

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Wirkung von Transthyretin
auf Wachstum und Differenzierung von Plattenepithel- und
Basalzellkarzinomen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Anna Katharina Karalus
aus Hamburg

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Weichenthal

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kalthoff

Tag der mündlichen Prüfung: 28. September 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 28. September 2009

gez.: Prof. Dr. Lucius

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Hinführung zum Thema	2
2.2 Aufbau und Funktionen der Haut.....	3
2.2.1 Die Epidermis.....	3
2.2.2 Die Dermis	4
2.2.3 Die Subcutis.....	4
2.3 Hautalterung.....	4
2.3.1 Klinisch-morphologische Merkmale	4
2.3.2 Histologisch nachweisbare strukturelle Veränderungen	5
2.3.3 Molekulare Charakteristika	6
2.3.4 Funktionelle Veränderungen der alternden Haut	7
2.3.5 immunologische Veränderungen der alternden Haut.....	10
2.3.6 Wirkung von oxidativem Stress auf die Epidermis	10
2.4 Epitheliale Hauttumore	15
2.5 Transthyretin.....	17
2.5.1 Die Entdeckung des Proteins Transthyretin (Präalbumin)	17
2.5.2 Produktionsorte des Transthyretins im menschlichen Körper	19
2.5.3 Funktionen des Transthyretin im menschlichen Körper	19
2.5.4 Megalin: rezeptorvermittelte Aufnahme von Transthyretin.....	22
2.5.5 Transthyretin und seine immunmodulierenden Eigenschaften	24
2.5.6 Transthyretin und die Haut.....	24
2.6 Zusammenfassung	25
3 Materialien und Methoden	28
3.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel.....	28

3.2	Verwendete Pufferlösungen und Eindeckmedien	29
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	30
3.4	Geräte.....	31
3.5	Verwendete Zelllinien	31
3.6	Kultivierung der Zellen	31
3.6.1	Vorbereitung von Medien.....	31
3.6.2	Züchtung der Zellen	32
3.6.3	Zellzählung	33
3.7	Bestimmung der Zellproliferation durch photometrische Messung der WST-1 Abspaltung.....	33
3.7.1	Vorbereitung der Zellen und Inkubation mit Transthyretin	33
3.7.2	Messung der optischen Dichte.....	34
3.8	Durchflusszytometrischer Nachweis der EGF-Rezeptordichte mittels FACScan	34
3.8.1	Vorbereitung der Zellen und Inkubation mit Transthyretin	35
3.8.2	Applikation der Antikörper.....	36
3.8.3	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse.....	36
3.9	Nachweis des Rezeptors Megalin mittels Cytospin	37
3.9.1	Inkubation der Zellen und Cytospin.....	38
3.9.2	Färbung der Objektträger.....	38
3.9.3	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis	39
3.10	Intrazellulärer Nachweis der Zytokeratine 1 und 10	39
3.10.1	Ansatz und Inkubation der Zellen.....	40
3.10.2	Vorbereitung der Zellen für das Anfertigen der Gefrierschnitte	40
3.10.3	Färbung der Objektträger.....	40
3.10.4	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis	41
3.11	Statistik	41
4	Ergebnisse.....	42

4.1	Wirkung von Transthyretin auf die Zellzahl von A-431-Zellen und CRL-7762-Zellen.....	42
4.2	Wirkung von Transthyretin auf die Differenzierung von A-431-Zellen und CRL-7762-Zellen	44
4.3	Wirkung von Transthyretin auf die EGF-Rezeptorexpression von A-431-Zellen und CRL-7762- Zellen.....	47
4.4	Transthyretinvermittelte Expression des Rezeptors Megalin	48
5	Diskussion	51
5.1	Wirkung von Transthyretin auf die Zellzahl.....	51
5.2	Transthyretin und EGF-Rezeptoren.....	54
5.3	Wirkung von Transthyretin auf die Zelldifferenzierung.....	57
5.4	Transthyretin und Megalin	58
6	Zusammenfassung	59
	Literaturverzeichnis	61
	Danksagung.....	76
	Lebenslauf	77

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
ca.	Circa
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
FAP	Familiäre amyloidotische Polyneuropathie (<i>familial amyloidotic polyneuropathy</i>)
FCS	Fetales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtslichtstreuung (<i>forward scatter</i>)
IL-1	Interleukin-1
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (<i>Low density Lipoprotein</i>)
Min.	Minuten
MMP-1	Matrixmetalloproteinase-1
m-RNA	Messenger Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBPA	Thyroxin-bindendes-Präalbumin
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphat buffered saline</i>)
RAP	Receptor-assoziiertes Protein
RBP	Retinol-bindendes Protein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
SSC	Seitwärtslichtstreuung (<i>side scatter</i>)

Sog.	Sogenannt
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Tetraiodthyronin, Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin
TTR	Transthyretin
UVA	Ultraviolettstrahlung der Wellenlänge A
UVB	Ultraviolettstrahlung der Wellenlänge B

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 4.1:</i>	Proliferation der A-431-Zellen und der CRL-7762-Zellen nach Inkubation mit Transthyretin in verschiedenen Konzentrationen	43
<i>Abbildung 4.2</i>	Expression von Keratin 1 in A-431 und CRL-7762-Zellen ohne Inkubation und nach vorausgegangener Inkubation mit Transthyretin.....	45
<i>Abbildung 4.3:</i>	Expression von Keratin 10 in A-431- und CRL-7762-Zellen ohne Inkubation und nach vorausgegangener Inkubation mit Transthyretin.....	46
<i>Abbildung 4.4:</i>	EGF-Rezeptorexpression der CRL-7762- und A-431-Zellen ohne Inkubation mit Transthyretin (Kontrolle) sowie nach Inkubation der Zelllinien mit Transthyretin.....	48
<i>Abbildung 4.5:</i>	Nachweis des Rezeptors Megalin auf A-431- und CRL-7762-Zellen.....	50

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Hauttumore, insbesondere Basaliome und Spinaliome, zählen zu den häufigsten Tumoren des Menschen. Der Häufigkeitsgipfel dieser Malignome liegt zwischen dem 60. und 80 Lebensjahr, so dass Spinaliome und Basaliome als Tumore des alternden Organismus bezeichnet werden können. Darüber hinaus scheint die Inzidenz dieser Erkrankungen über die letzten Jahrzehnte zuzunehmen. Der genaue Pathomechanismus der Tumorentstehung und die Faktoren in der alternden Haut, die hierfür eine Rolle spielen, sind bis heute nicht vollständig geklärt.

Das Plasmaprotein Transthyretin ist als Transportprotein von Retinol für dessen Transport zu seinen Zielorganen unerlässlich, so auch für die Haut. Im Differenzierungsprozess stellt Retinol einen kritischen Faktor der Keratinozyten dar: Es spielt für das initiale Wachstum und die Reifung der Keratinozyten eine essentielle Rolle. In diesem Zusammenhang konnte Kieslich (Kieslich 2005) nachweisen, dass es zu altersabhängigen Proteinveränderungen in der Epidermis kommt. So wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die epidermale Transthyretin-Konzentration im Alter abnimmt. Ob Transthyretin zusätzlich einen direkten Einfluss auf die Keratinozyten ausübt und welche Mechanismen für die Abnahme der Transthyretin-Konzentration verantwortlich sind, konnten diese Studien jedoch nicht klären.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen der im Alter abnehmenden Transthyretin-Konzentration und der altersabhängig zunehmenden Inzidenz an Plattenepithelkarzinomen und Basalzellkarzinomen besteht. Mittels durchflusszytometrischem Nachweis des EGF-Rezeptors und Messung der optischen Dichte soll geklärt werden, ob Transthyretin einen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen hat. Der mögliche Einfluss auf die Differenzierung dieser Zellen wird mit Hilfe der Zytokeratine 1 und 10, die als Marker des Differenzierungsgrades fungieren, untersucht. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob eine rezeptorvermittelte intrazelluläre Transthyretin-Aufnahme, ähnlich wie in der Niere über Megalin, vorhanden ist. Dieser soll sodann weiter charakterisiert und identifiziert werden.

2 Einleitung

2.1 Hinführung zum Thema

In nahezu allen Bevölkerungen der Welt ist in den letzten Jahrzehnten der Anteil der älteren Population dramatisch angestiegen. Diese demographische Entwicklung ist von hoher Relevanz für die Sozialsysteme, insbesondere für die Gesundheitssysteme. Diese sollen sowohl eine menschenwürdige Versorgung gewährleisten, als auch bezahlbar sein. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass in den letzten Jahren das Bewusstsein der Bevölkerung und Forschungsinstitutionen für die Notwendigkeit der Altersforschung gewachsen ist. Von großer Relevanz sowohl für das Gesundheitssystem und die ärztliche Tätigkeit, als auch für die Forschung ist es, die Ursachen und molekularen Grundlagen von Alterungsprozessen zu verstehen. Aus der Kenntnis dieser molekularen Prozesse können insbesondere neue diagnostische, therapeutische und präventive Konzepte entwickelt werden.

Von besonderem Forschungsinteresse für die Dermatologie sind hierbei die altersassoziierten gut- und bösartigen Veränderungen und Erkrankungen der Haut, wie zum Beispiel Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome, da sie mit zunehmendem Alter häufiger vorkommen und somit Früherkennung, Prävention und Therapie dieser Tumoren immer größere Bedeutung erlangen. Dieses Interesse wird auch von der Wirtschaft geteilt, da neben der klassischen chirurgischen Therapie der Markt für nicht-invasive Therapeutika hohe Absatzchancen für entsprechende Produkte verspricht.

Zu den Substanzen, die auf die verschiedenen Kompartimente und Zellsystemen der Haut einwirken, gehört auch das Transthyretin. Die Entdeckung, dass Transthyretin bestimmte, potenziell nutzbare Wirkungen auf die Keratozyten der alternden Haut ausübt (Kieslich 2005), war der unmittelbare Anlass, sich anhand der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen In-vitro-Versuche mit den Wirkungsmechanismen von Transthyretin zu beschäftigen. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, in Kenntnis der Wirkungsmechanismen von Transthyretin einen Beitrag zur Beantwortung der Frage zu leisten, ob und in welcher Form Transthyretin eine präventive oder therapeutische Wirkung hat. Da die bisherigen

Forschungen sowohl einen funktionellen Zusammenhang zwischen Hautalterung und Transthyretin, als auch einen Zusammenhang zwischen den hier thematisierten Hauttumoren und Hautalterung nachweisen konnten, ist es notwendig, Alterungsprozesse in diesem Zusammenhang ausführlich zu beleuchten.

Zunächst sollen der Aufbau und die Funktionen der gesunden Haut dargestellt werden. Weiterhin wird hier zusammengefasst, was über die Natur von Alterungsvorgängen in der Haut bekannt ist. Zusätzlich soll ein Überblick über den Forschungsstand der hier relevanten Tumorarten im Kontext der Hautalterung gegeben werden. Vor Darstellung der angewandten Methoden, wird auf den aktuellen Forschungsstand in Bezug auf die molekulare Struktur und die Funktionen von Transthyretin eingegangen.

2.2 Aufbau und Funktionen der Haut

Die Haut, das Grenzorgan zwischen Organismus und Umwelt, hat vielfältige Funktionen, von denen die bekanntesten folgende sind (Fritsch 2004):

- Mechanischer Schutz
- Schutz vor UV-Licht
- Schutz vor Wasser- und Elektrolytverlust
- Immunkompetenz
- Thermoregulation
- Sinnesfunktionen
- Schutz vor Mikroorganismen
- Endokrine Funktion

Die Haut erfüllt diese Funktionen mittels ihrer Strukturen, die von außen nach innen aus drei Schichten besteht (Fritsch 2004):

2.2.1 Die Epidermis

Die Epidermis ist ein verhornendes Plattenepithel, das zu 90% aus Keratinozyten besteht. Sie setzt sich aus vier Schichten zusammen, die von den Keratinozyten in ihrem Differenzierungsprozess durchwandert werden. Letztere erfahren dabei morphologische und funktionelle Veränderungen. Die äußerste Schicht wird von

den terminal differenzierten Zellen, den sogenannten Korneozyten, gebildet. Neben den Keratinozyten beherbergt die Epidermis, wenn auch in geringer Zahl, Langerhanszellen, Melanozyten und Merkelzellen.

2.2.2 Die Dermis

Die Dermis (Korium) ist das bindegewebige Gerüst der Haut und gleichzeitig Sitz der die Haut versorgenden Gefäße und Nerven. Dieses Gewebe besteht aus ineinander vernetzten Kollagenfaserbündeln und elastischen Fasern. In diesem Fasernetzwerk finden sich ferner Fibroblasten, Mastzellen und andere Gewebszellen. Die hohe Reißfestigkeit und Elastizität der Haut ist fast ausschließlich eine Leistung der Dermis.

2.2.3 Die Subcutis

Die Subcutis als unterste Schicht besteht aus läppchenartig aufgebautem Fettgewebe. In den dazwischen liegenden bindegewebigen Septen, die das straffe Grundgerüst darstellen, befinden sich Nerven und Gefäße. Das subkutane Fettgewebe gewährleistet unter anderem mechanischen Schutz, dient der Wärmeisolation und der Energiespeicherung.

2.3 Hautalterung

2.3.1 Klinisch-morphologische Merkmale

Die endogen gealterte Haut ist oftmals trocken, blass, dünn und bis zu einem gewissen Grade schlaff; sie ist auch gekennzeichnet durch feine Falten. Ein weiteres Merkmal der Haut in höherem Alter ist das gehäufte Auftreten benigner Neoplasien (McCullough und Kelly 2006, Yaar et al. 2002).

Die UV-geschädigte Haut ist, je nach individueller Sonnenexposition und Hauttyp, ebenfalls trocken und weist tiefe Falten und Furchen auf. Daneben kennzeichnen sie irregulär pigmentierte Areale (De- und Hyperpigmentierungen), Teleangiektasien und eine Vielzahl an prämaligen Läsionen, wie beispielsweise die aktinische Keratose als häufigste Präkanzerose (McCullough und Kelly 2006, Yaar et al. 2002).

In vielen Regionen der Haut finden sich Merkmale sowohl der endogenen als auch der durch exogene Einflüsse gealterten Haut.

2.3.2 Histologisch nachweisbare strukturelle Veränderungen

Die ausgeprägteste Veränderung der endogenen Hautalterung ist das Abflachen der Überganszone zwischen Epidermis und Dermis, der sog. Junktionszone. Des Weiteren nimmt die Dichte an Melanozyten und Langerhanszellen in der Epidermis ab. Der Verlust an Melanozyten im Alter beträgt pro Dekade ungefähr 10% (Gilchrest et al. 1979) und trägt zum blasserem Erscheinungsbild der Haut bei.

Die für das endogene Altern charakteristischen strukturellen Veränderungen betreffen vor allem die Dermis. Aufgrund der im Laufe des Lebens stark abnehmende Zell- und Gefäßdichte wird sie erheblich dünner. Auch eine Verminderung taktiler Fähigkeiten, wie die Verschlechterung der Vibrationswahrnehmung, der Oberflächensensibilität und der Zwei-Punkte-Diskrimination, wurde bei älteren Patienten beschrieben (Shimokata und Kuzuya 1995, Stevens und Patterson 1995).

Veränderungen in der Gefäßwandarchitektur tragen zu deren Fragilität im Alter bei. Die abgeschwächte vaskuläre Reaktivität, die Rarefizierung des Gefäßnetzwerks und der Kapillarschlingen in den dermalen Papillen, sowie die Rückbildung des subkutanen Fettgewebes schränken die Fähigkeit der Altershaut zu Thermoregulation ein (Gilchrest et al. 1982). Die zusätzliche Reduktion des kapillaren Netzwerkes um die Haarbulbi, die apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen sowie um die Talgdrüsen ist verantwortlich für deren altersassoziierte Atrophie. Dieser Rückbildungsprozess trägt somit zur abnehmenden Schweiß- und Sebumproduktion im Alter bei. Im Extremfall kann als Folge eine Hyperthermie auftreten (Wagner und West 1972). Altersbedingte Veränderungen auf Ebene der Hautkapillaren werden auch für die langsamere Elimination von Substanzen aus der alternden Haut verantwortlich gemacht (Yaar et al. 2002).

Zu den strukturellen Alterungserscheinungen in der Dermis gehören weiterhin: Der Verlust von extrazellulärer Matrix und Matrixmetalloproteinasen (Familie der Metalloenzyme), die für den Umbau des Kollagensystems verantwortlich sind,

sowie eine verringerte Anzahl der kollagensynthetisierenden Fibroblasten (Varani et al. 2000). Da das Kollagen als extrazelluläres Stütz- und Strukturprotein maßgeblich für die Straffheit, Dehnbarkeit und Reißfestigkeit der Dermis verantwortlich ist, hat die verminderte Kollagenbildung in der alternden Haut eine abgeschwächte mechanische Belastbarkeit zur Folge.

Ferner gehen die dünnen Oxytalanfibrillen der elastischen Fasern verloren und das Elastin, ein fibrilläres Protein, welches den amorphen Kern der elastischen Fasern bildet, wird proteolytisch zersetzt. Die Elastizität, die durch diese elastischen Fasern vor allem in der retikulären Dermis gewährleistet wird, ist somit altersbedingt vermindert.

2.3.3 Molekulare Charakteristika

Auf molekularer Ebene kann Altern als Folge und Summe aller lebenslang erworbenen Schädigungen definiert werden. Dies bedeutet nicht nur Schäden an der DNA, sondern auch an Proteinen, Zuckern und Lipiden. Die mit zunehmendem Alter gehäuft auftretenden Mutationen der mitochondrialen DNA sind auf die kontinuierliche Generation von freien Radikalen in den Mitochondrien zurückzuführen. Diese Mutationen beeinträchtigen die mitochondriale Aktivität. Es wird deshalb weniger ATP gebildet, was sich in eingeschränkten zellulären Funktionen und in einer erhöhten Vulnerabilität der Haut gegenüber Schäden und Krankheiten widerspiegelt (Jacobs 2003). Weiterhin betrifft der natürliche Alterungsprozess den Zellkern, denn die Anzahl der Zellteilungen ist ein Maß für die Gesamtlebenszeit eines Organismus. Diese Zahl ist zell- und speziesspezifisch begrenzt. Jede Zellteilung setzt die Replikation der DNA voraus. Bisher galten die mit zunehmendem Alter kürzer werdenden Telomere als limitierender Faktor für die Anzahl der möglichen Replikationen bzw. Zellteilungen. Demnach bestimmt der altersbedingte Telomerverlust die replikative Lebensspanne einer Zelle. Neuere Studien gehen jedoch davon aus, dass der Zeitpunkt des Zelltods nicht alleine durch die Telomerlänge determiniert wird, sondern auch durch andere Faktoren, wie die Telomeraseaktivität (Masutomi et al. 2003). Die Telomerstruktur wurde 1985 erstmals von Greider und Blackburn in eukaryonten Zellen beschrieben (Cech 2004). Hierbei handelt es sich um spezielle Kappen jeweils am Ende eines Chromosoms, die kurze Tandemwiederholungen einer bestimmten Basensequenz darstellen. Bei Säugetieren ist diese

Basensequenz ...TTAGGG.... Bei der Replikation der DNA wird diese Basensequenz nicht bis zum Ende abgelesen, da die Enden der Chromosomen durch die Telomere geschützt und stabilisiert werden. Dieser Umstand bedingt die Verkürzung der Telomere mit jeder Zellreplikation. Untersuchungen von Allsop et al haben gezeigt, dass eine inverse Beziehung zwischen der Telomerlänge einer Zelle und dem physiologischen Alter des jeweiligen Donors besteht, von dem die Zelle stammt (Allsopp et al. 1992): Die Telomere in Zellen von älteren Probanden sowie in Zellen von Patienten mit Vergreisungssyndromen wie Werner-Syndrom oder Progerie (Schulz et al. 1996) sind kürzer als in Zellen von jüngeren Individuen. Man geht davon aus, dass die altersbedingt kürzer werdenden Telomersequenzen die Anzahl der Zellteilungen begrenzen und deshalb einen limitierenden Faktor für die replikative Fähigkeit und Lebensspanne einer Zelle darstellen (Allsopp et al. 1992). Der Telomerverlust ist somit ein charakteristisches Merkmal der alternden Zelle und ein Maß für die Gesamtlebenszeit des Organismus.

Die Haut ist ein Organ, an dem man den individuellen Alterungsprozess optisch leicht erkennen kann. Zahlreiche endogene und exogene Faktoren können die natürlich ablaufenden Alterungsprozesse beschleunigen oder verlangsamen.

Sind endogene Faktoren für den Alterungsprozess der Haut ausschlaggebend, so spricht man von der endogenen, der biologischen oder auch der Zeitalterung der Haut. Überwiegen hingegen die Wirkungen exogener Faktoren, wird von exogenem Altern oder von der Umweralterung gesprochen. Da das UV-Licht der quantitativ wichtigste exogene Faktor des Alterungsprozesses der Haut ist, wird häufig der Begriff der exogenen Alterung mit dem der Lichtalterung („photoaging“), einem von Kligman 1989 geprägten Begriff, gleichgesetzt (Kligman 1989). Die Lichtalterung ist, anders als das endogene Altern, von der individuellen Sonnenexposition und dem Hauttyp abhängig.

2.3.4 Funktionelle Veränderungen der alternden Haut

Zu den altersbedingten funktionellen Veränderungen der Haut zählt unter anderem deren schlechtere Wundheilung, bedingt durch die geringere Proliferationskapazität der Keratinozyten und der Fibroblasten (Gerstein et al. 1993). Die verzögerte Wiederherstellung der Barrierefunktion nach Schädigungen

ist ein weiteres Merkmal (Elias und Ghadially 2002). Charakteristisch für die alternde Haut ist auch die reduzierte Produktion von Zytokeratinen (Sunderkotter et al. 1997). Bei diesen handelt es sich um unlösliche Polypeptide, aus denen sich die Keratinfilamente zusammensetzen und die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Sie stellen die Hauptstrukturproteine in allen epidermalen Zellen dar (Osborn und Weber 1982). Die Zytokeratine sind unter allen Intermediärfilamenten die Marker für die epitheliale Zelldifferenzierung (Singh und Gupta 1994). Die Expression spezifischer Zytokeratinklassen ist für verschiedene Epithelien, ihre histologischen Differenzierungsstufen, den Grad der embryonalen Entwicklung und auch für bestimmte Krankheitszustände der Zelle charakteristisch. Während der epidermalen Differenzierung ist die Bildung von Keratinen eines bestimmten Stadiums an die Hemmung der Keratine des vorangegangenen Stadiums gekoppelt (Dlugosz und Yuspa 1993). So sind die Zytokeratine 1 und 10 sog. Keratinisationsmarker, die in den differenzierteren, verhornenden Keratinozyten vorkommen. Sie stellen eine der ersten Veränderungen dar, die auf die terminale Differenzierung der Zelle hindeuten. Die Transformation von benignen epidermalen Tumoren in ein malignes Stadium, geht in der Regel mit einem Verlust der Keratine 1 und 10 einher (Kartasova et al. 1992). Im Zusammenhang mit dieser Arbeit besonders bedeutsam ist, dass Perkins et al einen Verlust der Keratin 10-Expression in Basaliomen und Spinaliomen fanden (Perkins et al. 1992).

Darüber hinaus ist die alternde Haut für einen Wasserverlust anfälliger als die Haut junger Menschen. Dieser Umstand beruht zumindest teilweise auf einer verminderten Fähigkeit zur Lipidsynthese (Ghadially et al. 1995). In der Haut nehmen die Konzentrationen nahezu aller größeren Lipidgruppen altersbedingt ab. Da die Lipide des Stratum corneum entscheidend für die Aufrechterhaltung der Wasserbarriere der Haut sind, ist es nicht verwunderlich, dass die Xerosis cutis ein charakteristisches Merkmal der alternden Haut ist. Dies ist insbesondere in den Wintermonaten der Fall, in denen die Synthese von Lipiden im Stratum corneum stärker reduziert ist, als in den Sommermonaten (Rogers et al. 1996).

Im Alter ist auch die Produktion von einigen in der Haut vorkommenden Zellen oder Zellprodukten reduziert. So nimmt die Zahl der Langerhanszellen in der Haut im Laufe des Lebens um ca. 20-50% ab und atrophe Veränderungen dieser Zellen

sind in Form einer verminderten Dichte an Dendriten und Birbeck Granula festzustellen (Grewe 2001). In den Keratinozyten werden weniger Immunzytokine synthetisiert, was letztendlich die zelluläre Immunabwehrfunktion der Haut schwächt (Sauder 1986).

Bei der Darstellung der funktionellen und morphologischen Veränderungen der alternden Haut und ihrer molekularen Basis stellt sich insbesondere bei Frauen die Frage, welche der altersassoziierten Veränderungen der Haut auf den Mangel der sog. weiblichen Sexualhormone zurückzuführen sind, dem besonders Frauen nach der Menopause ausgesetzt sind, wenn die Östradiolsekretion des postmenopausalen Ovars weitestgehend erloschen ist.

Es besteht kein Zweifel, dass die Haut sowohl ein hormonbildendes Organ ist als auch zu den hormon-, insbesondere sexualsteroidabhängigen Organen gehört. Östrogene fördern bei Frauen mit einem Östrogendefizit die Wassereinlagerung und damit den Turgor der Haut, sie stimulieren die Kollagensynthese und unter Östrogeneinfluss nehmen die Dicke, die Elastizität und die Feuchtigkeit der Haut wieder zu. Die Gefahr der Xerosis wird unter Östrogeneinfluss dadurch vermindert, dass Hautlipide vermehrt synthetisiert werden (Sator et al. 2001). Östrogene stimulieren die Durchblutung der Haut und die Neubildung von Kapillaren. Bei Frauen mit einem Östrogendefizit ist eine Verminderung der Konzentration des Typ I und Typ III Kollagens in der Haut nachweisbar, dieses ist durch eine Östrogensubstitution reversibel (Affinito et al. 1999) (Brincat 2000). Indem sie die Bildung bestimmter Zytokine stimulieren, sollen Östrogene bei älteren Menschen auch die Wundheilung beschleunigen (Shah und Maibach 2001). Östrogene sind jedoch nicht in der Lage, die durch exogene Noxen induzierten Alterungsvorgänge zu verhindern.

Eine weitere wichtige endokrine Funktion der Epidermis ist die Vitamin D₃-Produktion. Dessen physiologische Vorstufe, das epidermale 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D₃) wird in der Haut unter Einwirkung ultravioletten Lichtes zu Cholecalciferol (Vitamin D₃) umgewandelt. Mit dem Alter nimmt die Menge des Provitamins in der Haut ab und somit auch die Produktion der übrigen Vitamin-D-Derivate (MacLaughlin und Holick 1985). Infolgedessen sind insbesondere ältere Menschen bei ungenügender UV-Exposition anfällig für einen Vitamin D₃-Mangel

(Gloth et al. 1995), was ihre ohnehin vorhandene Neigung zur Osteoporose verstärkt.

2.3.5 immunologische Veränderungen der alternden Haut

Die Haut stellt das größte immunaktive Organ des menschlichen Körpers dar. Sie beherbergt auf der einen Seite typische Immunzellen, wie Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, auf der anderen Seite aber auch solche, die nur in der Haut vorkommen. Hierzu zählen Keratinozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen. In wieweit es zu einer Reduktion der Anzahl an Langerhanszellen in der alternden Haut kommt, ist noch strittig. Sicher ist jedoch, dass mit zunehmendem Alter auch in der Haut die Immunkompetenz abnimmt. Die Fähigkeit von Langerhanszellen, sensibilisierten T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren, sowie die T-Lymphozytenproliferation zu stimulieren, nimmt altersabhängig ab (Sunderkotter et al. 1997). Keratinozyten besitzen die Fähigkeit, verschiedene Zytokine zu synthetisieren und haben deshalb eine wichtige regulatorische Funktion bei der Immunantwort und bei inflammatorischen Prozessen der Haut. Im Alter produzieren Keratinozyten sehr viel weniger Interleukin-1. Darüber hinaus ist besonders in sonnengealterter Haut der Interleukin-1-Rezeptorantagonist erniedrigt (Neuber et al. 2003).

Das Immunsystem scheint daneben eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hauttumoren zu spielen: Organtransplantierte Patienten die sich einer immunsuppressiven Therapie unterziehen müssen, haben im Vergleich zur Normalbevölkerung eine 65-250-fach höhere Inzidenz an einem Plattenepithelkarzinom und ein 10-fach höheres Risiko an Basalzellkarzinomen zu erkranken. Plattenepithelkarzinome scheinen bei immunsuprimierten Patienten aggressiver zu sein: sie bilden häufiger Rezidive, haben eine höhere Wachstumsrate und metastasieren bei 5-8% der Patienten. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass das Immunsystem nicht nur eine bedeutende Funktion in der Entstehung von Hauttumoren einnimmt, sondern auch auf die Schwere der Erkrankung maßgeblichen Einfluss hat (Euvrard et al. 2003).

2.3.6 Wirkung von oxidativem Stress auf die Epidermis

Im Laufe des Alterungsprozesses bilden sich vermehrt freie Radikale. Dies ist Folge sich häufender genetischer Schäden (z.B. in den Mitochondrien) und der

daraus entstehenden Störungen des Metabolismus. Freie Radikale werden auch reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) genannt. Addieren sich im Laufe des Lebens die oxidativen Schäden durch zusätzliche Ultraviolett-Strahlung oder andere Umwelteinflüsse, versagen die Reparaturmechanismen. Die durch die freien Radikale ausgelösten Schäden können nicht mehr ausgeglichen werden. Im Laufe der Zeit akkumulieren die molekularen Schäden in der Zelle (Ames et al. 1993, Stadtman 1992). Die antioxidativ wirkenden körpereigenen Abwehrmechanismen sind Enzyme wie die Superoxiddismutase oder Katalase. Zusätzlich bestehen noch verschiedene Reparatursysteme für Nukleinsäuren, Membranen und Proteine. Die bereits beschriebenen Alterungsprozesse als Folge oxidativer Schäden greifen an unterschiedlichen Stellen der Zellfunktionen an.

Oxidative Schäden an Proteinen

Proteine sind ein bekanntes Hauptangriffsziel für oxidative und zelluläre Schäden: In der Epidermis ist beispielsweise eine altersabhängige Zunahme des Gehalts an Proteinkarbonylen nachgewiesen worden. Diese Proteinkarbonyle sind instabile, veränderte Proteine, die zur Aggregatbildung neigen und mit ihrer chemisch aktiven Oberfläche mit anderen Makromolekülen reagieren können. Diese oxidativ veränderten, funktionsunfähigen Proteine werden durch das Proteasom entfernt, eine intrazelluläre Protease, die für das Überleben der Zelle von essentieller Bedeutung ist. Auf der anderen Seite hemmen die oben beschriebenen Proteinaggregate auch das Proteasom, was wiederum den Abbau weiterer oxidierter Proteine verhindert und Proteinaggregate akkumulieren lässt. Dieser Circulus vitiosus endet letztendlich im Zelltod. Die oben umrissenen oxidativen Prozesse und ihre Folgen konnten in verschiedenen Hautschichten der alternden Haut nachgewiesen werden. Neben den Proteinaggregaten hemmt sowohl das UVA- als auch das UVB-Licht¹ die Proteasompeptidase.

Bei Schädigung der menschlichen Haut durch exogene Noxen spielt die UV-Strahlung eine zentrale Rolle. Bei dieser Form der exogenen Alterung findet sich eine weite Spanne epidermaler, struktureller Veränderungen. Zu diesen gehören die Wachstums- und Differenzierungsstörungen von Melanozyten und Keratino-

¹ Weitere Ausführung zu UV-Licht erfolgt auf Seite 15

zyten inklusive zytologisch nachweisbarer Atypien. Potentielle klinische Folgen sind benigne Hyperplasien, epitheliale Dysplasien sowie Präkanzerosen. Die Melanozyten sind unregelmäßig verteilt, mit der Folge, dass die alternde Haut zu klinisch auffallenden hyper- sowie depigmentierten Arealen prädisponiert ist (Yaar et al. 2002).

Am charakteristischsten für die exogene Alterung sind jedoch die Veränderungen auf Ebene der Dermis: die Hauptbestandteile der dermalen extrazellulären Matrix, Elastin und Kollagen, sind stark betroffen: Es findet sich neben einer Elastose, d.h. einer Degeneration der elastischen Faser, eine verminderte Zahl an reifen Kollagenfasern. Stattdessen herrscht basophiles Kollagen vor. Daneben findet sich in der Dermis eine Zunahme an Fibroblasten, Mastzellen, Histiozyten und anderen mononukleären Zellen, was auf eine chronisch entzündliche Reaktion in der lichtgealterten Haut hinweist. Ein weiterer charakteristischer Befund der alternden Haut ist die reduzierte Menge an Pro-Kollagen-1 in den Fibroblasten und in der extrazellulären Matrix. Diese Kollagenklasse macht 85-90% der extrazellulären Matrix der menschlichen Dermis aus und wird ausschließlich von Fibroblasten gebildet. Neben dem Pro-Kollagen-1 werden auch andere Kollagenfasern, wie das Pro-Kollagen-3, vermindert gebildet (Krutmann 2003). Als molekulare Ursache hierfür ist möglicherweise die UV-Strahlung, die zur Hemmung der Kollagenfasersynthese und/oder der beschleunigten Abbau derselben beiträgt. Zusätzlich scheinen sowohl UVA- als auch UVB-Strahlen die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen, welche Kollagen proteolytisch abbauen, zu steigern. Erfolgt die verstärkte Induktion dieser Enzyme bei UVB-Licht indirekt über eine Signalkaskade, an deren Ende die Bildung der Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) in Keratinozyten steht, so kann UVA-Licht über die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies die MMP-1 Expression in den dermalen Fibroblasten zusätzlich aktivieren (Krutmann 2003).

Neben der UV-Strahlung spielen bei der vorzeitigen Hautalterung des Menschen auch andere Umwelteinflüsse die oxidative Schäden auslösen können eine Rolle. Hierzu gehört neben dem Ozon und der Infrarotstrahlung das Rauchen. Ein langfristiger Zigarettenkonsum von 20 Zigaretten oder mehr pro Tag beschleunigt die Hautalterung um fast ein Jahrzehnt (Leung und Harvey 2002). Raucher entwickeln im Gegensatz zu Nichtrauchern, schneller und ausgeprägter

Gesichtsfalten (Koh et al. 2002). Die molekulare Basis der vorzeitigen Hautalterung bei Rauchern scheint unter anderem die verminderte Synthese und verstärkte Degradation von Kollagen zu sein. Ausdruck des verstärkten Kollagenabbaus sind höhere Konzentrationen der Metalloproteinase-1-mRNA in der Haut von Rauchern. Dieses Enzym ist in der Lage, das Kollagen der Haut, insbesondere dessen Subtypen I und III, abzubauen (Lahmann et al. 2001, Yin et al. 2000).

Oxidative Schäden am Mitochondrium

Ein zweites wichtiges Ziel oxidativer, schädlicher Wirkungen ist das Mitochondrium. Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Versorgung der Zelle mit Energie. Bei der für die Energiegewinnung erforderlichen oxidativen Phosphorylierung entstehen permanent reaktive Sauerstoffspezies, welche die mitochondriale DNA im Sinne von Mutationen schädigen. Solche Mutationen können den Prozess der oxidativen Phosphorylierung stören und die Bildung neuer reaktiver Sauerstoffspezies fördern. Dieser *circulus vitiosus* ist für den normalen Alterungsprozess menschlicher Zellen wahrscheinlich von großer Bedeutung. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten durch UV-Bestrahlung solche Mutationen erzeugt werden. Die UV-Licht induzierten Mutationen legen nahe, die mitochondriale Schädigung als eine der molekularen Grundlagen der UV-induzierten Lichtalterung anzusehen (sog. mitochondriale Theorie des Alterns).

Oxidative Schäden auf Ebene der DNA

Eine weitere wichtige Zielstruktur von Alterungsprozessen in der menschlichen Haut ist die nukleäre DNA. Sie stellt das wichtigste Chromophor für die UVB-Strahlung dar. Unter deren Einwirkung entstehen gehäuft Mutationen der nukleären Erbinformation. Wie schon dargestellt, trägt die ultraviolette Strahlung zur Bildung dieser schädlichen Sauerstoffverbindungen bei (Brenneisen et al. 1998) und senkt die Aktivität antioxidativer Enzyme, wie z.B. alpha-Tocopherol (Yamamoto 2001). Die UV-Strahlung ist folglich die wichtigste exogene Noxe, die durch molekulare Mechanismen auf verschiedenen Ebenen zu oxidativem Stress und somit zu einer vorzeitigen Alterung der menschlichen Haut beiträgt. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen UV-Exposition einerseits und dem Auftreten von Alterszeichen und

epithelialen Neoplasien andererseits besteht (Erb et al. 2005). Weitere Studien dokumentieren sowohl die altersbedingte Steigerung der reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) (Sohal und Brunk 1992), als auch der oxidativ geschädigten Proteine (Stadtman 1992) und der DNA (Ames et al. 1993).

Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren unter oxidativem Stress

Die Haut stellt die Grenzfläche zwischen Umwelt und Körper dar. Jede Umwelttoxine, die in der Lage ist, in die Haut einzudringen und so oxidativen Stress hervorzurufen, ist potentiell für Alterungsprozesse von pathologischer Bedeutung.

Eine der ersten messbaren Reaktionen der menschlichen Haut auf einwirkende ultraviolette Strahlung, ist die Aktivierung verschiedener Cytokine und Wachstumsfaktoren, sowie membranständiger Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Zu nennen ist hier unter anderem der EGF-Rezeptor (Sachsenmaier et al. 1994), der TNF-alpha-Rezeptor (Dy et al. 1999), der PAF-Rezeptor (Dy et al. 1999) der Insulinrezeptor (Coffer et al. 1995) und der Interleukin-1-Rezeptor (Rosette und Karin 1996).

Der EGF-Rezeptor (EGFR) spielt eine kritische Rolle in der Karzinogenese der UV-induzierten Hauttumoren (Stoscheck und King 1986). Dieser Rezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, welche die Zellproliferation sowohl in epithelialen als auch in nichtepithelialen Zellen steigert. Er fördert somit die Proliferation der Keratinozyten und stellt folglich einen Marker für proliferierende Keratinozyten dar (Boonstra et al. 1985, Nanney et al. 1984).

Sowohl Basaliomzellen als auch Plattenepithelkarzinomzellen exprimieren den EGF-Rezeptor in einem Ausmaß, welches mit der Expression des EGF-Rezeptors in den basalen Zellschichten normaler Epidermis vergleichbar ist (Lavrijsen et al. 1989). Der EGF-Rezeptor scheint also von entscheidender Bedeutung für die Entstehung der UV-induzierten Hauttumore zu sein. Die oben beschriebenen Eigenschaften wurde in dieser Arbeit genutzt: Der EGF-Rezeptor wurde als Marker zur Messung des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen unter dem Einfluss von Transthyretin verwendet.

2.4 Epitheliale Hauttumore

Hauttumore stellen weltweit die häufigsten Tumore dar. Bei den nicht-melanozytären Hauttumoren, die epithelialen Ursprungs sind (vor allem Basaliome und Spinaliome), liegt die Inzidenz in Europa bei 300/100.000 für Basaliome und bei 150/100.000 für Spinaliome (Erb et al. 2005). Verschiedene Studien konnten eine weltweite Zunahme der Inzidenz beider Hauttumore in den letzten Jahrzehnten belegen (Holme et al. 2000, Preston und Stern 1992). Dies ist im Wesentlichen auf zwei Faktoren zurückzuführen: Der erste Faktor ist die demographische Veränderung der westlichen Gesellschaft, nämlich der rapide Anstieg der Lebenserwartung sowie die überproportionale Zunahme des Anteils der älteren Menschen an der Gesamtpopulation: Es wird in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Zunahme der Lebenserwartung um 1,5 Lebensjahre pro Jahrzehnt gerechnet, was für eine weitere Zunahme dieser Problematik spricht. Im Jahre 2001 betrug die Zahl der Sechzigjährigen und Älteren in der Bundesrepublik Deutschland 18,5 Mio. dies sind 22,4% der Gesamtbevölkerung. Für das Jahr 2050 erwartet man in dieser Altersgruppe 28 Millionen Menschen, entsprechend 37% der Gesamtpopulation (Pötzsch und Sommer 2003). Die zweite entscheidende Ursache für die Zunahme maligner Hauttumore findet seinen Ursprung in der geänderten Freizeitgestaltung und dem Wandel des Schönheitsideals in den letzten Jahrzehnten. Die gesteigerte Sonnenexposition des Einzelnen fördert die Kumulation von UV-bedingten Hautschäden: Hierzu gehören zum einen die unter 2.3 beschriebenen Alterungsprozesse der Haut, zum anderen sind UVB-Strahlen (Wellenlänge von 290-315 nm) maßgeblich für die Entstehung von Basaliomen und Spinaliomen verantwortlich. UVA-Strahlen (Wellenlänge von 315-400 nm) sind hingegen weniger stark karzinogen. Trotzdem ist es sehr wahrscheinlich, dass UVA-Strahlen zusammen mit UVB-Strahlen die Karzinogenese beschleunigen. Neben einer Immunsuppression induzieren sie, wie in 2.3.6. beschrieben, demnach DNA Veränderungen in den exponierten Zellen (Grossman und Leffell 1997). Durch die dünner werdende Ozonschicht und der dadurch gesteigerten UV-Belastung der Erdoberfläche wird dieser Prozess weiter potenziert.

Neben der quantitativen Zunahme konnte festgestellt werden, dass das Wachstumsverhalten mancher Spinaliome und Basaliome an Aggressivität zunimmt

und dass das Auftreten bei immer jüngeren Patienten (d.h. < 40 Jahre) zu beobachten ist (Christenson et al. 2005, Wrone et al. 1996).

Dass, wie oben dargestellt, UV-Strahlen maßgeblich für die Entstehung der Hauttumore verantwortlich sind, zeigt sich deutlich an deren Prädilektionsstellen. Die Prädilektionsstellen des Spinalioms entsprechen den chronisch licht-exponierten Körperpartien. Seltener findet man sie im Bereich chronisch-entzündlicher und chronisch-degenerativer Hautveränderungen. Basaliome treten ebenfalls in diesen Bereichen auf, zusätzlich jedoch auch an Körperstellen an denen eine geringe UV-Belastung vorlag oder in keinem nennenswerten Umfang eine vorangegangene aktinische Schädigung bestand, wie beispielsweise am Rumpf.

Obwohl beide Hauttumore zu den häufigsten Tumoren des Menschen zählen, ist ihre genaue Pathogenese noch weitgehend unerforscht. Ein Merkmal beider Tumore stellt deren Widerstandsfähigkeit gegenüber dem programmierten Zelltod dar. Die Gründe hierfür konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings ist für viele Tumorzellen bekannt, dass sie Mechanismen entwickeln um der Apoptose zu entgehen, so auch Basaliom- und Spinaliomzellen.

Die empfindliche Homöostase der epithelialen Zellen der Haut wird durch Apoptose-induzierende und Apoptose-unterbindende Moleküle hergestellt. Hierzu gehört auf der einen Seite die TNF-Rezeptor-Familie (FasL, TRAIL) (Bhardwaj und Aggarwal 2003), auf der anderen Seite die bcl-2-Familie (bax, bac, bcl-2 und bcl-xL) (Kirkin et al. 2004). UV-Strahlen induzieren nicht nur DNA Schäden in der Epidermis, sondern stören auch die epidermale Hömeostase der Zellen auf das empfindlichste. Werden diese Schäden der Zelle nicht repariert oder durch Apoptose eliminiert, kommt es zu einer Zelltransformation, unkontrollierter Proliferation und letztendlich zur Tumorentstehung. Ein wichtiges Gen in diesem Zusammenhang ist das p53 Tumorsupressorgen: Das p53 Gen wird auch als „Schützer des Genoms“ bezeichnet (Levine 1997). Ist die DNA der Keratinozyten so weit geschädigt, dass eine Reparatur nicht mehr möglich ist, z.B. durch UV-Schäden, werden die Zellen unter der Kontrolle des p53 durch die Induktion von Apoptose entfernt (Hill et al. 1999). UV-Strahlen können jedoch auch p53 selbst derart schädigen, so dass Mutationen in diesem Gen auftreten. Unkontrolliertes Zellwachstum und Verlust der Apoptosefähigkeit der geschädigten Keratinozyten

ist die Folge. Mutationen des p53 Supressorgen konnten in 56% der Basaliome und in mehr als 90% der Spinaliome gefunden werden (Ziegler et al. 1994).

Die Therapie dieser Hauttumore besteht noch immer vor allem in der Exzision der Läsion mit ausreichend Sicherheitsabstand. Da diese Tumore nicht selten im Gesichtsbereich auftreten, kann es hier, besonders bei ausgedehnten Befunden, zu kosmetisch oder funktionell wenig zufriedenstellenden Ergebnissen kommen. Neuere Behandlungsmöglichkeiten, wie z.B. Immunmodulatoren, topische Chemotherapeutika oder die photodynamische Therapie bringen gewissen Vorteile und zeigen Erfolg versprechende Perspektiven: Medikamentöse Therapieformen (z.B. Interferon und Fluorouracil) zeigen in Studien eine niedrigere Morbidität und geringere Schädigung des Umgebungsgewebes, haben jedoch im Vergleich zur konventionellen Exzision den Nachteil, dass die Tumore häufig nicht völlig verschwinden. Darüber hinaus sind die meisten vergleichenden Studien unvollständig und erlauben somit keine endgültige Aussage bezüglich der Wirksamkeit dieser neueren Therapievarianten (Lee et al. 2007).

Die Forschung nach neuen Möglichkeiten hinsichtlich Therapie und Prophylaxe dieser Tumore ist vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz von Hauttumoren folglich von großer Bedeutung.

2.5 Transthyretin

Im Folgenden wird das für diese Arbeit bedeutende Protein Transthyretin detailliert dargestellt. Zu diesem Zweck wird erst ein kurzer Überblick über die Entdeckung des Proteins gegeben und dann auf dessen Funktion und Wirkungsweise im menschlichen Körper eingegangen. Abschließend soll die Bedeutung des Proteins für die menschliche Haut, ein bisher kaum erforschtes Gebiet, beleuchtet werden.

2.5.1 Die Entdeckung des Proteins Transthyretin (Präalbumin)

Die Entdeckung des Plasmaproteins Transthyretin reicht zurück in die fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts. Bei Untersuchungen an Plasmaproteinen mittels der damals neu eingeführten Gelelektrophorese stellte sich im elektrischen Feld eine Bande dar, die vor Albumin herlief. Diese Proteinbande wurde als „Präalbumin“ bezeichnet. In den darauf folgenden Jahren erkannte man, dass Präalbumin die Fähigkeit besitzt, Schilddrüsenhormone zu binden. Auf dieser

Beobachtung beruht die zweite Bezeichnung des Proteins: Thyroxin binding prealbumin (TBPA) (Robbins und Rall 1960). In den achtziger Jahren wiesen Dickson et al. nach, dass Zellen des Plexus choroideus Präalbumin synthetisieren und in die zerebrospinale Flüssigkeit sezernieren (Dickson et al. 1985). Diese Entdeckung lieferte eine Erklärung für die hohen Präalbumin-Konzentrationen der zerebrospinalen Flüssigkeit im Vergleich zu denen im Blut und zeigte einen möglichen, bisher unbekannt, selektiven Aufnahmeweg für Thyroxin in bestimmte Gebiete des Zentralnervensystems. Weitere Untersuchungen in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts hatten großen Anteil an der Aufklärung der Proteinstruktur: Präalbumin, später Transthyretin genannt, besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei jede Untereinheit ausgedehnte β -Faltblattstrukturen enthält. Transthyretin verfügt als Tetramer über eine hohe Stabilität. Jeweils zwei Untereinheiten bilden ein Dimer. Dieses Dimer besitzt in einem zentral lokalisierten, hydrophoben Kanal zwei identische Bindungsstellen für Thyroxin. Durch die Bindung eines Thyroxinliganden an die erste Bindungsstelle wird die Affinität der zweiten für Thyroxin nachhaltig reduziert. Studien Mitte der siebziger Jahre zeigten, dass dies durch einen allosterischen Effekt, also eine Veränderung der Proteinstruktur zustande kommt (Irace und Edelhoch 1978, Wojtczak et al. 2001). Dies erklärt den Umstand, dass Transthyretin jeweils nur ein Thyroxin Molekül in der Zirkulation transportiert. Der neu entdeckten Funktion des Präalbumins (TBPA) wurde so dann durch eine neue Nomenklatur Rechnung getragen: aus Präalbumin (TBPA) wurde Transthyretin (TTR).

Im gleichen Jahrzehnt wurde eine weitere Funktion des Transthyretin bekannt: Die Fähigkeit des Proteins mit dem Vitamin-A-bindenden Protein („retinol binding protein“ (RBP) einen Komplex zu bilden. Die vier vorhandenen RBP-Bindungsstellen sind jedoch nie vollständig besetzt (Peterson 1971, Raz und Goodman 1969).

Seit den späten achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts sind einige erbliche Varianten von Transthyretin beschrieben worden, die sich zwei Kategorien zuordnen lassen. Auf der einen Seite solche, die eine gesteigerte Kapazität zur Thyroxinbindung haben. Diese Varianten manifestieren sich klinisch als Hyperthyreose. Auf der anderen Seite lässt sich die große Mehrzahl der

bekanntesten Varianten bei Patienten mit familiärer Amyloid-Polyneuropathie („familial amyloidotic polyneuropathy“, FAP) nachweisen. Diese autosomal-dominant vererbliche Erkrankung findet sich überdurchschnittlich häufig in portugiesischen Familien. Die bei diesen Familien gefundenen Transthyretin-Varianten weisen nicht selten eine verringerte Affinität zu Thyroxin auf. Der Mechanismus der Transformation eines löslichen Transthyretin-Tetramers in ein unlösliches, polymeres Amyloid ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

2.5.2 Produktionsorte des Transthyretins im menschlichen Körper

Die Hauptsyntheseorte des Transthyretins stellen Leber und Zentralnervensystem dar, von wo aus das Protein in das Blut, bzw. den Liquor cerebrospinalis sezerniert wird. Die Regulation der Transthyretin-Synthese in diesen beiden Orten erfolgt unabhängig voneinander. Während der embryonalen Entwicklung werden die Transthyretin-Gene zuerst in der Tela choroidea, dem Vorläufer des Plexus choroideus, exprimiert und erst danach in der Leber (Fung et al. 1988). Die mRNA von Transthyretin ist im ZNS nur im Plexus choroideus und in den Meningen nachweisbar. Beide Strukturen sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt, (Blay et al. 1993, Herbert et al. 1986). Betrachtet man die gesamte Proteinproduktion in der cerebrospinalen Flüssigkeit, so ist Transthyretin mit 25 % das Protein mit der höchsten Produktionsrate im Plexus choroideus (Dickson et al. 1986). Der größte Teil des Thyroxin (T₄) im CSF wird von Transthyretin transportiert (Hagen und Solberg 1974). Weitere Syntheseorte des Transthyretins sind Auge (Retina, Ziliarkörper und Nervus opticus) (Ong et al. 1994), Pankreasinseln (Jacobsson et al. 1989) und Dottersack (Soprano et al. 1986). In geringen Mengen wird das Protein auch im Magen, Herzen, Skelettmuskel und in der Milz synthetisiert.

Das Protein wird hauptsächlich in der Leber abgebaut, in geringeren Mengen jedoch auch in der Muskulatur, der Haut und in den Nieren, (Makover A (1988) J Biol Chem 263:8598-603) nicht jedoch im ZNS (Makover et al. 1988).

2.5.3 Funktionen des Transthyretin im menschlichen Körper

Auf Basis bisheriger Forschungsergebnisse hat das Protein Transthyretin im menschlichen Körper vor allem zwei Funktionen inne, die unten beschrieben werden. Darüber hinaus spielt es bei einigen erblich bedingten Erkrankungen eine

entscheidende Rolle. Im Folgenden soll hierüber ein kurzer Überblick gegeben werden, sowie auf die bisher wenig erforschten Zusammenhänge und Funktionen des Transthyretins in der Haut hingewiesen werden.

Transthyretin und die Schilddrüsenhormone

Nach heutigem Wissensstand lassen sich Transthyretin zwei Funktionen zuordnen: Erstens gehört Transthyretin zu den Plasmaproteinen, die den Transport von (T_4) im Blut gewährleisten. In bestimmten Regionen des Zentralnervensystems scheint Transthyretin sogar das einzige Transportprotein für T_4 zu sein (Schreiber 2002). Das biologisch aktive Stoffwechselprodukt, Trijodthyronin (T_3) hingegen wird von Transthyretin nicht transportiert (Palha 2002). Mehr als 99% des T_3 und T_4 sind an Transportproteine gebunden, von denen beim Menschen die quantitativ wichtigsten Thyroxin-bindendes-Globulin (TBG), Transthyretin und Albumin sind (Robbins 2000). Schilddrüsenhormone sind v.a. für die regelrechte Entwicklung des Gehirns unabdingbar (Bernal und Nunez 1995, Oppenheimer und Schwartz 1997). Ihre spezifische Rolle im Erwachsenenhirn scheint jedoch noch nicht vollständig geklärt zu sein (Palha 2002). Um ihren Bestimmungsort im Zentralnervensystem zu erreichen, gibt es für die Schilddrüsenhormone zwei mögliche Aufnahmewege: Der erste Weg führt über die lipidhaltige Plasmamembran der Blut-Hirnschranke und des Plexus choroideus. Dank ihrer lipophilen Eigenschaften können die Schilddrüsenhormone diese Plasmamembranen problemlos passieren und gelangen so zu ihren Bestimmungsorten. Der zweite Weg führt vom Blut über den Plexus choroideus, wo die Schilddrüsenhormone an Transthyretin binden und anschließend in die Zerebrospinalflüssigkeit sezerniert werden (Southwell et al. 1993). Studien legen nahe, dass nicht die im Plasma an Transthyretin gebundene Fraktion in die zerebrospinale Flüssigkeit transportiert wird, sondern dass nur freies T_4 dorthin gelangt: Dieses überwindet die Lipidmembran, interagiert daraufhin mit Transthyretin und trägt so zum Gesamt- T_4 Gehalt im Gehirn bei (Chanoine et al. 1992). Transthyretin scheint allerdings für die Aufnahme von T_4 in die periventrikulären Gehirnstrukturen des ZNS und seine Verteilung nicht zwingende Voraussetzung zu sein (Palha et al. 2002). Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass Transthyretin weder für den T_4 -Transfer zum ZNS noch für dessen Verteilung innerhalb des Gehirns essentiell ist. Interessanterweise

konnte jedoch bei TTR-Null-Mäusen in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) kein anderes Transportprotein für T_4 nachgewiesen werden (Palha et al. 2000). Aller Wahrscheinlichkeit nach ist also kein anderes Transportprotein vorhanden, welches in CSF und Plexus choroideus das Fehlen von Transthyretin ausgleichen könnte.

Eindeutig geklärt werden muss allerdings noch, ob Transthyretin möglicherweise im Plexus Choroideus oder in der zerebrospinalen Flüssigkeit benötigt wird, um T_4 zu speichern oder einen funktionellen Puffer zu bilden. Denkbar ist auch, dass Transthyretin als Hormonreservoir dient und so nach Bedarf der Gewebe T_4 selektiv an die Zielgewebe freigibt. Hierdurch könnte einerseits der T_4 -Abbau in der Leber und andererseits auch die glomeruläre Filtration durch die Nieren verhindert werden (Mendel et al. 1987, Palha et al. 2002). Für die Aufnahme von T_4 in der Leber und Niere, ebenso wie für das Aufrechterhalten normaler Schilddrüsenhormonkonzentrationen in diesen Organen (Palha et al. 1997) scheint Transthyretin nicht essentiell zu sein (Mendel et al. 1992), da Menschen bei denen eine Transthyretin-Mutation mit gesteigerter oder erniedrigter T_4 -Affinität vorliegt, in der Regel keine Anzeichen einer Hypo- oder Hyperthyreose zeigen (Refetoff et al. 1986, Rosen et al. 1993). Darüber hinaus konnte im Tierexperiment an sog. TTR-Null-Mäusen gezeigt werden, dass trotz einer 50% niedrigeren Konzentration des zirkulierenden Gesamt- T_4 der Anteil des freien T_4 , als auch die Konzentrationen des zirkulierenden T_3 und TSH unverändert im Sinne einer Euthyreose blieben (Palha et al. 1994).

Transthyretin und Retinol

Eine weitere Funktion kommt Transthyretin beim Transport des Retinols (Vitamin A) zu. Als Transportprotein stellt es der Haut über das Retinol-bindendes Protein (RBP) Retinol zur Verfügung. RBP ist im Blut das spezifische Transportprotein für Retinol, welches dieses Vitamin von der Leber zu seinen Zielgeweben transportiert. Transthyretin bindet an den RBP-Retinol-Komplex. Solch ein Komplex setzt sich im Blut aus Transthyretin und RBP in einem Verhältnis von 1:1 zusammen (Naylor und Newcomer 1999). Die hierfür benötigten Bindungsstellen befinden sich auf der Oberfläche des Proteins.

Mutationen des Transthyretin-Moleküls, wie sie auch bei der familiären Amyloid-Polyneuropathie (Punktmutation an Position 84) vorkommen, gehen mit stark erniedrigten Plasma-RBP-Konzentrationen einher. Die geringe Interaktion des mutierten Transthyretin-Moleküls mit RBP deutet darauf hin, dass Isoleucin an Position 84 des Transthyretin-Moleküls von entscheidender Bedeutung für die RBP-Bindung von Transthyretin ist (Waits et al. 1995). Wo die Komplexbildung zwischen RBP und Transthyretin erfolgt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Denkbar ist eine Bindung der beiden Proteine bereits in den Hepatozyten oder eine erst im Plasma stattfindende Komplexbildung (Navab et al. 1977, Rask et al. 1983). Die vermutete Komplexbildung von holo-RBP (Retinol gebunden an RBP) mit Transthyretin im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten scheint sich zu bestätigen (Bellovino et al. 1996).

2.5.4 Megalin: rezeptorvermittelte Aufnahme von Transthyretin

Die Organe und Gewebe, in denen Transthyretin abgebaut wird, sind bekannt: Hauptabbauort ist die Leber; daneben sind die Nieren der wichtigste extrahepatische Abbauort (Makover et al. 1988). Über die Mechanismen, die zur Aufnahme des Transthyretin führen, ist hingegen relativ wenig bekannt. Die Ergebnisse verschiedener Studien bestärken die Annahme, dass Transthyretin wahrscheinlich über einen rezeptorvermittelten Mechanismus aufgenommen wird. (Divino und Schussler 1990, Vieira et al. 1995), (Kuchler-Bopp et al. 2000). Sousa et al. konnten in der Niere einen Transthyretin-Rezeptor aus der Familie der LDL-Rezeptoren nachweisen: Dieser spezifische Rezeptor, Megalin, vermittelt in der Niere die tubuläre Aufnahme von Transthyretin (Sousa et al. 2000). Gestützt wird diese Aussage durch die Beobachtung, dass Patienten mit Schäden an ihrem Tubulussystem der Niere, wie sie beispielsweise beim Fanconi-Syndrom vorkommen, Transthyretin mit dem Urin ausscheiden.

Dieser Rezeptor ist ein Multiliganden-Rezeptor, der an der apikalen Seite einiger resorptiver Epithelien exprimiert wird. Zu diesen Epithelien zählen die des proximalen Tubulus (Christensen et al. 1995) und des Dottersack (Zheng et al. 1994). Der Rezeptor Megalin gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren (low density lipoprotein-Rezeptorfamilie) und bindet das sog. RAP (receptor-associated-protein) (Christensen et al. 1992). Dieses Protein RAP erleichtert und beschleunigt die Ausbildung der korrekten Raumstruktur der LDL-Rezeptoren während deren

Biosynthese und Transport zur Zelloberfläche (Birn et al. 2000), (Willnow 1998). Zu den bisher bekannten Megalinliganden gehören Transcobalamin (Vitamin B₁₂-bindendes-Protein) (Moestrup et al. 1996), Vitamin-D-bindendes Protein (Nykjaer et al. 1999) und Retinol-bindendes Protein (RBP) (Christensen et al. 1999). Der Bindung dieser Proteine an Megalin kommt somit eine wichtige Funktion in der Rückresorption glomerulär filtrierter, essentieller Substanzen zu. Unterstützt wird diese Aussage durch Untersuchungen an Mäusen, denen das Megalin-Gen fehlt: Diese gentechnisch veränderten Mäuse sind gekennzeichnet durch eine hohe Mortalitätsrate, Entwicklungsstörungen (Willnow et al. 1996) und durch tubuläre Resorptionsstörungen mit Verlust von niedermolekularen Plasmaproteinen über die Niere.

Des Weiteren scheint die Struktur von Transthyretin für die Bindung an Megalin von entscheidender Bedeutung zu sein: Die bisher bekannten Punktmutationen des Proteins treten oft an Position 30 des Proteins auf und sind häufig mit der familiären Amyloid-Polyneuropathie (familial amyloidotic polyneuropathy) vergesellschaftet (Saraiva 1995). Diese autosomal-dominante Krankheit geht mit dem Auftreten von extrazellulär abgelagerten Amyloid-Fibrillen in verschiedenen Geweben, vor allem im peripheren Nervensystem einher (Saraiva 1995). Zusätzlich weisen die betroffenen Patienten niedrige Plasmakonzentrationen des mutierten Proteins auf. Dies könnte auf dessen beschleunigten Abbau hinweisen.

Um das Bindungsverhalten von Transthyretin an den Rezeptor Megalin besser zu verstehen, wurden die Varianten Transthyretin V30M, eine Amyloid-Mutation und Transthyretin T119M, eine Nicht-Amyloid-Mutation auf ihre unterschiedlichen Aufnahmeraten untersucht: Transthyretin V30M war die Mutation mit der höchsten Aufnahmerate in der Niere, wogegen Transthyretin T119M die niedrigste besaß. Diese Ergebnisse untermauern die Annahme, dass die Konformation von Transthyretin für die Erkennung durch Megalin von großer Bedeutung ist.

Aus dem oben besprochenen ergibt sich für diese Arbeit die Fragestellung, ob Megalin auch in der Haut vorkommt und dort als Rezeptor für Transthyretin fungieren könnte.

2.5.5 Transthyretin und seine immunmodulierenden Eigenschaften

Bereits in mehreren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass Transthyretin immunmodulierende Eigenschaften besitzt (Borish et al. 1992, Burton et al. 1987, Husz et al. 1975, Le et al. 1981): Transthyretin scheint in der Lage zu sein, die IL-1 Produktion der humanen Monocyten-Leukämie-Linie THP-1 sowie der Endothelzellen bis zu einem gewissen Maße zu inhibieren. IL-1 ist ein potenter Mediator in der körpereigenen Immunantwort. Die Produktionsaktivität des IL-1 scheint hierbei einer diffizilen Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Faktoren unterworfen zu sein. Als spezifischer Inhibitor des IL-1 im Serum konnte Transthyretin identifiziert werden. Die hepatische mRNA von Transthyretin wird während der Akute-Phase-Reaktion vermindert transkribiert, so dass in dieser Phase die entsprechend benötigte Höhe des IL-1 Plasmaspiegels erreicht wird (Dickson et al. 1986). In eine ähnliche Richtung weist die Beobachtung, dass die Transthyretinspiegel im Plasma durch ein Trauma oder Mangelernährung, zusammen mit anderen Akute-Phase-Proteinen deutlich abfallen (Douville et al. 1982) und dass bei Patienten mit systemischen Vaskulitiden ein Mangel an Transthyretin im Serum gefunden wurde (King et al. 1987). Transthyretin vermag zwar die Produktion des IL-1 in Endothelzellen zu drosseln, eine totale Hemmung findet jedoch nicht statt (Borish et al. 1992).

Dieser Effekt des Transthyretins legt die Vermutung nahe, dass Transthyretin neben seinen bisher bekannten Aufgaben, eine weitere Funktion im Immunsystem hat und hier als endogener antiinflammatorischer Mediator fungiert (Borish et al. 1992).

2.5.6 Transthyretin und die Haut

Das Plasmaprotein Transthyretin ist auch in der Haut als Transportprotein von Retinol im Komplex mit RBP für dessen Transport zu den Zielorganen unerlässlich. Im Prozess der Differenzierung von Keratinozyten stellt Retinol einen kritischen Faktor dar: Es spielt für das initiale Wachstum und die Reifung der Keratinozyten eine essentielle Rolle. Dies zeigt sich daran, dass unter einer reduzierten Retinolkonzentration in der basalen Epidermis eine verminderte Anzahl an transienten Keratinozyten heranreift. Auf der anderen Seite setzt jedoch

die Differenzierung der Keratinozyten eine abnehmende Retinolkonzentration in basalen epidermalen Strukturen voraus (Fuchs und Green 1981).

Den Nachweis von Transthyretin in der Epidermis erbrachten Törma und Vahlquist in ihrer Studie, die sich mit den Transportproteinen des Vitamin A (Retinol) in der Epidermis beschäftigte (Torma und Vahlquist 1983). Des Weiteren gelang es diesen Autoren, Transthyretin aus Epidermisextrakten zu gewinnen und unter der Hypothese, dass Transthyretin ausschließlich extrazellulär vorkommt, semiquantitativ zu bestimmen. Die von Ihnen nachgewiesenen Konzentrationen lagen bei durchschnittlich 160 mg/l. Diese Studie war die erste, die sich mit Transthyretin im Zusammenhang mit der Epidermis beschäftigte und die erste die zeigte, dass Transthyretin zu den physiologischen Bestandteilen der Epidermis zählt.

In seiner Rolle als Transportprotein für Retinol, hat Transthyretin zusammen mit RBP folglich eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von Keratinozyten. Kieslich untersuchte in ihrer Arbeit das Proteom von Keratinozyten, als Hauptbestandteil der Epidermis (Kieslich 2005). Über die so gewonnenen Expressionsmuster in junger und gealterter Epidermis erhoffte man sich Rückschlüsse auf die in den Alterungsprozess involvierten Proteine. Es sollten vor allem altersabhängig veränderte Proteinexpressionen dargestellt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Plasmaprotein Transthyretin als wichtiges Transportprotein für Retinol in der Epidermis nachzuweisen ist. Dieses scheint für die intakte Funktion der Epidermis unerlässlich, wird in der Epidermis jedoch nicht synthetisiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die epidermale Transthyretin-Konzentration im Alter abnimmt (Kieslich 2005).

Ob Transthyretin zusätzlich einen direkten Einfluss auf Keratinozyten ausübt, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

2.6 Zusammenfassung

Die Hautalterung gehört zu den leicht sichtbaren Alterungsprozessen des Menschen. Sie ist ein komplexer Prozess, bei dem multiple Faktoren, wie z.B. UV-Exposition, das Immunsystem und genetische Komponenten eine Rolle spielen. Man unterscheidet zwischen intrinsischer und extrinsischer Hautalterung. Erstere bezeichnet die vorprogrammierte, nicht zu beeinflussende Alterung, die je nach

Individuum unterschiedlich schnell voranschreitet. Die extrinsische Hautalterung hingegen ist bestimmt durch das Maß an schädlichen exogenen Einflüssen, vor allem UV-Strahlung und Nikotinabusus. Zu den Folgen dieses Alterungsprozesses zählt neben den optisch störenden Veränderungen, wie beispielsweise der Verlust der Elastizität, auch die Bildung von Hauttumoren.

Hauttumore, insbesondere Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome zählen zu den häufigsten Tumoren des Menschen. Der Häufigkeitsgipfel dieser Malignome liegt zwischen dem 60. und 80 Lebensjahr, so dass Plattenepithelkarzinome und Basalzellkarzinome als Tumore der alternden Haut bezeichnet werden können. Die Inzidenz dieser Erkrankungen scheint darüber hinaus in den letzten Jahrzehnten zuzunehmen. Der genaue Pathomechanismus ihrer Entstehung ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Das Plasmaprotein Transthyretin ist als Transportprotein von Retinol für den Transport zu den Zielorganen unerlässlich, so auch für die Haut. Im Differenzierungsprozess stellt Retinol einen kritischen Faktor der Keratinozyten dar: Es ist essentiell für das initiale Wachstum und die Reifung der Keratinozyten. In diesem Zusammenhang konnte Kieslich nachweisen, dass es zu altersabhängigen Proteinveränderungen in der Epidermis kommt (Kieslich 2005). Unter anderem nimmt die epidermale Transthyretin-Konzentration im Alter ab. Ob Transthyretin zusätzlich einen direkten Einfluss auf die Keratinozyten ausübt und welche Mechanismen für die Abnahme der Transthyretin-Konzentration verantwortlich sind, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Aus den oben beschriebenen Erkenntnissen ergibt sich die Fragestellung der vorliegenden Arbeit: Ziel dieser Arbeit ist es, den möglichen Einfluss von Transthyretin auf die Proliferation von Basaliom- und Spinaliomzellen zu untersuchen und somit die Rolle des Transthyretin in der Haut besser zu verstehen. Die Leitfragen der Arbeit lauten somit:

- Gibt es einen funktionellen Zusammenhang zwischen der steigenden Inzidenz an Hauttumoren im Alter und der beobachteten Abnahme der Transthyretin-Konzentration in der alternden Haut?
- Hat Transthyretin einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Basaliomen und Spinaliomen?

Darüber hinaus soll die Aufnahme von Transthyretin in die Zellen weiterführend untersucht werden. Besonderes Interesse gilt hierbei dem Rezeptor Megalin, der in der Niere für die Rückresorption von Transthyretin verantwortlich ist. Hieraus resultiert die Frage, ob Megalin auch in der Epidermis nachzuweisen ist und ob dieses Protein auch in der Haut als Rezeptor für Transthyretin fungiert.

3 Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche erläutert und die hierfür verwendeten Reagenzien und Materialien aufgelistet.

3.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

Acrylamid-Bis 30%	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
(BCIP):5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	Sigma, Saint Louis, USA
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
CellWash Waschpuffer	Becton & Dickinson, Heidelberg
Cy TM 3 konjugierter AffiniPure-Kaninchen-anti-Ziege Antikörper, IgG	Dianova, Hamburg,
DMEM: (Dulbecco's Modifizierte Eagle Medien)	Gibco; Palsey, GB
DMEM ohne Calcium, ohne L-Glutamin	Gibco; Palsey, GB
Di-Methylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Foetales Rinderserum (FCS)	Gibco, Palsey, GB
humanes Prealbumin	Biodesign International, Saco, USA
Maus-anti-Human-EGFR	BD Biosciences, San Diego, USA
Magermilchpulver	Fluka, Buchs, Schweiz
Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT)	Sigma, Saint Louis, USA
R-Phycoerythrin (R-PE) konjugiert	BD Biosciences, San Diego, USA
Maus IgG _{2b} , Isotypenkontrolle, R-Phycoerythrin (R-PE)-konjugiert	BD Biosciences, San Diego, USA
RPMI	Gibco, Palsey, GB
L-Glutamin 200 mM	Gibco, Palsey, GB
Kaninchen-anti-Human-pan Ras	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

	USA
Kaninchen-anti-Human-Prealbumin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Kaninchennormalserum	Dianova, Hamburg
Molekulargewichtsstandard	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Monoklonaler Maus-anti-Human Cytokeratin 10, IgG1	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco, Palsey, GB
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Saint Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Saint Louis, USA
RIPA Puffer	Sigma, Saint Louis, USA
TEMED	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Trypanblau 0,5% (w/v) in NaCl	Seromed Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA, Flüssig	Gibco, Palsey, GB
Tween	Merck, Darmstadt
WST-1 Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Ziege-anti-Humanes Megalin (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz USA
Ziege-anti-Human Cytokeratin 1 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ziegennormalserum	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

3.2 Verwendete Pufferlösungen und Eindeckmedien

Dulbecco's Phosphatgepufferte

Kochsalzlösung (D-PBS) Gibco, Palsey, GB

PBS (phosphat buffered saline)-Puffer:

NaCl 8,0 g

Na₂HPO₄ 1,15 g

KH₂PO₄ 0,2 g

KCl 0,2 g
In 1,0 l Aqua dest., pH 7,2-7,4

Elvanol (Eindeckmedium):

Glycerin (86%)	Roth Werk, Rilchingen-Hauweiler
Na ₂ HPO ₂ 2M	Merck, Darmstadt
Moviol	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
PBS	Gibco, Palsey, GB
Einbettmedium Cytochrome PIN	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA

3.3 Verbrauchsmaterialien

Cell Scraper (steril)	Nunc International, Roskilde Dänemark
Filterpapier Grad 1F	Munktell Filter, Grycksbo, Schweden
Zellkulturflaschen (75 ml)	Falcon, Oxnard, USA
Mikroskopische Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim/Main
Pipettenspitzen (0,5-20 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (2-200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (50-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (0,5-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenplatten (MikroWell Platten) 96, 24 und 6 Vertiefungen	Nunc International, Roskilde, Dänemark
Polypropylenröhrchen 15 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg
Polypropylenröhrchen 50 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg
Polypropylenröhrchen 1 ml	Nunc International, Roskilde, Dänemark
Polystyrolröhrchen 12x 75 mm	Falcon, Oxnard, USA
PVDF Membran (0,2 µm Durchmesser)	Bio Rad Laboratories, Hercules USA
Sterile Einmalpipetten (1-10 ml)	Becton & Dickinson, Heidelberg

3.4 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
FACScan Durchflusszytometer	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop, Axiophot 2	Zeiss (West), Oberkochen
Inverses Routinemikroskop CK-2	Olympus Optical, Hamburg
Kryostat Leica CM 3050	Leica, Solms
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer	Omnilab, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
PH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer, Dynatech MR 5000	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Probenmixer, Certomat MV	B. Braun, Melsungen
Universal-Kleinschüttler KL2	Edmund Bühler, Bodelshausen
Werkbank, steril	Ceag Schirp, Selm-Bork
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

3.5 Verwendete Zelllinien

Die für diese Doktorarbeit benutzte humane Basaliomzelllinie, CRL-7762 von der Firma American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA, stammt von einer Patientin. Die verwendete humane Spinaliomzelllinie, A-431, von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig wurde einem soliden Tumors einer 85-jährigen Patientin entnommen. Diese Tumorzellen enthalten viele EGF-Bindungsstellen.

3.6 Kultivierung der Zellen

3.6.1 Vorbereitung von Medien

Um Zellen in Kultur zu halten, werden je nach Art der Zellen bestimmte Nährmedien benötigt. Diesen kann man im Rahmen unterschiedlicher Fragestellungen und Versuchsanordnungen Wirkstoffe hinzufügen oder entziehen.

Als Basismedium für die Kultur der Spinaliom-, und Basaliomzellen wurde DMEM mit 1,8 mM Calcium verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch des Mediums wurde ein Antibiotikagemisch (Penicillin 5000 IE/ml und Streptomycin 5000 IE/ml) sowie 10% fetales Rinderserum (FCS) hinzugefügt.

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank (Heraeus) in einer 5% CO₂ enthaltenden, wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C inkubiert.

3.6.2 Züchtung der Zellen

Aufbau einer Kultur

Die bei -80°C eingefrorenen Zelllinien mussten zuerst in einem 37 C° warmem Wasserbad aufgetaut werden. Hierzu wurde das Kryoröhrchen samt Inhalt in ein Röhrchen mit 70% Alkohol gegeben und für einige Minuten im Wasserbad belassen. Anschließend konnte das Zentrifugat unter der Werkbank in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit Gebrauchsmedium aufgefüllt, und im Anschluss bei 1700 rpm (Umdrehungen pro Minute) für 10 Minuten zentrifugiert werden. Nach Dekantieren des Überstands wurde des Pellet mit 1,0 ml Gebrauchsmedium aufgenommen und in eine 75 ml Flasche überführt. Nach Zugabe von 15 ml Gebrauchsmedium wurde die Flasche bei 37 C° und 5% wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank belassen.

Weiterführen einer Kultur

Die Verdoppelungszeit für die verwendeten Zelllinien liegt bei ungefähr 80-100 Stunden, weswegen der Zellrasen alle 3-5 Tage geteilt werden musste. Hierzu wurde das alte Kulturmedium vollständig aus der Flasche abgesaugt und der Zellrasen 10 Minuten lang mit Trypsin (1:5 Verdünnung mit PBS) inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit dem jeweils verwendeten Gebrauchsmedium gestoppt, passende Teilproben (im Verhältnis 1:2 bis 1:4) der Zellsuspension in neue Kulturflaschen überführt und frisches Gebrauchsmedium hinzugefügt.

Ernten der Zellen

Die Arbeitsschritte für das Ernten der Zellen entsprachen denen für die Teilung des Zellrasens mit dem Unterschied, dass nach Zugabe des Gebrauchsmediums

die genaue Zellzahl ermittelt und die für den jeweiligen Versuch erforderliche Zellzahl eingestellt wurde.

3.6.3 Zellzählung

Die Quantifizierung der Zellzahl in der Zellsuspension erfolgte nach einer entsprechenden Verdünnung (1:10, bzw. 1:20) einer Teilprobe mit einer 0,5 % Trypanblaulösung. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die intakte Zellmembran nicht durchdringt, so dass nur geschädigte oder tote Zellen an einer intensiven Blaufärbung zu erkennen sind. Die Zellzahl wurde dann mit einer Neubauer-Zählkammer bei 40-facher Vergrößerung ermittelt, so dass die Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt werden konnte.

3.7 Bestimmung der Zellproliferation durch photometrische Messung der WST-1 Abspaltung.

Der proliferative Status in der sich die Zellen befinden, spiegelt sich in der Aktivität der zellulären mitochondrialen Dehydrogenase wider, die das Tetrazoliumsalz WST-1 zu dem Farbstoff Formazan spaltet. Die Farbstoffbildung ist zur Zahl der Zellen proportional. Die Absorption dieses Farbstoffes wird dann im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und als optische Dichte bezeichnet. Die optische Dichte steht also für die gemessene Zellzahl und auf diese Weise kann so direkt die Zahl der Zellen ermittelt werden.

3.7.1 Vorbereitung der Zellen und Inkubation mit Transthyretin

Nach ausreichendem Wachstum der Zellen konnten diese geerntet und Basaliom- und Spinaliomzellen auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/0,8 ml verdünnt werden. Letztendlich standen so zwei Zellsuspensionen bereit. Von den auf 1×10^5 Zellen/0,8 ml eingestellten Basaliom- und Spinaliomzellsuspensionen wurden für die Vorverdünnung jeweils 900 μ l einer Zelllinie mit einer bestimmten Transthyretinkonzentration (entweder 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l, 25 μ l oder 12,5 μ l) versetzt und diese Zellsuspension anschließend, entsprechend dem vorher für die einzelnen Zellen verwendeten Medium, auf 1 ml aufgestockt. Die mitgeführten Leerwerte wurden entsprechend den unterschiedlichen Zelllinien und Medien erstellt, so dass je 900 μ l der entsprechenden Zellen mit 100 μ l des

entsprechenden Mediums versetzt wurden. Im Anschluss daran wurden 100 µl jeder einzelnen Suspension in eine 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und als Triplikate angesetzt. Zusätzlich wurde pro Ansatz eine Hintergrundkontrolle, die später ebenfalls mit dem WST-1 Reagenz inkubiert wurde, sowie eine Kontrolle des benutzte Medium angelegt. Auch diese waren Triplikate mit je 100 µl.

Die Messungen erfolgten nach einer Inkubation mit Transthyretin von jeweils 24, 48 und 72 Stunden. Insgesamt wurden drei Mikrotiterplatten mit identischen Zellsuspensionen und Transthyretinkonzentrationen untersucht.

3.7.2 Messung der optischen Dichte

Nach 72 Stunden Kultivierung im Brutschrank (in einer 5% CO₂ enthaltenden, wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C) wurde den Suspensionen der ersten Mikrotiterplatte jeweils 10 µl des WST-1-Reagenz hinzugefügt, um so über die Umwandlung des WST-1 zu dem Farbstoff Formazan die Aktivität der zellulären mitochondrialen Dehydrogenase und damit die Proliferationsaktivität der Zellen zu messen.

Hieran anschließend wurde über einen Zeitraum von insgesamt 4 Stunden alle 30 Minuten die optische Dichte der Zellsuspensionen gemessen und die Platte dazwischen weiterhin im Brutschrank inkubiert. Die Absorption des Farbstoffs wurde im Photometer bei 450 nm/Referenzfilter 630 nm gemessen. Der oben beschriebene Ansatz und die anschließenden Messungen, wurden insgesamt drei Mal wiederholt.

3.8 Durchflusszytometrischer Nachweis der EGF-Rezeptordichte mittels FACScan

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe physikalische Parameter von Zellen (oder anderen Partikeln) mit hoher Geschwindigkeit bestimmt werden können. Es können verschiedene Parameter, wie etwa Zellgröße, Granularität und Fluoreszenz gleichzeitig gemessen werden. Durch einen Überdruck im Flüssigkeitssystem wird die Zellsuspension aus den Probenröhrchen in den Kreislauf der Trägerflüssigkeit des FACscan überführt. Durch den aufwärtsgerichteten Flüssigkeitsstrom wird gewährleistet, dass die suspendierten

Zellen einzeln und hintereinander an dem Analysepunkt in der Messküvette vorbei geleitet werden. Der Analysepunkt ist der Punkt, an dem das Licht des Laserstrahls den Flüssigkeitsstrom mit den darin enthaltenen Zellen im rechten Winkel kreuzt. Ähnlich dem Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie wird bei der Durchflusszytometrie die Sichtbarmachung der Lichtstreuung ausgenutzt. Zur Lichtstreuung tragen Zelleigenschaften wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und intrazelluläre granuläre Bestandteile bei. Das Licht wird entlang des einfallenden Lichtstrahles gestreut und als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet. FSC ist hauptsächlich ein Maß für die Zellgröße, kleine Zellen streuen weniger Licht als große. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt von der Zelldichte und der Granularität, nur zum geringen Teil von der Zellgröße, ab. Dieses Licht wird als Rechtwinkelstreulicht (SSC) bezeichnet.

Für die Messung der Fluoreszenz werden Fluorochrome mit einem Absorptionsmaximum um 488 nm verwendet. Die Intensität des Lichtsignals für jeden zu untersuchenden Parameter wird in ein elektrisches Signal umgewandelt. Je nach Höhe der Amplitude wird das Signal einem bestimmten Kanal zugeordnet. Viele Signale verschiedener Zellen können demselben Kanal zugeordnet werden. Das Intensitätsprofil eines gemessenen Parameters kann so z.B. in Form eines Histogramms, als einfachste Darstellungsform eindimensional abgebildet werden. Die horizontale Achse bezeichnet dabei den Bereich in Kanälen (Maß für die Intensität), die vertikale Achse die Anzahl von Zellen (mit einer definierten Intensität) je Kanal.

Die mittlere, mediane und modale Verteilung der Fluoreszenzintensität kann neben anderen statistischen Parametern bei jeder einzelnen Messung ermittelt werden. Bei den meisten Analysen werden die Medianwerte der Verteilung der antikörperspezifischen Fluoreszenzintensität von unbehandelten Kontrollen mit den Werten behandelter Proben verglichen.

3.8.1 Vorbereitung der Zellen und Inkubation mit Transthyretin

Die Basaliom- und Spinaliomzellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/0,8 ml eingestellt. Nun wurden pro Zelllinie je 800 µl der vorbereiteten Zellsuspension in jeweils drei Löcher einer 24-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich kamen in zwei der drei Löcher je 200 µl des verwendeten

Kulturmediums und das verbleibende wurde mit 200 µl Transthyretin (200µg/ml) aufgefüllt. Da nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden gemessen werden sollte, wurde der Ansatz für jede Zelllinie als Triplikat angefertigt und bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigte Atmosphäre) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde der erste Ansatz geerntet und, um eventuell durch das Trypsin angedaute Rezeptoren zu regenerieren, 1-2 Stunden lang auf einen Schüttler gestellt. Unter mehrmaligem Spülen mit einem Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden die Zellen in je eines von drei Röhrchen überführt und bei 1700 Umdrehungen pro Minute (rpm) 10 Minuten lang zentrifugiert.

3.8.2 Applikation der Antikörper

Für die folgende Inkubation mit dem Maus-anti-Human-EGFR-PE, IgG_{2b} und der Isotypkontrolle wurden je zwei Röhrchen pro Leerwert, bzw. pro jeweilige Transthyretinkonzentration verwendet, so dass letztendlich sechzehn Röhrchen zur Verfügung standen. Ein Röhrchen wurde zur Isotypenkontrolle mit je 10 µl R-PE-konjugierter Maus-IgG_{2b}-PE versetzt, das andere mit je 10 µl Maus-anti-Human-EGFR-PE. Zum Schluss wurden pro Röhrchen 100 µl Zellsuspension (Basaliomzellen und Spinaliomzellen) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 45 Minuten bei 4°C unter ständigem Schütteln im Kühlschrank.

Nach dieser Zeit wurde die Suspension erneut mit 2 ml Phosphatpuffer gewaschen und bei 1400 Umdrehungen pro Minute (rpm) 10 Minuten lang zentrifugiert, um die überständigen Antikörper zu entfernen. Nachdem das Zentrifugat erneut mit 0,5 ml Puffer (CellWash) resuspendiert worden war, konnten die Ansätze im FACScan gemessen werden.

3.8.3 Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse

Für die Untersuchung wurde ein FACS-Gerät von der Firma Becton & Dickinson, Heidelberg verwendet. Eine Kalibrierung des FACS erfolgte vor jeder Messung mit einer dem Gerät entsprechenden Kalibrierungsflüssigkeit. Damit wurde gewährleistet, dass die gemessenen Werte der Fluoreszenz, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden, untereinander vergleichbar waren.

Für jede Analyse wurden 100.000 Zellen gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit einer entsprechenden Anwender-Software (Cellquest Software). Hierfür definiert der Anwender in der FSC/SSC-Darstellung der gemessenen Probe sogenannte Gates. Dies sind vom Benutzer definierte Felder, die ausnahmslos eine bestimmte Zellpopulation, z.B. Granulozyten umschließen. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung werden vom Rechner auf eine unbekannte Bezugsgröße normiert dargestellt. Die Resultate liefern somit keine absoluten Werte, die einen direkten Vergleich mit anderen Fluoreszenzmeßmethoden erlauben.

Nachdem ein solches Gate definiert worden ist, wertet der Rechner nur die innerhalb dieses "Gates" liegende Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz aus. Somit kann die Expression eines bestimmten Oberflächenmoleküls (hier EGF-R) in einer definierten Zellpopulation bestimmt werden. Die Daten wurden im Anschluss in Form eines sog. Histogrammes, einer eindimensionalen Darstellung der Intensitätsverteilung, abgebildet.

Gebundener EGF-R Antikörper wurde anhand von Markern (M1 und M2) definiert als Fluoreszenzintensität bzw. EGF-R-PE abzüglich der Isotypen-Fluoreszenzintensität (IgG2-PE; BD Biosciences, San Diego, USA). Diese Marker M1 und M2 zur Bestimmung der EGF-R positiven Zellen wurden folglich anhand der Isotypkontrollen in den Histogrammen gesetzt. So wurde der unspezifischen Bindung Rechnung getragen. Die weitere Auswertung erfolgt über die Histogrammstatistik. Als Kriterium für das Maß der Fluoreszenzintensität wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzhistogramme verwendet.

3.9 Nachweis des Rezeptors Megalin mittels Cytospin

Der Cytospin ist eine Zentrifugationsmethode, mit Hilfe derer in einem Röhrchen befindliche Zellen unbeschädigt auf einen Objektträger gebracht werden können. Diese Methode erweist sich als besonders gut geeignet, wenn eine geringe Zellzahl vorliegt. Da Megalin einen Oberflächenrezeptor darstellt, war der Cytospin für den Nachweis des Rezeptors auf der Zelloberfläche Methode der Wahl.

3.9.1 Inkubation der Zellen und Cytospin

Für die Immunhistologie mittels Zytozentrifugation wurden die Basaliom- und Spinaliomzellen genau wie für den Nachweis des EGFR auf $1 \times 10^5 / 0,8$ ml Zellen eingestellt. Für die Inkubation in den 24-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten wurden in jeweils zwei Löcher 800 μ l Zellen und 200 μ l des verwendeten Kulturmediums als Leerwert pipettiert und ein weiteres Loch wurde mit 800 μ l Zellsuspension und 200 μ l Transthyretin gefüllt. Die Platten wurden sogleich zur Inkubation bei 37°C in den mit 5% CO₂ gesättigten Brutschrank gestellt.

Nach 72 Stunden wurde das überstehende Medium in den Löchern der entsprechenden Platte mit einer sterilen Pasteurpipette vollständig abgesaugt und 0,5 ml 5%iges Trypsin zum Ablösen der Zellen hinzugegeben. Nach dem Lösen der Zellen vom Untergrund und Stoppen der Reaktion durch Hinzufügen von 1,0 ml Kulturmedium wurde die Platte ca. 1 Stunde lang auf einem Schüttler belassen, um eventuell angedaute bzw. abgelöste Rezeptoren zu regenerieren.

Unmittelbar darauf wurden die Zellen aus den Röhrchen gelöst und in getrennte 15 ml Röhrchen überführt und anschließend 10 Minuten bei 1700 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Von diesem, in 1,0 ml PBS resuspendierten Zentrifugat wurden jeweils 250 μ l in die Auftragsstellen der Zentrifugationseinheit überführt. Nach Zentrifugation bei 1300 Umdrehungen pro Minute lagen folglich für jede Zelllinie, bzw. für jedes Kulturmedium entsprechend den Ansätzen zwei Objektträger vor, wobei pro Objektträger eine Auftragsstelle für die Negativkontrolle genutzt wurde und die zweite für den Primärantikörper.

Um die Zellen auf ihrer Unterlage zu fixieren, wurden sie luftgetrocknet, 10 Minuten bei -20°C in Aceton gelagert und abschließend erneut an der Luft getrocknet.

3.9.2 Färbung der Objektträger

Der für diesen Versuch verwendete Sekundärantikörper ist mit Cy-3 markiert, einem rötlich fluoreszierenden Indocarbocyanin. Dieses gehört zu der Familie der Fluorochrome und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 550 nm und ein Emissionsmaximum von 570 nm. Unmittelbar vor der Färbung wurden die Objektträger 2 x 5 Minuten in frischem PBS gewaschen.

Vor der eigentlichen Inkubation wurden die Objektträger 20 Minuten mit 10% Kaninchen-Normalserum in PBS benetzt. Dies erfolgte, wie auch alle folgenden Inkubationen, in einer feuchten Kammer. Im nächsten Schritt wurde das Kaninchen-Normalserum verworfen, der Primärantikörper Ziege-anti-Human-Megalin (C-19) in der Verdünnung 1:100 in PBS und 2% Normalserum aufpipettiert und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auftragsstellen für die Negativkontrolle wurden hierbei entsprechend mit PBS bedeckt. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden anschließend die Objektträger dreimal in PBS gewaschen, wobei der Puffer bei jedem Waschgang erneuert wurde.

Der 1:500 verdünnte Kaninchen-anti-Ziege-Cy-3-markierte Sekundärantikörper, wurde mit 2% Kaninchen-Normalserum verdünnt, aufpipettiert und 45 Minuten lang auf den Auftragsstellen belassen. Es erfolgten drei erneute Waschgänge mit PBS, die diesmal jedoch abgedunkelt stattfinden mussten, um den lichtempfindlichen Cy-3-markierten Antikörper zu schützen. Abschließend wurden die Objektträger abgetrocknet und die Deckgläser mit Elvanol fixiert.

3.9.3 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis

Der Nachweis von Megalin erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot 2) der Firma Zeiss. Für den Cy-3-markierten Sekundärantikörper wurde Fluoreszenzlicht der entsprechenden Wellenlänge verwendet. Alle Aufnahmen erfolgten im Phasenkontrastmodus des Mikroskops. Der Phasenkontrast ist für dünne ungefärbte Objekte ideal, die über dem Zellkern ca. 5 bis 10 μm , an der Peripherie weniger als 1 μm "hoch" sind und im sichtbaren Teil des Spektrums kaum Lichtabsorption zeigen. Das Auge kann sie im Hell- und Dunkelfeld kaum sehen. Es gibt aber sehr kleine Unterschiede in den Brechungsindizes zwischen den Zellen und der umgebenden wässrigen Lösung und innerhalb der Zellen zwischen Zytoplasma und Zellkern. Diese winzigen Unterschiede macht der Phasenkontrast mit optischen Mitteln sichtbar.

3.10 Intrazellulärer Nachweis der Zytokeratine 1 und 10

Da die Zytokeratine 1 und 10 intrazelluläre Marker darstellen, war bei ihrem Nachweis der Gefrierschnitt die Methode der Wahl. Die Zellen wurden bei -24°C

geschnitten. Man erhielt so die Möglichkeit, intrazelluläre Bestandteile der Zelle sichtbar zu machen.

3.10.1 Ansatz und Inkubation der Zellen

Die zwei verschiedenen Zelllinien wurden geerntet und auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/0,9 ml eingestellt. Für die eigentliche Inkubation wurden für jede Zelllinie in je zwei Löcher einer 24-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte 100 μ l Medium, entsprechend für den Leerwert, bzw. 200 μ g/ml Transthyretin pipettiert. Anschließend konnten die 100 μ l Medium mit jeweils 900 μ l der entsprechenden Basaliomzell- und Spinaliomzellsuspension ergänzt werden.

Anschließend wurden diese zwei Ansätze 72 Stunden lang im Brutschrank bei 37°C und einer 5% CO₂- und wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert, um sie unmittelbar danach zu ernten. Hierbei wurden auf jedes Loch 1,0 ml 5%iges Trypsin gegeben, um die Reaktion nach 10 Minuten mit 1,0 ml des üblichen Gebrauchsmediums zu stoppen.

3.10.2 Vorbereitung der Zellen für das Anfertigen der Gefrierschnitte

Die Zellsuspensionen wurden nun in 15 ml-Röhrchen überführt und bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) 10 Minuten zentrifugiert. Diese so entstandenen Zentrifugate mussten im Anschluss in 1,0 ml PBS resuspendiert und in jeweils ein Kryoröhrchen pipettiert werden, um sie nochmals 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zu zentrifugieren. Nach Absaugen des Überstands und Auffüllen der konischen Spitzen der Kryoröhrchen mit Einbettmedium wurden diese bei -80°C eingefroren, um die Zellen für das anschließende Schneiden vorzubereiten. Die Gefrierschnitte wurden bei -24°C in einer Dicke von 8 μ m angefertigt, 10 Minuten in Aceton fixiert und abschließend an der Luft getrocknet.

3.10.3 Färbung der Objektträger

Die Arbeitsschritte beim Färben der Objektträger erfolgten genau wie bei den Objektträgern des Cytospin (Abschnitt 3.9.1), lediglich mit dem Unterschied, dass hier andere Antikörper, bzw. Normalseren und veränderte Konzentrationen benutzt wurden.

Für den Nachweis des Zytokeratin 1 erfolgte die Präinkubation in 10%igem Kaninchennormalserum. Der Primärantikörper, Ziege-anti-Human-Antikörper, wurde in einer Konzentration von 1:500 mit einem Zusatz von 2%igem Kaninchennormalserum verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy-3-markierter Kaninchen-anti-Ziegen-Antikörper eingesetzt.

Für den Nachweis des Zytokeratin 10 wurde als Normalserum ein 10%iges Ziegennormalserum benutzt. Als Primärantikörper kam hier ein Maus-anti-Human-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 (mit zusätzlich 2% Ziegennormalserum) zum Einsatz und der Cy-3-markierte Sekundärantikörper war ein Ziege-anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 (ebenfalls mit 2% Ziegennormalserum).

3.10.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis

Der optische Nachweis der Zytokeratine 1 und 10 erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot 2) der Firma Zeiss. Für den Cy-3-markierten Sekundärantikörper wurde Fluoreszenzlicht der entsprechenden Wellenlänge verwendet. Alle Aufnahmen wurden im Phasenkontrastmodus des Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Diese Methode eignet sich wie schon unter 3.9.3 erwähnt besonders bei dünnen ungefärbten Präparaten die im sichtbaren Teil des Spektrums kaum Lichtabsorption zeigen und das (menschliche) Auge sie im Hell- und Dunkelfeld kaum sehen kann. Mit Hilfe des Phasenkontrast können jedoch die winzigen Unterschiede in den Brechungsindizes zwischen den Zellen und der umgebenden wässrigen Lösung und innerhalb der Zellen zwischen Zytoplasma und Zellkern sichtbar gemacht werden.

Der Phasenkontrast ist für dünne ungefärbte Objekte ideal, die über dem Zellkern ca. 5 bis 10 μm , an der Peripherie weniger als 1 μm "hoch" sind.

3.11 Statistik

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden über einen Mittelwertvergleich ermittelt. Dieses Verfahren wird von der statistischen Literatur gefordert, wenn nur wenige Datensätze zur Verfügung stehen (Backhaus 2006). Für die statistische Analyse der Daten wurde der t-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde 5% angesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Transthyretin auf die Zahl an vitalen Zellen von A-431-Zellen und CRL-7762-Zellen

Über die kolorimetrische Bestimmung der optischen Dichte kann Rückschluss auf die Zahl der vitalen Zellen gezogen werden. Die Bestimmung der optischen Dichte mittels WST-1 Reagenz basiert auf der Spaltung eines Tetrazoliumsalzes, welches nach vorheriger 72-stündiger Inkubation der Zellen mit Transthyretin zum Kulturmedium hinzugefügt wurde. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden, da hiernach die größte Substratumsatzmenge zu erwarten war und gemessen wurde. Es erfolgte folglich nach 240 Minuten eine Einzelpunktmessung.

Abbildung 4-1 zeigt bei den mit TTR inkubierten Zellen eine signifikante Abnahme der optischen Dichte. Dies ist sowohl bei den CRL-7762-Zellen, als auch bei den A-431-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Leerwert) der Fall. Unter Transthyretineinfluss kann folglich von einer signifikanten Abnahme der Zahl an vitalen Zellen gesprochen werden. Die Abnahme ist bei allen vier verschiedenen Transthyretin-Konzentrationen signifikant. Die Inkubation mit 200 µg/ml und 100 µg/ml Transthyretin bewirkt im Vergleich zu der Kontrollgruppe die stärkste Abnahme der Zahl an vitaler Zellen (Abbildung 4-1) Anders als bei den CRL-7762-Zellen ist bei den A-431-Zellen nach Inkubation mit niedrigen Transthyretin-Konzentration keine signifikante Abnahme der Zahl an vitalen Zellen zu beobachten: Dies gilt sowohl bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml als auch von 25 µg/ml.

Das WST-1 Assay gibt lediglich Aufschluss über die Ab- und Zunahme der Zellzahl, Rückschlüsse bezüglich möglicher Ursachen können jedoch nicht gezogen werden. Für die Abnahme der Zahl vitaler Zellen kommen ursächlich mehrere denkbare Mechanismen in Betracht. Zum einen kann es sich um eine Hemmung der Zellproliferation durch Transthyretin handeln, ebenso kommt eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen unter Inkubation mit Transthyretin in Betracht. Denkbar ist auch eine veränderte Adhärenz der Zellen, da in diesem Test lediglich die verbleibenden adhärenen Zellen untersucht wurden und die nicht adhärenen Zellen in den voraus gegangenen Waschschritten entfernt wurden.

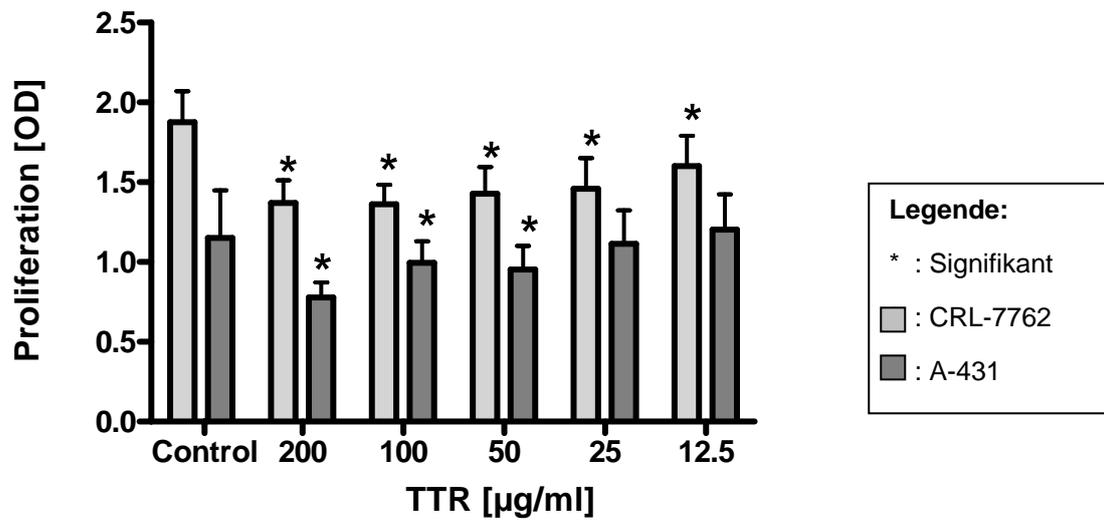


Abbildung 4-1: Optische Dichte als Maß der vitalen Zellzahl der A-431-Zellen und der CRL-7762-Zellen nach Inkubation mit Transthyretin in verschiedenen Konzentrationen.

4.2 Wirkung von Transthyretin auf die Differenzierung von A-431-Zellen und CRL-7762-Zellen

Keratine, insbesondere Keratin 1 und Keratin 10 gelten als spezifische Marker der terminalen Differenzierung von Keratinozyten. Aus diesem Grund sollte die Wirkung von Transthyretin auf den Differenzierungsgrad der Zellen anhand der Keratinexpression dargestellt werden.

Aus Abbildung 4-2 wird deutlich, dass sowohl die CRL-7762-Zellen (c) als auch die A-431-Zellen (e) nur wenig Fluoreszenz an ihrer Oberfläche erkennen lassen. Da die Fluoreszenz die Keratinexpression der Zellen widerspiegelt, deutet dieser Befund auf eine geringe Keratin 1-Expression beider Zelllinien hin.

Anders verhält sich die Situation nach 72-stündiger Inkubation der CRL-7762-Zellen (d) und der A-431-Zellen (f) mit 200 µg/ml Transthyretin. Bei beiden Zelllinien ist das Keratin 1 deutlich nachweisbar. Im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen, zeigt sich nach Inkubation mit Transthyretin eine sehr viel stärkere Fluoreszenz. Dies spricht für eine Induktion der Keratin 1-Expression.

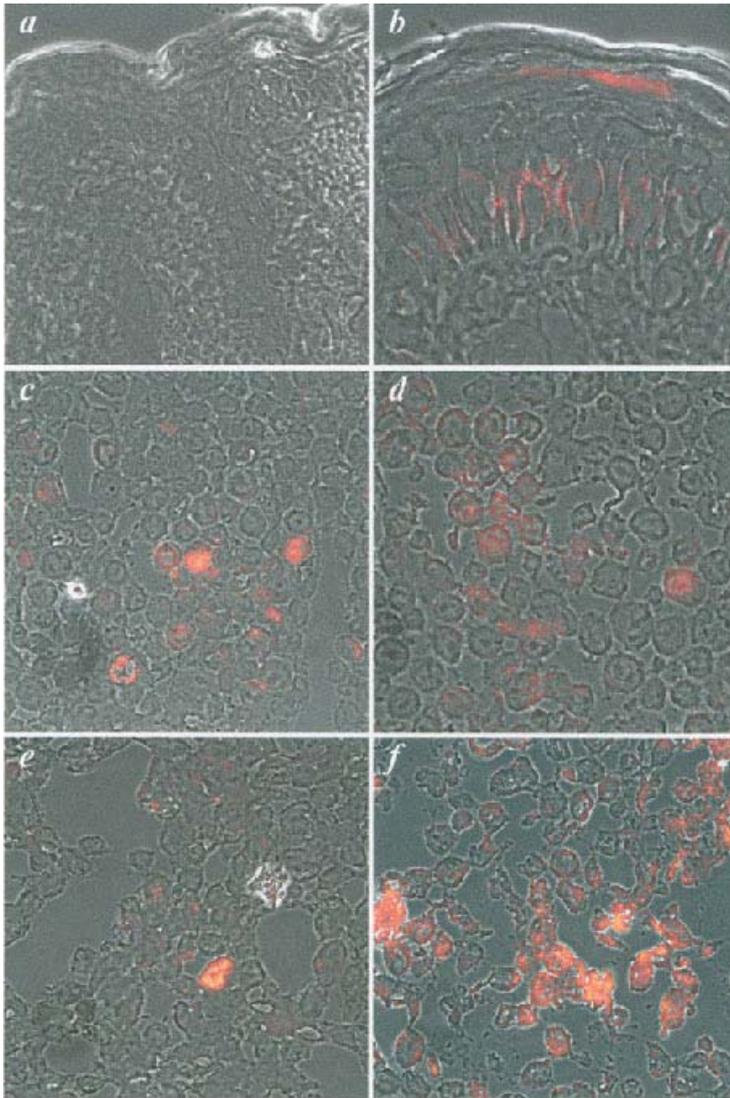


Abbildung 4-2: Expression von Keratin 1 in A-431 und CRL-7762-Zellen: Negativkontrolle (a) und Positivkontrolle (b) in der Epidermis, Expression von Keratin 1 in CRL-7762-Zellen ohne (c) und mit vorheriger Transthyretin-Inkubation (d), Expression des Keratin 1 in A-431-Zellen ohne (e) und mit vorheriger Inkubation der Zellen mit Transthyretin (f). Die Aufnahmen erfolgten im Phasenkontrastmodus des Fluoreszenzmikroskops.

Die Abbildung 4-3 stellt die Keratin 10-Expression mittels Immunfluoreszenz dar. Abbildung 4-3 (a) bildet die Negativkontrolle, Abbildung 4-3 (b) weist die Keratin 10-Expression in der humanen Epidermis nach. Werden beide Zelllinien im Hinblick auf die Keratin 10-Expression betrachtet, so fällt ähnlich wie bei der Keratin 1-Expression ein schwaches Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 4-3 (c) und (e)).

Anders verhält es sich nach 72-stündiger Inkubation der A-431-Zellen und der CRL-7762-Zellen mit 200 µg/ml Transthyretin. Im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen ist, wie in der Abbildung 4-3 (d) und (f) ersichtlich, ein stärkeres Immunfluoreszenzsignal nachweisbar. Dies deutet auf eine stärkere Differenzierung beider Zelllinien durch die Inkubation mit Transthyretin hin.

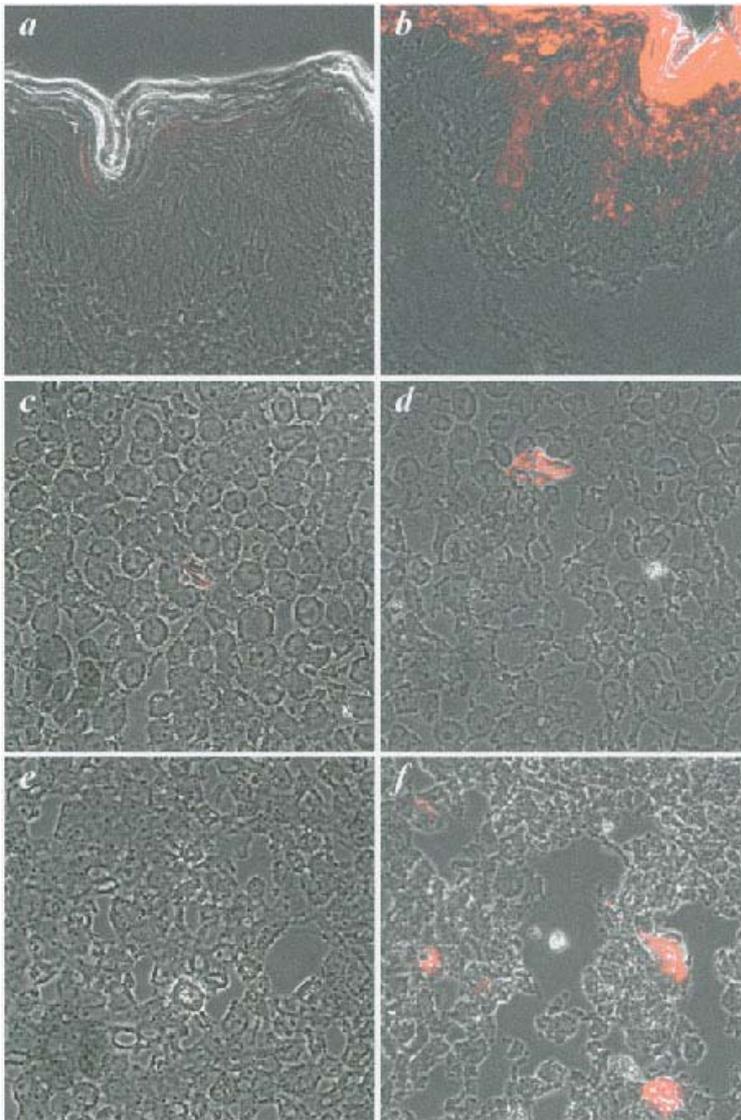


Abbildung 4-3: Expression von Keratin 10 in A-431- und CRL-7762-Zellen ohne Inkubation und nach vorausgegangener Inkubation mit Transthyretin: (a) Negativkontrolle und Positivkontrolle (b) in der Epidermis, Expression von Keratin 10 in CRL-7762-Zellen ohne (c) und mit vorheriger Transthyretin-Inkubation (d), Expression des Keratin 10 in A-431-Zellen ohne (e) und mit vorheriger Inkubation der A-431-Zellen mit Transthyretin (f). Alle Aufnahmen erfolgten im Phasenkontrastmodus des Mikroskops.

4.3 Wirkung von Transthyretin auf die EGF-Rezeptorexpression von A-431- Zellen und CRL-7762- Zellen

Da sowohl Basalzellkarzinome als auch Plattenepithelkarzinome EGF-Rezeptoren exprimieren, sollte die Wirkung von Transthyretin auf die EGF-Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie untersucht werden.

Die Daten wurden in Form eines sog. Histogrammes, einer eindimensionalen Darstellung der Intensitätsverteilung, abgebildet. Hierbei stellt die x-Achse die Intensität der gemessenen Signale dar. Die Zahl der EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche korreliert folglich mit der Fluoreszenzintensität. Eine Änderung der Rezeptoranzahl bewirkt demnach einen Shift auf der X-Achse. Auf der y-Achse des Histogramms ist die Zahl der Zellen aufgetragen, die mit einer bestimmten Intensität analysiert wurden. Die Marker M1 und M2 zur Bestimmung der EGFR positiven Zellen wurden anhand der Isotypkontrollen in den Histogrammen gesetzt. So wurde der unspezifischen Bindung Rechnung getragen und diese von der Analyse ausgeschlossen. Der Anteil der EGFR exprimierenden Zellen entspricht in diesem Fall dem Anteil der im Histogramm durch den Marker M2 umfassten Zellen. Die weitere Auswertung erfolgt über die Histogrammstatistik. Als Kriterium für das Maß der Fluoreszenzintensität wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzhistogramme verwendet.

In diesem Versuch zeigt sich nach Inkubation der CRL-7762-Zellen mit Transthyretin eine geringe Intensitätszunahme der gemessenen Fluoreszenzsignale, welche im Histogramm durch einen Shift auf der x-Achse dargestellt wird. Im Vergleich zeigt sich eine Zunahme des Mittelwertes von 930,25 (Kontrolle) auf 1351,67 nach Inkubation der Zellen mit Transthyretin.

Die A-431-Zellen weisen ebenfalls nach Inkubation mit Transthyretin eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Leerwert auf. Diese Zunahme des Mittelwertes von 1454,56 (Kontrolle) auf 1897,07 nach Transthyretininkubation spiegelt sich auch hier durch einen Shift auf der x-Achse im Histogramm. Diese Zunahme der Fluoreszenzintensität entspricht einer Zunahme des EGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche sowohl der CRL-7762-Zellen als auch der A-431-Zellen. Eine Aussage bezüglich der Signifikanz der Ergebnisse kann hier aufgrund der zu geringen Datenzahl nicht getätigt werden.

Darüberhinaus stellt sich eine Abnahme der Counts dar. Diese spiegeln die Zahl der Zellen mit einer definierten Intensität wider. Die Abnahme liegt in der Verwendung der oben beschriebenen Gates begründet.

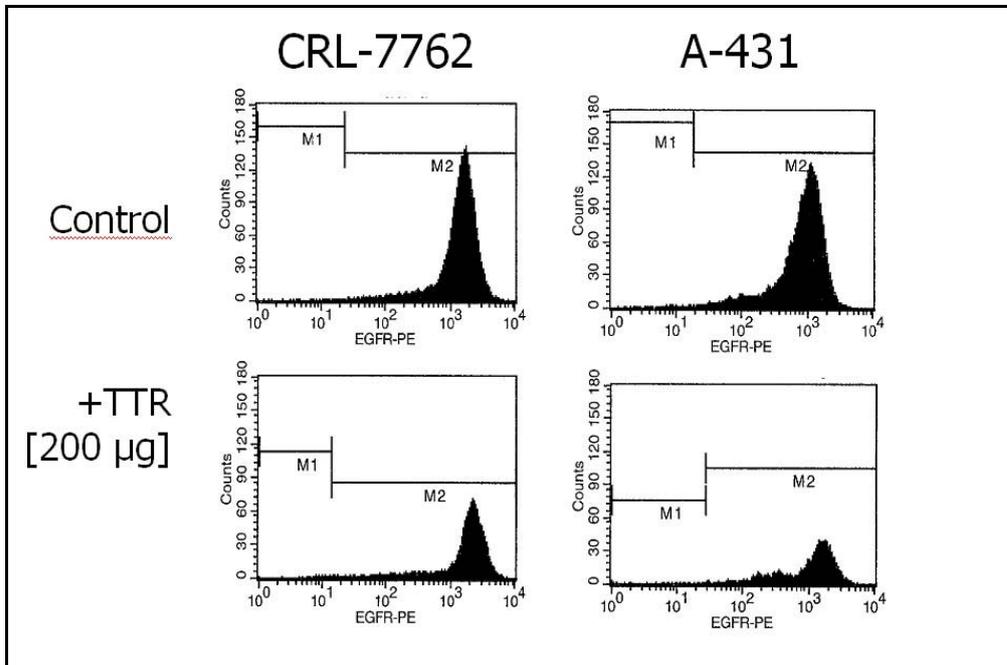


Abbildung 4-4: EGF-Rezeptorexpression der CRL-7762- und A-431-Zellen ohne Transthyretin-Inkubation (Kontrolle), sowie nach Inkubation der Zelllinien mit Transthyretin.

4.4 Transthyretinvermittelte Expression des Rezeptors Megalin

Die tubuläre Rückresorption von Transthyretin in der Niere erfolgt mittels eines Rezeptors aus der LDL-Familie: Megalin. Daher stellte sich im Kontext dieser Arbeit die Frage, ob Megalin ebenfalls von Keratinozyten, bzw. Basaliom- und Spinaliomzellen exprimiert wird und somit die Transthyretinaufnahme dieser Zellen vermittelt.

Der Versuch hierzu sollte zeigen, ob der Rezeptor Megalin von den CRL-7762-Zellen und den A-431-Zellen exprimiert wird oder nicht. Zum einen sollte also die Existenz des Rezeptors auf der Zelloberfläche der Basaliomzellen und Spinaliomzellen nachgewiesen werden. Zum anderen sollte untersucht werden, in wie weit die Inkubation der Zellen mit Transthyretin die Expression des Megalinrezeptors auf der Oberfläche beeinflusst.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte im proximalen Nierentubulus das Vorhandensein des Megalinrezeptors von Sousa et al nachgewiesen werden (Sousa et al. 2000). Folglich dienten in diesem Versuch histologische Schnitte von Nierentubuli als Nachweis des Megalinrezeptors (Abbildung 4-5 (a) und (b)). Für die Negativkontrolle wurde ausschließlich der Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Ziege-Cy3-markiert) verwendet (a). Hier lässt sich keine Fluoreszenz darstellen, wohingegen die Positivkontrolle eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der Endothelzellen der Niere nachweist (b). Diese Fluoreszenz belegt die Existenz des Rezeptors Megalin. In der Negativkontrolle der CRL-7762-Zellen (c) und der A-431-Zellen (d), in der nur der Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Ziege-Cy3-markiert) verwandt wird, lässt sich keine Fluoreszenz nachweisen.

Die Abbildung 4-5 stellt die Megalinrezeptorexpression der CRL-7762 Zellen, ohne (e) und mit (f) vorheriger Transthyretin-Inkubation dar. Deutlich wird hierbei zum einen, dass der Rezeptor Megalin von den Zellen dieser Zelllinie exprimiert wird und zum anderen, dass die Expression des Rezeptors unter Transthyretineinfluss gesteigert ist.

Ähnlich verhält sich die Situation mit der Spinaliomzelllinie. Die Megalinexpression der A-431-Zellen ist in Abbildung 4-5 (g) klar ersichtlich, wenngleich die Fluoreszenz eine geringere Expression, verglichen mit den CRL-7762 Zellen, vermuten lässt. Die Megalinexpression nach Inkubation mit 200 µg/ml Transthyretin ist bei dieser Zelllinie ebenfalls vermehrt (h) (Abbildung 4-5).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigt also, dass beide Zelllinien Megalin auf der Oberfläche exprimieren. Zusätzlich kann nachgewiesen werden, dass die vorherige Inkubation der Zellen mit 200 µg/ml Transthyretin eine Steigerung der Expression dieses Rezeptors bewirkt.

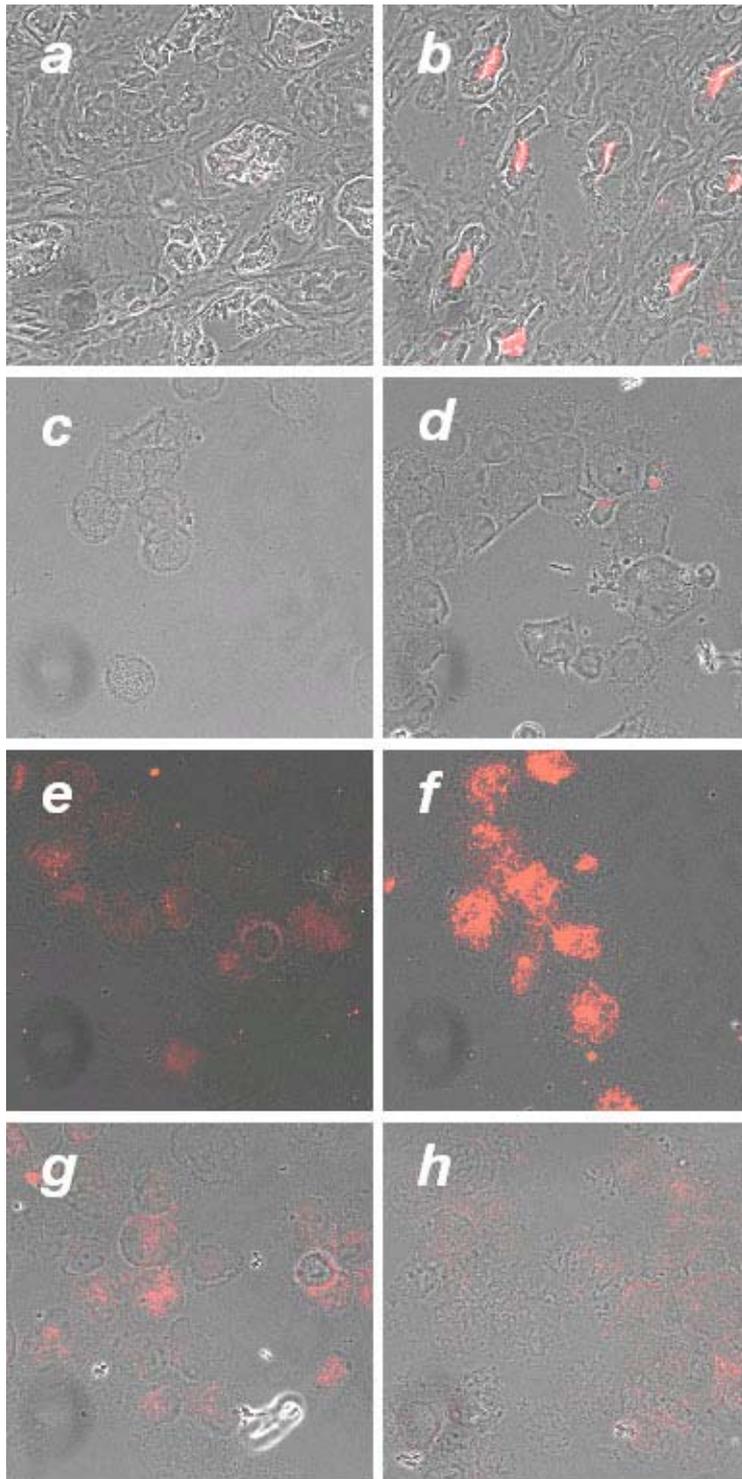


Abbildung 4-5: Nachweis des Rezeptors Megalin auf A-431- und CRL-7762-Zellen: Negativkontrolle (a), Postivkontrolle mit Megalinnachweis in Schnitten von Nierentubuli (b), Negativkontrolle der CRL-7762-Zellen (c) und der A-431-Zellen (d), Megalinexpression der CRL-7762-Zellen ohne Inkubation (e) und nach Transthyretininkubation (f), Megalinexpression der A-431-Zellen ohne Inkubation (g) und nach Transthyretininkubation (h). Die Aufnahmen erfolgten im Phasenkontrastmodus.

5 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit sollen im folgenden Abschnitt im Kontext der bisherigen Forschung diskutiert werden. Es stellen sich vor diesem Hintergrund folgende Fragen:

1. Welche Ursachen kommen für die Abnahme der Zellzahl unter dem Einfluss von Transthyretin in Betracht und welche Rolle spielt Retinol in diesem Zusammenhang?
2. Wie kann die EGF-Rezeptor-Expression der Zellen unter Transthyretininkubation interpretiert werden und worauf deutet die Zunahme der Keratin 1- und 10-Expression nach Inkubation der Tumorzellen mit Transthyretin hin?
3. Über welche möglichen Mechanismen könnte die Wirkung von Transthyretin erklärt werden?
4. Was bedeutet der Nachweis von Megalin auf den Tumorzellen und wie kann die gesteigerte Megalinexpression nach Inkubation mit Transthyretin interpretieren werden?

5.1 Wirkung von Transthyretin auf die Zellzahl

Im Bezug auf die menschliche Haut wurde Transthyretin bisher vor allem im Kontext des Vitamin A-Transports in die Haut untersucht. Als Transportprotein stellt es der Haut im Komplex mit dem Retinol-bindenden Protein (RBP) Retinol zur Verfügung. Durch Retinol unterliegen Keratinozyten auf vielfache Weise morphologischen und biochemischen Veränderungen. Retinol ist ein kritischer Faktor im Differenzierungsprozess von Keratinozyten. Retinoide sind für das regelrechte Wachstum und die Reifung von verschiedenen Epithelien einschließlich der Epidermis essentiell und können die Expression von Wachstumsfaktoren, Protoonkogenen und Ceramiden beeinflussen. Sind die Retinolkonzentrationen in basalen epidermalen Strukturen reduziert, reifen vermindert transiente Keratinozyten heran. Die Zugabe von Retinol zu kultivierten Keratinozyten steigert zum einen die Expression des EGF-Rezeptors (Jetten 1981) und reguliert zum anderen die Expression verschiedener Keratine (Fuchs und Green 1981). Außerdem hemmt Retinol die Proliferation der Keratinozyten

(Chen et al. 2000) und hemmt ihre kalziumabhängige terminale Differenzierung (Yuspa et al. 1983). Für die regelrechte Differenzierung der Keratinozyten ist folglich eine Abnahme der Retinolkonzentration erforderlich (Fuchs und Green 1981). Der proliferative Effekt hingegen ist abhängig vom aktuellen proliferativen Zustand der Zelle (Varani et al. 1998): Schnell proliferierende Zellen werden in ihrem Wachstum gehemmt, auf Zellen, die sich im Wachstumsstillstand befinden, wirken Retinoide hingegen wachstumsfördernd.

Eine wichtige Rolle beim Transport der Retinoide in die Epidermis scheint Transthyretin einzunehmen: Kieslich et al konnten das Plasmaprotein Transthyretin in der Epidermis nachweisen sowie zeigen, dass das Protein in der Epidermis selbst nicht synthetisiert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Transthyretin als Transportprotein für die intakte Funktion der Epidermis wichtig zu sein scheint (Kieslich 2005). Zusätzlich konnte in der zitierten Studie gezeigt werden, dass die epidermale Transthyretinkonzentration im Rahmen des Alterungsprozesses abnimmt. Eine mögliche Schlussfolgerung hieraus ist, dass der alternden Haut als Folge der verminderten Transthyretinkonzentration eine geringere Menge an Retinoiden zur Verfügung steht. Die geringere Retinoidmenge könnte also in direktem Zusammenhang mit dem verminderten Transthyretingehalt stehen. Dieser Umstand könnte somit eine Ursache der morphologischen Veränderungen der alternden Haut sein.

Messungen der Plasmatransthyretin-Konzentration in verschiedenen Lebensabschnitten zeigen niedrige Plasmakonzentrationen bei der Geburt mit ansteigenden Werten im Laufe des Lebens. Mit zunehmendem Alter sinken jedoch die Plasmakonzentrationen dieses Proteins wieder auf niedrige Werte ab (Ingenbleek und Young 2002). Die verminderte Transthyretinkonzentration in der Haut des alten Menschen könnte somit die Folge der im Laufe des Lebens abnehmenden Plasmakonzentrationen des Proteins sein. Darüberhinaus findet sich eine enge Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad von Malabsorptionssyndromen, dem Immunstatus, akuten und chronischen Entzündungen und der Transthyretinkonzentration im Plasma. All diese Zustände verursachen eine Transthyretinabnahme im Plasma. Da die Häufigkeit dieser Zustände mit höherem Alter zunimmt, könnte dies eine weitere Ursache für den Konzentrationsrückgang des Proteins in alternder Haut darstellen (Ingenbleek und Young 2002).

Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Vitamin A via Retinol-bindendes-Protein in Keratinozyten wird von Transthyretin gehemmt (Huang und Vieira 2006). Dies geschieht möglicherweise durch die Blockade einer Bindungsstelle des Retinol-transportierenden RBP-Moleküls oder durch Konformationsänderung des Moleküls. In diese Richtung weisen auch Untersuchungen an Makrophagen, bei denen ebenfalls die RBP-vermittelte Retinolaufnahme durch Zusatz von Transthyretin vermindert werden konnte (Hagen et al. 1999). Über diesen Mechanismus ist eine mögliche Einflussnahme von Transthyretin auf die gegenüber Retinoiden hochsensible Epidermis denkbar. Diese Deutung unterstützt folglich die Annahme, dass Transthyretin eine regulatorische Funktion in der Epidermis besitzt.

Pfahl konnte nachweisen, dass UV-Strahlung zu einem Mangel an Vitamin A und zu einer abnehmenden Anzahl an Retinoidrezeptoren in Keratinozyten führt. Diese Rezeptoren hemmen die Wirkung des AP-1, eines Proteinkomplexes, der aus Mitgliedern der c-Jun- und c-Fos-Familie zusammengesetzt ist (Pfahl 1993). C-Jun und c-Fos sind in der Lage, sowohl die Zellproliferation als auch die Zelldifferenzierung in der Haut von Mäusen zu induzieren (Angel et al. 2001) und scheinen somit eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zu spielen. Über diese Veränderungen der Signaltransduktion ist die Entstehung neuer Tumore, insbesondere in Keratinozyten denkbar (Andersson et al. 2003). Über den genannten Mechanismus könnte somit die im Alter abnehmende Transthyretinkonzentration eine zunehmende Bildung von Hauttumoren im höheren Lebensalter fördern. Denn eine geringere Transthyretin-Konzentration geht mit einer verminderten Retinolkonzentration in der Haut einher, was die Entstehung von Hauttumoren begünstigen könnte.

In dem Versuch 4.1 konnte unter Transthyretineinfluss eine signifikante Abnahme der Zahl an vitalen Zellen in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Abnahme ist bei allen vier in dieser Arbeit verwendeten Transthyretin-Konzentrationen signifikant. Innerhalb der dargestellten Versuche wurde fetales Kalbserum (FCS) als Kulturmedium für die Zellen verwendet, welches sowohl RBP als auch Vitamin A enthält. Denkbar ist somit, dass einige der beschriebenen Effekte auch durch die Anwesenheit von Vitamin A zu erklären sind. In diesem Zusammenhang konnte Le (2000) zeigen, dass Retinoide das Wachstum

verschiedener Tumore des Menschen hemmen, darunter auch das Wachstum von Mammakarzinomzellen, Ovarialkarzinomzellen und Plattenepithelkarzinomen (Le et al. 2000). Folglich besteht die Möglichkeit, dass die im Kapitel 3.7 beschriebene Abnahme der Zahl an vitalen Zellen auf eine vermehrte Aufnahme des im FCS enthaltenen Retinols zurückzuführen ist. Da jedoch die Zellzahl nach Inkubation mit Transthyretin im Vergleich zu dem Leerwert unter gleichen Inkubationsbedingungen (gleiche Menge an FCS und damit Retinol) signifikant abnahm, kann davon ausgegangen werden, dass Retinol unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht für die Abnahme der Zellzahl verantwortlich sein kann. Die Abnahme der Zellzahl muss somit andere Ursachen haben.

Die oben beschriebenen Ergebnisse des Versuches 4.1 lassen lediglich eine Aussage bezüglich der Ab- bzw. Zunahme an vitalen Zellen zu. Rückschlüsse über mögliche Ursachen können nicht gezogen werden. Für die hier nachgewiesene Abnahme der Zellzahl kommen ursächlich mehrere denkbare Mechanismen in Betracht. Zum einen kann es sich um eine Hemmung der Zellproliferation durch Transthyretin handeln, zum anderen kommt eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen unter Inkubation mit Transthyretin in Betracht. Als weitere Ursache ist eine Verringerung der Zellteilungsrate oder eine veränderte Adhärenz der Zellen denkbar. Um den genauen Wirkmechanismus zu eruieren bedarf es jedoch weiterführender Untersuchungen.

5.2 Transthyretin und EGF-Rezeptoren

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) nimmt eine zentrale Rolle in der epidermalen Entwicklung und der Regulierung des Zellwachstums ein.

Dabei hat die EGF-Rezeptor-Signaltransduktion zwei entscheidende Funktionen während der Entwicklung der Epidermis inne: Zum einen aktiviert sie eine antiapoptotische Signalkaskade und verhindert somit die Apoptose der Zelle. Zum anderen inhibiert sie die Differenzierung der Keratinozyten. Diese bleiben so an der Basalmembran im basalen Kompartiment verankert (Sibilia et al. 2000). Die höchste Dichte an EGF-Rezeptoren findet sich in der basalen Schicht der Epidermis sowie in der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels. Mit zunehmender Migration der Zellen in die suprabasalen Epidermisschichten und

damit einhergehender terminaler Differenzierung nimmt die Zahl der EGF-Rezeptoren ab (Sibilia et al. 2000), (King et al. 1990). Veränderungen und Anomalien der EGFR Funktionen sind assoziiert mit den Charakteristika der Tumorentwicklung: autonome Zellproliferation, Invasion, Angiogenese und metastatisches Potential (Herbst und Shin 2002, Mendelsohn 2001, Wells 1999)

Hohe EGF-Rezeptor-Expressionsspiegel sind ein häufiges Charakteristikum von Malignomen. EGF-Rezeptoren werden in vielen Zelltypen exprimiert, inklusive in epithelialen und mesenchymalen Zellen (Wells 1999) mit einer Anzahl zwischen 40.000 und 100.000 Rezeptoren pro Zelle (Carpenter und Cohen 1979). Die Zahl an EGF-Rezeptoren in malignen Zellen kann jedoch deutlich höher liegen. (Ennis et al. 1991). Die Expression von EGF-Rezeptoren konnte ebenfalls in Basalzellkarzinomen und in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Hagedorn und Bauknecht 1990),(Hagedorn et al. 1990), (Mendelsohn und Baselga 2006). In Plattenepithelkarzinomen konnte eine hohe EGFR-Expression in mindestens 80% der Tumoren gefunden werden und korreliert dann mit einer verminderten Überlebensrate der Patienten (Ford und Grandis 2003). Gesteigerte oder veränderte EGFR-Expression kann auf eine Vielzahl von Mechanismen zurückzuführen sein: gesteigerte, bzw. abweichende Ligandenproduktion, gesteigerte EGFR Gentranskription, Genamplifikation, Deletion und Mutation (Ennis et al. 1991).

Eine der bestcharakterisierte Gruppe von Proteinen, welche die Apoptose regulieren, ist die Bcl-2 Familie, welche zwei bestimmte Gruppen einschließt: Zum einen pro-apoptotische und anti-apoptotische Mitglieder. EGF-Rezeptoren können die Balance zwischen diesen beiden Gruppen verändern, in dem sie die anti-apoptotischen Moleküle der Bcl-2 Familie, wie Bcl-2 oder Bcl-x hochregulieren (Henson et al. 2003). Diese Aussage wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei Abwesenheit des EGF-Rezeptors in Keratinozyten eine gesteigerte Apoptose nachgewiesen werden konnte (Sibilia et al. 2000).

Da sowohl Basalzellkarzinome als auch Plattenepithelkarzinome EGF-Rezeptoren exprimieren, sollte im Versuch 4.4 untersucht werden, ob auch Transthyretin als Ligand fungiert und somit auf die EGF-Rezeptorexpression einen Einfluss ausübt. Diese Frage stellt sich vor dem Hintergrund der zuvor beobachteten signifikanten Abnahme der Zellzahl in beiden Zelllinien nach Transthyretininkubation. Nach

Inkubation der Zellen mit Transthyretin ließ sich zwar in der Tendenz eine Zunahme, jedoch keine signifikante Änderung der EGF-Rezeptorexpression darstellen. Der Wirkmechanismus, über den die Abnahme der Zellzahl durch Transthyretin zu erklären ist, konnte somit in diesem Experiment nicht geklärt werden.

Hauttumoren nutzen komplexe Mechanismen, um dem Zelltod und somit ihre Destruktion durch das Immunsystem zu umgehen. Es existieren hierfür zwei unterschiedliche Wege, welche möglicherweise ein Erklärungsansatz für die Einflussnahme von Transthyretin bieten: Zum einen verteidigen sich Hauttumorzellen aktiv gegen das Immunsystem über die Expression bestimmter Liganden, zu denen unter anderem auch FasL und TRAIL gehören. Zum anderen haben sich Hauttumorzellen Mechanismen angeeignet, um der extrinsischen und intrinsischen Apoptose zu entkommen. Der extrinsische Weg wird durch bestimmte Liganden und deren Rezeptoren vermittelt, welche zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und TNF-Rezeptoren gehören. Zwei Liganden, FasL und TRAIL sowie ihre Rezeptoren sind hierbei von besonderer Bedeutung (Bhardwaj und Aggarwal 2003). Über einen komplexen Prozess kann so die Apoptose angestoßen werden. Die intrinsische Apoptose hingegen ist Mitochondrien-abhängig. Sie erfolgt in Abhängigkeit von Zellstress jeglicher Art, so z.B. von oxidativen Stress, DNA-Schädigung oder anderen Schäden an der Zelle. All diese Faktoren führen zu Veränderungen an der Mitochondrienmembran und über weitere Schritte letzten Endes zur Apoptose (Erb et al. 2008). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Diese funktionieren teilweise gegensätzlich: So wird durch bax und bak die Apoptose induziert, wohingegen bcl-2 und bcl-x diese inhibieren (Kirkin et al. 2004). Tumorzellen nutzen komplexe Mechanismen, um diese beiden Wege zu umgehen: So haben sie z.B. defekte Apoptose-Mechanismen oder blockieren diese aktiv, so dass sich die Tumorzellen unkontrolliert vermehren können. Basalzellkarzinome steigern auf diesem Wege ihre Widerstandsfähigkeit indem sie bestimmte Apoptose-inhibierende Moleküle (bcl-2 und c-Flip) verstärkt exprimieren (Erb et al. 2008).

Wie eingangs erwähnt, verteidigen sich Hauttumorzellen daneben auch aktiv gegen das Immunsystem über die Expression bestimmter Liganden, zu denen FasL und TRAIL gehören. Sowohl Basalzellkarzinome als auch Plattenepithelkarzinome

exprimieren FasL (Buechner et al. 1997), (Bachmann et al. 2001). Das hohe Expressionsmuster von FasL könnte darauf hindeuten, dass diese Tumorzellen das Immunsystem umgehen, in dem sie aktivierte Immunzellen via FasL ausschalten. (Erb et al. 2008). Auch wenn dieser Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, so gibt es doch einige Beobachtungen, die diese Hypothese untermauern. (Buechner et al. 1997), (Bachmann et al. 2001, Erb et al. 2008). Vor diesem Hintergrund ist ein Zusammenhang mit einer weiteren Transthyretinfunktion denkbar: In mehreren Studien konnte nämlich nachgewiesen werden, dass Transthyretin immunmodulierende Eigenschaften besitzt (Borish et al. 1992), (Burton et al. 1987), (Le et al. 1981): Transthyretin konnte als spezifischer Inhibitor von Interleukin 1 (IL-1) identifiziert werden. Das Protein scheint in der Lage, die Bildung von IL-1, welches ein potenter Mediator in der körpereigenen Immunantwort darstellt, bis zu einem gewissen Maße zu hemmen. In eine ähnliche Richtung weist die Beobachtung, dass der Plasmatransthyretinspiegel in Stresssituationen, z.B. ausgelöst durch Traumata oder Mangelernährung zusammen mit den Spiegeln anderer Akute-Phase-Proteine deutlich abfällt (Douville et al. 1982). Diese Eigenschaften von Transthyretin lassen die Annahme zu, dass Transthyretin neben seinen bisher bekannten Aufgaben auch eine immunologische Funktion besitzt. Dies ist vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Einflussnahme von Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen auf das Immunsystems möglicherweise von Bedeutung. Über welchen genauen Prozess Transthyretin auf die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen Einfluss nimmt, konnte hier nicht geklärt werden. Ob Transthyretin möglicherweise über einen der oben genannten Mechanismen das Tumorzellwachstum beeinflusst, bedarf somit einer weiteren Klärung.

5.3 Wirkung von Transthyretin auf die Zelldifferenzierung

Perkins konnte einen Rückgang der Keratin 1- und 10-Expression in verschiedenen epidermalen Malignomen so auch in Plattenepithelkarzinomen und Basalzellkarzinomen nachweisen. Dieser Befund spricht für eine Abnahme der Zelldifferenzierung in diesen Tumoren (Perkins et al. 1992). Die Keratinexpression der Keratine 1 und 10 konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl für die A-431-Zellen als auch für die CRL-7762-Zellen bestätigt werden. Nach Inkubation der

Zellen mit 200 µg/ml Transthyretin zeigte sich eine deutliche Zunahme der Keratin 1- und Keratin 10-Expression. Da beide Keratine Marker für den Grad der Differenzierung darstellen, ist die unter Transthyretineinwirkung beobachtete Zunahme der Keratin 1- und 10-Expression möglicherweise Ausdruck einer Transthyretin-bedingten Induktion der terminalen Differenzierung.

5.4 Transthyretin und Megalin

Megalin ist bisher als ein Rezeptor bekannt, der auf verschiedenen Epithelien exprimiert wird, wie z.B. im proximalen Tubulus der Niere (Christensen et al. 1995) und im Dottersack (Zheng et al. 1994). Er ist ein endozytischer Rezeptor, der multiple Liganden bindet und zur Familie der Low-density-Lipoprotein-Rezeptoren gehört (Hussain et al. 1999). Für die tubuläre Rückresorption von verschiedenen Makromolekülen, unter anderem des Retinol-bindenden-Proteins (RBP), spielt er eine wichtige Rolle (Christensen et al. 1999). Sousa et al konnten 2000 erstmals Transthyretin als bisher nicht bekannten Megalinliganden identifizieren und nachweisen, dass dieser Rezeptor für die renale Rückresorption von Transthyretin von großer Bedeutung ist. Unterstützt wurde diese Beobachtung indirekt durch die Tatsache, dass Patienten mit tubulären Störungen in der Niere Transthyretin über den Urin ausscheiden. Ausserdem konnte bei Mäusen, die Megalin im renalen Tubulus nicht exprimieren konnten, kein Nachweis von zellulär gebundenem, lysosomalem Transthyretin erbracht werden (Sousa et al. 2000). Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass Megalin für die renale Transthyretin-Aufnahme unerlässlich ist.

In dem Versuch in Kapitel 3.9 konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die A-431 Zellen als auch die CRL-7762-Zellen den Rezeptor Megalin exprimieren. In Abwesenheit von Transthyretin ließ sich dieser nicht darstellen. Nach Inkubation der Tumorzellen mit 200 µg/ml Transthyretin wurde er jedoch von den Zellen exprimiert. Dies weist darauf hin, dass die Expression des Rezeptors möglicherweise von der Anwesenheit von Transthyretin abhängig ist.

6 Zusammenfassung

Hauttumore – insbesondere Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome – sind die häufigsten Tumore des älteren Menschen. Aufgrund des veränderten Lebensstil- und Freizeitverhaltens und der weltweit immer höheren Lebenserwartung wird die Inzidenz dieser Malignome in den nächsten Jahrzehnten weiter ansteigen. Folglich nimmt die Erforschung der Pathogenese sowie neuer, weniger invasiver Therapieoptionen an Bedeutung zu.

Studien über altersabhängige Proteinveränderungen in der menschlichen Epidermis konnten kürzlich nachweisen, dass die Konzentration von Transthyretin – ein Transportprotein für Retinol und Schilddrüsenhormone – in alter Epidermis im Vergleich zu junger Haut vermindert ist. Es wird in der Epidermis nicht synthetisiert, scheint jedoch als Transportprotein für ihre intakte Funktion unerlässlich zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Transthyretin auf die Proliferation und Differenzierung von Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen unter in vitro Bedingungen zu untersuchen. Hierzu wurde die Basalzellkarzinomzelllinie CRL-7762 und die Plattenepithelkarzinomzelllinie A-431 verwendet. Beide Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Transthyretinkonzentrationen inkubiert, um im Anschluss die Zahl an vitalen Zellen mittels Tetrazolium (WST-1)-Assays zu ermitteln. Hierbei zeigte sich in beiden Tumorzelllinien eine signifikante Abnahme der Zahl vitaler Zellen durch hohe Transthyretinkonzentrationen. Als ursächlicher Mechanismus wäre eine Hemmung der Zellproliferation, eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen, eine Verringerung der Zellteilungsrate oder auch eine veränderte Adhärenz der Zellen denkbar.

Da der EGF-Rezeptor einen Einfluss auf das Überleben von Tumorzellen hat und die Expression des Rezeptors sowohl in Basalzellkarzinomen als auch in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden ob die Expression des EGFR durch Transthyretin beeinflusst wird. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es konnte in beiden Zelllinien nach Inkubation mit Transthyretin im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen keine signifikante Änderung des Expressionsmusters des Rezeptors beobachtet werden. Der

Einfluss von Transthyretin auf die Anzahl der vitalen Tumorzellen muss folglich über einen anderen, bisher nicht bekannten Mechanismus erfolgen.

Da Transthyretin immunmodulierende Eigenschaften zu haben scheint und Hauttumorzellen sich aktiv gegen das Immunsystem über die Expression bestimmter Liganden (FasL und TRAIL) verteidigen können, wäre hier ein Zusammenhang und eine mögliche Einflussnahme in vivo denkbar.

Über welchen genauen Mechanismus Transthyretin Einfluss auf die hier beobachteten Veränderungen nimmt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Ob Transthyretin möglicherweise über einen der oben genannten Mechanismen das Tumorzellwachstum beeinflusst, bedarf somit einer weiteren Klärung.

Darüber hinaus sollte die Expression der Keratine immunhistochemisch nachgewiesen werden. In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Keratin 1 und 10 als Maß der Zelldifferenzierung durch Transthyretin induziert wird. Diese Beobachtung deutet folglich auf eine Transthyretinbedingte Induktion der terminalen Differenzierung hin.

Vor dem Hintergrund der bisher bekannten Funktionen des Rezeptors Megalin sollte in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen von Megalin in den Tumorzelllinien als möglicher rezeptorvermittelter Aufnahmeweg für Transthyretin untersucht werden: Hier konnte mittels Immunhistochemie die Expression von Megalin sowohl in der CRL-7762-Zelllinie als auch in der A-431-Zelllinie nachgewiesen werden. Dieser Rezeptor scheint folglich nicht nur in der Niere für die Transthyretinaufnahme verantwortlich zu sein, sondern auch in Hauttumoren.

Literaturverzeichnis

Affinito, P., Palomba, S., Sorrentino, C., Di Carlo, C., Bifulco, G., Arienzo, M.P., Nappi, C. (1999): Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas* Dec 15; 33 (3), 239-47

Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Nov 1; 89 (21), 10114-8

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Sep 1; 90 (17), 7915-22

Andersson, E., Rosdahl, I., Torma, H., Vahlquist, A. (2003): Differential effects of UV irradiation on nuclear retinoid receptor levels in cultured keratinocytes and melanocytes. *Experimental dermatology* Oct; 12 (5), 563-71

Angel, P., Szabowski, A., Schorpp-Kistner, M. (2001): Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* Apr 30; 20 (19), 2413-23

Bachmann, F., Buechner, S.A., Wernli, M., Strebel, S., Erb, P. (2001): Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *The Journal of investigative dermatology* Jul; 117 (1), 59-66

Backhaus, K. (2006): *Multivariate Analysemethoden eine anwendungsorientierte Einführung*, 11. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg New York

Bellovino, D., Morimoto, T., Tosetti, F., Gaetani, S. (1996): Retinol binding protein and transthyretin are secreted as a complex formed in the endoplasmic reticulum in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Experimental cell research* Jan 10; 222 (1), 77-83

Bernal, J., Nunez, J. (1995): Thyroid hormones and brain development. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* Oct; 133 (4), 390-8

Bhardwaj, A., Aggarwal, B.B. (2003): Receptor-mediated choreography of life and death. *Journal of clinical immunology* Sep; 23 (5), 317-32

Birn, H., Vorum, H., Verroust, P.J., Moestrup, S.K., Christensen, E.I. (2000): Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology* Feb; 11 (2), 191-202

Blay, P., Nilsson, C., Owman, C., Aldred, A., Schreiber, G. (1993): Transthyretin expression in the rat brain: effect of thyroid functional state and role in thyroxine transport. *Brain research* Dec 31; 632 (1-2), 114-20

Boonstra, J., De Laat, S.W., Ponc, M. (1985): Epidermal growth factor receptor expression related to differentiation capacity in normal and transformed keratinocytes. *Experimental cell research* Dec; 161 (2), 421-33

Borish, L., King, M.S., Mascali, J.J., Johnson, S., Coll, B., Rosenwasser, L.J. (1992): Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation* Oct; 16 (5), 471-84

Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. (1998): Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* Feb 27; 273 (9), 5279-87

Brincat, M.P. (2000): Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas* May 29; 35 (2), 107-17

Buechner, S.A., Wernli, M., Harr, T., Hahn, S., Itin, P., Erb, P. (1997): Regression of basal cell carcinoma by intralesional interferon-alpha treatment is mediated by CD95 (Apo-1/Fas)-CD95 ligand-induced suicide. *The Journal of clinical investigation* Dec 1; 100 (11), 2691-6

Burton, P.M., Horner, B.L., Jones, G.H., Lin, T., Nestor, J.J., Jr., Newman, S.R., Parks, T.L., Smith, A.J., White, A. (1987): Immuno-enhancing activity of the amino-terminal domain of human prealbumin: isolation, characterization and synthesis. *International journal of immunopharmacology*; 9 (3), 297-305

Carpenter, G., Cohen, S. (1979): Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*; 48, 193-216

Cech, T.R. (2004): Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* Jan 23; 116 (2), 273-9

Chanoine, J.P., Alex, S., Fang, S.L., Stone, S., Leonard, J.L., Korhle, J., Braverman, L.E. (1992): Role of transthyretin in the transport of thyroxine from the blood to the choroid plexus, the cerebrospinal fluid, and the brain. *Endocrinology* Feb; 130 (2), 933-8

Chen, W.C., Sass, J.O., Seltmann, H., Nau, H., Orfanos, C.E., Zouboulis, C.C. (2000): Biological effects and metabolism of 9-cis-retinoic acid and its metabolite 9,13-di-cis-retinoic acid in HaCaT keratinocytes in vitro: comparison with all-trans-retinoic acid. *Arch Dermatol Res* Dec; 292 (12), 612-20

Christensen, E.I., Gliemann, J., Moestrup, S.K. (1992): Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry* Oct; 40 (10), 1481-90

Christensen, E.I., Moskaug, J.O., Vorum, H., Jacobsen, C., Gundersen, T.E., Nykjaer, A., Blomhoff, R., Willnow, T.E., Moestrup, S.K. (1999): Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *Journal of the American Society of Nephrology* Apr; 10 (4), 685-95

Christensen, E.I., Nielsen, S., Moestrup, S.K., Borre, C., Maunsbach, A.B., de Heer, E., Ronco, P., Hammond, T.G., Verroust, P. (1995): Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *European journal of cell biology* Apr; 66 (4), 349-64

Christenson, L.J., Borrowman, T.A., Vachon, C.M., Tollefson, M.M., Otley, C.C., Weaver, A.L., Roenigk, R.K. (2005): Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *Jama* Aug 10; 294 (6), 681-90

Coffer, P.J., Burgering, B.M., Peppelenbosch, M.P., Bos, J.L., Kruijer, W. (1995): UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* Aug 3; 11 (3), 561-9

Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Bannister, D., Schreiber, G. (1986): Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver. *The Journal of biological chemistry* Mar 15; 261 (8), 3475-8

Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Tu, G.F., Howlett, G.J., Schreiber, G. (1985): High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* Mar 29; 127 (3), 890-5

Divino, C.M., Schussler, G.C. (1990): Receptor-mediated uptake and internalization of transthyretin. *The Journal of biological chemistry* Jan 25; 265 (3), 1425-9

Dlugosz, A.A., Yuspa, S.H. (1993): Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *The Journal of cell biology* Jan; 120 (1), 217-25

Douville, P., Talbot, J., Lapointe, R., Belanger, L. (1982): Potential usefulness of serum prealbumin in total parenteral nutrition. *Clinical chemistry* Jul; 28 (7), 1706-7

Dy, L.C., Pei, Y., Travers, J.B. (1999): Augmentation of ultraviolet B radiation-induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet-activating factor receptor. *The Journal of biological chemistry* Sep 17; 274 (38), 26917-21

Elias, P.M., Ghadially, R. (2002): The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities. *Clinics in geriatric medicine* Feb; 18 (1), 103-20, vii

Ennis, B.W., Lippman, M.E., Dickson, R.B. (1991): The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer investigation*; 9 (5), 553-62

Erb, P., Ji, J., Kump, E., Mielgo, A., Wernli, M. (2008): Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Advances in experimental medicine and biology*; 624, 283-95

Erb, P., Ji, J., Wernli, M., Kump, E., Glaser, A., Buchner, S.A. (2005): Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunology letters* Aug 15; 100 (1), 68-72

Euvrard, S., Kanitakis, J., Claudy, A. (2003): Skin cancers after organ transplantation. *The New England journal of medicine* Apr 24; 348 (17), 1681-91

Ford, A.C., Grandis, J.R. (2003): Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head & neck* Jan; 25 (1), 67-73

Fritsch, P. (2004): *Dermatologie, Venerologie* 2. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg New York

Fuchs, E., Green, H. (1981): Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* Sep; 25 (3), 617-25

Fung, W.P., Thomas, T., Dickson, P.W., Aldred, A.R., Milland, J., Dziadek, M., Power, B., Hudson, P., Schreiber, G. (1988): Structure and expression of the rat transthyretin (prealbumin) gene. *The Journal of biological chemistry* Jan 5; 263 (1), 480-8

Gerstein, A.D., Phillips, T.J., Rogers, G.S., Gilchrest, B.A. (1993): Wound healing and aging. *Dermatologic clinics* Oct; 11 (4), 749-57

Ghadially, R., Brown, B.E., Sequeira-Martin, S.M., Feingold, K.R., Elias, P.M. (1995): The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *The Journal of clinical investigation* May; 95 (5), 2281-90

Gilchrest, B.A., Blog, F.B., Szabo, G. (1979): Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *The Journal of investigative dermatology* Aug; 73 (2), 141-3

Gilchrest, B.A., Stoff, J.S., Soter, N.A. (1982): Chronologic aging alters the response to ultraviolet-induced inflammation in human skin. *The Journal of investigative dermatology* Jul; 79 (1), 11-5

Gloth, F.M., 3rd, Gundberg, C.M., Hollis, B.W., Haddad, J.G., Jr., Tobin, J.D. (1995): Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *Jama* Dec 6; 274 (21), 1683-6

Grewe, M. (2001): Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. *Clinical and experimental dermatology* Oct; 26 (7), 608-12

Grossman, D., Leffell, D.J. (1997): The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Archives of dermatology* Oct; 133 (10), 1263-70

Hagedorn, M., Bauknecht, T. (1990): Detection of epidermal growth factor-like factors in various skin tumors. *Zeitschrift für Hautkrankheiten* Jun; 65 (6), 575-7

Hagedorn, M., Vanscheidt, W., Strasser, W., Bauknecht, T. (1990): Determination of epidermal growth factor (EGF) receptors in basal cell carcinomas, squamous cell carcinomas and melanomas. *Zeitschrift für Hautkrankheiten* Jun; 65 (6), 568-70

Hagen, E., Myhre, A.M., Smeland, S., Halvorsen, B., Norum, K.R., Blomhoff, R. (1999): Uptake of vitamin A in macrophages from physiologic transport proteins: role of retinol-binding protein and chylomicron remnants. *The Journal of nutritional biochemistry* Jun; 10 (6), 345-52

Hagen, G.A., Solberg, L.A., Jr. (1974): Brain and cerebrospinal fluid permeability to intravenous thyroid hormones. *Endocrinology* Nov; 95 (5), 1398-410

Henson, E.S., Gibson, E.M., Villanueva, J., Bristow, N.A., Haney, N., Gibson, S.B. (2003): Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry* Aug 15; 89 (6), 1177-92

Herbert, J., Wilcox, J.N., Pham, K.T., Fremeau, R.T., Jr., Zeviani, M., Dwork, A., Soprano, D.R., Makover, A., Goodman, D.S., Zimmerman, E.A., et al. (1986): Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology* Jul; 36 (7), 900-11

Herbst, R.S., Shin, D.M. (2002): Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* Mar 1; 94 (5), 1593-611

Hill, L.L., Ouhtit, A., Loughlin, S.M., Kripke, M.L., Ananthaswamy, H.N., Owen-Schaub, L.B. (1999): Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science (New York, NY)* Aug 6; 285 (5429), 898-900

Holme, S.A., Malinowszky, K., Roberts, D.L. (2000): Changing trends in non-melanoma skin cancer in South Wales, 1988-98. *British Journal of Dermatology* Dec; 143 (6), 1224-9

Huang, J., Vieira, A. (2006): Evidence for a specific cell membrane retinol-binding protein transport mechanism in a human keratinocyte line. *International journal of molecular medicine* Apr; 17 (4), 627-31

Hussain, M.M., Strickland, D.K., Bakillah, A. (1999): The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annual review of nutrition*; 19, 141-72

Husz, S., Hamerlinck, F., Cormane, R.H. (1975): Prealbumin bearing lymphocytes as an indicator of hapten protein carrier in certain varieties of dermatitis. *The British journal of dermatology* Jul; 93 (1), 11-5

Ingenbleek, Y., Young, V.R. (2002): Significance of transthyretin in protein metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine* Dec; 40 (12), 1281-91

Irace, G., Edelhoch, H. (1978): Thyroxine-induced conformational changes in prealbumin. *Biochemistry* Dec 26; 17 (26), 5729-33

Jacobs, H.T. (2003): The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging cell* Feb; 2 (1), 11-7

Jacobsson, B., Collins, V.P., Grimelius, L., Pettersson, T., Sandstedt, B., Carlstrom, A. (1989): Transthyretin immunoreactivity in human and porcine liver, choroid plexus, and pancreatic islets. *The journal of histochemistry and cytochemistry* Jan; 37 (1), 31-7

Jetten, A.M. (1981): Action of retinoids and phorbol esters on cell growth and the binding of epidermal growth factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* Feb 27; 359, 200-17

Kartasova, T., Roop, D.R., Yuspa, S.H. (1992): Relationship between the expression of differentiation-specific keratins 1 and 10 and cell proliferation in epidermal tumors. *Molecular carcinogenesis*; 6 (1), 18-25

Kieslich, J. (2005): Die Bedeutung von Transthyretin und HSP 27 in der alternden Epidermis. *Med. Diss., Hamburg*

King, L.E., Jr., Gates, R.E., Stoscheck, C.M., Nanney, L.B. (1990): The EGF/TGF alpha receptor in skin. *The Journal of investigative dermatology* Jun; 94 (6 Suppl), 164S-70S

King, M., Wolff, S.M., Rosenwasser, L.J. (1987): Vasculitic sera lack an inhibitor of endothelial cell IL-1 production. *Clinical research*; 35, 608A

Kirkin, V., Joos, S., Zornig, M. (2004): The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* Mar 1; 1644 (2-3), 229-49

Kligman, L.H. (1989): Prevention and repair of photoaging: sunscreens and retinoids. *Cutis; cutaneous medicine for the practitioner* May; 43 (5), 458-65

Koh, J.S., Kang, H., Choi, S.W., Kim, H.O. (2002): Cigarette smoking associated with premature facial wrinkling: image analysis of facial skin replicas. *International journal of dermatology* Jan; 41 (1), 21-7

Krutmann, J. (2003): Vorzeitige Hautalterung durch ultraviolette Strahlung und andere Umwelttoxene. *Hautarzt*; 54 ((3)), 300-1

Kuchler-Bopp, S., Dietrich, J.B., Zaepfel, M., Delaunoy, J.P. (2000): Receptor-mediated endocytosis of transthyretin by ependymoma cells. *Brain research* Jul 7; 870 (1-2), 185-94

Lahmann, C., Bergemann, J., Harrison, G., Young, A.R. (2001): Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* Mar 24; 357 (9260), 935-6

Lavrijsen, A.P., Tieben, L.M., Ponec, M., van der Schroeff, J.G., van Muijen, G.N. (1989): Expression of EGF receptor, involucrin, and cytokeratins in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of the skin. *Archives of dermatological research*; 281 (2), 83-8

Le, J., Ikehara, S., Pahwa, R., Burton, P., White, A., Good, R.A. (1981): In Vitro effects of prealbumin on T-cell-dependent immune responses of the mouse. *Cellular immunology* Nov 15; 65 (1), 1-12

Le, Q., Dawson, M.I., Soprano, D.R., Soprano, K.J. (2000): Modulation of retinoic acid receptor function alters the growth inhibitory response of oral SCC cells to retinoids. *Oncogene* Mar 9; 19 (11), 1457-65

Lee, S., Selva, D., Huilgol, S.C., Goldberg, R.A., Leibovitch, I. (2007): Pharmacological treatments for Basal cell carcinoma. *Drugs*; 67 (6), 915-34

Leung, W.C., Harvey, I. (2002): Is skin ageing in the elderly caused by sun exposure or smoking? *The British journal of dermatology* Dec; 147 (6), 1187-91

Levine, A.J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* Feb 7; 88 (3), 323-31

MacLaughlin, J., Holick, M.F. (1985): Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *The Journal of clinical investigation* Oct; 76 (4), 1536-8

Makover, A., Moriwaki, H., Ramakrishnan, R., Saraiva, M.J., Blaner, W.S., Goodman, D.S. (1988): Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat. *The Journal of biological chemistry* Jun 25; 263 (18), 8598-603

Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., Weinberg, R.A., Stewart, S.A., Hahn, W.C. (2003): Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* Jul 25; 114 (2), 241-53

McCullough, J.L., Kelly, K.M. (2006): Prevention and treatment of skin aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* May; 1067, 323-31

Mendel, C.M., Cavalieri, R.R., Kohrle, J. (1992): Thyroxine (T4) transport and distribution in rats treated with EMD 21388, a synthetic flavonoid that displaces T4 from transthyretin. *Endocrinology* Mar; 130 (3), 1525-32

Mendel, C.M., Weisiger, R.A., Jones, A.L., Cavalieri, R.R. (1987): Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. *Endocrinology* May; 120 (5), 1742-9

Mendelsohn, J. (2001): The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocrine-related cancer* Mar; 8 (1), 3-9

Mendelsohn, J., Baselga, J. (2006): Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Seminars in oncology* Aug; 33 (4), 369-85

Moestrup, S.K., Birn, H., Fischer, P.B., Petersen, C.M., Verroust, P.J., Sim, R.B., Christensen, E.I., Nexø, E. (1996): Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Aug 6; 93 (16), 8612-7

Nanney, L.B., McKenna, J.A., Stoscheck, C.M., Carpenter, G., King, L.E. (1984): Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* Feb; 82 (2), 165-9

Navab, M., Smith, J.E., Goodman, D.S. (1977): Rat plasma prealbumin. Metabolic studies on effects of vitamin A status and on tissue distribution. *The Journal of biological chemistry* Jul 25; 252 (14), 5107-14

Naylor, H.M., Newcomer, M.E. (1999): The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP. *Biochemistry* Mar 2; 38 (9), 2647-53

Neuber, K., Schmidt, S., Mensch, A. (2003): Telomere length measurement and determination of immunosenescence-related markers (CD28, CD45RO, CD45RA, interferon-gamma and interleukin-4) in skin-homing T cells expressing the cutaneous lymphocyte antigen: indication of a non-ageing T-cell subset. *Immunology* May; 109 (1), 24-31

Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., Melsen, F., Christensen, E.I., Willnow, T.E. (1999): An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* Feb 19; 96 (4), 507-15

Ong, D.E., Davis, J.T., O'Day, W.T., Bok, D. (1994): Synthesis and secretion of retinol-binding protein and transthyretin by cultured retinal pigment epithelium. *Biochemistry* Feb 22; 33 (7), 1835-42

Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L. (1997): Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocrine reviews* Aug; 18 (4), 462-75

Osborn, M., Weber, K. (1982): Intermediate filaments: cell-type-specific markers in differentiation and pathology. *Cell* Dec; 31 (2 Pt 1), 303-6

Palha, J.A. (2002): Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* Dec; 40 (12), 1292-300

Palha, J.A., Episkopou, V., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E., Saraiva, M.J. (1994): Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. *The Journal of Biological Chemistry* Dec 30; 269 (52), 33135-9

Palha, J.A., Fernandes, R., de Escobar, G.M., Episkopou, V., Gottesman, M., Saraiva, M.J. (2000): Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology* Sep; 141 (9), 3267-72

Palha, J.A., Hays, M.T., Morreale de Escobar, G., Episkopou, V., Gottesman, M.E., Saraiva, M.J. (1997): Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice. *American Journal of Physiology* Mar; 272 (3 Pt 1), E485-93

Palha, J.A., Nissanov, J., Fernandes, R., Sousa, J.C., Bertrand, L., Dratman, M.B., Morreale de Escobar, G., Gottesman, M., Saraiva, M.J. (2002): Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin. *Neuroscience*; 113 (4), 837-47

Perkins, W., Campbell, I., Leigh, I.M., MacKie, R.M. (1992): Keratin expression in normal skin and epidermal neoplasms demonstrated by a panel of monoclonal antibodies. *Journal of cutaneous pathology* Dec; 19 (6), 476-82

Peterson, P.A. (1971): Characteristics of a vitamin A-transporting protein complex occurring in human serum. *The Journal of biological chemistry* Jan 10; 246 (1), 34-43

Pfahl, M. (1993): Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocrine reviews* Oct; 14 (5), 651-8

Pöttsch, O., Sommer, B. (2003): Bevölkerung Deutschlands bis 2050, 10. Aufl., Destatis, Wiesbaden

Preston, D.S., Stern, R.S. (1992): Nonmelanoma cancers of the skin. The New England journal of medicine Dec 3; 327 (23), 1649-62

Rask, L., Valtersson, C., Anundi, H., Kvist, S., Eriksson, U., Dallner, G., Peterson, P.A. (1983): Subcellular localization in normal and vitamin A-deficient rat liver of vitamin A serum transport proteins, albumin, ceruloplasmin and class I major histocompatibility antigens. Experimental cell research Jan; 143 (1), 91-102

Raz, A., Goodman, D.S. (1969): The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex. The Journal of biological chemistry Jun 25; 244 (12), 3230-7

Refetoff, S., Dwulet, F.E., Benson, M.D. (1986): Reduced affinity for thyroxine in two of three structural thyroxine-binding prealbumin variants associated with familial amyloidotic polyneuropathy. The Journal of clinical endocrinology and metabolism Dec; 63 (6), 1432-7

Robbins, J. (2000), Werner, S.C., Braverman, L.E. (Hrsg.), Werner and Ingbar's the thyroid, 8. (Aufl.), 105-20, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, [u.a.]

Robbins, J., Rall, J.E. (1960): Proteins associated with the thyroid hormones. Physiological reviews Jul; 40, 415-89

Rogers, J., Harding, C., Mayo, A., Banks, J., Rawlings, A. (1996): Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. Archives of dermatological research Nov; 288 (12), 765-70

Rosen, H.N., Moses, A.C., Murrell, J.R., Liepnieks, J.J., Benson, M.D. (1993): Thyroxine interactions with transthyretin: a comparison of 10 different naturally occurring human transthyretin variants. The Journal of clinical endocrinology and metabolism Aug; 77 (2), 370-4

Rosette, C., Karin, M. (1996): Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science (New York, NY Nov 15; 274 (5290), 1194-7

Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J. (1994): Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. Cell Sep 23; 78 (6), 963-72

Saraiva, M.J. (1995): Transthyretin mutations in health and disease. *Human mutation*; 5 (3), 191-6

Sator, P.G., Schmidt, J.B., Sator, M.O., Huber, J.C., Honigsmann, H. (2001): The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: a pilot study. *Maturitas* Jul 25; 39 (1), 43-55

Sauder, D.N. (1986): Effect of age on epidermal immune function. *Dermatologic clinics* Jul; 4 (3), 447-54

Schreiber, G. (2002): The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. *Clinical chemistry and laboratory medicine* Dec; 40 (12), 1200-10

Schulz, V.P., Zakian, V.A., Ogburn, C.E., McKay, J., Jarzebowicz, A.A., Edland, S.D., Martin, G.M. (1996): Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Human genetics* Jun; 97 (6), 750-4

Shah, M.G., Maibach, H.I. (2001): Estrogen and skin. An overview. *American journal of clinical dermatology*; 2 (3), 143-50

Shimokata, H., Kuzuya, F. (1995): Two-point discrimination test of the skin as an index of sensory aging. *Gerontology*; 41 (5), 267-72

Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F.M., Schlessinger, J., Wagner, E.F. (2000): The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* Jul 21; 102 (2), 211-20

Singh, S., Gupta, P.D. (1994): Tampering with cytokeratin expression results in cell dysfunction. *Epithelial cell biology*; 3 (2), 79-83

Sohal, R.S., Brunk, U.T. (1992): Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation research* Sep; 275 (3-6), 295-304

Soprano, D.R., Soprano, K.J., Goodman, D.S. (1986): Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Oct; 83 (19), 7330-4

Sousa, M.M., Norden, A.G., Jacobsen, C., Willnow, T.E., Christensen, E.I., Thakker, R.V., Verroust, P.J., Moestrup, S.K., Saraiva, M.J. (2000): Evidence for

the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *The Journal of biological chemistry* Dec 8; 275 (49), 38176-81

Southwell, B.R., Duan, W., Alcorn, D., Brack, C., Richardson, S.J., Kohrle, J., Schreiber, G. (1993): Thyroxine transport to the brain: role of protein synthesis by the choroid plexus. *Endocrinology* Nov; 133 (5), 2116-26

Stadtman, E.R. (1992): Protein oxidation and aging. *Science (New York, NY)* Aug 28; 257 (5074), 1220-4

Stevens, J.C., Patterson, M.Q. (1995): Dimensions of spatial acuity in the touch sense: changes over the life span. *Somatosensory & motor research*; 12 (1), 29-47

Stoscheck, C.M., King, L.E., Jr. (1986): Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer research* Mar; 46 (3), 1030-7

Sunderkotter, C., Kalden, H., Luger, T.A. (1997): Aging and the skin immune system. *Archives of dermatology* Oct; 133 (10), 1256-62

Torma, H., Vahlquist, A. (1983): Vitamin A transporting proteins in human epidermis and blister fluids. *Archives of dermatological research*; 275 (5), 324-8

Varani, J., Fisher, G.J., Kang, S., Voorhees, J.J. (1998): Molecular mechanisms of intrinsic skin aging and retinoid-induced repair and reversal. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc* Aug; 3 (1), 57-60

Varani, J., Warner, R.L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H., Kang, S., Chung, J.H., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Fisher, G.J., Voorhees, J.J. (2000): Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *The Journal of investigative dermatology* Mar; 114 (3), 480-6

Vieira, A.V., Sanders, E.J., Schneider, W.J. (1995): Transport of serum transthyretin into chicken oocytes. A receptor-mediated mechanism. *The Journal of biological chemistry* Feb 17; 270 (7), 2952-6

Wagner, P.D., West, J.B. (1972): Effects of diffusion impairment on O₂ and CO₂ time courses in pulmonary capillaries. *Journal of applied physiology* Jul; 33 (1), 62-71

Waits, R.P., Yamada, T., Uemichi, T., Benson, M.D. (1995): Low plasma concentrations of retinol-binding protein in individuals with mutations affecting position 84 of the transthyretin molecule. *Clinical chemistry Sep*; 41 (9), 1288-91

Wells, A. (1999): EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology Jun*; 31 (6), 637-43

Willnow, T.E. (1998): Receptor-associated protein (RAP): a specialized chaperone for endocytic receptors. *Biological chemistry Aug-Sep*; 379 (8-9), 1025-31

Willnow, T.E., Hilpert, J., Armstrong, S.A., Rohlmann, A., Hammer, R.E., Burns, D.K., Herz, J. (1996): Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Aug 6*; 93 (16), 8460-4

Wojtczak, A., Cody, V., Luft, J.R., Pangborn, W. (2001): Structure of rat transthyretin (rTTR) complex with thyroxine at 2.5 Å resolution: first non-biased insight into thyroxine binding reveals different hormone orientation in two binding sites. *Acta crystallographica Aug*; 57 (Pt 8), 1061-70

Wrone, D.A., Swetter, S.M., Egbert, B.M., Smoller, B.R., Khavari, P.A. (1996): Increased proportion of aggressive-growth basal cell carcinoma in the Veterans Affairs population of Palo Alto, California. *Journal of the American Academy of Dermatology Dec*; 35 (6), 907-10

Yaar, M., Eller, M.S., Gilchrist, B.A. (2002): Fifty years of skin aging. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc Dec*; 7 (1), 51-8

Yamamoto, Y. (2001): Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of dermatological science Aug*; 27 Suppl 1, S1-4

Yin, L., Morita, A., Tsuji, T. (2000): Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Archives of dermatological research Apr*; 292 (4), 188-94

Yuspa, S.H., Ben, T., Lichti, U. (1983): Regulation of epidermal transglutaminase activity and terminal differentiation by retinoids and phorbol esters. *Cancer research Dec*; 43 (12 Pt 1), 5707-12

Zheng, G., Bachinsky, D.R., Stamenkovic, I., Strickland, D.K., Brown, D., Andres, G., McCluskey, R.T. (1994): Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the

receptor-associated protein (RAP). The journal of histochemistry and cytochemistry Apr; 42 (4), 531-42

Ziegler, A., Jonason, A.S., Leffell, D.J., Simon, J.A., Sharma, H.W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., Brash, D.E. (1994): Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. Nature Dec 22-29; 372 (6508), 773-6

Danksagung

Nach Abschluss einer solchen Arbeit gilt es, all den Menschen zu danken, die zum Gelingen beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Karsten Neuber, der mir diese experimentelle Arbeit ermöglicht und sie umfassend begleitet hat. Seine intensive persönliche Betreuung, seine fundierten Ratschläge und kreativen Ideen habe ich sehr geschätzt. Er war auch derjenige, der mein Interesse für die Pathophysiologie der Haut und damit für die Dermatologie als mein heutiges Betätigungsfeld geweckt hat. Für alle, die mit ihm zusammengearbeitet haben, ist noch immer unfassbar, dass Herr Professor Neuber während der Fertigstellung dieser Arbeit plötzlich verstarb.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Weichenthal, der als Kooperationspartner von Herrn Prof. Neuber bei den Forschungsarbeiten zur Thematik dieser Arbeit aktiv beteiligt war und wertvolle Anregungen gegeben hat. Nach dem Tod von Herrn Professor Neuber hat er dankenswerterweise die Betreuung dieser Arbeit übernommen.

Von großer Hilfe bei den Laborarbeiten waren auch der Rat und die technische Unterstützung durch Gerlinde Finger, der ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Dank gilt auch meinem Ehemann Gerrit, der stets für mich da war und mir mit seinen vielen Ideen und Korrekturvorschlägen beratend zur Seite gestanden hat.

Dass ich mich ungestört und intensiv meinem Studium und dieser Arbeit widmen konnte, verdanke ich vor allem meinen Eltern, denen ich an dieser Stelle für Ihre große Unterstützung ganz besonders danken möchte.

Anna Karalus

Hamburg im September 2009

Lebenslauf

Name:	Anna Katharina Karalus (geb. Leidenberger)
Staatsang.:	deutsch
Geburtstag:	25. November 1977
Geburtsort:	Hamburg
Familienstand:	Verheiratet
Eltern:	Prof. Dr. med. Freimut A. Leidenberger, Endokrinologe; Hannelore Leidenberger, Hebamme
Ausbildung	
Seit 10/2009	Assistenzärztin im Dermatologikum, Hamburg
2007 – 2009	Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
2006 – 2007	Hospitation in der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
2005 – 2006	Studium der Humanmedizin: Universität Hamburg <ul style="list-style-type: none">• Drittes medizinisches Staatsexamen• Praktisches Jahr
2003 – 2004	Wissenschaftliche Tätigkeit im Rahmen der Dissertation in der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE
1999 – 2005	Studium der Humanmedizin: Philipps-Universität, Marburg <ul style="list-style-type: none">• 2. Staatsexamen• 1. Staatsexamen• Physikum
1998 –1999	Pflegepraktikum: Elim Krankenhaus, Hamburg
1988 – 1998	Abitur: Corvey Gymnasium, Hamburg
1994 – 1995	<ul style="list-style-type: none">• Besuch der High School „Governor Dummer Academy“, Massachusetts/USA
1984 – 1988	Grundschule Alsterdorferstraße