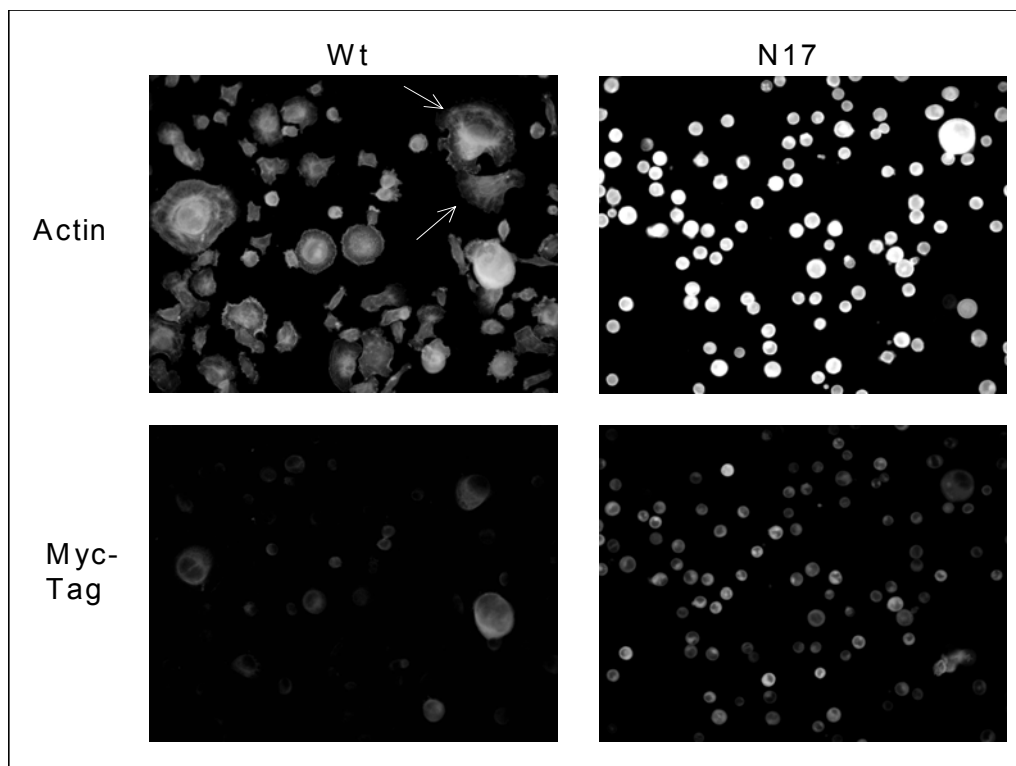


Abbildung 3.21: Bilder von N17Rac1 transgenen- und Wildtypzellen 40 min nach Ausplattierung. Die Zellen wurden durch TRITC-Phalloidin gegen polymerisiertes Aktin, und mit anti-Myc-Antikörper (Klon 9B11) gegen den Myc-Tag von N17Rac1 gefärbt. Lamellipodien der Wildtypzellen wurden mit Pfeilen gekennzeichnet, Vergrößerung: 200x; (Wt: Wildtypzellen; N17: N17Rac1)

Abbildung 3.22 zeigt die Zusammenfassung aller Ausbreitungsversuche mit Kollagen Typ I und Fibronektin als Ausgangsmatrix. In dieser Darstellung wurde die Zellgröße (in Pixel) gegen die Zellzahl aufgetragen. Auf Kollagen I als Matrix (a) zeigten die Wildtypzellen ein stärkeres Verhalten sich auszubreiten als die N17Rac1 transgenen Zellen. Bei Verwendung einer Matrix aus Fibronektin zeigten die N17Rac1 Zellen keine Unterschiede in ihrer Ausbreitung im Vergleich zu den untersuchten Wildtypzellen. Somit haben die N17Rac1 transgenen Keratinozyten einen Defekt im Ausbreitungsverhalten auf Kollagen I.

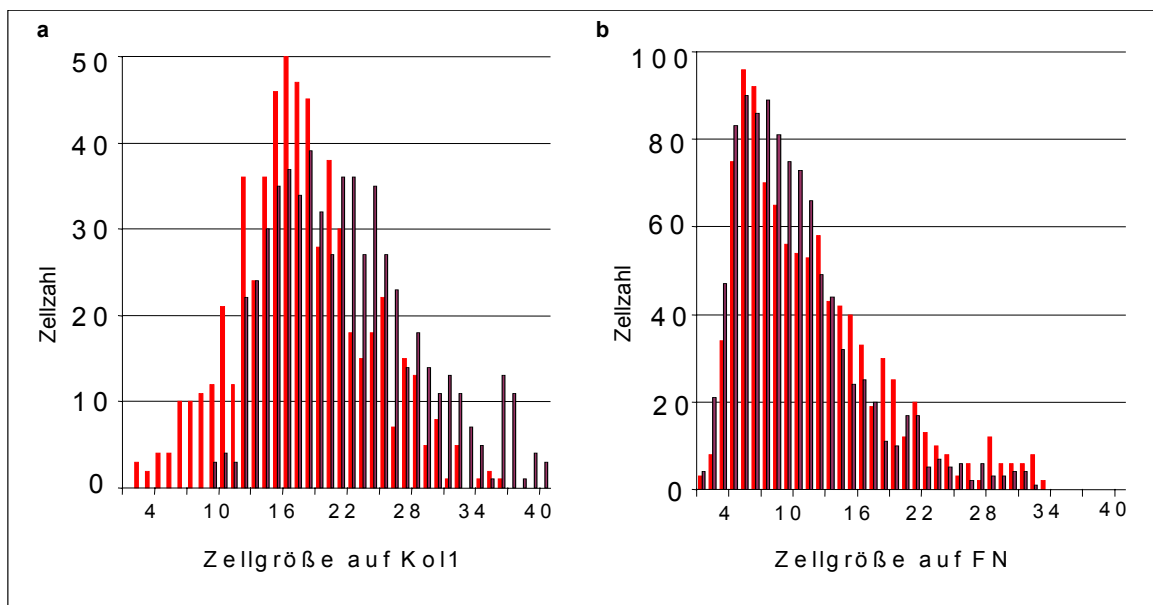


Abbildung 3.22: Zusammenfassung der Ausbreitungsversuche auf Kollagen I (a, Kol1) und auf Fibronektin (b, FN), rote Balken: N17Rac1 transgene Zellen, schwarze Balken: Wildtypzellen, (X-Achse: Zellgröße in Pixel)

3.5.4 Untersuchungen von Zell-Matrixkontakten

Die verminderte Fähigkeit der N17Rac1 transgenen Keratinozyten, auf einer Kollagen I Matrix zu migrieren, sich anzuheften und auszubreiten ließ vermuten, dass die Expression von Rezeptoren für die Anhaftung an Kollagen I gestört schien. Es ist bekannt, dass der wichtigste Rezeptor für die Anhaftung an Kollagen I in Keratinozyten das $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist (Lange et al., 1994). Die Bindung an Fibronektin wird durch $\alpha_2\beta_5$ -Integrin vermittelt. Daraufhin wurde die Expression der Untereinheiten der Integrine α_2 , β_1 und α_5 auf der Membranoberfläche der Keratinozyten mittels FACS-Analyse untersucht. Insgesamt wurden die Expressionsprofile von 7 N17Rac1 transgenen Keratinozyten und 5 Wildtypzelllinien untersucht. Dabei konnte bei 2 N17Rac1 Linien (N556 und N561) reproduzierbar eine stark reduzierte Expression der α_2 -Integrinuntereinheit festgestellt werden. Fünf

weitere transgene Linien zeigten eine den Wildtypzellen vergleichbare Expression. Die Expression der Integrinuntereinheiten von β_1 und α_5 an der Zellmembran war bei transgenen wie bei Kontrollzellen im gleichen Verhältnis. In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse exemplarisch für drei primäre Keratinozytenlinien dargestellt. Die blauen Kurven zeigen die Ergebnisse der Wildtypzelllinie N541, die grünen und die gelben Kurven jeweils die Ergebnisse der N17Rac1 transgenen Zelllinien N556 und N570. Bei der Untersuchung der Expression von der Untereinheit α_2 -Integrin konnte eine Abnahme bei der transgenen Linie N556 (grüne Kurve) festgestellt werden (Abbildung 3.23 b). Die transgene Linie N570 zeigte eine, der dargestellten Kontrolllinie N541 vergleichbare Expression von α_2 -Integrin. Die Expression der β_1 - (c) und α_5 -Integrinuntereinheit (d) zeigten keine Unterschiede auf. Somit konnte nicht generell festgestellt werden, dass eine geringere oder fehlende Expression von $\alpha_2\beta_1$ -Integrin an der Zellmembran vorliegt.

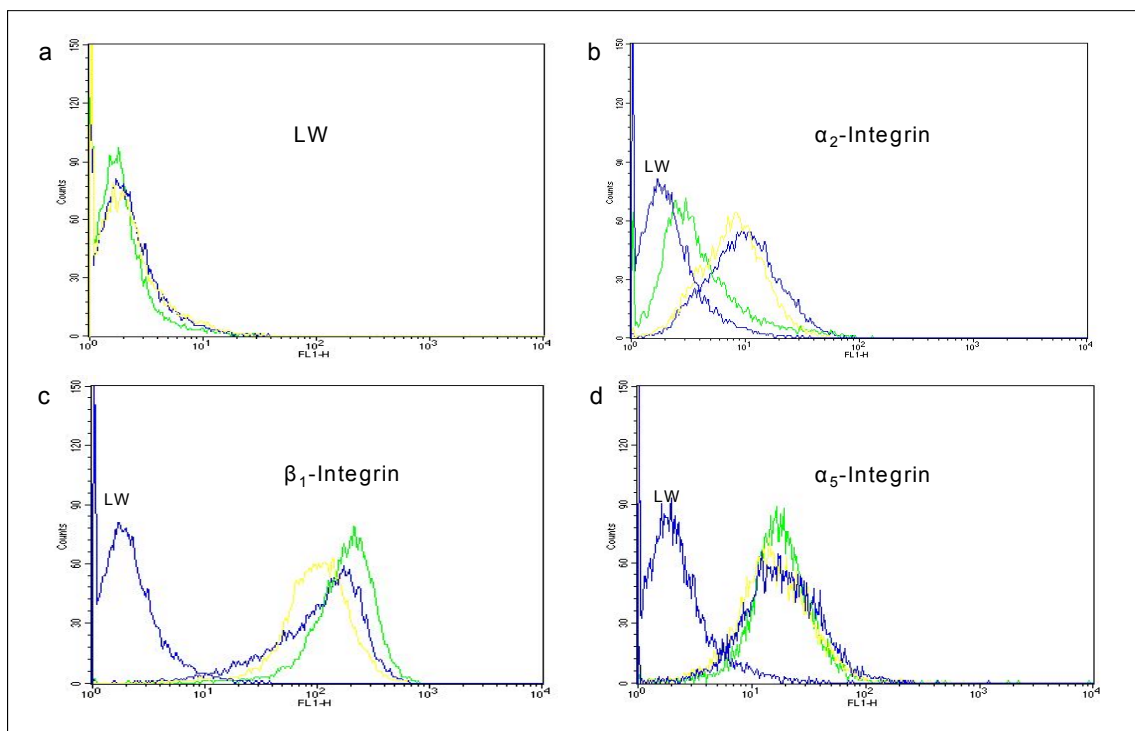


Abbildung 3.23: Ergebnisse der Integrinexpression auf der Zelloberfläche von N17Rac1 transgenen und Wildtypzellen durch FACS-Analyse, a: Darstellung der Leerwerte der Wildtypzelllinie N541 (blaue Kurve) und der N17Rac1 transgenen Linien N556 (grüne Kurve) und N570 (gelbe Kurve); b: Ergebnisse der FACS-Analyse von α_2 -Integrinuntereinheit in den Linien N541 (blau), N556 (grün) und N570 (gelb), Nachweis von β_1 -Integrinuntereinheit in den Zelllinien N541 (blau), N556 (grün) und N570 (gelb); d: Ergebnisse der FACS-Analyse von α_5 -Integrinuntereinheit in N541 (blau), N556 (grün) und N570 (gelb); (LW: Leerwert)

Da die anderen untersuchten 5 N17Rac1 transgenen Keratinozytenlinien eine den Wildtypzellen vergleichbare Expression der α_2 -Integrinuntereinheit aufwiesen, konnte

dies nicht als alleinige Ursache für die Störungen in der Migration, Adhäsion und Ausbreitung angenommen werden. Zusätzlich wurde durch Immunfluoreszenz die α_2 -Integrinuntereinheit in der Epidermis von N17Rac1 transgenen und Wildtypmäusen detektiert (Abbildung 3.24). Hier konnte kein Unterschied im Expressionsmuster oder der Signalintensität nachgewiesen werden.

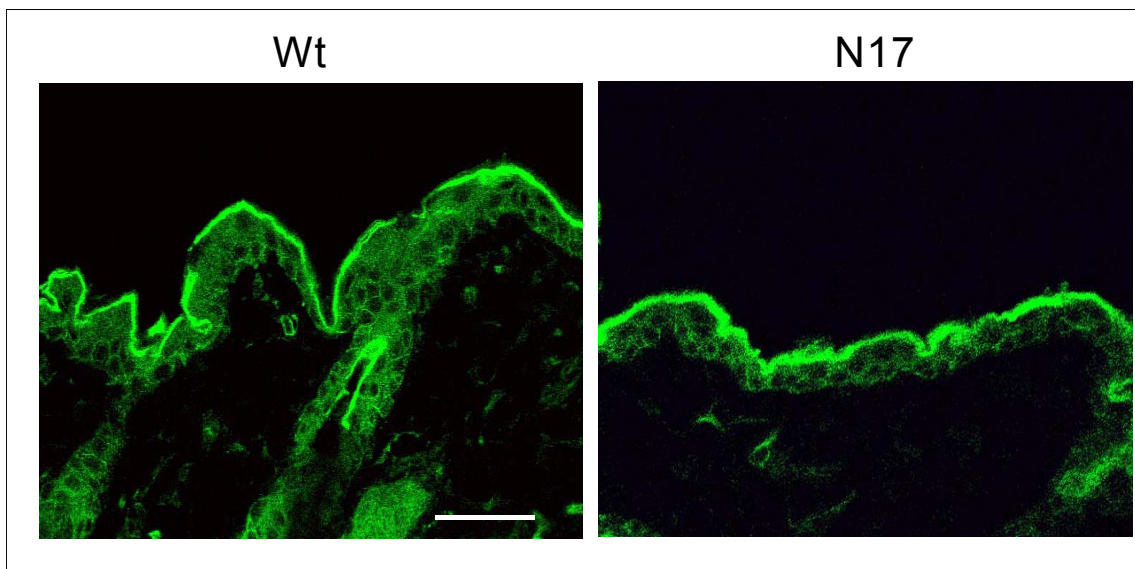


Abbildung 3.24: Nachweis der α_2 -Integrinuntereinheit (anti- α_2 -Antikörper) durch Immunfluoreszenz in murinen Epidermisproben von N17Rac1 transgenen und Wildtypmäusen, Skalierungsbalken = 100 μm , (Wt: Wildtyp; N17: N17Rac1)

Um festzustellen, ob auf Grund der Expression von N17Rac1 in den primären Keratinozyten eine Veränderung in der Bildung der Fokalkontakte vorliegt, die den Adhäsion- und Migrationsphänotyp erklären könnten, wurden diese in N17Rac1 transgenen Keratinozyten und Wildtypzellen mit einem Antikörper gegen Vinculin durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 3.25 dargestellt, konnte bei den N17Rac1 transgenen Zellen weniger Vinculin als in den Wildtypzelle in den fokalen Kontakten nachgewiesen werden. Somit könnte die Expression von N17Rac1 in primären murinen Keratinozyten Einfluss auf die normale Ausbildung von Fokalkontakten haben.

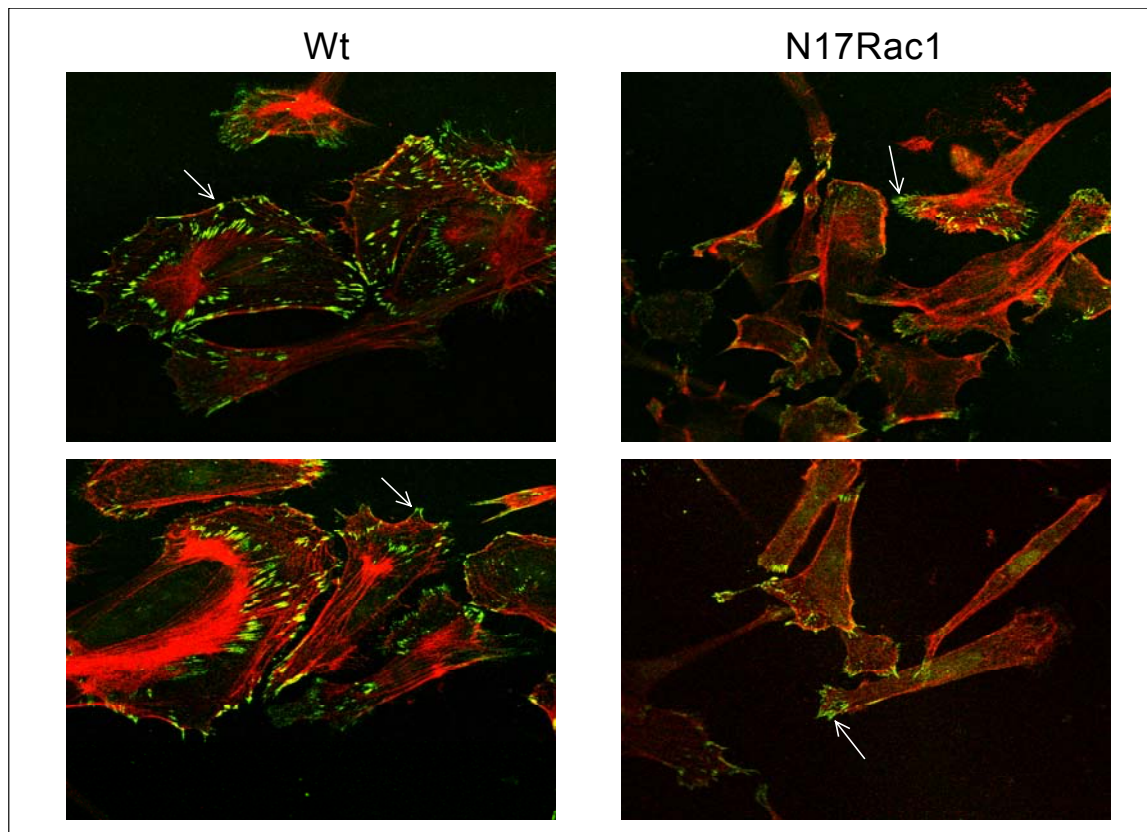


Abbildung 3.25: Nachweis von Vincullin (Pfeile) in den Fokalkontakten von Wildtypzellen und von N17Rac1 transgenen Zellen durch Immunfluoreszenz. Polymerisiertes Aktin wurde mit Phalloidin angefärbt. Vergrößerung: 400x

3.5.5 Bestimmung der Kopienzahl des N17Rac1 Transgens in Keratinozyten

Eine mögliche Begründung für die schwächere Expression der α_2 -Integrinuntereinheit der in Kapitel 3.5.4 genannten transgenen Zellpopulationen von N556 und N561 könnte aus einer größeren Kopienzahl des N17Rac1 Transgens herrühren, die im Vergleich zu transgenen Zellen von anderen Mäusen vorliegt. Zur Bestimmung der Kopienzahl des Transgens in den transgenen Mauskeratinozyten wurden von verschiedenen transgenen Zelllinien Southern Blots durchgeführt und mit einer Sonde gegen das Transgen (vergleiche Abbildung 3.26) hybridisiert. Aus denselben Zelllinien wurden gleiche Mengen DNA mit einer Sonde gegen das „Single Copy“-Gen *IL-2-Rezeptor* hybridisiert. Die Signalstärken beider Blots wurden miteinander verglichen und dadurch auf die Anzahl der Kopien des Transgens von N17Rac1 im Genom der Keratinozyten geschlossen. In diesem Versuch wurden DNA Proben von Keratinozyten verwendet, die aus Rückkreuzungen mit C57Bl/6 Wildtypieren (N135, N142) stammten und Proben von Tieren, deren beide Elternteile positiv für das N17Rac1 Transgen waren (N540, N556, N561). Die transgenen Linien N540, N556, N561 wurden im Kapitel 3.5.4 hinsichtlich ihrer Integrinexpression untersucht. Die

Linie N540 zeigte im Gegensatz von N556 und N561 dabei keine veränderte α_2 -Integrinexpression. In Abbildung 3.26 a konnte bei der Ermittlung der Kopienzahl ein stärkeres Signal bei der Linie N556 als bei der Linie N540 festgestellt werden. In der transgenen Linie N540 scheint eine Kopie von N17Rac1 integriert zu sein. In der Linie N556 etwa 3-4 Kopien. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Stärke der Veränderungen im Zellverhalten mit der Kopienzahl korreliert. In Abbildung 3.26 b wurde die Kopienzahl von N17Rac1 in transgenen Zelllinien, aus Rückkreuzungen mit C57Bl/6 Wildtyptieren (N135, N142), mit Zelllinien aus Mäusen, deren Eltern beide N17Rac1 positiv waren (N561, N556), verglichen. Es entstand dabei der Eindruck, dass bei der Nachkommenschaft von transgenen Elternteilen, die Kopienzahl sich in transgenen Linien erhöhen konnte. Die transgene Linie N556, die aus einer Verpaarung zweier N17Rac1 Mäuse stammt, zeigte hier mit etwa 3-4 Kopien die höchste Integrationsrate. Je größer die Anzahl der integrierten cDNA Kopien für N17Rac1 im Genom der Mäuse, desto stärker könnten die Defekte der Keratinozyten ausgeprägt sein.

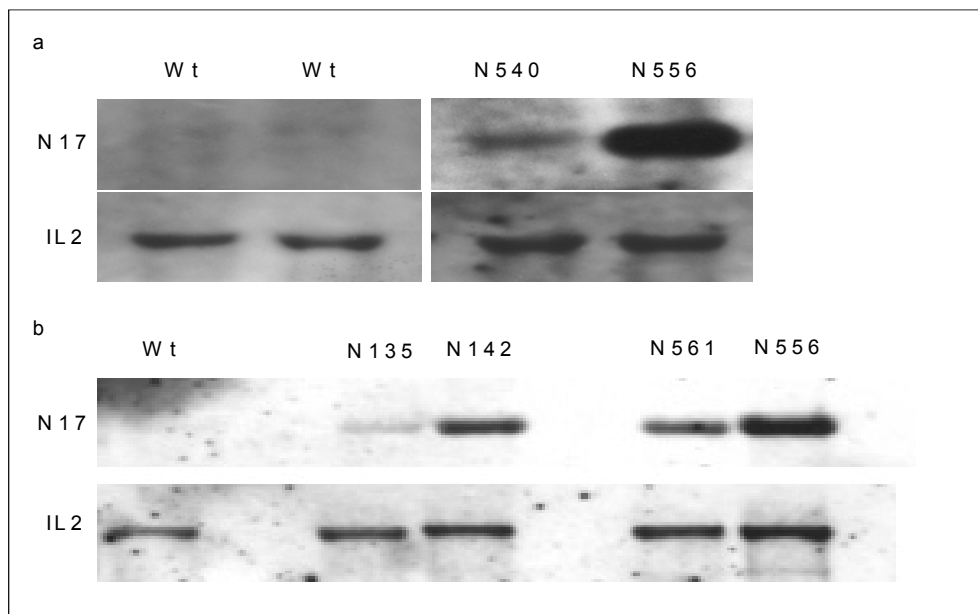


Abbildung 3.26: Bestimmung der Kopienzahl des N17Rac1 Transgens im Genom von Keratinozytenlinien; a: Überprüfung der Kopienzahl von N17Rac1 auf Grund der α_2 -Expressionsunterschiede in N540 und N556; b: Überprüfung der Kopienzahl von N17Rac1 Linien auf Grund des unterschiedlichen Elterngenotyps (N135, N142: Rückkreuzungen mit Wildtypeltern; N556 und N561: Eltern waren jeweils beide N17Rac1 transgen (N17: N17Rac1; IL2: Interleukin-2 Rezeptor als Ladekontrolle; Wt: Wildtypzelllinie)

3.6 Auswirkungen von N17Rac1 im Tumormodell Keratin14-HPV8

Maliri et al. (2002) konnten zeigen, dass während einer Ras-induzierten Tumorentwicklung, Mäuse mit einer Deletion des Rac1 spezifischen GEF's Tiam1 weniger Tumore entwickelten, als Wildtypkontrollen. Die Tumore der Tiam 1 (-/-) Mäuse zeigten, im Gegensatz zu Kontrolltumoren, eine stärkere Veränderung zu erhöhter Malignität. Um feststellen zu können, ob die Expression einer dominant negativen Mutante von Rac1 (N17Rac1) Auswirkungen auf die Tumorentwicklung haben könnte, wurden N17Rac1 positive Tiere im C57Bl/6 Maushintergrund mit HPV8 transgenen Tieren im FVB/N Maushintergrund verpaart.

Es ist bekannt, dass der humane Papillomavirus 8 (HPV8) in der Hautkrebsbildung bei Patienten mit Epidermodysplasia verruciformis eine Rolle spielt (Pfister et al., 1997). Um die Auswirkungen des HPV8 in der Haut näher analysieren zu können, wurden im Institut für Virologie der Universität zu Köln transgene Mäuse generiert (Schaper et al., 2005). In diesen Tieren, mit FVB/N Maushintergrund wurden unter der Kontrolle des Keratin14 Promotors die frühen Gene des HPV8-Genoms in das Genom integriert. Über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 12 Monaten entwickeln 91 % der HPV8 transgenen Mäuse einzelne oder multifokale benigne Tumore. 6 % der transgenen Tiere entwickelten zum Ende dieses Beobachtungszeitraumes Plattenepithelkarzinome der Haut.

Von den Nachkommen der angesetzten Verpaarungen wurden insgesamt 13 HPV8/N17Rac1 doppelt transgene- und 11 HPV8 transgene Tiere über einen Zeitraum von 14 Monaten hinsichtlich einer spontanen Tumorentwicklung beobachtet. In keinem dieser Tiere, auch nicht auf der Haut der HPV8 transgenen Mäusen, die als Positivkontrollen gehalten wurden, entwickelten sich in diesem Zeitraum, wie bei Schaper et al. (2005) beschrieben, benigne Tumore. Es wurde vermutet, dass der Grund dafür in der Einkreuzung der N17Rac1 transgenen Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund in den FVB/N Maushintergrund der HPV8 transgenen Mäuse lag. HPV8 transgene Mäuse in 100 %igem C57Bl/6 Hintergrund, zeigten keine spontane Tumorbildung.

Die Bestrahlung der HPV8 Mäuse im FVB/N Hintergrund mit hohen Dosen von UVA/UVB-Strahlen (10 J UVA/ cm² und 1 J UVB/ cm²) zeigte hingegen, dass die Induzierung der benignen Tumore wesentlich früher (1-3 Wochen nach Bestrahlung) einsetzen kann als die spontane Entwicklung.

Daraufhin wurden 13 HPV8/N17Rac1 doppelt transgene und 11 HPV8 transgene Tiere im gemischten Hintergrund bestrahlt. Die Tiere beider Gruppen zeigten anschließend Symptome eines Sonnenbrandes. Auf dem bestrahlten Rückenareal bildeten sich Rötungen und Schwellungen, die sich bei allen HPV8 positiven Mäusen nach etwa zwei Wochen zu benignen Tumoren entwickelten. In Abbildung 3.25 sind die makroskopischen Veränderungen vier Wochen nach der Bestrahlung von zwei HPV8 transgenen und zwei HPV8/N17Rac1 transgenen Mäusen dokumentiert. In beiden HPV8 transgenen Mäusen sind leichte (linkes Bild) bis starke (rechtes Bild) Wucherungen, begrenzt auf das bestrahlte Areal, zu beobachten. Bei zweien dieser HPV8 transgenen Mäuse befanden sich nach vier Wochen diese Veränderungen auch Rückenteile in Richtung Nackenbereich, außerhalb der bestrahlten Fläche. Bei den beiden dargestellten HPV8/N17Rac1 doppelt transgenen Tieren waren in dem bestrahlten Areal keine Wucherungen zu erkennen. Durch Ertasten der Fläche war im Vergleich zu nicht bestrahlten Bereichen auf dem Rücken, eine leichte nicht erhabene Verdickung der Haut auszumachen. Ein Tier der HPV8/N17Rac1 doppelt transgenen Mäuse zeigte leichte Wucherungen.

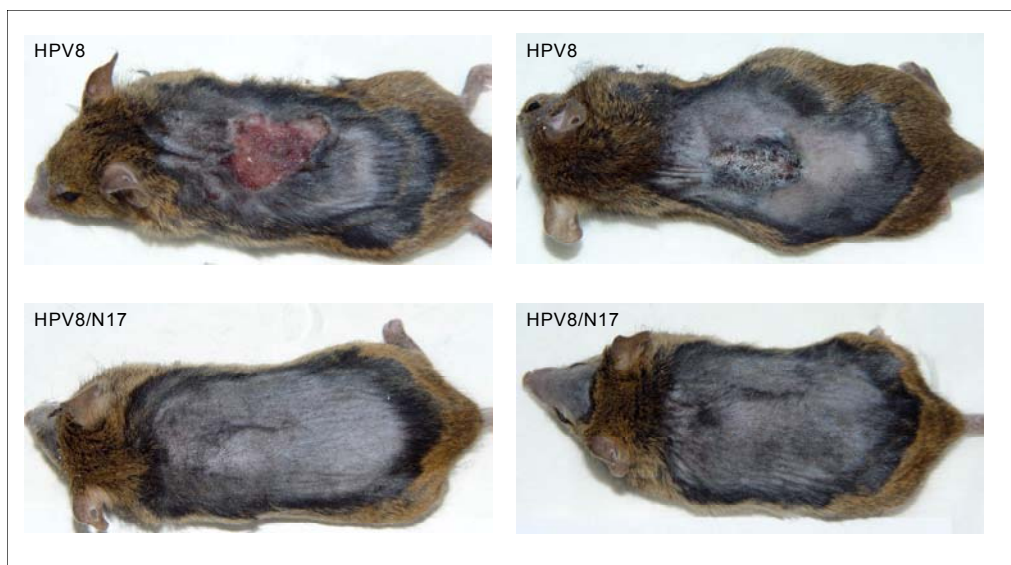


Abbildung 3.27: Bilder der mit UVA/UVB-Strahlen behandelten HPV8 und HPV8/N17Rac1 transgenen Mäusen. HPV8 positive Mäuse zeigen papillomartige Veränderungen im bestrahlten Rückenbereich.

Die histologische Untersuchung im HE-Schnitt (Abbildung 3.28) zeigte bei den HPV8 transgenen Mäusen, wie bei Schaper et al., 2005 beschrieben, die Symptome einer Papillomatose, Akanthose, Hyperkeratose und verschiedene Varianten von epidermaler Dysplasie. Von den 13 HPV8/N17Rac1 doppelt transgenen Tieren

zeigte dagegen ein Tier die Symptome der HPV8 Maus, sowie ein Tier beginnende Zystenbildung. Weitere sechs doppelt transgene Tiere zeigten eine leichte Verdickung der Epidermis von etwa 9 ± 1 Zellschichten. Acht weitere Tiere besaßen im Durchschnitt 5 ± 2 Keratinozytenschichten. In Abbildung 3.28 sind Beispiele von mit HE gefärbten Epidermisschnitten von HPV8 transgenen und HPV8/N17Rac1 doppelt transgenen Mäusen, vier (Abbildung 3.28 a) und acht (Abbildung 3.28 b) Wochen nach der Bestrahlung, dargestellt.

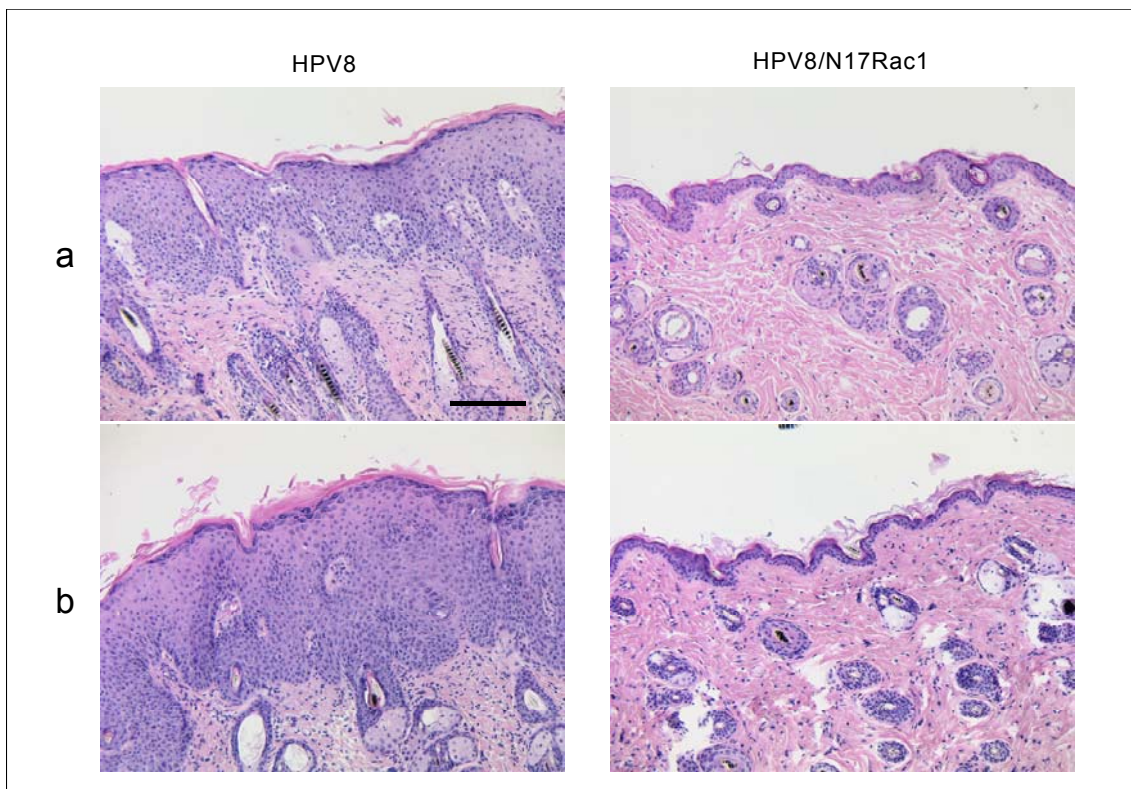


Abbildung 3.28: HE gefärbte histologische Schnitte von bestrahlten HPV8 und HPV8/N17Rac1 transgenen Mäusen, a: ein Monat nach der Bestrahlung, b: zwei Monate nach Bestrahlung mit UVA/UVB-Strahlen; Skalierungsbalken = 100 μ m

Acht Wochen nach der Bestrahlung mit UVA/UVB-Strahlen hat sich bei den HPV8 transgenen Mäusen im Vergleich zu vier Wochen die Schichtdicke der Epidermis fast verdoppelt. Bei den doppelt transgenen Tieren ist nach acht Wochen keine Veränderung festzustellen.

Die Überprüfung der Expression von Keratin 14 durch Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 3.29 a, b) in der Epidermis zeigte in der hyperproliferativen Epidermis der bestrahlten HPV8 transgenen Mäuse ein Expressionsmuster bis in die suprabasalen Schichten hinein. Bei den bestrahlten doppelt transgenen Mäusen mit weniger Zellschichten konnte man ebenfalls ein Signal bis in subbasale Schichten

beobachten. Den Mäusen wurde 2 h vor ihrem Tod BrdU injiziert. Sich in der S-Phase befindliche Keratinozyten konnte so in der Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-BrdU-Antikörper sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.29 c, d). In der Epidermis der HPV8/N17Rac1 positiven Mäuse konnten nur wenige BrdU-positive Zellen detektiert werden, pro Gesichtsfeld im Durchschnitt 2 ± 3 Zellen. In den HPV8 transgenen Mäusen sieht man in den basalen Bereichen des hyperproliferativen Gewebes etwa 21 ± 5 Zellen. Es proliferieren somit weniger Zellen in der doppelt transgenen Epidermis.

Die Expression von N17Rac1 in HPV8 positiver Epidermis hemmt somit die durch die Bestrahlung ausgelöste benigne Tumorentwicklung, so dass lediglich eine leichte Hyperproliferation der basalen Keratinozyten festzustellen ist. N17Rac1 wirkt also der Tumorentwicklung *in vivo* entgegen.

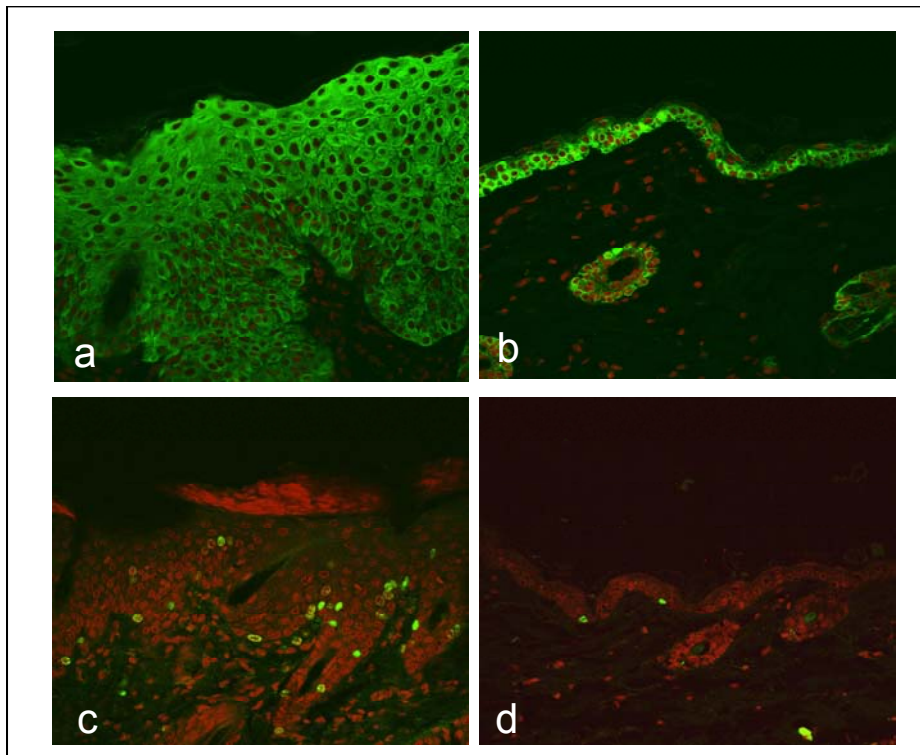


Abbildung 3.29: Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Keratin 14 (a, b) und mit einem Antikörper gegen BrdU (c, d); a, c: HPV8 transgene Epidermisproben, b, d: Epidermisproben von HPV8/N17Rac1 transgenen Mäusen. Gegenfärbung der Kerne wurde mit Propidiumjodid durchgeführt. Vergrößerung: 200x

3.7 Charakterisierung der L61Rac1 transgenen Mäuse

3.7.1 Nachweis der Integration des Transgens auf DNA Ebene

Zur Identifizierung der transgenen Mäuse für L61Rac1 wurden von allen geborenen Mäusen Schwanzbiopsien genommen und mit der isolierten DNA eine PCR durchgeführt. Das dadurch amplifizierte DNA Fragment beinhaltete das 3'-Ende des Keratin 14 Promotors und erstreckte sich über den Myc-Tag bis in die cDNA von L61Rac1 (vergleiche Abbildung 3.31 a). Es wurden dabei 2 positive Tiere für das L61Rac1 Konstrukt in der F0-Generation gefunden. Von diesen Tieren wurde das amplifizierte PCR Fragment sequenziert, um so die Punktmutation nachweisen zu können. Zur weiteren Verifizierung der Transgenität der Mäuse wurden Southern Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 3.31 c). Hierbei erstreckte sich die benutzte DNA Sonde ebenfalls von dem 3'-Ende des K14 Promotors, über den Myc-Tag hinweg in die cDNA von L61Rac1 (Abbildung 3.31, a).

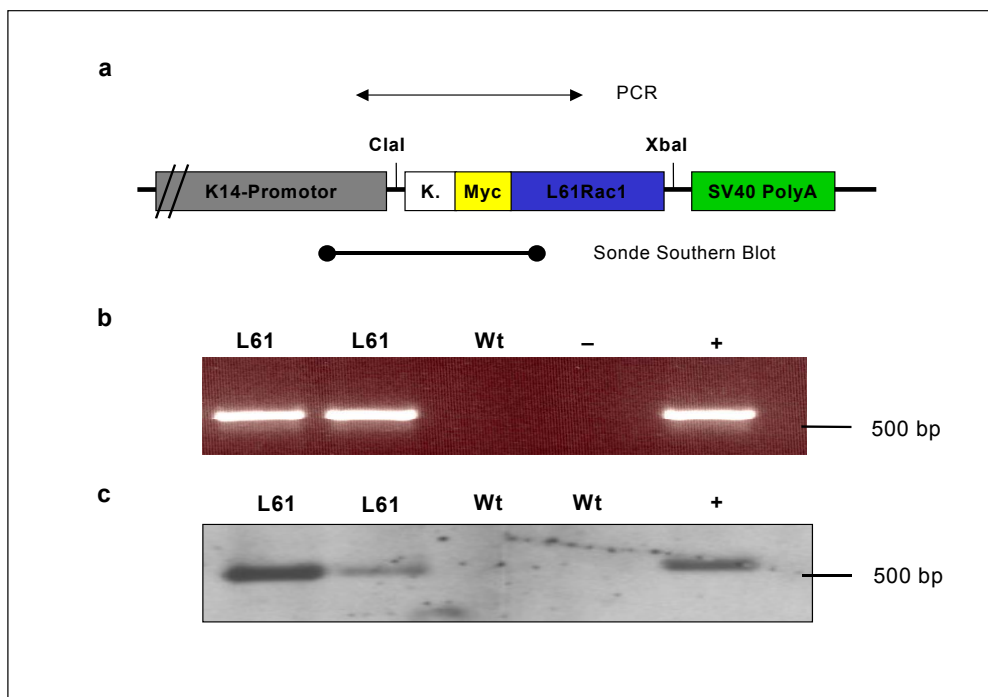


Abbildung 3.31: Typisierung der transgenen Tiere für L61Rac1 auf genomischer Ebene. a: Schematische Darstellung des Keratin 14 Konstruktes mit den jeweiligen Hybridisierungsstellen für PCR-Primer und für die DNA Sonde des Southern Blots, b: Nachweis der Integration von L61Rac1 in das Mausgenom durch PCR, c: Nachweis der Integration von L61Rac1 in das Mausgenom durch Southern Blot Analyse, (K.: Kozak-Sequenz; Myc: Myc-Tag; L61: L61Rac1; Wt: Wildtyp; +: Plasmidkontrolle; -: Negativkontrolle)

In den Abbildungen 3.31 b und c ist die PCR Typisierung von jeweils 2 transgenen Mäusen für L61Rac1 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde hierbei als

Template das Ursprungsplasmid pBBEB K14-10 L61Rac1 verwendet. Als Negativkontrolle wurde Wildtyp DNA genommen. Die F0 Generation zeigte auch bei näherer makroskopischer Betrachtung wie bei den N17Rac1 transgenen Tieren keinerlei Auffälligkeiten. Die Mäuse waren gesund, zeigten keine Größenunterschiede und auch keine Veränderungen an der Haut oder den Haaren. Die transgenen Tiere wurden nun mit Mäusen des Stammes C57Bl/6 verpaart und über drei Generationen in diesen Stamm zurückgekreuzt.

3.7.2 Nachweis der Expression von L61Rac1

Um die Expression von L61Rac1 in der Epidermis der transgenen Mäuse zu überprüfen, wurden für die Durchführung von Western Blots Proteinlysate aus Keratinozyten adulter Mäuse hergestellt. In Abbildung 3.32 a ist der erfolgreiche Nachweis des transgenen Proteins für L61Rac1 mit Hilfe des anti-Myc Antikörpers (Klon 9B11) dargestellt. Als Positivkontrolle wurde jeweils Proteinlysate aus mit pRKMyc RacL61 transfizierten humanen Keratinozyten aufgetragen. Proben von Kontrolltieren wurden als Negativkontrollen verwendet. In diesem Experiment konnte reproduzierbar eine Expression von L61Rac1 gezeigt werden, die aber wesentlich schwächer ausfiel als die Expression von N17Rac1 Protein (Abbildung 3.9, Auftragsmenge in beiden Versuchen je 30 µg Gesamtprotein).

Der Nachweis von L61Rac1 mit Hilfe eines Antikörpers gegen den Myc-Tag des Proteins durch Immunfluoreszenz in der Epidermis von transgenen Mäusen, konnte nicht wie bei N17Rac1 (Abbildungen 3.9 a) erfolgreich etabliert werden.

Zur Überprüfung der Expression von L61Rac1 *in vitro*, wurden primäre Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen isoliert. Anschließend wurden diese Zellen auf mit Kollagen I beschichteten Kulturschalen und mit Hilfe von Mausfibroblasten als Feederzellen kultiviert. Zur Analyse der Expression von L61Rac1 in transgenen Zelllinien wurden Proteinlysate hergestellt und diese jeweils im Western Blot untersucht (Abbildung 3.32 b). Die Expression von L61Rac im Gegensatz zu dem Nachweis von N17Rac1 (Abbildung 3.11) konnte nur mit dem Antikörper gegen den Myc-Tag (Klon 9B11) nachgewiesen werden. Durch den aus 16 Aminosäuren bestehenden Myc-Tag wurde das Transgen bei etwa 23 kDa detektiert.

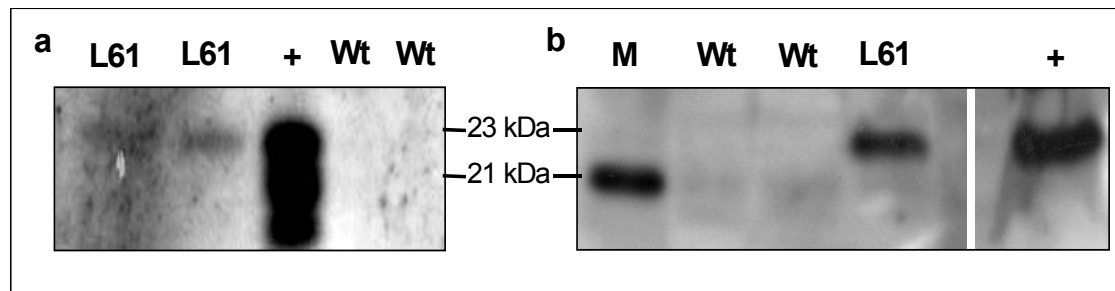


Abbildung 3.32: Überprüfung der Expression von konstitutiv aktivem L61Rac1. a: Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus adulten Keratinozyten von L61Rac1 transgenen und Wildtypmäusen; die Detektion erfolgte mit dem anti-Myc Antikörper (Klon 9B11) bei 23 kDa; b: Western Blot Analyse mit Proteinlysaten von primären Keratinozyten aus neugeborenen L61Rac1 transgenen- und Wildtypmäusen. Die Detektion erfolgte mit anti-Myc Antikörper (Klon 9B11) bei 23 kDa, (M: Marker, +: Positivkontrolle aus Lysaten von pRKMyc RacL61 transfizierten humanen Keratinozyten, Wt: Wildtyp, L61: L61Rac1)

3.7.3 Auswirkungen von L61Rac1 im Tumormodell Keratin14- Δ Nlef

Niemann et al. (2002) generierten eine transgene Mauslinie, die unter der Kontrolle des Keratin 14 Promotors ein N-terminal delitiertes Lef1 Protein, ohne β -Catenin-Bindungsstelle, exprimiert. Sie konnten damit zeigen, dass dieses Protein sich in einer dominant negativen Art verhält und somit den β -Catenin-Signalweg unterdrückt. Adulte transgene Mäuse verloren nach und nach ihr Fell und die Keratinozyten an der Basis der Haarfollikel differenzierten zu Zysten. Darüber hinaus entwickelten sich nach einmaliger Behandlung mit dem Tumorinduktor 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen (DMBA) aus Keratinozyten der oberen Regionen der Haarfollikel spontane benigne Hauttumore mit Talgdrüsendifferenzierung. Die Absicht war nun, zu untersuchen, ob L61Rac1 zu einer erhöhten Invasivität der benignen Tumore führt. Δ Nlef transgene Mäuse wurden mit den L61Rac1 transgenen Mäusen verpaart. Die daraus resultierenden doppelt transgenen Tiere zusammen mit einfach transgenen (L61Rac1, Δ Nlef) oder Wildtypkontrolltieren wurden einmalig auf dem Rücken mit dem Tumorinduktor DMBA bestrichen. Dabei wurden 8 doppelt transgene-, 14 Δ Nlef transgene-, 18 L61Rac1 transgene und 15 Wildtypiere behandelt. Nach ca. 4 Wochen war eine Tumorbildung zu beobachten. Dabei entwickelten sich bei den L61Rac1/ Δ Nlef doppelt transgenen und bei den Δ Nlef transgenen Mäusen auf den Rückenbereich großflächige kugelige Talgdrüsentumore und spitz zulaufende kegelige Papillome. Die tumorbefallenen Tiere wurden bei einer zu großen Anzahl (>15) der Geschwülste getötet und Proben von dem Tumorgewebe, der Leber, der Milz und dem Lymphknoten entnommen. Drei der 8 doppelt transgenen Mäuse verstarben sehr früh, entwickelten aber durchschnittlich wesentlich weniger Tumore

auf ihren Rücken als die $\Delta Nf1$ Mäuse im gleichen Zeitraum. Von den restlichen 5 $\Delta Nf1/L61Rac1$ Mäusen konnten Proben entnommen werden. In Abbildung 3.33 ist die Auswertung der Tumorzahlen dargestellt. Im Durchschnitt bildeten sich auf allen doppelt transgenen Mäusen $6 \pm 2,1$ Talgdrüsentumore und $1,5 \pm 1$ Papillome. Auf den $\Delta Nf1$ positiven Mäusen $13,1 \pm 6,3$ Talgdrüsentumore und $2,9 \pm 2,4$ Papillome.

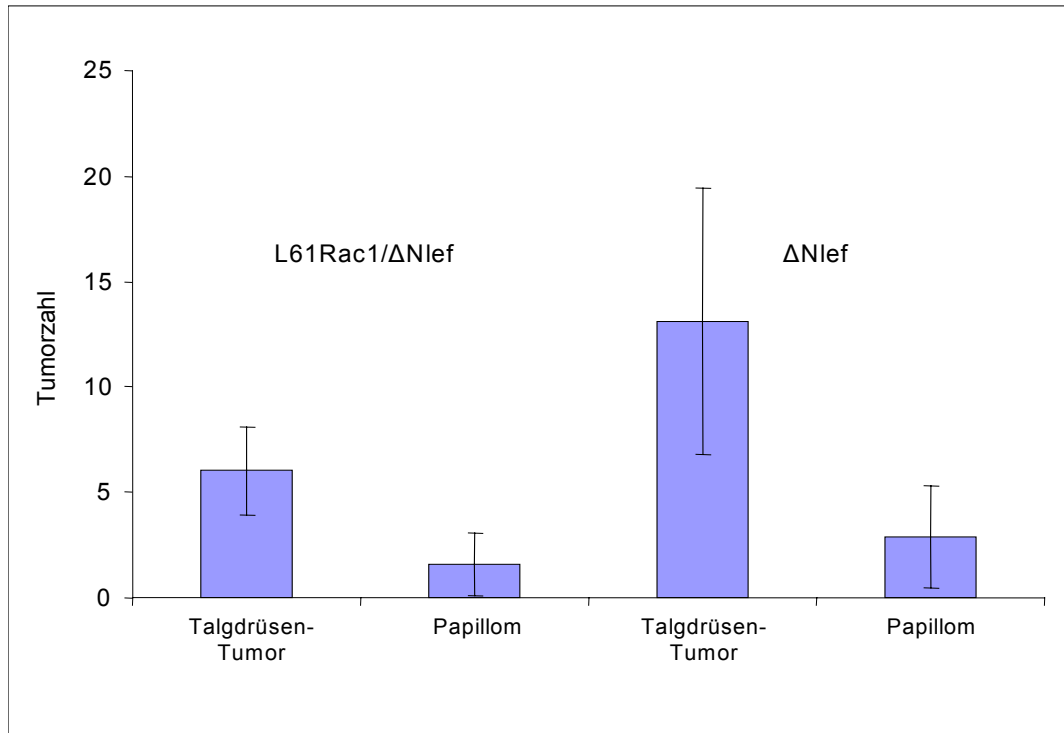


Abbildung 3.33: Ergebnisse der Tumorzahlen von $\Delta Nf1/L61Rac1$ und $\Delta Nf1$ transgenen Mäusen nach Anzahl der Talgdrüsentumore und der Papillome aufgeteilt

Von den 5 näher untersuchten $\Delta Nf1/L61Rac1$ Mäusen wiesen drei Tiere während der Tumoruntersuchung histologische Auffälligkeiten auf. Zwischen ein und drei Tumore dieser Tiere zeigten im HE-Schnitt (Abbildung 3.34, c) dicht gepackte Zellen, die kleiner waren als die differenzierten Talgdrüsenzellen der benignen Tumore (a) von $\Delta Nf1$ transgenen Tieren. Diese Zellen lagen wie die benignen Talgdrüsentumore in abgegrenzten Kompartimenten vor. Es wurde vermutet, dass die Zellen in diesen tumorartigen Strukturen wenig differenzierten Talgdrüsenzellen entsprechen. Zusätzlich wurden auf diesen Tieren normale benigne Talgdrüsentumore (a) und Papillome (b) gefunden. Die nähere Untersuchung der entnommenen Organe (Milz, Leber, Lymphknoten) dieser doppelt transgenen Tiere ergab keine Auffälligkeiten.

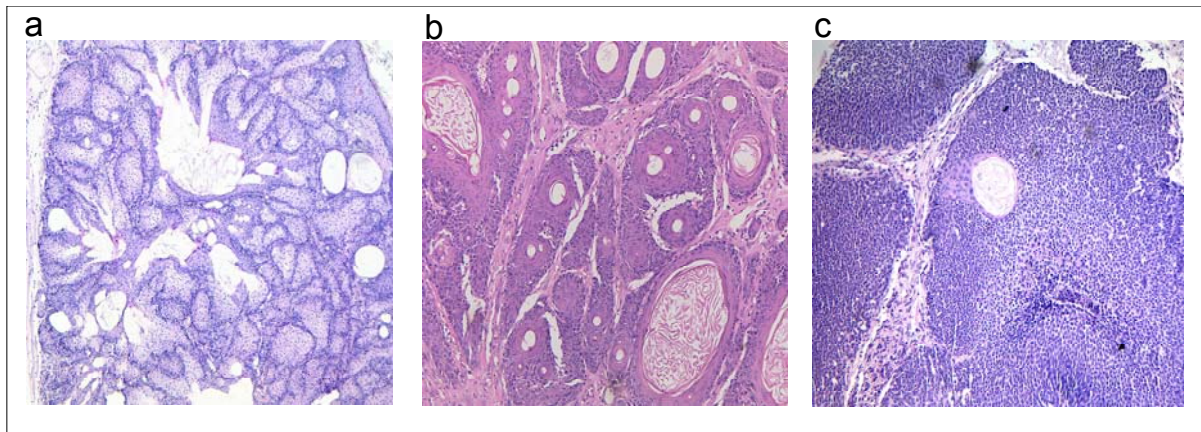


Abbildung 3.34: a-c: Übersicht der verschiedenen vorkommenden Tumorarten im HE-Schnitt in den doppelt transgenen Tieren, a: Talgdrüsenadenom, b: Papillom, c: wenig differenzierter Talgdrüsentumor; Vergrößerung: 10x

Von Teilen der Tumore wurden Proteinlysate extrahiert und im Western Blot auf die Expression beider Transgene (Δ Nlef/L61Rac1) untersucht. Da beide Konstrukte am N-Terminus einen Myc-Tag besitzen, konnten mit einem anti-Myc-Antikörper beide Transgene gleichzeitig detektiert werden. Δ Nlef konnte bei etwa 50 kDa und L61Rac1 bei ca. 23 kDa detektiert werden (Abbildung 3.35).

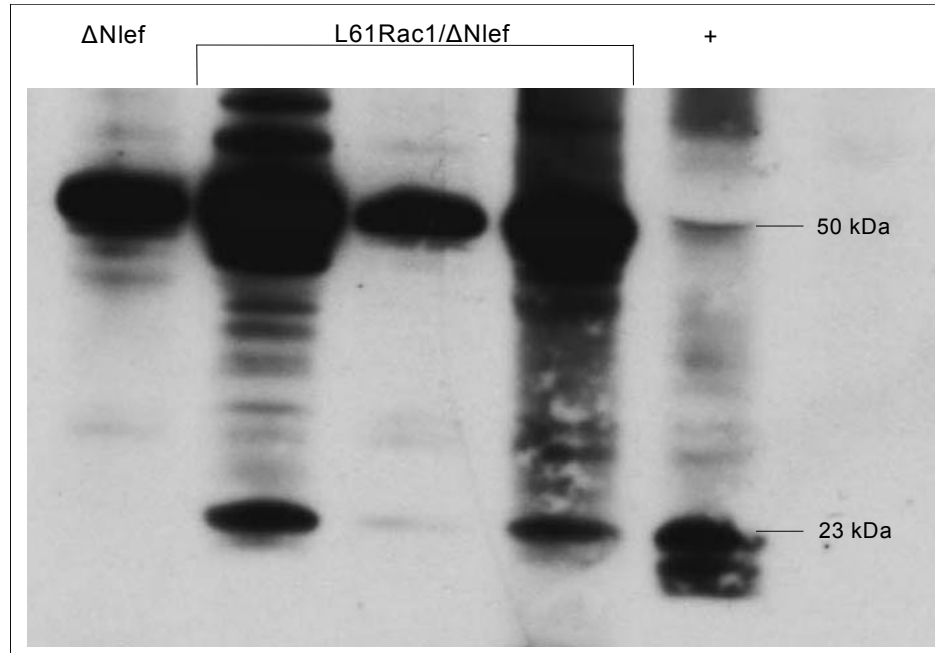


Abbildung 3.35: Nachweis der Expression von L61Rac1 und Δ Nlef in Tumorgewebe durch Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Myc-Tag (+: Positivkontrolle)

Bei allen untersuchten Tumoren wurde eine starke Keratin 14 Expression festgestellt (Abbildung 3.28 a, b), somit stammen diese Zellen von basalen Keratinozyten der Haarfollikel oder der Epidermis ab. Bei Untersuchungen der BrdU-Inkorporation in

die Zellkerne sich teilender Zellen zeigten die undifferenzierten Talgdrüsentumore etwa vergleichbare Zellzahlen wie die benignen Tumore. Die BrdU positiven Zellen lagen bei den auffälligen Tumoren eher im äußeren Bereich der Tumorlappen (Abbildung 3.36 d).

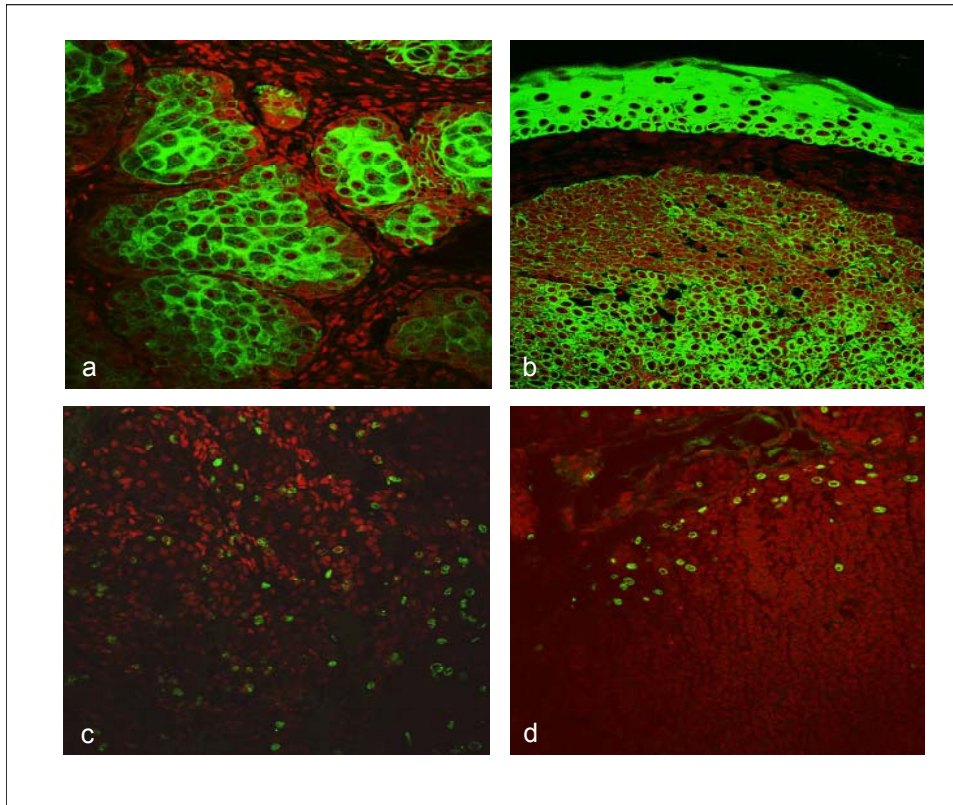


Abbildung 3.36: a, b: Nachweis von Keratin 14 durch Immunfluoreszenz in Maustumoren. a: benigner Talgdrüsentumor, b: undifferenzierter Talgdrüsentumor, c, d: Nachweis der BrdU-Inkorporation durch Immunfluoreszenz in Maustumoren, c: benigner Talgdrüsentumor, d: undifferenzierter Talgdrüsentumor; Vergrößerung: 200x

Eine weiterführende Untersuchung dieses Phänomens konnte wie in Kapitel 3.6 zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden. Es gibt aber auf Grund dieser ersten Ergebnisse Hinweise darauf, dass die zusätzliche Expression der konstitutiv aktiven Mutante von Rac1 (L61Rac1) in $\Delta Nf1$ transgenen Tieren in der Epidermis nicht zu einer Zunahme der Tumorbildung führt, dafür aber zu einer erhöhten Tendenz, Tumore mit vermehrt undifferenzierten Talgdrüsenzellen zu bilden.

4 Diskussion

4.1 Generierung und Charakterisierung der transgenen Mäuse

Ziel dieser Arbeit war es, eine tiefere Einsicht in die Rolle von Rac1 in den basalen Keratinozyten der Haut der Maus zu erhalten. Die basalen Zellen sind in der Lage, durch Proliferation und Migration die Integrität der Epidermis aufrecht zu halten und sind somit einer der wichtigsten Zelltypen in diesem Gewebe. Der von Sugihara et al. (1998) generierte komplette Knockout von Rac1 in der Maus führte zur embryonalen Letalität durch unvollständige Gastrulationsvorgänge am Tag 6,5. Untersuchungen an in Kultur genommenen primären Epiblasten, die aus Rac1 defizienten Embryos isoliert wurden, zeigten, dass Rac1 in der Bildung von Lamellipodien, der Zelladhäsion und der Zellmigration *in vivo* eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund von zusätzlichen *in vitro* Daten wurde Rac1 eine wichtige Rolle neben der Migration (Nobes und Hall, 1999; Ridley, 2001, Etienne-Manneville und Hall, 2002) auch in der Initiierung und Aufrechterhaltung von Zell-Zellkontakten in epithelialen Zellen zugeschrieben (Braga et al., 2000, Betson et al., 2002). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Hypothese entwickelt, dass eine gezielte Veränderung der Funktionalität von Rac1 in den basalen Keratinozyten eindeutige Veränderungen der gesamten Epidermis zur Folge haben sollte. Erwartet wurden insbesondere Veränderungen in den Schutzfunktionen der Haut. Durch Veränderungen der Bildung und Beibehaltung von Zell-Zellkontakten könnte die Barrierefunktion der Haut, die unter anderem den Stoffaustausch zwischen Organismus und Umwelt weitgehend kontrolliert, nicht mehr ausreichend funktionieren. Es könnten Mikroorganismen eindringen oder der Organismus würde austrocknen. Zusätzlich könnte durch ein verändertes Migrations- oder Proliferationsverhalten von Keratinozyten eine Störung in der kutanen Wundheilung und in der Entwicklung von Haarfollikeln hervorgerufen werden.

Um dies zu untersuchen, wurde hier in einem transgenen Ansatz unter der Kontrolle des Keratin14 Promotors jeweils die konstitutiv aktive Punktmutante L61Rac1 und die negativ dominante Punktmutante N17Rac1 in der basalen Zellschicht der Epidermis von Mäusen exprimiert. Diese beiden Punktmutanten von Rac1 konnten bereits in verschiedenen Zelltypen von Säugetieren zu der funktionalen Analyse von Rac1 beitragen (Ridley et al., 1992; Berrier et al., 2000; Patil et al., 2004).

Die erste Generation von transgenen Mäusen zeigte bei beiden Konstrukten keinen spontanen Phänotyp. Die histologische Untersuchung sowie die Untersuchung von epidermisspezifischen Markern durch Immunfluoreszenz in N17Rac1 positiven Mäusen zeigten ebenfalls keine Unterschiede zu Wildtypkontrollen.

Kompensation durch andere, in den basalen Keratinozyten exprimierte Proteine könnten einer der Gründe für das Ausbleiben eines spontanen Phänotyps sein. Eine vermehrte Aktivierung von Rac3 könnte hier gleichfalls eine Rolle spielen. Diese Isoform von Rac1 wird ubiquitär exprimiert, bevorzugt in neuralen Geweben (Haataja et al., 1997). Rac3 defiziente Mäuse zeigten aber ihrerseits keinen offensichtlichen Hautphänotyp (Cho et al., 2005; Corbetta et al., 2005). Rac2 wird in Keratinozyten nicht exprimiert, sondern ist ausschließlich auf das hämatopoetische System beschränkt (Didsbury et al., 1989; Shirsat et al., 1990). Ebenso ist bekannt, dass Cdc42 bei der Umordnung des Aktinzytoskelettes eng mit Rac1 interagiert. Rac1 und Cdc42 besitzen unter anderem auch das gleiche Bindungsmotiv (CRIB-Motiv) und können gleiche Effektoren aktivieren, wie zum Beispiel IQGAP1 (Fukata et al., 1997). Ein weiterer Grund für das Ausbleiben eines spontanen Phänotyps könnte durch die geringe Anzahl der integrierten Kopien des Transgens oder durch die Inaktivierung der integrierten Kopien hervorgerufen werden. Es wurde gezeigt, dass der hier verwandte Keratin 14 Promotor bereits in der Eizelle aktiviert werden kann (Hafner et al., 2004). Es ist daher möglich, dass Oozyten mit hoher Expression des Transgens durch starke Modulation der Rac1 Aktivität bereits in der Gebärmutter absterben. In diesem Falle würden nur Eizellen mit geringer Expression überleben.

Eine ebenso häufige Ursache für die Inaktivierung von Transgenen ist eine Methylierung im Promotorbereich des Gens (Matzke et al., 2000). Diese Inaktivierung wird durch die zufällige Integration von vielen Kopien eines Transgens noch gefördert (Herzt et al., 1999). Dies konnte in dieser Arbeit nicht als Grund für einen fehlenden spontanen Phänotyp herangezogen werden. Es konnte durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden, dass in primären Keratinozyten aus adulten wie neugeborenen transgenen Mäusen eine Expression von N17Rac1 stattfindet. Die Anzahl der exprimierenden Zelllinien stieg durch Verpaarung von transgenen Mäusen untereinander im Vergleich zu Rückkreuzungen mit Wildtypmäusen, an. Eine erhöhte Integration der Kopienzahl von N17Rac1 bedeutete in dieser Arbeit keine Bildung eines spontanen Phänotyps *in vivo*. Die durchgeführten Untersuchungen an in Kultur gehaltenen transgenen Zelllinien ergaben dagegen

Hinweise auf eine Korrelation zwischen Kopienzahl des Transgens und der Ausprägung von Zelldefekten.

Um dem möglichen Nachteil einer zu frühen Expression in der Eizelle entgegenzuwirken, könnten transgene Mäuse mit induzierbarer Expression eines Transgens angeregt werden, zum Beispiel durch das in Zellen erfolgreich angewandte Tetrazyklin on/off- System (Kwei et al., 2006).

In den zeitgleich zu dieser Arbeit generierten epidermisspezifischen Rac1 Knockout Mäusen konnte ein spontaner Phänotyp beobachtet werden. Der von Chrostek et al. (2005) generierte epidermisspezifische Knockout für Rac1 (Rac1^{E-KO}) wurde mit Hilfe des Cre/Lox-Systems unter Kontrolle von Cre-Keratin 5 hergestellt. Bei dieser Maus zeigte sich nach zwei Wochen beginnender Fellausfall. Nach spätestens zwei Monaten ist das Fell bis auf wenige Haare komplett ausgefallen. Im Gegensatz dazu zeigte die konditionale epidermisspezifische Knockoutmaus von Benitah et al. (2005) wenige Wochen nach Aktivierung von Cre-Keratin14 durch Tamoxifen eine frühzeitige Differenzierung der basalen Keratinozyten, welche zur Ablösung und im extremsten Fall zum Tod der Mäuse führte.

Im Vergleich zu diesen Knockout-Strategien wurde in dieser Arbeit gezielt die Etablierung von transgenen Mausmodellen durchgeführt. Die Expression von einer dominant negativen (N17Rac1) oder einer konstitutiv aktiven Mutante (L61Rac1) von Rac1 ermöglicht die Hemmung oder die Aktivierung von Signalwegen, an denen Rac1 beteiligt ist, ohne dass diese dabei zwangsläufig komplett unterbrochen werden. Die Benutzung von dominant negativen oder konstitutiv aktiven Mutanten von Proteinen zur Aufklärung von Signalwegen hat nicht nur Vorteile. Im Falle von Rac1 könnten solche Mutanten an viele verschiedene GEFs binden und so nicht nur zu einer Beeinträchtigung der GTP-Beladung von Rac-Isoformen führen, sondern auch von Cdc42 und anderen Rho Familienmitgliedern (Hiraoka et al., 1992; Schmidt und Hall, 2002; Guo et al., 2003).

Auch wenn das Ausbleiben eines spontanen Phänotyps eher überraschend war, lieferten aber die N17Rac1 transgenen Mäuse und ihre isolierten transgenen Zellen die Möglichkeit, die Auswirkungen einer Rac1 Inhibierung in der Wundheilungssituation zu analysieren. Die Knockoutmäuse für Rac1 (insbesondere der epidermal induzierbare Knockout für Rac1 von Benitah et al., (2005) sind für die Untersuchung der Wundheilung nicht so gut geeignet, da bereits vor der

Verwundung teilweise starke Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Populationen vorliegen.

4.2 Funktionen von Rac1 in der epithelialen Wundheilung in vivo

Sowohl die N17Rac1 transgenen Mäuse als auch die Rac1^{E-KO} Mäuse zeigten eine klare Verzögerung in der Reepithelialisierung während der kutanen Wundheilung. Eine potentielle Funktion von Rac1 in der Wundheilung konnte bereits durch Untersuchungen *in vitro* gezeigt werden (Nobes and Hall, 1999; Fenteany et al., 2000;). Zusätzlich konnte in *Drosophila melanogaster* festgestellt werden, dass Rac1 für den dorsalen Schluß während der Embryogenese benötigt wird (Harden et al., 1995; Woolner et al., 2005). Dies ist ein Prozess, welcher mit der Wundheilung in Säugetieren vergleichbar ist. Hierbei handelte es sich aber um Modelle, die die Komplexität der Wundheilung von Säugetieren *in vivo* nur stark vereinfacht widerspiegeln. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten dabei zum ersten Mal, dass epidermale Keratinozyten eine normale Rac1 Aktivität für eine effiziente Reepithelialisierung nach Verwundung in Mäusen benötigen.

Im Gegensatz zu den N17Rac1 transgenen Mäusen zeigten die Rac1^{E-KO} Mäuse eine progressive Haarfollikelzerstörung nach der Geburt. Die Bulge-Region der Haarfollikel wurde als der Ort der epidermalen Stammzellen (Costarelis et al., 1990; Tumber et al., 2000) identifiziert, die an der Repopulation der Epidermis nach der Verwundung beteiligt sind (Taylor et al., 2000). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Rac1^{E-KO} Mäusen auf Grund des Verlustes von Stammzellen in der Bulge-Region eine gestörte Reepithelialisierung in der Wundheilung ein sekundäres Phänomen ist. Ein direkter Effekt auf die Effizienz der Reepithelialisierung in der Wundheilung konnte aber durch die Tatsache gezeigt werden, dass N17Rac1 Mäuse, die keinen spontanen Phänotyp besitzen, einen klaren Defekt in der Reepithelialisierung zeigten.

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der Frage, ob die Hemmung von Rac1 in den basalen Keratinozyten die zellautonome Hemmung der Proliferation und der Migration zur Folge hat. Um dies zu beantworten, wurden in dieser Arbeit Experimente an isolierten N17Rac1 transgenen Keratinozyten durchgeführt.

4.2.1 Regulation der Keratinozytenproliferation durch Rac1

Die während der Wundheilung gesteigerte Proliferation epidermaler Keratinozyten wird durch Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α und KGF) ausgelöst und durch Matrix-Metalloproteinasen und Integrine gesteuert (Werner und Grose, 2003; Santoro und Gaudino, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass N17Rac1 transgene Keratinozyten an den Wundrändern und -zungen weniger stark proliferierten als Wildtypkontrollen. In Kultur gehaltene primäre transgene Keratinozyten zeigten nach Zugabe von Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-1) ebenfalls eine verringerte Proliferationsrate. In unverwundeter Haut von N17Rac1 transgenen Mäusen verursachte die Inhibition der Rac1 Aktivität keine phänotypischen Veränderungen. Dies lässt darauf schließen, dass zur Aufrechterhaltung der Homöostase von unverwundeter Epidermis nur sehr niedrige Level der Rac1 Aktivität benötigt werden. Nur in der Wundheilung wird der Effekt der Rac1 Inhibition auf die Keratinozytenproliferation sichtbar. Dabei könnte es zu einer Verzögerung des Beginns des Zellzyklusses oder zu einer verminderten Zahl von sich teilenden Zellen kommen.

Zusätzlich wiesen N17Rac1 transgene Keratinozyten Defekte bei der Adhäsion und dem Ausbreitungsverhalten auf einer Kollagen I-Matrix auf. Die Zellproliferation wird eng durch eine integrinvermittelte Adhäsion gesteuert. Der Verlust der Adhäsion führt normalerweise zu einer kompletten Arretierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklusses (Stoker et al., 1968). Eines der wichtigsten Integrine in der intakten und verwundeten Haut ist das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin. Dies ist in Keratinozyten der Bindungspartner für Kollagen I und kann Migration sowie Proliferation stimulieren (Emsley et al., 2000). Die Überprüfung der Expression der $\alpha 2$ -Integrinuntereinheit auf der Zelloberfläche zeigte nur in zwei von insgesamt sieben transgenen Zellpopulationen eine verringerte Expression. In Epidermisproben von N17Rac1 transgenen Mäusen wurden im Vergleich zu Wildtypmäusen keine Expressionsunterschiede festgestellt. Somit schien eine Veränderung in der Expression der $\alpha 2$ -Integrinuntereinheit nicht der Grund für eine verringerte Proliferation zu sein.

Ein weiterer Signalweg, der hier eine Rolle spielen könnte, ist der JAK/STAT- Weg. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 eine wichtige Rolle in der Kontrolle von essentiellen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel Differenzierung und Proliferation spielt (Levy und Darnell, 2002). *In vitro* Daten zeigten, dass

aktiviertes Rac1 direkt mit STAT3 interagieren kann. Dies wiederum führte zu einer STAT3 Aktivierung (Simon et al., 2000). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rac1 über autokrine Induktion von IL-6 indirekt STAT3 aktivieren kann (Faruki et al., 2001). Da in den untersuchten Wundrändern der Rac1^{E-KO} Mäuse eine den Kontrollwunden vergleichbare STAT3-Aktivierung gezeigt werden konnte, kann dieser Signalweg nicht für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein.

Auch die Aktivierung des MAPK Signalweges über ERK führt in Keratinozyten zu einer verstärkten Proliferation *in vitro* and *in vivo*. Eine erhöhte Aktivität von ERK konnte darüber hinaus in Proben von hyperproliferativen Hautkrankheiten gezeigt werden (Haase et al., 2001; Hobbs et al. 2004). Ebenso wie bei STAT3 konnte auch hier kein Unterschied in der Aktivierung von pERK zwischen transgenen und Kontrollmäusen festgestellt werden. Bei der Untersuchung von Keratinozyten aus dem Tiam1 Knockout, dem wichtigsten GEF für Rac1, konnte weder bei pERK noch bei STAT3 ein Unterschied in der Aktivierung festgestellt werden (Hamelers et al., 2005). Dies bestätigt die Ergebnisse dieser Arbeit, dass beide Signalwege nicht für die verringerte Proliferation von entscheidender Bedeutung sind.

Als Alternative zu den oben genannten Signalwegen konnten Olson et al. (1995) zeigen, dass es durch Mikroinjektion von N17Rac1-Proteinen in Fibroblasten zu einer ERK- unabhängigen Blockierung des Zellzyklusses durch die Blockierung der Cyclin D-Synthese kommt (Joyce et al., 1999). In Mausfibroblasten, in denen Rac1 deletiert wurde, konnte ebenso eine reduzierte Proliferation aufgrund der G1-Blockierung im Zellzyklusses festgestellt werden (Vidali et al., 2006). Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen und der Ergebnisse unserer Versuche zeigte sich bei murinen Makrophagen mit einer Deletion von Rac1 kein Defekt in der Proliferation (Wells et al., 2004). Denkbar ist, dass Rac2 diese Funktion übernimmt.

Dies zeigt, dass in verschiedenen Zelltypen Rac1 auch über unterschiedliche Signalwege die Proliferation beeinflussen könnte. Welcher Signalweg für Keratinozyten über Rac1 die Proliferation in der Wundheilung beeinflusst, muss in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

4.2.2 Die Rolle von Rac1 in der Migration

Um die möglichen Ursachen der verzögerten Reepithelialisierung in den Wunden von N17Rac1 und Rac1^{E-KO} Mäusen weiter beschreiben zu können, wurden die Vorgänge der Migration in isolierten N17Rac1 transgenen Keratinozyten in Zellverbänden und an einzelnen Keratinozyten untersucht. Für diese Versuche wurden die Substrate Kollagen I und Fibronectin verwendet, die in epidermalen Wunden reichlich vorhanden sind (O'Toole, 2001).

Die Zellmigration ist essentiell bei inflammatorischen Krankheiten, bei der tumorogenen Zellinvasion und für die Funktion des Immunsystems, aber sie spielt auch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, und der Gewebereparatur (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003; Raftopoulou und Hall, 2004). Die Migration ist das Ergebnis eines sich zyklisch wiederholendes Vorganges aus Zytoskelett-vermittelter Protrusion und Polarisation, Bildung von adhäsiven Kontakten, Zellkontraktion und Retraktion am hinteren Ende der Zelle (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Initiiert wird dieser Prozess hauptsächlich durch Bestandteile der extrazellulären Matrix und durch Wachstumsfaktoren (Schwartz et al., 1995; Eliceiri, 2001).

Mit den in dieser Arbeit vorgenommenen artifiziellen Wundheilungsversuchen an isolierten N17Rac1 transgenen Keratinozyten, konnte eine verzögerte Reepithelialisierung im Vergleich zu Wildtypzellen festgestellt werden. Dabei konnte durch die vorangegangene Behandlung der Zellen mit Mitomycin C ausgeschlossen werden, dass die Lücke durch Proliferation der Keratinozyten geschlossen werden konnte, was somit nur durch Migration erfolgt. Dieser Effekt konnte auf Kollagen I nicht aber auf Fibronectin als Matrixbestandteil gezeigt werden. Die gestörte Reepithelialisierung bei den isolierten N17Rac1 transgenen Keratinozyten ermöglicht somit eine höhere Übertragbarkeit der *in vitro* auf die *in vivo* Situation in der Wundheilung und zeigt zusätzlich zur verringerten Proliferation den Einfluss der Migration auf den Defekt in der Reepithelialisierung.

Durch Experimente mit dominant negativen Mutanten von Rac1 in Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, dass Rac1 verantwortlich für die Bildung von Lamellipodien und Ruffles ist, ohne die keine Migration stattfinden kann (Ridley et al., 1992). Die Aktivität von Rac1 ist auch essentiell für die *in vitro* Wundheilung von einschichtigen Zellverbänden (Nobes and Hall, 1999, Fenteany et al., 2000; Vidali et al., 2006). In diesen Versuchen wurde N17Rac1 transient exprimiert oder Rac1

komplett deletiert. In den Experimenten dieser Arbeit wurde dagegen N17Rac1 stabil in das Genom der Zellen integriert. Die Ergebnisse bestätigen die oben genannten gesammelten Daten über die Wundheilung *in vitro*.

Die Voraussetzungen für die Migration von Zellen sind die räumlich und zeitlich getrennten Vorgänge der Adhäsion, der Ausbildung von Membranprotrusionen, der Zellkontraktion und der Ablösung vom Untergrund (Li et al., 2004). Die meisten Zelltypen reagieren auf Oberflächen, die mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet sind, mit Adhäsion und einer Ausbreitung des Zellkörpers bis hin zu einer abgeflachten Morphologie. Diese Vorgänge werden durch Integrin-vermittelte komplexe dynamische Veränderungen des Aktinzytoskelettes gesteuert (Price et al., 1998).

Die Adhäsion von N17Rac1 transgenen Keratinozyten auf Kollagen I erfolgte durchweg weniger effizient im Vergleich zu den Kontrollen. Zusätzlich zeigten N17Rac1 Keratinozyten ein reduziertes Ausbreitungsverhalten auf Kollagen I.

In früheren Studien mit Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Rac1 zusammen mit der Rho GTPase Cdc42 das Ausbreiten von Zellen regulieren kann. Integrinvermittelte Zelladhäsion von Mausfibroblasten auf Fibronectin löste die Aktivierung von Rac1 aus (Del Pozo et al., 2000). Die Expression von N17Rac1 und N17Cdc42 inhibierte die Zellausbreitung (Clark et al., 1998; Price et al., 1998; Van Leeuwen et al., 1999). In Fibroblasten mit einer Rac1 Deletion konnte ebenso ein abgeschwächtes, aber nicht vollständig aufgehobenes Ausbreitungsverhalten auf einer Fibronectinmatrix festgestellt werden (Vidali et al., 2006). In unseren Untersuchungen sah man dagegen Rac1 abhängige Veränderungen auf Kollagen I. Somit scheint Rac1 in murinen Keratinozyten einen stärkeren Einfluss auf Kollagen I vermittelte Zelladhäsion und Ausbreitung zu haben als dies in Fibroblasten der Fall zu sein scheint.

Um festzustellen, wie sich der Einfluss von N17Rac1 auf die Migration einzelner Keratinozyten auswirkte, wurden Keratinozyten mittels „Time Lapse“ Video-Mikroskopie analysiert. Dabei zeigte sich bei den N17Rac1 transgenen Keratinozyten während der Migration eine Reduktion in der zurückgelegten Distanz und der Geschwindigkeit. Dieser Effekt war deutlicher bei der Migration auf Kollagen I als auf Fibronectin zu sehen. Die Adhäsion und das Ausbreitungsverhalten von Zellen sind Funktionen, die die Effizienz der Zellmigration beeinflussen können. Somit existierte die Hypothese, dass die Migration der N17Rac1 transgenen Zellen insgesamt gestört

ist. Dies bestätigt die Migrationsergebnisse von Untersuchungen in Säugetierzelllinien, die durch Transfektion und Expression von dominant negativem Rac1 eine geringere Migration aufwiesen als Wildtypzellen (Walmod et al., 2004).

Da die einzelnen Phasen der Migration stark Integrin-abhängig sind, könnte N17Rac1 einen Defekt in den Signalwegen der Zell-Matrixinteraktion hervorrufen. Ebenso wie in der Proliferation (vergleiche Kapitel 4.2.1) spielt dabei das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, der Bindungspartner an Kollagen I in Keratinozyten, eine wichtige Rolle in der Migration (Emsley et al., 2000). Zhang et al. (2006) konnten zeigen, dass Keratinozyten ausschließlich über das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin an Kollagen I adhären und in diesem Falle auch keinen alternativen Mechanismus bei einer $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Defizienz nutzen können. Eine Funktion von Rac1 in diesem Zusammenhang konnte in der epithelialen Mauszelllinie NmuMG gezeigt werden. Durch Mutation der zytoplasmatischen Domäne der $\alpha 2$ -Untereinheit wurde EGF stimulierte sowie unstimulierte Migration inhibiert. Dieser MAPK-abhängige Vorgang konnte durch die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 wieder hergestellt werden (Paul et al., 2000). Somit lässt sich im Umkehrschluss vermuten, dass die Expression einer dominant negativen Mutante von Rac1 auch Auswirkungen auf die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelte Migration haben könnte. Unsere Ergebnisse über die Expression der $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten in N17Rac1 transgenen Keratinozyten sowie in N17Rac1 transgener Epidermis zeigten dabei keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen. Weiterführende Untersuchungen an den hier generierten N17Rac1 transgenen Keratinozyten, zeigten mit Hilfe einer Methode zur stroboskopischen Analyse der Zelldynamik (SACED) bei den N17Rac1 transgenen murinen Keratinozyten eine Störung in der Bildung von Lamellipodien. Dabei erhöhte sich die Frequenz der Ruffle Bildung. Diese Vorgänge ließen den Schluss zu, dass initiale Membranausstülpungen sich wieder zurückzogen, bevor sich ein komplettes Lamellipodium bilden konnte.

Zusätzlich zeigten Ergebnisse dieser Arbeit, dass in N17Rac1 transgenen Zellen mittels Vinculinfärbung weniger Fokalkontakte detektiert wurden. Somit schienen die N17Rac1 Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen nur zu einem Teil in der Lage zu sein, Fokalkontakte zu bilden, um sich entwickelnde Lamellipodien stabilisieren zu können. Rac1 kann über die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes auf Vinculin Einfluss nehmen (Kris et al., 2001). Eine Inhibierung der Bindung zwischen Arp2/3 Komplex und Vinculin führte dabei nur zu leichten Veränderungen im Ausbreitungsverhalten und

der Migration. Die Expression von N17Rac1 könnte einen ähnlichen Einfluss auf diesen Signalweg ausüben, da hier ebenfalls eine Reduktion in der Ausbreitung und in der Migration der Zellen festgestellt werden konnte. Es lässt sich vermuten, dass der primäre Defekt der N17Rac1 transgenen murinen Keratinozyten nicht bei der Steuerung des Aktinfilamentnetzwerkes liegt, da Lamellipodien und Ruffles gebildet werden, sondern in der verringerten Bildung von stabilen Lamellipodien durch feste Zell-Matrixkontakte.

Letztendlich lässt sich feststellen, dass die Veränderungen der murinen Keratinozyten durch die stabile Expression von N17Rac1 die Ergebnisse anderer Arbeiten in anderen Zelltypen größtenteils bestätigen. In Fibroblasten zum Beispiel löste die Expression von dominant negativen Mutanten von Rac1 ebenfalls eine Abnahme in der Bildung von Lamellipodien und Ruffles, in der Proliferation, Adhäsion, Ausbreitung und in der Migration aus (Ridley et al., 1992; Westwick et al., 1997; Berrier et al., 2000; Fenteany et al., 2000). In anderen Zelltypen wie zum Beispiel in Makrophagen, führte eine vollständige Deletion des Rac1 Gens weder zu einer Veränderung in der Migration noch bei der Proliferation (Wells et al., 2004). Dies bestätigt, dass in unterschiedlichen Zelltypen Rac1 an unterschiedlichen Signalwegen beteiligt ist. Als Unterschied lässt sich feststellen, dass die N17Rac1 murinen Keratinozyten diesen Phänotyp auf Kollagen I zeigen und nicht wie die Fibroblasten primär auf Fibronectin. In Keratinozyten scheint somit der Zell-Kollagen I Kontakt einen größeren Einfluss auf eine normale Zellfunktion zu haben als der Kontakt zu Fibronectin. Quantitative Unterschiede in der Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins scheinen hierbei für die reduzierte Proliferation und Migration keine durchgehende Rolle zu spielen.

Die beobachteten Veränderungen von isolierten N17Rac1 transgenen Zellen in der Proliferation und der Migration im Vergleich zu Kontrollzellen könnten auch Hinweise auf die Gründe der gestörten Reepithelialisierung in N17Rac1 transgenen Mäusen *in vivo* liefern. Für eine normale Wundheilung in der Epidermis sind Migrations- wie Proliferationsvorgänge notwendig. 24 Stunden nach der Verwundung beginnen die sich am Wundrand befindlichen Keratinozyten zu migrieren. Begleitend zu den Migrationsvorgängen beginnen die Keratinozyten des Wundrandes hinter den aktiv migrierenden Zellen zu proliferieren. Das daraus entstehende dichte hyperproliferative Epithelium versorgt die migrierenden Keratinozyten am Wundrand

(Singer und Clark, 1999). Migrierende Keratinozyten benutzen eine provisorische Matrix im Wundbett, die reich an Fibrin, Fibronektin, Vitronektin, Laminin 5 und dermalen Kollagenen ist. Für die Bindung an diese Matrix müssen verschiedene Integrine von den Zellen exprimiert werden. Eines der häufigsten Bestandteile dieser Matrix ist das Kollagen I (O'Toole, 2001). Die Bindung an Kollagen I findet bei Keratinozyten in Fokalkontakten durch die Expression von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin statt. Diese Bindung könnte bei den N17Rac1 transgenen Keratinozyten in der Wunde gestört sein und somit die veränderte Proliferation und Migration hervorrufen, die für die reduzierte Reepithelialisierung in der Wunde verantwortlich zu sein scheinen. Die initialen Vorgänge für Migration und Proliferation sind hierbei die erfolgreiche Adhäsion und Ausbreitung der Keratinozyten sowie die Stabilisierung dieser Strukturen durch feste Zell-Matrixkontakte. Tschardt et al. (2005) konnten durch die morphologische Analyse einer sich schließenden Wunde, bei der abgeflachte und ausgebreitete Zellen zwei Tage nach Verwundung zu beobachten waren, zeigen, dass in der Wundheilung die Ausbreitung von Keratinozyten zu einem frühen Zeitpunkt stattfindet. Die Effizienz der Wundheilung könnte durch diese Vorgänge bestimmt werden und die Verzögerung in der Reepithelialisierung hervorrufen.

4.3 Funktion von Rac1 in der Tumorentwicklung und -differenzierung

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Rac1 zusammen mit RhoA eine tumorigene Transformation von NIH 3T3 Fibroblasten auslösen kann (Khosravi-Far et al., 1995). Eine konstitutive Aktivierung von Rac1 in Lymphozyten führte zu einem invasiven Phänotyp mit möglichem Potential der Metastasierung (Michiels et al., 1995). Rac1 scheint somit eine wichtige Rolle in verschiedenen Aspekten der Tumorigenese zu spielen.

4.3.1 Die Expression von N17Rac1 in der Epidermis von HPV8 transgenen Mäusen führt zur Reduktion der Tumorentwicklung

Ziel der Verpaarung der N17Rac1 transgenen Mäuse (C57Bl/6 Hintergrund) mit HPV8 transgenen Mäusen (FVB/N Hintergrund) war es, festzustellen, ob die Expression einer dominant negativen Mutante von Rac1 in der Epidermis einen Einfluss auf die tumorigenen Eigenschaften des transgenen HPV8-Genom hatte. Die HPV8 transgenen Mäuse bilden spontan über einen Zeitraum von bis zu 60

Wochen Papillome in der Haut. Daraufhin sollten ursprünglich doppelt transgene Mäuse gezüchtet werden, die ohne Zuhilfenahme von externen Stimuli Hautveränderungen bilden sollten. Es zeigte sich jedoch über einen Beobachtungszeitraum von mehr als 60 Wochen, dass weder bei den HPV8 transgenen Mäusen noch bei den HPV8/N17Rac1 doppel-transgenen Mäusen Hautveränderungen auftraten. Ein möglicher Grund hierfür konnte der gemischte Hintergrund aus C57Bl/6 und FVB/N- Mäusen sein, da bei HPV8 transgenen Mäusen im reinen C57Bl/6 Hintergrund keine Hautveränderungen zu beobachten waren. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit ultravioletten Licht eines definierten Hautareals auf dem Rücken der HPV8 transgenen Mäuse in 2-3 Wochen zu Hyperproliferation und Tumorentwicklung führte. Aus diesem Grund wurden die einfach und doppelt transgenen Mäuse mit einer definierten Dosis von UVA/UVB Strahlen behandelt. Die Ergebnisse der Bestrahlung der HPV8/N17Rac1 transgenen Mäuse zeigten, im Gegensatz zu den HPV8 positiven Tieren, eine drastische Verringerung der Hyperproliferation und Papillombildung. Die zusätzliche Expression einer dominant negativen Variante von Rac1 (N17Rac1) schien somit die durch HPV8 induzierte Hyperproliferation der Epidermis stark zu reduzieren.

Eine Bestrahlung der Epidermis kann DNA-Schäden in den Keratinozyten induzieren, die zu Transformationen der Zellen führen (Gilchrest, 2003). Zusätzlich wirken die UVA/UVB-Strahlen immunsuppressiv. Die Strahlung kann die in der Haut vorkommenden Langerhanszellen schädigen, die dort als erste Verteidigungslinie des Immunsystems gelten. Dies kann zu einer Änderung der Zellzahl sowie der Morphologie dieser Immunzellen führen (Aberer et al., 1981). Diese Änderungen verhindern somit, dass die Langerhanszellen effektiv in die angrenzenden Lymphknoten einwandern können, um weitere Immunantworten auszulösen (Wang et al., 2003). Zusätzlich sezernieren UV-bestrahlte Keratinozyten und Mastzellen IL-10 und TNF α , die die Bildung von ROS (Reactive Oxygen Species) begünstigen und immunsuppressiv wirken können (Cacerse-Dittmar et al., 1995). Diese Substanzen stören zusätzlich die Migration und die Antigenpräsentation von Langerhanszellen (Rivas et al., 1994). Damit kann verhindert werden, dass das Immunsystem Tumorwachstum erkennt (Yuen et al., 2002). Ohne eine Bestrahlung bilden sich auf den HPV8 positiven Mäusen, die konstitutiv das HPV8-Genom exprimieren, spontan papillomäre Hautveränderungen. Die hohe UVA/UVB-Dosis beschleunigt bei allen HPV8 positiven Tieren die Bildung von Tumoren. Es wäre möglich, dass dieser

Beschleunigung eine Störung des Immunsystems auf dem bestrahlten Hautareal zu Grund liegt. Trotz konstitutiver Expression des HPV8-Genoms in einer nicht bestrahlten Maus kämpft das Immunsystem der Haut eine zeitlang erfolgreich gegen die proliferativen Eigenschaften des Transgens an, bis es überrollt wird. Die zeitgleiche Expression von N17Rac1 verhindert eine starke Proliferation trotz Bestrahlung. Die Überprüfung der BrdU Inkorporation in den Zellkernen der Keratinozyten zeigte auch in den 4-5 Lagen der Epidermis der doppelt transgenen Mäuse keinen Anstieg in der Proliferationsrate. In welchen Signalwegen Rac1 hierbei eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen, die auf Grund zu kurzer Zeit in dieser Arbeit nicht mehr angestellt werden konnten. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass Rac1 *in vitro* die Expression verschiedener Interleukine beeinflusst und damit auch die Bildung von „ROS“ (Reactive oxygen species). Es konnte zum Beispiel in NIH3T3 Fibroblasten, die transient mit konstitutiv aktiven Formen von Rac1 transfiziert worden waren, nach Stimulation mit EGF oder IL-1 ein Anstieg von intrazellularen ROS gezeigt werden. Die Expression von dominant negativen Formen von Rac1 dagegen hatte nach Stimulation den entgegengesetzten Effekt (Sundaresan et al., 1996). Ebenso konnte in arteriellen glatten Muskelzellen gezeigt werden, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Rac1, V12Rac1, zu einer starken Anreicherung von ROS und einer gesteigerten Zellproliferation führen kann. Die Expression von N17Rac1 dagegen führte zu einer verminderten ROS Bildung und Proliferation und zu einer Zellzyklussarretierung in der G₂/M Phase (Patil et al., 2004). Somit könnte *in vivo* die Expression von N17Rac1 in der Epidermis einen Anstieg von ROS in dem Beobachtungszeitraum von zwei Monaten nach der Bestrahlung verhindern und dadurch die durch die Expression der HPV8 Gene hervorgerufene Hyperproliferation der basalen Keratinozyten blockieren oder mindestens hinauszögern.

Die Bildung von ROS spielt auch in der Wundheilung eine Rolle. In der Endzündungsphase sezernieren Makrophagen und Neutrophile ROS als Schutz gegen mikrobielle Infektionen (Wientjes und Segal, 1995). Große Mengen von ROS können dagegen zur Zelltransformation in der Wunde führen (Cerutti und Trump,

1991). Es wäre vorstellbar, dass die Expression von N17Rac1 in einer Wundsituation ebenfalls zu einer niedrigeren ROS Bildung und damit zu der beobachteten reduzierten Proliferation führen kann. Diese Theorie müsste durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden.

4.3.2 Expression von L61Rac1 in der Epidermis von Δ Nlef transgenen

Mäusen führt zu einer Entdifferenzierung von Talgdrüsentumoren

Um feststellen zu können, welchen Einfluss die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Rac1 auf den Phänotyp von Δ Nlef transgenen Mäusen in der Epidermis hat, wurden L61Rac1/ Δ Nlef doppelt transgene Mäuse gezüchtet. Die Δ Nlef transgenen Mäuse exprimieren in den basalen Keratinozyten ein N-terminal deletiertes Lef1-Protein, welches somit keine Bindungsstelle für β -Catenin besitzt. Lef1 ist ein Transkriptionsfaktor der TCF/Lef Familie und ist Teil des Wnt Signalweges, welcher die Morphogenese und Proliferation von Zellen modulieren kann (Behrens et al., 1996). Die Aktivierung des Wnt Signalweges wurde schon länger mit Tumorigenese in Verbindung gebracht (Roose und Clevers, 1999; Taipale und Beachy, 2001). Niemann et al. (2002) konnten zeigen, dass Δ Nlef dominant negativ auf den β -Cateninsignalweg wirkt. Dabei verlieren 6 Wochen alte Δ Nlef transgenen Mäuse ihr Fell und bilden aus Keratinozyten der unteren Haarfollikelregion dermale Zysten. Diese exprimieren morphologische und molekulare Marker der interfollikulären Epidermis. Keratinozyten adulter Δ Nlef transgener Mäuse aus den oberen Regionen der Haarfollikel bilden spontan benigne Hauttumore mit Talgdrüsendifferenzierung.

Zur Beschleunigung des Tumorwachstums wurden doppelt und einfach transgene Tiere für L61Rac1 und Δ Nlef mit dem Tumorinduktor DMBA behandelt. Die L61Rac1/ Δ Nlef transgenen Mäuse bildeten dabei eine geringere Anzahl von Tumoren als die Δ Nlef transgenen Mäuse. Die gebildeten Talgdrüsentumore von L61Rac1/ Δ Nlef transgenen Mäuse zeigten histologische Unterschiede zu den Tumoren aus Δ Nlef transgenen Tieren. Die Zellen schienen aus kleinen, nicht differenzierten Talgdrüsenzellen zu bestehen. Somit lässt sich vermuten, dass die zusätzliche Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Rac1 keine weitere Steigerung in der Proliferationsrate von Δ Nlef Mäusen zur Folge hat. Sie hemmt aber anscheinend die Differenzierung der Talgdrüsenzellen. Bei diesen Tumoren kann man aber noch nicht von Talgdrüsenkarzinomen sprechen, da zum Beispiel weder

atypische Zellkernveränderungen noch eine verstärkte Proliferation mit einer Infiltration in umliegende Gewebeteile festgestellt werden konnten. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, spielt Rac1 eine Rolle in der Regulierung des Zellzyklusses und der Proliferation (Westwick et al., 1997; Joyce et al., 1999) aber auch der Transformation (Qui et al., 1995; Zohn et al., 1998). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Rac1 eine Rolle im Wnt Signalweg besitzt. Die Expression von N17Rac1 in Colon-Krebszellen führte zu einer deutlichen Inhibierung des Wnt Signalweges. Die Expression von konstitutiv aktivem V12Rac1 dagegen führte zu einer deutlichen Aktivierung (Ezufali und Bapat, 2004). In einem anderen Beispiel konnte gezeigt werden, dass Rac mit Rho zusammen durch den Wnt Signalweg aktiviert wird und in der Gastrulation von Wirbeltieren eine wichtige Rolle spielen (Habas et al., 2003). In einer weiteren Versuchsreihe mit einer größeren Anzahl von Versuchstieren als in dieser Arbeit soll die Rolle von Rac1 im Wnt Signalweg bezüglich der Tumorigenese weitergehend untersucht werden. Dabei muss die Funktion des Tumorinduktors DMBA, welcher Mutationen in der kleinen GTPase Ras auslöst und damit zu Zelltransformation beiträgt (Pozzatti et al., 1986; Webb et al., 1998), näher mit einbezogen werden.

5 Zusammenfassung – Abstract

5.1 Zusammenfassung

Eine funktionierende Wundheilung ist die Voraussetzung für eine normale Funktion der Haut. In *Drosophila melanogaster* wird die kleine GTPase Rac1 für den dorsalen Schluß während der Embryogenese benötigt. Dies ist ein Prozess, welcher der Wundheilung in Säugetieren sehr ähnelt. Es ist bekannt, dass Rac1 ein Regulator für wichtige Funktionen des Zytoskelettes ist und somit Einfluss auf Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -transformation besitzt. In muriner Epidermis verursacht die induzierbare Deletion von Rac1 möglicherweise einen Verlust der epidermalen Stammzellen.

Um die Funktionen von Rac1 in Keratinozyten der basalen epidermalen Schichten und in der äußeren epithelialen Wurzelscheide der Haarfollikel aufzuklären, wurden transgene Mäuse generiert, die entweder eine dominant negative Mutante von Rac1, N17Rac1 oder eine konstitutiv aktive Mutante L61Rac1 unter der Kontrolle des Keratin 14 Promotors exprimierten. Bei diesen Mäusen konnte für beide Konstrukte kein spontaner Phänotyp beobachtet werden. Die N17Rac1 transgenen Mäuse zeigten jedoch in Wundheilungsexperimenten eine verzögerte Reepithelialisierung. Untersuchungen der hier zu Grunde liegenden Mechanismen offenbarten, dass *in vivo* die Proliferation von Keratinozyten am Wundrand und die zentripetale Migration der neugebildeten Epidermis beeinträchtigt sind. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Mäusen mit einer epidermisspezifischen Deletion von Rac1 produziert.

Primäre epidermale Keratinozyten, die N17Rac1 exprimierten, proliferierten weniger als Kontrollzellen und zeigten eine reduzierte Adhäsion und Ausbreitung auf Kollagen Typ I aber nicht auf Fibronectin. Ebenso zeigten die Untersuchungen einzelner N17Rac1 transgener Keratinozyten, dass diese auf Kollagen Typ I und nicht auf Fibronectin bei der willkürlichen Migration und der Fähigkeit, artifizielle Wunden zu schließen, stärkere Beeinträchtigungen im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen. Erste Hinweise lassen vermuten, dass die Bildung fokaler Kontakte in primären murinen Keratinozyten bei der Inhibition von Rac1 gestört ist.

Um einen Einblick in eine mögliche Rolle von Rac1 bei der Tumorbildung zu bekommen, wurden die beiden Rac1 Mutanten jeweils in verschiedene epidermale Tumor-Mausmodelle eingekreuzt. Die Kreuzung der N17Rac1 transgenen Mäuse mit transgenen Mäusen, die epidermal HPV8 exprimierten, zeigten nach Behandlung mit

UVA/UVB- Strahlen eine deutliche Reduktion in der Entwicklung von HPV8 induzierten Papillomen. Die Kreuzung von RacL61 transgenen Mäusen mit der Δ Nlrf transgenen Maus zeigte bei den doppelt transgenen Tieren nach Behandlung mit dem Mutagen DMBA eine Entdifferenzierung der entstehenden Tumore.

Wir schließen aus den Ergebnissen, dass Rac1 für die normale epidermale Wundheilung benötigt wird und in diesem Zusammenhang die Proliferation und die Migration der Keratinozyten regulieren kann. Unsere Ergebnisse lassen weiterhin die Vermutung zu, dass Rac1 die Rolle eines Onkogens bei der Entstehung epidermaler Tumore spielen kann.

5.2 Abstract

Efficient epidermal wound repair is a prerequisite for normal skin Funktion. In *Drosophila melanogaster* the small GTPase Rac1 is known to be required for dorsal closure, a process that resembles epidermal wound healing in mammals. Rac1 has been known as a regulator of cytoskeletal functions that determine cell adhesion, migration and proliferation and transformation. In murine epidermis, inducible deletion of Rac1 results in depletion of the epidermal stem cell pool. In order to address functions of Rac1 in keratinocytes of the basal epidermal layer and in the outer root sheath of hair follicles, we generated transgenic mice expressing a dominant inhibitory mutant of Rac, N17Rac1 and a constitutively active mutant, L61Rac1, under the control of the keratin 14 promoter. These mice do not exhibit an overt skin phenotype but the N17Rac1 transgenic mice show protracted skin wound re-epithelialization. Investigation into the underlying mechanisms of N17Rac1 transgenic mice revealed that *in vivo* both proliferation of wound edge keratinocytes and centripetal migration of the neo-epidermis were impaired. Similar results were obtained in mice with epidermis specific deletion of Rac1. Primary epidermal keratinocytes that expressed the N17Rac1 transgene were less proliferative than control cells and showed reduced adhesion and spreading on collagen I but not on fibronectin. Likewise, random migration of single N17Rac1 transgenic keratinocytes and closure of scratch wounds in N17Rac1 expressing keratinocyte monolayers showed a greater impairment on collagen I than on fibronectin in comparison to the respective controls. The function of vinculin containing focal adhesion complexes was impaired in N17Rac1 transgenic keratinocytes.

To gain further insight into the role of Rac1 in skin tumor development we crossed the Rac1 mutants to mouse models of epidermal tumorigenesis.

Crossbreeding of N17Rac1 transgenic mice with HPV8 expressing transgenic mice showed a reduction in tumor growth after UVB/UVA light treatment compared to HPV8 transgenic control mice. Additionally, crossbreeding of the L61Rac1 transgenic mice with transgenic mice for Δ Nlef showed less tumor growth but impaired tumor differentiation in the presence of L61Rac1.

We conclude that Rac1 is functionally required for normal epidermal wound healing and in this context exerts a dual function, namely the regulation of keratinocyte proliferation and migration. Rac1 also seems to play a role in the regulation of epidermal tumor development *in vivo*.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADSBRA	Antibody Diluent Solution Background Reducing Agent
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BrdU	5-Bromo -2- desoxyuridin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CMV	Zytomegavirus
Cre	Cause Rekombination
cDNA	Komplementäre DNA
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extracellular stimulus regulated kinase
FAD Medium	DMEM : Ham´s F12, 1:3
FCS	Fötales Kälber Serum
g	Gramm
GNS	normales Ziegen Serum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guanin Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GEF	Guanin-Nukleotidaustauschfaktor
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxilin und Eosinfärbung
HRP	Merettichperoxidase
IFE	interfollikuläre Epidermis

IgG	Immunglobulin G
IGF-1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor-1
IL-2	Interleukin-2
JNK	Jun N-terminal kinase
K10	Keratin 10
K14	Keratin 14
K5	Keratin 5
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinozyten Wachstumsfaktor
L61	L61Rac1
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MOPS	M-Morpholin propan sulphonische Säure
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
N17	N17Rac1
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGF	Nerven Wachstumsfaktor
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Blutplättchen Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	p(otenial of) H(ydrogen)
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Runden pro Minute
Rac	<i>‘ras-related C3 botulinum toxin substrate’</i>
Ras	<i>‘rat sarcoma viral oncogene homolog’</i>
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SACED	stroboskopische Analyse der Zelldynamik
SDS	Natriumdodecyl-Sulphat
SSC	Standard Zitrat Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBE	Tris borat EDTA Puffer
TBS	Tris buffered saline
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminoethan
TE	Tris-EDTA Puffer
ü. N.	über Nacht
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp

7 Literatur

Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F., and Pringle, J. R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *111*, 131-142.

Aktorics, K., Rosener, S., Blaschke, U., and Chhatwal, G. S. (1988). Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem* *172*, 445-450.

Alonso, L., and Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100 Suppl 1*, 11830-11835.

Ambruso, D. R., Knall, C., Abell, A. N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R. J., *et al.* (2000). Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4654-4659.

Ando, Y., and Jensen, P. J. (1993). Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* *100*, 633-639.

Arnold, I., and Watt, F. M. (2001). c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol* *11*, 558-568.

Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* *50*, 1131-1137.

Baugher, P. J., Krishnamoorthy, L., Price, J. E., and Dharmawardhane, S. F. (2005). Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* *7*, R965-974.

Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* *382*, 638-642.

Benitah, S. A., Frye, M., Glogauer, M., and Watt, F. M. (2005). Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. *Science* *309*, 933-935.

Berrier, A. L., Mastrangelo, A. M., Downward, J., Ginsberg, M., and LaFlamme, S. E. (2000). Activated R-ras, Rac1, PI 3-kinase and PKCepsilon can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin beta1 cytoplasmic domains. *J Cell Biol* *151*, 1549-1560.

Betson, M., Lozano, E., Zhang, J., and Braga, V. M. (2002). Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* *277*, 36962-36969.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-1523.

- Bokoch, G. M.** (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72, 743-781.
- Bornstein, P., and Sage, E. H.** (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14, 608-616.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F.** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.
- Bouzahzah, B., Albanese, C., Ahmed, F., Pixley, F., Lisanti, M. P., Segall, J. D., Condeelis, J., Joyce, D., Minden, A., Der, C. J., et al.** (2001). Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Mol Med* 7, 816-830.
- Braga, V. M., Betson, M., Li, X., and Lamarche-Vane, N.** (2000). Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 11, 3703-3721.
- Bromberg, J., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr.** (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.
- Brouard, M., and Barrandon, Y.** (2003). Controlling skin morphogenesis: hope and despair, Vol 14).
- Caceres-Dittmar, G., Ariizumi, K., Xu, S., Tapia, F. J., Bergstresser, P. R., and Takashima, A.** (1995). Hydrogen peroxide mediates UV-induced impairment of antigen presentation in a murine epidermal-derived dendritic cell line. *Photochem Photobiol* 62, 176-183.
- Cantrell, D.** (1998). Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav? *Curr Biol* 8, R535-538.
- Carpenter, G.** (1993). EGF: new tricks for an old growth factor. *Curr Opin Cell Biol* 5, 261-264.
- Cerutti, P. A., and Trump, B. F.** (1991). Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 3, 1-7.
- Chen, J. D., Lapiere, J. C., Sauder, D. N., Peavey, C., and Woodley, D. T.** (1995). Interleukin-1 alpha stimulates keratinocyte migration through an epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha-independent pathway. *J Invest Dermatol* 104, 729-733.
- Cho, Y. J., Zhang, B., Kaartinen, V., Haataja, L., de Curtis, I., Groffen, J., and Heisterkamp, N.** (2005). Generation of rac3 null mutant mice: role of Rac3 in Bcr/Abl-caused lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Biol* 25, 5777-5785.
- Chrostek, A., Xunwei, W., Quondamatteo F., Hu, R., Sanecka A., Niemann C., Langbein, L., Haase, I. and Brakebusch, C.** (2006). Rac1 is crucial for hair follicle integrity, but is not essential for the maintenance of Epidermis. *Mol. Biol. Cell*, Manuskript in Revision

- Clark, E. A.**, King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M., and Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol* 142, 573-586.
- Clark, R. A.**, Lanigan, J. M., DellaPelle, P., Manseau, E., Dvorak, H. F., and Colvin, R. B. (1982). Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 79, 264-269.
- Compton, C. C.**, Gill, J. M., Bradford, D. A., Regauer, S., Gallico, G. G., and O'Connor, N. E. (1989). Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 60, 600-612.
- Corbetta, S.**, Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G., and de Curtis, I. (2005). Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Mol Cell Biol* 25, 5763-5776.
- Cotsarelis, G.**, Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-1337.
- Cox, A. D., and Der, C. J.** (1992). Protein prenylation: more than just glue? *Curr Opin Cell Biol* 4, 1008-1016.
- Dale, B. A.**, Holbrook, K. A., and Steinert, P. M. (1978). Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* 276, 729-731.
- del Pozo, M. A.**, Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D., and Schwartz, M. A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J* 19, 2008-2014.
- Derynck, R.** (1988). Transforming growth factor alpha. *Cell* 54, 593-595.
- Desmouliere, A.**, Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology* 146, 56-66.
- Deuel, T. F.**, Senior, R. M., Huang, J. S., and Griffin, G. L. (1982). Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 69, 1046-1049.
- Didsbury, J.**, Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* 264, 16378-16382.
- Dorseuil, O.**, Reibel, L., Bokoch, G. M., Camonis, J., and Gacon, G. (1996). The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1. *J Biol Chem* 271, 83-88.
- Eliceiri, B. P.** (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* 89, 1104-1110.

- Emsley, J.**, Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J., and Liddington, R. C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* 101, 47-56.
- Esufali, S.**, and Bapat, B. (2004). Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 23, 8260-8271.
- Etienne-Manneville, S.**, and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Faruqi, T. R.**, Gomez, D., Bustelo, X. R., Bar-Sagi, D., and Reich, N. C. (2001). Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9014-9019.
- Fenteany, G.**, Janmey, P. A., and Stossel, T. P. (2000). Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Curr Biol* 10, 831-838.
- Ferguson, M. W.**, and O'Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 839-850.
- Fiegen, D.**, Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R., and Ahmadian, M. R. (2004). Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* 279, 4743-4749.
- Fuchs, E.** (1990). Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2, 1028-1035.
- Fuchs, E.** (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* 17, 197-208.
- Fuchs, E.**, and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.
- Fuchs, E.**, and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63, 345-382.
- Fukata, M.**, Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (1997). Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J Biol Chem* 272, 29579-29583.
- Fukata, M.**, Nakagawa, M., and Kaibuchi, K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 15, 590-597.
- Gailit, J.**, and Clark, R. A. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 6, 717-725.
- Garlick, J. A.**, and Taichman, L. B. (1994). Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* 70, 916-924.
- Gilchrest, B. A.** (2003). Skin aging 2003: recent advances and current concepts, Vol 72).

- Glassford, J.**, Holman, M., Banerji, L., Clayton, E., Klaus, G. G., Turner, M., and Lam, E. W. (2001). Vav is required for cyclin D2 induction and proliferation of mouse B lymphocytes activated via the antigen Receptor. *J Biol Chem* 276, 41040-41048.
- Glomset, J. A., and Farnsworth, C. C.** (1994). Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annual Review of Cell Biology* 10, 181-205.
- Grinnell, F.** (1992). Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci* 101 (Pt 1), 1-5.
- Grondahl-Hansen, J.**, Lund, L. R., Ralfkiaer, E., Ottevanger, V., and Dano, K. (1988). Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest Dermatol* 90, 790-795.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Guo, X.**, Stafford, L. J., Bryan, B., Xia, C., Ma, W., Wu, X., Liu, D., Songyang, Z., and Liu, M. (2003). A Rac/Cdc42-specific exchange factor, GEFT, induces cell proliferation, transformation, and migration. *J Biol Chem* 278, 13207-13215.
- Haase, I.**, Evans, R., Pofahl, R., and Watt, F. M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci* 116, 3227-3238.
- Haase, I.**, Hobbs, R. M., Romero, M. R., Broad, S., and Watt, F. M. (2001). A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest* 108, 527-536.
- Haataja, L.**, Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1997). Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* 272, 20384-20388.
- Habas, R.**, Dawid, I. B., and He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17, 295-309.
- Hafner, M.**, Wenk, J., Nenci, A., Pasparakis, M., Scharffetter-Kochanek, K., Smyth, N., Peters, T., Kess, D., Holtkotter, O., Shephard, P., *et al.* (2004). Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis* 38, 176-181.
- Hall, A.** (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-640.
- Hamelers, I. H.**, Olivo, C., Mertens, A. E., Pegtel, D. M., van der Kammen, R. A., Sonnenberg, A., and Collard, J. G. (2005). The Rac activator Tiam1 is required for (alpha)3(beta)1-mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *J Cell Biol* 171, 871-881.
- Han, V. K.**, D'Ercole, A. J., and Lund, P. K. (1987). Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236, 193-197.

- Harden, N.**, Loh, H. Y., Chia, W., and Lim, L. (1995). A dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in *Drosophila*. *Development* *121*, 903-914.
- Hertz, J. M.**, Schell, G., and Doerfler, W. (1999). Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* *274*, 24232-24240.
- Hiraoka, K.**, Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Takaishi, K., Mizuno, T., Asada, M., Menard, L., Tomhave, E., Didsbury, J., and et al. (1992). Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* *182*, 921-930.
- Hirshberg, M.**, Stockley, R. W., Dodson, G., and Webb, M. R. (1997). The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nat Struct Biol* *4*, 147-152.
- Hobbs, R. M.**, Silva-Vargas, V., Groves, R., and Watt, F. M. (2004). Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions. *J Invest Dermatol* *123*, 503-515.
- Hodak, E.**, Gottlieb, A. B., Anzilotti, M., and Krueger, J. G. (1996). The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* *106*, 564-570.
- Hordijk, P. L.**, ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., and Collard, J. G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* *278*, 1464-1466.
- Hwang, S. Y.**, Jung, J. W., Jeong, J. S., Kim, Y. J., Oh, E. S., Kim, T. H., Kim, J. Y., Cho, K. H., and Han, I. O. (2006). Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *Int J Cancer* *118*, 2056-2063.
- Jacinto, A.**, Martinez-Arias, A., and Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* *3*, E117-123.
- Jaffe, A. B., and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* *21*, 247-269.
- Johnson, D. I., and Pringle, J. R.** (1990). Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* *111*, 143-152.
- Jordan, P.**, Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C., and Chastre, E. (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* *18*, 6835-6839.
- Joyce, D.**, Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., et al. (1999). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* *274*, 25245-25249.

- Jurnak, F.** (1985). Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science* 230, 32-36.
- Kasper, B.,** Tidow, N., Grothues, D., and Welte, K. (2000). Differential expression and regulation of GTPases (RhoA and Rac2) and GDIs (LyGDI and RhoGDI) in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 95, 2947-2953.
- Kato, G. J., and Dang, C. V.** (1992). Function of the c-Myc oncoprotein. *Faseb J* 6, 3065-3072.
- Khosravi-Far, R.,** Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S., and Der, C. J. (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 15, 6443-6453.
- Klekotka, P. A.,** Santoro, S. A., and Zutter, M. M. (2001). alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain-dependent cellular migration requires p38 MAPK. *J Biol Chem* 276, 9503-9511.
- Knust, E.** (1997). Drosophila morphogenesis: movements behind the edge. *Curr Biol* 7, R558-561.
- Kraynov, V. S.,** Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., and Hahn, K. M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290, 333-337.
- Kwei, K. A.,** Finch, J. S., Ranger-Moore, J., and Bowden, G. T. (2006). The role of Rac1 in maintaining malignant phenotype of mouse skin tumor cells. *Cancer Lett* 231, 326-338.
- Lange, T. S.,** Bielinsky, A. K., Kirchberg, K., Bank, I., Herrmann, K., Krieg, T., and Scharffetter-Kochanek, K. (1994). Mg²⁺ and Ca²⁺ differentially regulate beta 1 integrin-mediated adhesion of dermal fibroblasts and keratinocytes to various extracellular matrix proteins. *Exp Cell Res* 214, 381-388.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Leibovich, S. J., and Ross, R.** (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78, 71-100.
- Levenson, S. M.,** Geever, E. F., Crowley, L. V., Oates, J. F., 3rd, Berard, C. W., and Rosen, H. (1965). The Healing Of Rat Skin Wounds. *Ann Surg* 161, 293-308.
- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr.** (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Li, B.,** Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A. W., Williams, D. A., Davis, R. J., Ghosh, S., and Flavell, R. A. (2000). Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science* 288, 2219-2222.

- Li, S.**, Yamauchi, A., Marchal, C. C., Molitoris, J. K., Quilliam, L. A., and Dinauer, M. C. (2002). Chemoattractant-stimulated Rac activation in wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol* 169, 5043-5051.
- Li, W.**, Fan, J., Chen, M., and Woodley, D. T. (2004). Mechanisms of human skin cell motility. *Histol Histopathol* 19, 1311-1324.
- Makela, M.**, Larjava, H., Pirila, E., Maisi, P., Salo, T., Sorsa, T., and Uitto, V. J. (1999). Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res* 251, 67-78.
- Malliri, A.**, van der Kammen, R. A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., and Collard, J. G. (2002). Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417, 867-871.
- Mansbridge, J. N., and Knapp, A. M.** (1987). Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol* 89, 253-263.
- Martin, P.** (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Matos, P.**, Collard, J. G., and Jordan, P. (2003). Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J Biol Chem* 278, 50442-50448.
- Matos, P.**, and Jordan, P. (2005). Expression of Rac1b stimulates NF-kappaB-mediated cell survival and G1/S progression. *Exp Cell Res* 305, 292-299.
- Matos, P.**, Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Verissimo, F., Gespach, C., Boavida, M. G., Scherer, S. W., and Jordan, P. (2000). Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 741-751.
- Matzke, M. A.**, Mette, M. F., and Matzke, A. J. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* 43, 401-415.
- McClain, S. A.**, Simon, M., Jones, E., Nandi, A., Gailit, J. O., Tonnesen, M. G., Newman, D., and Clark, R. A. (1996). Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am J Pathol* 149, 1257-1270.
- Mettouchi, A.**, Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K., and Giancotti, F. G. (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* 8, 115-127.
- Michiels, F.**, Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1995). A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 375, 338-340.
- Miki, H.**, Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408, 732-735.

- Millard, T. H.**, Sharp, S. J., and Machesky, L. M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380, 1-17.
- Mira, J. P.**, Benard, V., Groffen, J., Sanders, L. C., and Knaus, U. G. (2000). Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 185-189.
- Mitchison, J. M., and Creanor, J.** (1971). Further measurements of DNA synthesis and enzyme potential during cell cycle of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research* 69, 244-247.
- Mizuno, T.**, Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Hiraoka, K., Takaishi, K., Asada, M., Nunoi, H., Matsuda, I., and Takai, Y. (1992). Regulation of the superoxide-generating NADPH oxidase by a small GTP-binding protein and its stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *J Biol Chem* 267, 10215-10218.
- Morasso, M. I.**, and Tomic-Canic, M. (2005). Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell* 97, 173-183.
- Morris, C. M.**, Haataja, L., McDonald, M., Gough, S., Markie, D., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (2000). The small GTPase RAC3 gene is located within chromosome band 17q25.3 outside and telomeric of a region commonly deleted in breast and ovarian tumours. *Cytogenet Cell Genet* 89, 18-23.
- Morris, R. J.**, Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A., and Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 411-417.
- Morris, R. J., and Potten, C. S.** (1999). Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol* 112, 470-475.
- Murphy, G.**, Stanton, H., Cowell, S., Butler, G., Knauper, V., Atkinson, S., and Gavrilovic, J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Apmis* 107, 38-44.
- Nakayama, A. Y., and Luo, L.** (2000). Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus* 10, 582-586.
- Nelson, W. G., and Sun, T. T.** (1983). The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol* 97, 244-251.
- Niemann, C.**, Owens, D. M., Hulsken, J., Birchmeier, W., and Watt, F. M. (2002). Expression of DeltaN Δ Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* 129, 95-109.
- Niemann, C., and Watt, F. M.** (2002). Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends in Cell Biology* 12, 185-192.

- Nobes, C. D., and Hall, A.** (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144, 1235-1244.
- Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y., and Kaibuchi, K.** (2004). Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell* 15, 1065-1076.
- O'Toole, E. A.** (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol* 26, 525-530.
- O'Toole, E. A., Mak, L. L., Guitart, J., Woodley, D. T., Hashimoto, T., Amagai, M., and Chan, L. S.** (2000). Induction of keratinocyte IL-8 expression and secretion by IgG autoantibodies as a novel mechanism of epidermal neutrophil recruitment in a pemphigus variant. *Clin Exp Immunol* 119, 217-224.
- Oksala, O., Salo, T., Tammi, R., Hakkinen, L., Jalkanen, M., Inki, P., and Larjava, H.** (1995). Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 43, 125-135.
- Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A.** (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269, 1270-1272.
- Owen, C. A., and Campbell, E. J.** (1999). The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis.[see comment]. *Journal of Leukocyte Biology* 65, 137-150.
- Paduch, M., Jelen, F., and Otlewski, J.** (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48, 829-850.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K. M.** (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol* 170, 793-802.
- Patil, S., Bunderson, M., Wilham, J., and Black, S. M.** (2004). Important role for Rac1 in regulating reactive oxygen species generation and pulmonary arterial smooth muscle cell growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L1314-1322.
- Pfister, H., and Ter Schegget, J.** (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 15, 335-347.
- Pozzatti, R., Muschel, R., Williams, J., Padmanabhan, R., Howard, B., Liotta, L., and Khoury, G.** (1986). Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. *Science* 232, 223-227.
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A., and Bokoch, G. M.** (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* 9, 1863-1871.
- Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M.** (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457-459.
- Radisky, D. C., Levy, D. D., Littlepage, L. E., Liu, H., Nelson, C. M., Fata, J. E., Leake, D., Godden, E. L., Albertson, D. G., Nieto, M. A., et al.** (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123-127.

- Raftopoulou, M., and Hall, A.** (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
- Raich, W. B., Agbunag, C., and Hardin, J.** (1999). Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Curr Biol* 9, 1139-1146.
- Ridley, A. J.** (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R.** (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rivas, J. M., and Ullrich, S. E.** (1994). The role of IL-4, IL-10, and TNF-alpha in the immune suppression induced by ultraviolet radiation. *J Leukoc Biol* 56, 769-775.
- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B., et al.** (1999). Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* 10, 183-196.
- Romer, J., Lund, L. R., Eriksen, J., Pyke, C., Kristensen, P., and Dano, K.** (1994). The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 102, 519-522.
- Roose, J., and Clevers, H.** (1999). TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1424, M23-37.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. and Maniatis. T.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, M. M., and Gaudino, G.** (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 304, 274-286.
- Schaper, I. D., Marcuzzi, G. P., Weissenborn, S. J., Kasper, H. U., Dries, V., Smyth, N., Fuchs, P., and Pfister, H.** (2005). Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* 65, 1394-1400.
- Schmidt, A., and Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E.** (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 19, 3013-3020.
- Schurer, N. Y., Plewig, G., and Elias, P. M.** (1991). Stratum corneum lipid function. *Dermatologica* 183, 77-94.

- Sells, M. A.,** Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 7, 202-210.
- Shih, T. Y.,** Williams, D. R., Weeks, M. O., Maryak, J. M., Vass, W. C., and Scolnick, E. M. (1978). Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *J Virol* 27, 45-55.
- Shimizu, K.,** Goldfarb, M., Perucho, M., and Wigler, M. (1983). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 383-387.
- Shirsat, N. V.,** Pignolo, R. J., Kreider, B. L., and Rovera, G. (1990). A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene* 5, 769-772.
- Simon, A. R.,** Vikis, H. G., Stewart, S., Fanburg, B. L., Cochran, B. H., and Guan, K. L. (2000). Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science* 290, 144-147.
- Singer, A. J., and Clark, R. A.** (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-746.
- Skalli, O.,** Vandekerckhove, J., and Gabbiani, G. (1987). Actin-isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation* 33, 232-238.
- Stacey, D. W., and Kung, H. F.** (1984). Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature* 310, 508-511.
- Steinert, P. M., and Liem, R. K.** (1990). Intermediate filament dynamics. *Cell* 60, 521-523.
- Sternlicht, M. D., and Werb, Z.** (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- Steven, A. C., and Steinert, P. M.** (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 2), 693-700.
- Stoker, M.,** O'Neill, C., Berryman, S., and Waxman, V. (1968). Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int J Cancer* 3, 683-693.
- Sugihara, K.,** Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433.
- Sun, T. T.,** Bonitz, P., and Burns, W. H. (1984). Cell culture of mammalian thymic epithelial cells: growth, structural, and antigenic properties. *Cell Immunol* 83, 1-13.
- Sun, T. T.,** Eichner, R., Nelson, W. G., Tseng, S. C., Weiss, R. A., Jarvinen, M., and Woodcock-Mitchell, J. (1983). Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol* 81, 109s-115s.

- Sundaresan, M.**, Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Sulciner, D. J., Gutkind, J. S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Finkel, T. (1996). Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* 318 (Pt 2), 379-382.
- Taipale, J., and Beachy, P. A.** (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349-354.
- Takai, Y.**, Kaibuchi, K., Kikuchi, A., and Kawata, M. (1992). Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* 133, 187-230.
- Takai, Y.**, Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Tavakkol, A.**, Elder, J. T., Griffiths, C. E., Cooper, K. D., Talwar, H., Fisher, G. J., Keane, K. M., Foltin, S. K., and Voorhees, J. J. (1992). Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin. *J Invest Dermatol* 99, 343-349.
- Taylor, G.**, Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461.
- Thomas, S.** (2002). Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* 48, 247-262.
- Tolias, K. F.**, Cantley, L. C., and Carpenter, C. L. (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 270, 17656-17659.
- Tscharntke, M.**, Pofahl, R., Krieg, T., and Haase, I. (2005). Ras-induced spreading and wound closure in human epidermal keratinocytes. *Faseb J* 19, 1836-1838.
- Tsuboi, R.**, Sato, C., Kurita, Y., Ron, D., Rubin, J. S., and Ogawa, H. (1993). Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 101, 49-53.
- Tumbar, T.**, Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W. E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303, 359-363.
- Vaezi, A.**, Bauer, C., Vasioukhin, V., and Fuchs, E. (2002). Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell* 3, 367-381.
- van Leeuwen, F. N.**, van Delft, S., Kain, H. E., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999). Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* 1, 242-248.
- Vasioukhin, V.**, Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209-219.
- Vidali, L.**, Chen, F., Cicchetti, G., Ohta, Y., and Kwiatkowski, D. J. (2006). Rac1-null Mouse Embryonic Fibroblasts Are Motile and Respond to Platelet-derived Growth Factor. *Mol Biol Cell*.

- Walmod, P. S.**, Hartmann-Petersen, R., Prag, S., Lepekhin, E. L., Ropke, C., Berezin, V., and Bock, E. (2004). Cell-cycle-dependent regulation of cell motility and determination of the role of Rac1. *Exp Cell Res* 295, 407-420.
- Walmsley, M. J.**, Ooi, S. K., Reynolds, L. F., Smith, S. H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D. A., Cancro, M. P., and Tybulewicz, V. L. (2003). Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 302, 459-462.
- Wang, B.**, Esche, C., Mamelak, A., Freed, I., Watanabe, H., and Sauder, D. N. (2003). Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 381-389.
- Watt, F. M.** (1994). Studies with cultured human epidermal keratinocytes: potential relevance to corneal wound healing. *Eye* 8 (Pt 2), 161-162.
- Watt, F. M.** (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J* 21, 3919-3926.
- Webb, C. P.**, Van Aelst, L., Wigler, M. H., and Woude, G. F. (1998). Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8773-8778.
- Wells, C. M.**, Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V., and Ridley, A. J. (2004). Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* 117, 1259-1268.
- Wennerberg, K., and Der, C. J.** (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science* 117, 1301-1312.
- Werner, S.**, Peters, K. G., Longaker, M. T., Fuller-Pace, F., Banda, M. J., and Williams, L. T. (1992). Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6896-6900.
- Werner, S.**, Smola, H., Liao, X., Longaker, M. T., Krieg, T., Hofschneider, P. H., and Williams, L. T. (1994). The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 266, 819-822.
- Werner, S., and Grose, R.** (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835-870.
- Westwick, J. K.**, Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G., and Der, C. J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 17, 1324-1335.
- Wientjes, F. B., and Segal, A. W.** (1995). NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol* 6, 357-365.
- Woolner, S.**, Jacinto, A., and Martin, P. (2005). The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion--dynamic studies of *Drosophila* dorsal closure. *Dev Biol* 282, 163-173.

- Yamauchi, A.**, Kim, C., Li, S., Marchal, C. C., Towe, J., Atkinson, S. J., and Dinauer, M. C. (2004). Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J Immunol* 173, 5971-5979.
- Yu, H.**, Leitenberg, D., Li, B., and Flavell, R. A. (2001). Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. *J Exp Med* 194, 915-926.
- Yu, W.**, Datta, A., Leroy, P., O'Brien, L. E., Mak, G., Jou, T. S., Matlin, K. S., Mostov, K. E., and Zegers, M. M. (2005). Beta1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. *Mol Biol Cell* 16, 433-445.
- Yuen, K. S.**, Nearn, M. R., and Halliday, G. M. (2002). Nitric oxide-mediated depletion of Langerhans cells from the epidermis may be involved in UVA radiation-induced immunosuppression. *Nitric Oxide* 6, 313-318.
- Zhang, B.**, Gao, Y., Moon, S. Y., Zhang, Y., and Zheng, Y. (2001). Oligomerization of Rac1 gtpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain. *J Biol Chem* 276, 8958-8967.
- Zhang, Z. G.**, Bothe, I., Hirche, F., Zweers, M., Gullberg, D., Pfitzer, G., Krieg, T., Eckes, B., and Aumailley, M. (2006). Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of $\alpha_2\beta_1$ integrin. *J Cell Sci* 119, 1886-1895.
- Zohn, I. M.**, Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (1998). Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 17, 1415-1438.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klein betreut worden

Köln den 18.5.2006

Michael Tschardtke

Teilpublikationen:

Tschardtke, M., Pofahl, R., Krieg, T., and Haase, I. (2005). Ras-induced spreading and wound closure in human epidermal keratinocytes. *Faseb J* 19, 1836-1838.

Lebenslauf

Daten zur Person:

Name: Michael Tscharntke
Geburtsdatum: 23.3.1974
Geburtsort: Bonn

Ausbildung:

08/1980 – 06/1984 Katholische Grundschule Bonn - Duisdorf

08/1984 – 07/1993 Hardtberg - Gymnasium, Bonn
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/1993 – 07/1995 Ausbildung zum staatlich geprüften biologisch
technischen
Assistenten an der „Rheinischen Akademie e.V.“ in Köln

10/1995 – 10/1997 Grundstudium an der Rheinischen Fr. Wilhelms
Universität
Bonn, Studiengang: Biologie auf Diplom, Vordiplom
08/1997

10/1997 – 12/1999 Hauptstudium an der Universität zu Köln, Studiengang:
Biologie auf Diplom

10/1999 Mündliche Diplomprüfungen:
Hauptfach: Genetik
1. Nebenfach: Botanik
2. Nebenfach: Biochemie

01/2000 – 12/2000

Diplomarbeit am Institut für Botanik unter Anleitung von Prof. U. I. Flügge an der Universität zu Köln mit dem Thema: Untersuchungen zur Identifizierung anaerob induzierbarer Knollengene aus *Solanum tuberosum* durch Differential Display. Die Versuche wurden in den Laboren der Firma MPB-Cologne GmbH in Köln durchgeführt.

09/2001 – 7/2006

Promotion für das Fach Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. Helmut W. Klein an der Universität zu Köln. Die Arbeiten wurden im Labor von Priv. Doz. Dr. Dr. Ingo Haase in der Abteilung für Dermatologie und Venerologie der Universitätsklinik zu Köln durchgeführt. Thema der Dissertation: Charakterisierung der Funktion von Rac1 in der Epidermis von Mäusen *in vivo* und *in vitro*

Danksagung:

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Ingo Haase für die interessante Themenstellung, die angenehme Betreuung und die konstruktive Diskussion der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln.

Herrn Prof. Dr. Helmut Klein danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Übernahme des Erstgutachtens. Frau Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank geht an Ruth Pofahl, die mir über die Jahre eine große Hilfe war und durch ihre Mitarbeit und ihren Ideen diese Arbeit immer mit auf Kurs gehalten hat.

Des weiteren möchte ich mich bei den Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Pathophysiologie der Epidermis, Athanasios Stratis, Doreen Markur, Renate Knaup, Semra Frimpong, Alina Hedrych-Ozimina für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken

Bedanken möchte ich mich auch bei den Kollegen und Kolleginnen der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln. Im besonderen bei Anke Baranowsky, Astrid Willbrandt-Hennes, Benedikt Hartwig, Anke Klose, Kerstin Elias, Nicole Brüggelolte, Jan Zamek und Yvonne Meyer, die durch ihre Mischung aus fachlicher und sozialer Unterstützung über die Jahre hinweg ein sehr angenehmes Arbeitsklima möglich gemacht haben.

Ich danke besonders herzlich meiner Familie für die jahrelange menschliche und finanzielle Unterstützung, sowie meinen Freunden, insbesondere Stefan Voigt, für ihre Hilfe, ihre Geduld und ihr Verständnis.