

**Funktionelle Analyse von Neuropilin 1 und 2 in der
Epidermis: Bedeutung in der Wundheilung und in der UVB-
induzierten Apoptose**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anna Riese

aus

Coesfeld

Köln, 2011

Berichtersteller: PD Dr. Roswitha Nischt

Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2011

Zusammenfassung

Neuropilin (NRP) 1 und 2 steuern die Ausbildung des Nerven- und des Gefäßsystems während der Entwicklung indem sie die Migration von Neuronen und Endothelzellen regulieren. Diese Funktion ist bereits gut beschrieben. Beide Rezeptoren werden auch von Keratinozyten exprimiert, doch über ihre Rolle in der Epidermis ist bisher nur sehr wenig bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Funktionen Neuropilin 1 und 2 in der Epidermis übernehmen.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass sich die Expressionsmuster in der Epidermis unterscheiden. Während Neuropilin 1 verstärkt in den suprabasalen Schichten exprimiert wird, ist Neuropilin 2 ausschließlich in der Basalzellschicht zu finden. Zur Klärung der Frage der Funktion wurden Epidermis-spezifische Neuropilin defiziente Mauslinien generiert ($\text{NRP}^{\text{epi}/-}$). Die epidermale Deletion von Neuropilin 1 beziehungsweise 2 oder beider Rezeptoren führt zu keiner spontanen Veränderung der Hautphysiologie. Die Differenzierung der Keratinozyten und die Funktion der Haut waren durch die Deletion nicht beeinflusst.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren eine Funktion bei der Homöostase der Haut besitzen. Dieser Effekt zeigte sich zunächst während der Wundheilung, die in Mäusen, denen beide Rezeptoren in der Haut fehlen, gestört ist. Die Wunden schließen sich langsamer und die Differenzierung der Neoepidermis ist verzögert. Diese gestörte Wundheilung ist jedoch nicht in den $\text{NRP1}^{\text{epi}/-}$ oder den $\text{NRP2}^{\text{epi}/-}$ sichtbar, was darauf hinweist, dass evtl. der eine Rezeptor das Fehlen des jeweiligen anderen kompensieren kann.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine Rolle von Neuropilin 1 bei der UVB-induzierten Apoptose herausgearbeitet. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stellte sich heraus, dass die Deletion des epidermalen Neuropilin 1 zu einer erhöhten Apoptoserate der Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung führt. Es konnte gezeigt werden, dass das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in den $\text{NRP1}/-$ Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung vermindert exprimiert wird. Außerdem wurde gezeigt, dass zwar die Aktivierung der Kinasen AKT und p38 nicht beeinflusst ist, dass aber die Phosphorylierung von ERK in den $\text{NRP1}/-$ Zellen schwächer ist. Zudem wurde gezeigt, dass die Menge an p53 nach UVB-Bestrahlung in $\text{NRP1}/-$ Keratinozyten erhöht ist. Eine Rolle könnte dabei die ausbleibende Aktivierung von Rac1 nach UVB-Bestrahlung spielen.

Eine mögliche Ursache der erhöhten Apoptoserate könnten die verminderten VEGF-A Mengen sein, die von den NRP1-/- Keratinozyten sezerniert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass Neuropilin 1 und 2 für die normale Entwicklung und Physiologie der Haut nicht essentiell sind, aber dass beide Rezeptoren eine Funktion bei der Wundheilung übernehmen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Neuropilin 1 das Überleben von Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung reguliert.

Abstract

Neuropilin (NRP) 1 and 2 are important regulators of axonal outgrowth and vascularization during development but they are also expressed by keratinocytes. The aim of this study was to investigate the role of Neuropilin 1 and 2 for the epidermis. The crucial function of regulating cell migration of neurons and endothelial cells during development is very well established for the two transmembrane receptors, but there only very rare data of their role in keratinocytes.

For *in vivo* studies epidermis-specific Neuropilin knockout mice (NRP^{epi-/-}) were generated by using the Cre/LoxP system. The Cre recombinase was under control of the Keratin 14 promotor. The NRP1^{epi-/-}, NRP2^{epi-/-} and the double knockout mice were viable, fertile and showed no obvious differences in skin and hair. Histologically the skin of the mice is not affected by the loss of Neuropilin 1, Neuropilin 2 or both. The differentiation of the epidermal layers is normal.

But we could show that there is a wound healing delay in the absence of both receptors. The reepithelisation of the wounds is not disturbed, but later stages of the wound healing process are affected. The differentiation of the neoepidermis in wounds of the NRP1/2^{epi-/-} mice is delayed. Wound healing of wounds from NRP1^{epi-/-} or NRP2^{epi-/-} animals is not affected, which implicates a compensatory effect of the receptors.

Additionally it was found that Neuropilin 1 is a regulator of UVB induced apoptosis. The NRP1^{-/-} keratinocytes are more susceptible to apoptosis *in vitro* and *in vivo*. The amount of Bcl-2 after UVB irradiation is reduced in the NRP1^{-/-} keratinocytes. There are no differences in the phosphorylation of p38 and AKT but ERK is less activated in the NRP1^{-/-} cells. Furthermore it was shown that the activation of the small GTPase Rac1 after UVB treatment was reduced in the absence of Neuropilin 1.

The reduced amounts of VEGF-A expressed by the NRP1^{-/-} keratinocytes might be an explanation for the apoptosis.

In summary we could demonstrate that Neuropilin 1 and 2 are not essential for the normal skin physiology but they do have functions in wound healing. Additionally it was found that Neuropilin 1 is a regulator of survival after UVB treatment of keratinocytes.