

Michaela Ernst: Untersuchungen zum Laminin-5 und zu anderen Basalmembrankomponenten in humanen Keratinozyten und Keratinozytenzelllinien unterschiedlicher Malignität unter Verwendung organotypischer Kultursysteme. 2003

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen und die Verteilung von Basalmembrankomponenten, insbesondere von Laminin-5, in primären humanen Keratinozyten, HaCaT-Zellen und ras-transformierten HaCaT-Zellen untersucht. Ergänzend wurde auch primäres Tumormaterial verwendet. Zur Annäherung an die in vivo Situation wurden die Zellen in der Mehrzahl der Versuche unter organotypischen Bedingungen, d.h. auf einem Kollagen-I-Gel mit darin eingebetteten Fibroblasten und unter Luftexposition, kultiviert.

Zunächst konnte auf mRNA Ebene gezeigt werden, daß ras-transformierte HaCaT-Zellen eine größere Anzahl der verschiedenen Lamininketten exprimieren als HaCaT-Zellen und so vermutlich mehr Laminin-Isoformen synthetisieren.

Für Laminin-5 wurde in HaCaT-ras-Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen unter organotypischen Kulturbedingungen eine konstante mRNA-Expression der $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ Ketten nachgewiesen. Die HaCaT-ras-Zellen zeigten somit ein gänzlich anderes Expressionsmuster, verglichen mit primären Keratinozyten und normalen HaCaT-Zellen. In diesen Zellen wurden nach sieben Tagen signifikant weniger mRNA-Transkripte der $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ Ketten nachgewiesen, als nach zwei Tagen. In HaCaT-ras-Zellen fand somit, die für normale Zellen charakteristische Downregulation des Laminin-5 nicht statt. Diese Besonderheit der ras-transformierten Zellen wurde in weiteren Experimenten genauer untersucht.

Durch verschiedene Versuchsansätze wurde nachgewiesen, daß weder die Fibroblasten im Kollagen-I-Gel, noch die kollagene Matrix selbst und auch nicht nur die Luftexposition für die anhaltende mRNA-Expression der drei Ketten verantwortlich sind. Es wurde gezeigt, daß ein Zusammenwirken der kollagenen Matrix bei gleichzeitig luftexponierter Kultur die mRNA-Expression beeinflussen. Dies gilt sowohl für die Downregulation in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen, als auch für die anhaltende mRNA-Expression in ras-transformierten HaCaT-Zellen. Desweiteren wurde gezeigt, daß ras-transformierte HaCaT-Zellen deutlich weniger $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ mRNA synthetisieren, wenn sie auf deepidermiserter Dermis mit teilweise erhaltener Basalmembran kultiviert werden. Als Kontrolle wurde deepidermisierte Dermis ohne Basalmembrankomponenten verwendet.

Proteindaten wurden mit indirekten Immunfluoreszenzen und mit immunchemischem Nachweis gewonnen. In Gefrierschnittpräparaten der organotypischen Kulturen zeigte sich nach sieben Tagen in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen an der Grenze zwischen Epithel und Kollagengel für die Basalmembrankomponenten Laminin-5, Kollagen-IV und Nidogen eine durchgängig gefärbte Linie. In Präparaten der ras-transformierten HaCaT-Zellen waren deutliche Kontinuitätsunterbrechungen sichtbar oder die Färbung erschien über das gesamte Kollagengel verteilt. Die Daten der ras-transformierten HaCaT-Zellen wurden gestützt durch die ähnlichen Ergebnisse, die mit primären Basaliomzellen erzielt wurden.

Mit Hilfe des immunchemischen Nachweises (ECL) konnte in Präparaten von HaCaT-Zellen nach siebentägiger organotypischer Kultur natives Laminin-5 nachgewiesen werden. In ras-transformierten HaCaT-Zellen wurde kein natives Laminin-5 gefunden. Somit konnte in HaCaT-Zellen unter organotypischen Kulturbedingungen Laminin-5 als mRNA-Transkripte, als korrekt abgelagerte Basalmembrankomponente und als natives Protein nachgewiesen werden. In ras-transformierten HaCaT-Zellen korrelierten diese verschiedenen Daten nicht miteinander. Dies deutet auf eine Veränderung im Vorkommen und in der Verteilung des Laminin-5 hin, die in verschiedenen humanen Tumorzellen zu finden ist.

Die Daten der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen nach kurzer Zeit auf dem Kollagengel mit der Synthese von Basalmembrankomponenten beginnen, diese sezernieren und korrekt abgelagern. Die abgelagerten Komponenten scheinen dann ihrerseits eine Informationsquelle für die ihr aufsitzenden Zellen zu sein. Das stützt die These, daß die

dreidimensionale Struktur der Basalmembran die auf ihr sitzenden Zellen veranlaßt, die Synthese der Komponenten zu reduzieren. Erst wenn die Basalmembran beschädigt ist, wie zum Beispiel in der Wundheilung oder auch durch die Degradation der Basalmembran durch Tumorzellen, wird die Neusynthese der einzelnen Komponenten induziert. In der Wundheilung wird allerdings nach Wiederherstellung der dreidimensionalen Struktur die Synthese wieder reduziert, während in Tumorzellen, aufgrund der gleichzeitig ablaufenden Degradationsvorgänge, die Synthese der Basalmembrankomponenten kontinuierlich fortgesetzt wird. Außerdem scheint die Struktur des Laminin-5 in ras-transfomierten HaCaT- Zellen verändert zu sein. Dies könnte auch in humanen epithelialen Tumoren für die Invasion und Migrations der Zellen eine Rolle spielen.

Within the framework of this thesis I researched the presence and the distribution of basal membrane components, especially that of laminin-5 in primary human keratinocytes, HaCaT cells and ras-transformed HaCaT cells. Furthermore, primary tumour material was used. To approximate as closely as possible in vivo situations, the cells in most of the experiments were cultivated under organotypical conditions, i.e. on a collagen type I gel mixed with fibroblasts and under air exposure. The first result demonstrated that ras-transformed HaCaT cells produce a larger number of different mRNA laminin chains as HaCaT cells and therefore probably synthesise more laminin isoforms. For laminin 5 was shown, that in primary keratinocytes and in the similar HaCaT cells the mRNA expression of the three chains of laminin 5 α 3, β 3 and γ 2 was significantly less after seven days under organotypical cultivation conditions than after two days. Such a down-regulation of laminin 5 is not to be observed in ras-transformed HaCaT cells.

Through different experiments was established that neither fibroblasts in collagen type I gel, the collagen matrix itself, nor the air exposition alone are responsible for the continuous mRNA expression of the three chains. It was proved that a combination of collagen matrix and air exposure influence the mRNA expression. This is true of the down-regulation in primary keratinocytes and HaCaT cells, as well as of the continuous mRNA expression in ras-transformed HaCaT cells. In addition, it was demonstrated that ras-transformed HaCaT cells considerably less mRNA of the α 3, β 3 and γ 2 chains were produced when they were cultivated on de-epidermised dermis with partially conserved basal membrane.

Protein data were created with both indirect immunofluorescence and using the immunochemical method. In frozen sections of the organotypical cultures a continuous coloured line of laminin 5, collagen IV and nidogen emerged in primary keratinocytes and HaCaT cells between the epithel and collagen gel. On the contrary, in sections of the ras-transformed HaCaT cells, visible breaks in the continuity of the line, or a dispersal of colour over the whole of the collagen gel were to be observed. The data of the ras- transformed HaCaT cells were confirmed by the similar results given with primary cells of basal cell carcinoma.

With the immunochemical method native laminin 5 in HaCaT cells sections was verified after a seven day organotypical culture, whereas these were not present in ras-transformed HaCaT cells. This proved that laminin 5 in HaCaT cells is to be found as mRNA, correct positioned component and as native protein in the organotypical culture system. This was not the case for ras- transformed HaCaT cells which showed a different profile, one probably to be found in in vivo tumour cells.

The data of this thesis has revealed that primary keratinocytes and HaCaT cells on collagen gel begin, after a short time, with the synthesis of basal membrane components and that these also separated and position themselves correctly. The positioned components thus seem to be an information source for the cells placed above them. This confirms the theory according to which the three-dimensional structure of the basal membrane give information to the overlying cells to reduce the synthesis of the components. Only when the basal membrane is damaged or degraded, such as in the cases of wounds or tumours, is the new synthesis of the individual components induced. Whereas in the case of wounds, the synthesis is once again reduced after the reconstruction of the three-dimensional structure, in the case of tumour cells, the synthesis of basal membrane components is continuously sustained due

to the parallel continuous degradation. In addition, it can be inferred that laminin 5 in ras- transformed HaCaT cells and thus also probably in epithelial tumours, has a different structure to that of normal cells.