

**Einfluss der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinase
ADAM10 auf die proteolytische Spaltung von
transmembranen Proteinen der Haut**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

vorgelegt von Felix Scholz

Kiel, Mai 2006

Referent:.....

Koreferent:.....

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2006

zum Druck genehmigt, Kiel den:.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

I .	EINLEITUNG	1
1.	CHEMOKINE	3
1.1	Das membranständige Chemokin CXCL16	5
2.	ADHÄSIONSMOLEKÜLE UND CADHERINE.....	6
2.1	Epitheliales Cadherin	8
3.	DIE ADAM-FAMILIE	11
3.1	ADAM17	13
3.2	ADAM10.....	14
3.3	Funktionen von ADAM Proteasen in der Haut	14
4.	FRAGESTELLUNG.....	16
II .	MATERIAL UND METHODEN	17
1.	VERSUCHSTIERE UND KERATINOZYTEN-ZELLKULTUREN	17
1.1	Versuchstiere und deren Haltung	17
1.2	Präparation und Dispersion der murinen Epidermis zur Herstellung von primären Keratinozytenzellkulturen	18
1.3	Präparation und Dispersion von humanen Keratinozyten für die Zellkultur	19
1.4	PAM212-Zelllinie	19
1.5	HaCaT-Zelllinie.....	19
1.6	Beschichtung von Zellkulturschalen	20
2.	DURCHFÜHRUNG VON TIER- UND ZELLKULTUREXPERIMENTEN	20
2.1	Wundheilungsversuche an SKH-1-Mäusen	21
2.2	CXCL-16-Proteolyse-Assay	22
2.3	Inhibition der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 durch die Inhibitoren Marimastat, GW280264X und GI254023X	22
2.4	Stimulation von Zellkulturen mit PMA, TNF- α und IFN- γ	24

Inhaltsverzeichnis

2.5	Übertransfektion von ADAM10 in HaCaT-Zellen und in primären murinen Keratinozyten.....	25
2.6	<i>Gene knockdown</i> -Experimente an primären humanen Keratinozyten mit <i>stealth</i> -siRNA.....	26
3.	IMMUNHISTOCHEMIE- UND INDIREKTE IMMUNFLOURESZENS-FÄRBUNGEN AN HUMANEN UND MURINEN PARAFFINSCHNITTEN	28
3.1	Verwendete primäre Antikörper	30
3.2	Verwendete sekundäre Antikörper.....	30
3.3	Immunhistologische DAB-Färbung an Paraffin-schnitten	31
3.4	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung an Paraffin-schnitten	32
4.	SDS-GELELEKTROPHORESE UND <i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSE VON KERATINOZYTENZELLKULTURLYSATEN	33
4.1	Verwendete Antikörper für <i>western blot</i> -Analysen.....	34
4.2	Durchführung der SDS-Gelelektrophorese und des <i>western blots</i> ..	34
5.	ELISA-ANALYSE VON ÜBERSTÄNDEN UND LYSATEN AUS PRIMÄREN MURINEN UND HUMANEN KERATINOZYTEN-ZELLKULTUREN	36
5.1	Der murine CXCL16-ELISA	37
5.2	Der humane CXCL16-ELISA.....	38
6.	RNA-ISOLIERUNG, REVERSE TRANSKRIPTION UND QUANTITATIVE <i>REALTIME</i> -PCR.....	38
6.1	RNA-Isolierung aus SKH-1-Maushaut und primären Keratinozytenzellkulturen	39
6.2	DNA-Verdau mittels DNase I	40
6.3	Reverse Transkription.....	40
6.4	Quantitative <i>realtime</i> -PCR	41
6.5	DNA-Agarose-Gel	43
III.	ERGEBNISSE	44

1. ADAM10 UND ADAM17 WERDEN KONSTITUTIV VON KERATINOZYTEN SOWOHL <i>IN VIVO</i> ALS AUCH <i>IN VITRO</i> EXPRIMIERT.....	45
2. CXCL16	47
2.1 CXCL16 wird von Keratinozyten in der Haut konstitutiv exprimiert. 48	
2.2 CXCL16 wird von Keratinozyten <i>in vitro</i> exprimiert und proteolytisch gespalten.....	49
2.3 Durch Metalloproteinaseinhibitoren lässt sich die Proteolyse von CXCL16 hemmen	50
2.4 ADAM10 <i>gene knockdown</i> verringert die Proteolyse von CXCL16..	55
2.5 PMA und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interferon- γ haben keinen Einfluß auf die Proteolyse von CXCL16 in Keratinozyten	62
2.6 Ionomycin verstärkt die Proteolyse von CXCL16	66
2.7 Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit UVB führt zu einer verstärkten Proteolyse von CXCL16, die Bestrahlung mit UVA hat keinen Effekt.....	67
2.8 Der CXCL16-Rezeptor CXCR6 wird von Zellen in der Dermis exprimiert	71
2.9 CXCL16 wird bei Mäusen in die Wundflüssigkeit abgegeben	72
3. E-CADHERIN	73
3.1 E-Cadherin wird von Keratinozyten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> gebildet.....	73
3.2 E-Cadherin wird in primären murinen und humanen Keratinozyten von ADAM10 geschnitten	74
3.3 ADAM10 und E-Cadherin weisen beim akuten Ekzem unterschiedliche Expressionsmuster auf.....	77
IV. DISKUSSION	81
1. ADAM10 UND ADAM17 WERDEN KONSTITUTIV VON KERATINOZYTEN SOWOHL <i>IN VIVO</i> ALS AUCH <i>IN VITRO</i> EXPRIMIERT.....	81
2. CXCL16	82
3. E-CADHERIN	87

V.	ZUSAMMENFASSUNG	91
VI.	SUMMARY	93
VII.	LITERATUR	95
VIII.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	113
IX.	ANHANG.....	114
1.	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	114
1.1	Abkürzungen für Aminosäuren	115
2.	MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	115
2.1	Zellkultur	115
2.2	RNA-Isolierung.....	116
2.3	Reverse Transkription.....	116
2.4	PCR	116
2.5	Gelelektrophorese	116
2.6	Tierhaltung	117
2.7	Puffer	117
2.8	Zellkulturmedien	118
3.	PROTOKOLLE.....	118
3.1	Präparation und Dispersion der murinen Epidermis.....	118
3.2	Präparation und Dispersion von humanen Keratinozyten.....	119
3.3	Beschichten von Zellkulturschalen.....	120
3.4	Transfektion von primären murinen Keratinozyten.....	120
3.5	siRNA-Transfektion von primären humanen Keratinozyten	120
3.6	DAB Immunhistochemie an Paraffinschnitten	121
3.7	Immunfluoreszens an Parafinschnitten.....	122
3.8	Immunfluoreszens an murinen Keratinozyten-kulturen.....	123

Inhaltsverzeichnis

3.9	Muriner CXCL16-ELISA	123
3.10	Humaner CXCL16-ELISA.....	124
3.11	Isolation von mRNA mittels TRIzol und DNase I Verdau	125
3.12	Dnase I Verdau.....	126
3.13	mRNA-Präzipitation	126
3.14	Reverse Transkription.....	127
3.15	Quantitative <i>realtime</i> -PCR.....	127
3.16	Proteingewinnung aus Zellkulturüberständen und Zellen für ELISA 128	
X.	LEBENS LAUF	129
XI.	DANKSAGUNG	130
XII.	ERKLÄRUNG	131

I. Einleitung

Die Haut grenzt den Körper gegen die Umwelt ab und nimmt eine Vielzahl von Funktionen wahr. Die Gesamtfläche der menschlichen Haut beträgt je nach Größe und Gewicht des Menschen 1,5 bis 2 m². Sie besteht aus Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut). Die Subcutis besteht im wesentlichen aus Bindegewebe- und Fettgewebezellen. Die Dermis besteht aus mesenchymalen Komponenten insbesondere Fibroblasten. Letztere produzieren ein Kollagenetzwerk, das von Elastin und Fibrillin durchsetzt wird. Dieses Netzwerk ist für die Festigkeit, Elastizität und Dicke der Haut verantwortlich. Die Nährstoffversorgung der Haut wird durch Blutgefäße in der Dermis gewährleistet. Nervenfasern, Lymphgefäße, Zellen des Immunsystems und epidermale Anhangsgebilde wie Haarfollikel, Haarschaft, Schweiß- und Talgdrüsen sind weitere Strukturen, die in der Dermis lokalisiert sind. Als Trennschicht zwischen Dermis und Epidermis fungiert die Basalmembran, die eine spezialisierte extrazelluläre Matrix darstellt. Zusammengesetzt ist diese aus Kollagen und Laminin. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen sind ebenfalls in ihr lokalisiert. Auf der Basalmembran liegt das *Stratum basale* auf, die unterste Schicht der Epidermis. Hier befinden sich die Stammzellen der Haut, die in der Lage sind, sich zu teilen und somit die regelmäßige Erneuerung der Epidermis zu gewährleisten. Die basalen Keratinozyten sind mittels Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert. Auf die Basalzellschicht folgen das *Stratum spinosum*, das *Stratum granulosum* und das *Stratum corneum*. Im Verlauf der Differenzierung wandern die Keratinozyten an die Oberfläche der Epidermis. Im oberen *Stratum granulosum* werden die Zellkerne abgebaut und die Keratinozyten verhornen zunehmend. Dieser Prozess ist im *Stratum corneum* der Hornschicht abgeschlossen. Die Keratinozyten besitzen hier keinen Zellkern mehr und schilfern als Hautschuppen ab. In gesunder Haut dauert der Prozess von der Zellteilung bis zur Abschilferung etwa 28 Tage (Freinkel et al. 2001).

Die Haut ist für verschiedene Prozesse der Homöostase wichtig. Von entscheidender Bedeutung ist die Barrierefunktion der Haut die zum Schutz des gesamten Körpers

I Einleitung

beiträgt. Die Hautbarriere ist an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt und kontrolliert die Wärmeaustauschrate zwischen Körper und Umgebung. In der Haut sind viele sensorische Nervenfasern zu finden. Diese dienen zur Wahrnehmung verschiedener Stimuli, wie Hitze, Kälte, Ortung von Druckstellen und Schmerz. Zusätzlich zu den physiologisch regulativen Aufgaben gewährleistet die Barriere der Haut auch den Schutz des Körpers vor schädlichen Substanzen aus der Umwelt und fungiert als erste Abwehrlinie gegen pathogene Erreger wie Pilze, Bakterien, Viren und Parasiten. Ernsthafte Schädigungen der Haut, die eine oder mehrere dieser Aufgabenbereiche einschränken oder blockieren, können schwerwiegende Folgen haben. Der Körper reagiert schon auf kleinste Beeinträchtigungen der Haut wie oberflächliche Wunden mit der Induktion von Reparaturmechanismen (Ekanayake-Mudiyanselage et al. 1998). An der Barriere-reparatur beteiligt sind verschiedene Zytokine, die Prozesse wie Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten steuern. Von TNF- α , IL-1 α und IL-1 β , Amphiregulin, NGF sowie von IL-6 wurde eine Beteiligung an der Barriere-reparatur bereits beschrieben (Wood et al. 1992; Wood et al. 1997; Liou et al. 1997; Wang et al. 2004b).

Treten ernstere Verletzungen auf, bei denen neben der Epidermis auch die Dermis geschädigt ist, tritt ein mehrstufiges Reparatursystem in Kraft. Erstens wird eine Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von Entzündungszellen zum Schutz der Wunde und damit des Organismus vor eindringenden Erregern aus der Umwelt eingeleitet. Zweitens wird die Gewebebildung und drittens die Gewebedifferenzierung eingeleitet (Singer et al. 1999). Die einzelnen Phasen überlappen hierbei. Zum Teil werden in der Literatur noch ergänzende Stufen wie eine Induktion der Blutgerinnung beschrieben. Um die Integrität der Haut zu erhalten, ist ein ausgefeiltes Netzwerk von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Proteasen nötig.

1. Chemokine

Das erste Chemokin, welches beschrieben wurde ist das Interleukin-8 (IL-8). Es gehört zu den CXC-Chemokinen und wurde als potentes chemotaktisches Molekül für Neutrophile entdeckt (Yoshimura et al. 1987). Mit der Zeit änderte sich das Bild von den Chemokinen. Wurden ihnen am Anfang nur Funktionen als chemotaktische Moleküle für verschiedenen Arten von Immunzellen zugeschrieben, daher auch der Name „**chemoattractant cytokine**“, so wurden im Lauf der Jahre immer vielfältigere Funktionen entdeckt. Durch ihre Diversität sind Chemokine an einer Fülle von biologischen Prozessen beteiligt sind. Unter anderem sind sie an der Reifung der Leukozyten, dem Wandern von Lymphozyten ins Lymphsystem und der Entwicklung von lymphatischen Gewebe beteiligt (Baggiolini 1998). Sie initiieren die Extravasation von Leukozyten. Dies ist ein mehrstufigablaufender Prozess, den man formal in die sich überlappenden Phasen „initialer Kontakt“, „Leukozytenrollen“ („*rolling*“), „feste Adhäsion“ und „Diapedese“ einteilen kann (Springer 1994; Butcher et al. 1996). Durch die Bindung von Chemokinen an Leukozyten, verändern diese ihr Zytoskelett und die Expression von Integrinen, die die Adhäsion an die Endothelzellen der Blutgefäße vermitteln (Springer 1994).

Durch die koordinierte Interaktion von verschiedenen Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden an der Gefäßwand und am Leukozyt gelangen Immunzellen an ihren Zielort, d.h. in das entzündete Gewebe bzw. in die lymphatischen Organe. Die chemotaktische Wirkung von Chemokinen konnte an Mäusen durch intradermale Injektion gezeigt werden. Bei den Versuchstieren bildeten sich nach der Injektion von Chemokinen in die Haut Immuninfiltrate (Meurer et al. 1993).

Kategorisiert werden Chemokine nach ihrer Fähigkeit, als chemotaktisches Molekül für Immunzellen zu wirken, und über strukturelle Homologien. Charakteristischerweise sind sie basische heparinbindende, lösliche Proteine, mit einer Länge von 70 bis 80 Aminosäuren und einem Molekulargewicht zwischen 7 und 16 kDa. Die Chemokindomäne besteht aus drei antiparallelen β -Faltblättern am N-Terminus, gefolgt von einer α -Helix am C-Terminus (Mantovani et al. 2004). Chemokine gliedern sich in vier Gruppen, die am N-terminalen Ende zwischen zwei und vier hochkonservierte Cystein-Reste besitzen. Bei der CXC-Chemokin-Familie werden die ersten beiden N-terminalen Cysteine durch eine beliebige Aminosäure

I Einleitung

getrennt (X steht für diese), während bei der CC-Familie die beiden Cysteine direkt aufeinander folgen. Die Familie der C-Chemokine besitzen an dieser Stelle der Sequenz nur ein Cystein, während bei den CX3C-Chemokinen drei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen liegen (Baggiolini et al. 1997; Ward et al. 1998).

Für die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor sind zwei Regionen des Chemokins verantwortlich. Zum einen die N-terminale Region und zum anderen eine sogenannte „*loop*“-Struktur zwischen den β -Faltblattstrukturen, die zwischen dem zweiten und dritten Cystein herausragen. Die *loop*-Region wird als erstes erkannt, und diese Interaktion scheint wichtig für die Präsentation des N-Terminus zu sein (Clark-Lewis et al. 1995). Die Aminosäuren am N-terminalen Ende sind für die biologische Aktivität entscheidend. Wird zum Beispiel beim MCP-1-Chemokin in dieser Region eine Aminosäure ausgetauscht, wird die biologische Aktivität um den Faktor 100 bis 1000 verringert (Gong et al. 1995).

Chemokinrezeptoren sind 7-Transmembranrezeptoren, die G-Protein-gekoppelt sind. Durch Versuche mit Pertussis-Toxin konnte gezeigt werden, dass es sich um heterotrimere G-Proteine der G_i -Klasse handelt (Neer 1995). Die Aktivierung eines Chemokinrezeptors induziert die G-Proteinabhängige Inhibierung der Adenylatcyclase, die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), der Phospholipase C, der Proteinkinase C (PKC) und der Proteinkinase A. Dies führt zur Bildung von Inositoltriphosphat und verursacht einen intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration (Ward et al 1998).

Nachdem die Rezeptoren das Signal weitergeleitet haben, folgt eine vollständige oder eine Teilinaktivierung. Dies geschieht durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten, die intrazellulär am C-Terminus lokalisiert sind. Anschließend werden die Rezeptoren internalisiert und entweder abgebaut oder dephosphoryliert und wieder an die Zelloberfläche transportiert (Murdoch et al. 2000; Moser et al. 2004).

1.1 Das membranständige Chemokin CXCL16

Es gibt zwei Sonderfälle unter den Chemokinen. Zum einen CX3CL1 (Fraktalkin) und zum anderen CXCL16. Die Besonderheit an diesen Chemokinen ist, dass sie Typl-Transmembranmoleküle sind (Bazan et al. 1997; Matloubian et al. 2000). Beide besitzen eine kurze cytoplasmatische Domäne, eine einzelne membran-durchspannende α -Helix, eine extrazelluläre stark glykosylierte Domäne und eine globuläre 10 kDa Chemokindomäne. Die Abb.1 stellt das Chemokin CXCL16 schematisch dar.

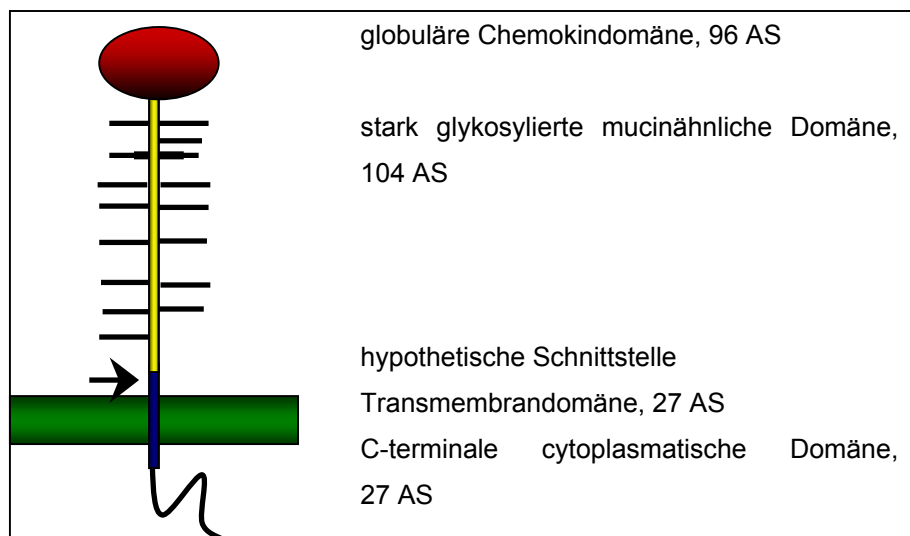


Abb.1: Schematische Darstellung von CXCL16. CXCL16 besitzt 4 Domänen, die Chemokindomäne, die mucinähnliche Domäne, die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne.

CXCL16 wurden bisher verschiedene biologische Aktivitäten zugeschrieben. So fungiert es membranständig als „*scavenger receptor*“ für oxidiertes „*low density lipoprotein*“ (LDL) bei Makrophagen (Shimaoka et al. 2000; Minami et al. 2001). Neben der Fähigkeit, oxidiertes LDL zu binden, kann CXCL16 als membranständiges Molekül ebenfalls an den Chemokinrezeptor CXCR6 binden und auf diese Weise den Zell-Zell-Kontakt vermitteln (Shimaoka et al. 2004). CXCL16 wird aber nicht nur als Zelloberflächenmolekül gefunden, sondern kann auch an der Zelloberfläche proteolytisch gespalten werden. In Fibroblasten und Endothelzellen wird es konstitutiv von ADAM10 geschnitten (Abel et al. 2004; Gough et al. 2004). Die Proteolyse kann durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verstärkt

werden. Die verstärkte Proteolyse ist aber nicht von ADAM10-abhängig, sondern erfolgt durch ADAM17 (Abel et al 2004; Ludwig et al. 2005). Als lösliches Chemokin wirkt CXCL16 chemotaktisch auf CXCR6-exprimierende Zellen wie T-Lymphozyten und Plasmazellen des Knochenmarkes (Matloubian et al 2000; Nakayama et al. 2003; Geissmann et al. 2005).

2. Adhäsionsmoleküle und Cadherine

Die Organisation eines Epithels beruht auf dem festen Kontakt der Epithelzellen untereinander und der Epithelzellen zur extrazellulären Matrix. Bei diesen Interaktionen stellen membranständige Oberflächenproteine einen Kontakt zwischen dem intrazellulären Zytoskelett und der angrenzenden Zelle oder der extrazellulären Matrix her. Ferner wird durch diese Adhäsionsmoleküle die Gewebs- und Organstruktur von mehrzelligen Organismen bestimmt. Zu den membrangebundenen Adhäsionsmolekülen zählen Integrine, Selektine, Proteine der Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine (Blobel 1997). Durch Kombination verschiedener Adhäsionsmoleküle kann die Gewebeintegrität gewährleistet werden und in der Embryogenese die Entwicklung und das Wanderverhalten von Zellen gesteuert werden. Außerdem regulieren Zelladhäsionsmoleküle die dynamischen Prozesse der Morphogenese, der Regeneration von Organen und den generellen Ablauf des Zellverhaltens (Wagener et al. 1999).

Integrine vermitteln als Zellmembranrezeptoren die Adhäsion zwischen Epithelzellen und der extrazellulären Matrix. Sie sind Heterodimere und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bisher sind 18 unterschiedliche α - und acht β -Untereinheiten bekannt (Seftor et al. 1999). Integrinrezeptoren erkennen kurze Peptidsequenzen von Matrixproteinen, wie zum Beispiel die in Fibronectin und Vitronectin vorkommende RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp). Integrine vermitteln nicht nur Adhäsion, sondern sind auch in der Lage die Genexpression von Zellen zu regulieren. Intrazellulär interagieren die Integrine mit dem Zytoskelett über Bindung an Talin, Vinkulin, Tensin, Aktinin und mit Signaltransduktionsmolekülen wie z.B. Tyrosinkinase der src-Familie oder FAK (*focal adhesion kinases*) (Stupack et al. 2000; Liotta et al. 2001; Eliceiri et al. 2002).

I Einleitung

Selektine sind stark glykosylierte Adhäsionsmoleküle, die kalziumabhängig sind. Sie besitzen extrazellulär am N-Terminus eine Lektindomäne und eine EGF-ähnliche Domäne. Zur Familie der Selektine gehören drei Mitglieder. Von Leukozyten wird das L-Selektin gebildet, von zytokinaktivierten Endothelzellen das E-Selektin und von Thrombozyten und Endothelzellen das P-Selektin (Kansas 1996; McEver 2002). Dadurch dass Selektine den initialen Kontakt zwischen Endothel und Lymphozyten ermöglichen, sind sie von großer Bedeutung bei dem Einleiten des sogenannten „*rolling*“ bei der Diapedese von Leukozyten (Tedder et al. 1995; Vestweber et al. 1999).

Die Immunglobulin-Superfamilie ist eine heterogene Gruppe von transmembranen Zelladhäsionsmolekülen. Charakteristisch für diese Familie ist die unterschiedliche Anzahl von Immunglobulin-Domänen. Die Adhäsion wird entweder als Hetero- oder Homo-Dimer vermittelt und ist, im Gegensatz zu der von Cadherinen und Integrinen vermittelten Adhäsion, unabhängig von Kationen. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind Mel-CAM/MUC18 (*melanocytic cell adhesion molecule*; CD146), ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*) und NCAM (*neruronal cell adhesion molecule*) (Aplin et al. 1998; Bogenrieder et al. 2003).

Cadherine sind eine weitere Superfamilie von Adhäsionsmolekülen. Bei Vertebraten und Invertebraten sind bisher mehr als 100 Mitglieder bekannt (Nollet et al. 2000). Die Cadherine teilen sich in fünf verschiedenen Unterfamilien auf. Zu den klassischen Cadherinen vom Typ 1 gehören Epitheliales (E)-, Neuronales (N)- und Placentales (P)-Cadherin. Dieser Gruppe sehr ähnlich sind die Cadherine vom klassischen Typ 2 wie „*vascular/endothelial cadherin*“ (VE)-Cadherin. Des weiteren gibt es noch die Gruppe der desmosomalen Cadherine mit Vertretern wie Desmoglein und Desmocollin. Der Unterfamilie der Protocadherine wird vor allem eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems zugeschrieben, aber auch bei der Bildung der Somiten. Die fünfte Unterfamilie der Cadherine bilden die Sieben-Domänen-Cadherine. Sie besitzen sieben Cadherin-Domänen und einen etwa 25 Aminosäuren umfassenden cytoplasmatischen Anteil (Gessner et al. 2000). Allen Subfamilien liegt ein genereller identischer Aufbau zugrunde. Sie sind glykosylierte Transmembranproteine, die durch Wiederholungen der sogenannten „*cadherin repeats*“ gekennzeichnet sind. Letztere ähneln sehr stark den globulären Strukturen

der Immunglobuline (Shapiro et al. 1995). Klassischerweise wird durch homologe Interaktion die Adhäsion vermittelt. Die Cadherinvermittelte Adhäsion ist kalziumabhängig. Gebildet werden die unterschiedlichen Cadherine in zahlreichen Geweben (Geiger et al. 1992).

2.1 Epitheliales Cadherin

Epitheliales Cadherin (E-Cadherin) gehört zu den klassischen Typ 1-Cadherinen. Es besteht aus einer 80 kDa großen extrazellulären Domäne, einer 15 kDa großen Transmembrandomäne und einer 15 kDa großen cytoplasmatischen Domäne. Die von E-Cadherin vermittelte Adhäsion basiert auf einer Homodimerbildung, der Verankerung von E-Cadherin in der Zellmembran und der Bindung ans Zytoskelett. Verantwortlich für die Homodimerisierung ist die extrazelluläre Domäne. Diese besteht aus fünf Einheiten von je 110 Aminosäuren (EC1-EC5). Entscheidend hierbei ist die N-terminale Domäne EC1, die in ihrem C-terminalen Bereich die Aminosäuresequenz His-Ala-Val besitzt. Diese Sequenz scheint für die trans-Erkennung der Cadherine wichtig zu sein (Shapiro et al 1995; Nagar et al. 1996). Bei der Interaktion lagern sich die extrazellulären Domänen parallel aneinander und bilden Dimere. Der exakte Ablauf der Dimerisierung ist bisher nicht komplett aufgeklärt. Bei N-Cadherin werden hydrophobe Interaktionen vermutet, während bei E-Cadherin die Kalziumionen entscheidend sind (Shapiro et al 1995; Nagar et al 1996). Um eine physikalische Verankerung in der Zelle zu haben, ist E-Cadherin an die Membran gebunden und über Catenine mit dem Aktinzytoskelett verbunden. β -Catenin bindet an das C-terminale Ende von E-Cadherin. α -Catenin verbindet schließlich β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett. α -Catenin ist mit dem Vincullin verwandt, welches an integrinabhängiger Adhäsion beteiligt ist. Weitere cytoplasmatische Proteine, die an Cadherine binden, sind Tyrosinphosphatasen und p120, welches eine regulatorische Funktion besitzt (Reynolds et al. 1994; Shibamoto et al. 1995; Staddon et al. 1995). Der Aufbau von E-Cadherin ist in Abb.2 dargestellt.

I Einleitung

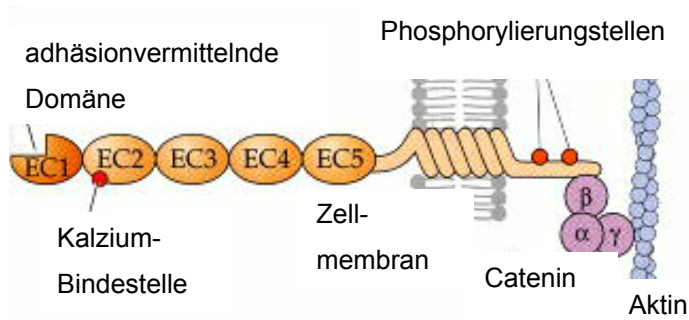


Abb.2: Schematische Darstellung von E-Cadherin. Zu sehen sind die fünf extrazellulären N-terminalen Domänen EC1 bis EC5, die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne. Dargestellt ist auch die Verknüpfung an das Aktin des Zytoskeletts durch α -, β - und γ -Catenin. (Abbildung verändert nach (Gilbert 2000).)

Exprimiert wird E-Cadherin in Epithelien und während der Embryogenese. Es wird als maternales Transkript und Protein schon im Einzellstadium bereitgestellt (Ogou et al. 1982; Collins et al. 1995; Ohsugi et al. 1996). Bei der Gastrulation ändert sich das Adhäsionsmolekül die Expression der invaginierenden Zellen, die später das Mesoderm bilden (Burdal et al. 1993; Huber et al. 1996). Die Zellen des Ektoderms und des Endoderms exprimieren E-Cadherin weiter (Nose et al. 1987; Butz et al. 1995). Bei der Einfaltung des Neuralrohrs beginnen die Zellen des Neuroektoderms auf N-Cadherin-Expression umzuschalten (Hatta et al. 1986; Hatta et al. 1987). Die Änderung des Adhäsionsmolekülmusters bei der Embryogenese ermöglicht es den Zellen, sich von den E-Cadherinexprimierenden Zellen zu lösen und zu migrieren. Somit ist dies ein entscheidender Prozess für die Bildung eines mehrschichtigen Embryos, der später unterschiedliche Organe und zelluläre Strukturen ausbilden wird. Die Embryonen von E-Cadherindefizienten Mäuse sind nicht in der Lage den Trophoblasten und das Blastozoeil richtig auszubilden und können sich auch nicht im Uterus einnisten (Larue et al. 1994; Marrs et al. 1996). Die Adhäsion ist demnach sowohl für die Entwicklung als auch im adulten Lebewesen von entscheidender Bedeutung.

Wie wichtig die korrekte Expression von E-Cadherin in der Epidermis ist, zeigen Versuche an hautspezifischen konditionalen E-Cadherin-defizienten Mäusen. Die Mäuse sterben innerhalb einer Stunde nach der Geburt an erhöhtem Wasserverlust (Tunggal et al. 2005). Die disfunktionelle Barriere scheint aber nicht primär von Abwesenheit von E-Cadherin und den damit einhergehenden Adhäsionsverlust verursacht zu sein, denn die fehlende Adhäsionson wird zum Teil von P-Cadherin

I Einleitung

kompensiert. Viel entscheidender scheint der Einfluß von E-Cadherin auf die Ausbildung von funktionsfähigen *tight junctions* zu sein, denn der E-Cadherin-abhängige Zell-Zell-Kontakt ist nötig, um funktionelle *tight junctions* auszubilden (Tunggal et al 2005). Neben der Zell-Zell-Interaktion ist E-Cadherin über β -Catenin am WNT-Signalweg beteiligt. Liegt β -Catenin im Zytosol vor, hat es eine kurze Halbwertszeit und wird schnell abgebaut. Erst die Bindung an E-Cadherin an der Zellmembran oder die Aktivierung der *frizzeld*-Rezeptorfamilie schützt β -Catenin vor der Degradation. Wenn es in den Zellkern translokalisiert, bindet es an den „*lymphocyte enhancer binding factor1/T-cell factor*“ und trägt zur Aktivierung der Transkription von Genen wie CyclinD1 bei, welches an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist (Cavallo et al. 1997; Tetsu et al. 1999). Kommt es zur verminderten Expression von E-Cadherin, so wird vermehrt β -Catenin im Zellkern nachgewiesen (Orsulic et al. 1999). Dies hat fatale Folgen für den Organismus, da es zur Tumorprogression kommt. Bei Melanomen kommt es im Laufe der Tumorprogression zu einer verminderten Expression von E-Cadherin. Dadurch verschlechtert sich die Adhäsion der Melanomzellen an die umgebenden Keratinozyten, und es kommt zu einem Auswandern von Melanomzellen aus dem Ursprungstumor und somit zur Metastasenbildung (Silye et al. 1998).

3. Die ADAM-Familie

ADAM10 und ADAM17 gehören zur der „*a disintegrin and metalloproteinase*“ (ADAM) Proteasenfamilie. Die ADAMs sind an vielen verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt wie Kontrolle von Membranfusion, Muskelentwicklung, Zellschicksalbestimmung bei der Entwicklung, Zellmigration und Entzündungsreaktionen im adulten Organismus (Seals et al. 2003).

ADAMs werden im gesamten Tierreich gefunden vom Protozoen bis zum Säugetier. Bisher sind mehr als 30 ADAM-Orthologe bekannt. Alle gehören zu den Metzinkinen, einer Unterfamilie der Metalloproteinasen, und teilen deren charakteristischen Domänenbau (Seals et al 2003; White 2003; Becherer et al. 2003). ADAMs sind integrale Typ1-Transmembranproteine. Am N-Terminus befindet sich die Prodomäne, die für die Aktivierung abgespalten werden muss. Für ADAM17 und ADAM10 wird Furin oder die Proprotein Konvertase PC7 als aktivierende Protease diskutiert. (Endres et al. 2003). An die Prodomäne schließt sich die katalytische Metalloproteasedomäne an, gefolgt von der Disintegrindomäne, einer cysteinreichen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, einer Transmembran Domäne und dem C-terminalen Fragment (Abb.3).



Abb.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der ADAM-Proteasen. Charakteristischer Weise enthält eine ADAM-Protease eine Prodomäne, eine Metalloproteasedomäne, eine Disintegrin-Domäne (DI), eine cysteinreiche Domäne, eine *Epidermal Growth factor-like* Domäne (E), eine Transmembrandomäne (TM) und eine C-terminale Domäne (C-T).

Die EGF-ähnliche Domäne ist nur bei einem Teil der ADAMs vorhanden. Es scheint, dass neben der proteolytischen Aktivität, Zell-Zellkontakte über ADAMs vermittelt werden können. So wurde die erste entdeckte Disintegrin-Metalloprotease, Fertilin bei einem Screen für monoklonale Antikörper gegen Spermienoberflächenproteine des Meerschweinchens entdeckt (Primakoff et al. 1987; Blobel et al. 1992). Fertilin- α und - β binden an Integrine auf der Oberfläche der Eizellen, was essentiell für die Fusion von Spermium und Eizelle zu sein scheint (Evans et al. 1995; Almeida et al. 1995; Shilling et al. 1997; Evans et al. 1997a; Evans et al. 1997b).

I Einleitung

Etwa der Hälfte der bekannten ADAMs fehlen wichtige Aminosäuren in ihrer Sequenz, die essentiell für die proteolytische Aktivität sind (White 2003; Blobel 2005). Zur Zeit sind 17 ADAMs mit proteolytischer Aktivität bekannt, die alle ein zinkbindendes Motiv mit der Sequenz HEXXHXXGXXH (X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure) aufweisen. Zu den proteolytisch aktiven Metalloproteasen zählen ADAM8, 9, 10, 12, 15 und 17. Die Substrate, die von den ADAMs proteolytisch gespalten werden, sind sehr vielfältig. Es werden Typl und Typll, glykosylphosphatidylinositolverankerte und indirekt an die Membran gebundene Proteine geschnitten. Die posttranslationale Modifikation der Abspaltung der extrazellulären Domänen (Ektodomänen) von membranständigen Proteinen wird als „*shedding*“ bezeichnet. ADAM10 und ADAM17 sind die Proteasen, für die im Vergleich zu anderen ADAMs die meisten Substrate beschrieben worden sind. Daher beruht das aktuelle Wissen über ADAM-abhängiges Ektodomänen-*shedding* auf Untersuchungen an diesen beiden ADAMs (Huovila et al. 2005a). Oftmals kann ein Substrat von mehreren ADAM-Proteasen geschnitten werden.

Um zu verstehen, wie es den ADAM-Proteasen möglich ist, selektiv Substrate zu schneiden, gerade im Hinblick auf die Redundanz der Substrate und Unterschiede in der Proteolyse in verschiedenen Zelltypen, ist es wichtig zu untersuchen, welche Faktoren zur Substraterkennung und welche für die Regulation der Proteolyse wichtig sind. So sind bei einigen ADAM-Proteasen Aminosäurereste in den flankierenden Regionen der Schnittstelle des Substrates entscheidend. Dies scheint aber nicht definitiv essentiell zu sein, da Mutations-Studien zeigten, dass Substrate trotz Aminosäureaustausch weiterhin geschnitten werden konnten. Die Variabilität der Schnittstellensequenzen bei verschiedenen Substraten setzt eine Toleranz des katalytischen Zentrums voraus. Demzufolge konnte keine Konsensussequenz in den Substraten gefunden werden (Black et al. 2003; Seals et al 2003; White 2003).

3.1 ADAM17

Die erste ADAM-Protease, die mit „*shedding*“ in Verbindung gebracht wurde, war ADAM17. Es wurde entdeckt, dass ADAM17 verantwortlich für die proteolytische Spaltung von dem Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) ist. Dementsprechend ist der alternativ Name „*tumor nekrosis factor- α converting enzyme*“ (TACE) (Gearing et al. 1994; Black et al 2003). ADAM17 ist an entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. So zeigte sich bei Mäusen, dass ADAM17 nötig ist, Epithelien während der Embryogenese korrekt auszubilden (Peschon et al. 1998a). Des weiteren ist ADAM17 bei der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt. ADAM17 schneidet nicht nur TNF- α , sondern auch die Zytokine CX3CL-1 und TRANCE, sowie die Rezeptoren CD30, CD40, IL-1-Rezeptor-II, IL-6-Rezeptor, IL-15-Rezeptor, TNF-Rezeptor I und TNF-Rezeptor II (Peschon et al 1998a; Garton et al. 2001; Hundhausen et al. 2003; Matthews et al. 2003; Black et al 2003; Becherer et al 2003; Contin et al. 2003; von Tresckow et al. 2004; Budagian et al. 2004).

Wie wichtig die Beteiligung von ADAM17 an der Regulation von Zytokin-Netzwerken ist, zeigte sich an Mäusen die defizient für TIMP-3 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-3*) sind, einen endogenen Inhibitor von ADAM17. Durch das Wegfallen der Inhibition wiesen diese Tiere verstärkte ADAM17-Aktivität und damit verstärkte TNF- α -Proteolyse auf. Dies führte zu einer verstärkten Infiltration der Leber durch Lymphozyten und hatte Nekrose als Folge. Die Mäuse starben alle an Leberversagen (Mohammed et al. 2004).

Neben der Regulation von Zytokinen und Zytokinrezeptoren ist ADAM17 ebenfalls an der Regulation von Wachstumsfaktoren und Wachstumshormonen beteiligt. So werden verschiedene Mitglieder der EGF-Familie geschnitten wie TGF- α (Lee et al. 2003; Shi et al. 2003; Hinkle et al. 2004; Sahin et al. 2004).

Nicht nur die verstärkte Aktivität, sondern auch das Fehlen der Aktivität führt zu ausgeprägten Defekten. So sterben ADAM17-defiziente Mäuse kurz nach der Geburt. Sie weisen einen ähnlichen Phänotyp wie TGF- α - und EGF-Rezeptor-defiziente Mäuse auf. (Peschon et al 1998a). Charakteristisch für diese Mäuse sind Entwicklungsdefekte an Epithelien und am Herzen (Peschon et al 1998a; Zhao et al. 2001; Jackson et al. 2003; Shi et al 2003; Hinkle et al 2004; Sahin et al 2004).

3.2 ADAM10

ADAM10 wurde aus dem Rinderhirn isoliert, zuerst als „*myelin basic protein-degrading enzyme*“ beschrieben und später als ADAM10 klassifiziert (Chantry et al. 1989). Das Ortholog Kuzbanian in *Drosophila melanogaster* ist für die proteolytische Spaltung von Notch verantwortlich. Der Delta/Notch Signalweg ist unter anderem verantwortlich für die sogenannte Lateralinhibition bei der Augenentwicklung, bei der Neurogenese, bei der Flügelentwicklung und bei der Venenentwicklung von *Drosophila melanogaster* (Rooke et al. 1996; Sotillos et al. 1997; Pan et al. 1997a). Ebenfalls ist Kuzbanian an der Regulation vom Axonwachstum und von Axonwachstumskegeln im zentralem Nervensystem beteiligt (Hattori et al. 2000; Schimmelpfeng et al. 2001).

Während der Entwicklung von Vertebraten ist ADAM10 an entscheidenden Prozessen beteiligt. So zeigen ADAM10-defiziente Mäuse sehr schwerwiegende Entwicklungsdefekte bei der Neurogenese, in den Somiten und im Kardiovaskularsystems. Außerdem ist der Notch-Signalweg gestört. Die Mäuse sterben pränatal am Tag 9.5 der Entwicklung (Hartmann et al. 2002). Bei Vögeln wird ADAM10 während der Entwicklung im Dermatom und Myotom der Somiten, in der Epidermis, im Darm, im Nierenepithel, in der Leber, im Herz und in der Neuralleiste exprimiert (Hall et al. 2003). Genau wie ADAM17 ist ADAM10 aber auch an verschiedenen Prozessen und Regulationsnetzwerken im adulten Organismus beteiligt. Es ist für die Proteolyse der Zytokine CX3CL1, CXCL16 und TNF- α verantwortlich (Abel et al 2004; Gough et al 2004). Ebenso zählen die Wachstumsfaktoren Betacellulin, EGF und HB-EGF zu den ADAM10-Substraten (Sahin et al 2004). Der einzige Zytokinrezeptor, der bis jetzt als Substrat bekannt ist, ist der IL-6-Rezeptor (Matthews et al 2003).

3.3 Funktionen von ADAM Proteasen in der Haut

Zytokine, Chemokine und Proteasen fungieren als ein funktionelles Regulationsnetzwerk, und Fehlregulation haben schwerwiegende Folgen für die Haut. Es konnte an Mäusen gezeigt werden, dass durch Deletion der Transkriptionsfaktoren JunB und c-Jun die Regulation des Zytokinmusters der Haut

I Einleitung

so verändert wurde, dass ein Hautphänotyp entsteht, der psoriatisch erkrankter Haut beim Menschen gleicht. Es wird vermutet, dass durch die Dysregulation dieser Transkriptionsfaktoren die Zytokinexpression angeregt wird. Dies hat wiederum zur Folge, dass Makrophagen und Neutrophile chemotaktisch in die Haut gelangen und zum veränderten Hautphänotyp beitragen (Zenz et al. 2005). Einhergehend mit der Induktion der Entzündungsreaktion und der Infiltration durch Makrophagen und Neutrophile ist eine Hochregulation der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinase ADAM17 beschrieben worden (Kawaguchi et al. 2005). Erhöhte Mengen verschiedener löslicher Faktoren, die als ADAM17-Substrat bekannt sind wie „*transforming growth factor- α* “ (TGF- α), TNF- α , die TNF- α -Rezeptoren p55 und p75 wurden in psoriatischer Haut nachgewiesen (Elder et al. 1989; Partsch et al. 1998; Kawaguchi et al 2005).

Ein weiteres Beispiel für eine entzündliche Erkrankung der Haut ist das Ekzem. Charakteristisch für die Krankheit ist eine schuppige, gerötete Haut mit starkem Juckreiz. Das akute Ekzem ist durch die Bildung kleiner epidermaler Bläschen charakterisiert, der sogenannten Spongiose. Dabei weiten sich die intrazellulären Räume zwischen den Keratinozyten bis zur Bläschenbildung auf. Zusätzlich wird eine Hyperkeratose und ein geringes T-Zellinfiltrat perivaskulär in der oberen Dermis und in der Epidermis beobachtet. Mit dem akuten Ekzem geht eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten und eine gestörte Barriere der Haut einher. Die gestörte Barriere erleichtert das Eindringen von schädlichen Stoffen aus der Umwelt in die Haut, was allergische Reaktionen zur Folge haben kann und wiederum das Ekzem verschlimmert. Der molekulare Prozess, der diesen Ereignissen zugrunde liegt, ist bisher nicht bekannt. Auch wenn die Entstehungsmechanismen entzündlicher Hauterkrankungen bisher nicht komplett verstanden sind, können Untersuchungen an ADAM-Proteasen jedoch zu einem besseren Verständnis der Erkrankungen führen und eventuell zu neuen Therapieansätzen führen.

4. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression und die Funktion der Metalloprotease ADAM10 in der Haut und in Keratinozytenzellkultur untersucht werden. Es sollten verschiedenen potentielle Substrate identifiziert und deren Proteolyse und Funktion genauer untersucht werden. Dabei sollte vergleichend im murinen und im humanen System gearbeitet werden.

Als ein potentielles Substrat für ADAM10 wurde das transmembrane Chemokin CXCL16 in der Haut nachgewiesen. Es sollte die Lokalisation der CXCL16 exprimierenden Zellen in der gesunden Haut gezeigt werden. Untersuchungen an murinen und humanen Zellkulturen sollten zeigen, ob CXCL16 *in vitro* proteolytisch von ADAM10 gespalten wird, und ob ADAM17 ebenfalls in diesen Prozess involviert ist. Diese Untersuchungen wurde mit Versuchen mit verschiedenen Metalloproteaseninhibitoren sowie mit siRNA-Experimenten durchgeführt.

Es sollte untersucht werden, welche Stimuli die Proteolyse von CXCL16 in Keratinozyten fördern. Um auf eine mögliche Rolle für CXCL16 in der Haut schließen zu können, sollte durch immunhistologische Färbungen die CXCR6 rezeptorpositiven Zellen in gesunder Haut lokalisiert werden.

Als ein weiteres potentielles Substrat von ADAM10 in der Haut wurde E-Cadherin untersucht. Es sollte durch Metalloproteaseninhibitoren, siRNA-*knockdown*-Versuche und Übertransfektion von ADAM10 gezeigt werden, dass ADAM10 für die Proteolyse von E-Cadherin verantwortlich ist. Ferner sollte untersucht werden, ob die ADAM10-abhängige Proteolyse eine Rolle bei der Entstehung von spongiotischen Bläschen im akuten Ekzem spielt. Es wurden Proben Ekzem erkrankter Haut mittels *western blot* und Immunhistologie untersucht.

II. Material und Methoden

Der Material- und Methodenteil stellt eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise bei den vorgenommenen Experimenten dar. Detaillierte Information über verwendete Chemikalien, Pufferzusammensetzungen und Geräte sind im Anhang IX zu finden. Auch die verwendeten Protokolle sind dort in tabellarischer Zusammenfassung zu finden.

1. Versuchstiere und Keratinozyten-Zellkulturen

Um die Funktionen von ADAM10 und ADAM17 in der Haut zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Modellsysteme verwendet. Es wurden Untersuchungen *in vitro* sowie *in vivo* durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene murine und humane Zellkultursysteme genutzt sowie auch die Maus als Versuchstier.

1.1 Versuchstiere und deren Haltung

Zur Untersuchung der Barrierefunktion wurden Tiere der Art *Mus musculus* verwendet. Es wurde haarlose Mäuse des käuflich erhältlichen Stammes SKH-1 von Charles River eingesetzt. Haarlose Mäuse sind bei dermatologischen Untersuchungen von Vorteil, da eine Rasur, die vor Versuchsbeginn zu Hautirritationen führen kann, entfällt. Ursprünglich wurden die SKH-1-Mäuse vom Temple Universitätskrankenhaus in Philadelphia von einem kommerziellen Tierverkäufer in New York erworben und sind weitergezüchtet worden. Die SKH-1-Mäuse gehen auf einen nicht charakterisierten und nicht reinrassigen Mäusestamm zurück. Seit 1986 ist dieser Stamm käuflich bei Charles River erhältlich. Die Mäuse sind immunkompetent. Haarlosigkeit und die Rückführbarkeit auf einen Albinohintergrund gelten als spezielle Merkmale.

Die Mäuse wurden in einem definierten 8 zu 16 Stunden Tag-Nachtrhythmus gehalten. Es wurden Wasser und Presspellets *ad libitum* gegeben. Gehalten wurden die Tiere einzeln in Polycarbonat-Käfigen von 220x160x140 mm Größe mit einem Edelstahlgitter. Ausgelegt waren die Käfige mit handelsüblichem Kleintierstreu.

Die durchgeführten Versuche wurden über den Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

1.2 Präparation und Dispersion der murinen Epidermis zur Herstellung von primären Keratinozytenzellkulturen

Zwei Tage alte Balb/c-Mäuse wurden zum Anlegen der primären murinen Keratinozytenzellkulturen verwendet. Die Mäuse wurden mittels Inhalationsnarkose betäubt, dekapitiert und die Extremitäten abgetrennt. Mit einem dorsolateralen Schnitt wurde die die Haut aufgetrennt und anschließend mit einem Skalpell abgezogen.

Die abgezogene Haut wurde kurz mit PBS gespült und anschließen mit 0,6 U/ml der Protease Dispasell bei Raumtemperatur (RT) für zwei Stunden inkubiert. Dann konnte mit Pinzetten die Epidermis als feines Häutchen von der Dermis abgetrennt werden. Die Epidermis wurde in 5 ml KSFM ++-- gesammelt und anschließend in 10 ml Trypsin/EDTA (Gibco BRL, Eggstein) für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach der Trypsinierung wurden die Zellen mit dem Stempel einer 10 ml Einwegspritze durch ein 100 µm Zellsieb (Falcon) gerieben und zum Abstoppen der Dispersion in Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor aufgefangen. Zum Pelletieren der Keratinozyten wurde für fünf Minuten bei 1200 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml KFSM++++ resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml auf kollagenisierten Kulturplatten ausplattiert.

1.3 Präparation und Dispersion von humanen Keratinozyten für die Zellkultur

Die humanen Keratinozyten für die primäre Zellkultur entstammten aus Vorhäuten, die bei Beschneidungen entfernt wurden.

Als erstes wurde das Unterhautfettgewebe mit einem Skalpell abgekratzt, danach wurde die Haut in kleine Streifen von 1 cm Länge und etwa 3-4 mm Breite zerschnitten. Diese Streifen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer 0,25 %igen Trypsinlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsinisierung wurde DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) verwendet.

Anschließend wurde die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgetrennt, in DMEM-Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen wurden bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Epilife-Medium (Cascade Biologics, Portland, USA) aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden in kollagenisierten 200 ml-Flaschen ausplattiert. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C und gesättigter CO₂-Atmosphäre. Es wurden drei bis vier Passagierungen durchgeführt, bis die Zellen schließlich für Versuche in kollagenisierten 12-Loch-Platten ausplattiert wurden.

1.4 PAM212-Zelllinie

Die PAM212-Zelllinie ist eine murine epidermale Keratinozyten-Zelllinie. Wie diese Zelllinie ursprünglich generiert wurde ist nicht bekannt. Sie fanden erstmals Verwendung zur Untersuchung der Adhäsion von Keratinozyten an verschiedene Substrate (Terranova et al. 1980).

1.5 HaCaT-Zelllinie

Die verwendete HaCaT-Zelllinie ist eine humane, immortalisierte, nicht tumorigene Zelllinie. Generiert wurde diese Zelllinie im Krebsforschungszentrum Heidelberg aus normalen humanen Keratinozyten durch erhöhte Temperatur und geringe

Kalziumkonzentration (Boukamp et al. 1988). Die HaCaT-Zellen finden weltweit Verwendung als Modell für Keratinozyten.

In dieser Arbeit sind schon bestehende Zellen des Forschungslabors der Dermatologie des Universitätsklinikums Kiel weiter kultiviert worden. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum, welches vor der Zugabe bei 65 °C für 30 Minuten inaktiviert wurde. Zusätzlich enthielt das Medium 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin. Kultiviert wurden die HaCaT-Zellen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit CO₂-Begasung in 200 ml-Kulturgefäßen. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage abgenommen und durch frisches auf 37 °C vorgewärmtes ersetzt. Zur Durchführung von Versuchen wurden die Zellen trypsinisiert und auf 12-Loch-Platten ausgesät.

1.6 Beschichtung von Zellkulturschalen

Es wurde eine 0,1 M HCl-Stammlösung hergestellt. Zur Beschichtung wurde Kollagen I aus Rindern verwendet. Die Beschichtungslösung wurde im Verhältnis 1:100 angesetzt, auf die Zellkulturschalen oder sterilen Deckgläser gegeben und für 1 bis 1,5 Stunden bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde zweimal mit PBS gespült. Die beschichteten Zellkulturschalen und Deckgläser konnten über längere Zeit trocken gelagert werden.

2. Durchführung von Tier- und Zellkulturexperimenten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an der Haut von Mäusen durchgeführt. Es handelte sich dabei um Wundheilungsversuche. Außerdem wurden verschiedenen Zellen in Zellkultur benutzt. Es wurden für die Versuche primäre murine Keratinozyten, primäre humane Keratinozyten, die murine Keratinozytenzelllinie PAM212 und die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet. Im Folgenden wird erläutert, wie bei *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen vorgegangen wurde

2.1 Wundheilungsversuche an SKH-1-Mäusen

Um zu überprüfen, ob CXCL16 bei der Wundheilung eine Rolle spielt, wurden Vollhautwunden an Mäusen gesetzt. Die Mäuse wurden Inhalationsnarkose betäubt und es wurde mit je 200 µl PBS an den Stellen gespült, wo später die Wunde gesetzt wurde. Um bei allen Tieren ein vergleichbares Areal zu spülen, wurde aus einem Eppendorf-Pipettiergefäß der Deckel entfernt und mittels einer Schere der obere Teil abgetrennt, so dass eine Art „Schornstein“ übrig blieb. Dieser wurde auf die zu spülende Stelle gelegt und die 200 µl PBS wurden hinein pipettiert. Mit der Pipette wurde drei Mal auf- und abpipettiert und anschließend die 200 µl in ein frisches Eppendorf-Pipettiergefäß pipettiert. Die Spülungen wurden weg gefroren und später mittels mCXCL16-ELISA wie unter 5.1 beschreiben analysiert.

Ein definiertes Areal von 20 mm Durchmesser wurde auf den Flanken der Mäuse mit einem Stift markiert. Anschließend wurde mit einer Schere das Areal ausgeschnitten. Hierbei wurde die Haut komplett entfernt (siehe Abb.1.A).

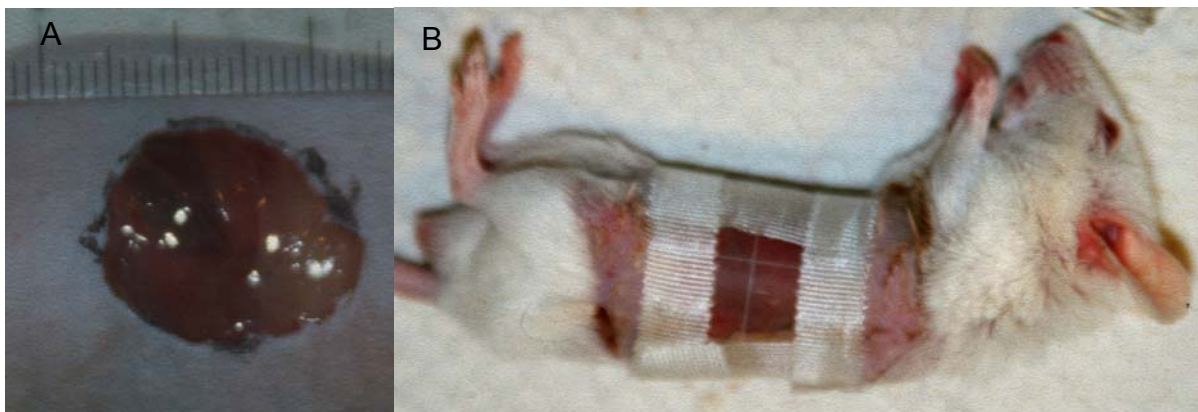


Abb.1: A Foto einer frisch gesetzten Wunde an einer SKH-1-Maus. B Balb/c-Maus nach Anlegung des semi-okklusiven Wundverbandes.

Die frischen Wunden wurden wiederum mit 200 µl PBS gespült. Nach den Spülungen wurden die Mäuse verbunden. Hierfür wurde der semi-permeable Comfeel-Plus Verband (Coloplast) in kleine Stücke geschnitten und passgerecht auf der Wunde aufgebracht. Zur Fixierung des Comfeel-Verbandes wurde selbstklebendes medizinisches Pflaster von Durapore™ verwendet. Es wurde jeden Tag der Verband erneuert. Des weiteren wurden die Wunden jeden Tag mit 200 µl PBS gespült.

2.2 CXCL-16-Proteolyse-Assay

Um zu überprüfen, ob CXCL16 in Keratinozyten von der membrangebundenen Form in die lösliche Form proteolytisch überführt wird, wurde ein Proteolyse-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-90 % inkubiert und dann mit PBS gespült. Anschließend wurden 350 µl frisches Medium appliziert. Da die HaCaT-Zellen und die PAM212-Zellen in einem Medium mit 10 % FCS kultiviert wurden, wurde bei diesen beiden Zelllinien 16 Stunden vor Versuchsbeginn kurz mit PBS gespült und anschließend entsprechendes Medium ohne FCS auf die Zellen gegeben.

Von allen Zellen erfolgten nach Beendigung des Versuches die Abnahme des Mediums und eine spätere Lagerung bei -20 °C. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 350 µl Lysepuffer mit einem Zellschaber von den Kulturschalen gekratzt. Der Lysepuffer bestand aus PBS 1 % Triton X und einem Proteaseinhibitor-Mix von der Firma Roche. Von den Überständen und Lysaten wurden jeweils ELISA-Messungen durchgeführt. Diese sind im Kapitel 5 beschrieben. Zur Expressionsanalyse wurden die Zellen nicht im Lysepuffer aufgenommen, sondern in 1 ml TRIzol (Sigma), und mit einem Zellschaber von den Schalen gelöst. Die RNA-Isolierung wird im Kapitel 6.1 eingehend beschrieben.

2.3 Inhibition der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 durch die Inhibitoren Marimastat, GW280264X und GI254023X

Für die Inhibition von Metalloproteinasen, insbesondere von ADAM 10 und ADAM 17, wurden Hydroxamate, die Chelatbildner sind, verwendet. Den Disintegrin-Metalloproteinasen ist ein aktives Zentrum gemeinsam, welches zur Ausführung der proteolytischen Aktivität im aktiven Zentrum Zn^{2+} -Ionen gebunden haben muss. Werden den Kulturmedien diese Chelatbildner zugesetzt, binden diese das Zink und inaktivieren so die Metalloproteinasen.

II Material und Methoden

Diese Hemmung ist reversibel. Werden die Inhibitoren mit PBS aus den Zellen ausgewaschen und frisches Medium ohne Inhibitoren hinzugefügt, sind die Metalloproteinasen wieder in der Lage, Zink zu binden und ihre proteolytische Aktivität auszuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Metalloproteinasen-Inhibitoren verwendet.

Marimastat stammt von GlaxoSmithKline. Es ist ein Breitbandinhibitor und ist in der Lage, verschieden ADAMs und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zu inhibieren. Marimastat wurde in Konzentrationen von 5 μ M oder 10 μ M eingesetzt.

Zum Inhibieren von ADAM10 und ADAM17 wurde der Inhibitor GW280264X ((2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-(2-methyl-1-propyl) hexanon Säure [(1S)-5-benzyloxycarbamoylamino-1-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyle)-1-pentyl] amide) eingesetzt. Die Endkonzentrationen waren 1, 3 und 5 μ M.

Für die Inhibition von ADAM10 wurde der Inhibitor GI254023X ((2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-(3-phenyl-1-propyl) butanoin Säure [(1S)-2,2-dimethyl-1-methylcarbamoyle-1-propyl] amide) verwendet. Auch hier waren die Endkonzentrationen 1,3 und 5 μ M.

Beide Metalloproteinaseninhibitoren sind durch folgende US-Patente geschützt: Patents US 6 172 064, US 6 191 150 and US 6 329 400.

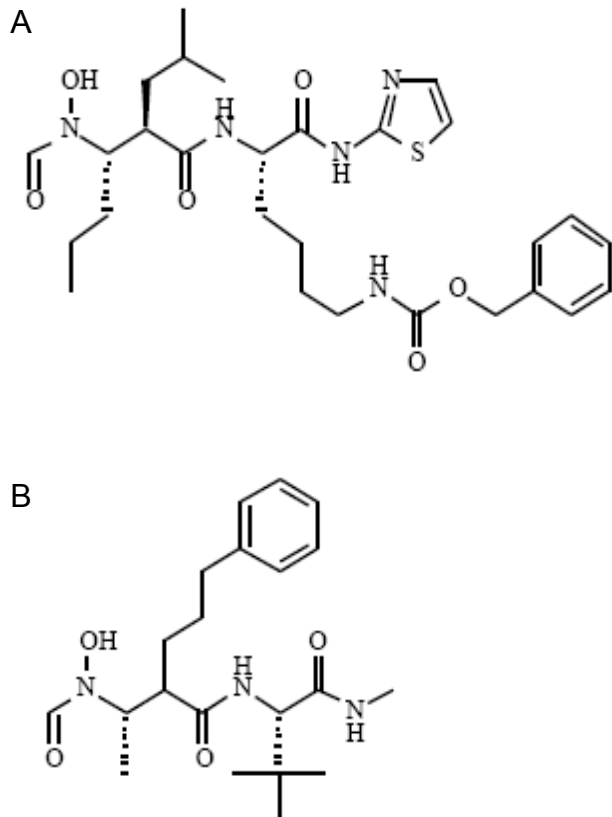


Abb.2: Chemische Formel der Metalloproteinase Inhibitoren GI254023X in A und GW280264X in B.

Vor den Versuchen wurden die jeweiligen Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurden 350 μ l vorgewärmtes Medium mit den Inhibitoren hinzugegeben. Für die ersten Versuche wurden Zeit- und Konzentrationsreihen durchgeführt. Die Inhibitoren wurden 1, 3 und 5 μ M eingesetzt.

2.4 Stimulation von Zellkulturen mit PMA, TNF- α und IFN- γ

Für die Stimulationsexperimente wurden die Zellen zuerst kurz mit PBS gespült und anschließend wurden die einzelnen Stimuli in entsprechender Konzentration in vorgewärmtem Medium hinzugegeben. Es wurden jeweils im gleichen Versuchsansatz die Substanzen einzeln und in Kombination getestet, sowie DMSO und Medium als Kontrolle appliziert. Um die erhöhte proteolytische Aktivität den einzelnen Metalloproteinasen zuordnen zu können, wurden jeweils die Inhibitoren parallel getestet. Die Inhibitoren wurden kombiniert mit den entsprechenden Stimuli

II Material und Methoden

und separat benutzt. Hierbei wurden die drei Inhibitoren Marimastat, GI254023X und GW280264X jeweils 10 μ M eingesetzt. PMA wurde 10 ng/ml und TNF- α und IFN- γ wurden entweder 10 ng/ml oder 20 ng/ml eingesetzt.

Für die Versuche mit PMA wurden die Zellen, die mit dem Inhibitoren behandelt werden sollten, eine halbe Stunde vor Stimulationsbeginn mit den entsprechenden Inhibitoren präinkubiert, um schnelle PMA-Effekte zu inhibieren.

Für alle Stimulationen wurde ein Endvolumen von 350 μ l/Loch eingesetzt.

Die Überstände wurden auf -20 °C gelagert und später direkt im ELISA analysiert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gespült und anschließend in PBS 1 % Triton X mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche abgekratzt. Dem Lysepuffer war zur Inhibierung von Proteasen Complete von Roche zugegeben. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und mittels ELISA analysiert.

2.5 Übertransfektion von ADAM10 in HaCaT-Zellen und in primären murinen Keratinozyten

Die Zellen wurden mit ADAM10-Expressionvektoren transient transfiziert. Die hierfür verwendeten pcDNA-Vektoren wurden mir von Karina Reiss aus dem Institut für Biochemie der Universität Kiel zur Verfügung gestellt.

Es wurden je 2 μ g Vektor DNA und 2 μ l FuGene in 500 μ l antibiotikafreiem Medium gemischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten stehen gelassen. Danach erfolgte die Auftragung des Gemischs auf die Zellen. Nach sechs Stunden im Inkubator wurde das Medium gewechselt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in PBS aufgenommen, pelletiert und weggefroren. Die Zellen wurden in einem 5 mM Tris Lysepuffer mit 1 mM EGTA, 250 mM Succrose und 1 % Triton X-100 aufgenommen und direkt in einer *western blot*-Analyse wie unter 4.2 beschrieben eingesetzt.

2.6 **Gene *knockdown*-Experimente an primären humanen Keratinozyten mit *stealth*-siRNA**

Um die Experimente mit den Metalloproteinaseinhibitoren zu stützen, wurden an primären humanen Keratinozyten mit *stealth*-siRNA (Invitrogen) Experimente durchgeführt.

Bei dieser Methode nutzt man einen posttranskriptionalen Effekt aus, der erstmals 1990 bei Pflanzen beschrieben wurde. Die offizielle Bezeichnung hierfür ist *post-transcriptional gene silencing* (Napoli et al. 1990).

Es wurde von Napoli et al. ein Effekt beschrieben, der nicht nur bei Pflanzen vorkommt, sondern auch bei Tieren. Für die Anwendung in Laboren wurde eine spezielle Form des sogenannten *gene silencing* etabliert, die RNAi-Methode. Diese Methode bestand darin, *antisense*-RNA in Zellen einzubringen und damit spezifisch mRNA zu blockieren und unzugänglich für den Translations-Apparat zu machen. Da hierbei relativ lange Oligo-Nukleotide benötigt wurden und der Erfolg nicht immer garantiert war, wurde weiter versucht, andere Methoden zum spezifischen *Gene knockdown* zu etablieren.

1998 konnte durch das Einführen von kleinen Mengen kurzer, etwa 20 bp langer doppelsträngiger RNAs (dsRNA) in Zellen von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gezeigt werden, dass auf diese Weise spezifisch die Expression von Genen inhibiert werden konnte (Fire et al. 1998).

Dieser *silencing*-Effekt, der durch die *small interfering* RNAs verursacht wird, lässt sich molekular auf einen RNA-Proteinkomplex zurückführen, den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Die Aktivierung des RISC erfolgt dadurch, dass einer der beiden RNA-Stränge den Komplex verlässt. Anschließend kann der Komplex an der komplementären Stelle der mRNA binden und 12 bp entfernt vom 3'-Ende der siRNA schneiden. Dies scheint ein sehr effektiver Mechanismus zu sein, denn es reichen schon geringe Mengen siRNA aus, um eine spezifische Gen-Unterdrückung zu erhalten. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus der Zelle zur Abwehr von Viren und/oder Transposons dient.

II Material und Methoden

Es wurden an den humanen Keratinozyten jeweils drei doppelsträngige *stealth* siRNAs von Invitrogen für ADAM10 und ADAM17 benutzt. Als Kontrolle diente eine dsRNA von Invitrogen, die für den Menschen unspezifische Sequenzen und einen geringen GC-Gehalt enthielt.

Folgende Sequenzen wurden für ADAM 10 benutzt:

Konstrukt 1: 5`-UAC ACC AGU ACA UCU GGU AUU UCC UC-3`

Konstrukt 2: 5`-AAC AGU AGU CAU CAU GAU UCU GCU C-3`

Konstrukt 3: 5`-AGA AUU AAC ACU CUC AGC AAC ACC A-3`

Für ADAM 17 wurden folgende Sequenzen benutzt:

Konstrukt 1: 5`-AUG AGU UGU AAC CAG GUC AGC UUC C-3`

Konstrukt 2: 5`-AUA CAU GAC AUA UUU CCC UCC CUG G-3`

Konstrukt 3: 5`-UAC UGU ACA GGG CUU UCC UUU CCU C-3`

Die Konstrukte wurden für die Transfektionen in einer gewünschter Endkonzentration von 50 µl pro Ansatz verdünnt. Hierfür wurde Epilife-Medium ohne Penicillin und Streptomycin (Epilife++) verwendet, da Antibiotika die Transfektionseffizienz herabsetzen können. Es wurden zum Testen der Transfektionseffizienzen zuerst verschiedene Konzentrationen der siRNAs getestet. Jedes Konstrukt wurde 10, 20 und 30 nM getestet.

Parallel zu den siRNA-Ansätzen wurde für jeden Ansatz 1 µl Lipofektamin 2000 (Invitrogen) in 50 µl Epilife++ pro Ansatz verdünnt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lipofektamin 2000 zu den siRNAs hinzugegeben, stark gevortext, und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit 37 °C warmen Epilife++ auf das Endvolumen von 500 µl pro Ansatz. Die primären Keratinozyten wurden kurz mit 37 °C warmen PBS gespült und jeweils 500 µl pro Ansatz auf die Zellen aufgetragen. Das Medium wurde sechs Stunden nach Transfektion gewechselt. Die Überstände der Zellkulturen wurden mittels ELISA analysiert.

Aus den Lysaten wurde die mRNA isoliert. Die Effektivität des *gene knockdowns* wurde mittels quantitativer *realtime*-PCR bestimmt. Detaillierte Beschreibung der

mRNA-Isolierung, der reversen Transkription und der quantitativen *realtime*-PCR sind im Kapitel 6 zu finden.

3. Immunhistochemie- und indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an humanen und murinen Paraffinschnitten

Zur Untersuchung der ADAM10-, CXCL16-, CXCR6- und E-Cadherin-Expression in der Haut wurden an murinen und humanen Gewebeschnitten immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Antikörper sind lösliche Immunglobuline (Ig) des Blutes, im Gegensatz zu den membranständigen Immunglobulinen (Ig) und den membranständigen Antigenrezeptoren (z.B. TCR), die nicht löslich sind. Es gibt fünf verschiedenen Klassen von Ig: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Zur Klassifizierung dienen Unterschiede in der schweren Kette. Die Hauptklassen können weiter in Subklassen differenziert werden, bei der IgG Klasse ist hierbei die Anzahl der Disulfidbrücken, die im C-terminalen Bereich die beiden schweren Ketten zusammenhalten, entscheidend.

Der prinzipielle Aufbau ist bei allen fünf Ig-Klassen der gleiche. Sie bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten. Das Grundgerüst bilden die beiden schweren Ketten, die über Disulfidbrücken am C-terminalen Ende zusammengehalten werden. Am N-Terminus wird ebenfalls über Disulfidbrücken jeweils eine leichte Kette an eine schwere Kette gebunden. Insgesamt entsteht auf diese Weise eine Y-förmige Struktur (Abb.3). Der variable Anteil, der über die Spezifität eines Antikörpers bestimmt, sitzt am N-Terminus. Die so genannte Fab-Region ist entscheidend dafür, wie gut die Bindungseigenschaften eines Antikörpers an ein Antigen sind. Bei der Wechselwirkung des Antikörpers zum Epitop spielen elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen eine Rolle. Kovalente Bindungen werden hier nicht geknüpft. Wie stark diese Wechselwirkungen sind, entscheidet über die Affinität eines Antikörpers, und somit über die Konzentration in der ein Antikörper eingesetzt werden muss, um eine Absättigung des Antigens mit dem Antikörper zu erreichen.

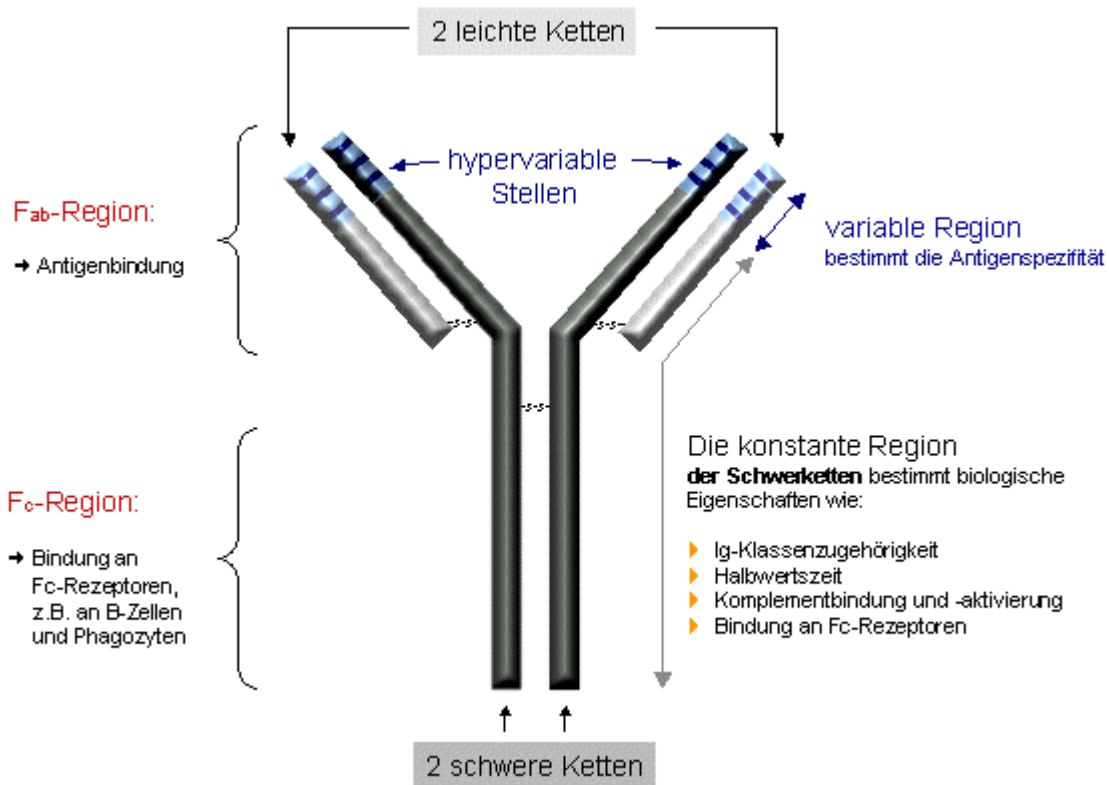


Abb.3: Schematische Darstellung eines Antikörpers (verändert nach: <http://www.hal-allergie.de/allergieinfos/anti.htm>).

Bei der Immunhistochemie, sowie der Immunfluoreszenz macht man sich die Spezifität der Antikörper zu Nutze. Man appliziert den so genannten primären Antikörper, der spezifisch gegen ein Epitop eines Proteins hergestellt wurde, auf einen histologischen Schnitt, und lässt ihn an sein Epitop binden. Um diesen Antikörper und damit das zu untersuchende Epitop sichtbar zu machen, fügt man einen sekundären Antikörper hinzu, der den primären erkennt und bindet. Zum Nachweis der Antikörper verwendet man entweder eine biochemische Reaktion, die durch ein Enzym vermittelt ist wie z.B. die Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase oder Fluorophore für die Fluoreszenzmikroskopie.

3.1 Verwendete primäre Antikörper

Zum Nachweis der endogenen Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden histologische Untersuchungen durchgeführt.

Der verwendete ADAM10-Antikörper von Chemicon ist ein polyklonales Kaninchen-Serum. Zur Immunisierung wurden die letzten 13 Aminosäuren des C-Terminus mit der Sequenz QRPESYQMGHMRR verwendet. Der Antikörper wurde in den murinen und humanen Paraffinschnitten in einer Endkonzentration von 10 µg/ml benutzt.

Der verwendete E-Cadherin-Antikörper von BD-Science ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus. Es wurde die intrazelluläre C-terminale Domäne von Aminosäure 735 bis 883 zur Immunisierung verwendet. Der Antikörper wurde zur Färbung im murinen und humanen System verwendet in einer Konzentration von 1,25 µg/ml.

Für die Färbung von CXCL16 in humanen Paraffinschnitten wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-human Antikörper von R&D Systems verwendet. Zur Immunisierung wurde die in *Escherichia coli* (*E. coli*) rekombinant hergestellte Chemokindomäne des humanen CXCL16 verwendet. Eingesetzt wurde der Antikörper in einer Endkonzentration von 250 µg/ml.

Für die Färbung des CXCR6-Proteins an humanen Schnitten wurde der kommerzielle monoklonale Antikörper aus der Maus von R&D-Systems in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml verwendet.

3.2 Verwendete sekundäre Antikörper

Für die chromogenen Färbungen mit Kaninchen-Antikörpern wurden Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Ziege anti-Kaninchen IgGs von DAKO in Konzentrationen von 1,5 µg/ml verwendet.

Als Sekundär-Antikörper gegen die monoklonalen Maus-Antikörper wurde Ziege anti-Maus HRP 1:5000 verwendet.

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde Cy2 für den 488 nm Wellenlängenbereich und Cy3 für den Wellenlängenbereich 543 nm verwendet. Die Antikörper stammten von Jackson ImmunoResearch und wurden an Paraffinschnitten

1:400 eingesetzt. Es wurde Cy2 Ziege anti-Kaninchen und Cy2 Ziege anti-Maus eingesetzt. Des weiteren fand FITC Ziege anti-Ratte Verwendung.

3.3 Immunhistologische DAB-Färbung an Paraffinschnitten

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Hautpräparate in 4 % Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Anschließend wurde sie mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und dann in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden auf -20 °C gekühlt und anschließend 4-6 µm dick geschnitten, auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Zum Entparaffinieren wurden die Präparate für 40 Minuten auf 64 °C erhitzt und zwei Mal für fünf Minuten in Xylol überführt. Anschließend wurde zur Rehydrierung eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt und die Schnitte am Ende in destilliertem Wasser aufgenommen. Um endogen vorhandene Peroxidasen zu inaktivieren wurde mit 3 % H₂O₂ für fünf Minuten inkubiert. Für alle verwendeten Antikörper haben sich die Antigene nach dem Kochen in Citratpuffer mit pH 6 als am besten zugänglich erwiesen. Dies wurde für 40 Minuten im Wasserbad durchgeführt. Nach dem Kochen ließ man die Schnitte für mindestens 15 Minuten abkühlen, danach wurden sie in destilliertes Wasser gestellt. Anschließend wurden sie drei Mal fünf Minuten lang mit *phosphat buffered saline* (PBS) gespült.

Um durch Paraformaldehyd hervorgerufenen Fixationsartefakte zu minimieren, wurde eine 1 %ige Natriumborhydrid-Lösung für eine Stunde auf die Schnitte aufgetragen. Anschließend wurde vier bis fünf Mal zügig das PBS gewechselt, bis keine Blässchen mehr zu sehen waren. Vor dem Blockieren wurde noch zwei Mal fünf Minuten mit *Tris buffered saline* (TBS) gespült.

Zum Blockieren von unspezifischen Bindungen der Antikörper in den Geweben wurde mit 0,1 % *bovine serum albumin* (BSA) und 0,2 % Glycin in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich enthielt dieser Blockierungspuffer FC-Fragmente vom Schaf. Die FC-Fragmente sollen die antikörpertragenden Zellen der Dermis absättigen und somit ein unspezifisches Binden von primären und sekundären Antikörpern an diese Zellen verhindern.

II Material und Methoden

Nach dem Blockieren wurden die primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Endvolumen von 50 µl pro Schnitt aufgetragen (siehe II 3.2) Die Inkubation erfolgte bei allen verwendeten primären Antikörpern bei 4 °C über Nacht.

Anschließend wurde für zwei Mal für fünf Minuten mit TBS 0,1% Tween (TBS-T) und drei Mal zehn Minuten mit TBS gespült.

Die peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper wurden in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Informationen zu den sekundären Antikörpern sind unter Punkt II 3.2 zu finden.

Die 3,3'-Diamino-Benzidin- (DAB-) Polymerisationsreaktion wurde in dem von Biogenex mitgelieferten 10x Puffer durchgeführt. Dieser wurde mit dem mitgelieferten H₂O₂ und dem DAB in den von dem Hersteller angegebenen Volumina vermischt und auf die Schnitte pipettiert. Nach maximal fünf Minuten Reaktionszeit wurden die Objektträger zum Stoppen der Reaktion in destilliertes Wasser gestellt.

Die Gegenfärbung wurde mit Mayer's Hemalaun (Merck) durchgeführt. Dabei wurden die Schnitte für ca. eine Minute in die Lösung gestellt. Zum Bläuen wurde normales Leitungswasser verwendet, und dieses anschließend durch destilliertes Wasser ersetzt.

Die Schnitte wurden mit Glycergel (DAKO) eingedeckelt, nach Trocknung des Mediums unter dem Mikroskop untersucht und mit einer Digitalkamera von Leica fotografiert.

3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten

Die Präparate der Fluoreszenzfärbungen wurden genauso wie die Präparate für die DAB-Färbungen behandelt. Genauer ist dem vorhergehenden Abschnitt 3.3 zu entnehmen. Unterschiede werden im Folgenden erläutert.

Um Autofluoreszenz der Dermis zu unterdrücken, wurden die Schnitte nach der Natrium-Borhydrid-Behandlung mit Sudan-Schwarz inkubiert. Als erstes wurden die Schnitte für zwei Minuten in 20 %igen Ethanol und für zwei Minuten in 70 %igen

Ethanol inkubiert, danach in 70 %igen Ethanol mit 1 % Sudan-Schwarz für zehn Minuten. Anschließend wurden die Schnitte in 70 %igen Ethanol geklärt, bis keine schwarzen Farbwölkchen mehr aus dem Gewebe kamen. Im Folgenden wurden sie wieder für zwei Minuten in 20 %igen Ethanol gespült. Vor dem Blockieren wurde noch zwei Mal für zehn Minuten mit TBS gespült. Die Färbung mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Genauere Informationen zu den Antikörpern sind dem Abschnitt 2.3 zu entnehmen. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde zwei Mal für fünf Minuten mit TBS-T und drei Mal für zehn Minuten mit TBS gespült.

Nach Applikation der jeweiligen sekundären Antikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Genaue Angaben zu den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern sind dem Kapitel 2.3 zu entnehmen. Zusätzlich zu den Sekundärantikörpern wurde zum Anfärben der Zellkerne der Farbstoff Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) verwendet. Eingesetzt wurde dieser in einer Endkonzentration von 1 µg/ml. Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde zwei Mal für fünf Minuten mit TBS-T und drei Mal für zehn Minuten mit TBS gespült. Eingedeckt wurden die Schnitte in MOWIOL.

Die Analyse erfolgte mit dem *laser scan microscope* (LSM) 510 UV (Zeiss Jena). Die Auswertung wurde mit freeware LSM-Browser, ebenfalls von der Firma Zeiss, durchgeführt.

4. SDS-Gelelektrophorese und *western blot*-Analyse von Keratinozytenzellkulturlysaten

Der *western blot* basiert auf dem Prinzip, dass man in einem Acrylamid-Gel Proteine in einem elektrischen Feld auftrennen kann. Hierbei erhalten die Proteine nach Denaturierung durch die Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) eine starke negative Netto-Ladung, so dass das Laufverhalten im Gel dem Molekulargewicht der Proteine entspricht. Die Proteine werden demnach nach ihrer Größe aufgetrennt.

Nach dem Auftrennen der Proteine können diese auf eine Nitro-Cellulosemembran transferiert werden. Dieser Vorgang wird auch „Blotten“ genannt. Das Blotten wird

ebenfalls mit Hilfe eines elektrischen Feldes durchgeführt. Befinden sich die Proteine auf der Membran, können diese mit Antikörpern und einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung von ADAM10 und der Auswirkung auf die Proteolyse von E-Cadherin wurden *western blot*-Analysen durchgeführt. Im *western blot* kann man zwischen der Präform bei ADAM10 von 98 kDa und der maturen Form von 60 kDa diskriminieren.

Bei E-Cadherin lassen sich anhand von *western blots* Spaltfragmente nachweisen, die Rückschlüsse auf die Prozessierung zulassen.

4.1 Verwendete Antikörper für *western blot*-Analysen

Für die *western blots* wurden folgende primäre Antikörper (AK) verwendet:

Monoclonaler ADAM10-AK (Chemicon), 1:10000 eingesetzt,

monoclonaler E-Cadherin-AK gegen den C-Terminus (BD Bioscience), 1:2500 eingesetzt und

monoclonaler E-Cadherin-AK gegen den N-Terminus (Santa Cruz) 1:1000 eingesetzt.

Zur Detektion wurden mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Ziege anti-Kaninchen- oder Ziege anti-Maus-Antikörper von Jackson Immuno Research in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

4.2 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese und des *western blots*

Es wurde ein 10 %iges Trenngel mit einem Endvolumen von 20 ml gegossen. Dieses bestand aus 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 9650 µl Glycerin, 230 µl SDS, 20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). 5 ml Tris (0,05 M/l, pH 8,8) und 50 µl Ammoniumpersulfat (APS). Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das

II Material und Methoden

Sammelgel gegossen. Dieses bestand aus 625 µl Acrylamid/Bisacrylamid, 3070 µl Wasser, 50 µl SDS, 5 µl TEMED, 1200 µl Tris (1,5 M/l, pH 6,8) und 50 µl APS.

Während das Gel aushärtete wurden die Proben im Auftragspuffer gekocht. Es wurden 10 µg Gesamt-Protein zusammen mit einem definierten Proteingewichtsmarker aufgetragen. Das Gel lief bei 200 V für etwa 45 Minuten.

Whatman-Papiere und eine Cellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und im Blotpuffer, bestehend aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20 % (V/V) Methanol, äquilibriert.

Das Gel wurde auf die Membran gelegt und mit Whatman-Papieren und den Schwämmen bedeckt. Nach dem Schließen der Plastikklemmen wurde das Modul in die *wet blot*-Kammer eingesetzt. Zum Transfer der Proteine aus dem Acrylamid-Gel auf die Zellulosemembran wurde für 45 Minuten eine Spannung von 200 V angelegt. Geblockt wurde nach dem Blotten für eine Stunde mit TBS-T mit 3 % Magermilchpulver. Anschließend wurde in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) der primäre Antikörper in 5 ml TBS-T mit 1,5 % Milchpulver verdünnt. Die Membran wurde vorsichtig an die Innenseite des Röhrchens geschoben, wobei darauf geachtet wurde, dass sie möglichst glatt und ohne Luftblasen an dem Plastik haftete. Es wurde bei 4 °C über Nacht auf einem Rollschüttler inkubiert.

Gespült wurde der *blot* mit TBS-T für drei Mal zehn Minuten, um unspezifisch gebundenen Antikörper vom *blot* zu entfernen. Der peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde in TBS-T verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloss sich ein dreimaliges Spülen mit TBS für zehn Minuten an.

Zur Detektion wurde ECL-Lösung von Amersham verwendet. Diese Detektion beruht darauf, dass die Meerrettichperoxidase ein Substrat chemisch umsetzt und dabei Energie in Form von Chemolumineszenz freisetzt. Diese Chemolumineszenz wurde in einer Dunkelkammer mit einem digitalen Detektionssystem visualisiert.

5. ELISA-Analyse von Überständen und Lysaten aus primären murinen und humanen Keratinozytenzellkulturen

Um zu untersuchen, ob CXCL16 in murinen und humanen Keratinozyten vorkommt und proteolytisch gespalten wird, wurden die Überstände und Lysate mit CXCL16-spezifischem *enzyme linked immunoabsorbend assay* (ELISA) untersucht. Für das murine System wurde das kommerziell erhältliche „ELISA DuoSet mouse CXCL16“ von R&D-Systems verwendet. Für den humanen ELISA wurden die erforderlichen Komponenten separat bestellt und zusammengestellt.

Der ELISA bedient sich eines Enzyms als Marker. Durch den Substratumsatz des Enzyms kann die Antigenkonzentration von den verwendeten Proben quantitativ bestimmt werden.

Die für diese Arbeit verwendeten ELISA sind so genannte „Sandwich“-ELISA. Sie sind spezifischer als die kompetitiven ELISA, da ihr Funktionsprinzip auf zwei unabhängig voneinander hergestellten Antikörpern beruht.

Ein „Fänger“-Antikörper wird an eine ELISA-Platte gebunden. Anschließend wird die Probe aufgetragen und das Antigen bindet an den „Fänger“-Antikörper. Der biotinylierte Detektionsantikörper bindet wiederum an das Antigen. Das Nachweisenzym, die Meerrettich-Peroxidase, ist an Streptavidin gekoppelt, und somit in der Lage mit dem vom Detektionsantikörper präsentierten Biotin zu interagieren.

Die Enzymaktivität wird meistens colorimetrisch bestimmt. Es wird ein Substrat für die verwendete Peroxidase hinzugefügt, und die Peroxidase beginnt dann mit dem enzymatischen Umsatz des Substrates. Der hierbei stattfindende Farbumschlag ist proportional zur Konzentration des aus der aufgetragenen Probe gebundenen Antigen. Stoppt man die Reaktion, kann die Farbintensität des Substrates photometrisch gemessen werden und im Anschluss daran anhand eines aufgetragenen Standards die jeweilige Konzentration des Antigens in den Proben errechnet werden.

5.1 Der murine CXCL16-ELISA

Um den mCXCL16-ELISA durchzuführen, wurde eine 96-Loch-Platte (NUNC) mit dem „Köder“-Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml beschichtet. Inkubiert wurde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur über Nacht. Nicht an die Platte gebundene Antikörper wurde mit vier Spülschritten mit PBS mit 0,05 % Tween ausgewaschen. Um zu verhindern, dass nicht spezifische Proteine aus den Proben später an den „Köder“-Antikörper binden, wurde mit 1 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor dem Auftragen der Proben wurde erneut gespült. Von den Proben wurden je 50 µl aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Standardreihe zur späteren Gesamtproteinmengenbestimmung in Doppelwerten aufgetragen. Es wurde mit von dem im ELISA-Set enthaltenen rekombinanten mCXCL16-Protein eine serielle Verdünnung vorgenommen, beginnend mit 1 µg/ml bis 0,015 µg/ml. Es wurden insgesamt acht Werte für die Standardreihe aufgetragen, wobei der letzte der Leerwert ohne CXCL16 war. Inkubiert wurden die Proben für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde vier Mal mit PBS mit 0,05 % Tween gespült, um ungebundenes Protein aus der Platte zu entfernen. Der biotinylierte Detektionsantikörper wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml in einem 50 µl PBS mit 1 % BSA Endvolumen aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Vor dem Auftragen des Streptavidin-HRP-Komplexes wurde wieder vier Mal mit PBS mit 0,05 % Tween gespült. Es wurde nicht der Streptavidin-HRP-Komplex aus dem ELISA-Set verwendet, sondern ein Komplex von ROCHE, der in PBS verdünnt und in einer Konzentration von 50 U/µl eingesetzt wurde. Nach der Applikation wurde für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde wieder vier Mal mit PBS mit 0,05 % Tween gespült. Das verwendete Substrat war 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin (BM blue) von Roche. Beim Applizieren entsteht durch den Umsatz der Peroxidase ein blauer Niederschlag. Die Reaktion wurde mit 1,8 M Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt. Der dadurch erfolgende Farbumschlag von blau nach gelb wurde mit einem ELISA-Leser (Sunrise, TECAN) bei einer Wellenlänge von 450 nm und als Referenz bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Zum Auswerten wurde das Verhältnis von 450 nm zu 620 nm verwendet. Aus den

optischen Dichtewerten des Standards wurde eine Standardkurve erstellt. Anhand der Regressionsgeraden konnten die absoluten Werte der Proben errechnet werden.

5.2 Der humane CXCL16-ELISA

Der humane CXCL16-ELISA ist ein selbst entwickelter ELISA. Die Vorgehensweise entspricht der unter 5.1 beschriebenen. Es handelt sich ebenso wie bei dem murinen ELISA um einen „Sandwich“-ELISA. Das Protokoll ist tabellarisch im Anhang unter IX 2.10 zu finden. Der „Fänger“-Antikörper stammt von R&D-Systems und wurde in 50 µl PBS in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Gespült wurde je drei Mal mit PBS mit 0,05 % Tween.

Die Proben wurden wie bei dem murinen ELISA unverdünnt mit je 50 µl eingesetzt. Für den Standard wurde die rekombinante Chemokindomäne von CXCL16 (R&D-Systems) verwendet. Es wurde eine serielle Verdünnung mit acht Werten, beginnend mit 6,25 ng/ml, eingesetzt. Der achte Wert entsprach dem Leerwert. Anschließend wurde wieder drei Mal mit PBS mit 0,05 % Tween gespült. Der Detektionsantikörper wurde in einer Konzentration von 150 ng/ml eingesetzt. Die anschließenden Schritte und die Detektion entsprachen dem Vorgehen wie unter 5.1 beschrieben.

6. RNA-Isolierung, reverse Transkription und quantitative *realtime*-PCR

Um die Expression von ADAM10, ADAM17 und CXCL16 in Keratinozyten zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Substanzen stimuliert, anschließend die RNA isoliert, eine reverse Transkription bzw. cDNA-Synthese durchgeführt und die relative Genexpression mittels quantitativer *realtime*-PCR bestimmt.

6.1 RNA-Isolierung aus SKH-1-Maushaut und primären Keratinozytenzellkulturen

Zur Isolierung der RNA wurde TRIzol von Invitrogen verwendet. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Hautproben und Zellen wurden jeweils in 1ml TRIzol eingefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden diese Proben aufgetaut und jeweils mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die drei Phasen zu separieren, wurde 15 Minuten bei 4 °C und 12000 U/min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase enthält ausschließlich RNA, die Interphase enthält DNA, welche laut Hersteller mit einer Ethanol-fällung isoliert werden kann. In der organischen unteren Phase sind die Proteine enthalten.

Um die RNA zu isolieren wurde vorsichtig die wässrige Phase entnommen, in ein neues Eppendorf-Zentrifugengefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol gefällt. Es wurde geschüttelt und anschließend bei 4 °C für 15 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem gründlichen Abnehmen des Ethanols wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 15 µl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. Die RNA-haltige Lösung wurde bei 60 °C für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Hierfür wurde eine 1:300 Verdünnung angefertigt und bei 260 nm die optische Dichte der Lösung gemessen. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration bei 280 nm gemessen und anhand des Verhältnisses von OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der Probe bestimmt. Im Anschluss wurde die RNA in einem 2 %igem Agarosegel aufgetrennt, um zu prüfen, ob die RNA degradiert war. Für die siRNA-Experimente an den primären humanen Keratinozyten wurde ein RNA/Protein-Isolations-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Dieses Kit ermöglicht es Protein und mRNA aus einer Probe zu extrahieren. Es wurde nach dem mitgeliefertem Protokoll verfahren. Abweichend wurde die isolierte RNA in 40 µl aufgenommen.

6.2 DNA-Verdau mittels DNase I

Um die verwendete RNA von eventuellen DNA-Kontaminationen zu befreien, wurde ein DNase-Verdau mit DNase I (Promega) durchgeführt. Für einen 10 µl-Ansatz wurden 2 µg RNA mit 2 U DNase I eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 45 Minuten. Zum Stoppen der Nukleaseaktivität wurden anschließend mit 1 µl 25 mM EDTA die für die DNase I wichtigen Mg²⁺-Ionen chelatiert und zur Denaturierung des Enzyms die Temperatur auf 65 °C für 10 Minuten erhöht. Der Ansatz konnte direkt für die reverse Transkription verwendet werden.

6.3 Reverse Transkription

Das Prinzip der reversen Transkription beruht auf dem Wirkmechanismus des Enzyms reverse Transkriptase, welches ursprünglich von RNA-Retroviren stammt. Diese nutzen es, um im Wirt ihr RNA-Erbgut in DNA zu kopieren, so dass die Wirtszelle die viralen Gene ablesen und produzieren kann. Die reverse Transkriptase ist eine DNA-Polymerase, die RNA als Matrizenstrang verwenden kann. Sie benötigt genau wie andere DNA-Polymerasen ein freies 3'-OH-Ende zur Initiation der Elongation. Für molekularbiologische Arbeiten mit eukaryotischer mRNA macht man sich eine weit verbreitete post-transkriptionale Modifikation der mRNA zu Nutze. Die eukaryotischen mRNAs werden am 3'-Ende geschnitten, und es wird ein Kernexport-Signal von 100-200 Adeninen, der sogenannte „poly-A-Schwanz“, an die mRNA angehängt. Bei der Methode der reversen Transkription verwendet man poly-Tymidin (poly-T) Primer, die ein freies 3'-OH-Ende als Elongationsstart für die reverse Transkriptase bereitstellen. Diese polymerisiert nach der Initiation in 5'-3'-Richtung einen zum Matrizen RNA-Strang komplementären DNA-Strang. Dieser wird allgemein als cDNA-Strang bezeichnet, vom englischen *complementary DNA* kommend.

Für das Umschreiben der verwendeten Proben wurden die 11 µl aus dem DNase I-Verdau direkt eingesetzt. Zu den Proben wurde nach der Inaktivierung 1 µl 0,5 µg/µl Poly-dT-Primer hinzugegeben und der Ansatz in einen Thermo-Cycler bei 70 °C für zehn Minuten gestellt. Anschließend kühlte der Block auf 42 °C herunter. Während

II Material und Methoden

der Inkubationszeit wurde der Enzym-Puffer-Ansatz vorbereitet. Dieser enthielt 4 µl 5x Puffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 1 µl eines 2 mM Nukleotid-Gemischs, 200 U Superscript-Enzym und 2 µl destilliertes Wasser. Bei 42 °C wurde das Enzym-Puffergemisch zu den Proben dazu pipettiert. Die Polymerisationsreaktion wurde für eine Stunde bei 42 °C durchgeführt. Zum Denaturieren des Enzyms wurde anschließend für zehn Minuten auf 65 °C erhitzt. Dann wurde auf 4 °C heruntergekühlt, die Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und die cDNA eingefroren.

6.4 Quantitative *realtime*-PCR

Die quantitative *realtime*-PCR ist eine Methode, mit der sich sehr präzise analysieren lässt, wie viel von einem PCR-Produkt in einer Probe enthalten ist. Das Prinzip dieser Analyse beruht auf der Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert, und dabei sein Emissionsspektrum verändert. Die gemessene Fluoreszenzintensität dient hierbei als Maß für die Konzentrationen von doppelsträngiger DNA. Mit jedem Verdopplungszyklus der PCR steigt die gemessene Fluoreszenzintensität an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Primerpaare zur PCR-Analyse verwendet:

ADAM10:	Vorwärts:	5`-TCC AC AGC CCA TTC AGC AA-3`
	Rückwärts:	5`-GCG TCT CAT GTG TCC CAT TTG-3`
ADAM17:	Vorwärts:	5`-GAA GTG CCA GGA GGC GAT TA-3`
	Rückwärts:	5` -GG GCA CTC ACT GCT ATT ACC-3`
mCXCL16:	Vorwärts:	5`-GAC CCT TGT CTC TTG CGT TC-3`
	Rückwärts:	5`-GAC CCT TGT CTC TTG CGT TC-3`
hCXCL16:	Vorwärts:	5`-ACG AGG TTC CAG CTC CTT TC-3`
	Rückwärts:	5`-CAA TCC CCG AGT AAG CAA GA-3`
GAPDH:	Vorwärts:	5`-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC-3`
	Rückwärts:	5`-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3`

II Material und Methoden

Für die quantitative *realtime*-PCR wurde der SYBR-Premix von TaKaRa benutzt. Im Premix sind die Polymerase-, Nukleotide- und Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen optimal eingestellt. Die Primer und die cDNA wurden entsprechend hinzugefügt und die Ansätze mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 10 μ l aufgefüllt.

Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

5 μ l SYBR-Premix

1 μ l je Primer (0,2 μ M)

1 μ l cDNA

3 μ l dest. H₂O

Die Ansätze wurden in LightCycler Kapillaren von Roche pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit dem LightCycler2.0-Instrument der Firma Roche untersucht. Es wurde jeweils eine so genannte *touch down-PCR* durchgeführt. Hierbei wird in den ersten 6 Zyklen die Anlagerungstemperatur von 66 °C je Zyklus um 1 °C gesenkt, bis auf eine endgültige Temperatur von 60 °C, die ab dem siebten Zyklus beibehalten wird. Dadurch wird die Spezifität der PCR erhöht. Das Programm sah wie folgt aus:

30 s 95 °C Denaturierung

15 s 66-60 °C *touch down*

15 s 72 °C Amplifikation und Fluoreszenzmessung

Insgesamt wurden 45 Zyklen vorgenommen und gemessen. Im Abschluss an jede PCR wurde noch eine Schmelzkurve aufgenommen, anhand derer die Spezifität der während der PCR entstandenen Produkte überprüft wurde. Hierbei wurde bei 65 °C für 15 Sekunden gestartet und die Temperatur langsam auf 95°C erhöht. Die Geschwindigkeit der Erhitzung betrug 0,2 °C/s. Die Fluoreszenz wurde hierbei kontinuierlich gemessen.

Zur Auswertung der *realtime*-PCR wurde von jeder Probe zusätzlich die Menge des Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Um die relative Genexpression zu errechnen, wurde das Verhältnis von Genmenge

zu GAPDH-Menge gebildet. Es wurde in jedem Lauf ein interner Standard festgelegt, auf den sich alle anderen Werte bezogen. Um die Effektivität der Primer in der Auswertung zu berücksichtigen, wurde von jedem verwendeten Primerpaar eine Standardkurve erstellt. Hierfür wurden Proben oder Plasmide, welche die entsprechenden Gene enthielten, seriell verdünnt und im zu erwartenden Arbeitsbereich eine Standardkurve erstellt, welche nach jeder Messung mit den gemessenen Werten abgeglichen wurde.

6.5 DNA-Agarose-Gel

Mittels DNA-Agarose-Gelen wurde überprüft, ob PCR-Produkte die erwartete Größe hatten. Diese Überprüfung wurde bei der Etablierung durchgeführt, da nach den ersten PCRs für jedes Produkt eine charakteristische Schmelzkurve bekannt war. Es wurden jeweils 150 ml 2 %ige Agarosegele hergestellt. Nach dem Erhitzen in der Mikrowelle wurde 1 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel gegossen. Nach dem Polymerisieren der Gele bei Raumtemperatur wurden diese in eine mit TE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Schwerelösung versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Basenpaarmarker mit Fragmenten von 100-1500 Basenpaaren (bp) in jeweils 100 bp Schritten aufgetragen. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 100 V an die Gelkammer gelegt. Nach 45-50 Minuten wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

III. Ergebnisse

Die Barriere der Haut hat eine wichtige Funktion im Rahmen der Homeostase. Sie verhindert einerseits übermäßigen Wasserverlust und andererseits das Eindringen pathogener Organismen in den Körper. Dementsprechend ist es wichtig, dass die Integrität der Haut erhalten bleibt oder, falls die Haut geschädigt ist, eine schnelle Reparatur erfolgt. Für Reparatur- und Entzündungsprozesse in der Haut sind Chemokine und Zytokine von Bedeutung. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Barriere-reparatur von IL-6 und dem IL-6-Rezeptor abhängig ist (Wang et al. 2004a; Bazan et al 1997; Bennett et al. 2003). An der Regulation von Zytokin und Wachstumsfaktoren bei inflammatorischen Prozessen sind Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen beteiligt. So ist bekannt, dass ADAM10 und ADAM17 für die Proteolyse des IL-6-Rezeptors und die Proteolyse von TNF- α , TGF- α und vom EGF-Rezeptor verantwortlich sind (Lee et al 2003; Mascia et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ADAM10 und ADAM17 eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität und bei der Wiederherstellung der geschädigten Hautbarriere spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb der Einfluß von ADAM10 und ADAM17 in Bezug auf das membranständige Chemokin CXCL16 und das Adhäsionsmolekül E-Cadherin untersucht. Für CXCL16 ist bekannt, dass es in Fibroblasten und Endothelzellen konstitutiv von ADAM10 und nach Stimulation mit PMA auch von ADAM17 geschnitten wird (Abel et al 2004; Gough et al 2004; Ludwig et al 2005). Ferner wurde untersucht, ob E-Cadherin in Keratinozyten möglicherweise von ADAM10 geschnitten wird, ob verstärkte Proteolyse die Adhäsion von Keratinozyten beeinflusst und ob es einen Zusammenhang zwischen Proteolyse und Bläschenbildung in der Epidermis bei Erkrankungen der Haut gibt.

1. ADAM10 und ADAM17 werden konstitutiv von Keratinozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* exprimiert

Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen (ADAMs) sind zinkabhängige membranständige Proteine, die für die proteolytische Spaltung von membrangebundenen Proteinen verantwortlich sind. ADAM10 und ADAM17 sind in die Regulation von Zytokinsignalwegen involviert (Blobel 2002). ADAM17 wird benötigt, um eine adäquate Entwicklung von Epithelien in der Embryogenese von Mäusen zu gewährleisten (Peschon et al. 1998b). ADAM10 ist ebenfalls an entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. Die Neurogenese von *Drosophila* ist abhängig von ADAM10. So wird die durch Delta und Notch vermittelte Lateralinhibition von ADAM10-abhängiger Proteolyse geregelt (Rooke et al 1996; Pan et al. 1997b). Während der Entwicklung von Vögeln wird ADAM10 in den Somiten vom Dermatome und dem Myotome exprimiert und ebenfalls in der Epidermis, im Darm Endoderm, im Nierenepithel, in der Leber, im Herz und in Nervenrohren (Hall et al 2003).

Um zu zeigen, dass Keratinozyten ADAM10 und ADAM17 exprimieren, wurden *western blots* an Lysaten der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT durchgeführt (Abb. 1 A und B). Die verwendeten Zelllysate stammten aus unstimulierten Zellen. In Abb. 1A ist ein *western blot* mit einem ADAM17-spezifischen Antikörper abgebildet. Die obere Bande entspricht der Proform von 120 kDa, die untere der maturen Form von ca. 95 kDa. In den HaCaT-Zelllysaten ließ sich ebenfalls ADAM10 in der Proform von 95 kDa und in der maturen Form von ca. 68 kDa nachweisen.

III Ergebnisse

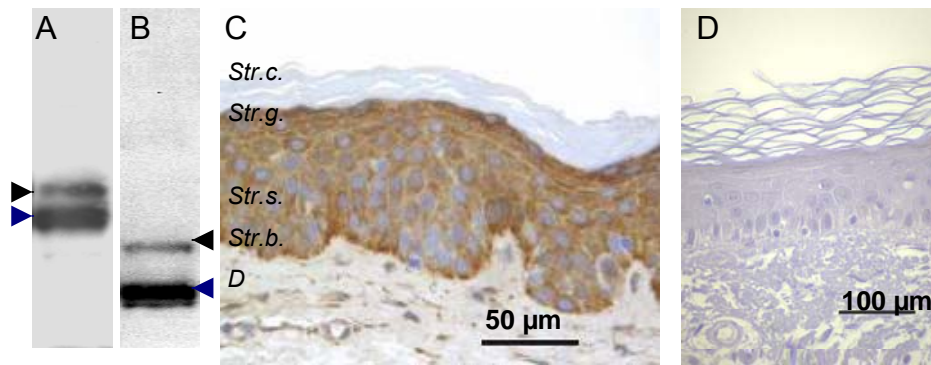


Abb.1: A Western blot gegen humanes ADAM17 in Proben von HaCaT-Zellen. Die obere Bande entspricht der Proform von 120 kDa (schwarze Pfeilspitze), die untere Bande entspricht der maturen Form von etwa 95 kDa (blaue Pfeilspitze). **B Western blot mit einem Antikörper für humanes ADAM10 in Proben von HaCaT-Zelllysaten.** Die obere Bande entspricht der Proform von ca. 97 kDa (schwarze Pfeilspitze), die untere entspricht der maturen Form von etwa 68 kDa (blaue Pfeilspitze). **C ADAM10-DAB-Immunhistologiefärbung an einem Paraffinschnitt von gesunder humaner Haut.** Str.c. = *Stratum corneum*; Str.g. = *stratum granulosum*; Str.s. = *stratum spinosum*; Str.b. = *stratum basale*; D = *Dermis* **D DAB-Immunhistologiefärbung an einem Paraffinschnitt von gesunder Haut mit Kaninchen-IgG-Kontrolle.**

Um zu zeigen, dass ADAM10 auch *in vivo* konstitutiv von Keratinozyten exprimiert wird, wurden histologische Färbungen an Paraffinschnitten von normaler Haut durchgeführt (Abb.1C). Die ADAM10-Immunreaktivität ist in der gesamten kernhaltigen Epidermis nachweisbar. Die Keratinozyten des *Stratum basale* weisen eine verstärkte Immunreaktivität auf, während im *Stratum corneum* keine Immunreaktivität nachweisbar ist.

2. CXCL16

CXCL16 ist ein membranständiges CXC-Chemokin. Es wird von antigenpräsentierenden Zellen, von durch Zytokine stimulierten Endothelzellen, von Glioma Zellen und von glatten Muskelzellen exprimiert (Jiang et al. 2005; Ludwig et al 2005; Hase et al. 2006). CXCL16 wird aber nicht nur als membranständiges Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert, sondern kann auch proteolytisch von ADAM10 gespalten werden (Abel et al 2004; Gough et al 2004). Durch Stimulation mit PMA wird die proteolytische Spaltung verstärkt. Dieser Prozess ist ADAM10-unabhängig und wird durch ADAM17 vermittelt (Abel et al 2004; Ludwig et al 2005). Die lösliche Chemokin Domäne vom CXCL16-Peptid übernimmt chemotaktische Funktion für Zellen, die den Rezeptor CXCR6 tragen (Matloubian et al 2000; Nakayama et al 2003; Geissmann et al 2005). Die Expression von CXCL16 in der Haut und in Keratinozyten wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

2.1 CXCL16 wird von Keratinozyten in der Haut konstitutiv exprimiert

Die Expression von CXCL16 in Keratinozyten wurde zuerst mit einem polyklonalen Antikörper (R&D Systems) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CXCL16 in gesunder humaner Haut konstitutiv von Keratinozyten gebildet wird. Chromogene Färbungen und indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten zeigten jeweils eine homogene Immunreaktivität für die gesamte Epidermis mit Ausnahme des *Stratum corneums* (Abb.2).

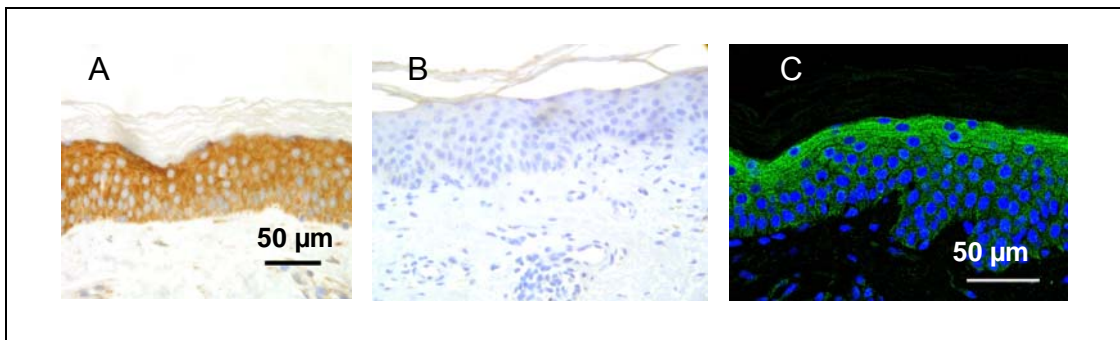


Abb. 2: A DAB-Färbung gegen hCXCL16 an Paraffinschnitten von normaler humaner Haut. Es ist eine homogene Immunreaktivität in der gesamten Epidermis mit Ausnahme des *Stratum corneums* zu erkennen **B Kaninchen-Isotyp-Kontrolle an Paraffinschnitten von gesunder humaner Haut.** Die Kaninchen-Isotypkontrollfärbung zeigt keine Immunreaktivität **C Fluoreszenzfärbung gegen hCXCL16 an Paraffinschnitten von gesunder humaner Haut.** Mit dem Fluorophor Cy2 gekoppelter sekundärer Antikörper wurde verwendet (grüner Kanal). Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff im UV-Bereich (blauer Kanal). Auch in der indirekten Immunfluoreszenz weist der anti-hCXCL16-Antikörper eine homogene Immunreaktivität in der gesamten Epidermis auf.

2.2 CXCL16 wird von Keratinozyten *in vitro* exprimiert und proteolytisch gespalten

Nachdem festgestellt wurde, dass Keratinozyten CXCL16 *in vivo* exprimieren, wurde in verschiedenen Zellkultursystemen untersucht, ob Keratinozyten auch *in vitro* CXCL16 konstitutiv exprimieren. Kulturüberstände und Zelllysate von der murinen Keratinozytenzelllinie PAM212 wurden mittels murinem CXCL16- (mCXCL16) ELISA untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl in den Zelllysaten als auch in den Kulturüberständen der Zellkulturen mCXCL16 nachweisbar war.

Die gemessene Menge mCXCL16 in den Kulturüberständen stieg kontinuierlich mit der Zeit an (Abb.3). Die Konzentration stieg von einem Hintergrundwert zu Versuchsbeginn auf etwa 1170 pg/ml nach acht Stunden an. In den Lysaten wurde ein langsamer Anstieg der CXCL16-Expression im Vergleich zum Ausgangswert festgestellt. So lag der Ausgangswert bei den PAM212-Zellen bei etwa 545 pg/ml und stieg langsam auf einen Wert von etwa 1000 pg/ml nach acht Stunden an.

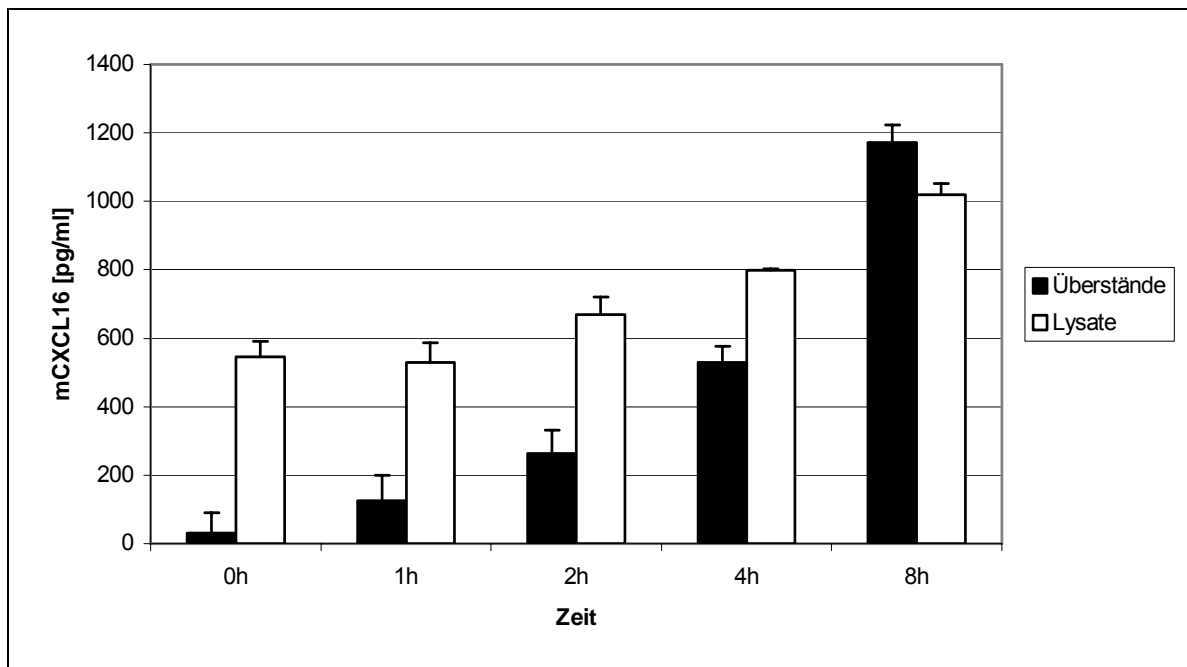


Abb. 3: mCXCL16 ELISA von Kulturüberständen und Lysaten der PAM212-Zelllinie. Die PAM212-Zellen wurden mit PBS gespült und anschließend mit frischem Medium versorgt. Die Kulturüberstände und Lysate wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Es zeigte sich eine Akkumulation von CXCL16 in den Kulturüberständen und Lysaten.

III Ergebnisse

Versuche mit primären humanen Keratinozyten lieferten ähnliche Ergebnisse. Es zeigte sich auch hier, dass die Zellen in der Lage sind, ohne vorherige Stimulation CXCL16 zu bilden. Die Menge von CXCL16 in den Zelllysaten stieg im Vergleich zum Ausgangswert nach einer Stunde nur sehr langsam an. Die Akkumulation von CXCL16 in den Kulturüberständen stieg kontinuierlich an (Abb.4).

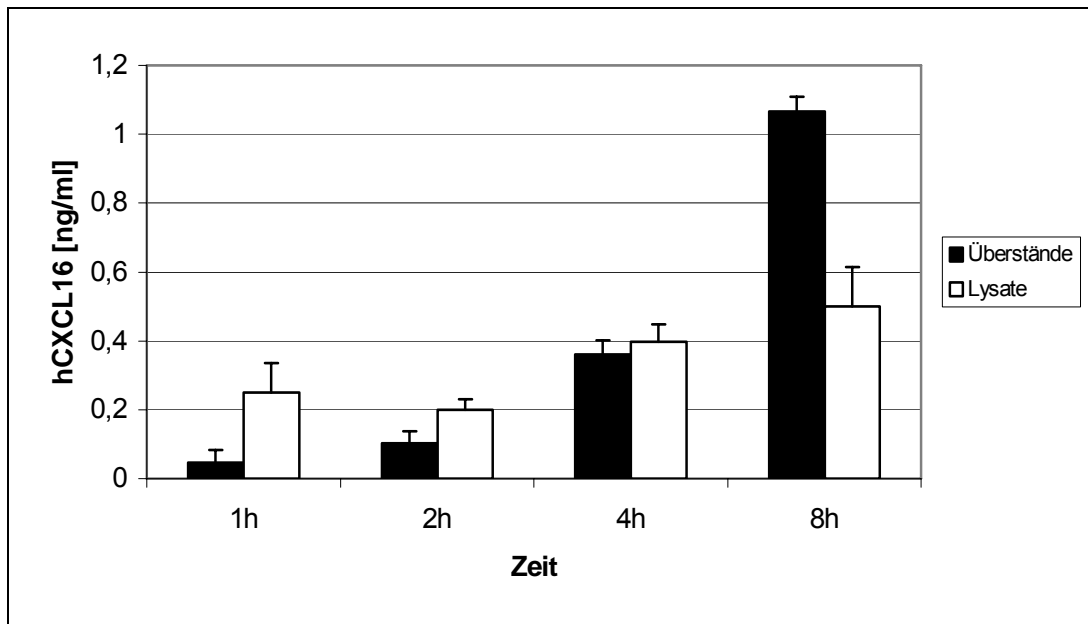


Abb.4: hCXCL16-ELISA von Kulturüberständen und Lysaten primärer humaner Keratinozyten. Die Zellen wurden kurz mit PBS gespült, anschließend mit frischem Medium versorgt und zu verschiedenen Zeitpunkten Kulturüberstände und Lysate entnommen.

Diese Daten zeigen, dass CXCL16 von Keratinozyten konstitutiv gebildet und in den Zellkulturüberstand abgegeben wird.

2.3 Durch Metalloproteinaseinhibitoren lässt sich die Proteolyse von CXCL16 hemmen

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie CXCL16 von der Oberfläche der Keratinozyten proteolytisch gespalten wird, wurden die Metalloproteinaseinhibitoren Marimastat, GW280264X und GI254023X verwendet. Marimastat ist ein Breitbandinhibitor, der verschiedene ADAM-Proteasen sowie andere Matrix-Metalloproteinasen hemmt. GW280264X inhibiert ADAM10 und ADAM17, wobei für ADAM17 eine stärkere Inhibition beschrieben ist (Hundhausen et al 2003).

III Ergebnisse

GI254023X inhibiert selektiv ADAM10 (Hundhausen et al 2003). Zum Einsatz kamen die Inhibitoren an primären murinen und primären humanen Keratinozyten. Durch diese Inhibitoren ist es möglich einzugrenzen, ob die Proteolyse von CXCL16 durch eine ADAM-Protease erfolgt, und ob ADAM10 oder ADAM17 für die proteolytische Aktivität verantwortlich ist.

Eingesetzt wurden die Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen. Es zeigte sich, dass die Abgabe von CXCL16 in den Kulturüberstand durch den Einsatz der Inhibitoren verringert werden konnte (Abb.5, Abb.6). In Konzentrationen von 1, 3 und 5 μ M hemmte Marimastat die Abgabe von CXCL16 in den Kulturüberstand. Dies konnte an primären murinen und humanen Keratinozyten gezeigt werden. Durch GW280264X konnte ebenfalls die Konzentration von CXCL16 in den Kulturüberständen reduziert werden. Auch hier reichten Konzentrationen von 1, 3 und 5 μ M aus, um die Proteolyse von CXCL16 zu reduzieren.

Die stärkste Inhibition wurde mit GI254023X festgestellt. Die Inhibition durch diesen Inhibitor war im murinen sowie im humanen System konzentrationsabhängig (Abb.5 und Abb.6).

III Ergebnisse

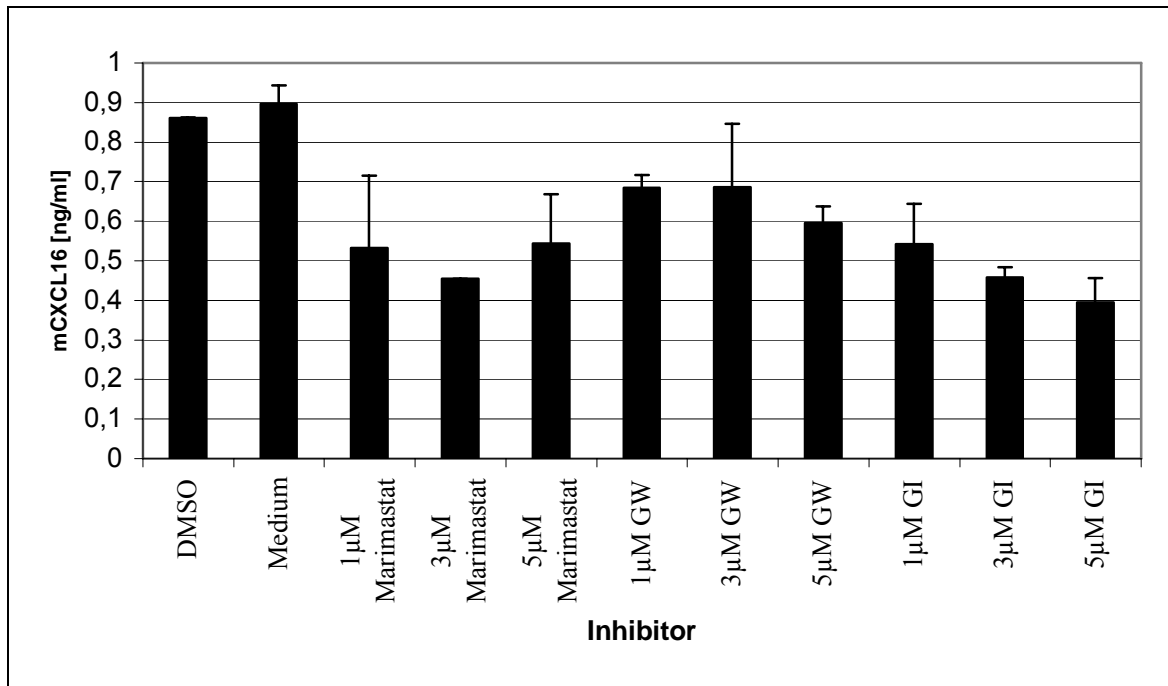


Abb.5: mCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer muriner Keratinozyten, die 24 h mit Inhibitoren behandelt wurden. Es wurden primäre murine Keratinozyten mit Marimastat, GI254023X und GW280264X behandelt. Die Inhibitoren wurden jeweils in den Konzentrationen 1, 3 und 5 µM eingesetzt. Alle drei Inhibitoren zeigten einen inhibitorischen Effekt auf die mCXCL16-Proteolyse. GI254023X inhibierte konzentrationsabhängig und am effektivsten.

III Ergebnisse

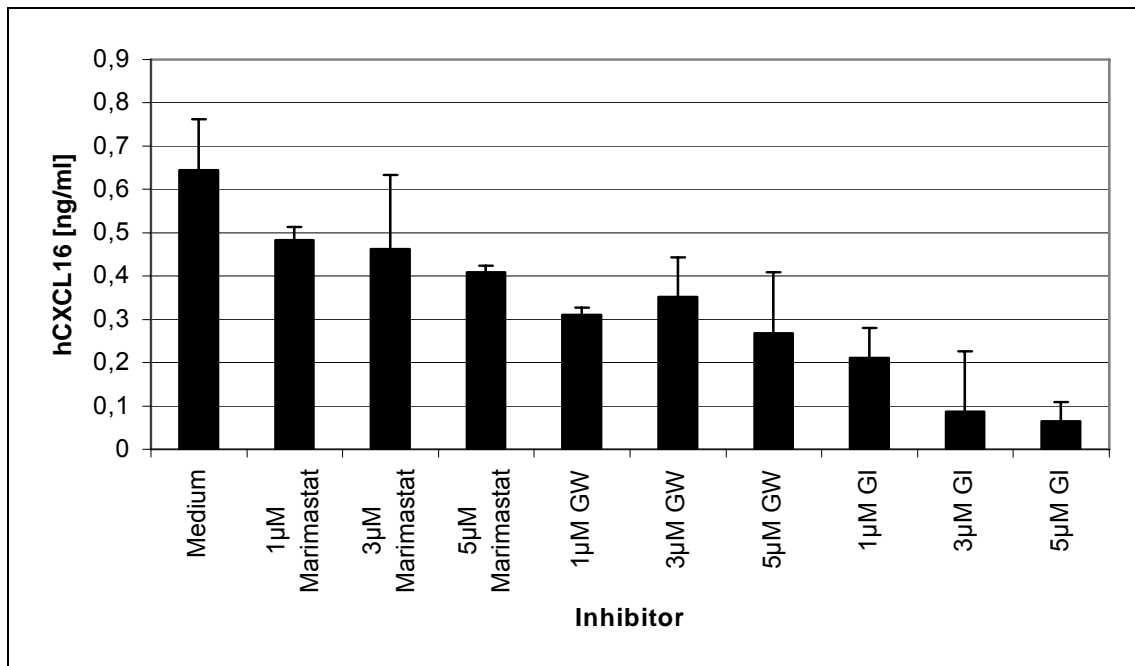


Abb.6: hCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer humaner Kertinozyten. Eingesetzt wurden die Inhibitoren GW280264X, GI254023X und Marimastat in Konzentrationen von jeweils 1 µM, 3 µM und 5 µM. Alle drei Inhibitoren zeigten eine Inhibition, wobei Marimastat den geringsten Effekt aufwies und GI254023X konzentrationsabhängig den stärksten.

Die gemessenen Mengen CXCL16 in den Zelllysaten der Keratinozyten verhielten sich reziprok zu den Mengen, die von den Zellen in den Kulturüberstand abgegeben wurden. Die gemessene Menge CXCL16 in den Zelllysaten nahm in den mit Inhibitoren behandelten Zellen zu. Um das Verhältnis von freigesetzten zu zellassoziierten CXCL16 zu verdeutlichen, wurde in Abb. 7 die prozentuale Distribution von Kulturüberstand zu Zelllysat aufgetragen.

III Ergebnisse

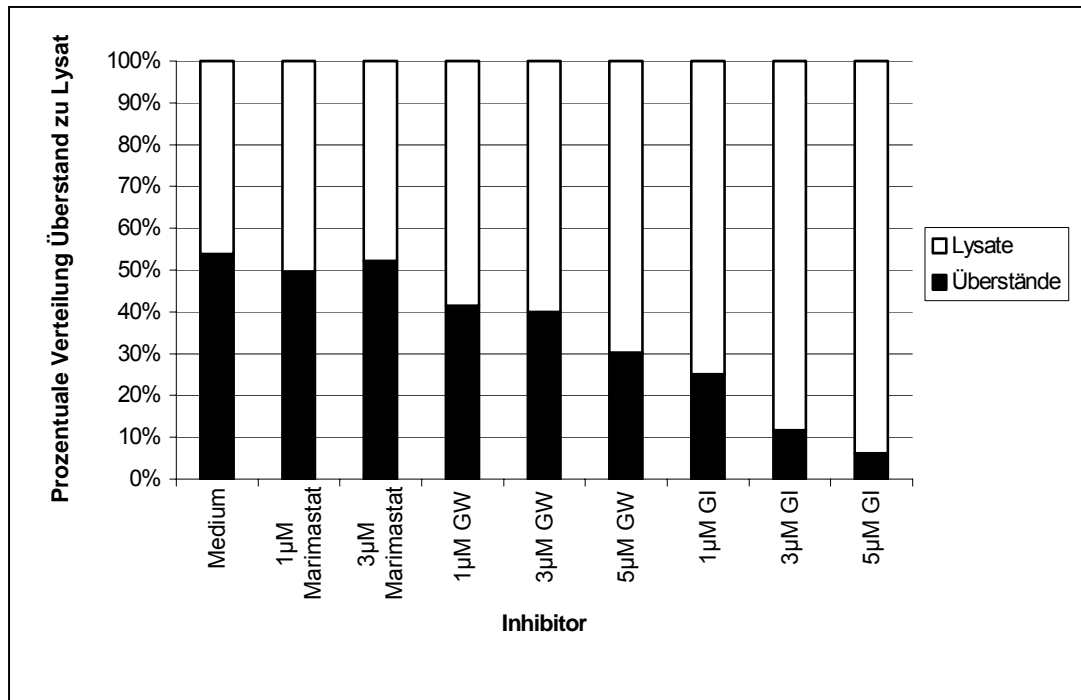


Abb. 7: Darstellung der prozentualen Verteilung der CXCL16-Konzentration in Kulturüberständen zu Lysaten. Nach Zugabe der Inhibitoren wurde die Konzentration von CXCL16 in den Kulturüberständen weniger. Die Konzentration in den Zelllysaten stieg an.

Die Daten entstammen einem Versuch mit primären humanen Keratinozyten und wurden mit dem humanen CXCL16-ELISA erhoben. Es wurde deutlich, dass sich das Verhältnis von CXCL16 in der Mediumkontrolle von etwa 50 % gelöst zu 50 % membrangebunden bei den mit Inhibitor behandelten Zellen änderte. Marimastat führte zu einer geringen Veränderung des Verhältnisses zwischen löslichem und membrangebundenem CXCL16. Bei GW280264X in einer Konzentration von 5 µM verschob sich das Verhältnis auf 30 % lösliches und 70 % membrangebundenes CXCL16. Die mit 5 µM GI254023X behandelten Proben wiesen die stärkste Inhibition mit 10 % CXCL16 in den Kulturüberständen und 90 % in den Zelllysaten auf.

2.4 ADAM10 *gene knockdown* verringert die Proteolyse von CXCL16

Durch die eingesetzten Metalloproteinaseinhibitoren konnte gezeigt werden, dass CXCL16 in murinen sowie in humanen Keratinozyten proteolytisch von der Zellmembran geschnitten wird. Ferner konnte die effektivste Inhibition mit dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X erreicht werden. Eine schwächere Inhibition wurde mit GW280264X erzielt, wobei zu beachten ist, dass GW280264X ADAM10 und ADAM17 inhibiert. Um zu überprüfen, welche der beiden ADAM-Proteasen für die CXCL16-Proteolyse in Keratinozyten verantwortlich ist, wurden Versuche mit siRNA durchgeführt. Hierfür wurden je drei Paare kurzer doppelsträngiger siRNA gegen ADAM10 und ADAM17 verwendet.

Zuerst wurde getestet, ob die Konstrukte in der Lage sind, in primären humanen Keratinozyten einen *gene knock down* zu erzielen, und welche Konzentration hierfür optimal ist. Überprüft wurde die Herunterregulation der mRNA durch quantitative *realtime*-RT-PCR. Es stellte sich heraus, dass die beste Herunterregulation der mRNA bei allen sechs Konstrukten bei einer Konzentration von 20 pM/ml erzielt wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Zellen wurden für die folgenden Versuche mit 20 pM/ml siRNA transfiziert. Um Rückschlüsse auf die Proteolyse von CXCL16 zu erhalten, wurde nach 48 Stunden und 72 Stunden ein Mediumwechsel vollzogen. Vier Stunden nach dem Wechsel wurden die Kulturüberstände und Lysate entnommen. Die Kulturüberstände wurden mittels hCXCL16-ELISA analysiert, aus den Zelllysaten wurden die Proteine und die RNA isoliert. Die isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *realtime*-PCR analysiert. Mit den siRNA-Konstrukten ADAM10-1 und ADAM10-2 wurde 52 Stunden nach Transfektion jeweils eine Herunterregulation der ADAM10-mRNA-Konzentration von ca. 80 % erreicht (Abb.8).

Auch 76 Stunden nach Transfektion wurde mit den beiden ADAM10-siRNA-Konstrukten eine verringerte Menge ADAM10-mRNA gemessen. Die Herunterregulation lag hier ebenfalls im Bereich zwischen 60 und 80 % (Abb.9).

III Ergebnisse

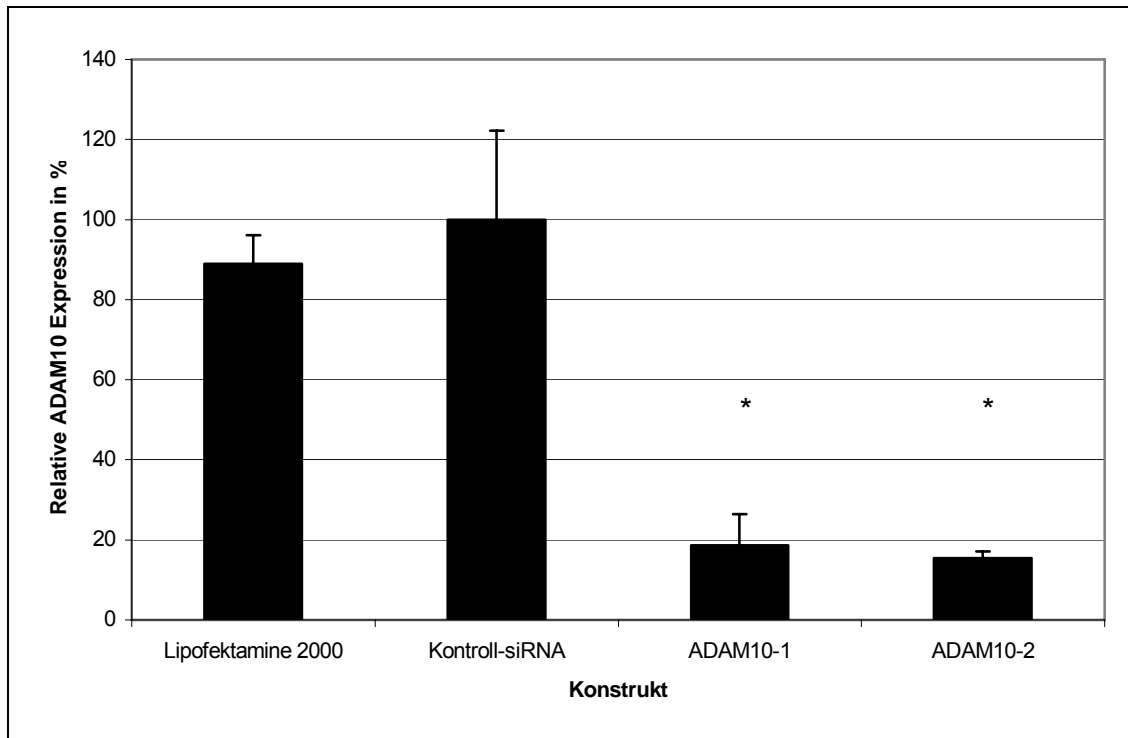


Abb.8: Quantitative *realtime*-PCR von mRNA aus primären humanen Keratinozyten. Dargestellt ist die relative ADAM10-Expression in Relation zur GAPDH-Expression. Die Proben wurden 52 Stunden nach Transfektion mit ADAM10-siRNA-Konstrukten entnommen. Alle Daten wurden in Relation zur Kontroll-siRNA gesetzt. Die siRNA-Konstrukte für ADAM10 und die Kontroll-siRNA wurden jeweils in einer Konzentration von 20 pM eingesetzt. Die * zeigen die statistisch signifikante Abweichung von $p < 0,05$ in Bezug auf die Kontroll-siRNA an.

III Ergebnisse

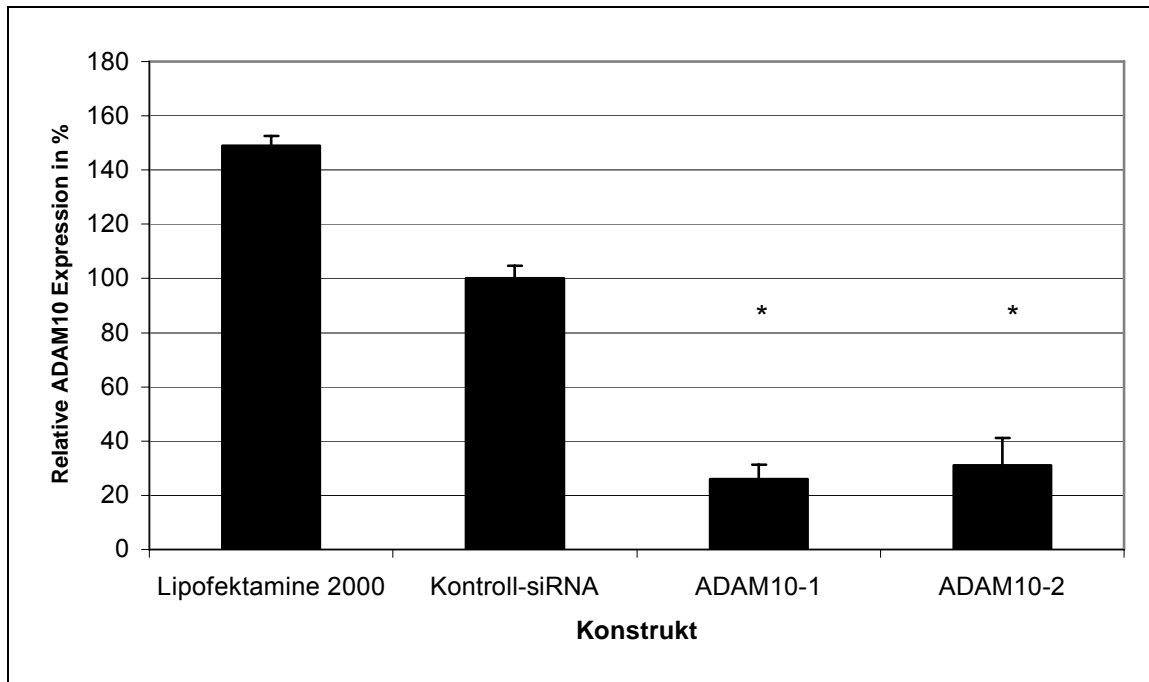


Abb.9: Quantitative *realtime*-PCR von cDNA aus primären humanen Keratinozyten, 76 Stunden nach ADAM10-siRNA-Transfektion. Alle siRNA-Konstrukte wurden in diesem Versuch in einer Konzentration von 20 pM eingesetzt. Dargestellt ist die relative ADAM10-Expression in Relation zur GAPDH-Expression. Alle Expressionswerte sind in Relation zu der unspezifischen Kontroll-siRNA dargestellt. Die * zeigen die statistisch signifikante Abweichung von der siRNA-Kontrolle mit einem Wert von $p < 0,05$ an.

Um die verminderte Expression von ADAM10 zusätzlich zu überprüfen, wurde aus den Zelllysaten neben der RNA ebenfalls die Proteine präzipitiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach 52 Stunden die ADAM10-Expression soweit vermindert war, dass sie unter die Nachweisgrenze des *western blots* gelangte (Abb10).

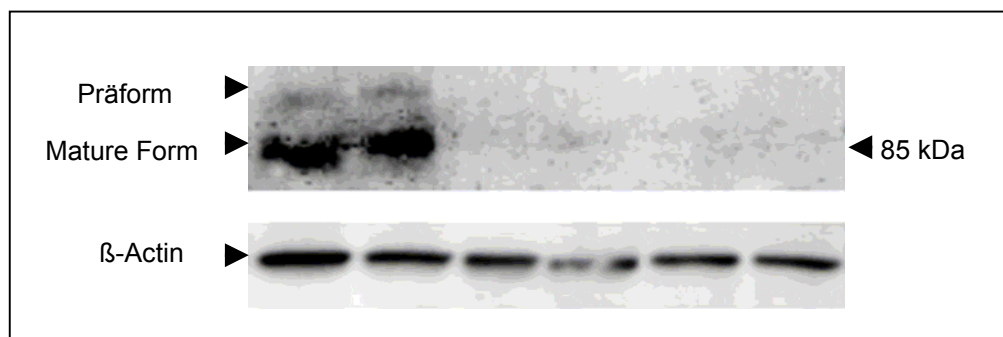


Abb.10: *Western blot* von ADAM10. Abgebildet sind Lysate von primären humanen Keratinozyten, die mit 20 pM ADAM10-siRNA transfiziert wurden. Die Probenentnahme erfolgte 52 Stunden nach Transfektion. Aufgetragen sind jeweils zwei gleich behandelte Proben. Um zu zeigen, dass alle Proben die gleiche Proteinkonzentration enthielten, wurde der *western blot* mit einem Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte β -Actin inkubiert.

III Ergebnisse

Die Kulturüberstände wurden mittels hCXCL16-ELISA analysiert. Es zeigte sich, dass in den Kulturüberständen 52 Stunden nach Transfektion keine verminderte Proteolyse von CXCL16 nachweisbar war (Abb.11).

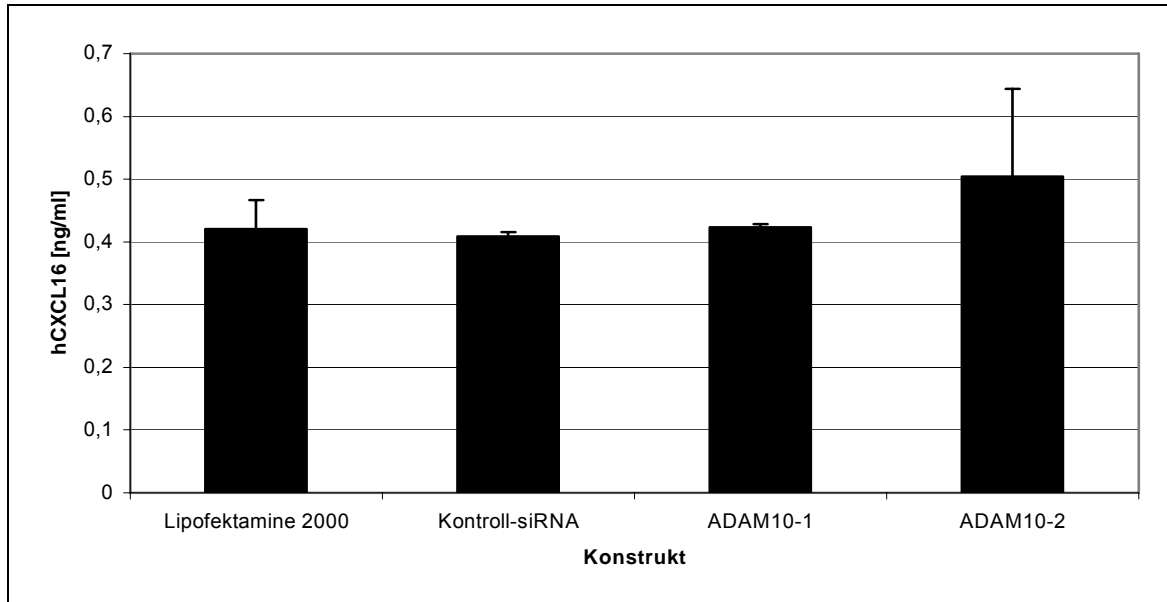


Abb.11: hCXCL16-ELISA aus Kulturüberständen primärer humaner Keratinozyten, die mit ADAM10-siRNA transfiziert wurden. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und vier Stunden später die Kulturüberstände entnommen. Die entsprechende ADAM10-mRNA-Analyse zu diesem Versuch ist in Abb. 9 dargestellt, der *western blot* in Abb.10.

72 Stunden nach erfolgter ADAM10-siRNA-Transfektion wurde erneut ein Proteolysetest durchgeführt. Die Kulturüberstände der primären humanen Keratinozyten wiesen 76 Stunden nach ADAM10 siRNA Transfektion eine signifikante Verminderung der gemessenen CXCL16-Menge in Relation zur gemessenen Menge der mit Kontroll siRNA behandelten Zellen auf. Das ADAM10-1-Konstrukt zeigte einen P-Wert von $p < 0,02$, das ADAM10-2-Konstrukt einen P-Wert von $P < 0,05$ (Abb.12). Die verminderte Proteolyse korreliert mit der verminderten ADAM10-Expression nach Durchführung der Transfektion (Abb.9).

III Ergebnisse

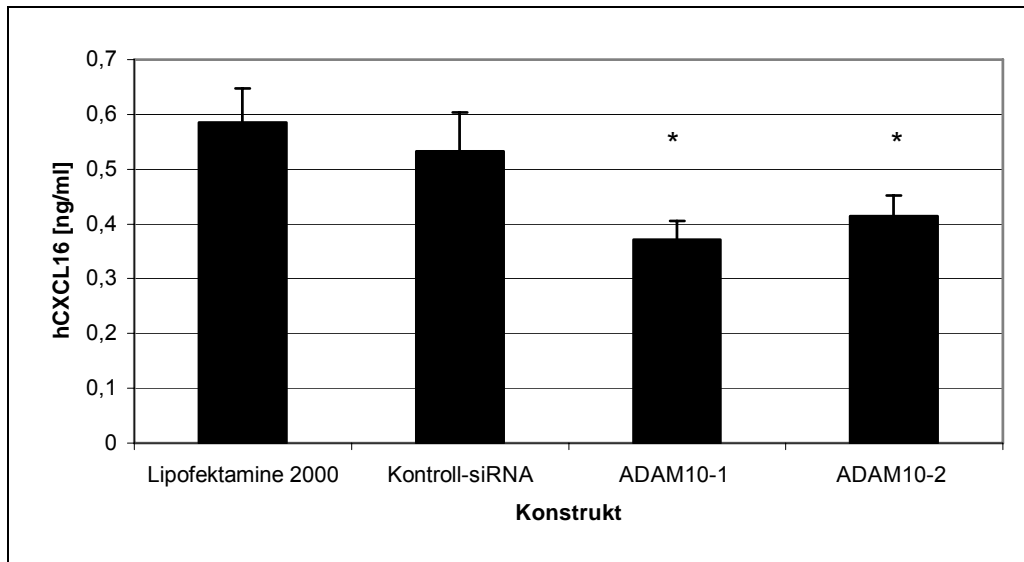


Abb.12: hCXCL16-ELISA von Kulturüberständen aus primären humanen Keratinozyten, die mit ADAM10-siRNA transifiziert wurden. 72 Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach weiteren vier Stunden die Kulturüberstände entnommen. Durch Transfektion mit dem siRNA-ADAM10-1-Konstrukt wurde eine verminderte CXCL16-Proteolyse nach 76 Stunden erreicht. Auch die Transfektion mit dem siRNA-ADAM10-2-Konstrukt führte zu einer verminderten Proteolyse von CXCL16. Die entsprechenden relativen ADAM10-mRNA-Expressionsdaten sind in Abb.9 dargestellt. Die berechneten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kulturüberstände von der unspezifischen Kontroll-siRNA. Die * zeigen die statistisch signifikante Abweichung von der siRNA-Kontrolle mit einem Wert von $p < 0,05$ an.

Die Inhibitor-Versuche mit GW280264X und GI254023X zeigten, dass GI254023X zwar der effektivere Inhibitor für die Proteolyse von CXCL16 ist, GW280264X aber ebenfalls in der Lage ist, inhibierend auf diese zu wirken. GW280264X blockiert die ADAM10- und ADAM17-abhängige Aktivität (Hundhausen et al 2003). Um zu überprüfen, ob die GW280264X-abhängige Inhibition nur auf die ADAM10-Aktivität oder ebenfalls auf ADAM17-Aktivität zurückzuführen ist, wurden siRNA-Konstrukte für humanes ADAM17 verwendet. Es wurden drei kurze doppelsträngige siRNA-Konstrukte mit unterschiedlichen Sequenzen getestet. Alle drei Konstrukte waren in der Lage, die mRNA-Expression von ADAM17 herunterzuregulieren. Die relative ADAM17-Expression wurde um 60 bis 80 % vermindert. Der stärkste *knockdown* konnte mit dem Konstrukt ADAM17-3 erreicht werden (Abb13).

III Ergebnisse

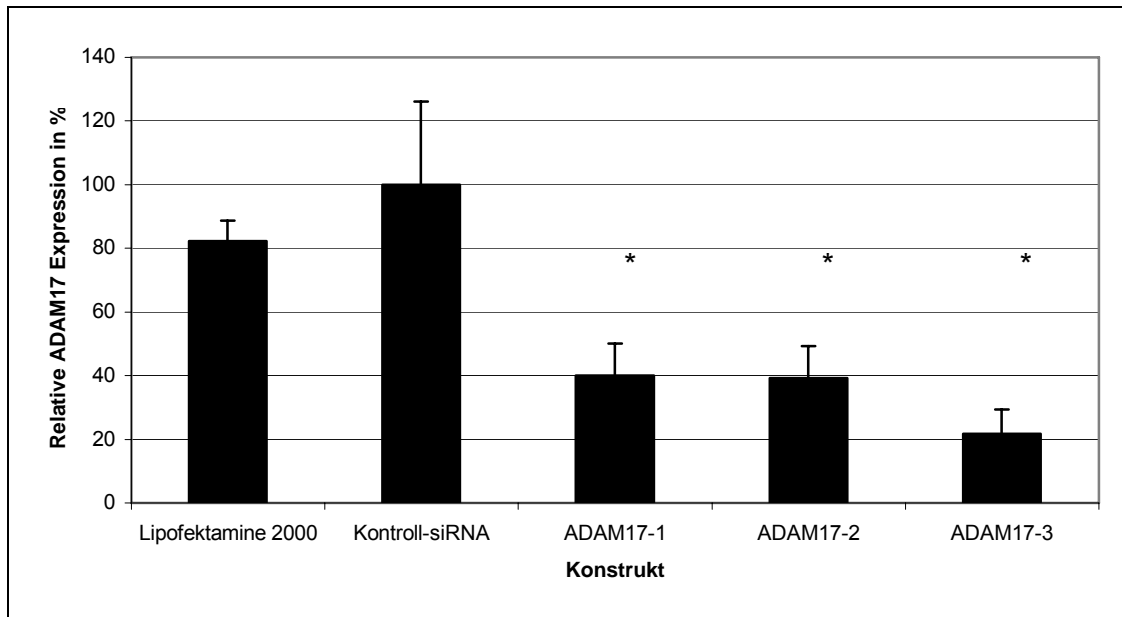


Abb.13: Quantitative *realtime*-PCR von primären humanen Keratinozyten, die mit ADAM17-siRNA-Konstrukten transfiziert wurden. Abgebildet ist die ADAM17-mRNA-Menge in Relation zur GAPDH-mRNA-Menge. Alle relativen Expressionswerte wurden in Bezug zu der transfizierten Kontroll-siRNA gesetzt. Die P-Werte sind ebenfalls in Relation zu diesen Werten errechnet worden. Die * zeigen die statistisch signifikante Abweichung von der siRNA-Kontrolle mit einem Wert von $p < 0,01$ an.

III Ergebnisse

Die Kulturüberstände aus den ADAM17-siRNA-Versuchen wurden mittels ELISA hinsichtlich der Konzentration von löslichem CXCL16 untersucht. Es war keine verminderte CXCL16 Menge in den Kulturüberständen der Keratinozyten mit verminderter ADAM17 mRNA-Expression nachweisbar (Abb.14).

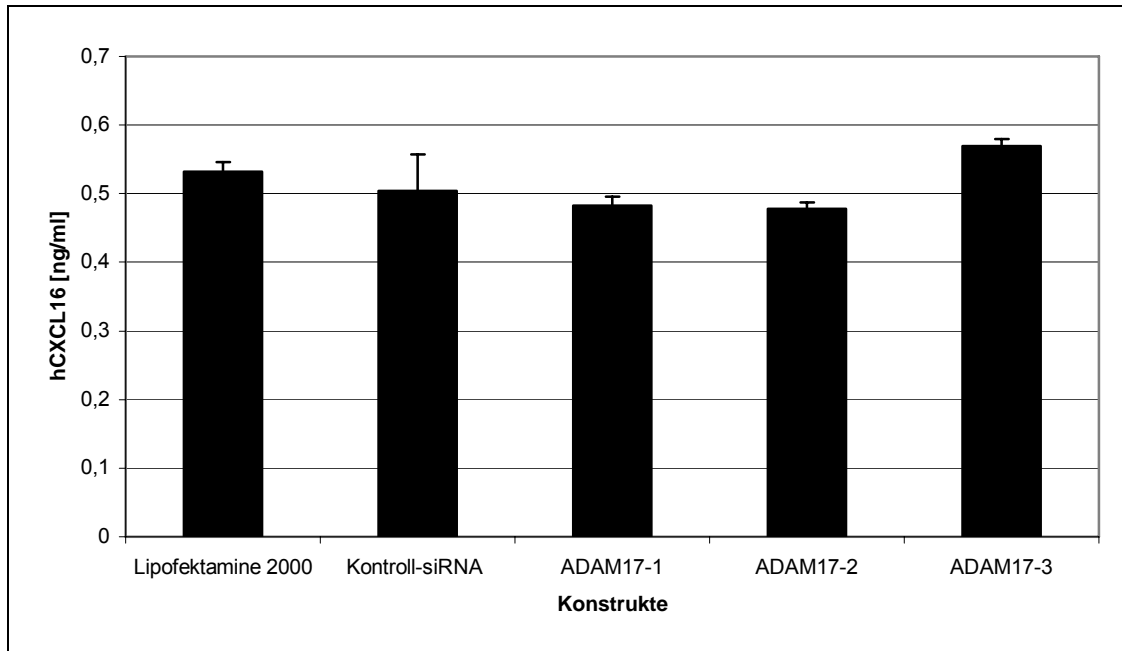


Abb.14: hCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer humaner Keratinozyten nach Transfektion mit ADAM17-siRNA. Die relativen Expressionen von ADAM17 sind in Abb. 13 dargestellt.

Diese Daten zeigen, dass ADAM10 die hauptverantwortliche Protease für die proteolytische Spaltung von CXCL16 in humanen primären Keratinozyten ist. Der *gene knockdown* von ADAM10 vermindert die Proteolyse von CXCL16, während diese nicht durch einen *gene knockdown* von ADAM17 beeinträchtigt wird.

2.5 PMA und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interferon- γ haben keinen Einfluß auf die Proteolyse von CXCL16 in Keratinozyten

Um die Regulation der CXCL16-Proteolyse zu untersuchen, wurden Versuche mit Phorbol-12-myristamat-13-acetat (PMA) durchgeführt. PMA zeigt eine breite Wirkung auf Zellen. So wird durch Applikation von PMA zu CXCL16-transfizierten COS-7 Zellen die Proteolyse ADAM17-abhängig stimuliert (Abel et al 2004). Die Kulturüberstände der mit PMA behandelten Keratinozyten wurden mittels ELISA analysiert. In den jeweiligen Versuchsansätzen wurden die Metalloproteaseinhibitoren GI254023X und GW280264X appliziert, um bei verstärkter Proteolyse Rückschlüsse auf die verantwortliche Protease ziehen zu können. Dabei ergab sich, dass PMA keinen Effekt auf die Proteolyse von CXCL16 in primären murinen Keratinozyten aufwies (Abb.15). Die Metalloproteaseinhibitoren GI254023X und GW280264X inhibierten die Proteolyse von CXCL16. Der von GW280264X ausgehende Effekt war geringer als der von GI254023X.

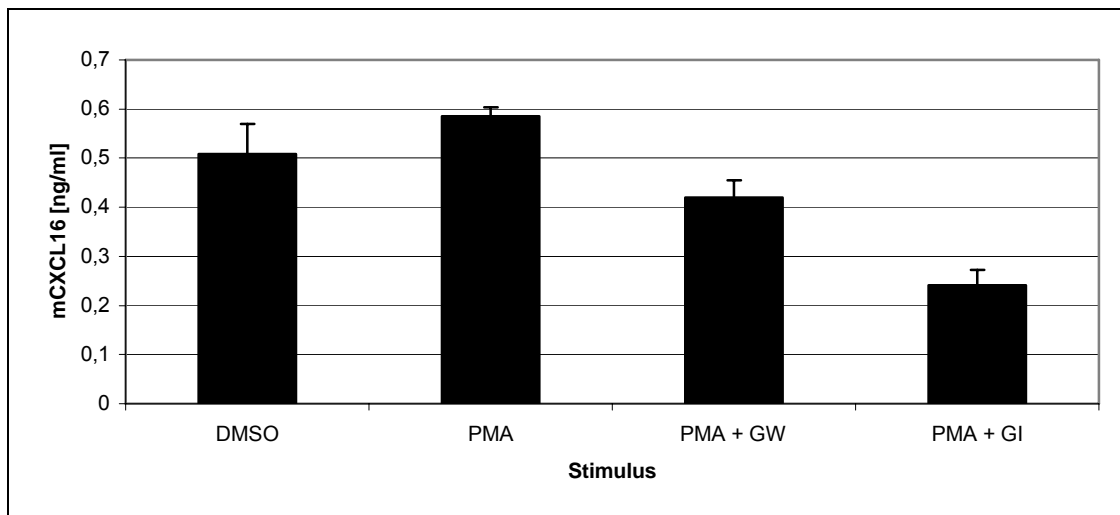


Abb.15: mCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer muriner Keratinozyten, die für vier Stunden mit 20 ng/ml PMA behandelt wurden. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet und jeweils 10 μ M der Inhibitoren GW280264X und GI254023X 30 Minuten vor Stimulation appliziert.

III Ergebnisse

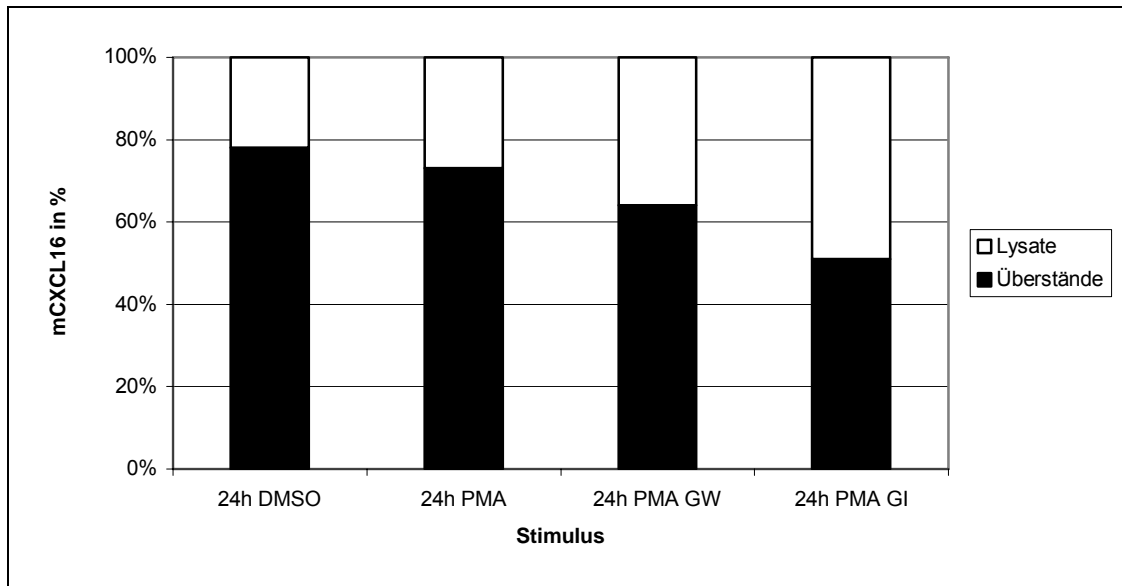


Abb.16: mCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer muriner Keratinozyten, die für vier Stunden mit 20 ng/ml PMA behandelt wurden. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der CXCL16-Proteinmenge von Überstand zu Lysat. Die Proben wurden 24 Stunden mit 20 ng/ml PMA behandelt. Die Inhibitoren wurden 30 Minuten vor Stimulation appliziert.

Die Proteolyseaktivität nach PMA-Applikation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht, es konnte jedoch keine signifikante Veränderung des Verhältnisses von geschnittenem zu membranständigem CXCL16 festgestellt werden. Abb.16 zeigt exemplarisch das Verhältnis von mCXCL16 in den Kulturüberständen der Keratinozyten zu mCXCL16 in den Lysaten 24 Stunden nach Stimulation mit PMA.

III Ergebnisse

Zusätzlich zu den primären murinen Keratinozyten wurde überprüft, ob PMA in murinen PAM212-Zellen einen Effekt auf die Proteolyse von CXCL16 hat. Auch in diesem System wurde keine erhöhte Proteolyse festgestellt (Abb. 17).

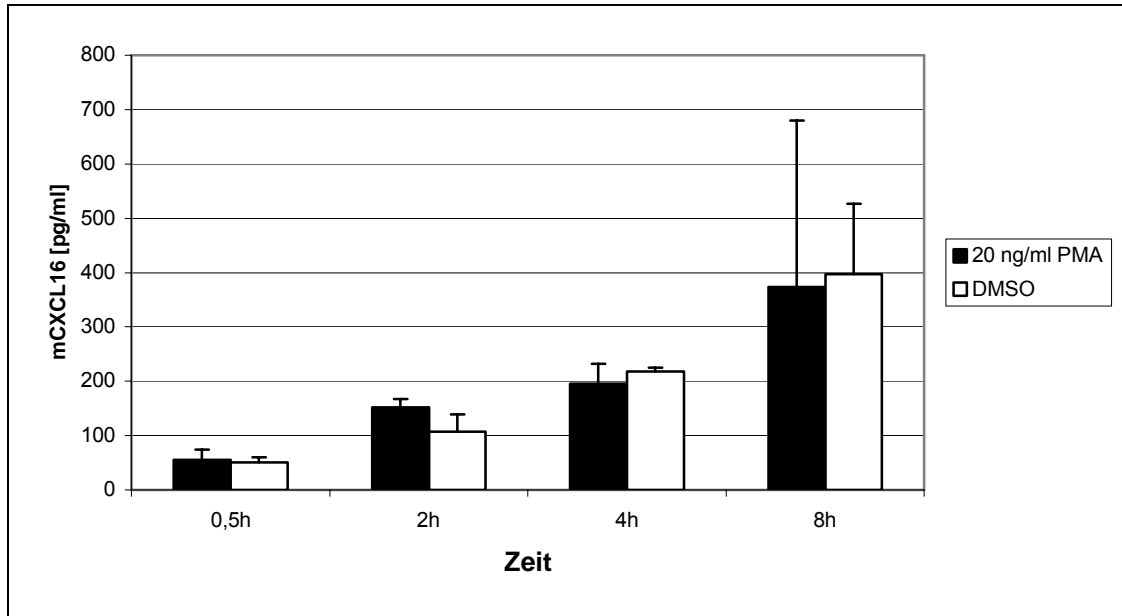


Abb.17: mCXCL16-ELISA von Kulturüberständen der murinen PAM212-Zelllinie nach Stimulation mit 20 ng/ml PMA. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation entommen.

Des weiteren wurde untersucht, ob die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interferon- γ in der Lage sind, die Proteolyse von CXCL16 in Keratinozyten zu beeinflussen. Es ist beschrieben, dass die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 über diese beiden Zytokine reguliert werden kann (Bzowska et al. 2004). Parallel zu den Zytokinen wurde separat und in Kombination mit den diesen jeweils 10 μ M Marimastat eingesetzt.

Durch die Stimulation der primären murinen Keratinozyten konnte keine erhöhte Proteolyse von CXCL16 festgestellt werden (Abb.18).

III Ergebnisse

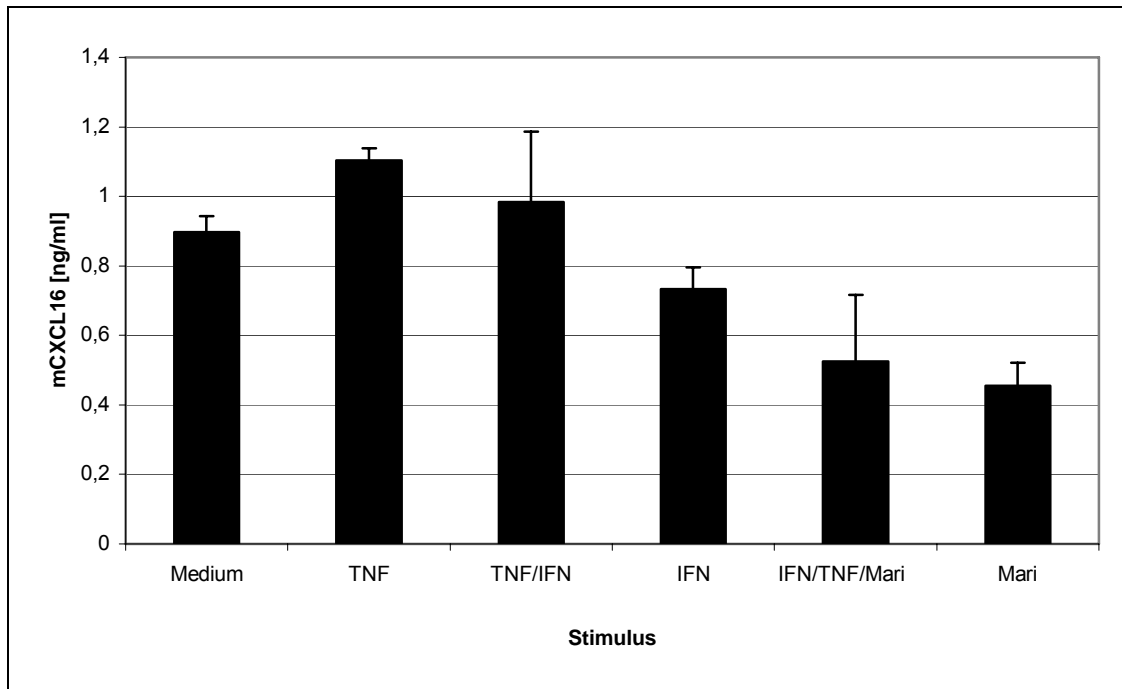


Abb.18: mCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer muriner Keratinozyten. Die Kulturüberstände wurden zwei Stunden nach Stimulation mit jeweils 10 ng/ml TNF- α , IFN- γ und 10 μ M Marimastat entnommen.

Es zeigte sich ebenfalls, dass humane primäre Keratinozyten auf die Stimulation mit TNF- α und Interferon- γ nicht mit vermehrter CXCL16-Proteolyse reagieren (Abb.19).

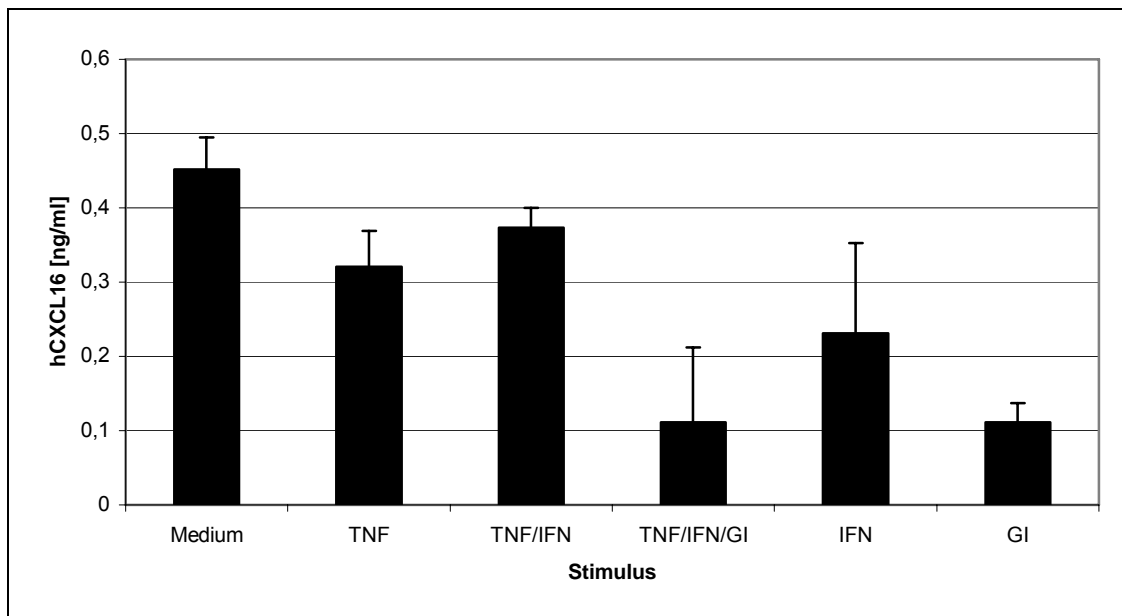


Abb.19: hCXCL16-ELISA von Kulturüberständen primärer humaner Keratinozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α , IFN- γ und GI254023X.

2.6 Ionomycin verstärkt die Proteolyse von CXCL16

Nachdem die proinflammatorischen Zytokine keine signifikanten Effekte auf die Proteolyse von CXCL16 zeigten, wurde Ionomycin getestet. Ionomycin verstärkt die proteolytische Aktivität von ADAM10 (Nagano et al. 2004). Es erhöht den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und aktiviert auf diese Weise kalziumabhängige Prozesse. Nach Applikation von Ionomycin auf HaCaT-Zellen zeigte sich ein rapider Anstieg der CXCL16-Proteolyse (Abb.20).

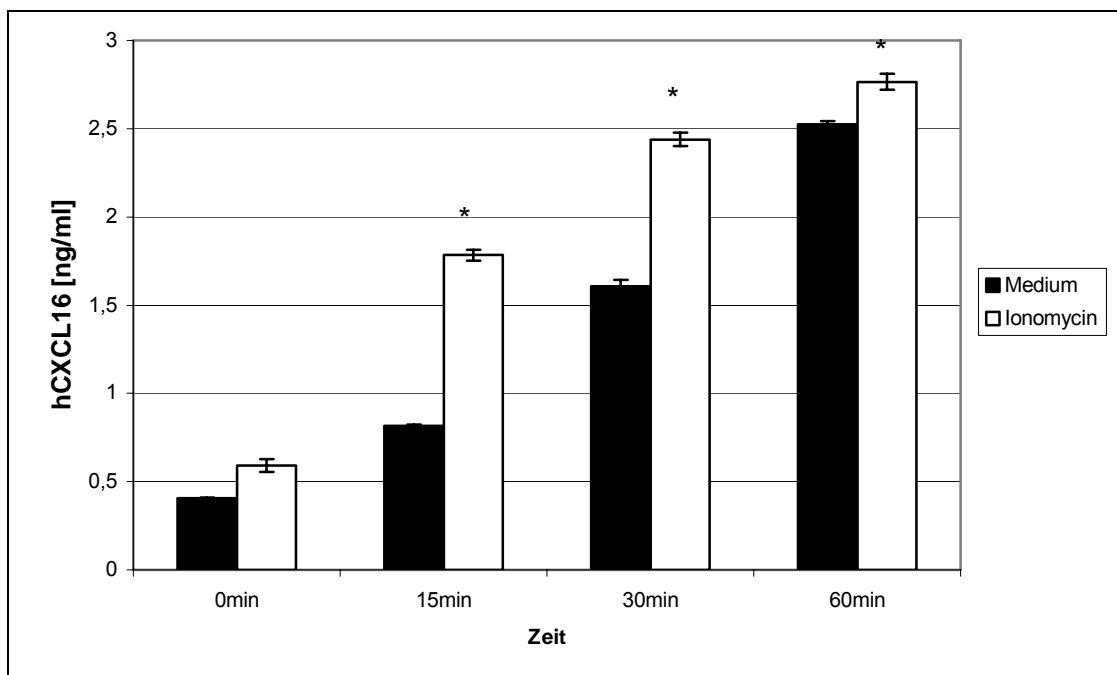


Abb.20: hCXCL16-ELISA aus Kulturüberständen von HaCaT-Zellen, die mit 1 μM Ionomycin stimuliert wurden. Die * zeigen den statistisch signifikanten Unterschied der mit Ionomycin behandelten Zellen zur jeweils entsprechenden unbehandelten Kontrolle. Die P-Werte entsprechen jeweil $p < 0,05$. (Der Versuch wurde von Frederic Adamski durchgeführt.)

2.7 Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit UVB führt zu einer verstärkten Proteolyse von CXCL16, die Bestrahlung mit UVA hat keinen Effekt

In einem weiteren Versuchsansatz wurde als physiologischer Stimulus für Keratinozyten UVA- und UVB-Bestrahlungsversuche an HaCaT-Zellen durchgeführt. Die Epidermis und Dermis sind ständig der Sonnenstrahlung ausgesetzt. Die Sonnenstrahlung besteht aus elektromagnetischen Strahlen verschiedener Wellenlängen und enthält unter anderem UVA und UVB. Diese sind für den Grossteil der biologischen Wirkung der Sonnenstrahlung verantwortlich. UVB hat eine Wellenlänge von 290 bis 320 nm und wirkt schädigend auf die DNA der Keratinozyten. Der UVB-Anteil der Sonnenstrahlung ist auch für das UV-Erythem (Sonnenbrand) und bei regelmäßigem Sonnenbaden für die sogenannte Lichtalterung der Haut und die Entwicklung von Hautkrebs verantwortlich (Ley 1985; Ananthaswamy et al. 1990). UVA besitzt eine Wellenlänge von 320 bis 400 nm und wirkt durch oxidativen Stress schädigend auf die Hautzellen (Hirota et al. 2005). UVA dringt aufgrund seiner Langwelligkeit tiefer als UVB in die Haut ein und schädigt somit nicht nur die Zellen der Epidermis, sondern auch die Fibroblasten in der Dermis. Auf diese Weise ist UVA verantwortlich für die lichtinduzierte grobe Faltenbildung der Haut.

Es wurde beschrieben, dass UVA in der Lage ist, in HaCaT-Zellen neben der ADAM17-mRNA-Expression ebenfalls die mRNA Expression von Furin zu induzieren (Skiba et al. 2005). Der Protease Furin wird eine Rolle bei der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 zugeschrieben (Endres et al 2003). Es wurden HaCaT-Zellen mit UVA bestrahlt, um zu überprüfen, ob der durch UVA induzierte oxidative Stress die Proteolyse von CXCL16 fördert. Es wurden verschiedene UVA-Strahlungsintensitäten getestet, beidene jedoch kein Effekt auf die Proteolyse von CXCL16 festgestellt werden konnte (Abb.21).

III Ergebnisse

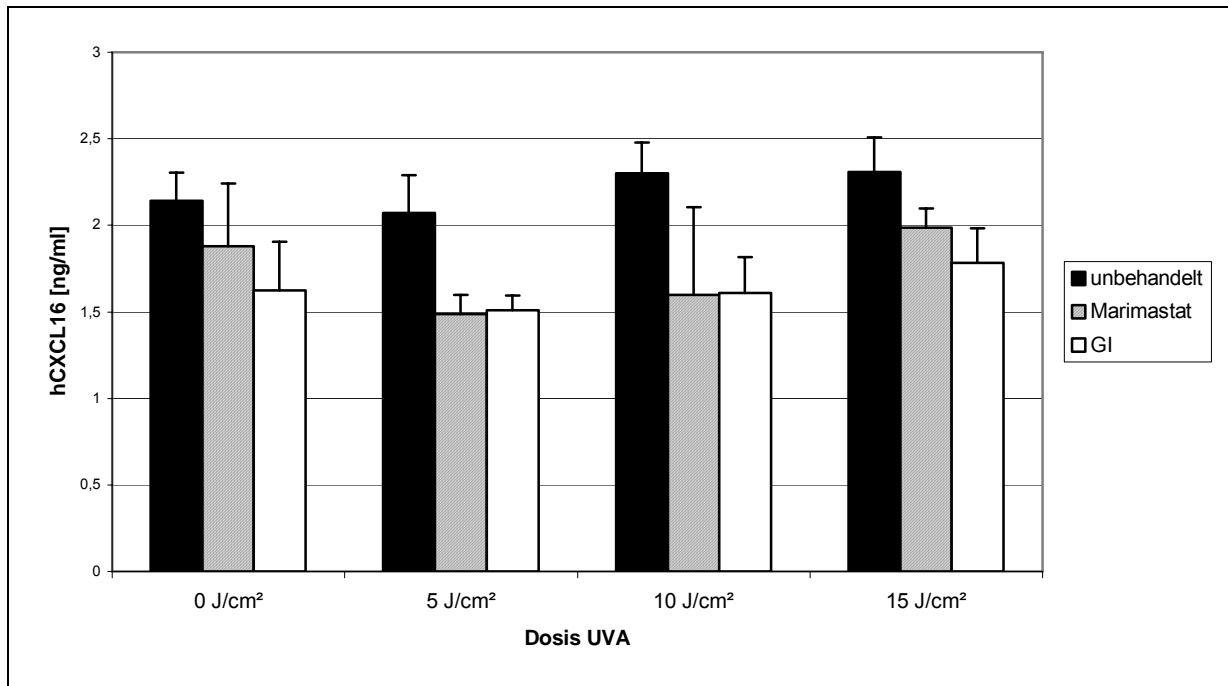


Abb.21: hCXCL16-ELISA aus HaCaT-Zellkulturüberständen, die mit verschiedenen Dosen UVA bestrahlt wurden. Die Kulturüberstände wurden zwei Stunden nach der Bestrahlung entnommen.

Als weiteren Stimulus wurde UVB-Bestrahlung eingesetzt. UVB induziert freie Radikale in Zellen, worauf die sogenannte Stressantwort eingeleitet wird. Es ist bekannt, dass die Bestrahlung mit UVB keinen großen Einfluss auf die Transkription von ADAM10 und ADAM17 hat. Es wird aber nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen die Transkription von Furin hochreguliert und vermehrt ADAM-Protease-Substrate wie TNF- α von den Keratinozyten gebildet (Skiba et al 2005). Dies deutet darauf hin, dass es nach Bestrahlung der Zellen zu einer Aktivierung von ADAM-Proteasen kommt.

Um zu überprüfen, ob UVB-Strahlen und die damit induzierte Aktivität von ADAM10 und ADAM17 einen Einfluss auf die Proteolyse von CXCL16 hat, wurden verschiedene Strahlungsintensitäten und Zeitpunkte getestet. Es stellte sich heraus, dass durch Bestrahlung mit UVB eine dosisabhängige Steigerung der Proteolyse von CXCL16 in HaCaT-Zellen erreicht wurde (Abb.22).

III Ergebnisse

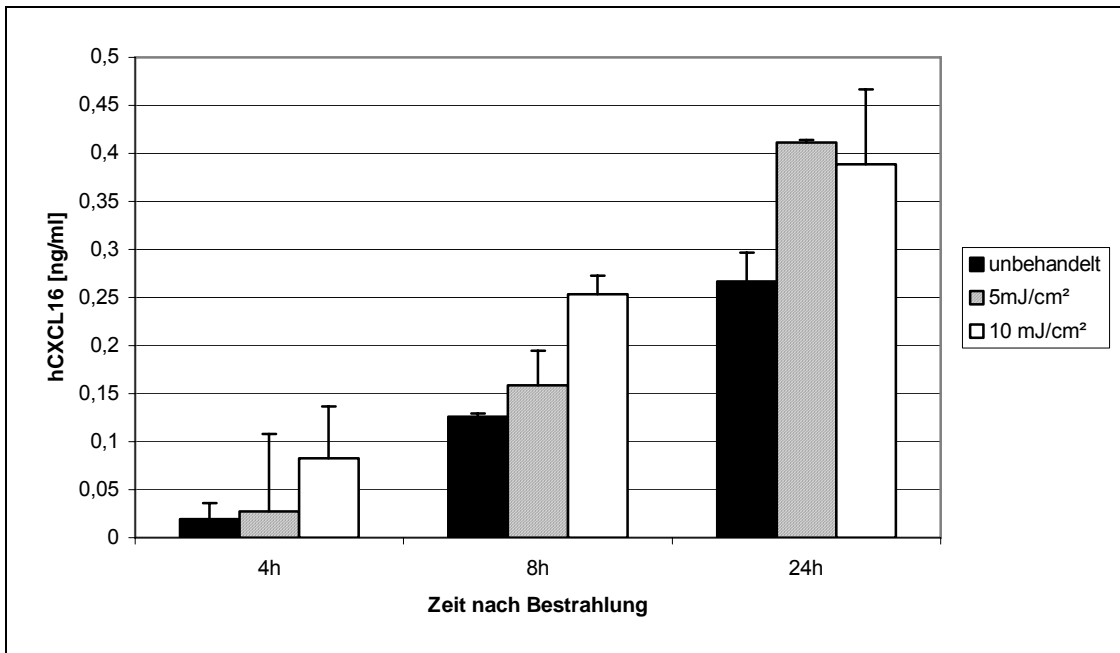


Abb.22: hCXCL16-ELISA aus Kulturüberständen von HaCaT-Zellen, die mit verschiedenen Dosen UVB bestrahlt wurden. Die Entnahme der Proben fand zu unterschiedlichen Zeiten statt.

Die durch die Bestrahlung hervorgerufene Proteolyse konnte mittels der Metalloproteinase-Inhibitoren GI254023X, GW280264X und Marimastat inhibiert werden (Abb.23).

III Ergebnisse

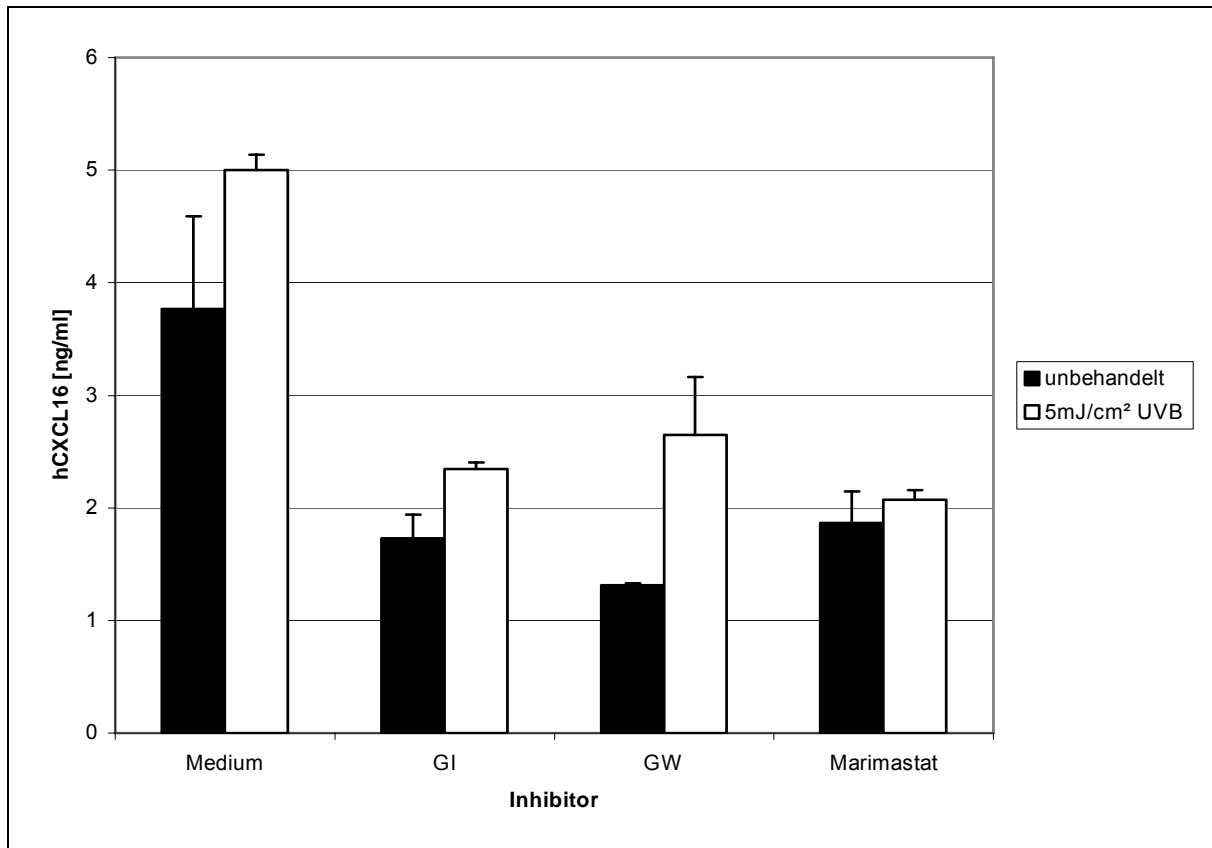


Abb.23: hCXCL16-ELISA von HaCaT-Zellen, die mit 5 mJ/cm² UVB bestrahlt wurden. Zusätzlich wurden jeweils die Inhibitoren GW280264X, GI254023X und Marimastat appliziert. Die Proben wurden 24 Stunden nach Bestrahlung entnommen.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die Bestrahlung mit UVA keine erhöhte CXCL16-Proteolyse hervorruft, während UVB-Strahlung eine metalloproteinasevermittelte proteolytische Spaltung induziert.

2.8 Der CXCL16-Rezeptor CXCR6 wird von Zellen in der Dermis exprimiert

Um Rückschlüsse auf die Funktion von CXCL16 in der Haut zu ziehen, wurde versucht mittels indirekter Immunfluoreszenz, den Rezeptor CXCR6 in gesunder humaner Haut nachzuweisen. Zum Einsatz kam ein monoklonaler Antikörper. In der Epidermis wurden keine CXCR6-immunreaktiven Zellen gefunden. In der Dermis wurden hingegen vereinzelt spezifische Rezeptor-exprimierende Zellen nachgewiesen (Abb.24).

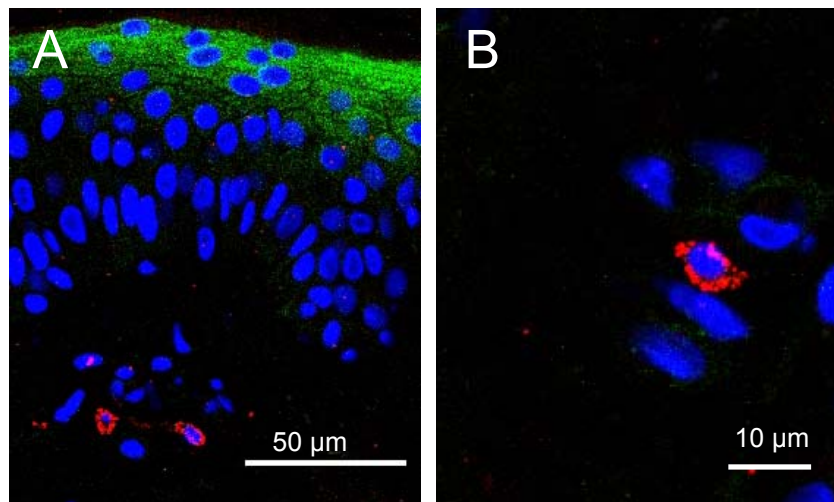


Abb.24: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit CXCR6- und CXCL16-spezifischen Antikörpern. Als Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet (blauer Kanal). **A Färbung mit anti-CXCR6 (roter Kanal) und anti-CXCL16 (grüner Kanal).** **B Färbung mit anti-CXCR6 (roter Kanal) und anti-CXCL16 (grüner Kanal).** Zu erkennen ist eine CXCR6 Positive Zelle der Dermis.

Im Frühjahr 2006 wurde eine Studie bezüglich dermalen T-Zellen veröffentlicht, in der die Autoren zeigten, dass es sich bei den CXCR6-positiven Zellen um dermale T-Zellen handelt (Clark et al. 2006).

2.9 CXCL16 wird bei Mäusen in die Wundflüssigkeit abgegeben

Es wurde die Wundflüssigkeit von Mäusen im Hinblick auf das Vorkommen von löslichem CXCL16 untersucht. Dazu wurden Wunden mit einem Durchmesser von zwei mm auf jeweils einer Flanke der Mäuse gesetzt. Vor und nach der Wundsetzung wurde mit 200 µl PBS gespült, anschließend wurden die Mäuse verbunden. Die Wunde wurde jeden Tag mit PBS gespült und der Verband erneuert. Es stellte sich heraus, dass CXCL16 ab dem ersten Tag nach der Wundsetzung in der Wundflüssigkeit nachweisbar ist. Die gemessene Menge an CXCL16 nahm im zeitlichen Verlauf zu und erreichte ihr Maximum zwischen dem dritten und dem sechsten Tag. An den folgenden Tagen sank die gemessene Menge wieder bis zum Hintergrundwert ab (Abb.25). Der Gesamt-Proteingehalt der Wundflüssigkeit änderte sich im Verlauf der Wundheilung nicht signifikant.

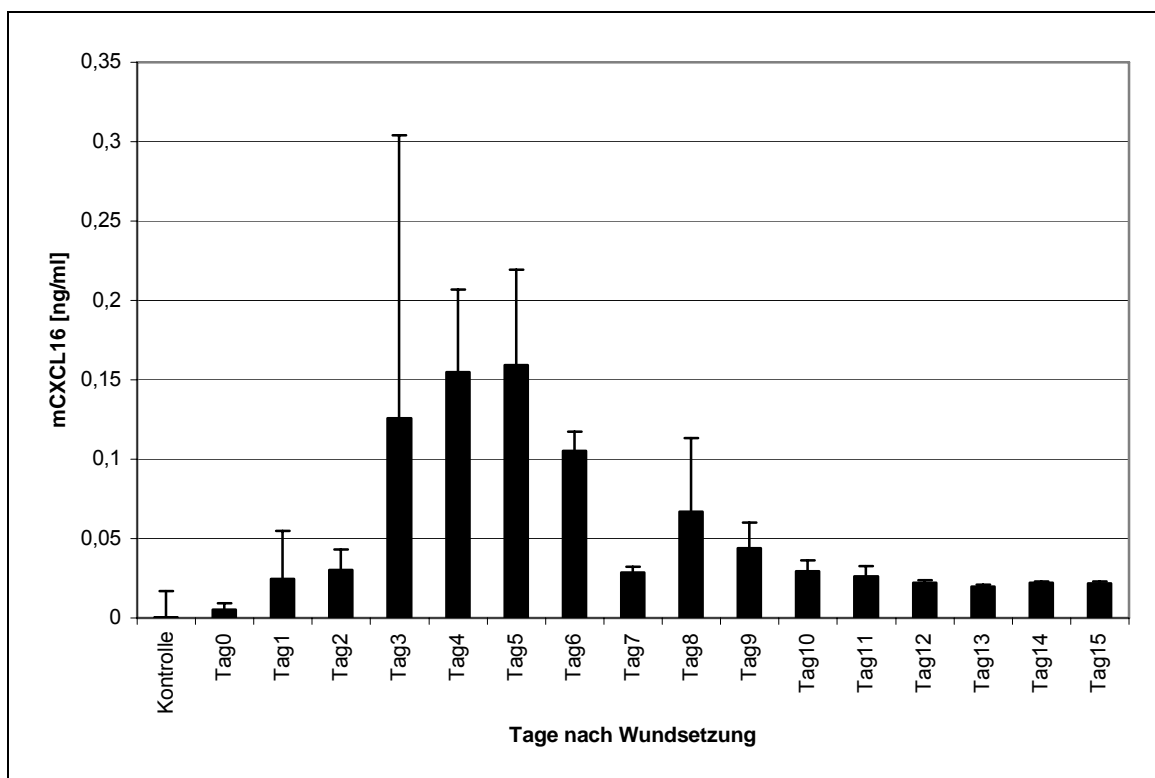


Abb.25.: mCXCL16-ELISA von Spülungen aus den Wundflüssigkeiten. Es wurden fünf haarlose SKH-1-Mäuse für diesen Versuch verwendet. Gespült wurde mit 200 µl PBS. Die Flaken wurden vor der Wundsetzung für den Referenzwert gespült. Nach Wundsetzung wurde jeden Tag gespült und anschließend die Wunde verbunden.

3. E-Cadherin

Als ein weiteres mögliches proteolytisches Substrat von ADAM10 und ADAM17 in der Epidermis wurde E-Cadherin untersucht. E-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül von Keratinozyten und wird von einer Protease gespalten. Bisher konnte die verantwortliche Protease jedoch nicht identifiziert werden. Bei Patienten mit entzündlichen Hautkrankheiten und verschiedenen Krebsarten wurden erhöhte E-Cadherin-Mengen im Blutserum nachgewiesen (Otto et al. 1993; Ryniers et al. 2002b; Chen et al. 2003b). Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob ADAM10 oder ADAM17 für die proteolytische Spaltung verantwortlich ist. Zusätzlich wurde auf die Fragestellung eingegangen, ob eine vermehrte Proteolyse von E-Cadherin zu einem Verlust der Adhäsion führt, mit besonderem Blick auf Krankheitsbilder, die eine Bläschenbildung in der Epidermis aufweisen.

3.1 E-Cadherin wird von Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* gebildet

E-Cadherin ist ein kalziumabhängiges Typ1-Transmembran-Glykoprotein. Es ist für die Adhäsion der Epithelzellen untereinander verantwortlich und ist an verschiedenen Prozessen wie Gewebeintegrität, Morphogenese und Wundheilung beteiligt (Otto et al 1993; Larue et al 1994; Le et al. 1999; Kuphal et al. 2004; Tunggal et al 2005).

E-Cadherin wird von Keratinozyten in gesunder Haut exprimiert (Abb.26 A und B). Es zeigte sich, dass E-Cadherin in der gesamten Epidermis exprimiert mit Ausnahme der basalen Bereiche des *Stratum basale* wird. Hier ist P-Cadherin für die Adhäsion der Keratinozyten an die Basallamina verantwortlich (Furukawa et al. 1997).

III Ergebnisse

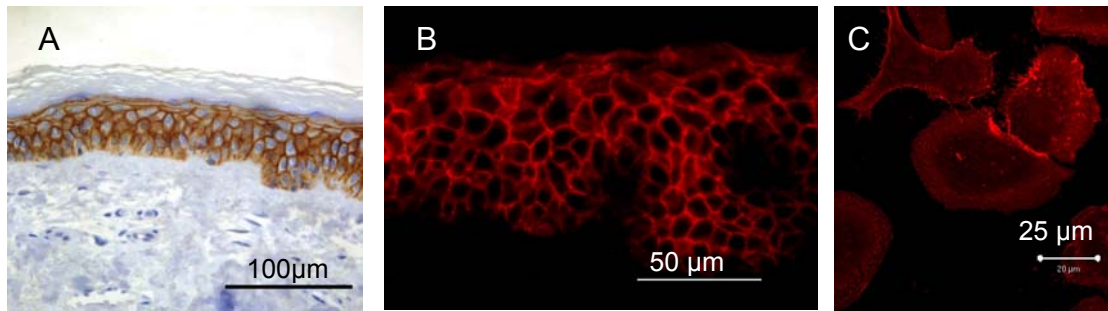


Abb.26: **A** DAB-Färbung mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper an einem Paraffinschnitt von gesunder humaner Haut. Die E-Cadherin Immunreaktivität ist in der gesamten kernhaltigen Epidermis zu finden außer in den basalen Bereichen des *Stratum basale*. **B** Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper an einem Paraffinschnitt von gesunder humaner Haut. Verwendet wurde ein CY3-gekoppelter sekundär Antikörper. **C** Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper an primären murinen Keratinozyten. Ein Cy3-gekoppelter sekundärer Antikörper wurde für den Nachweis verwendet. Die murinen Keratinozyten weisen an den Kontaktstellen eine verstärkte Immunreaktivität auf.

Primäre murine Keratinozyten sind auch in Zellkultur fähig E-Cadherin zu bilden. Es zeigte sich, dass die Immunreaktivität für E-Cadherin an den Adhäsionspunkten der Zellen stärker war als an Stellen, wo kein Zell-Zellkontakt stattfand.

3.2 E-Cadherin wird in primären murinen und humanen Keratinozyten von ADAM10 geschnitten

Um zu zeigen, dass E-Cadherin von ADAM10 geschnitten wird, wurden *western blot*-Analysen an primären murinen Keratinozyten durchgeführt. An den Lysaten von ADAM10^{-/-}-Embryonen konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin in diesen nicht proteolytisch gespalten wird, während in Embryos, die defizient für andere ADAMs sind, die C-terminalen Fragmente (CTFs) nachgewiesen werden, die nach erfolgter Proteolyse vorhanden sind (Maretzky et al. 2005a). Daraufhin wurden primäre murine Keratinozyten mit einem Überexpressionsvektor für ADAM10 transfiziert. Es konnte gezeigt werden, dass in den Keratinozytenkulturen, die ADAM10 überexprimieren, ebenfalls eine vermehrte Proteolyse von E-Cadherin stattfindet. In diesen Zelllysaten waren vermehrt C-terminale Fragmente nachweisbar (Abb.27).

III Ergebnisse

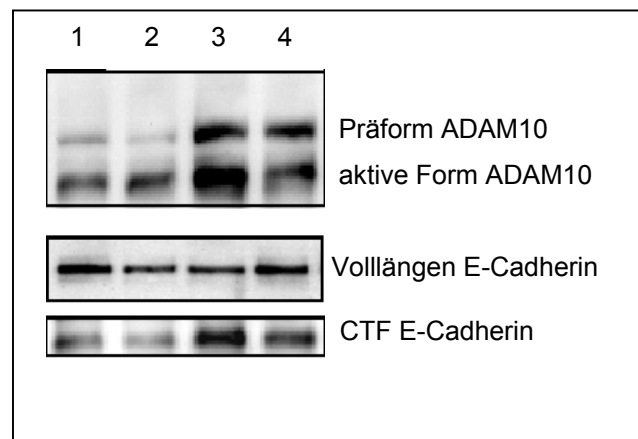


Abb.27: Oben *western blot* von murinem ADAM10 von Zelllysaten aus einer Übertransfektion von ADAM10 in primären murinen Keratinozyten. Die Spuren 1 und 2 enthalten Transfektionskontrollen, Spur 3 und 4 die Zelllysate nach Übertransfektion von ADAM10. In der Mitte und Unten ist eine Rehybridisierung des *western blots* mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper zu sehen.

Versuche mit dem Inhibitor GI254023X zeigten, dass die Generierung des C-terminalen Fragments von E-Cadherin konzentrationsabhängig inhibiert wurde. So wurden von den Keratinozyten, die mit höhere Konzentration GI254023X behandelt wurden, weniger C-terminale Fragmente gebildet. Im *western blot* wurde daher eine stärkere Bande für das Vollängen E-Cadherin nachgewiesen (Abb28).

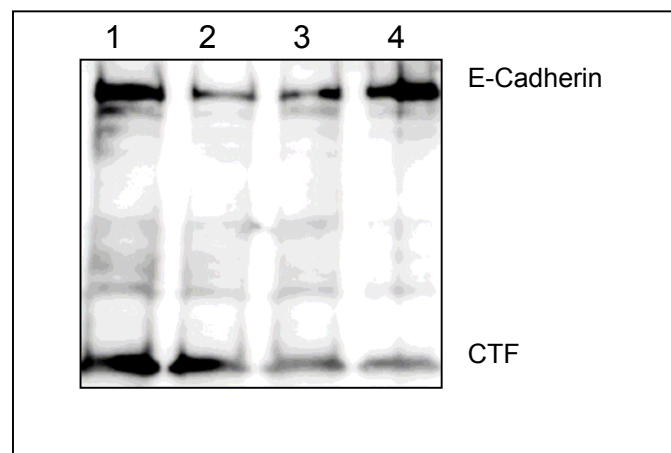


Abb.28: *Western blot* gegen E-Cadherin aus primären murinen Keratinozyten nach Inhibition mit 1 μM, 3 μM und 5 μM GI254023X. Das Vollängen E-Cadherin akkumulierte mit steigender Konzentration von GI254023X. Die CTF-Fragmente wurden mit steigender Konzentration von GI254023X vermindert gebildet. Spur 1 = DMSO Kontrolle, Spur 2 = 1 μM GI254023X, Spur 3 = GI254023X 3 μM und Spur 4 = GI254023X 5 μM.

III Ergebnisse

Mit Hilfe von ADAM10-siRNA-Transfektionen konnte für das humane System ebenfalls gezeigt werden, dass in primären humanen Keratinozyten E-Cadherin proteolytisch von ADAM10 gespalten wird. In den Zelllysaten, die 48 und 72 Stunden nach siRNA-Transfektion entnommen wurden, war die mature Form von ADAM10 kaum nachweisbar. In den gleichen Proben konnte mittels eines *western blots* gegen E-Cadherin gezeigt werden, dass 48 Stunden nach Transfektion noch ähnliche Mengen des C-terminalen Fragmentes gebildet wurden wie bei den entsprechenden Kontrollen. 72 Stunden nach der Transfektion akkumulierte das Vollängen E-Cadherin, während weniger vom C-terminalen Fragment gebildet wurde (Abb.29).

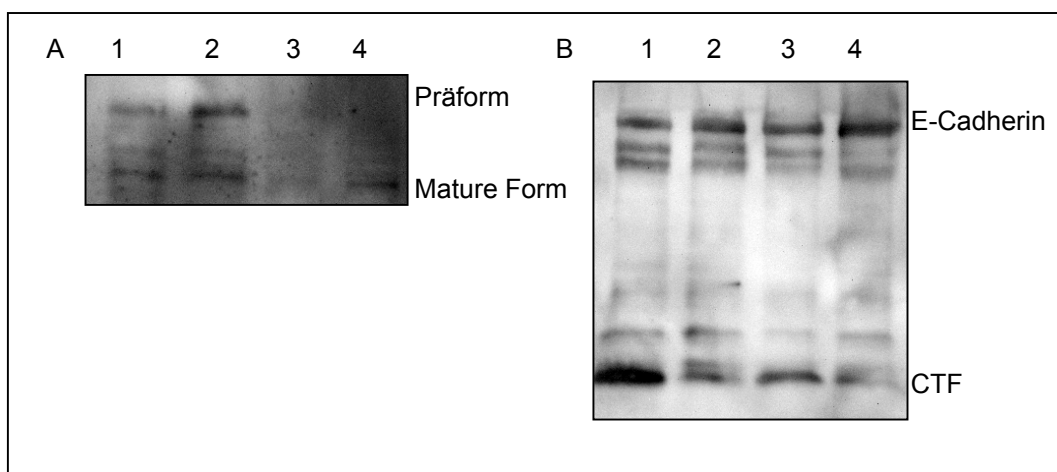


Abb.29: A Western blot an Zelllysaten von primären humanen Keratinozyten unter Verwendung eines für ADAM10 spezifischen Antikörpers. Die Spuren 1 und 2 enthalten die siRNA-Negativkontrolle, die Spur 3 die Probe 48 Stunden nach erfolgter ADAM10-siRNA-Transfektion. Die vierte Spur enthält das Zelllysate 72 Stunden nach Transfektion mit ADAM10-siRNA. Das ADAM10-Signal wurde durch die Transfektion vermindert. **B Western blot aus A rehybridisiert mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper.** In Spur 4, 72 Stunden nach Transfektion der Keratinozyten mit ADAM10-spezifischer siRNA, akkumuliert das Vollängen E-Cadherin. Das C-terminale Fragment wird weniger gebildet. (Dieser Versuch wurde von Thorsten Maretzky durchgeführt.)

3.3 ADAM10 und E-Cadherin weisen beim akuten Ekzem unterschiedliche Expressionsmuster auf

Verschiedene Hautkrankheiten weisen pathologische Störungen in der Epidermis auf. So findet man unter anderem bei verschiedenen Formen des Ekzems spongiotische Bläschen. Charakteristisch hierfür ist, dass die Keratinozyten in der Epidermis auseinanderweichen, und somit je nach Ausprägung der Krankheit eine Spalte entsteht bzw. Bläschen entstehen. An histologischen Schnitten von Biopsien aus akuten Ekzemen zeigte sich, dass ADAM10 verstärkt exprimiert wurde. Ebenso war zu erkennen, dass sich die homogene cytosolische Immunreaktivität von ADAM10 veränderte. Diese war teilweise an der Zellmembran akkumuliert (Abb.31). Die E-Cadherin-Immunreaktivität, die in gesunder Haut normalerweise sehr homogen ist (Abb.30 A), verschwand zum Teil in Bereichen der Bläschenbildung oder war nur noch punktförmig nachweisbar (Abb.31). In Bereichen, in denen die Spongiose noch nicht allzu stark fortgeschritten war, ist die E-Cadherin-Immunreaktivität relativ durchgängig in der Zellmembran der Keratinozyten zu finden. Dort, wo die Spongiose allerdings weiter fortgeschritten ist, ist kaum noch intakte Immunreaktivität für E-Cadherin zu finden (Abb.32 IIA). Es zeigte sich, dass die auseinander weichenden Keratinozyten nur noch an den Adhäsionspunkten E-Cadherin exprimierten (Abb.32 IIA und IIIA).

III Ergebnisse

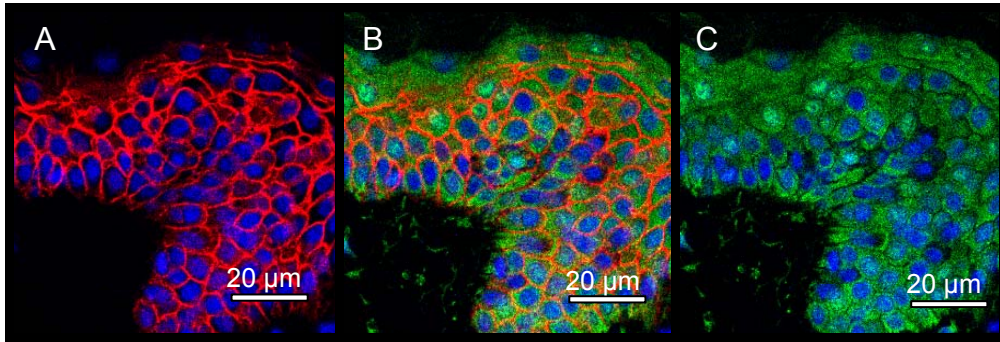


Abb.30: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten von gesunder humaner Haut. Der Maßstab entspricht 100 µm. Die Kernfärbung wurde mit Hoechst-Farbstoff durchgeführt. **A Färbung von E-cadherin.** Der verwendete Sekundärerantikörper war mit Cy3 markiert. Die E-Cadherin-Immunreaktivität war an den Zellmembranen der Keratinozyten in der gesamten Epidermis gleichmäßig. Die Ausnahme war die basale Zellmembran der Basalzellschicht. Hier ist keine Immunreaktivität für E-Cadherin zu finden. **B Überlagerungsbild vom roten und grünen Kanal.** **C Färbung von ADAM10.** Der sekundäre Antikörper war mit Cy2 gekoppelt. Die ADAM10-Immunreaktivität ist in der gesamten Epidermis zu finden.

III Ergebnisse

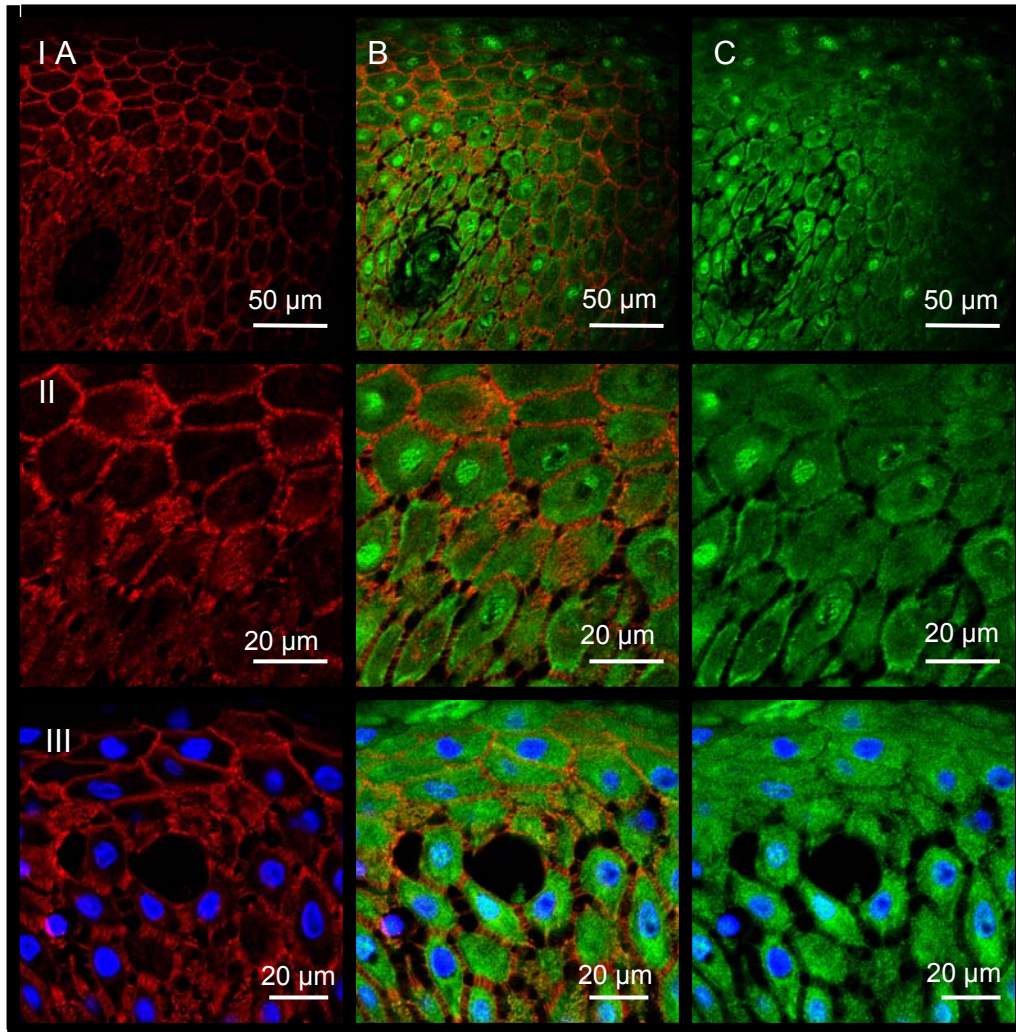


Abb.31: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten von Biopsien zweier verschiedener akuter Ekzeme. Für die Kernfärbung wurde der Hoechst-Farbstoff verwendet (blauer Kanal). **A Färbung von E-Cadherin.** Der verwendete Sekundärantikörper war Cy3 gekoppelt (roter Kanal). **B Überlagerungsbild von A und C.** **C Färbung von ADAM10.** Der verwendete Sekundärantikörper war mit Cy2 gekoppelt (grüner Kanal). **I akutes Ekzem in der Übersicht.** Zu erkennen ist, dass die Keratinozyten sich ringförmig um ein großes spongiotisches Bläschen anordnen. In Richtung des Zentrums des großen Bläschens hin lockert die Adhäsion der Keratinozyten immer mehr auf. Die Immunfluoreszenz von ADAM10 scheint im Bereich um das spongiotischen Bläschen intensiver zu sein. **II Vergrößerung des spongiotischen Bereiches von I.** Es ist deutlich zu erkennen, dass das Expressionsmuster von E-Cadherin gestört ist. In den Bereichen, wo die Spongiose noch nicht stark fortgeschritten ist, ist eine relativ gleichmäßige Immunreaktivität zu erkennen, die aber schon Unterbrechungen aufweist. In den Bereichen, wo die Spalten zwischen den Keratinozyten größer werden, geht die Immunreaktivität verloren. Sie bleibt nur an den Kontaktpunkten der Keratinozyten erhalten. **III Übersicht über den spongiotischen Bereich eines akuten Ekzems.** Auch bei diesem akuten Ekzem ist zu erkennen, dass in den spongiotischen Bereichen die Immunreaktivität von E-Cadherin gestört ist. Sie ist nur an den verbleibenden Kontaktstellen der Keratinozyten zu erkennen.

III Ergebnisse

Um zu quantifizieren, ob bei erkrankter Haut mehr ADAM10 gebildet wird als in gesunder, wurden Proben aus akuten Ekzemen mittels *western blot* analysiert. Es zeigte sich, dass ADAM10 in erkrankter Haut verstärkt in seiner murenen Form nachweisbar war (Abb.32A).

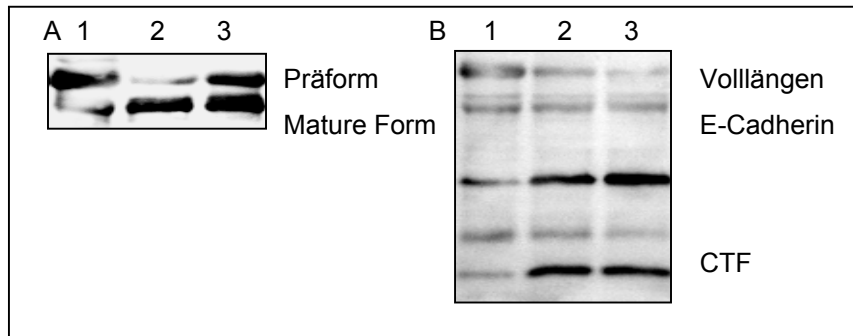


Abb.32: A Western blot mit einem ADAM10-spezifischen Antikörper. Spur 1 = Probe aus gesunder Haut, Spur 2 und 3 = Proteine aus einem Lysat eines akuten Ekzems. Im akuten Ekzem wurden größere Mengen der murenen Form von ADAM10 gebildet. **B Western blot mit einem für E-Cadherin-spezifischen Antikörper.** Spur 1 = Probe aus gesunder Haut, Spur 2 und 3 = Probe aus einem akuten Ekzem. Das C-terminale Fragment wurde in der erkrankten Haut vermehrt gebildet.

Die erkrankte Haut wies nicht nur eine verstärkte Bildung der murenen Form von ADADM10 auf, sondern gleichzeitig eine vermehrte Bildung der C-terminalen Fragmente von E-Cadherin (Abb.32B). Die verstärkte Bildung von C-terminalen Fragmenten korreliert mit einer starken Verminderung des Vollängen E-Cadherins.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinase ADAM10 auf die Proteolyse von membrangebundenen Proteinen in der Haut untersucht. Zu Beginn der Dissertation war bereits bekannt, dass verschiedene ADAM-Proteine in der Haut exprimiert werden. Jedoch wurde die Expression und Funktion von ADAM10 bisher nicht eingehend untersucht. Wir vermuteten, dass ADAM10 die verantwortliche Protease für die proteolytische Spaltung des membranständigen Chemokins CXCL16 in der Haut ist. Daher untersuchten wir zunächst, ob CXCL16 von Keratinozyten exprimiert wird und im nächsten Schritt, ob ADAM10 die hauptverantwortliche Protease für die proteolytische Spaltung von CXCL16 in Keratinozyten ist. Um Hinweise über die Funktion von ADAM10 und CXCL16 in der Haut zu erlangen, wurde die Wirkung verschiedener Stimuli *in vitro* getestet. Zudem wurde *in vivo* untersucht, ob CXCL16 bei Vollhautwunden von Mäusen in die Wundflüssigkeit sezerniert wird. Danach wurde untersucht wo der CXCL16-bindende Rezeptor CXCR6 in der Haut lokalisiert ist. Als ein weiteres potentielles Substrat von ADAM10 wurde die Proteolyse des Adhäsionsmolekül E-Cadherin untersucht. Für E-Cadherin war bekannt, dass es proteolytisch in Keratinozyten gespalten wird, die dafür verantwortliche Protease wurde bisher nicht identifiziert. Ferner wurde untersucht, ob die durch den Abbau von E-Cadherin vermittelte Bläschenbildung bei der Hauterkrankung des akuten Ekzems durch ADAM10 vermittelt wird.

1. ADAM10 und ADAM17 werden konstitutiv von Keratinozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* exprimiert

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass Keratinozyten ADAM10 und ADAM17 exprimieren. Im *western blot* von HaCaT-Zelllysaten wurden jeweils die inaktive Pro-Form und die aktive mature Form von ADAM10 und ADAM17 nachgewiesen. Zusätzlich wurde mittels Immunhistochemie gezeigt, dass ADAM10

IV Diskussion

in der gesamten kernhaltigen Epidermis gesunder Haut exprimiert wird. Die Immunreaktivität wies in den oberen Zellschichten der Epidermis eine homogene Färbung auf, im *Stratum basale* war zudem eine verstärkte Immunreaktivität zu finden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass verschiedene ADAM-Proteasen in der Haut exprimiert werden. ADAM9/10/17 sind an der proteolytischen Spaltung von Kollagenen in der Haut beteiligt (Franzke et al. 2002; Kawaguchi et al. 2004). Ein Substrat für ADAM10 und ADAM17 ist der IL-6-Rezeptor (Matthews et al. 2003). Anhand von Barrierestörungsversuchen an Mäusen, wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass der lösliche IL-6-Rezeptor eine wichtige Rolle bei Reparaturprozessen von oberflächlichen Wunden in der Haut spielt (Wang et al. 2004b). Des Weiteren konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass der membranständige Wachstumsfaktor HB-EGF durch ADAM-Proteasen in die aktive Form überführt wird und als lösliches HB-EGF chemotaktisch auf Keratinozyten wirkt. HB-EGF wurde in der Haut am Wundrand und in der Wundflüssigkeit nachgewiesen (Marikovsky et al. 1993; Tokumaru et al. 2000; Shirakata et al. 2005). Dies sind Indizien, die darauf hinweisen, dass die gezielte Proteolyse von membranständigen Proteinen der Haut von Bedeutung für die Homöostase und für Reparaturprozesse in der Haut ist.

2. CXCL16

Keratinozyten sind wichtige Produzenten von Wachstumsfaktoren und Chemokinen in der Haut (Gillitzer 2001; Gillitzer et al. 2001; Payne et al. 2002; Homey et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das membrangebundene Chemokin CXCL16 von Keratinozyten der Haut exprimiert wird. Immunhistochemische Analysen gesunder Haut wiesen eine homogene Immunreaktivität von CXCL16 in der gesamten Epidermis mit Ausnahme des ausgesparten *Stratum corneum*s auf.

Primäre murine und humane Keratinozyten sind ebenfalls in der Lage CXCL16 unter Zellkulturbedingungen zu bilden. Durch Analysen der Zellkulturüberstände konnte festgestellt werden, dass Keratinozyten CXCL16 in den Kulturüberstand abgeben. CXCL16 akkumuliert in den Kulturüberständen mit der Zeit. Es wurde bereits

IV Diskussion

beschrieben, dass in Fibroblasten und Endothelzellen CXCL16 von ADAM10 konstitutiv und nach Stimulation mit PMA von ADAM17 proteolytisch gespalten wird (Abel et al 2004; Gough et al 2004). Um zu überprüfen, ob in den Keratinozyten ebenfalls eine proteolytische Spaltung erfolgt, wurden Untersuchungen mit verschiedenen Metalloproteinaseinhibitoren durchgeführt. Marimastat, ein Breitbandinhibitor für Metalloproteinasen, zeigte bei den Experimenten nur einen schwachen inhibitorischen Effekt. Erst in höheren Dosen konnte die proteolytische Spaltung von CXCL16 effektiv verringert werden. Durch den für ADAM10 und ADAM17 spezifischen Inhibitor GW280264X konnte in einer Dosierung von 5 μM die Proteolyse vermindert werden. Der ADAM10-spezifische Inhibitor GI254023X war hingegen in geringeren Dosen schon ab 1 μM in der Lage inhibitorisch zu wirken. Diese Ergebnisse wurden sowohl für humane als auch für murine Keratinozyten erhalten und ließen vermuten, dass ADAM10 für die konstitutive Spaltung von CXCL16 in primären Keratinozyten verantwortlich ist.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurden an primären humanen Keratinozyten *knockdown* Versuche mit siRNA durchgeführt. Mit dieser Methoden konnte die Transkriptmenge von ADAM10 und ADAM17 um 60 bis 80% herabreguliert werden. Durch die Analyse der Zellkulturüberstände mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass die Menge an CXCL16 in den Kulturüberständen von Keratinozyten mit verminderter ADAM10-Expression signifikant vermindert war. Die proteolytisch gespaltenen Menge CXCL16 von den Zellen mit herunterregulierter ADAM17-Expression unterschied sich nicht signifikant von den siRNA-Kontrollen. In den ADAM10 herunterregulierten Zellen wurde weiterhin im geringen Maße CXCL16 geschnitten. Dies liegt vermutlich an der Translation der verbliebene mRNA. Im *western blot* konnten keine Banden mehr detektiert werden, was dafür spricht, dass der ADAM10-Proteingehalt in den Zellen unter die Detektionsgrenze des Antikörpers gesunken war. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass ADAM10 die hauptverantwortliche Protease für die konstitutive Prozessierung von CXCL16 in Keratinozyten ist.

In der Literatur wurde beschrieben, dass es durch Stimulation mit Phorbolestern zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) kommt und das dies zu einer erhöhten Proteolyse durch ADAM-Proteasen führt. Beschrieben ist dieser Effekt unter anderen

IV Diskussion

für IL6-R, TNF- α und L-Selektin (Mullberg et al. 1993; Peschon et al 1998a). Im Zusammenhang mit der Phorbol-ester-abhängigen Aktivierung der Proteolyse konnte für das Prion-Protein, das Amyloid-Vorläuferprotein und das L1-Protein gezeigt werden, dass ADAM10 für die konstitutive Proteolyse dieser Substrate zuständig ist, und ADAM17 nach Stimulation die gleichen Substrate schneidet (Buxbaum et al. 1998; Vincent et al. 2001; Maretzky et al. 2005b). Diese differenzielle Art der Regulation findet man auch für die membranständigen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 (Garton et al 2001; Hundhausen et al 2003; Abel et al 2004). So konnte anhand von mit CXCL16 transfizierten murinen ADAM10-defizienten Fibroblasten gezeigt werden, dass ADAM17 nach PMA-Stimulation CXCL16 schneidet. Die differentielle Regulation der Proteolyse ist aber kein generelles Prinzip. Die verstärkte N-Cadherin Proteolyse nach Stimulation mit dem Phorbol-ester PMA lässt sich nicht auf ADAM17 zurückführen, sondern auf die proteolytische Aktivität von ADAM10 (Reiss et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden Stimulationsversuche an Keratinozyten mit PMA durchgeführt. Es wurden verschiedene Stimulationszeiten und PMA-Konzentrationen getestet. In Zellkultur konnte jedoch keine verstärkte Proteolyse von CXCL16 gemessen werden. Die CXCL16-Proteolyse ist demnach in Keratinozyten nicht durch PMA-Stimulation induzierbar.

Keratinozyten sind in der Lage verschiedene Zytokine zu exprimieren, unter anderem auch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ . IFN- γ stimuliert in verschiedenen Zelltypen wie glatter Muskulatur und Endothelien die Expression von CXCL9/10/11, CX3CL1 und auch CXCL16 (Abel et al 2004; Wuttge et al. 2004). Für Keratinozyten ist beschrieben worden, dass IFN- γ die Expression von CX3CL1, CXCL10 und CXCL9 induziert (Kaplan et al. 1987; Tensen et al. 1999; Sugaya et al. 2003). Interessanterweise hat IFN- γ alleine und auch in Co-Stimulation mit TNF- α keinen Einfluss auf die Expression und die Proteolyse von CXCL16 in primären murinen und humanen Keratinozyten. Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von CXCL16 in HaCaT-Zellen durch Stimulation mit Ionomycin erhöht werden konnte. Ionomycin fördert die ADAM10-abhängige Proteolyse durch Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels (Nagano et al 2004; Reiss et al 2005). Durch Bestrahlung mit UVB in einer physiologischen Dosierung, konnte die Gesamtproteinmenge von CXCL16 in HaCaT-Zellen erhöht werden. Darüber hinaus

IV Diskussion

konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Proteinmenge von CXCL16 ansteigt, sondern auch dessen Proteolyse verstärkt wird. Durch Applikation der Metalloproteinaseinhibitoren Marimastat, GW280264X und GI254023X akkumulierte CXCL16 in den Zelllysaten, und die in die Überständen abgegebene Menge wurde reduziert. Die Regulation der Aktivierung von ADAM10 durch UVB-Strahlen scheint Ca^{2+} -abhängig zu sein. Durch Bestrahlung von Zellen mit UVB steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration an und aktiviert calmodulinabhängige Prozesse (Spielberg et al. 1991; Deliconstantinos et al. 1996; Hightower et al. 1999). Es wird davon ausgegangen, dass Calmodulin konstitutiv an inaktives Pro-ADAM10 gebunden ist und durch die Erhöhung des Kalziumspiegels von diesem dissoziiert und ADAM10 auf diese Weise aktiviert werden kann (Nagano et al. 2004). Zusammengenommen sprechen diese Daten dafür, dass ADAM10 in Keratinozyten nicht nur konstitutiv aktiv ist, sondern auch durch kalziumabhängige Prozesse wie den durch Ionomycin und UVB-Strahlen verursachten zellulären Stress verstärkt aktiviert werden kann und vermehrt CXCL16 schneidet.

In der Literatur wurden verschiedene Funktionen für CXCL16 beschrieben. So dient es als Rezeptor für oxidiertes „*low density Lipoprotein*“ (LDL) *in vitro* (Shimaoka et al. 2000). Für CXCL16-exprimierende Makrophagen und dendritische Zellen wurde gezeigt, dass die Bindung der Chemokin-Domäne an Bakterien zur Phagozytose beiträgt (Shimaoka et al. 2003). Chemokine können auch antimikrobielle Aktivität aufweisen. Dies wurde unter anderen für CXCL4/9/10 und 11 gezeigt (Durr et al. 2002). Für CXCL16 ist dies bisher aber noch nicht gezeigt worden. Eine andere Funktion von CXCL16 ist seine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen. Es bindet spezifisch an den Rezeptor CXCR6 (Matloubian et al. 2000). Es konnte anhand von indirekten Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten gesunder humaner Haut gezeigt werden, dass der Rezeptor von einer Unterpopulation von Zellen in der Dermis exprimiert wird. Die Zellen kommen in einer sehr geringen Frequenz in der Dermis vor. Vor kurzem konnte durch Untersuchungen von Clark et al. anhand von FACS-Analysen an intradermalen Immunzellen gezeigt werden, dass die CXCR6-exprimierenden Zellen eine Untergruppierung der dermalen T-Zellen darstellen (Clark et al. 2006). Somit gibt es in der Haut eine räumliche Trennung zwischen ligandexprimierenden Zellen und rezeptorpositiven Zellen. Der Ligand CXCL16 wird von den Keratinozyten der Epidermis gebildet, während der Rezeptor von T-Zellen

IV Diskussion

der Dermis exprimiert wird. Ein ähnlicher Unterschied in der Lokalisation von Chemokin und Rezeptor wurde kürzlich für CCL27 beschrieben. CCL27 wird in der Epidermis von Keratinozyten exprimiert und durch Stimulation mit UVB-Strahlen ausgeschüttet. Es wirkt als chemotaktisches Molekül auf die T-Zellen der Dermis (Meller et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst lassen vermuten, dass CXCL16-Aktivierung im Rahmen von Stressantworten der Epidermis eine Rolle spielt. CXCL16 wird durch Verletzung der Haut wie UVB-Bestrahlung oder eine mechanische Verletzung freigesetzt und kann in die Dermis diffundieren. Dort kann es an die rezeptorpositiven T-Zellen binden, die entweder an den Ort der Schädigung migrieren oder eine Entzündung induzieren.

3. E-Cadherin

Die Epidermis erneuert sich ständig. Keratinozyten in der Epidermis haben eine Transitzeit von der Bildung in der Basalzellschicht bis zur Abschuppung von etwa 28 Tagen. Bei Stressreaktionen und bei verschiedenen Hauterkrankungen ist die Transitzeit deutlich verkürzt, so kann sie bei psoriatisch erkrankter Haut nur etwa vier Tage dauern. Die Epidermis reagiert auf Umwelteinflüsse und Schädigung mit Reparaturmechanismen, um die Integrität der Haut zu erhalten (Freinkel et al 2001). Um diese Anforderungen zu erfüllen ist es notwendig, dass ein ausgefeiltes regulatives Netzwerk vorhanden ist. E-Cadherin ist eins der wichtigsten Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle der Keratinozyten der Epidermis. Es vermittelt die Adhäsion zwischen den Keratinozyten und trägt zur Integrität der Epidermis bei. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin in der gesamten Epidermis exprimiert wird, mit Ausnahme der Kontaktfläche der Keratinozyten an der Basalmembran wo der Kontakt zwischen Keratinozyten und Basalmembran durch P-Cadherin gewährleistet wird (Furukawa et al 1997). In Zellkultur wurde beobachtet, dass E-Cadherin an Adhäsionspunkten der Keratinozyten verstärkt lokalisiert ist.

Morphogenese von Epithelien und auch das Rearrangieren der Epidermis im adulten Organismus setzt eine regelmäßige Lockerung und Neubildung von Zell-Zell-Kontakten voraus (Gumbiner 1992). Dementsprechend ist die Regulation der Expression und des Proteinumsatzes von E-Cadherin für eine gesunde Haut von großer Bedeutung. So weisen verschiedene Hautkrankheiten ein verändertes E-Cadherin-Expressionsmuster auf. Bei der Autoimmunerkrankung *Pemphigus vulgaris* werden Antikörper gegen verschiedene Cadherine gebildet. Dies führt dazu, dass die Keratinozyten ihre Adhäsion zueinander verlieren. Die Erkrankung geht mit suprabasaler, akantholytischer Blasenbildung einher (Evangelista et al. 2006). Des Weiteren ist die Herabregulierung von E-Cadherin und damit korrelierende Metastasierung bei verschiedenen Krebsarten beschrieben worden. In diesem Zusammenhang konnte auch ein erhöhter löslicher E-Cadherin-Spiegel im Serum von Krebspatienten festgestellt werden (Otto et al 1993; Yonemura et al. 1995; Ryniers et al. 2002a; Chen et al. 2003a). Bisher konnte die verantwortliche Protease für die E-Cadherin-Proteolyse noch nicht identifiziert werden (Ito et al. 1999). Die

IV Diskussion

Daten aus den in dieser Arbeit durchgeführten ADAM10 Übertransfektions-, Inhibitions- und siRNA-*knockdown*-Experimenten zeigen, dass ADAM10 maßgebend an der proteolytischen Spaltung von E-Cadherin beteiligt ist. So wurden nach Inhibition mit dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X weniger C-terminale E-Cadherin-Fragmente in murinen Keratinozyten gebildet. Auch nach Herabregulation von ADAM10 durch siRNA-Versuche konnte gezeigt werden, dass es zu einer verminderten Spaltung von E-Cadherin in Keratinozyten kommt. Dagegen konnte eine verstärkte E-Cadherin-Proteolyse durch Übertransfektion von ADAM10 erreicht werden. Diese Daten zeigen, dass ADAM10 die hauptverantwortliche Protease für die Spaltung von E-Cadherin in Keratinozyten ist.

Zellmigration ist ein entscheidender Faktor bei der Wundheilung. Reguliert wird die Zellmigration bei der Wundheilung durch den intrazellulären Ca^{2+} -Influx. Durch Inhibition des Ca^{2+} -Influxes wird die Mobilität von Keratinozyten herabgesetzt (Tran et al. 1999). In diesem Zusammenhang konnte in Wundheilungsversuchen *in vitro* gezeigt werden, dass die Überexpression von ADAM10 die Migration von Keratinozyten fördert (Maretzky et al 2005a). Verschiedenen Stimuli können die ADAM10 und ADAM17 abhängige Proteolyse verstärken (Fan et al. 2003). So konnte gezeigt werden, dass der durch Ionomycin hervorgerufene Ca^{2+} -Influx in HaCaT-Zellen die ADAM10-abhängige E-Cadherin-Proteolyse verstärkt (Maretzky et al 2005a). Diese Befunde sprechen dafür, dass nach Verwundung der Haut über kalziumabhängige Prozesse die ADAM10-Aktivität verstärkt wird, und dass es auf diese Weise zu einer Regulation der Zelladhäsion und der Zellmigration kommt.

E-Cadherin ist nicht nur an adhäsiven Prozessen beteiligt, sondern auch in Signalwege eingebunden. Intrazellulär bindet β -Catenin an E-Cadherin (Gumbiner 1993). β -Catenin ist Teil des WNT-Signalweges und kann die Transkription von Genen aktivieren. Es wird vermutet, dass es bei verminderter E-Cadherin-Expression zu einer vermehrten Genaktivierung kommt, die auf eine erhöhte Konzentration von β -Catenin im Zellkern zurückzuführen ist (Orsulic et al 1999). In malignen Melanomen wurde gezeigt, dass freigesetztes β -Catenin zur Phosphorylierung der MAP-Kinase P38 führt, welche Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie aktivieren kann (Pece et al. 2000; Kuphal et al 2004). Neben der MAP-Kinaseabhängigen Genaktivierung wurde ebenfalls beschrieben, dass β -Catenin über den „*lymphocyte*

IV Diskussion

enhancer binding factor1/T-cell factor-Signalweg Gene aktivieren kann (He et al. 1998). Über diesen Signalweg werden unter anderem c-myc und Cyclin D1 aktiviert, die bei der Kontrolle der Proliferation von Zellen eine Rolle spielen (Shtutman et al. 1999). Es besteht also ein Zusammenhang zwischen β -Cateninabhängiger Genaktivierung und E-Cadherin-Verlust. An HaCaT-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte ADAM10-Aktivität und die damit einhergehende Verminderung der E-Cadherin-Konzentration in der Zellmembran zu einer verstärkten Translokation von β -Catenin führte sowie zu einer verstärkten Expression von c-myc und Cyclin D1 (Maretzky et al 2005a). Unter pathologischen Bedingungen einer Erkrankung oder einer Verwundung der Haut kann es somit zu einem vermehrten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Keratinozyten und dadurch zu einer Aktivierung von ADAM10 kommen. Dadurch wird E-Cadherin vermehrt geschnitten und degradiert, woraus eine verminderte Adhäsion und eine erhöhte Motilität der Keratinozyten resultiert. Zusätzlich könnte es möglich sein, dass die Proliferation der Keratinozyten durch die vermehrte Freisetzung von β -Catenin angeregt wird.

Entzündungsprozesse und damit die Expression von Zytokinen und Chemokinen sind in der Pathogenese vieler Hautkrankheiten von großer Bedeutung. Bisher wurde aber nur teilweise geklärt, wie es zu der Wechselwirkung zwischen den Immunzellen und den Keratinozyten kommt. Die häufigste entzündliche Erkrankung der Haut ist das Ekzem, zu dem insbesondere das allergische und irritativ-toxische Kontaktekzem und das atopische Ekzem (Neurodermitis) gehören. Das akute Ekzem ist charakterisiert durch Spongiose. Unter Spongiose versteht man das Auseinanderweichen von Keratinozyten und die Entstehung von Spalten bzw. kleinen Bläschen in der Epidermis. Das akute Ekzem ist von einem Th2-ähnlichem Zytokinmuster geprägt. Es weist eine erhöhte Expression von IL-4, IL-13 und CCL27 auf (Purwar et al. 2006). Häufig geht mit der Zytokinproduktion der Keratinozyten die Migration von T-Zellen in die entzündete Haut, die ihrerseits wieder Zytokine ausschütten, einher (Homey et al 2004; Purwar et al 2006). Der Prozess der für den Verlust der E-Cadherin-Expression im akuten Ekzem verantwortlich ist, wurde bisher nicht aufgeklärt. ADAM-Proteasen sind oftmals an Entzündungsreaktionen beteiligt (Abel et al 2004; Skiba et al 2005). Hierbei erfolgt die Regulation der Proteasen nicht durch Gentranskription, sondern hauptsächlich durch posttranslationale Regulation (Huovila et al. 2005b). Es wird davon ausgegangen, dass eine Stimulation von Zellen,

IV Diskussion

sei es durch synthetische Stimuli wie PMA oder durch Zytokine wie TNF- α oder IFN- γ , zu einer Aktivierung von ADAM-Proteasen führen kann (Hundhausen et al 2003; Abel et al 2004; Ludwig et al 2005). In HaCaT-Zellen führt Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zu einer verstärkten Proteolyse von E-Cadherin (persönliche Kommunikation mit Karina Reiß und Thorsten Maretzky). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Patienten mit akutem Ekzem verstärkt ADAM10 exprimieren, und dass dies mit einer verstärkter Bildung der C-terminalen Fragmente von E-Cadherin assoziiert ist. Durch indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten konnte gezeigt werden, dass die Expression von E-Cadherin im akuten Ekzem gestört ist. In Bereichen der spongiotischen Bläschen änderte sich das kontinuierliche E-Cadherin-Expressionsmuster zu einem unterbrochenem. Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit akuten Ekzemen einen hohen Anteil an E-Cadherin im Blutserum aufweisen (Matsuyoshi et al. 1995; Furukawa et al 1997). Es besteht also die Möglichkeit, dass die erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen in der erkrankten Haut zu einer Aktivierung von ADAM10 führt, die wiederum eine verstärkte Proteolyse von E-Cadherin nach sich zieht und somit zum Entstehen der spongiotischen Bläschen beitragen kann. Unabhängig von der Sequenz der Ereignisse, die zu dem entzündlichen Prozess führen, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADAM10 das Potential hat, an der Entstehung der spongiotischen Bläschen mitzuwirken. Dabei ist zu beachten, dass der genaue Entstehungsprozess bisher nicht komplett geklärt ist. Es konnte aufgrund der Datenlage nicht geklärt werden, ob die verstärkte ADAM10-Expression in akuten Ekzemen und damit die verstärkte Proteolyse von E-Cadherin, ein primärer oder ein sekundärer Effekt in der geschädigten Haut ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass E-Cadherin in Keratinozyten proteolytisch von ADAM10 gespalten wird. Diese Spaltung kann durch verschiedene Stimuli wie proinflammatorische Zytokine, Phorbolster oder dem Ca^{2+} -Induktor Ionomycin verstärkt werden. In entzündlichen Erkrankungen wie dem akuten Ekzem treten erhöhte Konzentrationen von E-Cadherin-Spaltungsprodukte auf, und es kommt zu einer verminderten Adhäsion der Keratinozyten untereinander. Zudem liegt ADAM10 vermehrt in der aktiven maturen Form vor. Dies spricht dafür, dass ADAM10 über die proteolytische Spaltung von E-Cadherin zu pathologischen Prozessen von Hautkrankheiten beiträgt.

V. Zusammenfassung

Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen (ADAMs) sind an verschiedenen biologischen Prozessen wie Kontrolle von Membranfusion, Muskelentwicklung, Zellschicksal-bestimmung bei der Entwicklung, Zellmigration und Entzündungsreaktionen beteiligt. Die Rolle der Metalloprotease ADAM10 in der Haut wurde bisher nur wenig untersucht. Ziel der Arbeit war es die Aufgaben von ADAM10 *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. Es sollten neue potentielle Substrate von ADAM10 in Keratinozyten identifiziert und deren Proteolyse untersucht werden. Anhand von *western blots* und Immunhistologien konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten konstitutiv ADAM10 exprimieren.

Das CXC-Chemokin CXCL16 wird als transmembranes Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert. Es vermittelt Zell-Zelladhäsion und kann als lösliches chemotaktisches Molekül sezerniert werden. Beide Funktionen werden über Bindung an den Rezeptor CXCR6 vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CXCL16 von epidermalen Keratinozyten in gesunder Haut konstitutiv exprimiert wird. In primären humanen und murinen Keratinozytenkulturen wird CXCL16 in den Kulturüberstand abgegeben. Diese Proteolyse wird präferentiell von der Disintegrin-ähnlichen Metalloprotease ADAM10 durchgeführt und nicht vom eng verwandten ADAM17, wie durch Experimente mit spezifischen Inhibitoren und siRNA-*gene knockdown*-Experimenten gezeigt werden konnte. Die proteolytische Spaltung konnte durch Ionomycin und UVB-Bestrahlung verstärkt werden. Der Rezeptor CXCR6 wird von einer Subpopulation von Zellen in der Dermis exprimiert, bei denen es sich wahrscheinlich um dermale T-Zellen handelt. CXCL16 wird von Keratinozyten gebildet und kann durch Zellaktivierung oder UV-Strahlung von den Zellen sezerniert werden und in der Dermis an den Rezeptor CXCR6 binden.

Als ein weiteres Substrat von ADAM10 wurde E-Cadherin, eins der wichtigsten Adhäsionsmoleküle in der Epidermis untersucht. Es vermittelt die Adhäsion zwischen den Keratinozyten und gewährleistet dadurch die Integrität der Epidermis. Zudem ist es an der Tumorprogression von Melanomen beteiligt. Es konnte durch Versuche mit Metalloproteaseinhibitoren und siRNA-Experimente gezeigt werden, dass das Adhäsionsmolekül E-Cadherin in Keratinozyten von ADAM10 geschnitten wird. Bei Patienten, die am akuten Ekzem, einer inflammatorischen Hautkrankheit mit

V Zusammenfassung

Bläschenbildung in der Epidermis, litten, wurde festgestellt, dass ADAM10 verstärkt in der Haut exprimiert ist. Die vermehrt gebildete mature Form von ADAM10 korrelierte mit der verstärkten Bildung von C-terminalen Fragmenten von E-Cadherin. Auch anhand von Histologien wurde gezeigt, dass in den Bereichen der spongiotischen Bläschen in der Epidermis das Expressionsmuster von E-Cadherin nicht dem der gesunden Haut entsprach. Unabhängig von der Reihenfolge der Ereignisse, die zu dieser Erkrankung führen, legen diese Ergebnisse nahe, dass eine verstärkte ADAM10-Aktivität durch die Spaltung von E-Cadherin und dem damit einhergehenden Verlust der Adhäsion der Keratinozyten untereinander, an der Entstehung der spongiotischen Bläschen in der Epidermis beteiligt sein kann.

VI. Summary

Disintegrin-like metalloproteinases (ADAMs) are involved in several biological processes like membrane fusion, muscle development, cell fate determination, cell migration, and inflammation. The metalloproteinase ADAM10 is not well studied in the skin. The aim of this work was to analyse the function of ADAM10 *in vivo* and *in vitro*. New substrates of ADAM10 in keratinocytes were identified and their proteolytical cleavage was analysed. Western blot and immunohistochemistry analyses revealed that ADAM10 is constitutively expressed by keratinocytes.

The CXC-chemokine CXCL16 is expressed as a transmembrane molecule at the cell surface promoting cell-cell adhesion, and can be released as a soluble molecule acting as a chemoattractant. Both functions are carried out by binding of CXCL16 to its receptor, CXCR6. In primary human and murine keratinocyte cultures, soluble CXCL16 is released into the cell culture medium. This release is preferentially mediated by the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 but not by the closely related metalloproteinase ADAM17, as shown by specific inhibitors and siRNA knockdown experiments. The proteolytic cleavage of CXCL16 is enhanced by cell stimulation with ionomycin or UVB irradiation. The receptor CXCR6 is expressed by a distinct subpopulation of cells in the dermis which are presumably resident T-cells. This work provides first evidence that CXCL16 is expressed constitutively by epidermal keratinocytes in healthy human skin and is released as a soluble form upon cell activation or photodamage and may thus target CXCR6-expressing cells in the dermis.

As another substrate of ADAM10 E-cadherin was analysed. E-cadherin is an important adhesion molecule of the epidermis. It mediates adhesion of keratinocytes, thus contributes to the integrity of the epidermis and is involved in tumor progression. Specific metalloproteinase inhibitor and siRNA knockdown studies show that ADAM10 is mainly responsible for the cleavage of E-cadherin in keratinocytes.

Elevated levels of ADAM10 could be detected in the skin of patients suffering from acute eczema, an inflammatory skin disease. These elevated levels of mature ADAM10 correlate with the generation of the C-terminal fragments of E-cadherin. In the spongiotic areas of the diseased skin the expression pattern of E-cadherin was disturbed as shown by histological staining. These results indicate that due to

VI Summary

elevated ADAM10 activity proteolytical E-cadherin cleavage is enhanced and may contribute to the generation of spongitic blisters and the loss of keratinocyte adhesion in the epidermis.

VII. Literatur

1. ABEL,S., HUNDHAUSEN,C., MENTLEIN,R., SCHULTE,A., BERKHOUT,T.A., BROADWAY,N., HARTMANN,D., SEDLACEK,R., DIETRICH,S., MUETZE,B., SCHUSTER,B., KALLEN,K.J., SAFTIG,P., ROSE-JOHN,S., LUDWIG,A., 2004. "The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10", *J.Immunol.*, 172, S. 6362-6372.
2. ALMEIDA,E.A., HUOVILA,A.P., SUTHERLAND,A.E., STEPHENS,L.E., CALARCO,P.G., SHAW,L.M., MERCURIO,A.M., SONNENBERG,A., PRIMAKOFF,P., MYLES,D.G., WHITE,J.M., 1995. "Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor", *Cell*, 81, S. 1095-1104.
3. ANANTHASWAMY,H.N., PIERCEALL,W.E., 1990. "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis", *Photochem.Photobiol.*, 52, S. 1119-1136.
4. APLIN,A.E., HOWE,A., ALAHARI,S.K., JULIANO,R.L., 1998. "Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins", *Pharmacol.Rev.*, 50, S. 197-263.
5. BAGGIOLINI,M., 1998. "Chemokines and leukocyte traffic", *Nature*, 392, S. 565-568.
6. BAGGIOLINI,M., DEWALD,B., MOSER,B., 1997. "Human chemokines: an update", *Annu.Rev.Immunol.*, 15, S. 675-705.
7. BAZAN,J.F., BACON,K.B., HARDIMAN,G., WANG,W., SOO,K., ROSSI,D., GREAVES,D.R., ZLOTNIK,A., SCHALL,T.J., 1997. "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif", *Nature*, 385, S. 640-644.
8. BECHERER,J.D., BLOBEL,C.P., 2003. "Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs)", *Curr.Top.Dev.Biol.*, 54, S. 101-123.
9. BENNETT,F., LUXENBERG,D., LING,V., WANG,I.M., MARQUETTE,K., LOWE,D., KHAN,N., VELDMAN,G., JACOBS,K.A., VALGE-ARCHER,V.E., COLLINS,M., CARRENO,B.M., 2003. "Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on

VII Literatur

costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses", *J.Immunol.*, 170, S. 711-718.

10. BLACK,R.A., DOEDENS,J.R., MAHIMKAR,R., JOHNSON,R., GUO,L., WALLACE,A., VIRCA,D., EISENMAN,J., SLACK,J., CASTNER,B., SUNNARBORG,S.W., LEE,D.C., COWLING,R., JIN,G., CHARRIER,K., PESCHON,J.J., PAXTON,R., 2003. "Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity", *Biochem.Soc.Symp.*, S. 39-52.
11. BLOBEL,C.P., 1997. "Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch", *Cell*, 90, S. 589-592.
12. BLOBEL,C.P., 2002. "Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding", *Inflamm.Res.*, 51, S. 83-84.
13. BLOBEL,C.P., 2005. "ADAMs: key components in EGFR signalling and development", *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 6, S. 32-43.
14. BLOBEL,C.P., WOLFSBERG,T.G., TURCK,C.W., MYLES,D.G., PRIMAKOFF,P., WHITE,J.M., 1992. "A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion", *Nature*, 356, S. 248-252.
15. BOGENRIEDER,T., HERLYN,M., 2003. "Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis", *Oncogene*, 22, S. 6524-6536.
16. BOUKAMP,P., PETRUSSEVSKA,R.T., BREITKREUTZ,D., HORNUNG,J., MARKHAM,A., FUSENIG,N.E., 1988. "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line", *J.Cell Biol.*, 106, S. 761-771.
17. BUDAGIAN,V., BULANOVA,E., ORINSKA,Z., LUDWIG,A., ROSE-JOHN,S., SAFTIG,P., BORDEN,E.C., BULFONE-PAUS,S., 2004. "Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)", *J.Biol.Chem.*, 279, S. 40368-40375.
18. BURDSAL,C.A., DAMSKY,C.H., PEDERSEN,R.A., 1993. "The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak", *Development*, 118, S. 829-844.
19. BUTCHER,E.C., PICKER,L.J., 1996. "Lymphocyte homing and homeostasis", *Science*, 272, S. 60-66.

VII Literatur

20. BUTZ,S., LARUE,L., 1995. "Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues", *Cell Adhes.Commun.*, 3, S. 337-352.
21. BUXBAUM,J.D., LIU,K.N., LUO,Y., SLACK,J.L., STOCKING,K.L., PESCHON,J.J., JOHNSON,R.S., CASTNER,B.J., CERRETTI,D.P., BLACK,R.A., 1998. "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor", *J.Biol.Chem.*, 273, S. 27765-27767.
22. BZOWSKA,M., JURA,N., LASSAK,A., BLACK,R.A., BERETA,J., 2004. "Tumour necrosis factor-alpha stimulates expression of TNF-alpha converting enzyme in endothelial cells", *Eur.J.Biochem.*, 271, S. 2808-2820.
23. CAVALLO,R., RUBENSTEIN,D., PEIFER,M., 1997. "Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus", *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 7, S. 459-466.
24. CHANTRY,A., GREGSON,N.A., GLYNN,P., 1989. "A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization", *J.Biol.Chem.*, 264, S. 21603-21607.
25. CHEN,H.C., CHU,R.Y., HSU,P.N., HSU,P.I., LU,J.Y., LAI,K.H., TSENG,H.H., CHOU,N.H., HUANG,M.S., TSENG,C.J., HSIAO,M., 2003a. "Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas", *Cancer Lett.*, 201, S. 97-106.
26. CHEN,H.C., CHU,R.Y., HSU,P.N., HSU,P.I., LU,J.Y., LAI,K.H., TSENG,H.H., CHOU,N.H., HUANG,M.S., TSENG,C.J., HSIAO,M., 2003b. "Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas", *Cancer Lett.*, 201, S. 97-106.
27. CLARK,R.A., CHONG,B., MIRCHANDANI,N., BRINSTER,N.K., YAMANAKA,K., DOWGIERT,R.K., KUPPER,T.S., 2006. "The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin", *J.Immunol.*, 176, S. 4431-4439.
28. CLARK-LEWIS,I., KIM,K.S., RAJARATHNAM,K., GONG,J.H., DEWALD,B., MOSER,B., BAGGIOLINI,M., SYKES,B.D., 1995. "Structure-activity relationships of chemokines", *J.Leukoc.Biol.*, 57, S. 703-711.
29. COLLINS,J.E., FLEMING,T.P., 1995. "Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time", *Trends Biochem.Sci.*, 20, S. 307-312.

VII Literatur

30. CONTIN,C., PITARD,V., ITAI,T., NAGATA,S., MOREAU,J.F., DECHANET-MERVILLE,J., 2003. "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling", *J.Biol.Chem.*, 278, S. 32801-32809.
31. DELICONSTANTINOS,G., VILLIOTOU,V., STAVRIDES,J.C., 1996. "Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes", *Biochem.J.*, 320 (Pt 3), S. 997-1003.
32. DURR,M., PESCHEL,A., 2002. "Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense", *Infect.Immun.*, 70, S. 6515-6517.
33. EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE,S., ASCHAUER,H., SCHMOOK,F.P., JENSEN,J.M., MEINGASSNER,J.G., PROKSCH,E., 1998. "Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption 2", *J.Invest Dermatol*, 111, S. 517-523.
34. ELDER,J.T., FISHER,G.J., LINDQUIST,P.B., BENNETT,G.L., PITTELKOW,M.R., COFFEY,R.J., JR., ELLINGSWORTH,L., DERYNCK,R., VOORHEES,J.J., 1989. "Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis", *Science*, 243, S. 811-814.
35. ELICEIRI,B.P., PUENTE,X.S., HOOD,J.D., STUPACK,D.G., SCHLAEPFER,D.D., HUANG,X.Z., SHEPPARD,D., CHERESH,D.A., 2002. "Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling", *J.Cell Biol.*, 157, S. 149-160.
36. ENDRES,K., ANDERS,A., KOJRO,E., GILBERT,S., FAHRENHOLZ,F., POSTINA,R., 2003. "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation", *Eur.J.Biochem.*, 270, S. 2386-2393.
37. EVANGELISTA,F., DASHER,D.A., LI,N., 2006. "The prevalence of autoantibodies against E-cadherin in pemphigus", *J.Invest Dermatol.*, 126, S. 9.
38. EVANS,J.P., KOPF,G.S., SCHULTZ,R.M., 1997a. "Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction", *Dev.Biol.*, 187, S. 79-93.

VII Literatur

39. EVANS,J.P., SCHULTZ,R.M., KOPF,G.S., 1995. "Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta", *J.Cell Sci.*, 108 (Pt 10), S. 3267-3278.
40. EVANS,J.P., SCHULTZ,R.M., KOPF,G.S., 1997b. "Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin alpha subunit to mouse eggs: evidence for function as a cell adhesion molecule in sperm-egg binding", *Dev.Biol.*, 187, S. 94-106.
41. FAN,H., TURCK,C.W., DERYNCK,R., 2003. "Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide", *J.Biol.Chem.*, 278, S. 18617-18627.
42. FIRE,A., XU,S., MONTGOMERY,M.K., KOSTAS,S.A., DRIVER,S.E., MELLO,C.C., 1998. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391, S. 806-811.
43. FRANZKE,C.W., TASANEN,K., SCHACKE,H., ZHOU,Z., TRYGGVASON,K., MAUCH,C., ZIGRINO,P., SUNNARBORG,S., LEE,D.C., FAHRENHOLZ,F., BRUCKNER-TUDERMAN,L., 2002. "Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs1", *EMBO J.*, 21, S. 5026-5035.
44. Freinkel,R.K., Woodley,D., 2001. *The biology of the skin*, New York: Parthenon Pub. Group.
45. FURUKAWA,F., FUJII,K., HORIGUCHI,Y., MATSUYOSHI,N., FUJITA,M., TODA,K., IMAMURA,S., WAKITA,H., SHIRAHAMA,S., TAKIGAWA,M., 1997. "Roles of E- and P-cadherin in the human skin", *Microsc.Res.Tech.*, 38, S. 343-352.
46. GARTON,K.J., GOUGH,P.J., BLOBEL,C.P., MURPHY,G., GREAVES,D.R., DEMPSEY,P.J., RAINES,E.W., 2001. "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)", *J.Biol.Chem.*, 276, S. 37993-38001.
47. GEARING,A.J., BECKETT,P., CHRISTODOULOU,M., CHURCHILL,M., CLEMENTS,J., DAVIDSON,A.H., DRUMMOND,A.H., GALLOWAY,W.A., GILBERT,R., GORDON,J.L., ., 1994. "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases", *Nature*, 370, S. 555-557.
48. GEIGER,B., AYALON,O., 1992. "Cadherins", *Annu.Rev.Cell Biol.*, 8, S. 307-332.

VII Literatur

49. GEISSMANN,F., CAMERON,T.O., SIDOBRE,S., MANLONGAT,N., KRONENBERG,M., BRISKIN,M.J., DUSTIN,M.L., LITTMAN,D.R., 2005. "Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids", *PLoS.Biol.*, 3, S. e113.
50. GESSNER,R., TAUBER,R., 2000. "Intestinal cell adhesion molecules. Liver-intestine cadherin", *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 915, S. 136-143.
51. Gilbert,S.F., 2000. *Developmental biology*, Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
52. GILLITZER,R., 2001. "Inflammation in human skin: a model to study chemokine-mediated leukocyte migration in vivo", *J.Pathol.*, 194, S. 393-394.
53. GILLITZER,R., GOEBELER,M., 2001. "Chemokines in cutaneous wound healing", *J.Leukoc.Biol.*, 69, S. 513-521.
54. GONG,J.H., CLARK-LEWIS,I., 1995. "Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues", *J.Exp.Med.*, 181, S. 631-640.
55. GOUGH,P.J., GARTON,K.J., WILLE,P.T., RYCHLEWSKI,M., DEMPSEY,P.J., RAINES,E.W., 2004. "A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16", *J.Immunol.*, 172, S. 3678-3685.
56. GUMBINER,B.M., 1992. "Epithelial morphogenesis", *Cell*, 69, S. 385-387.
57. GUMBINER,B.M., 1993. "Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules", *Neuron*, 11, S. 551-564.
58. HALL,R.J., ERICKSON,C.A., 2003. "ADAM 10: an active metalloprotease expressed during avian epithelial morphogenesis", *Dev.Biol.*, 256, S. 146-159.
59. HARTMANN,D., DE STROOPER,B., SERNEELS,L., CRAESSAERTS,K., HERREMAN,A., ANNAERT,W., UMANS,L., LUBKE,T., LENA,I.A., VON FIGURA,K., SAFTIG,P., 2002. "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts 3", *Hum.Mol.Genet.*, 11, S. 2615-2624.
60. HASE,K., MURAKAMI,T., TAKATSU,H., SHIMAOKA,T., IIMURA,M., HAMURA,K., KAWANO,K., OHSHIMA,S., CHIHARA,R., ITOH,K., YONEHARA,S., OHNO,H., 2006. "The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated

VII Literatur

epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT", *J.Immunol.*, 176, S. 43-51.

61. HATTA,K., TAKAGI,S., FUJISAWA,H., TAKEICHI,M., 1987. "Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos", *Dev.Biol.*, 120, S. 215-227.
62. HATTA,K., TAKEICHI,M., 1986. "Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development", *Nature*, 320, S. 447-449.
63. HATTORI,M., OSTERFIELD,M., FLANAGAN,J.G., 2000. "Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent", *Science*, 289, S. 1360-1365.
64. HE,T.C., SPARKS,A.B., RAGO,C., HERMEKING,H., ZAWEL,L., DA COSTA,L.T., MORIN,P.J., VOGELSTEIN,B., KINZLER,K.W., 1998. "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway", *Science*, 281, S. 1509-1512.
65. HIGHTOWER,K.R., DUNCAN,G., DAWSON,A., WORMSTONE,I.M., REDDAN,J., DZIEDIZC,D., 1999. "Ultraviolet irradiation (UVB) interrupts calcium cell signaling in lens epithelial cells", *Photochem.Photobiol.*, 69, S. 595-598.
66. HINKLE,C.L., SUNNARBORG,S.W., LOISELLE,D., PARKER,C.E., STEVENSON,M., RUSSELL,W.E., LEE,D.C., 2004. "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency", *J.Biol.Chem.*, 279, S. 24179-24188.
67. HIROTA,A., KAWACHI,Y., ITOH,K., NAKAMURA,Y., XU,X., BANNO,T., TAKAHASHI,T., YAMAMOTO,M., OTSUKA,F., 2005. "Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis", *J.Invest Dermatol*, 124, S. 825-832.
68. HOMEY,B., BUNEMANN,E., 2004. "Chemokines and inflammatory skin diseases", *Ernst.Schering.Res.Found.Workshop*, S. 69-83.
69. HUBER,O., BIERKAMP,C., KEMLER,R., 1996. "Cadherins and catenins in development", *Curr.Opin.Cell Biol.*, 8, S. 685-691.
70. HUNDHAUSEN,C., MISZTELA,D., BERKHOUT,T.A., BROADWAY,N., SAFTIG,P., REISS,K., HARTMANN,D., FAHRENHOLZ,F., POSTINA,R., MATTHEWS,V., KALLEN,K.J., ROSE-JOHN,S., LUDWIG,A., 2003. "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10

VII Literatur

is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion 2", *Blood*, 102, S. 1186-1195.

71. HUOVILA,A.P., TURNER,A.J., PELTO-HUIKKO,M., KARKKAINEN,I., ORTIZ,R.M., 2005a. "Shedding light on ADAM metalloproteinases", *Trends Biochem.Sci.*, 30, S. 413-422.
72. HUOVILA,A.P., TURNER,A.J., PELTO-HUIKKO,M., KARKKAINEN,I., ORTIZ,R.M., 2005b. "Shedding light on ADAM metalloproteinases", *Trends Biochem.Sci.*, 30, S. 413-422.
73. ITO,K., OKAMOTO,I., ARAKI,N., KAWANO,Y., NAKAO,M., FUJIYAMA,S., TOMITA,K., MIMORI,T., SAYA,H., 1999. "Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts", *Oncogene*, 18, S. 7080-7090.
74. JACKSON,L.F., QIU,T.H., SUNNARBORG,S.W., CHANG,A., ZHANG,C., PATTERSON,C., LEE,D.C., 2003. "Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling", *EMBO J.*, 22, S. 2704-2716.
75. JIANG,X., SHIMAOKA,T., KOJO,S., HARADA,M., WATARAI,H., WAKAO,H., OHKOHCHI,N., YONEHARA,S., TANIGUCHI,M., SEINO,K., 2005. "Cutting edge: Critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance", *J.Immunol.*, 175, S. 2051-2055.
76. KANSAS,G.S., 1996. "Selectins and their ligands: current concepts and controversies", *Blood*, 88, S. 3259-3287.
77. KAPLAN,G., LUSTER,A.D., HANCOCK,G., COHN,Z.A., 1987. "The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin", *J.Exp.Med.*, 166, S. 1098-1108.
78. KAWAGUCHI,M., MITSUHASHI,Y., KONDO,S., 2004. "Localization of tumour necrosis factor-alpha converting enzyme in normal human skin", *Clin.Exp.Dermatol*, 29, S. 185-187.
79. KAWAGUCHI,M., MITSUHASHI,Y., KONDO,S., 2005. "Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis", *Br.J.Dermatol.*, 152, S. 915-919.
80. KUPHAL,S., POSER,I., JOBIN,C., HELLERBRAND,C., BOSSERHOFF,A.K., 2004. "Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma", *Oncogene*, 23, S. 8509-8519.

VII Literatur

81. LARUE,L., OHSUGI,M., HIRCHENHAIN,J., KEMLER,R., 1994. "E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoctoderm epithelium", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91, S. 8263-8267.
82. LE,T.L., YAP,A.S., STOW,J.L., 1999. "Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics", *J.Cell Biol.*, 146, S. 219-232.
83. LEE,D.C., SUNNARBORG,S.W., HINKLE,C.L., MYERS,T.J., STEVENSON,M.Y., RUSSELL,W.E., CASTNER,B.J., GERHART,M.J., PAXTON,R.J., BLACK,R.A., CHANG,A., JACKSON,L.F., 2003. "TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase 8", *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 995, S. 22-38.
84. LEY,R.D., 1985. "Photoreactivation of UV-induced pyrimidine dimers and erythema in the marsupial *Monodelphis domestica*", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 82, S. 2409-2411.
85. LIOTTA,L.A., KOHN,E.C., 2001. "The microenvironment of the tumour-host interface", *Nature*, 411, S. 375-379.
86. LIOU,A., ELIAS,P.M., GRUNFELD,C., FEINGOLD,K.R., WOOD,L.C., 1997. "Amphiregulin and nerve growth factor expression are regulated by barrier status in murine epidermis", *J.Invest Dermatol.*, 108, S. 73-77.
87. LUDWIG,A., SCHULTE,A., SCHNACK,C., HUNDHAUSEN,C., REISS,K., BRODWAY,N., HELD-FEINDT,J., MENTLEIN,R., 2005. "Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells", *J.Neurochem.*, 93, S. 1293-1303.
88. MANTOVANI,A., SICA,A., SOZZANI,S., ALLAVENA,P., VECCHI,A., LOCATI,M., 2004. "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization", *Trends Immunol.*, 25, S. 677-686.
89. MARETZKY,T., REISS,K., LUDWIG,A., BUCHHOLZ,J., SCHOLZ,F., PROKSCH,E., DE STROOPER,B., HARTMANN,D., SAFTIG,P., 2005a. "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102, S. 9182-9187.
90. MARETZKY,T., SCHULTE,M., LUDWIG,A., ROSE-JOHN,S., BLOBEL,C., HARTMANN,D., ALTEVOGT,P., SAFTIG,P., REISS,K., 2005b. "L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth", *Mol.Cell Biol.*, 25, S. 9040-9053.

VII Literatur

91. MARIKOVSKY,M., BREUING,K., LIU,P.Y., ERIKSSON,E., HIGASHIYAMA,S., FARBER,P., ABRAHAM,J., KLAGSBRUN,M., 1993. "Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90, S. 3889-3893.
92. MARRS,J.A., NELSON,W.J., 1996. "Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis", *Int.Rev.Cytol.*, 165, S. 159-205.
93. MASCIA,F., MARIANI,V., GIROLOMONI,G., PASTORE,S., 2003. "Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation", *Am.J.Pathol.*, 163, S. 303-312.
94. MATLOUBIAN,M., DAVID,A., ENGEL,S., RYAN,J.E., CYSTER,J.G., 2000. "A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo", *Nat.Immunol.*, 1, S. 298-304.
95. MATSUYOSHI,N., TANAKA,T., TODA,K., OKAMOTO,H., FURUKAWA,F., IMAMURA,S., 1995. "Soluble E-cadherin: a novel cutaneous disease marker", *Br.J.Dermatol.*, 132, S. 745-749.
96. MATTHEWS,V., SCHUSTER,B., SCHUTZE,S., BUSSMEYER,I., LUDWIG,A., HUNDHAUSEN,C., SADOWSKI,T., SAFTIG,P., HARTMANN,D., KALLEN,K.J., ROSE-JOHN,S., 2003. "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE) 1", *J.Biol.Chem.*, 278, S. 38829-38839.
97. MCEVER,R.P., 2002. "Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow", *Curr.Opin.Cell Biol.*, 14, S. 581-586.
98. MELLER,S., WINTERBERG,F., GILLIET,M., MULLER,A., LAUCEVICIUTE,I., RIEKER,J., NEUMANN,N.J., KUBITZA,R., GOMBERT,M., BUNEMANN,E., WIESNER,U., FRANKEN-KUNKEL,P., KANZLER,H., DIEU-NOSJEAN,M.C., AMARA,A., RUZICKA,T., LEHMANN,P., ZLOTNIK,A., HOMEY,B., 2005. "Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus", *Arthritis Rheum.*, 52, S. 1504-1516.
99. MEURER,R., VAN RIPER,G., FEENEY,W., CUNNINGHAM,P., HORA,D., JR., SPRINGER,M.S., MACINTYRE,D.E., ROSEN,H., 1993. "Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8", *J.Exp.Med.*, 178, S. 1913-1921.

VII Literatur

100. MINAMI,M., KUME,N., SHIMAOKA,T., KATAOKA,H., HAYASHIDA,K., AKIYAMA,Y., NAGATA,I., ANDO,K., NOBUYOSHI,M., HANYUU,M., KOMEDA,M., YONEHARA,S., KITA,T., 2001. "Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 21, S. 1796-1800.
101. MOHAMMED,F.F., SMOOKLER,D.S., TAYLOR,S.E., FINGLETON,B., KASSIRI,Z., SANCHEZ,O.H., ENGLISH,J.L., MATRISIAN,L.M., AU,B., YEH,W.C., KHOKHA,R., 2004. "Abnormal TNF activity in Timp3(-/-) mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration", *Nat.Genet.*, 36, S. 969-977.
102. MOSER,B., WOLF,M., WALZ,A., LOETSCHER,P., 2004. "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control", *Trends Immunol.*, 25, S. 75-84.
103. MULLBERG,J., SCHOOLTINK,H., STOYAN,T., GUNTHER,M., GRAEVE,L., BUSE,G., MACKIEWICZ,A., HEINRICH,P.C., ROSE-JOHN,S., 1993. "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding", *Eur.J.Immunol.*, 23, S. 473-480.
104. MURDOCH,C., FINN,A., 2000. "Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases", *Blood*, 95, S. 3032-3043.
105. NAGANO,O., MURAKAMI,D., HARTMANN,D., DE STROOPER,B., SAFTIG,P., IWATSUBO,T., NAKAJIMA,M., SHINOHARA,M., SAYA,H., 2004. "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation", *J.Cell Biol.*, 165, S. 893-902.
106. NAGAR,B., OVERDUIN,M., IKURA,M., RINI,J.M., 1996. "Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization", *Nature*, 380, S. 360-364.
107. NAKAYAMA,T., HIESHIMA,K., IZAWA,D., TATSUMI,Y., KANAMARU,A., YOSHIE,O., 2003. "Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues", *J.Immunol.*, 170, S. 1136-1140.
108. NAPOLI,C., LEMIEUX,C., JORGENSEN,R., 1990. "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans", *Plant Cell*, 2, S. 279-289.
109. NEER,E.J., 1995. "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals", *Cell*, 80, S. 249-257.

VII Literatur

110. NOLLET,F., KOOLS,P., VAN ROY,F., 2000. "Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members", *J.Mol.Biol.*, 299, S. 551-572.
111. NOSE,A., NAGAFUCHI,A., TAKEICHI,M., 1987. "Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules", *EMBO J.*, 6, S. 3655-3661.
112. OGOU,S., OKADA,T.S., TAKEICHI,M., 1982. "Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells", *Dev.Biol.*, 92, S. 521-528.
113. OHSUGI,M., HWANG,S.Y., BUTZ,S., KNOWLES,B.B., SOLTER,D., KEMLER,R., 1996. "Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development", *Dev.Dyn.*, 206, S. 391-402.
114. ORSULIC,S., HUBER,O., ABERLE,H., ARNOLD,S., KEMLER,R., 1999. "E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation", *J.Cell Sci.*, 112 (Pt 8), S. 1237-1245.
115. OTTO,T., REMBRINK,K., GOEPEL,M., MEYER-SCHWICKERATH,M., RUBBEN,H., 1993. "E-cadherin: a marker for differentiation and invasiveness in prostatic carcinoma", *Urol.Res.*, 21, S. 359-362.
116. PAN,D., RUBIN,G.M., 1997b. "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis", *Cell*, 90, S. 271-280.
117. PAN,D., RUBIN,G.M., 1997a. "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis", *Cell*, 90, S. 271-280.
118. PARTSCH,G., WAGNER,E., LEEB,B.F., DUNKY,A., STEINER,G., SMOLEN,J.S., 1998. "Upregulation of cytokine receptors sTNF-R55, sTNF-R75, and sIL-2R in psoriatic arthritis synovial fluid", *J.Rheumatol.*, 25, S. 105-110.
119. PAYNE,A.S., CORNELIUS,L.A., 2002. "The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis", *J.Invest Dermatol*, 118, S. 915-922.
120. PECE,S., GUTKIND,J.S., 2000. "Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation", *J.Biol.Chem.*, 275, S. 41227-41233.

VII Literatur

121. PESCHON,J.J., SLACK,J.L., REDDY,P., STOCKING,K.L., SUNNARBORG,S.W., LEE,D.C., RUSSELL,W.E., CASTNER,B.J., JOHNSON,R.S., FITZNER,J.N., BOYCE,R.W., NELSON,N., KOZLOSKY,C.J., WOLFSON,M.F., RAUCH,C.T., CERRETTI,D.P., PAXTON,R.J., MARCH,C.J., BLACK,R.A., 1998b. "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development", *Science*, 282, S. 1281-1284.
122. PESCHON,J.J., SLACK,J.L., REDDY,P., STOCKING,K.L., SUNNARBORG,S.W., LEE,D.C., RUSSELL,W.E., CASTNER,B.J., JOHNSON,R.S., FITZNER,J.N., BOYCE,R.W., NELSON,N., KOZLOSKY,C.J., WOLFSON,M.F., RAUCH,C.T., CERRETTI,D.P., PAXTON,R.J., MARCH,C.J., BLACK,R.A., 1998a. "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development", *Science*, 282, S. 1281-1284.
123. PRIMAKOFF,P., HYATT,H., TREDICK-KLINE,J., 1987. "Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion", *J.Cell Biol.*, 104, S. 141-149.
124. PURWAR,R., WERFEL,T., WITTMANN,M., 2006. "IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis", *J.Invest Dermatol.*, 126, S. 1043-1051.
125. REISS,K., MARETZKY,T., LUDWIG,A., TOUSSEYN,T., DE STROOPER,B., HARTMANN,D., SAFTIG,P., 2005. "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling", *EMBO J.*, 24, S. 742-752.
126. REYNOLDS,A.B., DANIEL,J., MCCREA,P.D., WHEELOCK,M.J., WU,J., ZHANG,Z., 1994. "Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes", *Mol.Cell Biol.*, 14, S. 8333-8342.
127. ROOKE,J., PAN,D., XU,T., RUBIN,G.M., 1996. "KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis", *Science*, 273, S. 1227-1231.
128. RYNIERS,F., STOVE,C., GOETHALS,M., BRACKENIER,L., NOE,V., BRACKE,M., VANDEKERCKHOVE,J., MAREEL,M., BRUYNEEL,E., 2002a. "Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion", *Biol.Chem.*, 383, S. 159-165.
129. RYNIERS,F., STOVE,C., GOETHALS,M., BRACKENIER,L., NOE,V., BRACKE,M., VANDEKERCKHOVE,J., MAREEL,M., BRUYNEEL,E., 2002b. "Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion", *Biol.Chem.*, 383, S. 159-165.

VII Literatur

130. SAHIN,U., WESKAMP,G., KELLY,K., ZHOU,H.M., HIGASHIYAMA,S., PESCHON,J., HARTMANN,D., SAFTIG,P., BLOBEL,C.P., 2004. "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands", *J.Cell Biol.*, 164, S. 769-779.
131. SCHIMMELPFENG,K., GOGEL,S., KLAMBT,C., 2001. "The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration", *Mech.Dev.*, 106, S. 25-36.
132. SEALS,D.F., COURTNEIDGE,S.A., 2003. "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions", *Genes Dev.*, 17, S. 7-30.
133. SEFTOR,R.E., SEFTOR,E.A., HENDRIX,M.J., 1999. "Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion", *Cancer Metastasis Rev.*, 18, S. 359-375.
134. SHAPIRO,L., FANNON,A.M., KWONG,P.D., THOMPSON,A., LEHMANN,M.S., GRUBEL,G., LEGRAND,J.F., ALS-NIELSEN,J., COLMAN,D.R., HENDRICKSON,W.A., 1995. "Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins", *Nature*, 374, S. 327-337.
135. SHI,W., CHEN,H., SUN,J., BUCKLEY,S., ZHAO,J., ANDERSON,K.D., WILLIAMS,R.G., WARBURTON,D., 2003. "TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling", *Dev.Biol.*, 261, S. 371-380.
136. SHIBAMOTO,S., HAYAKAWA,M., TAKEUCHI,K., HORI,T., MIYAZAWA,K., KITAMURA,N., JOHNSON,K.R., WHEELOCK,M.J., MATSUYOSHI,N., TAKEICHI,M., ., 1995. "Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes", *J.Cell Biol.*, 128, S. 949-957.
137. SHILLING,F.M., KRATZSCHMAR,J., CAI,H., WESKAMP,G., GAYKO,U., LEIBOW,J., MYLES,D.G., NUCCITELLI,R., BLOBEL,C.P., 1997. "Identification of metalloprotease/disintegrins in *Xenopus laevis* testis with a potential role in fertilization", *Dev.Biol.*, 186, S. 155-164.
138. SHIMAOKA,T., KUME,N., MINAMI,M., HAYASHIDA,K., KATAOKA,H., KITA,T., YONEHARA,S., 2000. "Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages", *J.Biol.Chem.*, 275, S. 40663-40666.
139. SHIMAOKA,T., NAKAYAMA,T., HIESHIMA,K., KUME,N., FUKUMOTO,N., MINAMI,M., HAYASHIDA,K., KITA,T., YOSHIE,O., YONEHARA,S., 2004. "Chemokines generally exhibit scavenger receptor activity through their receptor-binding domain", *J.Biol.Chem.*, 279, S. 26807-26810.

VII Literatur

140. SHIMAOKA,T., NAKAYAMA,T., KUME,N., TAKAHASHI,S., YAMAGUCHI,J., MINAMI,M., HAYASHIDA,K., KITA,T., OHSUMI,J., YOSHIE,O., YONEHARA,S., 2003. "Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain", *J.Immunol.*, 171, S. 1647-1651.
141. SHIRAKATA,Y., KIMURA,R., NANBA,D., IWAMOTO,R., TOKUMARU,S., MORIMOTO,C., YOKOTA,K., NAKAMURA,M., SAYAMA,K., MEKADA,E., HIGASHIYAMA,S., HASHIMOTO,K., 2005. "Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing", *J.Cell Sci.*, 118, S. 2363-2370.
142. SHTUTMAN,M., ZHURINSKY,J., SIMCHA,I., ALBANESE,C., D'AMICO,M., PESTELL,R., BEN ZE'EV,A., 1999. "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96, S. 5522-5527.
143. SILYE,R., KARAYIANNAKIS,A.J., SYRIGOS,K.N., POOLE,S., VAN NOORDEN,S., BATCHELOR,W., REGELE,H., SEGA,W., BOESMUELLER,H., KRAUSZ,T., PIGNATELLI,M., 1998. "E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions", *J.Pathol.*, 186, S. 350-355.
144. SINGER,A.J., CLARK,R.A., 1999. "Cutaneous wound healing", *N.Engl.J.Med.*, 341, S. 738-746.
145. SKIBA,B., NEILL,B., PIVA,T.J., 2005. "Gene expression profiles of TNF-alpha, TACE, furin, IL-1beta and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCat cells", *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.*, 21, S. 173-182.
146. SOTILLOS,S., ROCH,F., CAMPUZANO,S., 1997. "The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs", *Development*, 124, S. 4769-4779.
147. SPIELBERG,H., JUNE,C.H., BLAIR,O.C., NYSTROM-ROSANDER,C., CEREB,N., DEEG,H.J., 1991. "UV irradiation of lymphocytes triggers an increase in intracellular Ca²⁺ and prevents lectin-stimulated Ca²⁺ mobilization: evidence for UV- and nifedipine-sensitive Ca²⁺ channels", *Exp.Hematol.*, 19, S. 742-748.
148. SPRINGER,T.A., 1994. "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm", *Cell*, 76, S. 301-314.
149. STADDON,J.M., SMALES,C., SCHULZE,C., ESCH,F.S., RUBIN,L.L., 1995. "p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex", *J.Cell Biol.*, 130, S. 369-381.

VII Literatur

150. STUPACK,D.G., CHO,S.Y., KLEMKE,R.L., 2000. "Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion", *Immunol.Res.*, 21, S. 83-88.
151. SUGAYA,M., NAKAMURA,K., MITSUI,H., TAKEKOSHI,T., SAEKI,H., TAMAKI,K., 2003. "Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1", *J.Dermatol.Sci.*, 31, S. 179-187.
152. TEDDER,T.F., STEEBER,D.A., CHEN,A., ENGEL,P., 1995. "The selectins: vascular adhesion molecules", *FASEB J.*, 9, S. 866-873.
153. TENSEN,C.P., FLIER,J., VAN DER RAAIJ-HELMER EM, SAMPAT-SARDJOEPERSAD,S., VAN DER SCHORS,R.C., LEURS,R., SCHEPER,R.J., BOORSMA,D.M., WILLEMZE,R., 1999. "Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3)", *J.Invest Dermatol.*, 112, S. 716-722.
154. TERRANOVA,V.P., ROHRBACH,D.H., MARTIN,G.R., 1980. "Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen", *Cell*, 22, S. 719-726.
155. TETSU,O., MCCORMICK,F., 1999. "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells", *Nature*, 398, S. 422-426.
156. TOKUMARU,S., HIGASHIYAMA,S., ENDO,T., NAKAGAWA,T., MIYAGAWA,J.I., YAMAMORI,K., HANAKAWA,Y., OHMOTO,H., YOSHINO,K., SHIRAKATA,Y., MATSUZAWA,Y., HASHIMOTO,K., TANIGUCHI,N., 2000. "Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing", *J.Cell Biol.*, 151, S. 209-220.
157. TRAN,P.O., HINMAN,L.E., UNGER,G.M., SAMMAK,P.J., 1999. "A wound-induced [Ca²⁺]_i increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility", *Exp.Cell Res.*, 246, S. 319-326.
158. TUNGGAL,J.A., HELFRICH,I., SCHMITZ,A., SCHWARZ,H., GUNZEL,D., FROMM,M., KEMLER,R., KRIEG,T., NIESSEN,C.M., 2005. "E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions", *EMBO J.*, 24, S. 1146-1156.
159. VESTWEBER,D., BLANKS,J.E., 1999. "Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands", *Physiol Rev.*, 79, S. 181-213.
160. VINCENT,B., PAITEL,E., SAFTIG,P., FROBERT,Y., HARTMANN,D., DE STROOPER,B., GRASSI,J., LOPEZ-PEREZ,E., CHECLER,F., 2001. "The disintegrins ADAM10 and

VII Literatur

TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein", *J.Biol.Chem.*, 276, S. 37743-37746.

161. VON TRESCKOW,B., KALLEN,K.J., VON STRANDMANN,E.P., BORCHMANN,P., LANGE,H., ENGERT,A., HANSEN,H.P., 2004. "Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30", *J.Immunol.*, 172, S. 4324-4331.
162. WAGENER,F.A., DA SILVA,J.L., FARLEY,T., DE WITTE,T., KAPPAS,A., ABRAHAM,N.G., 1999. "Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression", *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 291, S. 416-423.
163. WANG,X.P., SCHUNCK,M., KALLEN,K.J., NEUMANN,C., TRAUTWEIN,C., ROSE-JOHN,S., PROKSCH,E., 2004a. "The Interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier repair in wild-type and IL-6-deficient mice", *In Press*.
164. WANG,X.P., SCHUNCK,M., KALLEN,K.J., NEUMANN,C., TRAUTWEIN,C., ROSE-JOHN,S., PROKSCH,E., 2004b. "The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis", *J.Invest Dermatol.*, 123, S. 124-131.
165. WARD,S.G., BACON,K., WESTWICK,J., 1998. "Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction", *Immunity.*, 9, S. 1-11.
166. WHITE,J.M., 2003. "ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions", *Curr.Opin.Cell Biol.*, 15, S. 598-606.
167. WOOD,L.C., JACKSON,S.M., ELIAS,P.M., GRUNFELD,C., FEINGOLD,K.R., 1992. "Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice", *J.Clin.Invest*, 90, S. 482-487.
168. WOOD,L.C., STALDER,A.K., LIOU,A., CAMPBELL,I.L., GRUNFELD,C., ELIAS,P.M., FEINGOLD,K.R., 1997. "Barrier disruption increases gene expression of cytokines and the 55 kD TNF receptor in murine skin", *Exp.Dermatol.*, 6, S. 98-104.
169. WUTTGE,D.M., ZHOU,X., SHEIKINE,Y., WAGSATER,D., STEMME,V., HEDIN,U., STEMME,S., HANSSON,G.K., SIRSOJO,A., 2004. "CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 24, S. 750-755.
170. YONEMURA,Y., NINOMIYA,I., KAJI,M., SUGIYAMA,K., FUJIMURA,T., TSUCHIHARA,K., KAWAMURA,T., MIYAZAKI,I., ENDOU,Y., TANAKA,M., ., 1995. "Decreased E-

VII Literatur

cadherin expression correlates with poor survival in patients with gastric cancer", *Anal.Cell Pathol.*, 8, S. 177-190.

171. YOSHIMURA,T., MATSUSHIMA,K., OPPENHEIM,J.J., LEONARD,E.J., 1987. "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1)", *J.Immunol.*, 139, S. 788-793.
172. ZENZ,R., EFERL,R., KENNER,L., FLORIN,L., HUMMERICH,L., MEHIC,D., SCHEUCH,H., ANGEL,P., TSCHACHLER,E., WAGNER,E.F., 2005. "Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins", *Nature*, 437, S. 369-375.
173. ZHAO,J., CHEN,H., PESCHON,J.J., SHI,W., ZHANG,Y., FRANK,S.J., WARBURTON,D., 2001. "Pulmonary hypoplasia in mice lacking tumor necrosis factor-alpha converting enzyme indicates an indispensable role for cell surface protein shedding during embryonic lung branching morphogenesis", *Dev.Biol.*, 232, S. 204-218.

VIII. Veröffentlichungen

Publikationen:

Maretzky,T.; Reiss,K.; Ludwig,A.; Buchholz,J.; Scholz,F.; Proksch,E.; de Strooper,B.; Hartmann,D.; Saftig,P. (2005) **“ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation”** PNAS (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A) Volume 102; Issue 26; start page 9182

Scholz F., Schulte A., Adamski F., Hundhausen C., Schwarz A., Kruse ML., Proksch E., Ludwig A. (2006) **“Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin”** im Review Prozess des Journal of Investigative Dermatology (JID).

Poster und Vorträge

F Scholz, s Bulvone Paus, E Proksch (2004) **“Unperturbed woundhealing in IL-15 deficient mice”** Poster auf der Tagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologischer Forschung (ADF) in Dresden 2004

F Scholz, S Bulvone Paus, E Proksch (2004) **“Wound Healing and Skin Barrier Repair are Unaffected in IL-15 Deficient Mice”** Poster auf der Tagung der European Society for Dermatological Research (ESDR) in Wien Österreich Publiziert im JID September 2004 Volume 124

K Reiss, F Scholz, P Saftig and E Proksch (2005) **“The metalloproteinase ADAM10 regulates E-cadherin expression:role in eczematous spongiosis”** Poster auf der Tagung der Society of Investigative Dermatology (SID) in St.Louis, Missouri USA. Abstract Publikation JID April 2005 Volume 124/Number 4 (supplement)

F Scholz ,T Maretzky *, K Reiss *, A Ludwig *, J Buchholz *, B de Strooper, D Hartmann, E Proksch, P Saftig* (2005) **“ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration and beta-catenin translocation”** Poster auf der Tagung der ESDR in Tübingen Abstract: JID September 2005 Volume 125/Number3 (Supplement)

F Scholz, E Proksch, A Schulte, F Adamski, C Hundhausen, A Schwarz and A Ludwig (2006) **“The membrane bound chemokine CXCL16 is constitutive expressed in keratinocytes and proteolytic cleaved by ADAM 10”** Vortrag und Poster auf der Tagung der SID in Philadelphia, Pennsylvania USA. Abstract Publikation JID April 2006 Volume 126/Number4 (Supplement)

IX. Anhang

1. Verwendete Abkürzungen

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure
CAM	<i>cellular adhesion molecule</i>
CTF	C-terminales Fragment
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HB-EGF	<i>heparin binding epidermal growth factor</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	ImmunoglobulinG
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6-Rezeptor
kDa	kilo Dalton
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PBS	phosphate buffered saline
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
TACE	<i>tumor necrosis factor α converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>

TH	<i>T-helper</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ZNS	zentrales Nervensystem

1.1 Abkürzungen für Aminosäuren

A Alanin (Ala)	G Glycin (Gly)	M Methionin (Met)
S Serin (Ser)	C Cystein (Cys)	H Histidin (His)
N Asparagin (Asn)	T Threonin (Thr)	D Asparaginsäure (Asp)
I Isoleucin (Ile)	P Prolin (Pro)	V Valin (Val)
E Glutaminsäure (Glu)	K Lysin (Lys)	Q Glutamin (Gln)
W Tryptophan (Trp)	F Phenylalanin (Phe)	L Leucin (Leu)
R Arginin (Arg)	Y Tyrosin (Tyr)	

2. Materialien und Chemikalien

2.1 Zellkultur

Diethylether	Fluka (Schweiz)
RPMI 1640	Cell Concepts (Umkirch)
FCS	PAA (Pasching)
Penicillin/Streptomycin	GIBCO (USA)
L-Glutamin	GIBCO (USA)
Ksfm mit EGF und BPE	GIBCO (USA)
CaCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PBS	PAA (Pasching)
Trypsin/EDTA	GIBCO (USA)
Dispase II	Roche Diagnostics (Schweiz)
Soybean-Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMSO	Sigma (Taufkirchen)

HEPES-Puffer	Merck (Darmstadt)
Epilife + Supplements	Cascade Biologics (USA)

2.2 RNA-Isolierung

RNA/Protein-Isoliations-Kit	Macherey-Nagel (Düren)
TRizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	MERCK (Darmstadt)

2.3 Reverse Transkription

Oligo-dT	Sigma (Taufkirchen)
RT-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
0,1 M DTT	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP	Amersham (Schweden)
Superscript plus II (200 U)	Invitrogen (Karlsruhe)

2.4 PCR

PCR-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
MgCl ₂	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP	Amersham (Schweden)
Taq-Polymerase	Invitroge (Karlsruhe)
LightCycler-Kit	Takara (Japan)
Primer	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.5 Gelelektrophorese

Agarose	CambrexBioScience (USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EDTA	MERCK (Darmstadt)
Tris	MERCK (Darmstadt)
Essigsäure 100%	MERCK (Darmstadt)
Bromphenolblau/Xylencyanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.6 Tierhaltung

Verwendete Maustämme:

SKH-1	Charles River (Sulzfeld)
Balb/c	Charles River (Sulzfeld)

Futter:

Diätfutter	Altromin (Lage)
------------	-----------------

Zusammensetzung:

Zusammensetzung: 25 % Rohprotein,

5,8 % Rohfett,

3,7 % Rohfaser,

6,7 % Rohasche sowie

Vitamin A, D3, E und Cu5

Wasser	Stadtwerke Kiel
--------	-----------------

2.7 Puffer

PBS: EDTA: 10 mmol/l	Merck (Darmstadt)
NaCl: 140 mmol/l	Merck (Darmstadt)
Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O: 6,0 mmol	Merck (Darmstadt)
KCl: 3,0 mmol/l	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄ : 1,4 mmol/l	Merck (Darmstadt)
TBS: NaCl: 85 mM/l	Merck (Darmstadt)
Tris: 50 mM/l	Merck (Darmstadt)

Lysepuffer für Zellen:

PBS

0,1 % TritonX	Merck (Darmstadt)
---------------	-------------------

1 Tablette Complete/50ml	Roche (Schweiz)
--------------------------	-----------------

2.8 Zellkulturmedien

DMEM	500 ml:
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (5000 U/l)	
Streptomycin (5 mg/ml)	5 ml
FCS	50 ml
KSFM	500 ml
Penicillin (5000 U/l)	
Streptomycin (5 mg/ml)	5 ml
EGF	5 µg/ml
Rinderhypophysenextrakt	50 mg/l
Epilife	500 ml
Penicillin (5000 U/l)	
Streptomycin (5 mg/ml)	5 ml
EpiLife Defined growth Medium Supplement	5 ml

3. Protokolle

3.1 Präparation und Dispersion der murinen Epidermis

- 2 – 3 Tage alte Mäuse in Ether betäuben, in Kunststoffpetrischale mit Skalpell dekapitieren
- Extremitäten und Schwanz mit einer Schere abtrennen, Rumpf dorsal longitudinal aufschneiden
- Haut mit Pinzette und Skalpell vom Rumpf abtrennen, Fettgewebe vorsichtig abschaben
- Haut mit Dermis nach unten in Glaspetrischale ausbreiten

- Haut mit 5 ml Dispase in Medium (1+4)-Aliquot überfluten
- 2,5 h bei RT inkubieren
- in Kunststoffpetrischale Epidermis mit zwei Pinzetten von Dermis abziehen
- Epidermis in ein mit ca 2ml Ksfm++++ gefülltes 50-ml-Falcon überführen
- kurz zentrifugieren, dekantieren
- Epidermis mit einem Skalpell zerkleinern
- in 5 ml 0,25%Trypsin/0,1%EDTA inkubieren: 10 min bei 37°C
- in 50-ml-Falcon 1 ml Trypsin-Inhibitor vorlegen und Zellen durch Zellsieb in Falcon abgießen
- Epidermisreste mit Spritzenstempel durch das Sieb streichen, mit Ksfm++++ nachspülen
- Zentrifuge: 1500 g, 4°C, 5 min, anschließend dekantieren
- Pellet in Ksfm++++ (37°C) resuspendieren und in 12-Well-Platten aussäen

3.2 Präparation und Dispersion von humanen Keratinozyten

- Unterhautfettgewebe abkratzen
- Haut in 1 cm lange und 4 mm breite Stücke schneiden, Streifen mit PBS spülen
- In 0,25% Trypsinlösung üN bei 4°C inkubieren
- Mit DMEM 10% FCS abstoppen
- Epidermis mit Pinzette von der Dermis trennen und in DMEM aufnehmen
- Durch auf- und anpipettieren Zellenresuspendieren
- Zellen bei 800g RT zentrifugieren
- Pellet in Epilife aufnehmen und auf kollagenisierte Platten ausplattieren

3.3 Beschichten von Zellkulturschalen

- 0,1M HCL Lösung 1:100 mit Bovine Collagen I versetzen
- 450 µl pro 12 Well, 800 µl pro 6 Well

3.4 Transfektion von primären murinen Keratinozyten

- 2 µg Vector DNA wurde mit 2 µl FuGene und 500µl KFSM-Medium ohne P/S gemischt
- 30 Min RT inkubieren
- Anschließend zu den Keratinozyten gegeben
- 6 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt
- 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in Lysepuffer aufgenommen

3.5 siRNA-Transfektion von primären humanen Keratinozyten

- 50µl Antibiotikafreies Epilife-Medium pro Kulturschale mit siRNA in entsprechender Verdünnung (10-30 nM) ansetzen
- Parallel 50µl Antibiotikafreies Epilife-Medium mit 1µl Lipofektamine2000 ansetzen 5 Min bei RT inkubieren
- Anschließend zusammenpipettieren und 30 Min bei RT inkubieren
- Auf 500µl Endvolumen mit auf 37°C vorgewärmten Epilife auffüllen
- Die Zellen kurz mit 37°C warmen PBS spülen und siRNA-Mix applizieren
- 6 h nach Transfektion Medium wechseln
- nach 48 h oder 72 h kurz mit PBS spülen und Medium wechseln
- nach 4 h Medium entnehmen und wegfrieren, Zellen abschaben und mit TRIzol oder Machery Nagel Lysepuffer aufnehmen

3.6 DAB Immunhistochemie an Paraffinschnitten

- Paraffinblöcke auf 4°C kühlen
- Paraffinblöcke schneiden ca.4-8 µm dicke Schnitte
- Schnitte üN bei 37°C trocknen lassen
- Schnitte bei 60°C 40 min erhitzen
- 3% H₂O₂ in A.Dest. für 5 min.
- Absteigende Alkoholreihe zur Entparafinierung
- 2x5 min Xylol
- 2x1 min absolut. Ethanol
- 2x1 min 96% Ethanol
- 2x1 min 80% Ethanol
- 2x1 min 70% Ethanol
- dannach in Aqua Dest.
- 40 min bei 90°C in Citrat Puffer pH6 kochen
- Abkühlen lassen
- In a.Dest stellen
- 2x5 min. PBS
- 30-60 min Na-Borohydrid 1% in PBS (frisch ansetzen)
- 4x kurz in PBS waschen bis Blässchen weg
- 2x5 min TBS spülen
- Bloken mit 0,1%BSA/0,2%Glycin/TBS 1h RT 1:200FC-Fragmente
- Roti-Immunoblock 1:10 in TBS 30-60 min
- 1AK In Blockieungs LSG ÜN
- 2x5 min TBS-T (0,1% Tween)
- 3x10 min TBS
- 2Ak POD gekoppelt in TBS 1h RT
- 2x5 min TBS-T
- 3x10 min TBS
- DAB 1 Trofen mit 0,5 tropfen H₂O₂ in 10x Reaktionspuffer Endvolumen 1,5 ml
- Bis 5 min. reagieren lassen, danach mit A.Dest. Reaktion abstoppen
- Etwa 1 min in Mayer`s Häkalaun LSG
- Spülen mit Leitungswasser

- Spülen mit A.Dest
- Eindeckeln mit Aquatex

3.7 Immunfluoreszens an Parafinschnitten

- Schnitte bei 60°C 40 min erhitzen
- Absteigende Alkoholreihe zur Entparafinierung
- 2x5 min Xylol
- 2x1 min absolut. Ethanol
- 2x1 min 96% Ethanol
- 2x1 min 80% Ethanol
- 2x1 min 70% Ethanol
- dannach in Aqua Dest.
- 40 min bei 90°C in Citrat Puffer pH6 kochen
- Abkühlen lassen
- In a.Dest stellen
- 2x5 min. PBS
- 30-60 min Na-Borohydrid 1% in PBS (frisch ansetzen)
- 4x kurz in PBS waschen bis Blässchen weg
- 2min 20% ethanol
- 2 min 70% Ethanol
- 10 min 1% Sudanschwarz in 70% Ethanol
- in 70% Ethanol klären bis keine Farbwölkchen mehr zu sehen sind
- 2 min 20% Ethanol
- 2x5 min TBS spülen
- Blocken mit 0,1%BSA/0,2%Glycin/TBS 1h RT 1:200FC-Fragmente
- Roti-Immunoblock 1:10 in TBS 30-60 min
- 1AK In Blockieungs LSG ÜN
- 2x5 min TBS-T (0,1% Tween)
- 3x10 min TBS
- 2Ak in TBS 1h RT (CY2+3 1:400; Hoechst 1:400)
- 2x5 min TBS-T

- 3x10 min TBS
- Eindeckeln mit Mowiol

3.8 Immunfluoreszenz an murinen Keratinozytenkulturen

- Zellen kurz mit PBS spülen
- 3 min. Bei -20°C mit Methanol fixieren
- 5 min. bei 4°C mit Aceton fixieren
- kurz mit PBS spülen
- 20min mit PBS TrX inkubieren bei RT
- 3x5 min mit PBS spülen
- Blocken mit TBS/0,1% BSA/0,2%Glycin 30 min bei RT
- hCXCL16 1:200 und hCXCR6 1:200 in Bloking Lsg üN bei 4°C
- 3x10 min mit TBS spülen
- GAR CY2, GAM CY3 je 1:600 und Hoechst je 1:300 in TBS für 1h RT im dunkeln
- 3x10 min spülen mit TBS
- Eindeckeln mit Mowiol

3.9 Muriner CXCL16-ELISA

- Capture AK 1:180 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS verdünnen. Und $50\mu\text{l}$ je Well Auftragen. ÜN bei Raumtemperatur inkubieren.
- 4x mit $200\mu\text{l}$ PBS 0,05 % Tween spülen
- Blocken mit $150\mu\text{l}$ PBS 1% BSA 1h bei Raumtemp
- 4x mit $200\mu\text{l}$ PBS 0,05 % Tween spülen
- $50\mu\text{l}$ der probe und des Standards in entsprechender Verdünnung auftragen und abgedeckt 2h bei RT inkubieren
- 4x mit $200\mu\text{l}$ PBS 0,05 % Tween spülen
- $50\mu\text{l}$ Detections AK 1:180 in PBS 1% BSA auftragen. 2h RT

- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen
- 50µl Streptavidin-HRP 1:200 in PBS 1% BSA 20min im Dunkeln
- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen
- 80µl Substrat für ca. 15 min
- 80µl 1,8 M H₂SO₄ Stop Lösung (Umschlag in Gelb)
- bei 450 nm messen
- Standardverdünnung CXCL16: 1:60 = 1ng
- Einsetzen: 1000;500;250;125;62,5;31,25;15,625 pg

3.10 Humaner CXCL16-ELISA

hCXCL16 ELISA

Coating buffer: 50mM Na-Carbonat/-bicarbonat pH 9,3

Waschpuffer: PBS+ 0,05% Tween

Verdünnungspuffer: PBS+ 0,05% Tween + 1% BSA

Blockin Puffer: PBS+ 0,05% Tween + 2% BSA

1.AK: Goat anti human CXCL16 von R&D Systems AF 976 (100µg/ml Stock)

2.AK: Rabbit anti human CXCL16 von Peprotech 500P200Pt (100µg/ml stock)

Enzym: Streptavidin POD (Roche)

Standard: Humanes rekombinantes CXCL16 Chemokin Domäne von R&D (25µg/µl Stock) M_w= 10154.9528 Da 50ng entsprechen 4,9237058 nM

Substrat: BM Blue Roche Nr.1484281

Stopsolution: 1,8 mM H₂SO₄

- Capture AK 1:180 (2µg/ml) in PBS verdünnen. Und 50µl je Well Auftragen. ÜN bei Raumtemperatur inkubieren.
- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen
- Blocken mit 150 µl PBS 1% BSA 1h bei RT
- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen
- 50µl der probe und des Standards in entsprechender Verdünnung auftragen und abgedeckt 2h bei RT inkubieren
- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen

- 50µl Detections AK 1:333 in PBS 1% BSA auftragen. 2h RT
- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen
- 50µl Streptavidin-HRP 1:200 in PBS 1% BSA 20min im Dunkeln
- 4x mit 200 µl PBS 0,05 % Tween spülen
- 80µl Substrat für ca. 15 min
- 80µl 1,8 M H₂SO₄ Stop Lösung (Umschlag in Gelb)
- bei 450 nm messen
- Standardverdünnung hCXCL16 Einsetzen: 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125; 0,39; 0,195; 0,0977; 0 ng

3.11 Isolation von mRNA mittels TRIzol und DNase I Verdau

- Zellen mit sterilem Zellschaber von der Schale kratzen und in 1 ml TRIzol aufnehmen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- je 200 µl Chloroform dazu, stark schütteln, 3 min bei RT
- zentrifugieren 12000g, 15 min, 4°C
- 3 Phasen im Röhrchen: oben klar (RNA), in der Mitte weiß (Protein), unten rot (DNA)
- vorsichtig obere Phase in frisches Eppendorfgefäß
- 500 µl Isopropanol dazu, mischen (RNA-Präzipitation)
- 10 min bei RT (wichtig), [einfrieren für einen Tag bei -20°C möglich]
- zentrifugieren 12000g, 10 min, 4°C
- Überstand abnehmen, gelartiges Präzipitat mit 1 ml eiskaltem 75% EtOH waschen
- vortexen, [aufbewahren für einen Tag bei 4°C möglich]
- zentrifugieren 7500g, 5 min, 4°C
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Präzipitat 5 –10 min an der Luft trocknen
- Pellet in a.Dest oder formamid H₂O aufnehmen 10 min bei 55°C im Thermomixer schütteln
- bei -70°C einfrieren

3.12 Dnase I Verdau

In 200 µl PCR-tube:

- In Wasser gelöste Probe zugeben (87 µl)
- Add 10 µl *10x Puffer* (mit MgCl₂)
- Add 1 U DNase I / RNase free pro 1 µg RNA
- Bei 37 °C für 45 min inkubieren
- Zum Stoppen 10 µl 25 mM EDTA zugeben
- 10 Min bei 65°C inkubieren
-

3.13 mRNA-Präzipitation

- 100 µl DEPC Wasser zur Probe hinzugeben und vortexen
- Probe in 1.5 ml Cup überführen
- 1 µl Glycogen zur Probe geben
- 20 µl 3M NaAcetate, pH 5,2 (0,1 Vol)
- 400 µl Ethanol (2-3 Vol)
- Invertieren zum Mischen
- 1-5 minuten in flüssigem Stickstoff wegfrieren oder bei -20 °C über Nacht
- Zentrifugieren bei 4 °C für 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit
- Vorsichtig den Überstand abnehmen
- 750 µl 70 % ethanol hinzufügen
- Zentrifugieren bei 4 °C für 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit
vorsichtig den Überstand entfernen und Waschen wiederholen
- Add 750 µl 75 % Ethanol
- Zentrifugieren bei 4 °C für 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit
- Vorsichtig Überstand endnehmen und das Pellet 10 Min lufttrocknen
- Resuspendieren in 20-50 µl *DEPC-Wasser*
- Für 10 Minuten auf 60 °C
- Kann bei -80 °C aufbewahrt werden

3.14 Reverse Transkription

- je Probe und Negativkontrolle 1 µl Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl) +5 µg RNA (Volumen je nach Konz.) + HPLC-H₂O ad 11 µl auf Eis (am besten zuerst H₂O, dann Oligo-dT dann RNA)
- 10 min bei 70°C (Wasserbad)
- auf Eis kurz abkühlen, abzentrifugieren, dann Proben bei 42°C äquilibrieren
- RT-Mix ansetzen:
 - 5xRT-Puffer 4 µl
 - 0,1 M DTT (10 mM EK) 2 µl
 - 2 mM dNTPs (0,5 mM EK) 1 µl
 - Superscript plus II (200 U) 0,35 µl
- Ebenfalls bei 42°C äquilibrieren, jeweils 8,35 µl dazu geben
- vortexen, kurz anschleudern
- 60 min bei 42°C (Thermoblock)
- 15 min bei 70°C inkubieren (Enzyminaktivierung)
- ad 100 µl mit Aqua ad iniectabilia auffüllen
- cDNA bei -20°C einfrieren

3.15 Quantitative *realtime*-PCR

Master Mix pro Ansatz:

- 3,5 µl H₂O
- 5 µl Takar SybrGreen
- 0,5 µl je Primer
- je 9,5 µl in eine Kapillare pipettieren
- Anschließend je 1µl Probe hinzuopettieren
- Ansatz herunter zentrifugieren und in den LightCycler stellen und PCR starten

3.16 Proteingewinnung aus Zellkulturüberständen und Zellen für ELISA

- Überstände entnehmen und mit 5µl (6 Well) oder 1µl (12 Well) PBS-Komplete versetzen.
- Zellen gut mit PBS spülen
- Zellen in 315µl oder 630 µl PBS 1% TritonX mit Complete Tablete versetztem Lysepuffer aufnehmen.
- Zellen abkratzen (wichtig nicht mit Enzym behandeln!!!)
- Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführen und 30 min. auf eis schütteln
- Zellen bei 1200g für 5 min. bei 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppi überführen und wegfrieren.

X. Lebenslauf

07.07.1976	Geboren in Flensburg, Staatangehörigkeit deutsch
1996	Abitur am Gynasium Westerland/Sylt
1996-1997	Zivildienst am Landesbildungszentrum für Blinde in Hannover
1997-2002	Studium der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg
2001	Diplomprüfung in den Fächern: Tierphysiologie, Genetik und Entwicklungsbiologie
2001-2002	Diplomarbeit in der Neurophysiologie mit dem Thema: „Charakterisierung olfaktorischer Rezeptorneurone des Tabakschwärmers <i>Manduca sexta</i> in Zellkultur und in der Antenne: Immunocytochemie und elektrische Aktivität“
Seit Februar 2003	Doktorand am Institut für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian Albrechts Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Proksch unter externer Betreuung von Prof. Dr. Roeder.

XI. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Proksch für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die Möglichkeit, in diesem meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Roeder für die Übernahme des Referates.

Vor allem möchte ich mich bei Claudia Neumann bedanken, die mir in den vergangenen drei Jahren immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die fruchtbaren Kooperationen möchte ich mich bei Dr. Andreas Ludwig, Dr. Karina Reiss, Dr. Thorsten Maretzky, Dr. Christian Hundhausen, Frederic Adamski, und Alexander Schulte bedanken.

Für die Unterstützung am LSM und die damit verbunden fachlichen Diskussionen und Ratschläge möchte ich besonders Dr. Marie-Luise Kruse danken.

Des weiteren gilt mein Dank dem gesamten 6. Stock der Dermatologie für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Im besonderen möchte ich der AG Proksch für Unterstützung, Diskussion und alles andere danken. Danke an Rüdiger Panzer, Kerstin Hinrichsen, Graziella Podda und die ehemaligen Mitarbeiter Dr. Michael Schunck und Nadja Linke.

Außerdem möchte ich mich bei Anna Goszczyńska für die liebenswerte Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich in meinem Leben immer voll unterstützt haben. Und natürlich auch herzlichen Dank an meine Schwester Caroline, die mir auch immer zur Seite gestanden hat.

XII. Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, einschließlich 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 den angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Kiel den _____

Felix Scholz