

Über die Rolle von PKC epsilon während der Wundheilung

**Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität
Hannover**

**Zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Tarik Hessabi
geboren am 21.08.1972 in Langenhagen
Erscheinungsjahr: 2005

Angefertigt am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie

Referent: Prof. Dr. Müller

Korreferent: Prof. Dr. Otto

Tag der Promotion: 01.04.2005

Zusammenfassung

Der erste Teil der vorgelegten Arbeit bestand in der Erstellung eines Expressionsprofils der verschiedenen PKC-Isoformen in der Maushaut. Als Arbeitsmethoden kamen die RT-PCR, der Western-Blot und die Immunhistochemie zu Einsatz. Als Grundlage für diese Analysen dienten die cDNA und Proteinextrakte aus der Keratinozytenzellkultur, der Epidermis, der Dermis und der gesamten Haut. Für die Immunhistochemie wurden Hautschnitte angefertigt. Das Hauptaugenmerk bei diesen Untersuchungen lag in der Expressionsstärke und -ort.

Positiv getestet wurden die Isoformen PKC- α , - δ , - ϵ , - η und - ζ . Alle Isoformen, mit Ausnahme von PKC- ϵ , werden in der Dermis und Epidermis exprimiert. Bei einem Vergleich der Isoformen untereinander lag die stärkste Expression bei PKC- δ . Danach folgten PKC- η und - ζ . Die schwächste Expression hatte PKC- α . Bei einem Vergleich der Expressionsstärke in den Kompartimenten der Haut war eine Reihenfolge erkennbar die sich auf alle Isoformen übertragen ließ: Am stärksten war die Expression in der Dermis, danach folgte die Epidermis und als letztes kam die Expression in der Keratinozytenzellkultur. In der mehrschichtigen Epidermis war eine Lokalisation der Expression auf die beiden unteren, stoffwechselaktiven Zellschichten möglich. In der Dermis scheint die Expression ubiquitär zu sein.

PKC- ϵ stellte Aufgrund seines Expressionsmusters einen Sonderfall dar. Es wurde im Verlaufe dieser Arbeit nur eine Expression in der Dermis festgestellt. Bei weiterführenden Experimenten konnte eine besonders hohe Expression im in der Dermis eingelagerten Blutkreislaufsystem diagnostiziert werden. Diese Besonderheit wurde genutzt um weitere Erkenntnisse über die Funktion von PKC- ϵ in der Haut zu gewinnen.

In Wundheilungsversuchen wurde in einem Vergleich zwischen Wildtyp Mäusen und PKC- ϵ *knock out* Mäusen eine Verlangsamung der Heilung in den mutanten Mäusen festgestellt. Die Reepithelialisierung verlief um ca. drei Tage langsamer. Im Zuge dieser Wundheilungsversuche wurde auch eine reduzierte Angiogenese diagnostiziert. Das Granulationsgewebe, welches die Grundlage für das neue Blutgefäßsystem bildet, wanderte langsamer in den Wundbereich ein. Aufgrund von Proliferationsversuchen, die sowohl *in vivo* (Immunhistochemie) als auch *in vitro* (Keratinozytenzellkultur), ist bewiesen worden, dass die reduzierte Angiogenese zum größten Teil für die verlangsamte Wundheilung in den PKC- ϵ defizienten Mäusen zuständig ist.

Abstract

It is known that the protein kinase C (PKC) system plays an important role in regulation of proliferation, migration and differentiation of the skin. PKC is a large family of proteins and keratinocytes containing five PKC isozymes: alpha, delta, epsilon, eta, and zeta. Each isoform is expressed in the epidermis and dermis of mice skin, except PKC epsilon. PKC- ϵ is only expressed in the blood vessels of the skin.

We have generated a mouse strain lacking PKC- ϵ to evaluate its significance in epithelial organization and building the granulation tissue during wound healing. In the mutant mice, after inflicting injury by punch biopsy, wound healing on the dorsal skin, particularly reepithelialization, was significantly delayed and impaired in structure. Impairment of epithelial regeneration in wound healing indicates a possibility that PKC- ϵ plays a role in maintenance of epithelial architecture. Compared with wild-type littermates, mice heterozygous or homozygous for the disrupted gene have statistically significant delayed healing of skin wounds and impaired angiogenesis in the granulation tissue. We propose a model in which PKC- ϵ integrates its activities on endothelial cells, fibroblasts, and macrophages to regulate the processes of angiogenesis, inflammation, and matrix remodelling in the context of cutaneous wound healing. The cellular location of the epsilon isoform of PKC correlates with this proposal. PKC- ϵ is highly expressed in activated macrophages and endothelial cells of developing blood vessels of the skin.

In conclusion, our results demonstrate an important role for PKC epsilon in the induction of angiogenesis and macrophage activation during wound healing.

Schlagwörter

Protein Kinase C (PKC), Wundheilung, Angiogenese

Keywords

protein kinase C (PKC), wound healing, angiogenesis

1. Einleitung.....	8
1.1 Protein Kinase C.....	8
1.1.2 Struktur und Einteilung.....	8
1.1.3 Regulation und Aktivierung.....	9
1.1.4 Expression und Funktion von PKC- ϵ	10
1.2 Die Haut.....	12
1.2.1 Die Aufgabe der Haut.....	12
1.2.2 Der Aufbau der Haut.....	12
1.3 Die Wundheilung.....	17
1.3.1 Bildung des Wundschorfes.....	18
1.3.2 Die Entzündungsphase.....	18
1.3.3 Die Reepithelialisierungsphase.....	19
1.4 Die Haut unter dem Einfluss von Protein Kinase C.....	21
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Materialien.....	25
2.1.1 Kits.....	25
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.3 Oligonukleotide.....	27
2.1.4 Antikörper.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Isolation und Kultivierung von Maus-Keratinocyten.....	29
2.2.2 Wundheilungsversuche.....	30
2.2.3 Histologie.....	31
2.2.4 Protein-Extraktion.....	34
2.2.5 Western-Blot.....	34
2.2.6 Die RT-PCR.....	36
2.2.7 Die β – Galaktosidasefärbung.....	40
2.2.7 Proliferationsanalysen mit Keratinocyten.....	41
3. Ergebnisse.....	42
3.1 Die PKC-Isoformen in der Haut.....	42
3.1.1 Das Expressionsprofil von PKC- α in der Haut.....	44
3.1.2 Das Expressionsprofil von PKC- ζ in der Haut.....	48
3.1.3 Das Expressionsprofil von PKC- δ in der Haut.....	50
3.1.4 Das Expressionsprofil von PKC- η in der Haut.....	55
3.1.5 Das Expressionsprofil von PKC- ϵ in der Haut.....	57
3.2 Die in vivo Wundheilung.....	61
3.2.1 Die Bildung des Granulationsgewebes.....	62
3.2.2 Die Regeneration der Haut.....	65
3.2.3 Die Unterschiede in der Proliferation.....	71
4. Diskussion.....	76
4.1 Die Expressionsmuster der PKC-Isoformen in der Haut.....	76
4.2 Die Funktion der PKC-Isoformen in der Epidermis.....	77
4.3 Die Wundheilung.....	81
4.4 Die Rolle von PKC- ϵ während der Angiogenese.....	84

4.5 Die Rolle von PKC- ϵ in der Makrophagenaktivierung	85
4.6 Ausblick	86
5. Zusammenfassung	86
Literaturverzeichnis.....	88
Abkürzungsverzeichnis.....	95
Erklärung	97
Lebenslauf.....	98

1. Einleitung

1.1 Protein Kinase C

Protein Kinase C (PKC) Enzyme gehören zu der Familie von Serin-/Threoninkinasen. Sie wurden zum ersten Mal 1977 von Nishizuka 1977 als proteolytisch aktivierte Kinasen im Rindergehirn beschrieben, die durch Proteolyse, Phospholipide und Ca^{2+} -Ionen aktiviert werden können (Nishizuka, Kishimoto et al.). Heute ist bekannt, dass die PKC-Isoformen eine zentrale Rolle in wichtigen Prozessen der Signalübertragung eukaryontischer Zellen, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose spielen (Dempsey, Newton et al. 2000).

1.1.2 Struktur und Einteilung

Die PKC-Familie umfasst eine Gruppe von 10 verwandten Serin-/Threoninkinasen, die sich anhand struktureller Kriterien und regulatorischer Eigenschaften in drei verschiedene Gruppen unterteilen lassen. In der ersten Gruppe, den *klassischen* PKCs, werden die Isoformen α , β _I, β _{II} und γ zusammengefasst. Zu den *neuen* PKCs gehören die Isoformen δ , ϵ , η und θ . Die *atypischen* PKCs ν/λ und ζ bilden die letzte Gruppe dieser Proteinfamilie.

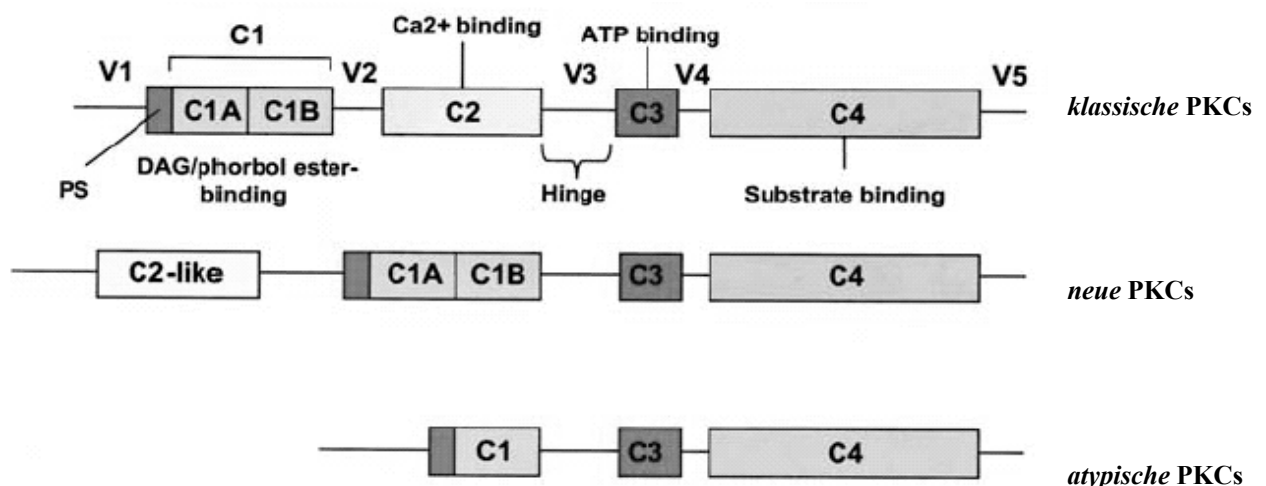


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PKC-Isoformen: Jede Isoform hat eine homologe C-terminale katalytische Domäne und eine N-terminale regulatorische Domäne, welche an Cofaktoren bindet. Die DAG/Phorbol ester C1-Domäne besteht aus zwei Cystein-reichen Zinkfingerdomänen (C1A und C1B) und ist vorhanden bei den *klassischen* und *neuen* PKC-Isoformen. Sie bilden eine hydrophobe Oberfläche welche es möglich macht DAG und Phorbol ester zu binden. Die C2-Domäne bei den *klassischen* PKCs ermöglicht es Ca^{2+} zu binden. Die atypischen PKCs haben noch über eine einzelne C1-Domäne. Die katalytische und regulatorische Domäne werden durch die relativ bewegliche V3-Domäne getrennt. C3 und C4 sind die ATP- bzw. Substratbindungsstellen. Ref. Seng-Lai Tan und Peter J. Parker.

Allen Mitgliedern der PKC-Familie gemeinsam ist eine katalytische Domäne von ca. 45 kDa am Carboxyterminus mit zwei konservierten Regionen (C3 und C4), die für die ATP-Bindung und für die katalytische Aktivierung verantwortlich sind (Parker PJ - Murray-Rust). Der ca. 25-50 kDa große Aminoterminus der PKC-Proteine stellt die regulatorische Domäne dar. Diese besteht aus der konservierten Region C1 und einer Pseudosubstratsequenz, deren Funktion die Suppression der Enzymaktivität bei fehlendem Stimulus ist (Housey GM Johnson, Hsiao et al.). Die C1 Region setzt sich aus zwei Zinkfingerdomänen zusammen, deren Cystein reiche Konsensussequenz jeweils zwei Zinkionen binden kann. Diese Zinkfingerstrukturen bilden eine Grube, in der DAG oder Phorbolster binden können (Nelsestuen, Bazzi). Typisch für alle PKC-Enzyme sind potentielle Bindungsstellen für Lipid-Kofaktoren wie z.B.: Phosphatidylserin in der C1-Region (Dekker LV and Parker PJ). Die C2-Domäne der *klassischen* PKCs vermittelt die Kalziumsensitivität des Enzyms, während die *neuen* und *atypischen* PKC-Isoformen einen verlängerten Aminoterminus besitzen, dessen Funktion noch unklar ist. Die *atypischen* PKC-Enzyme sind aufgrund nur einer Zinkfingerdomäne nicht mehr in der Lage DAG oder TPA zu binden. Ihre Aktivität ist von der Anwesenheit von Phospholipiden abhängig (Housey ,Johnson, Hsiao et al.).

1.1.3 Regulation und Aktivierung

PKCs gehören zur Gruppe der Enzyme, die Phosphatgruppen aus Adenosintriphosphat (ATP) auf Proteine übertragen. Auf diese Weise wird die Aktivität des Substrats verändert und damit eine Regulation der Zelle ermöglicht (Nelsestuen and Bazzi). Abhängig vom Zelltyp haben sie Einfluss auf die Proteinbiosynthese, das Zytoskelett oder auf die Kontrolle des Zellstoffwechsels (Weber-Nordt, Mertelsmann, Finke et al.). Hierzu zählen u.a. die Zelldifferenzierung und die Zellproliferation, aber auch viele vaskuläre Funktionen wie die Vasokonstriktion und die Neovaskularisation (Rando RR - Kishi). Derartige Signalwege können durch spezifische extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder Neurotransmitter und deren meist membranständigen Rezeptoren, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Antigen-Rezeptoren oder Integrinen ausgelöst werden (Nelsestuen and Bazzi). Die Weiterleitung der extrazellulären Signale erfolgt dann über intrazelluläre Signalkaskaden, wie die JAK-STAT-Signalkaskade. Hier werden STAT-Moleküle von der Januskinase aktiviert, die dann im Nukleus als Transkriptionsfaktoren fungieren (Weber-Nordt, Mertelsmann R, Finke et al.). Eine andere Möglichkeit ist der Hormonsignalweg über den sekundären Botenstoff cAMP und weiter zu Protein Kinase A. Ein weiterer Signalweg ist die Kaskade der MAP-Kinasen, die ausgehend von den Kinasen

Raf bis zu den ERK-Kinasen letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Jun und Fos führen (Nelsestuen GL and Bazzi MD).

Innerhalb der verschiedenen Signalkaskaden kommt es zu Rezeptor vermittelter Aktivierung von Effektorproteinen wie Phospholipase C oder D. In der Folge werden unter anderem bestimmte Membranlipide wie Phosphatidylinositol (PI), PI-4-phosphat oder PI-4,5-diphosphat (PIP₂) hydrolisiert. Dadurch entsteht Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG), die als intrazelluläre sekundäre Botenstoffe bekannt sind und das extrazelluläre Signal weiterleiten und verstärken (Dekker LV Parker PJ). Für DAG wurde gezeigt, dass es als endogener Aktivator für PKC-Isoformen fungiert, während IP₃ den cytoplasmatische Kalzium-Spiegel anhebt indem es Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Kalziumspeichern freisetzt, was zur vollständigen Aktivierung der klassischen PKC-Isoformen führt (Parker PJ and Murray-Rust J).

Weiterführende Untersuchungen in Säugerzellen haben PKC als den Hauptziel für Tumorpromotoren der Phorbolsterklasse, z.B.: TPA, und dessen Derivate identifiziert (Rando RR Kishi Y). TPA ist in der Lage die Rezeptor vermittelte PKC-Aktivierung zu umgehen und führt aufgrund konstitutiver Bindung an PKC zu einer anhaltenden Aktivierung, was notwendig ist um Langzeiteffekte wie die Proliferation oder Migration zu initiieren (Rando RR and Kishi Y).

1.1.4 Expression und Funktion von PKC-ε

PKC-ε gehört der Familie der *neuen* und Kalzium-unabhängigen PKC-Isoformen an. Besonders an dieser Isoform ist eine Aktin-Bindungsdomäne, welche zwischen der ersten und zweiten Cystein reichen Region der C1-Domäne liegt (Akita Y, Nishizuka Y and Takai Y et al.). Sie ist in der Lage mit Aktinfilamenten zu assoziieren (Nishizuka Y, Takai Y and Kishimoto et al.).

Bevor eine Stimulierung über verschiedene *second messenger* wie DAG, PIP₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), oder ungesättigte Fettsäuren erfolgen kann, muss PKC-ε an drei verschiedenen Regionen phosphoryliert werden: An Thr-566 für die enzymatische Aktivität und an Ser-729 und Thr-710 für die Fähigkeit den *second messenger* binden zu können (Akita Y). Die intrazelluläre Lokalisation hängt auch vom *second messenger* ab der an die C1 Region bindet. Nach Bindung von DAG transloziert PKC-ε an die Plasmamembrane oder an das Cytoskelett, bei einer Anbindung von Fettsäuren transloziert PKC-ε an das Golgi-Netzwerk (Oancea E Meyer ,1998).

Expression von PKC- ϵ findet in verschiedensten Geweben und Zellen statt. Besonders stark ist sie in neuronalen, hormonellen und immunologischen Zellen (Brodie - Bogi, Acs et al.; Castrillo, Pennington et al. 2001). Während der embryonalen Entwicklung weist das sich entwickelnde Blutkreislaufsystem als erste funktionelle Einheit eine Expression von PKC- ϵ achten Tag *post coitum* auf, parallel verlaufend mit einer Expression von PKC- ϵ in bestimmten Regionen des Herzen (Akita Y LA). Während der weiteren Entwicklung kommt es noch zu Expressionen im zentralen Nervensystem und im Gehirn. Auch im adulten Organismus gibt es eine Expression an den vorher genannten Orten (Akita Y LA).

Zu den physiologischen und pathologischen Funktionen kann gesagt werden das PKC- ϵ von allen *neuen* PKC-Isoformen, die am stärkste exprimierte im zentralen Nervensystem ist (Brodie C, Bogi K - Acs et al.). PKC- ϵ induziert das Wachstum von Dendriten und Axxonen während der neuronalen Differenzierung. Im Bereich der sensorischen Neuronen ist PKC- ϵ bei der Übermittlung von Schmerzsignalen beteiligt (Brodie C, Bogi K - Acs et al.).

Im Immunsystem spielt PKC- ϵ eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Makrophagen. Makrophagen von PKC- ϵ *knock out* Mäusen zeigten Defizite in der Abwehr von Bakterieninfektionen (Aksoy E, Goldman M - Willems et al.; Castrillo, Pennington et al. 2001). Außerdem sind PKC- ϵ und/oder PKC- δ notwendig für eine IgG – stimulierte Phagozytose (Castrillo, Pennington et al. 2001; Larsen, Ueyama et al. 2002). Die Makrophagenaktivierung spielt auch eine wichtige Rolle in der Wundheilung und wird zu einem späteren Zeitpunkt ausführlicher diskutiert.

Im Bereich der Herzentwicklung spielt PKC- ϵ eine wichtige Rolle in der postnatalen Entwicklung (Littler CM, Morris KG Jr - Fagan et al.). PKC- ϵ ist auch in den wirkungsvollsten herzeigenen Schutz involviert, der ischämischen Präkonditionierung. Sie kann durch eine kurzzeitige Herz-Unterdurchblutung ausgelöst werden und damit den Herzzelltod um bis zu 90% verringern (Littler CM, Morris KG Jr - Fagan et al.; Vondriska, Klein et al. 2001). Zusätzlich werden gefährlichen Herzrhythmusstörungen bei der Reperfusion, der wieder einsetzenden Durchblutung, vermindert. Nach einer gezielten Unterbrechung des PKC- ϵ Gens verminderte sich der Schutz vor einem Infarkt durch die Präkonditionierung (Sabri A and Steinberg SF).

PKC- ϵ ist auch in der Entwicklung einiger Krankheitsbilder mit eingebunden. Bei der Diabetes z.B. scheint eine Überexpression von PKC- ϵ im Muskel zu einer verminderten Expression des Insulinrezeptors zu führen (Akita Y). Bei Ausbruch der Alzheimerschen

Krankheit kommt zu einem Abfall der PKC- ϵ Expression im Gehirn (Bredel M - Pollack and Pollack IF).

1.2 Die Haut

1.2.1 Die Aufgabe der Haut

Die Haut erfüllt unterschiedliche Aufgaben:

- sie dient als mechanische Schutzhülle
- ist die erste immunologische Barriere (Langerhans-Zellen)
- Schutz vor Strahlung (Melanocyten)
- Als Ausscheidungsorgan, z.B.: Schweiß
- Temperaturregulation
- Empfindungsorgan (Schmerz- oder Tastsinn)
- Schutz vor Mikroorganismen

Außerdem ist die Haut eines der wenigen Organe, die in der Lage sind sich selbst zu regenerieren. Dieser Aspekt der Wundheilung ist eine der wichtigsten Eigenschaften der Haut.

1.2.2 Der Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einer Größe von ca. 1,8 Quadratmetern (bei einem durchschnittlichen Erwachsenen) das größte Körperorgan. Über ihre Oberfläche sind in unregelmäßigen Abständen 2.800.000 Schmerzrezeptoren (Meissner-Körperchen), 200.000 Temperaturrezeptoren (Krause-Körperchen für Kälte; Ruffini-Körperchen für Wärme) und 500.000 Druckrezeptoren (Vater-Pacini-Körperchen) verteilt.

Die Haut des Menschen setzt sich aus Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subdermis) zusammen.

Die Epidermis

Die Oberhaut wird auch Epidermis genannt und ist die oberste Hautschicht. Sie ist die äußerste Grenze zur Außenwelt (Fuchs E et al). Je nach Ort, kann sie zwischen 0,03 mm (Gesicht) und 4 mm (Rücken, Fußsohlen) dick sein (Fuchs E - Raghavan). Auch das Alter und das Geschlecht haben Einfluss auf die Dicke der Oberhaut (Fuchs E - Raghavan). Sie wird aus den Keratinozyten gebildet. Die Keratinozyten sind Hornzellen, die auch einen Zellkern besitzen. Sie produzieren den Hornstoff, das Keratin. Das Keratin ist wasserabweisend und verleiht der Haut Festigkeit (Fuchs E).

Die Epidermis besteht aus vier verschiedenen Schichten:

- Hornschicht oder Stratum corneum
- Körnerzellschicht oder Stratum granulosum
- Stachelzellschicht oder Stratum spinosum
- Basalschicht oder Stratum germinativum (auch: Stratum basale)

Die oberen zwei Zellschichten bestehen aus verhornten, abgestorbenen Zellen (Marks R). In der Körnerschicht wird eine Vorstufe der Hornsubstanz Keratin, das Keratohyalin, hergestellt (Fuchs E). Aus dieser Schicht schieben sich die verhornten Zellen weiter auf die oberste Ebene, die Hornschicht (Fuchs E and Byrne C). Dort werden die Zellen fortlaufend abgestoßen (Fuchs E, Merrill B, Jamora et al.). So "häutet" sich der Mensch etwa alle 27 Tage. Die Stachelzellschicht und die Basalschicht bestehen aus lebenden Zellen (Denning et al, 2001). Sie sorgen für den Nachschub für die zwei oberen Hautschichten, in denen Hautzellen abgestoßen werden (Fuchs E Byrne and Byrne C). Beim Verschluss von Wunden werden, ausgehend von der Basalschicht der gesunden Haut, neue Hautzellen gebildet. Von dort wandern sie langsam über die heilende Wunde (Martin P ,1997).

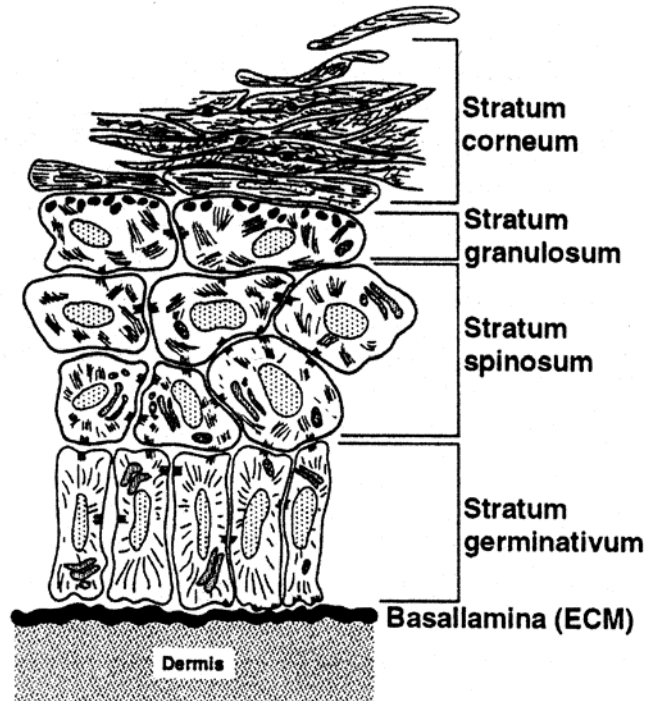


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Epidermis. Aufbau und Unterteilung in die vier Schichten in Verbindung zur Zelldifferenzierung der Keratinozyten. Dargestellt ist auch die Basallamina (extrazelluläre Matrix) und die darunter liegende Dermis. Ref.: (E. Fuchs, 1994)

Eingebettet in die Epidermis sind noch andere Zellenarten, die eine bestimmte „Spezialaufgabe“ übernehmen. Die **Melanozyten** z.B.: produzieren das Pigment Melanin. Melanin gibt unserer Haut Farbe und sorgt bei Sonneneinstrahlung für eine Bräunung der Haut. Dadurch erfüllen sie eine Schutzfunktion. Sie sollen nämlich die gefährlichen UV-Strahlen davon abhalten, in tiefere Hautschichten einzudringen (Kanitakis J. et al.). Die **Langerhans-Zellen**, die ebenfalls in die Epidermis eingebettet sind, sind ein wichtiger Teil des Immunsystems. Langerhans-Zellen phagozytieren zellfremdes Material, verarbeiten dessen Proteine und präsentieren diese auf ihrer Oberfläche in Form von Antigenen. Bei Infektionen können Abwehrzellen aus dem Bindegewebe durch die relativ weiten Interzellularräume bis ins Stratum spinosum der Haut vordringen und die präsentierten Antigene als Hilfe zur Keimabwehr nutzen (Kanitakis J, Lin, Mascaro JM Jr et al.).

Die Dermis

Die Dermis (Lederhaut), der mittlere Bestandteil der Haut, besteht aus zwei Schichten: Stratum reticulare (Netzschicht) und Stratum papillare (Zapfenschicht) (Wysocki AB). Das Stratum reticulare ist die Hauptschicht der Dermis und bildet den Übergang zur Subkutis. Es

ist aus straffem geflechtartigem Bindegewebe aufgebaut, das von groben elastischen Fasern durchzogen wird. In dieser Schicht befinden sich Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen, Nervenbündel und Blutgefäße (Fuchs E.)

Im darüber liegenden Stratum papillare, das aus feinen Bindegewebefasern besteht, liegen die Endschlingen der Kapillargefäße, die die Ernährung und den Stoffwechsel der gefäßlosen Oberhaut sicherstellen. Außerdem sind die Papillen der Ort der freien Nervenendigungen, über die die Schmerzwahrnehmung vermittelt wird, der Tastsinnesorgane wie der Meissnerschen Körperchen und der Kälte- und Wärmerezeptoren. Die ganze Dermis wird von Lymphgefäßen durchzogen. Elastizität und Dehnungsfähigkeit der Haut beruhen vorwiegend auf den Eigenschaften des Hautbindegewebes der Dermis (McMillan JR - Akiyama M Shimizu et al.).

Aufbau der Haare

Haare bestehen aus verhornten Zellschichten der Haut. Sie gehören ebenfalls, wie die Nägel, zu den Hautanhangsgebilden. Die Haarwurzel reichen bis in die Lederhaut und manchmal sogar bis in die Unterhaut (Wolfram LJ).

Das menschliche Haar besteht aus dem Haarschaft, der Haarwurzel und der Haarzwiebel. Der Haarschaft ist derjenige Teil, der aus der Haut herausragt. Die Haarwurzeln sind in der Haut verankert. Sie endet mit einer knollenartigen Verdickung, der Haarzwiebel. Die Haarzwiebel ist an der Haarpapille der Haut befestigt, die aus Bindegewebe besteht. Dadurch erhält das Haar Halt. Die Haarwurzel befinden sich in der Wurzelscheide, die auch Haarfollikel genannt wird. Daran angeschlossen ist eine Talgdrüse, die das Haar einfettet. Zusätzlich wird jedes einzelne Haar von einem Muskel umfasst und von Nervenfasern umspinnen (Wolfram LJ).

Das Haar, das sichtbar über der Hautoberfläche liegt, ist in drei verschiedenen Schichten aufgebaut: In der Mitte befinden sich die Markzellen, die auch Medulla genannt werden (Rees JL). Sie wirken oft schwammartig. Um die Medulla herum liegt spindelförmig eine Schicht verhornter Faserzellen, die auch Cortex genannt wird. Diese Faserschicht ist sozusagen der Hauptbestandteil des Haares. Je nachdem, wie sie aufgebaut ist, bestimmt sich die Festigkeit und Elastizität des Haares (Wolfram LJ). In der Faserschicht befinden sich auch die Farbpigmente. Um die Faserschicht herum ist, wie bei einem Tannenzapfen, das Haar durch eine Schuppenschicht geschützt. Diese Schuppenschicht, die Cuticula, ist zwar mehrlagig, aber auch sehr dünn. Weil sie durchsichtig ist, schimmern durch diese Schicht die Farbpigmente des Haares hindurch.

Aufbau der Nägel

Die Nägel an Fingern und Zehen sind "Verlängerungen" der Haut. Sie bestehen aus harten, verhornten Zellen der Oberhaut, die ganz dicht aneinander liegen. Der Nagel gehört zu den Anhangsgebilden der Haut. Der sichtbare Teil des Nagels wird Nagelplatte genannt. Er ist durchsichtig. Seine rosa Farbe hat er von den Blutkapillaren des Nagelbetts, die unter dem Nagel liegen und durch ihn hindurch scheinen. Der weiße, wie ein Halbmond geformte, Bereich des Nagels wird Lunula oder Nagelmond genannt (Cohen PR). Er erscheint weiß, weil das normalerweise durchscheinende Nagelbett von der Nagelmatrix verdeckt ist. Der mit der Haut verankerte Bereich des Nagels wird Nagelwurzel genannt. Der Nagel wächst, weil sich die oberen Zellen der Nagelmatrix in verhornte Nagelzellen umwandeln (Marshall RC, Orwin DF, Gillespie et al.). Dabei schiebt sich der Nagel vom Mönchchen aus vorwärts bis zum freien Rand, der die Fingerkuppe überragt. In der Woche wächst ein Nagel ungefähr 0,5 bis 1 Millimeter. Ein verlorener Fingernagel braucht etwa drei Monate, um wieder nachzuwachsen (Wysocki AB).

Die Unterhaut

Die Unterhaut oder Subcutis besteht aus lockeren Bindegewebe und Fettpolstern, die als kleine Kissen in das Bindegewebe eingelagert sind. Diese Fettpolster dienen als Wärmeisolierung für den Körper. Ausläufern der festen Fasern der Lederhaut durchziehen das Bindegewebe und sind mit der unter der Unterhaut liegenden Körperfazie verbunden. Sie verbinden die Haut wie Haltebänder mit dem darunter liegenden Gewebe. Je nachdem, wie stark diese Haltebänder entwickelt sind, lässt sich die Haut auf ihrer "Unterlage" verschieben, z. B. auf dem Handrücken, oder nicht verschieben, z. B. unter der Fußsohle. Die Dicke der Unterhaut variiert ganz nach der Menge der eingelagerten Fettzellen (Fuchs E, Raghavan S). Wichtige Rezeptoren in der Unterhaut sind die Vater-Pacini-Körperchen, zuständig für Druck und Vibrationen.

1.3 Die Wundheilung

Die Unterbrechung der anatomischen oder physiologischen Funktion der Haut wird als Wunde bezeichnet. In jedem Fall versucht der Organismus, die Wunde so schnell wie möglich zu schließen und die Funktion des beschädigten Gewebes wieder herzustellen (Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin et al.). Sind nur die obersten Hautschichten (Epidermis) betroffen, kann eine vollständige Regeneration eintreten, die das geschädigte Gewebe völlig gleichwertig wiederherstellt. Ist die Wunde tiefer, d.h. sind auch die unteren Hautschichten betroffen, kommt es zur Narbenbildung (Woolley K, Martin P).

Bei einer blutenden Verletzung der Haut laufen immer dieselben Reparaturprozesse ab. Wie an Diagramm 1 zu erkennen ist, gibt es keine klare Abgrenzung der Prozesse zueinander.

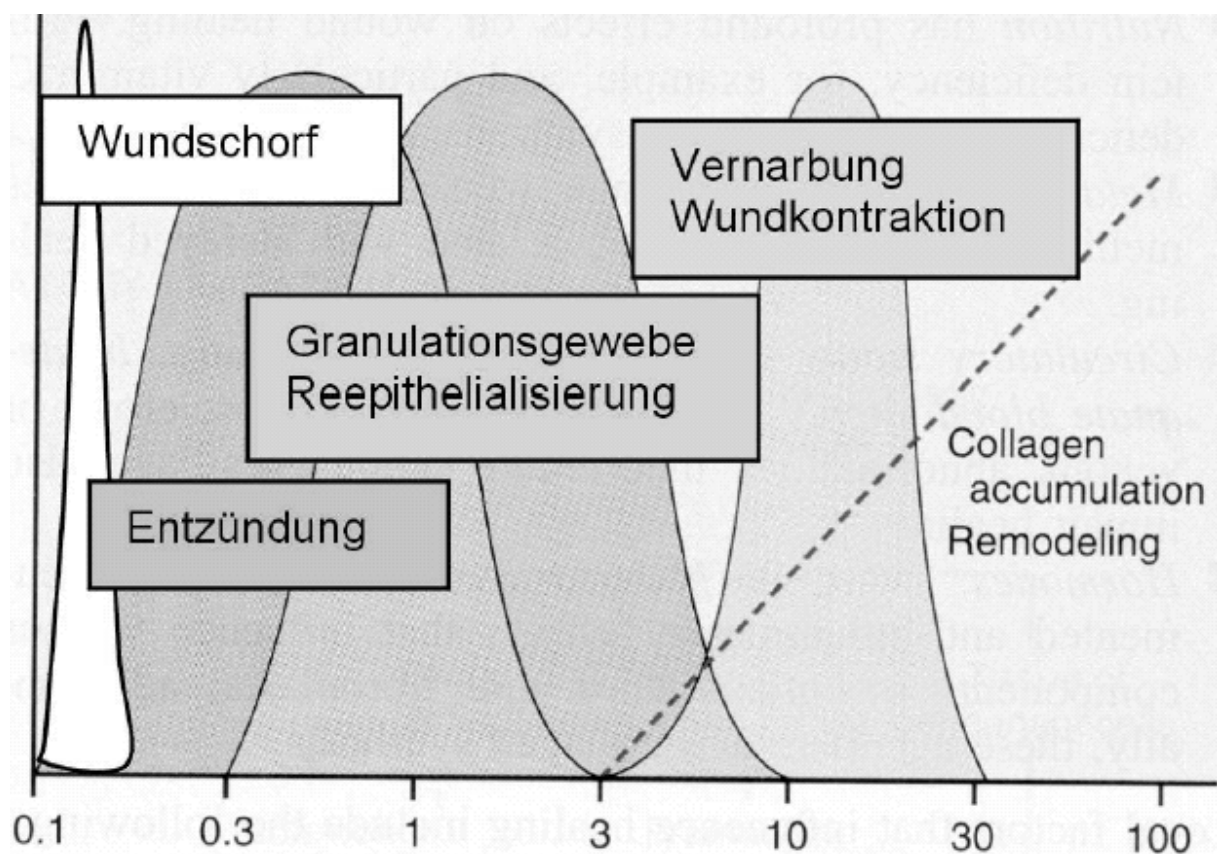


Diagramm 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs (x-Achseinteilung in Tagen) der Wundheilung. Die einzelnen Prozesse der Wundheilung sind in ihrem zeitlichen Ablauf nach der Verletzung abgebildet. Es ist gut zu erkennen wie die Prozesse ineinander übergehen. Ref.: Robbins: *Pathologic Basis of Disease*.

1.3.1 Bildung des Wundschorfes

Der Wundschorf oder auch Wundpropf ist der erste Wundverschluss nach einer Verletzung der Haut. Dieser schnelle Wundverschluss ist notwendig damit der Wundbereich von äußeren Einflüssen, wie Verschmutzungen oder Infektionen, abgegrenzt wird. Der Wundpropf besteht zum größten Teil aus koaguliertem Blut, welches den Blutverlust verringert und die Wundränder vereinigt (Martin P). Wie in Diagramm 1 zu erkennen kann man die Bildung des Wundschorfes auch der Entzündungsphase zurechnen.

1.3.2 Die Entzündungsphase

Die Entzündungsphase beginnt fast unmittelbar nach der Verletzung der Haut. Sie Initialisiert den Beginn der Wundheilung (Martin P). Charakteristische Zeichen sind Schmerzen, eine Rötung und Schwellungen. Wie schon oben erwähnt gehört auch die Bildung des Wundpropfes mit zur Entzündungsphase. Sofort nach der Verletzung kommt es zu einem Platzen von Thrombozyten aus dem Blutstrom. Eiweißstoffe im Blut bilden zusammen mit den Thrombozyten ein Fibringerinnsel (Tomlinson A, Ferguson MW). Gerinnselbildung und Vasokonstriktion von verletzten Gefäßen verringern den Blutverlust (Wysocki AB). Eine Erweiterung nahe gelegener Gefäße führt zum Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen und somit zu einem Gewebsödem. Diese Flüssigkeit wird Wundsekret oder Exsudat genannt und besteht aus Plasma, das durch weiße Blutkörperchen entsprechend aufbereitet wurde (Tomlinson A, Ferguson MW). Durch eine Einwanderung von Blutplättchen und Fibrinbestandteilen in den Wundraum wird nicht nur die Wunde vor der Außenwelt verschlossen, sondern durch eine Degranulation von Blutplättchen gelangen auch biologisch aktive Substanzen, z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Koagulationsfaktoren in den Wundpropf. Im genaueren sind das: PDGF, PDEGF, EGF, TGF- α & β , HB-EGF und IGF-1 (Gillitzer R and Goebeler M Martin P Hopkinson-Woolley J McCluskey et al.). Diese Substanzen induzieren den weiteren Verlauf der Wundheilung. Sie stimulieren z.B. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen in den Wundbereich zu migrieren (Ramadori G, Saile B). Diese Zellen sind für die Immunantwort im Wundraum zuständig. Sie zerstören Bakterien, phagozytieren Fremdkörper und beseitigen schadhafte Zellen (Ramadori G, Saile B). Makrophagen dienen auch noch als Quelle von verschiedenen Wachstumsfaktoren und stimulieren neue Blutgefäße aus dem umliegenden Gewebe in den Wundbereich zu wachsen. Die Makrophagen sind die maßgeblichen Entzündungszellen und "dirigieren" den Heilungsprozess (Park JE and Barbul A). Die aktivierten Makrophagen setzen einen Reiz für die Fibroblasten, welche beginnen

neue Zellen zu bilden (Park JE and Barbul A). Diese so entstandenen Myofibroblasten wandern mit den Makrophagen in das Wundgebiet hinein. Indem Makrophagen Leukozyten ersetzen, stimulieren sie die Einwanderung von Fibroblasten und deren Proliferation. Fibroblasten ihrerseits verstärken die Produktion von Kollagen Typ III (retikuläre Fasern) die Vorstufe des Bindegewebs-Netzwerkes vom Kollagen Typ I (Hart J).

1.3.3 Die Reepithelialisierungsphase

Sie beginnt, je nach Traumagröße, 12 Stunden bis 48 Stunden nach der Verletzung (Yamaguchi Y and Yoshikawa K). In dieser Phase der Wundheilung sollte die Zahl der Monozyten, Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen abnehmen und wir finden fast nur noch Fibroblasten und Myofibroblasten im neuen Gewebe (Park JE and Barbul A)(Diagramm 2). Damit eine Wunde gut verheilen kann, muss sie ausreichend durchblutet werden. Die Neubildung von Blutgefäßen, die Angiogenese, beginnt schon sehr bald, zwei bis drei Tag nach einer Verletzung (Martin P). Dabei werden im Wundgewebe unter anderem von Makrophagen Substanzen abgesondert, die auf die Endothelzellen von intakten Blutgefäßen einwirken: aFGF, TNG- β , WAF, VEGF und EGF (Hackam DJ, Ramadori G and Saile B). Die Endothelschicht ist eine Schicht in der Wand von Blutgefäßen. Durch entstehende Lücken in der äußeren Zellschicht der Blutgefäße beginnen Endothelzellen in Richtung des verletzten Gewebes zu wandern (Li J, Zhang YP, Kirsner et al.). Sie bilden röhrenförmige Gebilde, die sich schließlich zu neuen Gefäßen zusammenschließen. Diesen Vorgang, der hier sehr verkürzt dargestellt ist, nennt man Vaskularisation. Zunächst werden auf diese Weise sehr viele Gefäße neu gebildet. Das so neu gebildete Gewebe heißt auf Grund seines körnigen Aussehens Granulationsgewebe (Sivakumar B, Harry LE, Paleolog et al.). Die neu gebildeten Gefäße und Kapillaren haben die Funktion die sich regenerierende Haut mit Wachstumsfaktoren, Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen (Echtermeyer, Streit et al. 2001). Gleichzeitig mit der Gefäßneubildung beginnt auch die Epidermis sich zu regenerieren. Wie auf Abbildung 3 zu erkennen fangen die Epidermiszellen, die Keratinozyten, an über den Wundbereich zu migrieren. Dabei werden in der Basalschicht der Epidermis vermehrt neue Zellen gebildet, die dann auf dem feuchten Granulationsgewebe vom Wundrand aus die Wunde überziehen (Echtermeyer, Streit et al. 2001). Für diesen Vorgang ist ein gut ausgebildetes feuchtes Granulationsgewebe sehr wichtig (Li J FAU - Zhang, Zhang YP, Kirsner et al.). Mit der Epidermisneubildung fängt die Wunde an, sich langsam zusammenzuziehen. Dies geschieht, weil sich nach und nach im Granulationsgewebe Zellen einlagern, die ähnlich wie Muskelzellen, kontrahieren (Woods A, Couchman and States

2001). Bei diesem Prozess richten sich Kollagenfasern entlang der Zugrichtung aus. Beendet ist die Reepithelialisierung wenn die offene Wunde durch eine einzellige Schicht aus Keratinozyten bedeckt ist. Die epitheliale Migration wird wahrscheinlich durch eine Kontaktinhibition gestoppt (Tomlinson A and Ferguson MW). Die Bildung von neuem stratifiziertem Epithel mit unterliegender Basalmembran erfolgt von den Wundrändern her gegen innen. Die suprabasalen Keratinozyten beginnen zu differenzieren und bilden interzelluläre Adhäsionsstrukturen, um die Epidermis wieder aufzubauen (O'Kane S).

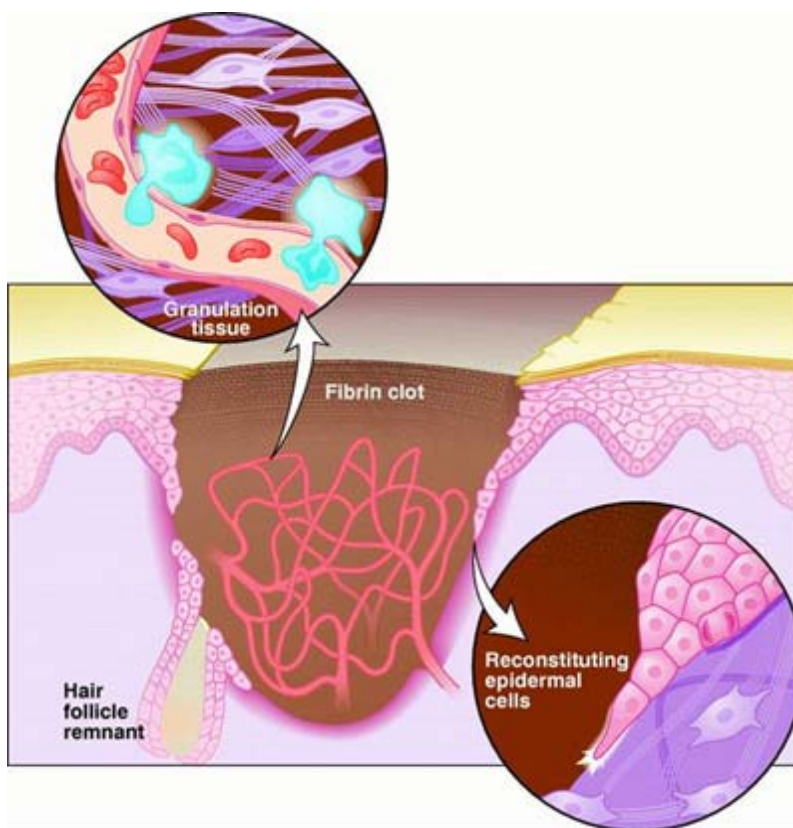


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Granulation und Reepithelialisation. Der Aufbau des Granulationsgewebes und der Vorgang der Epithelisation sind dargestellt. Die Vergrößerung zeigt die an den Wundrändern charakteristisch verdickte Epidermis wie sie unter den Wundpropf (Fibrin clot) migriert. Sie nutzt dabei das Granulationsgewebe als Matrix. Ref.: P. Martin et al.

1.3.4 Die Vernarbungs- und Wundkontraktionsphase

Diese Phase ist die längste im Verlauf einer Wundheilung. Sie kann ganz nach ursprünglicher Größe der Wunde von drei Wochen bis zu zwei Jahre dauern (O'Kane S). Der wichtigste Vorgang in dieser Phase ist die Wundkontraktion und die damit verbundene Entstehung von

neuem Bindegewebe. Dieses neue Gewebe, das u. a. aus Kollagenfasern besteht, beginnt von den Rändern der Wunde langsam nach innen zu wachsen (O'Kane S). Dabei werden zunächst entlang des Fibrinnetzes, das den Thrombus durchzieht, Fibroblasten angelagert, die sich sehr schnell teilen. Sie stellen die Gewebegrundsubstanz her, die u. a. aus Kollagenfasern bestehen. Die Kollagenfasern sind wichtig für die Festigkeit des neuen Gewebes (Tomlinson A and Ferguson MW). Normalerweise, im gesunden Gewebe, richten sich Kollagenfasern nach bestimmten Hauptzugrichtungen aus. Das kann das neu geschaffene Gewebe nicht, weil ihm sozusagen die Orientierung fehlt. Es entsteht Narbengewebe, das biochemisch gesehen mit der normalen Haut fast identisch ist, aber aufgrund der fehlenden Orientierung anders aussieht (O'Kane S). Im Gewebe der Narbe sind keine Haare, Talg- oder Schweißdrüsen eingelagert. Auch die für die Hautfarbe verantwortlichen Melanocyten fehlen im Narbengewebe.

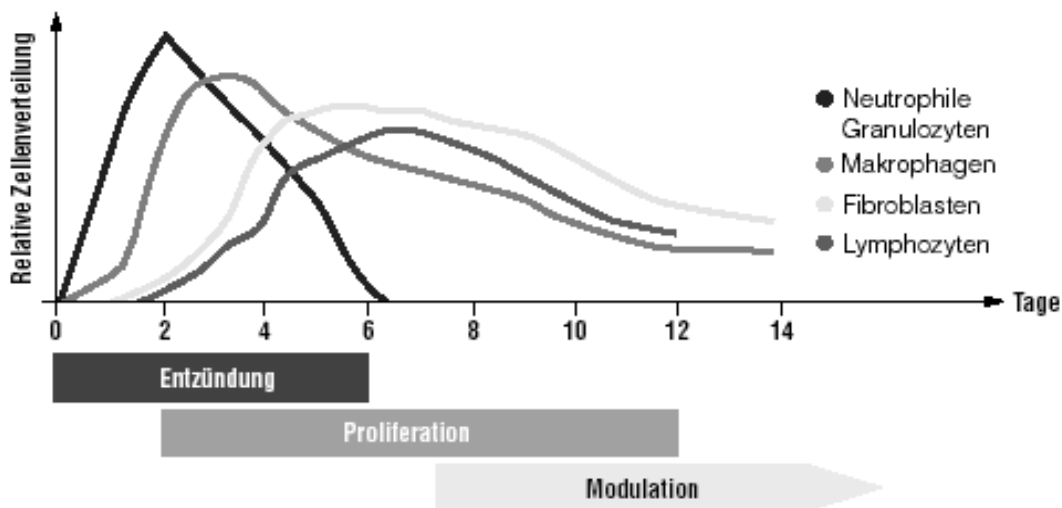


Diagramm 2: Die relative Zellverteilung in Relation zum zeitlichen Ablauf der Wundheilung. Die Neutrophilen Granulozyten und die Makrophagen stellen während der Entzündungsphase die größte Zellfraktion. Später dominieren dann die Fibroblasten und Lymphozyten. Ref.: M. Schäffer, H.-D. Becker

1.4 Die Haut unter dem Einfluss von Protein Kinase C

Über die Funktionen der einzelnen PKC-Isoformen in der Haut ist bisher noch wenig bekannt. Das liegt vor allem am Fehlen spezifischer Aktivatoren oder Inhibitoren für die einzelnen Isoformen.

In der Mausepidermis hat man bis heute mittels RT-PCR, Westernblot- und Northernblot-Analysen die PKC-Isoformen α , δ , η und ζ detektiert. Im Folgenden sollen einige Beispiele gegeben werden die zeigen, dass die detektierten Isoformen an Prozessen wie der Adhäsion, Proliferation, Apoptose und Migration beteiligt sein können.

Besonders stark ist die Expression von PKC- δ . Diese Isoform wurde in allen stoffwechselaktiven Schichten der Epidermis gefunden (Lowell S and Watt FM). Die neue PKC-Isoform eta dagegen wurde nur in der untersten Epidermisschicht dem Stratum germinativum gefunden. Bei einer zunehmenden Differenzierung aus der basalen Schicht nahm auch die Expression zu. Ein Hinweis darauf das PKC- η ein wichtiger Faktor in der Zelldifferenzierung ist (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.).

Ein weiterer Versuchsansatz die Rolle der verschiedenen PKC-Isoformen zu ermitteln, stellt die Untersuchung der Entwicklung von Papilloma- und Hautkarzinoma dar. PKC- δ ist in der Lage die Papilloma- und Karzinomentwicklung positiv zu beeinflussen (Denning MF, Wang Y - Nickoloff et al.). Wenn Maus-Keratinozyten mit oncogenem ras^{HA} transformiert werden wird der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) stimuliert. Das führt zur Aktivierung der src-Kinase, die dann zu einer Tyrosinphosphorylierung von PKC- δ führt (Joseloff E, Cataisson C - Aamodt et al.; Brandt, Goerke et al. 2003). Dadurch wird PKC- δ transloziert bzw. aktiviert. *In vitro* können auch PKC- ϵ , η und ζ von der src-Kinase phosphoryliert werden. Ob die Tyrosinphosphorylierung bei diesen Isoformen eine wesentliche Rolle spielt ist nicht bekannt (Joseloff E, Cataisson C - Aamodt et al.).

Die terminale Differenzierung der Keratinozyten ist ein weiterer wichtiger Prozess in den PKC involviert ist (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.). Diese Differenzierung ist die Grundvoraussetzung für die Entstehung eines mehrschichtigen Epithels (Echtermeyer F, Baciuc PC - Saoncella et al.). Da die Differenzierung ein Calcium abhängiger Vorgang ist, ist es möglich ihn in der Keratinozytenzellkultur zu induzieren. In Western Blot Untersuchungen ist dabei festgestellt worden, dass die Expression sämtlicher vorher in der Haut positiv detektierter PKC-Isoformen ansteigt (Abbildung 10, 15, 20 und 25). Mit der Hilfe von PKC Inhibitoren ist gezeigt worden das PKC- α an der Expression der Differenzierungsmarker Lorikrin, Filaggrin und Transglutaminase 1 beteiligt ist (Tibudan SS, Wang Y FAU - Denning et al.). PKC- α wird an Membranstrukturen transloziert und aktiviert worauf im Nukleus die Expression der Differenzierungsgene über die Modulation von Transkriptionsfaktoren der Jun- und Fos-Familie. PKC- δ transloziert während der terminalen Differenzierung an Membranstrukturen und an das Zytoskelett (Alt A, Ohba M FAU - Li et al.). Unter anderem sorgt PKC- δ für einen Rückgang der Expression des Integrins $\alpha 6 \beta 4$ (Alt A, Ohba M FAU - Li

et al.). Dieses Integrin wird nur in den basalen Keratinozyten exprimiert und sorgt für eine Verbindung mit der extrazellulären Matrix (Alt A, Gartsbein M - Ohba et al.). Geht die Expression zurück können die basalen Keratinozyten in die oberen Schichten der Epidermis migrieren und differenzieren (Alt A, Gartsbein M - Ohba et al.). PKC- η erhöht die Transkription von Transglutaminase und Involucrin (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.).

Ein wichtiger Faktor sind einzelne PKC-Isoformen auch in der Zell-Zyklus Regulation von primären Keratinozyten (Frey, Clark et al. 2000). Allerdings bedeutet hierbei eine PKC Aktivierung nicht auch gleichzeitig eine Erhöhung der Proliferationsrate (Hofmann J). Bei einer TPA Stimulation kommt es dosisabhängig zu einer Inhibition des Wachstums während des Übergangs von der G1- zur S-Phase (Gavrielides MV, Frijhoff AF - Conti et al.). Der gleiche Effekt tritt bei einer Überexpression von PKC- δ und η auf. PKC η assoziiert dazu mit dem Komplex E/cdk2/p21 im Zytoplasma der Zelle (Frey, Clark et al. 2000). Das führt zu einer Inhibition der Kinase Aktivität von cdk2, was letztendlich den Stopp vom Zellzyklus im G1 Stadium bedeutet (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.).

Die Zellmigration in der Haut ist besonders während der Reepithelialisierung in der Wundheilung wichtig (Martin P). Wenn die Keratinozyten in den Wundbereich einwandern kommt es zu einer dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskelettes (Brandt, Gimona et al. 2002). Während der Wundheilung wird noch ein anderer Prozess über einen PKC abhängigen Signalweg induziert. Die Keratinozyten exprimieren und sekretieren die Protease Kollagen 1, um ihre eigene Migration durch die Spaltung von Kollagen zu beschleunigen (Rieck, Cholidis et al. 2001). Auch eine Rolle spielt der Einfluss verschiedener PKC-Isoformen auf Integrine wie $\alpha 6 \beta 4$ oder $\alpha v \beta 6$. Beide sind Oberflächenmoleküle die während dynamischer Prozesse wie der Migration exprimiert werden (Alt A, Gartsbein M - Ohba et al.). Das verschiedene PKC-Isoformen mit diesen Integrinen interagieren wurde mit spezifischen Inhibitoren wie z.B. GF109203X gezeigt.

Bei einer funktionalen Zelladhäsion bedarf es einer Verknüpfung zwischen Zytoskelett und Oberflächenrezeptor, die an Proteine der ECM oder benachbarte Zellen binden (Alt A, Gartsbein M - Ohba et al.). Verschiedene PKC Inhibitoren verringern sowohl die Migration als auch die Zelladhäsion, was mit einem Zusammenbruch des Zytoskelettes zu tun hat (Vasioukhin and Fuchs 2001). Bei einer Stimulation von humanen Keratinozyten mit TPA oder Wachstumsfaktoren, gibt es bei unveränderter Adhäsion einer Verringerung der Migration. Dieses lässt auf eine negative Reaktion bei der Reorganisation des Aktinzytoskelettes schließen. Die TPA-Stimulation beeinflusst auch die Organisation des Zell-Zell-Kontakts in Keratinozyten (Vasioukhin and Fuchs 2001). In den Zonula adherens

kommt es nach TPA-Stimulation beispielsweise zur Delokalisation von Vinkulin und E-Cadherin.

Eine weitere wichtige Funktion für die mehrschichtige Epidermis ist die Apoptose. Geschädigte Zellen, z.B. durch übermäßige UV-Bestrahlung, müssen kontrolliert abgestoßen werden. Innerhalb des so gestarteten Apoptosesignalweges wird die Aktivität der Protease Caspase 3 induziert. Gleichzeitig ist PKC- δ nur noch als katalytisch aktive Form nachzuweisen (Basu A). PKC- δ ist auch die einzige PKC-Isoform die bei der UV-Induzierten Apoptose eine Rolle spielt (Denning MF, Wang Y - Nickoloff et al.). Eine Aktivierung von PKC- ζ wirkte sich inhibierend auf diesen Apoptoseweg aus (Watt FM).

Die Wichtigkeit der verschiedenen PKC-Isoformen und der PKC Signaltransduktion in der Haut wird auch deutlich durch ihren Einfluss auf die Ausbildung verschiedener Krankheitsbilder wie Hautkrebs oder Schuppenflechte. Bei der Schuppenflechte kommt es zu einer anormalen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten. Bei einer starken Aktivierung von PKC- δ und - η durch Phorbolster ließen sich verschiedene Merkmale der Krankheit reproduzieren (Denning et al, 2004). Außerdem ist die Verteilung der unterschiedlichen PKC-Isoformen in von Schuppenflechte befallener Haut verschieden zu der in normaler Haut (Denning et al, 2004).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisendorf, FRG), Roth (Karlsruhe, FRG) und Gibco BRL (Karlsruhe, FRG). Die verwendeten Enzyme stammen von der Firma New England Biolabs (Schwalbach, FRG), Sigma und Gibco.

2.1.1 Kits

- SuperScript II / Gibco
- DAB / BioGenex
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent / Pierce
- BrdU-Kit / Gibco

2.1.2 Puffer und Lösungen

- Trenngelpuffer:
1,5M Tris
0,1% SDS
pH 8,8
- Sammelgelpuffer
480mM Tris
0,1% SDS
pH 6,8
- Laufpuffer (10x)
288,0g Glycin
60,7g Tris
20,0g SDS
auf 2 Liter H₂O
- Transferpuffer (10x)
225g Glycin
60g Tris

- Citrat – Puffer
10 mM Zitronensäuremonohydrat
pH 6,0 mit Natriumhydroxid
- TE – Puffer
10ml Tris / HCl pH 7,5
2ml 0,5M EDTA pH 8
- PBS (10x)
80g NaCl
2g KCl
14,4g Na₂HPO₄
2,5g KH₂PO₄
pH 7,4
- TBS (10x)
24,2g Tris
175,6g NaCl
pH 7,4
- TEA
66,3ml TEA
433,7ml DEPC – H₂O
pH 8
- TNT
6ml 1M Tris / HCl
60ml 5M NaCl
0,6ml Tween 20
534ml dd – H₂O
- NTMT
60ml Tris / HCl 1M pH 9,5
12ml NaCl 5M
6ml Levanusole 200mM
0,6ml TWEEN 20
30ml MgCl₂
372ml H₂O

- MAB
 - 80ml Maleinsäure 1M
 - 15ml NaCl
 - 0,8ml TWEEN 20
 - 704ml dd H₂O

- MEMFA
 - 20ml Formadehyd
 - 20ml MOPS 1M
 - 20ml EGTA 20mM
 - 20ml MgSO₄ 10mM
 - 120 ml dd H₂O

- Protein Extraktionspuffer
 - 12,5ml Tris / HCl 1M pH 7,5
 - 25,0ml EGTA 100mM pH 7
 - 5,0ml EDTA 100mM pH 7
 - 2,5ml Triton X 100 10%
 - 2,5ml beta – Mercaptoethanol 0,3%
 - 204ml dd H₂O

2.1.3 Oligonukleotide

β-Aktin sense	TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G
β-Aktin antisense	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C
PKC α sense	CCT GGT GGC AAT GGG TGA TCT ACA C
PKC α antisense	GAG CCC TTG GGT TTC AAG TAT AGA
PKC δ sense	GCA GGG AGC CCA GCT CAT AGG
PKC δ antisense	GAG GTA CTA GAA GCT GTT CAC TAC
PKC η sense	GTC CTA CCC CAA ATC CTT G
PKC η antisense	TAC TGC ACT TTG CAA GAT TGG GTG C
PKC ζ sense	AGG AGA CAG ATG GAA TTG CTT ACA T
PKC ζ antisense	CCT CCG AGT CGT CTT TAA TGC T
PKC ε sense	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC
PKC ε antisense	CTG CAG CAG CTC CTC GAA CTG GAT

2.1.4 Antikörper

Spezifität	Wirt	Firma
Ki-67	Maus	BD Bioscience
PKC-α	Ratte	New England Biolabs
PKC-δ	Ratte	New England Biolabs
PKC-ϵ	Ratte	New England Biolabs
PKC-η	Ratte	New England Biolabs
PKC-ζ	Ratte	New England Biolabs

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Kultivierung von Maus-Keratinozyten

Die Kultivierung von primären Maus-Keratinozyten diente zur detaillierten Phänotyp-Analyse in PKC-ε mutanten Zellen. Die Keratinozyten wurden aus der Epidermis von neugeborenen Mäusen präpariert. Die neugeborenen Mäuse, nicht älter als zwei Tage, wurden nach dem Töten in PBS gewaschen und die komplette Haut isoliert. Die Hautstücke wurden unter semisterilen Bedingungen 2x in PBS gewaschen und anschließend in 5 ml 1x Dispase-Lösung über Nacht auf Eis inkubiert. Dispase ist eine Metalloprotease, welche die Proteine der extrazellulären Matrix abbaut. Alle folgenden Arbeiten wurden unter Zellkultur-sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Dispase-Inkubation wurde die Epidermis mit Pinzetten von der Dermis abgezogen. Die Epidermis wurde mittels Skalpell (mechanisch) in kleine Stücke geteilt und in 5 ml vorgewärmtes Trypsin 20-25 min. bei 37°C inkubiert. Das Vereinzeln der Keratinozyten wurde in 5 min Abständen durch Schütteln kontrolliert. Bei eindeutiger Trübung wurde die Inkubation durch die Zugabe von einem Volumen Medium mit leicht erhöhter Ca^{2+} Konzentration (Initiierungsmedium) gestoppt. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden noch zusätzliche Zellklumpen vereinzelt. Die Keratinozyten wurden 5 min bei 1200 rpm (ohne Bremse) abzentrifugiert, in frischem Initiierungsmedium resuspendiert und in einer Zelldichte von 2×10^6 in einer 35 mm Zellkulturschale ausgesät. Pro neugeborene Maus lag die Ausbeute bei ca. 10^7 Zellen. Die Zellkulturschalen wurden zuvor mit Proteinen wie z.B. Gelatine (o/n 37°C) und Kollagen (5 min RT) beschichtet. Der leicht erhöhte Ca^{2+} - Spiegel des Initiierungsmediums ist für eine optimale Adhäsion an Matrixproteine nötig und wurde nach 8-12h durch Keratinozyten-Kulturmedium (Proliferationsmedium) mit einem niedrigen Ca^{2+} - Gehalt ersetzt. Eine Mediumserneuerung erfolgte alle zwei Tage.

Im Folgenden konnten die Keratinozyten kryokonserviert oder zum Differenzieren gebracht werden. Bei der Kryokonservierung wurde 3-4h vorher das Proliferationsmedium durch Initiierungsmedium ersetzt und dann 2x mit PBS gewaschen, 20 min Trypsinbehandlung bei 37°C, abzentrifugieren und zur Lagerung bei -80°C in Einfriermedium resuspendieren. Die Differenzierung konnte durch Erhöhen der Ca^{2+} - Konzentration erreicht werden.

- Dispase - Stammlösung (5x): 25 U/ml oder 27,7 mg/ml PBS (Gibco BRL)
- Proliferationsmedium (0,088 mM Ca^{2+}): Keratinozytenmedium mit Supplements (Gibco BRL)
- Initiierungsmedium (0,31 mM Ca^{2+}): 89% Proliferationsmedium und 11% ES – Zellkulturmedium
- Differenzierungsmedium (1,2 mM Ca^{2+}): 20 μ l 1m CaCl_2 auf 18 ml Proliferationsmedium
- Einfriermedium: 70% Initiierungsmedium, 20% FCS, 10% DMSO

2.2.2 Wundheilungsversuche

Das Modell der Wundheilung wurde gewählt um für die Maus, bzw. für die Haut der jeweiligen Maus, einen Stressfaktor zu schaffen. Notwendig war dies, weil die Haut der PKC- ϵ *knock out* Maus keinen erkennbaren Phänotyp zeigte. Das gleiche Fall trat auch bei der PKC- δ *knock out* Maus auf. Bei Wundheilungsexperimenten wurde dann aber gezeigt, dass die Wundheilung in der PKC- δ defizienten Maus langsamer verläuft als in der wildtyp Maus. Dieser Versuchsansatz sollte nun in der PKC- ϵ defizienten Maus wiederholt werden.

Die Wunden wurden mit einer handelsüblichen Revolverlochzange mit einem Durchmesser von 5mm gesetzt. Die Wunden wurden paarweise auf dem Rücken der Mäuse angelegt. Die Versuchstiere durften für diese Art der Wundheilungsexperimente nicht älter als 10 Wochen sein, mussten weiblich und nicht schwanger sein. Um statistische Ungenauigkeiten auszuschließen, wurden pro Versuchsansatz jeweils vier wildtyp Tiere und vier mutante Tiere verwendet.

Vor der Wundsetzung mussten die Tiere anästhesiert werden. Dieses geschah durch die Injektion von Isofluran. Dann wurde den Mäusen der Rücken rasiert und die freigelegte Haut mit Ethanol gereinigt. Die Wunden wurden den Versuchstieren paarweise im oberen Rückenbereich gesetzt. Nach der Wundsetzung wurden die Mäuse ohne eine weitere Behandlung zurück in die Käfige gesetzt. Der Wundheilungsvorgang sollte auf natürlichem Weg verlaufen. Nach einer bestimmten Heilungszeit, in diesem Fall 3, 5, 7 und 10 Tage (Standardparameter bei Wundheilungsversuchen), wurden die Wunden freipräpariert und in direkt zur Fixierung in 4% PFA überführt.

2.2.3 Histologie

Histologische Schnitte wurden für morphologische Untersuchungen der normalen Haut und der Wunden angefertigt, sowie für Antikörper – Färbungen um bestimmte Proteine zu markieren.

2.2.3.1 Mikrotom-Schnitte

Für Mikrotom-Schnitte wurden die Präparate, in diesem Fall Haut aus dem Rückenbereich der Maus, direkt in 4% PFA (Paraformaldehyd) zur Fixierung über Nacht bei 4°C überführt. Danach wurden die Präparate über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol in Paraffin eingebettet:

- 1x 1h in 30% Ethanol / PBS
- 1x 1h in 50% Ethanol / PBS
- 1x 1h in 70% Ethanol / PBS
- 1x 1h in 90% Ethanol / PBS
- 1x 1h in 100% Ethanol
- 1x 1h in Ethanol / Xylol
- 1x 1h in Xylol
- 1x 1h in Xylol / Paraffin

Anschließend wurde das Präparat über Nacht in Paraffin inkubiert. Danach wurde das Präparat in Paraffin eingebettet. Die Lagerung fand bei 4°C statt.

Die histologischen Schnitte wurden mit dem Mikrotom in einer Dicke von 10µm angefertigt, in einem geheizten Wasserbad gestreckt und dann auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen. Diese Objektträger wurden dann bei 37°C über Nacht getrocknet. Auch hier fand die Lagerung, bei nicht sofortiger Benutzung, bei 4°C statt.

Die Hämalaun-Färbung

Die Hämalaun – Färbung wurde genutzt um die Strukturen (Histologie) der Haut oder der Wunden sichtbar zu machen. Der erste Schritt bei dieser Arbeitsmethode war, genau wie bei der Antikörper – Färbung, das Entwachsen mit Xylol und das Rehydrieren über eine absteigende Ethanolreihe. Danach kamen die Präparate für 5 min in ddH₂O. Dann erfolgte der eigentliche Färbeschritt in der Hämalaunlösung. Die Inkubationszeit hier sollte zwischen 2 und 5 min liegen, ganz nach erwünschter Farbintensität. Der nächste folgende Schritt ist die Gegenfärbung mit Kalialaun (2x 2 min). Das sollte einer möglichen Überfärbung entgegen wirken. Nach diesen Färbeschritten wurden die Präparate wieder in H₂O überführt. Erst ddH₂O (2x 1 min), danach 10 min in warmes Leitungswasser und dann wieder für eine Minute in ddH₂O. Anschließend erfolgten eine aufsteigende Ethanolreihe und eine Inkubation in Xylol. Diese letzten Schritte wurden vorgenommen um es zu ermöglichen die Präparate mit dem xylolhaltigen Pertex einzudeckeln.

Die Antikörper-Färbung auf Paraffinschnitten

Hierbei werden die verschiedenen PKC - Isoformen im Gewebe markiert und sichtbar gemacht. Dazu wird ein primärer Antikörper verwendet, welcher in der Lage ist direkt eine bestimmte PKC - Isoform zu markieren. Ein sekundärer Antikörper der gegen den ersten gerichtet ist und mit einem bestimmten Enzym konjugiert ist wird zur Verstärkung des Signals benutzt. Das gekoppelte Enzym (HRP) ist in der Lage ein bestimmtes Substrat (DAB) umzusetzen und eine Farbreaktion hervorzurufen.

Der erste Schritt bei einer Antikörper – Färbung ist das Entwachsen der Präparate durch Xylol (2x 10min) und das rehydrieren durch eine absteigende Ethanolreihe (2x 5min abs. Ethanol; 95 % Ethanol / H₂O; 90% Ethanol / H₂O; 90% Ethanol / H₂O; 70% Ethanol / H₂O; 30% Ethanol / H₂O: á 1 min bei RT). Dann wurden die Schnitte in H₂O überführt.

Anschließend folgte das so genannte „demasking“. Dabei wurden die Präparate 2 min in Citratpuffer (10mM, pH6.0) aufgeköcht um die Epitope der Proteine freizulegen. Daraufhin folgte der erste Waschrisschritt und das blockieren. Gewaschen wurde 3x in TBS bei RT. Geblockt wurde mit Methanol und Wasserstoffperoxyd (20 min, RT). Nach einem weiteren Waschrisschritt (3x TBS) wurde der erste Antikörper, der gegen eine spezifische PKC – Isoform gerichtet war, aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

Darauf folgte ein weiterer Waschschrift mit TBS (3x á 5 min). Der zweite Antikörper, der daraufhin aufgetragen wurde, ist gegen den ersten gerichtet und mit einem Enzym zur Signalverstärkung konjugiert. Verdünnt wurde wieder TBS mit 10% FCS, die Inkubationszeit betrug 4 Std. Nach weitere Waschschriften wurde der Objektträger mit dem Substrat überschichtet, das für die Farbreaktion verantwortlich war. Verwendet wurde das BioGenex – Kit nach Herstellerangaben mit dem Farbsubstrat DAB. Die Inkubationszeit betrug zwischen 2 und 5 min. Abgestoppt wurde die Farbreaktion mit TBS.

2.2.4 Protein-Extraktion

Die Proteinextraktion erfolgte entweder direkt aus Mausgewebe, z.B. Haut oder Gehirn, oder aus Zellkulturmaterial (Keratinozyten). Die Probe wurde zuerst in kaltes PBS aufgenommen um dann in Extraktionspuffer überführt zu werden. Der Extraktionspuffer wurde in einem Bouncer vorgelegt. Im Bouncer wurde die Probe dann homogenisiert. Um die lösliche Fraktion der Proteine von der unlöslichen zu trennen, war es nötig die vollständig homogenisierte Probe in einer „Corex - Tube“ zu zentrifugieren. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abgenommen. Die homogenisierten Proteine wurden dann in ½ Volumen 4x Proben – Puffer aufgenommen und für 5 min. bei 100°C erhitzt. Wenn die Proteine daraufhin nicht direkt über SDS – Gel aufgetrennt wurden, wurden sie bei -20°C gelagert.

2.2.5 Western-Blot

Die Western-Blot Methode wurde genutzt um ein Expressionsprofil der verschiedenen PKC-Isoformen in der Maushaut zu erstellen. Zwei unterschiedliche Varianten, das „Tankblot System“ und das „Semidryblot System“, kamen dabei zum Einsatz.

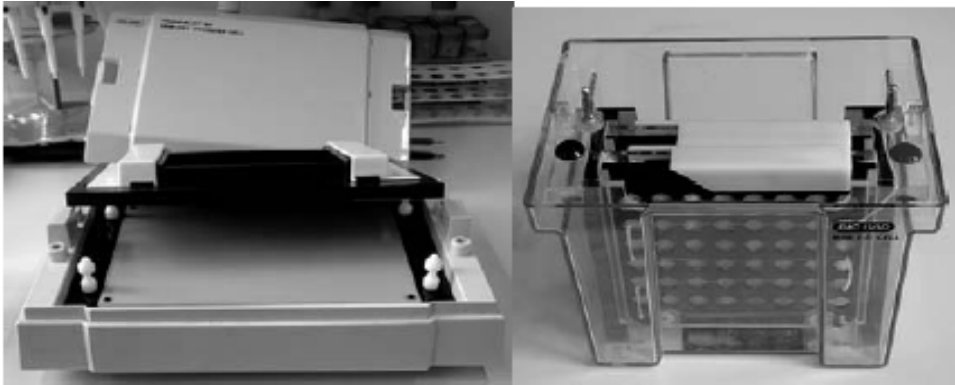


Abbildung 4: Das „Semidryblot System“ (BIORAD) und das „Tankblot System“ (BIORAD).

Beim Western-Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrocellulosemembran) transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Außerdem wird bei diesem Vorgang das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine können renaturieren und dabei teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, allerdings nicht ihre Quartärstruktur. Sie können somit von Antikörpern erkannt werden.

SDS-Gel

Die Proteingele setzen sich aus einem 10%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel zusammen. Das Trenngel besteht aus 6.7 ml H₂O, 4.0 ml Trenngelpuffer, 5.3 ml Acrylamid, 200µl APS und 30µl TEMED. Das Sammelgel setzt sich aus 4.4 ml H₂O, 1.9 ml Sammelgelpuffer, 1.2 ml Acrylamid, 150 µl APS und 15 µl TEMED zusammen. Mit dem Sammelgel wurde das Trenngel, nachdem es fest war, überschichtet. Die Proteinextrakte, welche in möglichst gleicher Konzentration aufgetragen wurden, sind dann bei 100 – 150 Volt aufgetrennt worden. Die Proteinauftrennung über die SDS Gele fand in 1x Laufpuffer statt.

Nach der Proteinauftrennung wurden diese dann aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde das Gel aus der Laufkammer genommen und in Transferpuffer überführt. Das eigentliche blotten auf eine Nitrocellulosemembran fand dann bei 0,4 mA für 1 Std. statt. Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran kam es zur Antikörpermarkierung.

Antikörpermarkierungen

Für die Antikörpermarkierung sind zwei Antikörper notwendig. Der erste Antikörper ist direkt gegen das gesuchte Protein gerichtet. Der zweite Antikörper markiert den ersten und ist mit einem bestimmten Enzym konjugiert, welches letztendlich ein Signal auf dem Röntgenfilm ergibt.

Vor der ersten Markierung musste die Membran blockiert werden. Da Antikörper Proteine sind, würden sie sich sonst an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Dies geschah mit 1% Milchpulver in PBS. Diese Proteine binden an sämtliche freien Bindungsstellen der Membran. Damit bleibt den Antikörpern nur mehr die Möglichkeit an das Epitop ihres Antigens zu binden.

Die Inkubationszeit war von der Wahl des ersten Antikörpers abhängig. Bei manchen Antikörpern reichte eine Inkubationszeit von 1 Std. bei RT, bei einigen Antikörpern musste über Nacht inkubiert werden. Der erste Antikörper wurde direkt in die Milchpulverlösung gegeben. Inkubiert wurde über Nacht bei 4°C. Der zweite Antikörper inkubierte nach einem Waschschrift (3x PBS + 0,1% TWEEN á 5 min) 4 Stunden bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift (3x PBS + 0,1% TWEEN á 5 min) wurde die Membran dann mit SuperSignal West Pico (Pierce) entwickelt.

2.2.6 Die RT-PCR

Die Proteinextraktion

Um eine RNA-Extraktion vorzunehmen, wurden Gewebe oder Zellen mit Trizol (ca. 1 ml pro 50mg) in einem Bouncer resuspendiert. Mit der Resuspension wurde solange fort gefahren bis das Gewebe vollständig gelöst war. Dann folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur, der eine Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml eingesetztem Trizol folgte. Dieser Ansatz wurde dann bei 12000 x g für 15 min zentrifugiert (4°C) um eine Phasentrennung herbei zu führen. Die obere farblose Phase wurde abgenommen und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1ml Trizol versetzt um eine Fällung der enthalten RNA herbeizuführen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 12000 x g für 15 min (4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde das restliche Pellet in TEB-Puffer oder DEPC-H₂O resuspendieren. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Extinktionen bei den Wellenlängen 260 nm (Nukleinsäuren), 280 nm (Aromaten und aromatische Aminosäuren in Proteinen) sowie bei 320 nm (weder Aminosäuren noch Nukleinsäuren absorbieren hier) gemessen. Die Extinktion bei 320 nm stellt einen Korrekturfaktor dar, der von den anderen Extinktionen abgezogen werden musste. Der Quotient der Extinktionen aus 260 und 280 nm bestimmt die Reinheit der RNA. Liegt das Verhältnis zwischen 1,7 und 2 ist die Probe sauber. Gelagert wurde die RNA bei -80°C.

Die Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit dem SuperScript II Kit der Firma Gibco BRL nach vorgeschriebenem Protokoll vorgenommen. Bei der dabei synthetisierten cDNA handelt es sich um eine in DNA umgeschriebene Kopie der mRNA, die daher keine Intronsequenzen enthält. Man benutzt hierfür das Enzym Reverse Transkriptase. Der benötigte Primer wird von einem Poly-dT-Oligonukleotid dargestellt, das mit dem 3'-Poly-A-Schwanz der mRNA interagiert. Der entstehende RNA-DNA-Hybrid dient dann als Template für eine sich anschließende RT-PCR mit Genspezifischen Primern.

Durchführung:

5,0 µL RNA

2,5 µL OligodT-Primer (10 mmol L⁻¹)

22,5µl ddH₂O

10' 70 °C, dann sofort auf Eis inkubieren

10,0 µL Puffer

5,0 µL DTT (0,1 mmol L⁻¹)

2,5 µL dNTP

2' 42 °C

2 µL Superscript II Reverse Transkriptase (GibcoBRL)

50' 42 °C

15' 72 °C (Inaktivierungsschritt)

Die Probe wurde bei -80°C gelagert.

Durch die reverse Transkriptase sind nun alle in der RNA-Präparation vorkommenden mRNAs in cDNA zurückkopiert worden. Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann nun die für die verschiedenen PKC Isoformen codierende cDNA spezifisch amplifiziert werden.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um innerhalb kürzester Zeit, ein spezifisches Genprodukt exponentiell zu vermehren. Hierfür wird in der Regel doppelsträngige DNA eingesetzt. Die Reaktion setzt sich aus drei, sich wiederholenden Einzelschritten zusammen:

1. Denaturierung: Durch Erwärmung auf 93 °C werden Wasserstoffbrücken aufgebrochen. Es liegen dann DNA-Einzelstränge vor.
2. Annealing: An die Einzelstränge können bei geeigneter Temperatur künstlich synthetisierte Oligonukleotide (Primer) an komplementäre DNA-Abschnitte binden. Dabei werden immer zwei Oligonukleotide je Reaktion eingesetzt, die jeweils nur an einen der beiden Einzelstränge binden können.
3. Elongation: Eine Polymerase verlängert in Anwesenheit von Nucleotiden und Magnesium als Cofaktor die Oligonukleotide komplementär zu der DNA-Matrize bei einer Temperatur von 72 °C.

Diese Schritte wiederholen sich 30 - 40-mal je nach Kopienanzahl des gesuchten Genes.

Durchführung:

Ansatz für die PCR zur Amplifizierung des PKC δ –Gens.

36,2 μ L ddH₂O

5 μ L PCR-Puffer mit MgCl₂, 10 x konzentriert 0,5 μ L dNTP

3 μ L Primer sense (10 μ M)

3 μ L Primer antisense (10 μ M)

0,3 μ L Taq Polymerase (3,5 Units/ μ L)

Vor Zugabe der Matrizen DNA wird die Temperatur des Thermocyclers auf 93 °C gebracht, die Probe wird in den Thermocycler gestellt und 1 min bei 93 °C inkubiert. Dies erhöht die Spezifität der Reaktion, weil mögliche Sekundärstrukturen der Oligonukleotide aufgebrochen werden. Dann werden 1 μ L cDNA in den Reaktionsansatz pipettiert. Eine weitere Inkubation bei 93 °C für 15 min sorgt dafür, dass die DNA Probe ohne Sekundärstrukturen vorliegt.

Danach folgen 35 Zyklen, wobei ein Zyklus aus den Einzelschritten 94 °C - 30 sec, 65 °C - 30 sec, 72 °C - 1 min besteht. Im Anschluss an die PCR (nach ca. 2 h) wird der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen.

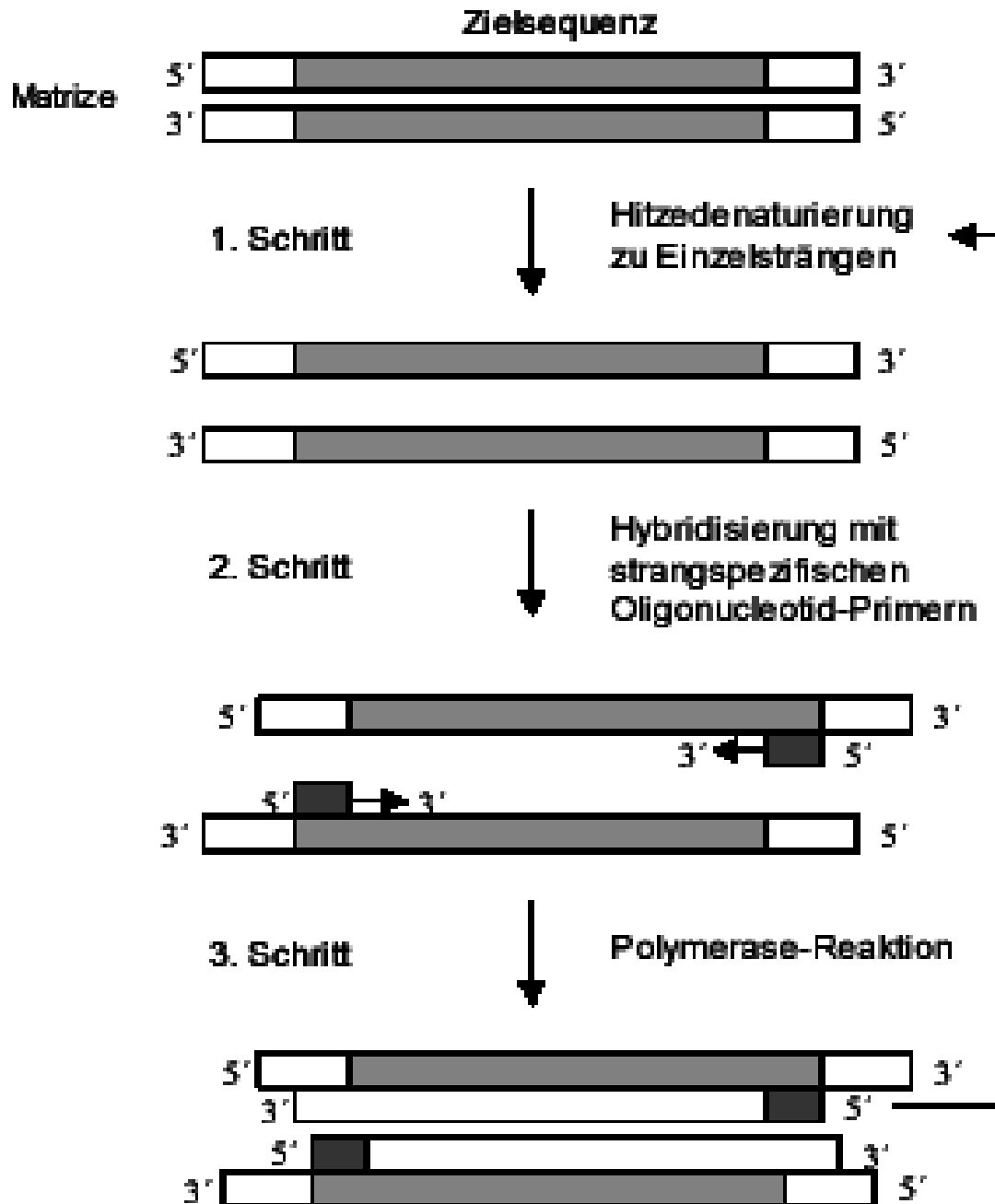


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion. Nach: Gassen und Schrimpf, 1999

1. Thermische Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges durch Aufschmelzen bei 90-94°C; es entstehen einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle
2. Annealing/Primerhybridisierung an einzelsträngige DNA durch Senkung der Temperatur auf die Primer-spezifische Annealing-Temperatur
3. Elongation, d.h. Verlängerung der Primer, also DNA-Synthese bei 72°C durch eine Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die eine kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne Enzymzugabe erlaubt.

Gelelektrophoretische Trennung des PCR-Produktes

Die Elektrophorese ist die wichtigste Methode bei der Analyse von Nukleinsäuren, da die Moleküle schnell und kostengünstig getrennt werden. Außerdem ist die Größentrennung genauer als bei anderen Methoden. Als Trägermaterial verwendet man Agarose, ein Polymer aus verschiedenen Galaktoseeinheiten, oder Polyacrylamid. Ladungsträger bei den Nukleinsäuren ist das Phosphat - Zuckerrückgrat. Dies hat zur Folge, dass Nukleinsäuren innerhalb eines großen pH-Bereichs negativ geladen sind und somit zur Anode wandern.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren im Gel hängt nicht nur von der absoluten Masse sondern auch von der Form ab, die besonders wichtig bei einzelsträngiger DNA und RNA ist. Durch intramolekulare und intermolekulare Basenpaarungen können Sekundärstrukturen ausgebildet werden, die das Laufverhalten im Gel verändern.

2.2.7 Die β – Galaktosidasefärbung

Die β – Galaktosidasefärbung wurde zur Analyse der Expression des Reportergens unter der Kontrolle des endogenen PKC – ϵ Promotors in der Maus benutzt. Expressionsstudien wurden in der adulten Maushaut und in der Primärkultur von Keratinozyten gemacht. Die zu färbenden Präparate wurden in PBS gewaschen und in ausreichendem Volumen Fixierlösung für 30 min bei 4°C unter schütteln fixiert. Bei Zellen wurde die Fixierzeit auf die Hälfte reduziert. Danach wurde 3x 15 min gewaschen. Die Färbung erfolgte bei 37°C und leichtem schütteln unter Lichtgeschützten Bedingungen über Nacht. Das Volumen der Färbelösung richtete sich nach der Größe des Präparates. Bei Zellen, die auf Eindeckelgläschen kultiviert wurden, reichten z.B. ein oder zwei Tropfen. Nachfixiert wurde mit Waschlösung mit 10% GDA. Die Zellen wurden dann mit Hydro-Mount eingedeckelt, die Gewebepreparate in 50% Glycerin eingelagert.

2.2.7 Proliferationsanalysen mit Keratinozyten

BrdU-Labeling

Die Proliferation von Zellen wurde in Korrelation von der DNA-Synthese untersucht. Der Einbau von BrdU anstelle von Thymidin wurde mit Hilfe eines „BrdU-Labeling and Detektion Kit II“ von Boehringer nach Herstellerangaben bestimmt. Bei einer Konfluenz von 50 – 60% der Keratinozyten wurden diese 12 h mit dem BrdU - Markierungsreagenz in Proliferationsmedium kultiviert. Der Nachweis erfolgte Immunfluoreszenz-mikroskopisch laut Hersteller mit einem anti - BrdU Antikörper in H₂O-gesättigter Atmosphäre und wurde mit DAPI gegen gefärbt. Die Keratinozyten wurden in MOVIOL eingedeckelt.

Ki-67 Proliferationsassay

Ki-67 ist ein Marker der während der Proliferation einer Zelle auf deren Oberfläche exprimiert wird. Mit einem spezifischen Antikörper gegen Ki-67 ist es möglich eine proliferierende Zelle zu erkennen. Um das bei einem histologischen Präparat zu ermöglichen wurde das gleiche Verfahren wie unter 2.2.5.2 angewandt. Der Ki-67 Antikörper wurde nach Herstellerangaben verdünnt und inkubiert. Für die Farbreaktion wurde das BioGenex-Kit nach Herstellerangaben mit dem Farbsubstrat DAB verwendet. Die Inkubationszeit betrug je nach Stärke der auftretenden Färbung 2 bis 5 Minuten. Abgestoppt wurde die Farbreaktion mit TBS.

3. Ergebnisse

3.1 Die PKC-Isoformen in der Haut

Um fundiert Fragestellungen in der Haut im Bezug auf die verschiedenen PKC-Isoformen zu bearbeiten war es nötig ein verlässliches Expressionsprofil dieser Proteine zu erarbeiten. Wichtig ist in diesem Zusammenhang der genaue Ort der Expression. Ist die Isoform ubiquitär nachweisbar, ist die Expression auf eine bestimmte Hautschicht beschränkt oder findet sie z.B. nur in den Blutkapillaren statt? Auf Grund des Expressionsortes ist es möglich erste Rückschlüsse zu ziehen auf die Funktion einer bestimmten Isoform. Wird z.B. eine Isoform nur in den unteren der vier Schichten der Epidermis exprimiert, ist es möglich, dass diese Isoform wichtig für die Zelldifferenzierung ist. Findet die Expression nur in den Blutkapillaren statt, deutet das eher auf eine Aufgabe in der Entwicklung dieser Kapillaren z.B. nach einer Verwundung der Haut hin.

Die Expressionsprofile wurden durch das Western Blot Verfahren, die RT-PCR und immunohistochemische Nachweise auf Hautpräparaten erstellt.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung einer dieser PKC-Isoformen in der Wundheilung. Nach Auswertung der vorliegenden Expressionsdaten wurde die Isoform PKC- ϵ ausgewählt. PKC- ϵ wird besonders stark in den Blutkapillaren der Haut exprimiert. Mit der im Labor generierten PKC- ϵ ^{-/-}-Maus stand zudem ein Tiermodell zur Charakterisierung Isoform-spezifischer Funktionen zur Verfügung

3.1.1 Das Expressionsprofil von PKC- α in der Haut

RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR (*Reverse Transkription / Polymerase Chain Reaction*) sollte nachgewiesen werden, welche PKC-Isoformen in der Haut überhaupt transkribiert werden. Dazu wurde Total-RNA aus den einzelnen Bestandteilen der Haut isoliert. Durch die Reverse Transkriptase wurde diese wiederum in cDNA (*c(opy)DNA*) umgeschrieben. Mit dieser cDNA als Template wurden dann die PCR-Reaktionen mit für die Isoformen spezifischen Primern vorgenommen.

Es wurde aus primäre Keratinozyten, Dermis, Epidermis und der gesamten Haut (vor Dispaseverdau) isoliert.

Aufgrund der nicht-linearen DNA-Amplifikation in Sensitivität der RT-PCR war es in diesem einfachen Reaktionsansatz allerdings nicht möglich, über die Bandenstärke Rückschlüsse auf die PKC-Konzentration in den einzelnen Hautbestandteilen zu ziehen.

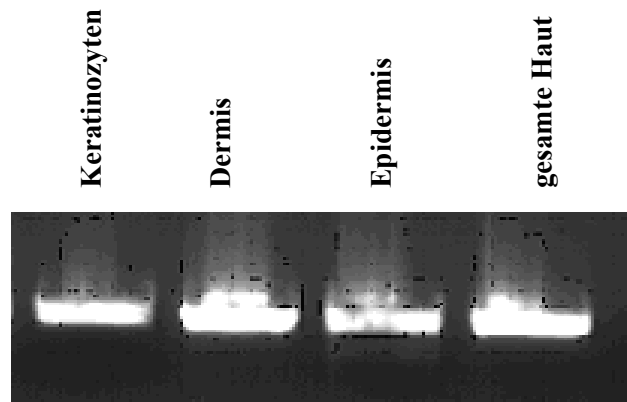


Abbildung 6: RT-PCR mit Primern für PKC- α . Als Vorlage wurde cDNA-Präparate aus primären Keratinozyten, Dermis, Epidermis und Gesamthaut verwendet.

In allen vier untersuchten Hautbestandteilen der Haut konnte eine mRNA - Expression von PKC- α nachgewiesen werden.

Western Blot

Bei der Western Blot Methode wurden die verschiedene Proteinextrakte aus den Keratinozyten, der Epidermis, der Dermis und der gesamten Haut verwendet. Die Isolierung vom Gesamthaut-Extrakt war notwendig, um fest zu stellen ob eine Modulation der PKC-Expression durch den Dispase Verdauungsschritt zur Trennung von Dermis und Epidermis stattfindet. Dass auf ein SDS-Gel immer die gleichen Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden, ist mit einer Comassiefärbung überprüft worden.

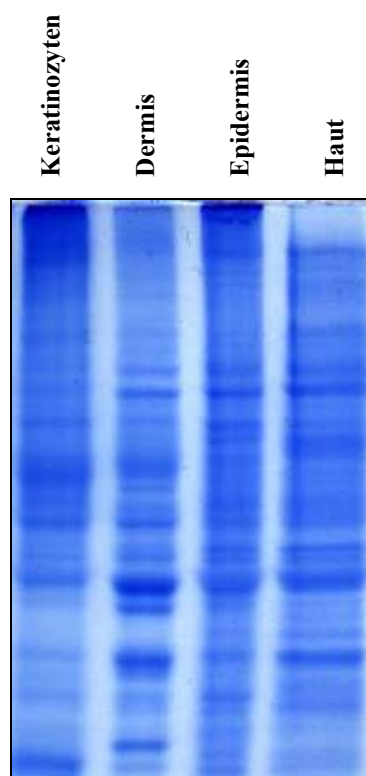


Abbildung 7: Comassiefärbung mit den Proteinextrakten aus primären Keratinozyten, Dermis ,Epidermis und gesamter Haut. Die gleichmäßige Färbung garantiert eine einheitliche Konzentration der Proteine.

Die homogene Intensität der Comassiefärbung gewährleistet, dass auf den Gelen eine einheitliche Proteinkonzentration aufgetragen wurde. Um später Vergleiche ziehen zu können wurden bei allen folgenden Western Blots die gleichen Proteinextrakte und die gleiche Proteinkonzentration mit 10µg/ml verwendet.

Ziel dieser Versuchsreihe war es, herauszufinden welche Isoformen in den verschiedenen Hautschichten exprimiert wird und in welcher Stärke.

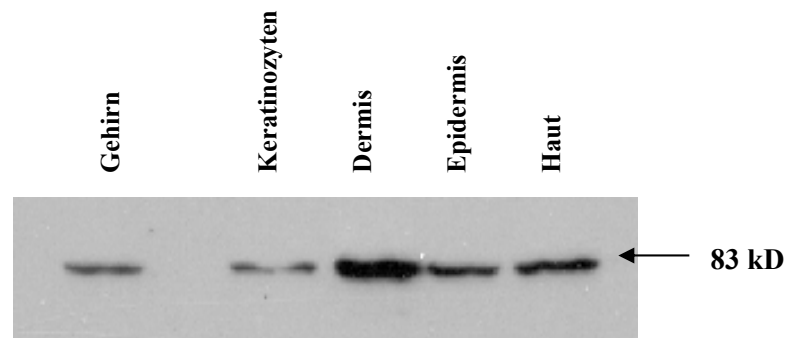


Abbildung 8: Western Blot mit einem Antikörper gegen PKC- α . Aufgetragen wurden Proteinextrakte mit einer Konzentration von 10 μ g/ml aus dem Gehirn (Positivkontrolle), von Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut. Die erwartete Bandengröße von PKC- α liegt bei 83 kD.

Es gibt eine PKC- α Expression in allen vier getesteten Extrakten der Haut. Dabei war die Proteinkonzentration in Gehirn und Keratinozyten am geringsten, während besonders die Dermis eine starke Proteinexpression von PKC- α zeigt.

Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie wurden die PKC-Proteine mit Hilfe eines Antikörpers auf Paraffinschnitten von Hautpräparaten markiert. Die verwendeten Präparate hatten eine Dicke von 10 μ m.

Bei dieser Arbeitsmethode liegt das Hauptaugenmerk auf dem Expressionsmuster der Enzyme *in situ*, nicht auf der Stärke der Expression. Auf den Hautschnitten ist die Histologie des Gewebes gut zu erkennen, d.h. es ist sogar möglich, die einzelnen Schichten der Epidermis voneinander zu unterscheiden. Dazu wurden Präparate aus einem Bereich genommen (oberer Rückenbereich) in welchem die Haut besonders dick ist.

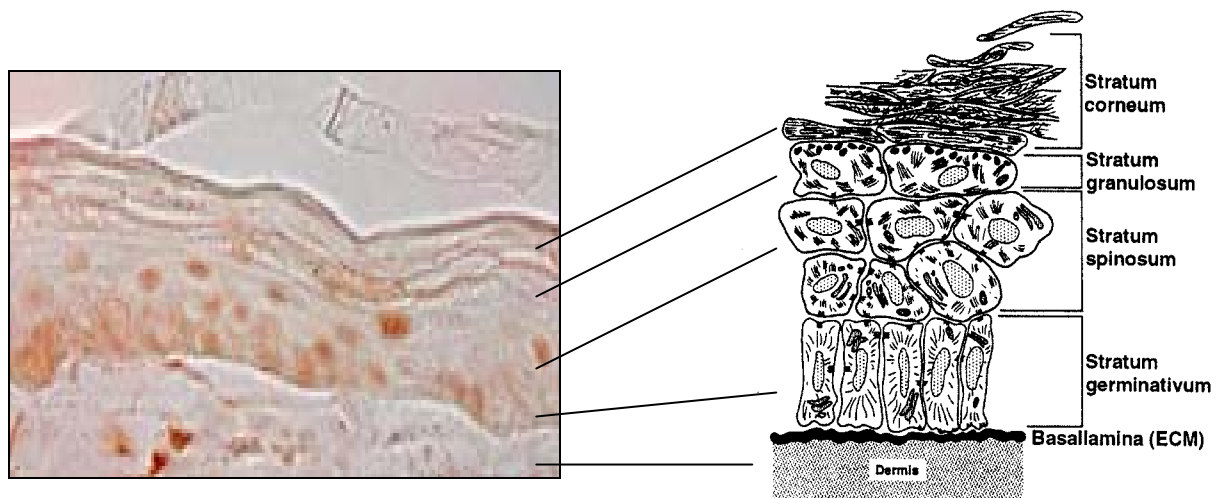


Abbildung 9: PKC- α Proteinexpression in der Epidermis aus dem oberen Rückenbereich der Maus. Man erkennt ein deutliches Signal (braun) im Stratum germinativum und einzelne PKC-positive Zellen im Stratum spinosum sowie der Dermis. Rechte Seite: Schematische Darstellung der Hautschichtung nach E. Fuchs et al.

Die Expression von PKC- α beschränkt sich auf die unteren beiden Zellschichten der Epidermis, das Stratum spinosum und das Stratum germinativum, sowie die Dermis. Die Expression ist nur im Stratum germinativum relativ ubiquitär, während es sich in den anderen beiden Schichten auf einzelne Zellen beschränkt.

Die Expression von PKC- α während der Keratinozytendifferenzierung

Unter normalen Zellkulturbedingungen steht den Keratinozyten nur ein Medium zur Verfügung, das ihnen die Proliferation ermöglicht. D.h. sie können nicht in Zellen differenzieren, aus denen die oberen Epidermisschichten bestehen. Es ist jedoch möglich, durch eine Erhöhung der Kalziumkonzentration eine weitere Differenzierung zu induzieren.

Im folgend beschriebenen Versuch wurden die Proteinextrakte von differenzierten Keratinozyten per PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einem für PKC- α spezifischen Antikörper markiert. Die Zeit der Differenzierung lag zwischen 0 und 96 Stunden. Nach 96 Stunden begannen die Keratinozyten abzusterben.

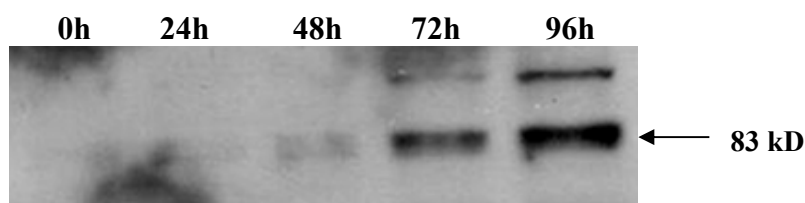


Abbildung 10: PKC α -Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr PKC α in den Zellen exprimiert.

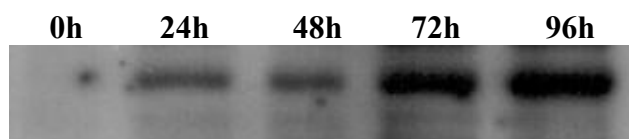


Abbildung 11: Keratin-1-Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr Keratin 1 in den Zellen exprimiert.

Wie in Abbildung 10 erkennbar ist, nimmt die Expression von PKC- α mit fortlaufender Differenzierung der Keratinozyten kontinuierlich zu. PKC- α wird während der Keratinozytendifferenzierung hochreguliert, was dafür spricht, dass PKC- α in die Signaltransduktion der Differenzierung involviert ist. Um sicher zu sein, dass dieses Ergebnis mit der Keratinozytendifferenzierung zusammenhängt wurde noch ein Western Blot angefertigt, mit einem Antikörper gegen Keratin-1, ein Differenzierungsmarker für Keratinozyten. Auf Abbildung 11 ist ein Anstieg der Expression von Keratin-1 zu erkennen. Die Differenzierung innerhalb der Kultur hatte zugenommen.

Die Isoform PKC- β_1/β_2 wurde von der Familie der allgemeinen PKC nicht extra getestet, weil die Ähnlichkeit der Primer für die PCR und die Spezifität der Antikörper zu gering war um verlässliche Daten zu bekommen. Das letzte Mitglied aus der Familie der klassischen PKCs, PKC- γ ; wurde negativ getestet.

3.1.2 Das Expressionsprofil von PKC- ζ in der Haut

RT – PCR

Wiederum wurde die RT-PCR mit aus primären Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut der Maus durchgeführt. Die Primer waren spezifisch gegen PKC- ζ .

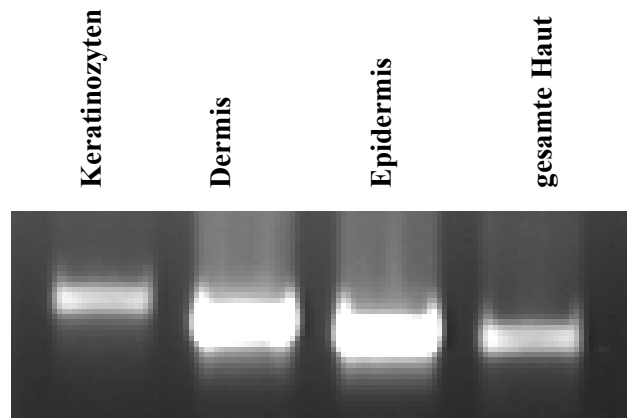


Abbildung 12: RT-PCR mit Primern für PKC- ζ . Es sollte bestimmt werden welche PKC-Isoformen in den verschiedenen Schichten der Haut exprimiert werden.

Auch für PKC- ζ wurden Transkripte in allen vier Hautkompartimenten gefunden. Die scheinbar schwächere Expression in den Keratinozyten deckt sich mit den Expressionsprofilen aus den bisher entsprechenden Western Blots.

Western Blot

Nach dem positiven Befund der RT-PCR wurde mit einem Western Blot weiter so vorgegangen wie bei PKC- α .

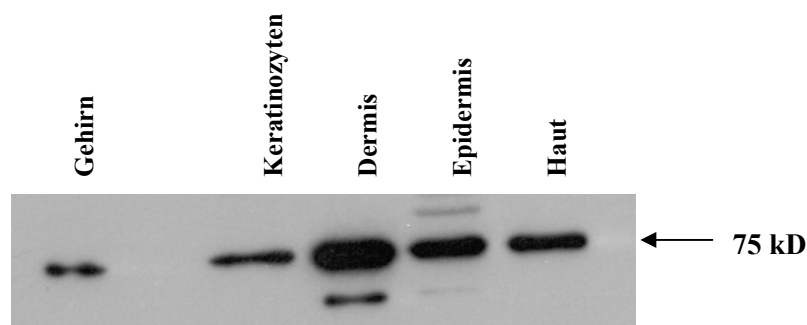


Abbildung 13: Western Blot mit einem Antikörper gegen PKC- ζ . Markiert wurden die Proteinextrakte aus dem Gehirn (Positivkontrolle), von Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut.

Wie die Abbildung 13 zeigt, ist die Expression von PKC- ζ in der Dermis– vergleichbar mit PKC- α – am stärksten. Die Expression in der Epidermis ist etwas stärker als in der gesamten Haut, während in den primären Keratinozyten am wenigsten. Protein detektiert wird.

Immunohistochemie

Ziel der Immunohistochemie ist wieder die Lokalisation des Expressionsortes von PKC- ζ in der Mauhaut. Ein Hautpräparat aus dem oberen Rückenbereich der Maus wurde mit einem Antikörper gegen PKC- ζ markiert.

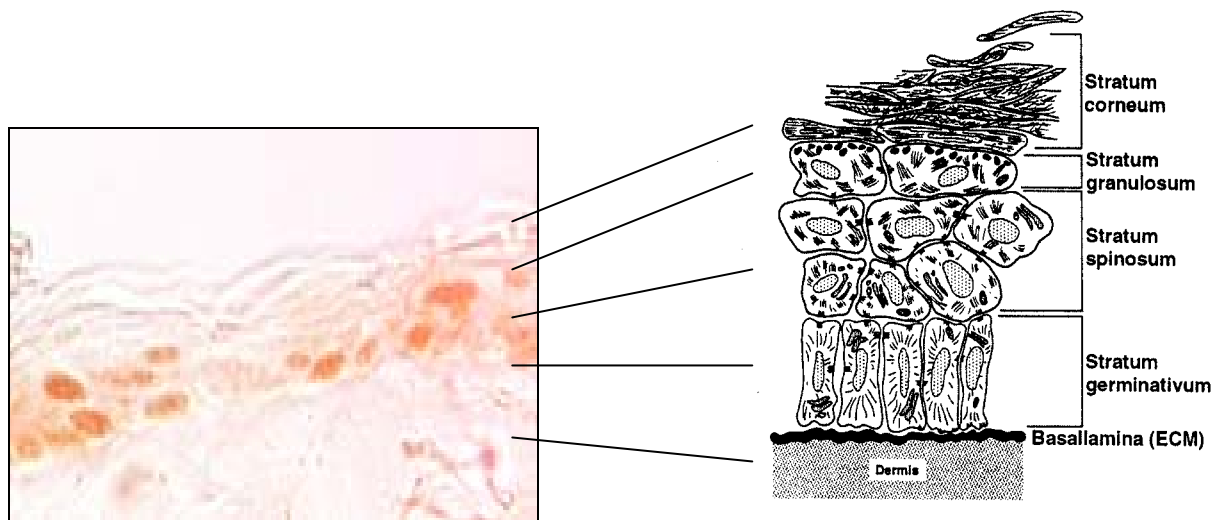


Abbildung 14: PKC- ζ Proteinexpression in der Epidermis aus dem oberen Rückenbereich der Maus. Man erkennt ein deutliches Signal (braun) im Stratum germinativum und einzelne PKC-positive Zellen im Stratum spinosum. Rechte Seite: Schematische Darstellung der Hautschichtung nach E. Fuchs et al.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, lässt sich PKC- ζ Expression nur im Stratum spinosum sowie im Stratum germinativum nachweisen, während im Stratum corneum und im Stratum granulosum keine positiven Zellen detektiert wurden.

Die Expression von PKC- ζ während der Keratinozytendifferenzierung

Die Proteinextrakte für den Western Blot aus differenzierenden Keratinozyten wurden wie für die vorhergehenden PKCs beschrieben gewonnen und mit einem spezifischen Antikörper gegen PKC- ζ markiert.

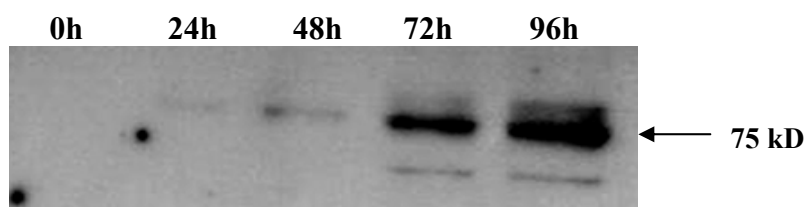


Abbildung 15: PKC- ζ Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr PKC- ζ in den Zellen exprimiert.

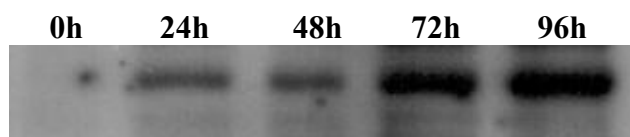


Abbildung 16: Keratin 1 Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr Keratin 1 exprimiert.

Der Expressionsverlauf von PKC- ζ (Abbildung 15) gleicht dem von PKC- α . In den ersten 48 Stunden ist nur ein ganz leichter Expressionsanstieg zu verzeichnen. Nach 72 Stunden hat die Expression stark zugenommen und erreicht nach 96 Stunden ihren Höhepunkt.

3.1.3 Das Expressionsprofil von PKC- δ in der Haut

RT – PCR

Zum Nachweis von PKC- δ Transkription wurde wiederum eine RT-PCR mit Total-RNA-Präparationen aus primären Keratinozyten, Dermis, Epidermis und der gesamten Haut durchgeführt

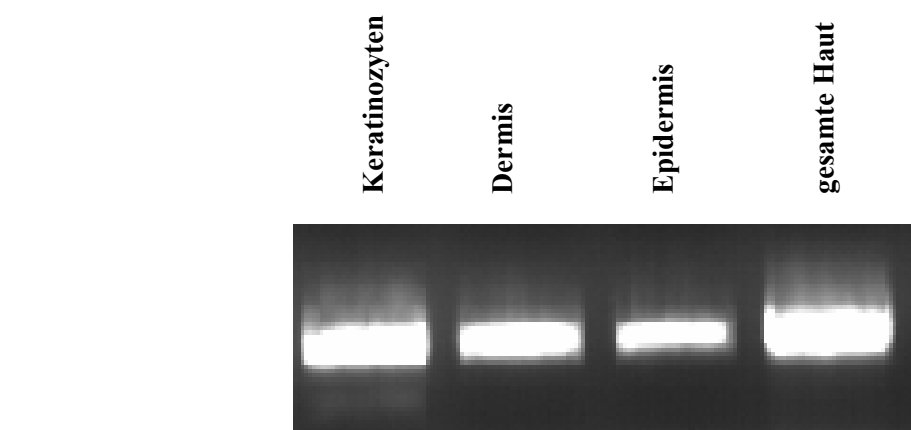


Abbildung 17: RT-PCR mit Primern für PKC- δ . Als Vorlage wurde cDNA-Präparate aus primären Keratinozyten, Dermis, Epidermis und Gesamthaut verwendet.

PKC- δ Transkripte werden – wie auch für PKC- α und PKC- ζ – in allen vier Hautkompartimenten nachgewiesen (Abbildung 17).

Western Blot

Nach dem positiven Befund der RT-PCR wurde wie bei den vorher untersuchten PKC-Isoformen weiter vorgegangen. Per Western Blot wurden Proteinextrakte von primären Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut getestet, um den primären Expressionsort und die –stärke in der Haut zu definieren.

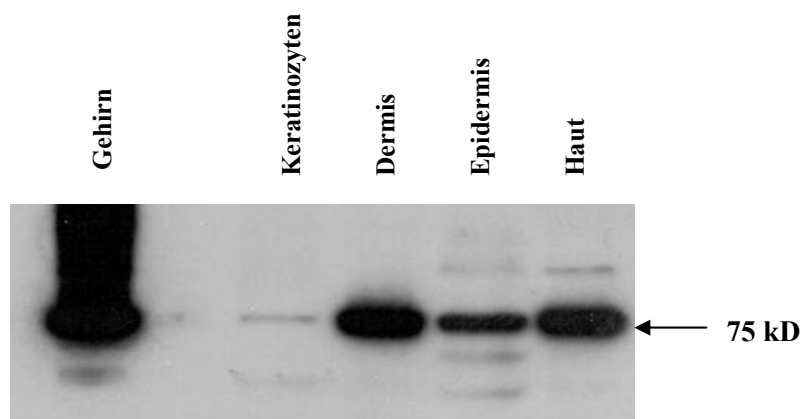


Abbildung 18: Western Blot mit einem Antikörper gegen PKC- δ . Aufgetragen wurden Proteinextrakte mit einer Konzentration von 10 μ g/ml aus dem Gehirn (Positivkontrolle), von Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut. Die erwartete Bandengröße von PKC- δ liegt bei

Ähnlich PKC- α zeigt auch PKC- δ Expression in allen getesteten Proteinextrakten. Auch die Konzentrationsverteilung ist der von PKC- α ähnlich. Die schwächste Expression liegt in den primären Keratinozyten vor, gefolgt von der Epidermis. Wie auch bei PKC- α ist die Expression in der Dermis am höchsten

Immunhistochemie

Um das Expressionsmuster von PKC- δ *in situ* darzustellen wurde wieder ein Hautpräparat aus dem oberen Rückenbereich mit einem spezifischen Antikörper gegen PKC- δ markiert.

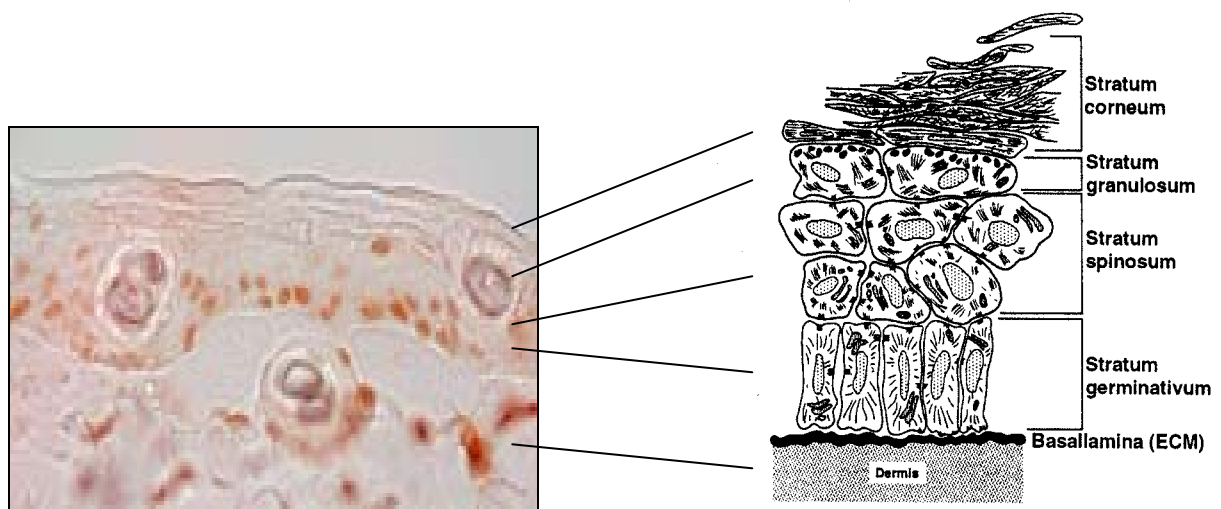


Abbildung 19: PKC- δ Proteinexpression in der Epidermis aus dem oberen Rückenbereich der Maus. Man erkennt ein deutliches Signal (braun) im Stratum germinativum und einzelne PKC-positive Zellen im Stratum spinosum. Rechte Seite: Schematische Darstellung der Hautschichtung nach E. Fuchs et al.

In Abbildung 19 ist besonders gut zu erkennen, dass die Expression von PKC- δ auf die unteren beiden Zellschichten der Epidermis begrenzt ist. Positive Zellen, befinden sich fast ausschließlich im Stratum germinativum und dem Stratum spinosum. Sie ist in beiden Schichten auf einzelne Zellen beschränkt ist.

Die Expression von PKC- δ während der Keratinozytendifferenzierung

Um den Einfluss einer zunehmenden Zelldifferenzierung auf die Expression von PKC- δ zu untersuchen, wurden kultivierte Keratinozyten durch eine Erhöhung der Kalziumkonzentration zur Differenzierung gezwungen. Aus diesem Ansatz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 Stunden) Proteinextrakte gewonnen und im Western Blot eingesetzt.

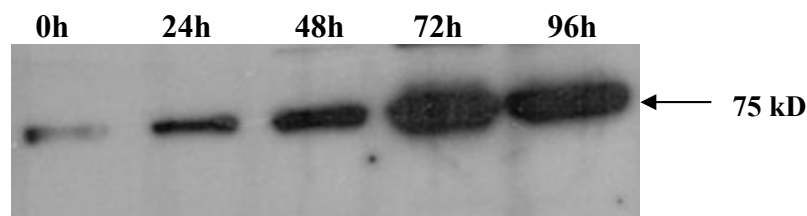


Abbildung 20: PKC- δ Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr PKC- δ in den Zellen exprimiert.

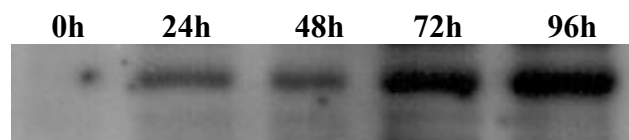


Abbildung 21: Keratin-1 Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr Keratin-1 in den Zellen exprimiert.

Wie PKC- α wird auch PKC- δ bei fortschreitender Zelldifferenzierung stärker exprimiert (Abbildung 21). Der Anstieg der Expression ist allerdings bei PKC- δ viel deutlicher als bei PKC- α . Bei PKC- α war eine deutliche Induktion erst nach 72 Stunden sichtbar, während bei PKC- δ dies schon nach 24 Stunden der Fall ist. Die höchste Expression von PKC- δ war schon nach 72 Stunden erreicht (im Gegensatz zu 96h bei PKC- α).

3.1.4 Das Expressionsprofil von PKC- η in der Haut

RT – PCR

Für die RT-PCR-Reaktion, mit spezifischen Primern für PKC- η , wurde tRNA aus primären Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut verwendet.

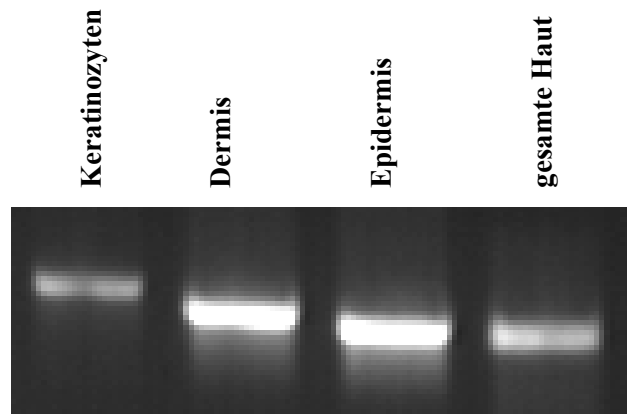


Abbildung 22: RT-PCR mit Primern für PKC- η . Es sollte bestimmt werden welche PKC – Isoformen in den verschiedenen Schichten der Haut exprimiert werden.

Auch für PKC- η wurden Transkripte in allen vier Hautkompartimenten gefunden. Die scheinbar schwächere Expression in den Keratinozyten deckt sich mit den Expressionsprofilen aus den entsprechenden Western Blots.

Western Blot

Da es bei der RT-PCR von PKC- η einen positiven Befund gab wurde weiter Vorgegangen wie bei PKC- α und PKC- δ . Per Western Blot wurden Proteinextrakte von primären Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut getestet, um den primären Expressionsort und die –stärke in der Haut zu definieren.

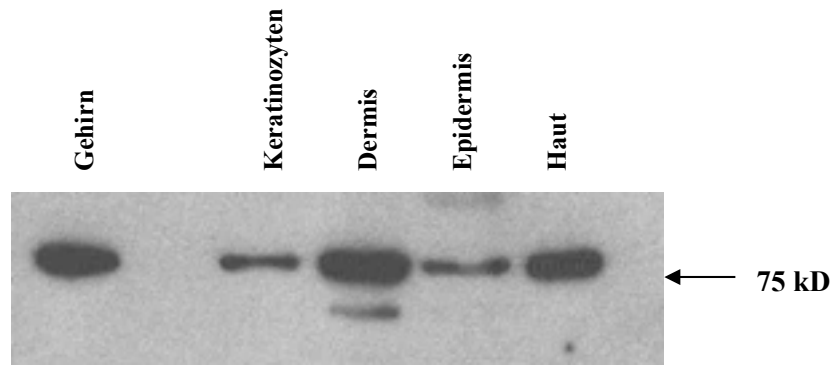


Abbildung 23: Western Blot mit einem Antikörper gegen PKC- η . Markiert wurden die Proteinextrakte aus dem Gehirn (Positivkontrolle), von Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut.

Wie bei PKC- α und PKC- δ gibt es eine PKC- η Expression in allen vier Hautkomponenten. Auch die Konzentrationsverteilung ist der Expression von PKC- α und PKC- δ wieder ähnlich. Die Expression in der Dermis ist am stärksten. Danach folgt die Expression in der gesamten Haut. Am schwächsten ist die Expression in den primären Keratinozyten und in der Epidermis.

Immunohistochemie

Um das Expressionsmuster von PKC- η *in situ* darzustellen wurde wie bei PKC- α , PKC- ζ und PKC- δ verfahren.

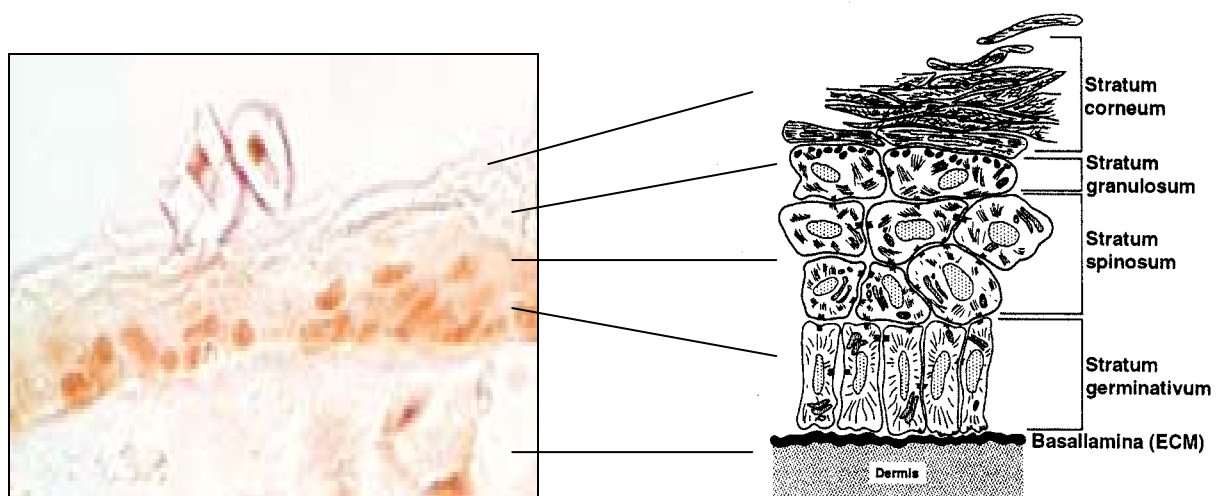


Abbildung 24: PKC- η Proteinexpression in der Epidermis aus dem oberen Rückenbereich der Maus. Man erkennt ein deutliches Signal (braun) im Stratum germinativum und einzelne PKC-positive Zellen im Stratum spinosum. Rechte Seite: Schematische Darstellung der Hautschichtung nach E. Fuchs et al.

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist konzentriert sich die Expression von PKC- η , wie bei PKC- α und PKC- δ zuvor, auf die unteren beiden Epidermisschichten. Wieder sind es nur einzelne Zellen, die eine positive Markierung zeigen.

Die Expression von PKC η während der Keratinozytendifferenzierung

Zur Detektion von PKC- η Protein in differenzierenden Keratinozyten wurde wie für PKC- α , PKC- ζ und PKC- δ beschrieben verfahren.

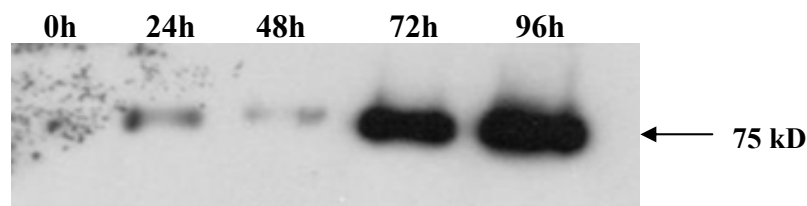


Abbildung 25: PKC- η Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend mehr PKC- η in den Zellen exprimiert.

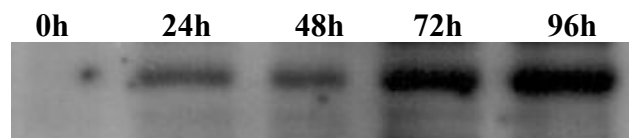


Abbildung 26: Keratin-1 Expression in differenzierenden Keratinozyten. Mit längerer Differenzierung wird zunehmend Keratin-1 in den Zellen exprimiert.

Wie Abbildung 26 zeigt, steigt auch bei PKC- η die Expression im Verlaufe der Keratinozytendifferenzierung deutlich an. Die Stärke der Induktion liegt dabei zwischen denen für PKC- α (Abbildung 10) und PKC- δ (Abbildung 20). Während der ersten 48 Stunden ist der Anstieg der Expression sehr schwach. Nach 72 Stunden hat die Expression jedoch stark zugenommen und steigt bis 96h weiter an.

3.1.5 Das Expressionsprofil von PKC- ϵ in der Haut

RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit Total-RNA aus primären Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut der Maus durchgeführt. Die Primer waren spezifisch gegen PKC- ϵ .

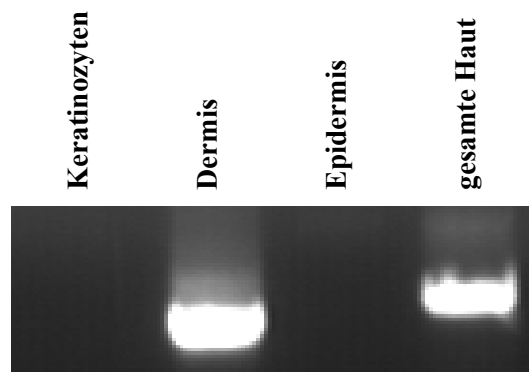


Abbildung 27: RT-PCR mit Primern für PKC- ϵ . Es sollte bestimmt werden welche PKC-Isoformen in den verschiedenen Schichten der Haut exprimiert werden.

In diesem Fall gibt es nur in der Dermis und in der gesamten Haut eine Expression. In den primären Keratinozyten und in der Epidermis wurde keine Expression detektiert.

Western Blot

Zur Bestätigung des Befundes aus der RT-PCR wurde, wie in den vorherigen analysierten PKC-Isoformen, ein Western Blot mit Proteinextrakten von primären Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut angefertigt.

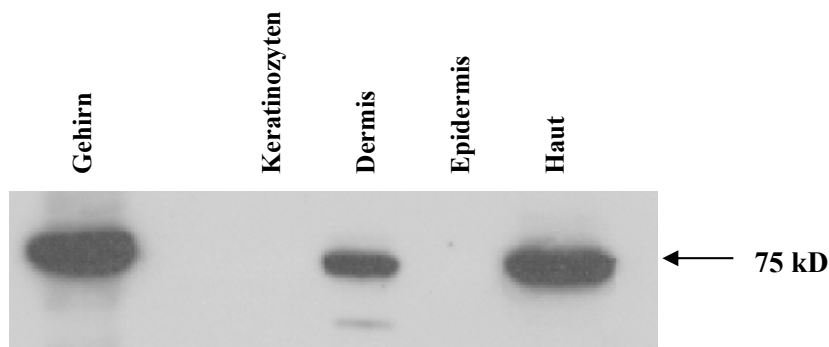


Abbildung 28: Western Blot mit einem Antikörper gegen PKC- ϵ . Markiert wurden die Proteinextrakte aus dem Gehirn (Positivkontrolle), von Keratinozyten, der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut.

Wie bei der RT-PCR zeigt auch der Western Blot nur bei der Dermis und der gesamten Haut eine Expression von PKC- ϵ . Bei den primären Keratinozyten und der Epidermis ist das Ergebnis wiederum negativ.

Immunhistochemie

Um das Expressionsmuster *in situ* zu analysieren wurde ein Hautpräparat mit einem spezifischen Antikörper gegen PKC- ϵ markiert.

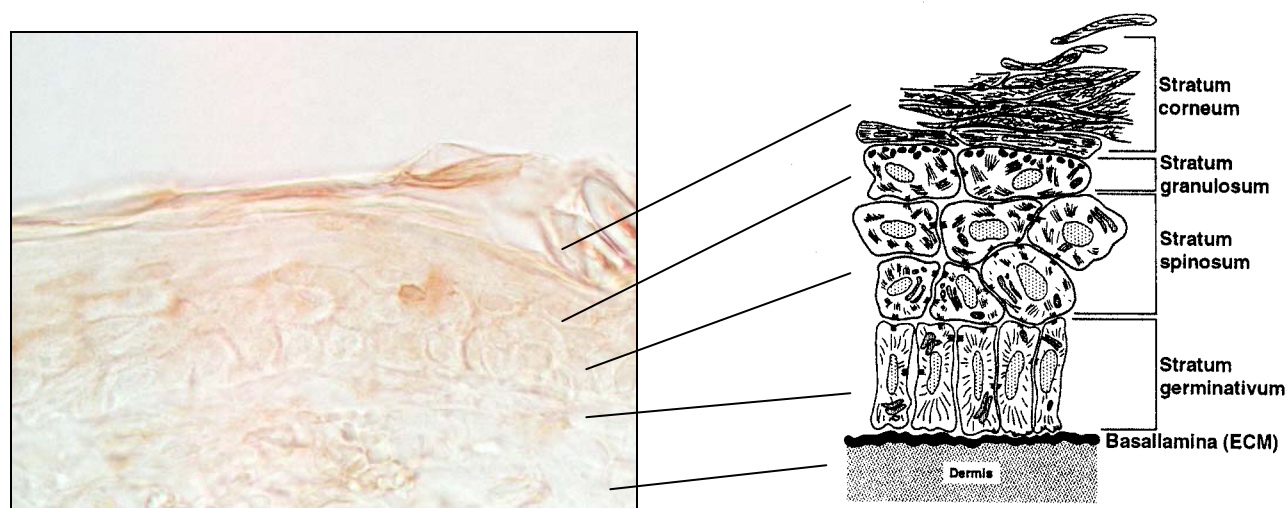


Abbildung 29: In keiner der vier Epidermisschichten gibt es ein positives Signal das auf eine Expression von PKC- ϵ hindeutet. Rechte Seite: Schematische Darstellung der Hautschichtung nach E. Fuchs et al.

Auch die Immunhistochemie bestätigt die beiden anderen Versuche. In keiner der vier Schichten der Epidermis gibt es ein positives Signal.

Um eine weitere Bestätigung dieser Daten zu bekommen und um Rückschlüsse auf die Expression von PKC- ϵ in der Dermis ziehen zu können wurde eine Immunfluoreszenz angefertigt. Das Hautpräparat umfasste diesmal einen größeren Teil der Dermis inklusive einiger Haarfollikel.

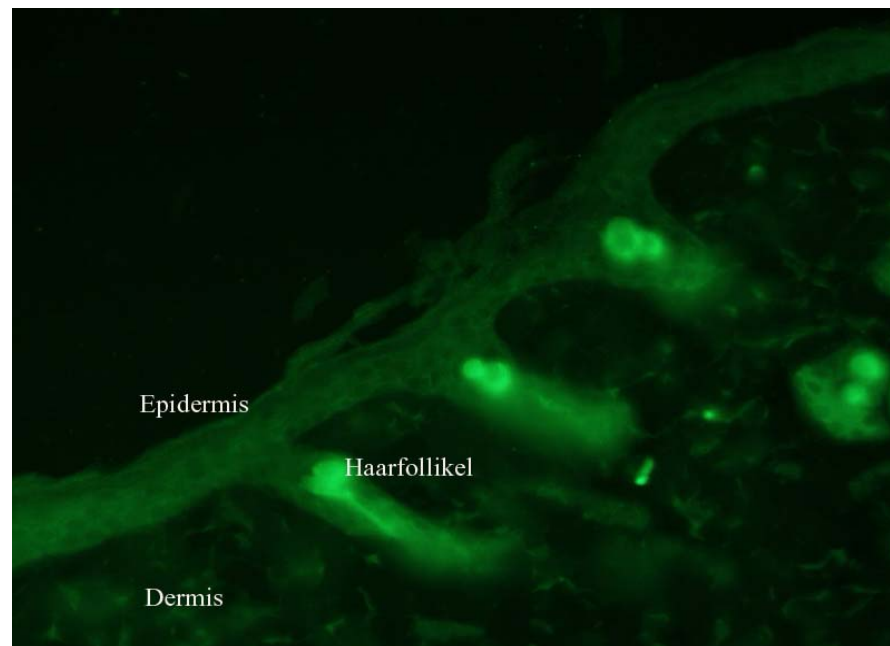


Abbildung 30: PKC- ϵ Proteinexpression in der Epidermis, der Dermis und in den Haarfollikeln. Auch hier gibt es keine Expression von PKC ϵ in der Epidermis. In der Dermis zeigen nur einige Zellen eine schwache Expression des Enzyms. Am stärksten ist das Signal in den in die Dermis eingebetteten Haarfollikeln.

Die Abbildung 30 zeigt deutlich, dass auch in diesem Fall keine Expression in der Epidermis vorhanden ist. Auch in der Dermis gibt es nur vereinzelt positive Signale. Eine sehr deutliche Expression gibt es dagegen in den Haarfollikeln. Diese sind in die Dermis eingebettet.

Eine weitere Möglichkeit als Expressionsort in der Dermis ist Kapillarsystem der Haut, welches – genau wie die Haarfollikel – in die Dermis eingebettet ist. Da sich die Antikörper gegen PKC- ϵ als nicht sensitiv genug erwiesen wurde eine LacZ – Färbung mit einem Stück Haut einer PKC- ϵ *knock out* Maus gemacht.

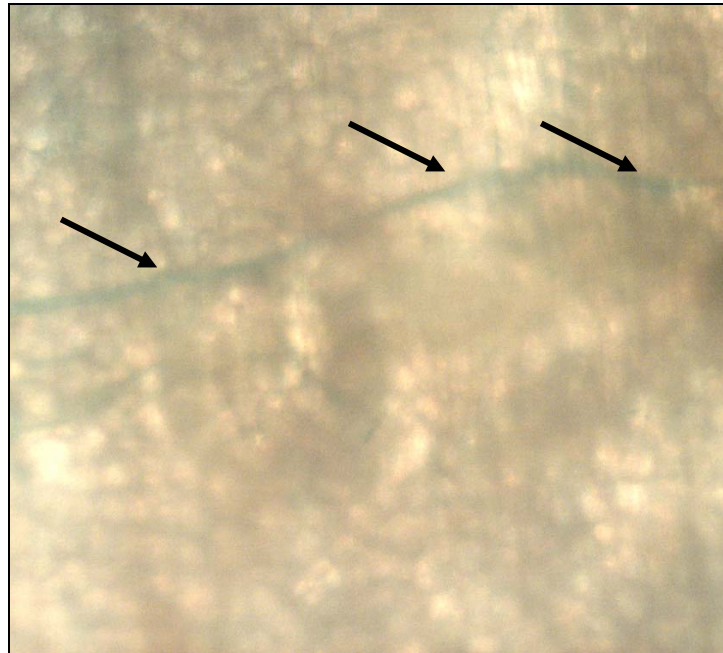


Abbildung 31: LacZ – Färbung eines Hautstückes entnommen aus dem oberen Rückenbereich einer PKC- ϵ defizienten Maus. Die Pfeile markieren ein bläulich eingefärbtes Blutgefäß. Die bläuliche Färbung erstreckt sich über das gesamte Kapillarsystem.

Wie auf Abbildung 31 zu sehen ist, ist die LacZ-Färbung in den Blutgefäßen der Haut einer PKC- ϵ defizienten Maus positiv. Es kommt zu einer Expression des LacZ-Gens. Nachgewiesen wird diese über die Enzymaktivität des Genprodukts, der β -Galaktosidase. PKC- ϵ wird in den Haarfollikeln und im Kapillarsystem exprimiert, beide sind in die Dermis eingebettet. In den Keratinozyten der Epidermis wird PKC- ϵ nicht exprimiert.

Bei allen anderen PKC-Isoformen die positiv in der Haut detektiert worden sind, PKC- α , PKC- δ , PKC- η und PKC- ζ , gibt es auch immer eine Expression in der Keratinozytenzellkultur und in der Epidermis. Die stärkste Expression liegt aber auch bei diesen Isoformen immer in der Dermis.

Das ungewöhnliche Expressionsmuster von PKC- ϵ war jedoch ein guter Ansatz um weitere Untersuchungen zur Funktion dieser Isoform in der Haut zu initiieren. Die ausschließliche Expression in der Dermis lässt hoffen, dass es keine großen Redundanzen mit anderen PKC-Isoformen gibt.

3.2 Die *in vivo* Wundheilung

Die postnatale Haut von PKC- ϵ defizienten Mäusen zeigte nach einer histologischen Untersuchung keine Unterschiede zu der Haut von Wildtyp Mäusen. Wie in der Abbildung 32 zu erkennen (A und B) ist gibt es keinerlei Unterschiede in der Ausbildung der Epidermis(1), der Dermis(2) und dem Bindegewebe(3). In C und D sieht man das es auch keinen Unterschied im Aufbau der vier Schichten der Epidermis gibt. Dicke und Aufbau bei der mutanten Haut (D) gleichen der der Wildtyp-Haut (C).

Da aber Aufgrund der Expressionsstudien davon ausgegangen wurde, dass PKC- ϵ eine wichtige Rolle in der Haut spielt, war es nötig, die Haut Stressbedingungen, in diesem Fall Verwundungen, auszusetzen. Ein Fallbeispiel für eine solche Vorgehensweise sind die Wundheilungsversuche mit der PKC- δ *knock out* Maus (). Wie in den Expressionsprofilen gezeigt wurde, ist PKC- δ die am stärksten vertretene PKC-Isoform in der Haut. Die Haut der *knock out* Maus zeigt ebenfalls keine Unterschiede zum Wildtyp. Im Verlauf des Wundverschlusses wurden allerdings gravierende Unterschiede festgestellt. Die Wunde in der Haut der PKC- δ defizienter Maus heilte langsamer ab als die der Wildtyp-Kontrollen. Aus diesem Grund wurde auch im Fall von PKC- ϵ dieser Versuchsansatz gewählt.

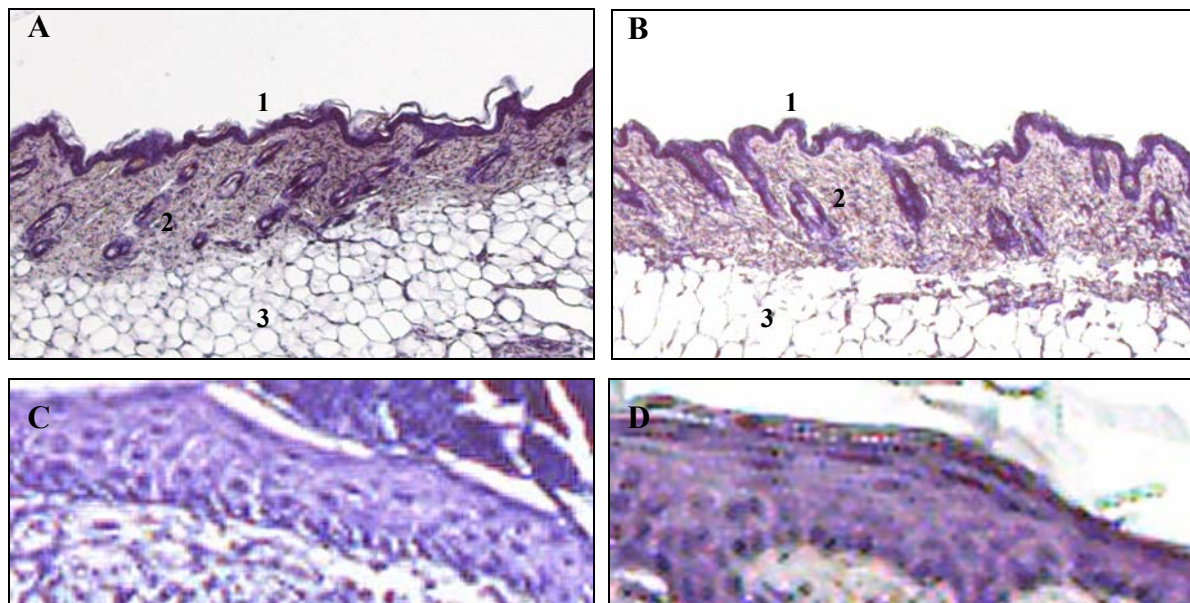


Abbildung 32: Histologie postnataler Wildtyp (A) und PKC- ϵ defizienter Haut (B) aus dem oberen Rückenbereich. 1: Epidermis; 2: Dermis; 3: Bindegewebe. Die Abbildung C und D zeigen die dazugehörige Epidermis in einer stärkeren Vergrößerung.

3.2.1 Die Bildung des Granulationsgewebes

Das Granulationsgewebe entsteht durch die Einwanderung von Kapillaren und Fibroblasten in den unteren, zentralen Wundbereich. Sie beginnt ca. drei Tage nach Entstehen der Wunde. Das Granulationsgewebe hat eine rote Farbe und weist eine raue Oberfläche auf (Echtermeyer, Streit et al. 2001). Es ist ein wichtiger Faktor für die Heilung von offenen Wunden: Es ist äußerst resistent gegen Infektionen, es bietet die Grundlage für die Epithelzellwanderung, ist mitbeteiligt an der Wundkontraktion, versorgt den Wundbereich mit Sauerstoff und Wachstumsfaktoren und enthält Fibroblasten, welche Kollagen produzieren.

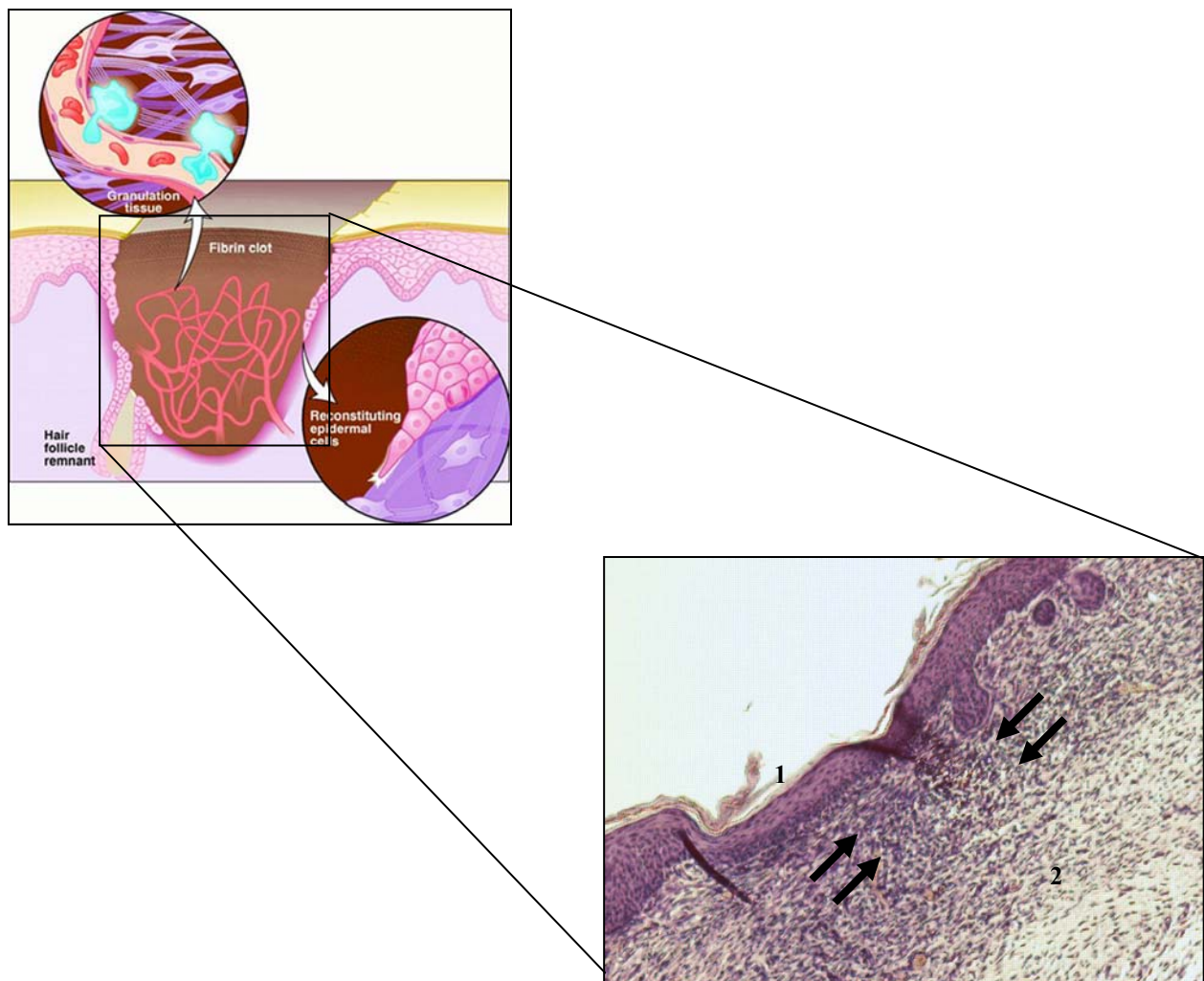


Abbildung 33: Wundheilung in der Maus. Hämalaun-Färbung von Paraffinschnitten nach fünf Tagen der Wundsetzung. 1: Epidermis; 2: Granulationsgewebe. Die Pfeile zeigen die Einwanderungsrichtung des sich bildenden Granulationsgewebes. Das Granulationsgewebe füllt den unteren Wundbereich aus. Es ist zu erkennen an seiner körnigen Struktur, welche durch die einwandernden Kapillaren hervorgerufen wird. Oben eine schematische Abbildung der Epithelisierung und der Granulationsgewebebildung (P. Martin, Nature 1997).

Das Granulationsgewebe besteht aus Kapillaren, die mit Fibroblasten, Makrophagen und anderen „Wanderzellen“ bedeckt sind. Durch Anastomosenbildung zwischen den Schlaufen entsteht ein dichtes Kapillarnetz. Hinter den Kapillaren wandern auch Lymphgefäße in den Wundbereich ein.

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob es bei der Bildung von Granulationsgewebe während der Wundheilung Unterschiede zwischen Wildtyp- oder PKC ϵ defizienten Mäusen gibt.

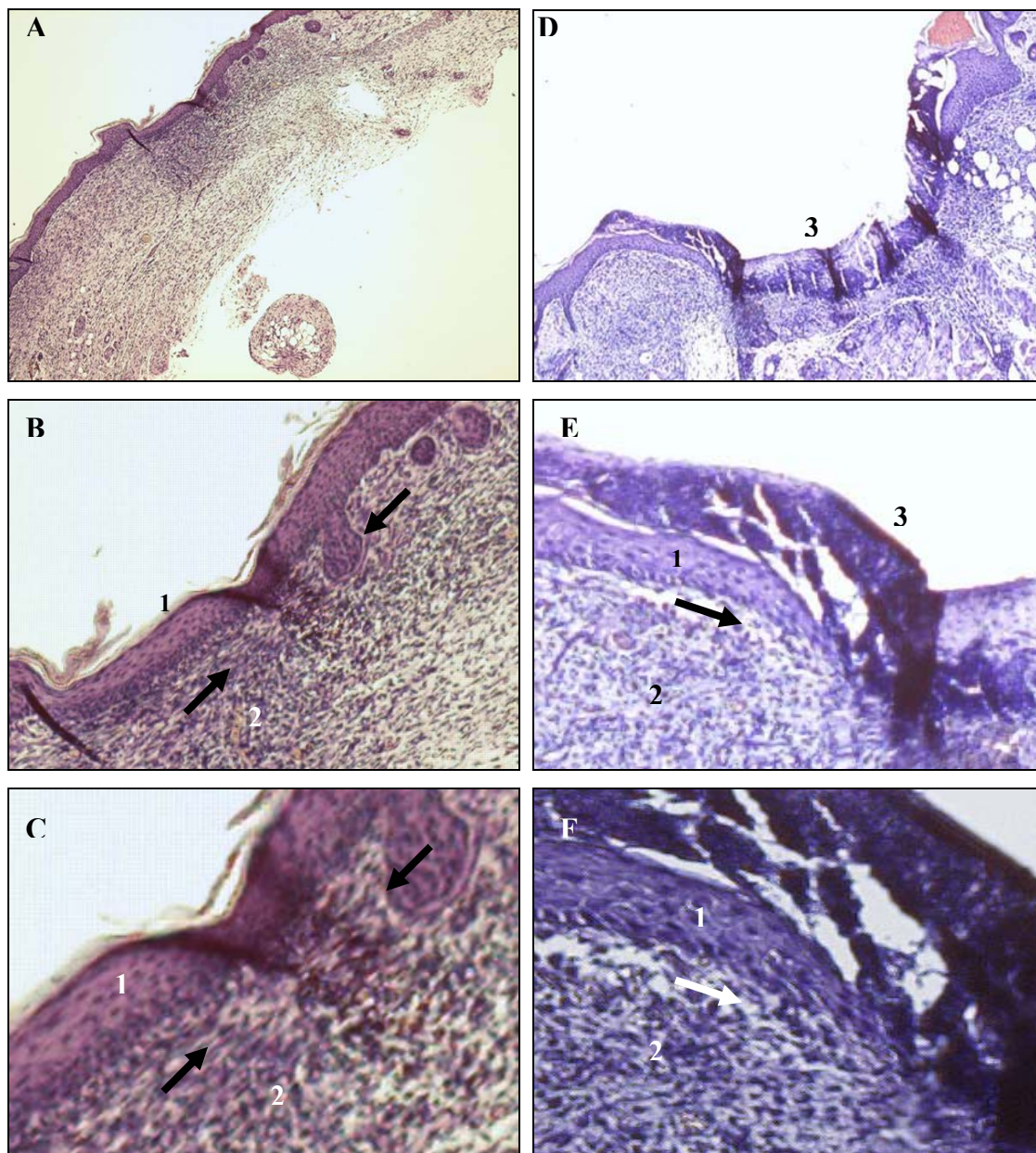


Abbildung 34: Die Einwanderung von Granulationsgewebe in den Wundbereich einer 5 Tage alten Wunde bei Wildtyp (A, B, C) und bei PKC ϵ defizienter Haut (D, E, F). Bei der Wildtyp Haut ist der Wundraum schon vollständig mit dem Granulationsgewebe (2) ausgefüllt. Auch die Epidermis (1) hat sich schon fast völlig über der Wunde geschlossen. Bei der mutanten Haut sind sowohl Epidermis (1) als auch das Granulationsgewebe nicht vollständig in den Wundraum vorgedrungen. Der Wundpfropf (3) verschließt noch fast 50% der Wunde (D). Die Pfeile geben die Richtung der Migration von Epidermis und Granulationsgewebe an.

Wie in Abbildung 34 (A, B, C) zu erkennen ist, füllt das Granulationsgewebe am 5. Tag den gesamten zentralen Wundraum aus. Es wandert in Laufe der Wundheilung in diesen Bereich ein und füllt ihn, bei normal ablaufender Wundheilung, nach ca. 4-5 Tagen vollständig aus. Über dem Granulationsgewebe ist die neu gebildete Epidermis zu sehen, welche die Wunde schon fast wieder ganz bedeckt. Der Wundpfropf, der erste akute Wundverschluss, hat sich schon abgelöst.

In der PKC- ϵ defizienten Maus (D, E, F) dagegen ist das Granulationsgewebe nach 5 Tagen noch nicht in den zentralen Wundbereich eingewandert. Es ist deutlich zu erkennen, dass das körnige Granulationsgewebe noch auf die Randbereiche der Wunde beschränkt ist. Der zentrale Wundbereich wird noch vom Wundpfropf bedeckt. Auch die Epidermis ist noch nicht in dem Maße in den Wundraum eingewandert, wie das bei der Wildtyp-Wunde der Fall ist. Es ist gut zu erkennen, dass die Einwanderung der Epidermis parallel zur Bildung des Granulationsgewebes verläuft.

3.2.2 Die Regeneration der Haut

In dieser Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob es im Verlauf der Wundheilung Unterschiede zwischen Wildtyp- und PKC- ε defizienter Haut bei der Regenerierung der Epidermis gibt.

Nach einer Verletzung der Haut entsteht als erster, schneller Wundverschluss der Wundpfropf. Der Wundpfropf besteht zum größten Teil aus koaguliertem Blut, welches den Blutverlust verringert und die Wundränder vereinigt (). Durch eine Degranulierung von Blutplättchen gelangen auch biologisch aktive Substanzen, z.B. Wachstumsfaktoren, in den Wundpfropf. Diese Substanzen induzieren den weiteren Verlauf der Wundheilung. Dieser ganze Vorgang ist die exsudative Phase in der Wundheilung. Die zweite Phase der Wundheilung ist die reparative Phase. In dieser Phase kommt es verstärkt zu Fibroblastenproliferation, Kapillarinfiltration, Epithelisierung und Wundkontraktion. In der letzten Wundheilungsphase, der Maturationsphase, wird die „Reißfestigkeit“ der Wunde durch Kollageneinlagerungen wiederhergestellt.

Das Augenmerk bei den Wundheilungsversuchen mit den PKC ε -defizienten Mäusen lag auf der reparativen Phase, da in dieser Phase die Regeneration der Epidermis und der Blutgefäße ihren Höhepunkt haben.

Der erste Aspekt der behandelt werden soll ist die Epithelisierung. Sie beschreibt das Einwandern der Epidermis in den Wundbereich. Die Epithelzellen an den Wundrändern werden mobilisiert und beginnen, in Richtung der Wundmitte zu migrieren. Bei partiellen, oberflächlichen Verwundungen beginnt diese Zellwanderung gleich nach der Verwundung. Bei größeren Verletzungen muss zuerst eine Schicht Granulationsgewebe gebildet werden. In solchen Fällen besteht eine Latenzperiode von 2-3 Tagen, bis die Wanderung und mit ihr eine verstärkte Mitoseaktivität am Wundrand beobachtet wird. Wie in Abbildung 34 zu sehen wandert die Epidermis vom Wundrand unter den Wundpfropf um die Wunde zu verschließen. Der Wundpfropf löst sich nach Wundverschluss durch die Epidermis ab.

Die Wunden wurden den Mäusen paarweise im oberen Rückenbereich gesetzt. Am Anfang hatten sie einen Durchmesser von ca. 5mm. Präpariert wurden die Wunden nach 3, 5, 7 und 10 Tagen. Es sollte untersucht werden, ob die Wundheilung im Rahmen dieser Zeitabstände in der PKC- ϵ defizienten Haut einen anderen Verlauf nimmt als in der Wildtyp-Maus.

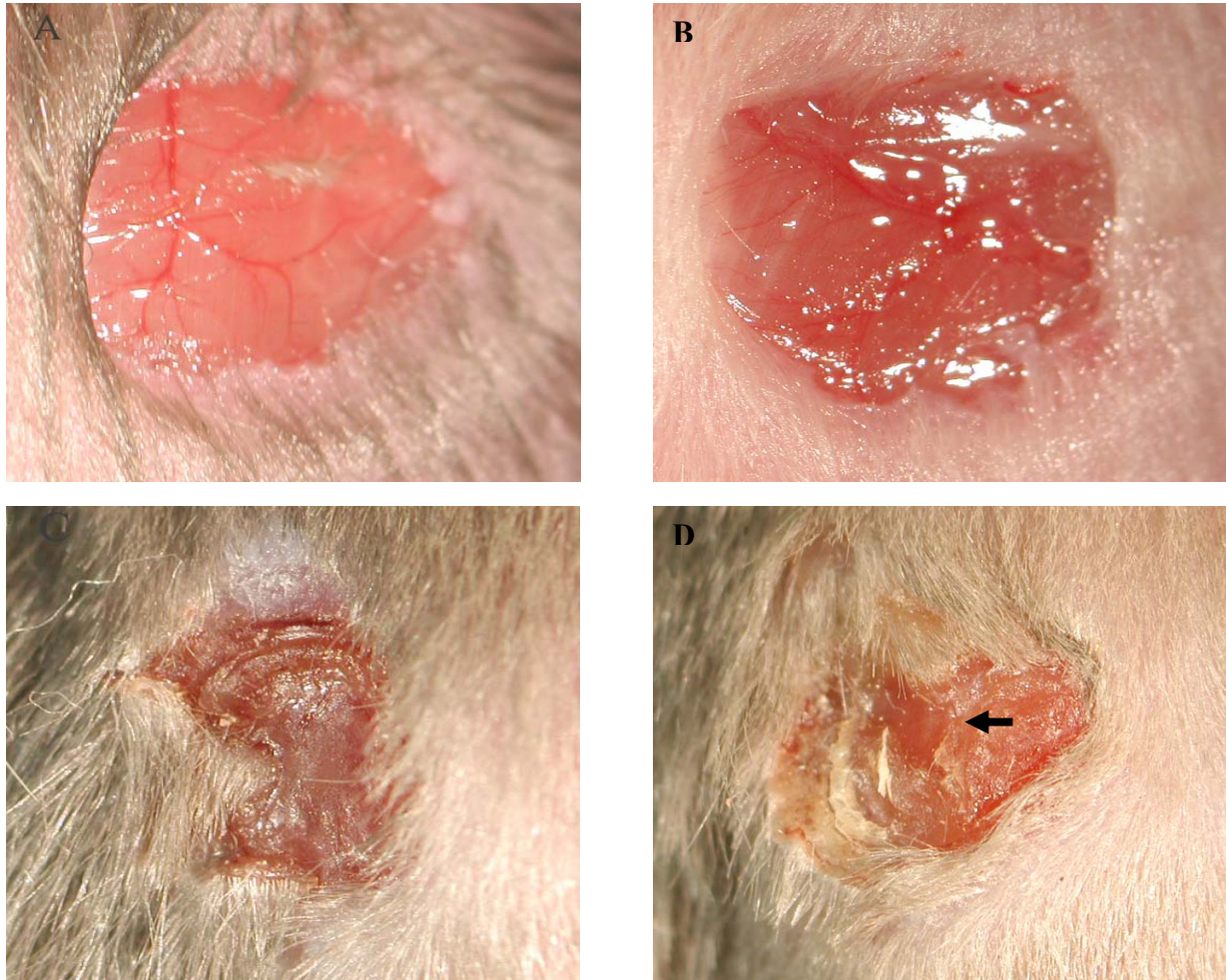


Abbildung 35: Wundheilung von Wildtyp (wt) und PKC ϵ knock out Mäusen. Die Wunden wurden im oberen Rückenbereich gesetzt. Die oberen Abbildungen zeigen zwei frisch gesetzte Wunden (5mm) in Wildtyp (A) und knock out (B). Die unteren Bilder zeigen die gleichen Wunden nach fünf Tagen. Der Wundbereich in Abbildung C ist deutlich kleiner als in Abbildung D. Die Wildtyp Wunde zeigt schon eine deutliche Kontraktion des Wundbereichs. In Abbildung D ist der Wundbereich noch größer und teilweise noch nicht vollständig vom Wundschorf (Wundpfropf) bedeckt (Pfeil).

Schon bei Beobachtung des Wundheilungsprozess direkt auf dem Mausrücken, haben sich nach fünf Tagen gravierende Unterschiede im Heilungsprozess zwischen Wildtyp und knock out Maus gezeigt. Bei einem Vergleich der Abbildungen C und D stellt man fest, dass der Wundbereich bei D noch größer ist als bei Abbildung C. Die Kontraktion der Wunde in der knock out Maus ist noch nicht soweit fortgeschritten wie in der Wildtyp Maus.

Die kommenden Abbildungen zeigen Paraffinschnitte (10 μ m) der verschiedenen Zeitpunkte durch den Wundbereich.

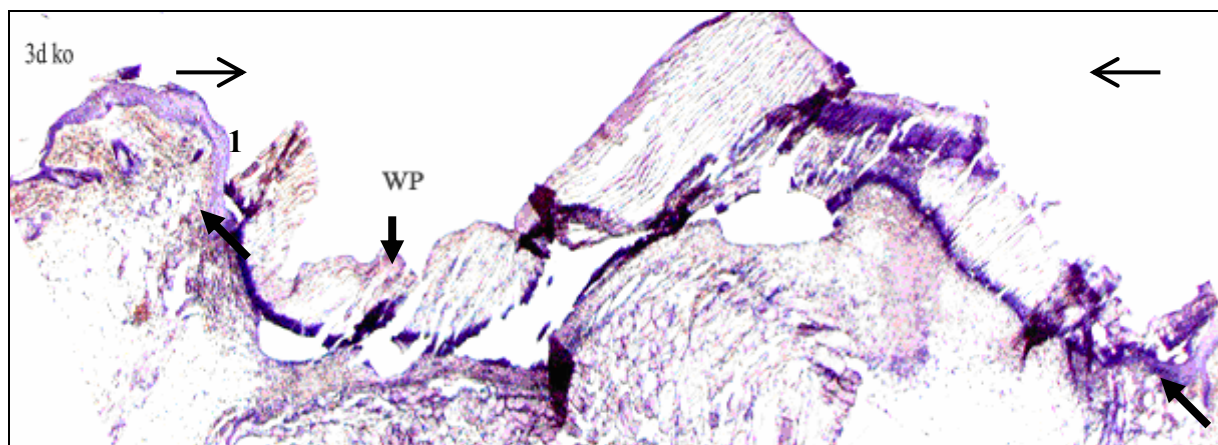
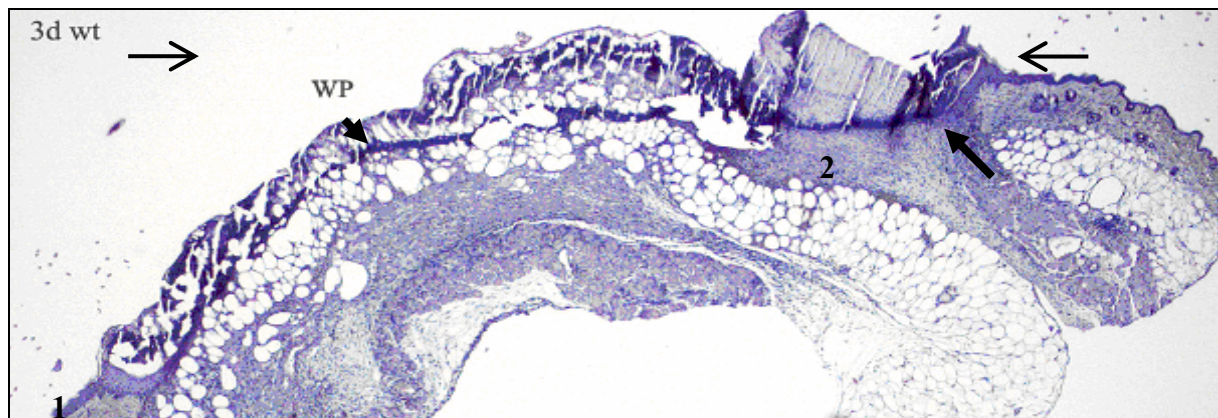


Abbildung 36: Wundheilung von Wildtyp und PKC- ϵ defizienten Mäusen nach drei Tagen. 1: Epidermis; 2: Granulationsgewebe. Die Pfeile markieren die Grenzen der Epidermis, die neu unter dem Wundpfropf (WP) einwandert. Die oberen offenen Pfeile zeigen die Migrationrichtung an.

Drei Tage nach der Wundsetzung ist der verletzte Hautbereich, wie auf Abbildung 36 zu erkennen, noch zum größten Teil vom Wundpfropf bedeckt. Die Epithelialisierung hat gerade erst eingesetzt. Der Wundpfropf schließt noch die Wunde ab, da die Epidermis noch nicht ausgebildet genug ist, um den Wundpfropf zu verdrängen und dessen Aufgabe zu übernehmen. Zu diesem Zeitpunkt der Wundheilung findet die exsudative Phase ihren Abschluss, und die reparative Phase beginnt. Aus diesem Grund gibt es auch noch keine gravierenden Unterschiede in der Wundheilung zwischen der Wunde aus den Wildtyp-Tieren und der Wunde aus dem mutanten Tieren. Die Bildung des Wundpfropfes in PKC- ϵ defizienten Tieren ist nicht negativ beeinflusst.

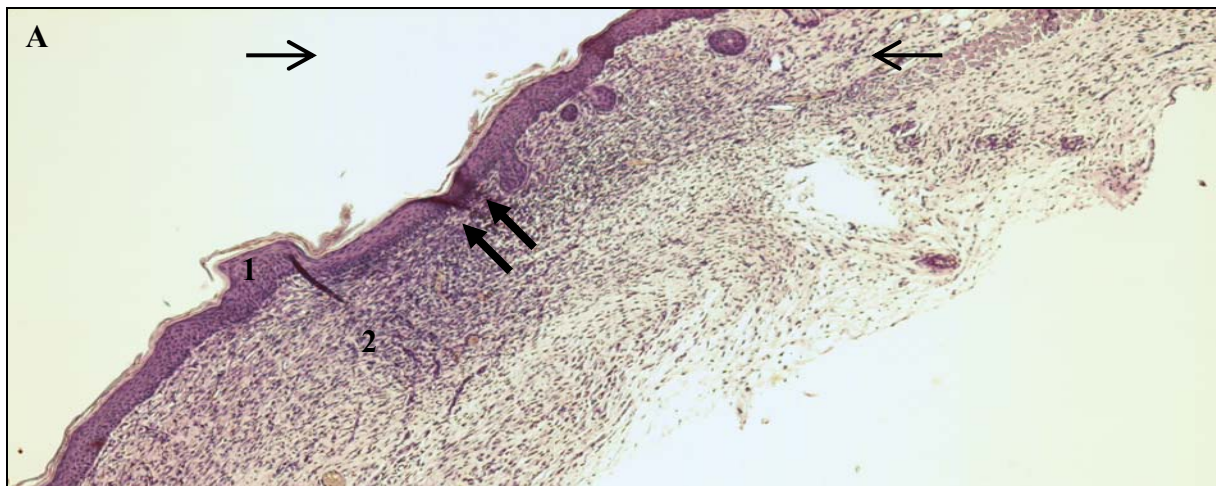


Abbildung 37: Wundheilung von Wildtyp (A) und PKC ε *knock out* (B) Mäusen nach fünf Tagen. 1: Epidermis; 2: Granulationsgewebe; 3: Wundpfropf. Die Pfeile markieren die Grenzen der neu einwandernden Epidermis. Die oberen offenen Pfeile zeigen die Migrationrichtung an. In Abbildung B ist noch der Wundpfropf vorhanden.

Am 5. Tag (Abbildung 37) hat die Epithelisierung in der Wildtyp-Haut einen anderen Verlauf genommen als in der PKC- ε defizienten Haut. In der Wildtyp-Haut hat die neu gebildete Epidermis den Wundbereich schon fast wieder bedeckt. Der Wundpfropf hat sich abgelöst. In der mutanten Haut dagegen bedeckt der Wundpfropf noch immer einen großen Teil des Wundbereichs. Die Epidermis ist noch nicht weit genug in den zentralen Wundbereich eingewandert, um für eine Ablösung des Wundpfropfes zu sorgen. Die Epithelisierung ist im Vergleich zur Wildtyp-Haut verlangsamt. D. h. die Epidermis in der PKC- ε defizienten Haut wandert ab dem dritten Tag, der Anfang der reparativen Phase, langsamer in den Wundbereich ein, als die Epidermis in der Wildtyp-Haut.

Diese Verlangsamung in der Wundheilung der PKC- ϵ defizienten Haut zeigt sich auch im Wundheilungsprozess nach sieben und zehn Tagen.

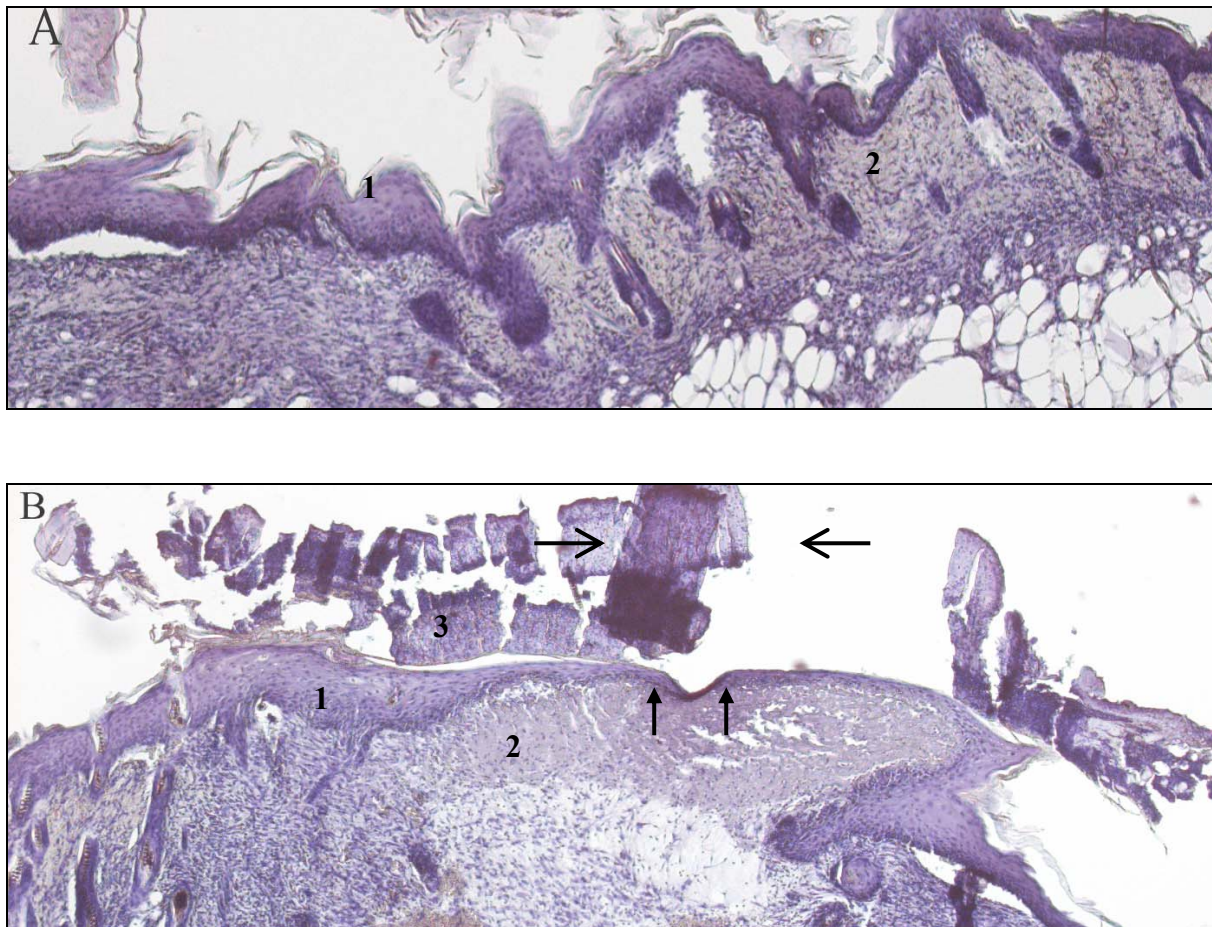


Abbildung 38: Wundheilung von Wildtyp (A) und PKC- ϵ defizienten (B) Mäusen sieben Tagen. 1: Epidermis; 2: Granulationsgewebe; 3: Wundpfropf. Die Pfeile in Abbildung 4B markieren die Grenzen der neu einwandernden Epidermis. Die oberen offenen Pfeile (Abbildung B) zeigen die Migrationrichtung an.

Nach sieben Tagen ist eine Reduzierung der Epithelisierung in der PKC ϵ defizienten Haut zu erkennen (Abbildung 38). Während die Epidermis der Wildtyp-Haut (Abbildung 38a) schon wieder vollständig geschlossen ist (sie zeigt nur noch die typische Verdickung nach einem Wundheilungsprozess), hat die Epidermis der mutanten Haut (Abbildung 38b) sich noch immer nicht ganz geschlossen. Es zeigt sich immer noch eine Lücke, ähnlich der in der Wildtyp-Haut nach fünf Tagen (Abbildung 37a). Auch der Wundpfropf hat sich noch nicht ganz abgelöst.

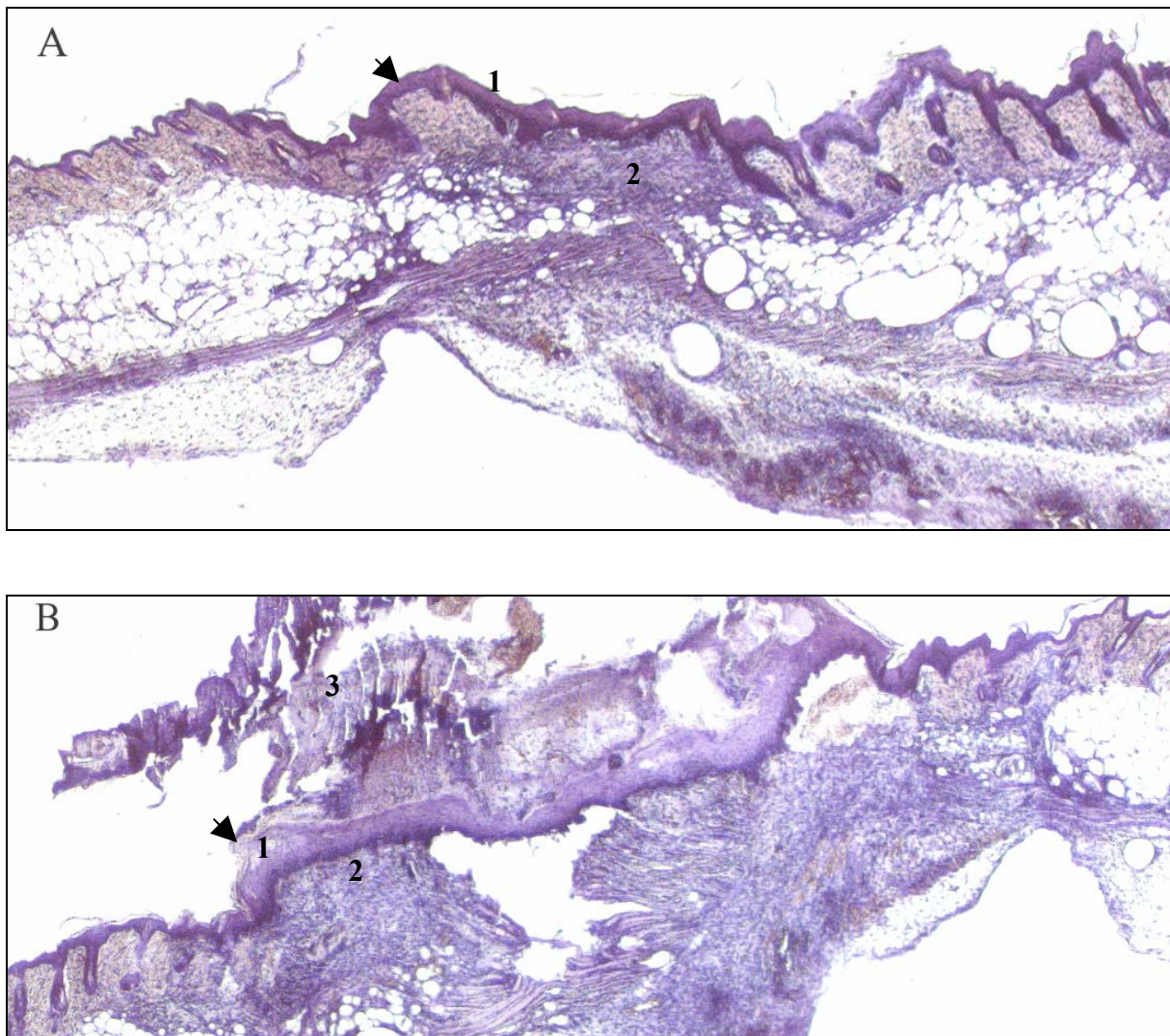


Abbildung 39: Wundheilung von Wildtyp (A) und PKC- ϵ defizienten (B) Mäusen nach zehn Tagen. 1: Epidermis; 2: Granulationsgewebe; 3: Wundpfropf. Der Pfeil markiert die für einen Wundheilungsprozess typisch verdickte Epidermis.

Nach zehn Tagen ist die Epithelisation in beiden Fällen abgeschlossen. Die neu gebildete Epidermis bedeckt den Wundbereich vollständig. Es ist noch die für den Wundheilungsprozess charakteristische Verdickung der Epidermis zu erkennen. Bei der mutanten Haut (Abbildung 39) ist noch ein Teil des Wundpfropfes vorhanden. Dieser hat aber keine Aufgabe mehr und löst sich im weiteren Verlauf der Wundheilung vollständig ab.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Wundheilung in der PKC- ϵ defizienten Haut langsamer verläuft als die Wundheilung in der Wildtyp Haut. Während der reoperativen Phase, zwischen Tag drei und Tag zehn, liegen dabei die größten Unterschiede. Der Wundverschluss durch die Epithelisation verläuft in der mutanten langsamer als in der Wildtyp-Maus.

Zeitlicher Ablauf der Wundheilung

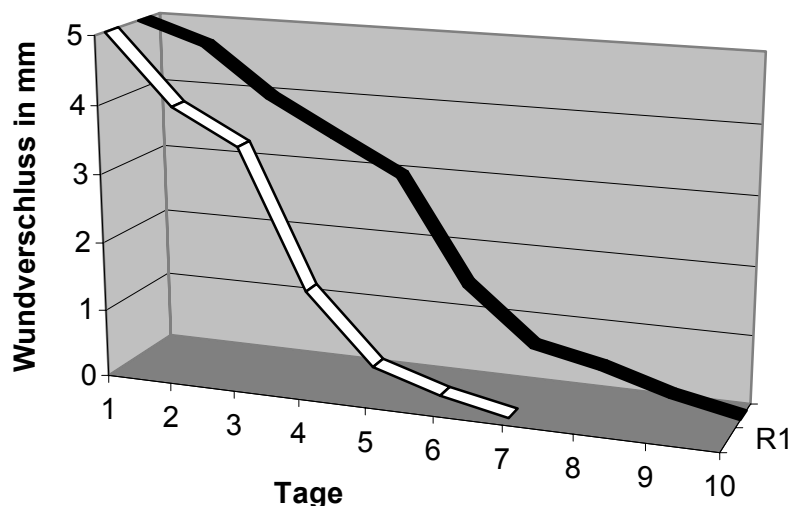


Diagramm 3: Zeitlicher Verlauf des Wundverschlusses in Wildtyp und PKC- ϵ defizienten Mäusen. Dargestellt ist der Durchmesser des offenen Wundbereichs im zeitlichen Verlauf der Wundheilung. Zu erkennen ist das in der Wildtyp Maus (weisser Graph) der absolute Wundverschluss nach 7 Tagen erfolgt, in der mutanten Maus (schwarzer Graph) erst nach 10 Tagen.

Diagramm 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Wundheilung in der Wildtyp Maus und der mutanten Maus. Die reparative Phase der Wundheilung setzt in der mutanten Haut ca. zwei Tage später ein als in der normalen Haut. Bei der Wildtyp Haut ist das am dritten Tag nach der Wundsetzung der Fall, bei der PKC- ϵ defizienten Haut erst am fünften.

3.2.3 Die Unterschiede in der Proliferation

Ein wichtiger Faktor während der Wundheilung ist die Proliferationsrate der Epidermiszellen. Es muss Zellmaterial gebildet werden, das in den Wundbereich migrieren und diesen ausfüllen kann. Aus diesem Grund wurde die Proliferation während der Wundheilung PKC- ϵ defizienter Haut näher untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt:

Zum einen wurde drei Tage nach der Wundsetzung, zu Beginn der reparativen Phase, die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Die Epidermiszellen beginnen zu dieser Zeit, in den Wundbereich zu migrieren. Die allgemeine Proliferationsrate steigt an, um ausreichend Zellmaterial zum Verschluss des Wundbereichs zur Verfügung zu stellen

Der zweite Proliferationsnachweis war eine BrdU (Bromdesoxyuridin)- Markierung. Die BrdU-Markierung wird unter der Verwendung der Keratinozytenzellkultur durchgeführt. In diesem Ansatz sollten Defekte, die aus Verzögerungen der Angiogenese während der Wundheilung resultieren und so das Ergebnis aus dem Ki-67-Nachweis beeinflussen können, keine Rolle spielen.

Ki-67 Expression

Zum Nachweis von Ki-67 wurden die Präparate in Ethanol fixiert und in Parafin eingebettet. Die Wunden, sowohl von der Wildtyp- als auch von der *knock out* Maus, waren ursprünglich 5 mm im Durchmesser.

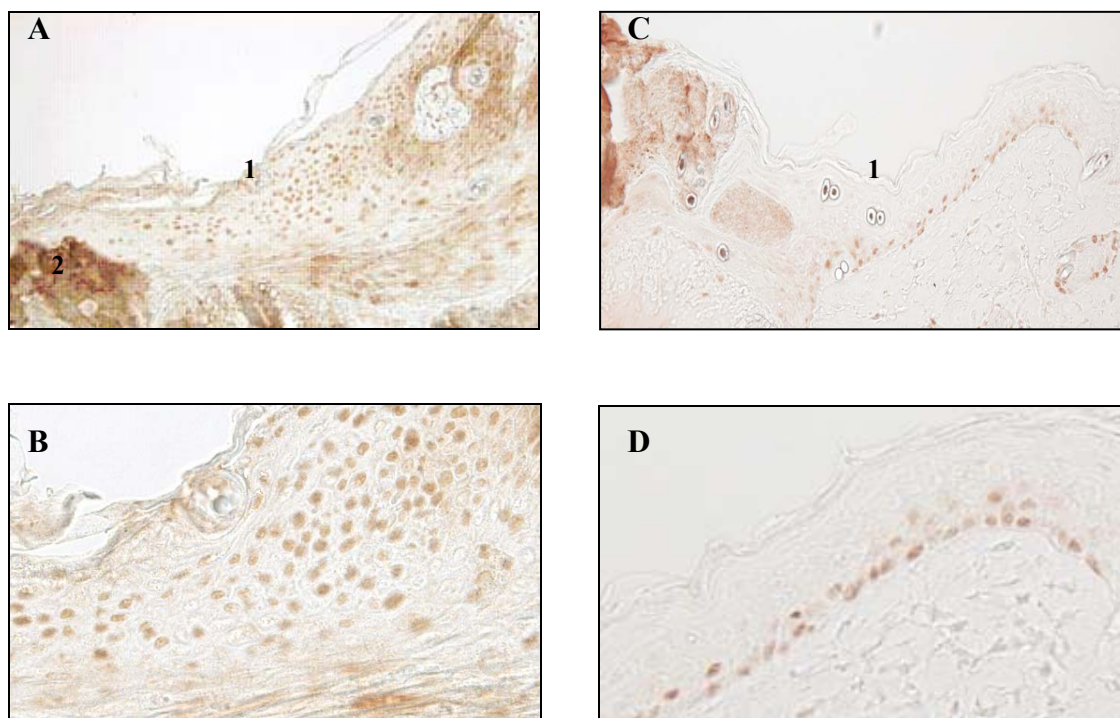


Abbildung 40: Ki67 Proteinexpression während der Wundheilung von Wildtyp (A, B) und PKC- ϵ defizienten (C, D) Mäusen nach drei Tagen. 1: Epidermis; 2: Wundpfropf. Man sieht deutlich mehr positive Zellen in der Wildtyp Haut. Sie proliferieren in breiter Front in Richtung Wundmitte.

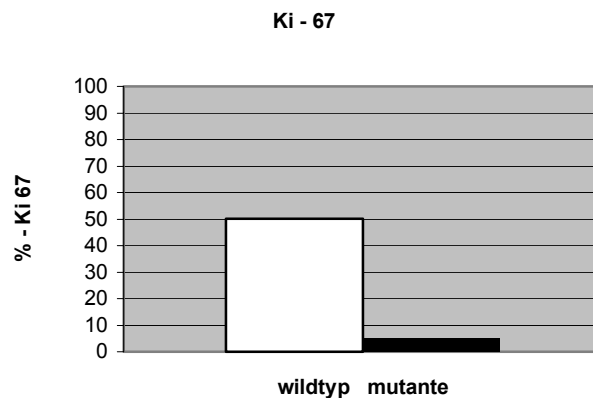


Diagramm 4: Prozentuale Darstellung der proliferierenden Zellen aus Abbildung 40.

Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist der Unterschied in der Proliferation der in den Wundbereich einwandernden Epidermiszellen beträchtlich. Die Anzahl der positiven Zellen in der Abbildung A liegt bei ca. 50%. Bei der PKC- ϵ defizienten Haut liegt die Anzahl der positiven Zellen nur bei ca. 5%. Weiterhin findet in der Wildtyp-Haut die Proliferation in der gesamten, typisch verdickten Epidermis statt. In der PKC- ϵ defizienten Haut ist die Proliferation auf die unteren Zellschichten beschränkt und wesentlich schwächer ausgeprägt. Ob die Keratinozyten selber durch den *knock out* von PKC- ϵ in ihrer Proliferation beeinträchtigt sind oder ob ein sekundärer Effekt dieses auslöst, sollte anhand der BrdU Markierung in Keratinozytenzellkultur untersucht werden.

BrdU – Labeling

Bei dieser Methodik wird anstelle von Thymidin Bromdesoxyuridin (BrdU) während der S-Phase des Zellzyklus eingebaut (). Mit einem spezifischen BrdU-Antikörper ist es möglich, diesen Einbau sichtbar zu machen. Da bei einem Zellkulturversuch die negativen Einflüsse einer verlangsamten Angiogenese, wie sie bei der PKC- ϵ *knock out* Maus während der Wundheilung beobachtet wird, keinen Einfluss haben, würden Unterschiede im Proliferationsverhalten bedeuten, dass das Fehlen von PKC- ϵ auch direkten Einfluss auf die Funktion der Keratinozyten hat. Sollte es keine Unterschiede geben, ist die Beeinträchtigung in der Wundheilung wahrscheinlich auf die Angiogeneseprobleme zurückzuführen.

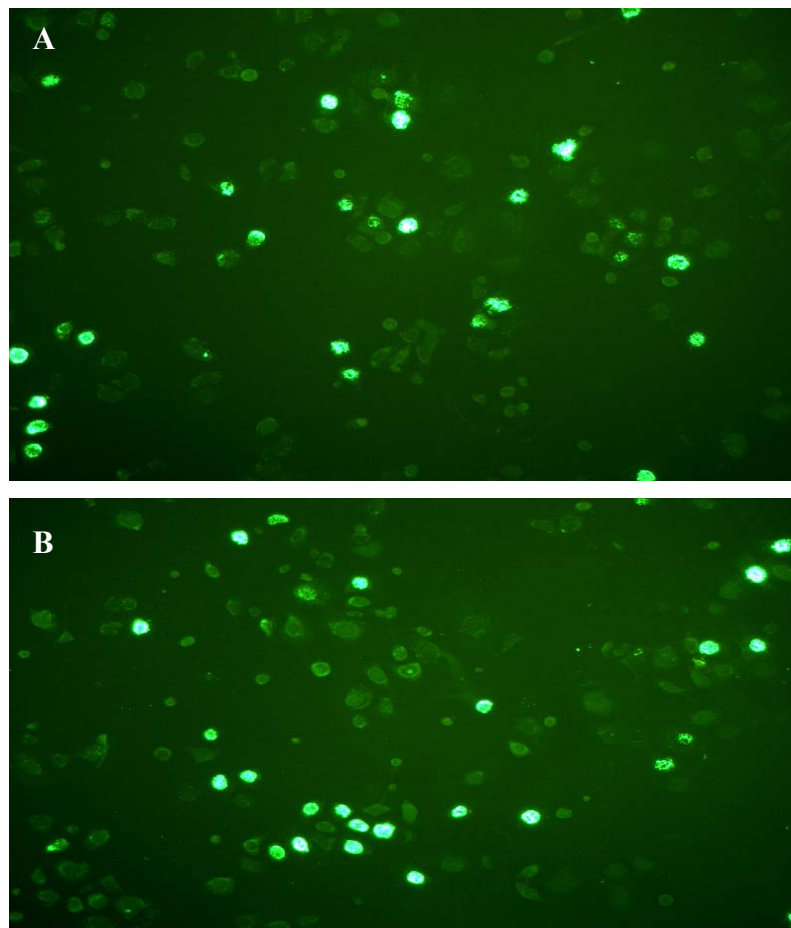


Abbildung 41: BrdU-Labeling in Keratinozytenzellkultur. Der Versuch erfolgte 3 Tage nach Aussaat der Zellen in Proliferationsmedium. Verwendet wurden für das Labeling eine Zellkultur aus Wildtyp-Keratinozyten (A) und aus PKC- ϵ defizienten Keratinozyten (B) bei einer Konfluenz von 50%. Die Fluoreszenz markiert die sich im Zellzyklus befindenden Zellen.

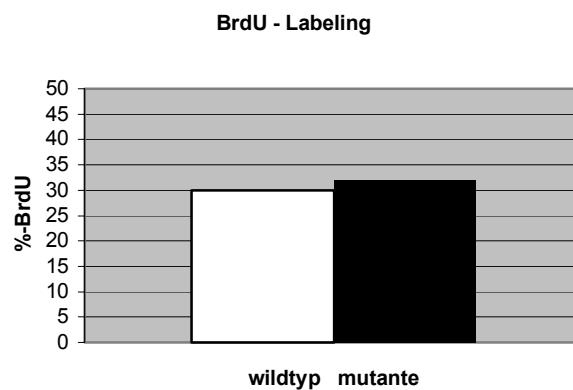


Diagramm 5: Prozentuale Darstellung der sich in der S – Phase befindenden Zellen aus Abbildung 41.

Wie in Abbildung 41 und Diagramm 5 zu erkennen ist, gibt es keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und PKC ϵ -defizienten Keratinozyten in der Anzahl der proliferierenden Zellen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus liegt bei ca. 30%.

Die Verringerung der Ki-67 Expression bei den PKC- ϵ defizienten Tieren, welche drei Tage nach dem Setzen der Wunde beobachtet wurde, sollte deshalb auf die Angiogenesedefizite zurückgeführt werden können.

4. Diskussion

4.1 Die Expressionsmuster der PKC-Isoformen in der Haut

Die positiv in der Mausepidermis detektierten PKC-Isoformen sind PKC- α , PKC- δ , PKC- η und PKC- ζ . Das deckt sich mit Ergebnissen aus verschiedenen anderen Publikationen (Denning, Dlugosz et al. 2000). In einigen Arbeiten wurde in humaner Epidermis auch PKC- ϵ detektiert (Hornia A, Lu Z - Sukezane et al.). Auch Expressionsort und -stärke decken sich mit Inhalten aus anderen Veröffentlichungen (Lee, Yuspa et al. 1998). Die oben genannten PKC-Isoformen finden sich in den unteren, stoffwechselaktiven Schichten der Epidermis, wobei PKC- δ mit Abstand die am stärksten exprimierte Isoform ist (Lowell S and Watt FM). Des Weiteren werden sie in primären Keratinozyten (Zellkultur) und in der Dermis detektiert. Eine Ausnahme bildet PKC- ϵ , das nur in den in der Dermis liegenden Haarfollikeln und Kapillaren exprimiert wird (Abbildungen 30 und 31).

Auch die Expressionsverteilung weist bei allen PKC-Isoformen, mit Ausnahme von PKC- ϵ , das gleiche Muster auf. Die niedrigste Expression weisen die primären Keratinozyten auf. Die Keratinozytenzellkultur besteht unter normalen Kulturbedingungen nur aus Zellen der untersten Epidermisschicht (Stratum germinativum). Die Zellen können proliferieren, eine Differenzierung zu anderen Epidermiszellen findet nicht statt. Auch in der IHC zeigt sich stets eine Expression in der basalen Schicht der Epidermis. Stärker ist die Expression der Isoformen in der gesamten Epidermis. Der Grund dafür ist, dass es in der zweiten stoffwechselaktiven Schicht der Epidermis, dem Stratum spinosum, auch zu einer Expression der PKC-Isoformen kommt. Am stärksten ist die Expression jedoch in der Dermis. Diese zeigt von allen Kompartimenten der Haut die höchste Stoffwechselrate. Über das ins Bindegewebe eingelagerte Blutgefäßsystem wird die Versorgung der gefäßlosen Epidermis sichergestellt. Die Haarfollikel kontrollieren das Wachstum der Haare. PKC- ϵ z.B. ist in das Wachstum und die Erhaltung der Haarfollikel involviert (Littler CM, Morris KG Jr - Fagan et al.). Außerdem ist die Dermis der Ort, in den die freien Nervenendigungen eingelagert sind, über die die Schmerzweiterleitung vermittelt wird. In der PKC- ϵ knock out Maus z.B. kommt es zu einer Verminderung der Schmerzweiterleitung in den sensorischen Neuronen (Littler CM, Morris KG Jr - Fagan et al.).

Wenn die Expressionsstärke der PKC-Isoformen untereinander verglichen wird, stellt man auch hier Unterschiede fest. Die am stärksten exprimierte Isoform ist PKC- δ . Sie ist in fast

alle wichtigen Zell-Funktionen wie Differenzierung, Proliferation oder Migration involviert (Lowell S and Watt FM). Danach folgen PKC- η und PKC- ζ . PKC- η spielt vor allem in der Keratinozytendifferenzierung eine Rolle (Abbildung 27) (Kashiwagi M, Ohba M Chida et al.). Über die Funktion von PKC- ζ in der Haut ist nicht viel bekannt. Die schwächste Expression weist PKC- α auf.

4.2 Die Funktion der PKC-Isoformen in der Epidermis

Da Ausbildung und Organisation der Epidermis entscheidende Aspekte der Wundheilung darstellen, auf der das Hauptaugenmerk der funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit liegt, soll im Folgenden auf mögliche Funktionen der einzelnen PKC-Isoformen in dieser Hautschicht eingegangen werden. Das Hauptaugenmerk soll dabei auf Funktionen liegen, die für eine mögliche Reorganisation der Epidermis verantwortlich sind.

PKC delta

Sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis ist die Expression von PKC- δ höher als die aller anderen Isoformen (Abbildung 18). Aus veröffentlichten Arbeiten geht auch hervor, dass PKC- δ in viele wichtige Funktionen in der Haut involviert ist (Lowell S and Watt FM) (Alt, Ohba et al. 2001). Zu diesen gehören die Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung, welche auch essentiell für die Reepithelialisierung sind (Martin P LA). Einer der wichtigsten Interaktionspartner ist das Integrin $\alpha 6\beta 4$. Es wird ausschließlich in den Keratinozyten der untersten Epidermisschicht auf der basalen Oberfläche exprimiert (Hintermann E, Bilban M - Sharabi et al.). Dort sorgt es für die Verbindung der Keratinozyten mit der extrazellulären Matrix über Laminin-5 (O'Toole EA, Marinkovich MP - Hoeffler et al.; Alt, Ohba et al. 2001). Die Differenzierung und die damit verbundene Migration in die nächste Epidermisschicht ist mit einer Trennung dieser Verbindung assoziiert (Alt, Ohba et al. 2001). Bei einer Aktivierung von PKC- δ , welches besonders stark in der untersten Epidermisschicht exprimiert wird (Abbildung 19), durch TPA wurde ein deutlicher Rückgang der $\alpha 6\beta 4$ -Expression in den Keratinozyten beobachtet (Alt, Ohba et al. 2001). Es kommt zu einer von PKC- δ vermittelten Phosphorylierung der beiden Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$, die zu einer Veränderung der zellularen Verteilung des Integrins führt (Alt A, Ohba M - Li et al.; Huang X, Wu J - Spong et al.). $\alpha 6\beta 4$ transloziert von den Hemidesmosomen in das

Cytosol. Die Keratinozyten lösen sich von der extrazellulären Matrix, migrieren in die oberen Zellschichten und differenzieren (Alt A, Gartsbein M - Ohba et al.).

Auch im Migrationsverhalten von Keratinozyten spielt der Komplex $\alpha 6\beta 4$ -Laminin-5 im Zusammenhang mit PKC- δ eine Rolle (Hintermann E, Bilban M - Sharabi et al.). Der $\alpha 6\beta 4$ -Integrinrezeptor wird in einer PKC- δ defizienten Maus zwar exprimiert, aber die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, mit dem $\alpha 6\beta 4$ intrazellulär verbunden ist, ist beeinträchtigt (Hintermann E, Bilban M - Sharabi et al.). Diese Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist für den Vorgang der Migration von entscheidender Bedeutung. Während der Lösung vom alten Standort über die Migration bis zur Bildung eines neuen Ligationskomplexes kommt es zu einer kompletten Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Brandt, Gimona et al. 2002). Bei der Aktivierung dieses Vorganges ist auch PKC- δ mit eingebunden. Es phosphoryliert die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP- α (Brandt, Goerke et al. 2003). Dadurch wird PTP- α aktiviert und setzt die intrazelluläre Signalkaskade weiter fort. PTP- α aktiviert Src, eine Tyrosin-Kinase. Src aktiviert in weiterer Folge eine Signalkaskade, die zur Auflösung der Aktin-Stressfasern führt (Brandt, Gimona et al. 2002).

Der Einfluss von PKC- δ auf die Proliferation ist vielfältig. Im Zusammenhang mit der Differenzierung wurde schon erwähnt, dass es bei einer Überexpression zu einem deutlichen Rückgang der $\alpha 6\beta 4$ -Expression kommt. Die Keratinozyten lösen sich von der extrazellulären Matrix. Da aber nur die basalen Keratinozyten proliferieren, bedeutet das indirekt eine Verringerung in der Proliferation. PKC- δ kann aber auch auf direktem Wege auf die Proliferation einwirken. Bei einer Stimulierung von Keratinozyten mit Insulin wurde ein Anstieg der PKC- δ -Aktivität festgestellt (Shen, Alt et al. 2001). Als Folge davon kam es zu einer erhöhten Proliferationsrate (Shen, Alt et al. 2001). Das dies auch auf die PKC- δ -Aktivierung zurückzuführen war, wurde mit dem spezifischen Inhibitor Rottlerin bewiesen (Shen, Wertheimer et al. 2000). Eine Aktivierung von PKC- δ findet allerdings nicht statt, wenn die Keratinozyten vorher mit EGF und Calcium stimuliert wurden (Shen, Alt et al. 2001).

PKC eta

Bei Wundheilungsversuchen mit PKC- η defizienten Mäusen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wie sie von PKC- δ bekannt sind und in dieser Arbeit für PKC- ε gezeigt wurden (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.). Der gesamte Verlauf der Wundheilung ist um ca. zwei Tage verlangsamt. Allerdings setzt diese Verlangsamung erst zu einem späteren Zeitpunkt ein

als bei z.B. der PKC- ϵ defizienten Maus. Bis zu Tag 5 läuft die Wundheilung identisch mit der Wildtyp Wundheilung ab. Erst wenn es zur Remodulierung der Epidermis kommt, tritt ein negativer Effekt ein (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.). Dazu passt das Expressionsprofil, das in Abbildung 26 gezeigt wird. Die Expression von PKC- η nimmt während der Keratinozytendifferenzierung erst später als die der anderen Isoformen zu (Lee YS, Dlugosz AA - McKay et al.).

PKC- η beeinflusst die Differenzierung von Keratinozyten auf zwei verschiedene Arten: einmal indirekt, über die Proliferation, und einmal direkt. Damit die Zelldifferenzierung beginnen kann, ist es nötig, eine Beendigung des Zellzyklus herbeizuführen. PKC- η assoziiert dazu mit dem Komplex cdk2/p21 im Zytoplasma der Zelle (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.). Das führt zu einer Inhibition der Kinaseaktivität von cdk2, was letztendlich den Stopp des Zellzyklus im G1-Stadium bewirkt (Kashiwagi M, Ohba M - Chida et al.). In die Differenzierung greift PKC- η direkt ein, indem es die Transkription von Transglutaminase, einem Marker für Keratinozytendifferenzierung, sowie von Involucrin erhöht.

PKC alpha

Auch PKC- α interagiert mit dem $\alpha 6\beta 4$ -Komplex. Bei einer Aktivierung von PKC- α kommt es allerdings zu einer Zunahme der $\alpha 6\beta 4$ -Integrin-Expression umgekehrt zur Wirkung von PKC- δ und PKC- ζ (Alt, Ohba et al. 2001). Das führt zu einer erhöhten Bindung an den Liganden Laminin-5 und einer Stabilisierung der Expression in den Hemidesmosomen (Alt, Ohba et al. 2001). Eine Differenzierung wird auf diese Weise inhibiert. Dazu passt, dass PKC- α die Differenzierungsmarker Keratin-1 und Keratin-10 unterdrückt (Lee YS - Dlugosz, Dlugosz AA - McKay et al.).

Eine Besonderheit ist die Interaktion von Syndecan-4 und PKC- α . Syndecan-4 ist ein transmembranes Proteoglycan, welches in vielen Zellarten in die Adhäsion mit der extrazellulären Matrix und in die Bildung von Aktin-Stressfasern involviert ist (Echtermeyer F, Baciuc PC, Saoncella et al.). Für eine Beteiligung an der Adhäsion von Syndecan-4 ist auch eine Aktivierung von PKC- α nötig, das an die Adhäsionspunkte transloziert (Murakami M, Horowitz A - Tang et al.). Die zytoplasmatische Domäne des Kernproteins von Syndecan-4 ist in der Lage, mit PKC- α über seine katalytische Domäne zu interagieren. Dabei wird durch Phospholipidmediatoren die Aktivität von PKC- α potenziert. Des Weiteren kann Syndecan-4 PKC- α in Abwesenheit anderer Mediatoren aktivieren (Murakami M, Horowitz A - Tang et al.).

Weiterhin beeinflusst PKC- α apoptotische Vorgänge in der Haut (Dempsey, Newton et al. 2000). In einer transgenen Maus, die PKC- α in der basalen Schicht der Epidermis überexprimiert, wurde nach TPA-Induktion eine Zunahme der Apoptose festgestellt {Pablos JL - Carreira, #96}.

PKC zeta

Auch PKC- ζ ist in die Integrin abhängige Adhäsion involviert. Bei einer Aktivierung von PKC- ζ kommt es genau wie bei PKC- δ zu einem Rückgang der $\alpha 6\beta 4$ -Expression in der basalen Schicht der Epidermis (Alt, Ohba et al. 2001). Der Effekt der Loslösung von der extrazellulären Matrix ist im Vergleich mit PKC- δ allerdings niedriger. Dennoch ermöglicht eine PKC- ζ -Aktivierung in diesem Fall eine weitere Migration und/ oder Differenzierung (Alt A, Gartsbein M - Ohba et al.).

PKC epsilon

Nach Daten dieser Arbeit findet eine Expression von PKC- ϵ nur in der Dermis der Haut statt. Besonders stark ist sie in den Haarfollikeln und im Blutkreislaufsystem (Abbildung 30 und 31). Wie vorher schon erwähnt, ist PKC- ϵ wichtig für das Wachstum und den Erhalt der Haarfollikel. Die Funktion im Blutkreislaufsystem wird in Kapitel 4.4 beschrieben.

In einigen neueren Arbeiten wird auch Aufgrund von RT-PCR-Daten eine Expression von PKC- ϵ in der Mausepidermis erwähnt (Wheeler, Ness et al. 2003). Untersucht wird dort die Rolle von PKC- ϵ in Entwicklung von Hautkrebs (Wheeler, Ness et al. 2003). In einer transgenen Maus, welche PKC- ϵ in der basalen Schicht der Epidermis und in den Haarfollikeln überexprimiert, wurde die Bildung von Tumoren festgestellt, die auch metastasieren. Die PKC- ϵ Aktivierung ist ein wichtiger Schritt in der TPA induzierten Ausschüttung von TNF- α durch Keratinozyten. Die TNF- α -Ausschüttung ist dabei proportional zur PKC- ϵ Expression (Wheeler, Ness et al. 2003).

Die hier aufgeführten Funktionen der verschiedenen PKC-Isoformen sind nur Teil der Aufgaben, die sie in den Signalkaskaden in der Haut haben. Vor allem PKC- δ scheint in viele wichtige Signalkaskaden integriert zu sein. Wenn unter Stresssituationen, wie z.B. der Wundheilung, die Expression von bestimmten PKC-Isoformen sich verändert, ist nicht viel über die Auswirkungen auf die Signalkaskaden bekannt. PKC- α z.B. ist während der

Wundheilung eine wichtige Komponente im Signaltransduktionsprozess, der zur Zellmigration führt (Lee YS, Dlugosz AA - McKay et al.).

Auch mögliche Redundanzen der PKC-Isoformen untereinander sind weitgehend unerforscht. Für eine vorhandene Redundanz, neben PKC-unabhängigen Prozessen, unter den PKC-Isoformen spricht, dass bei Wundheilungsversuchen in PKC *knock out* Mäusen die Wunden zwar langsamer verheilen, der totale Wundverschluss aber trotzdem erreicht wird. Um dieses genauer zu untersuchen, wäre eine Kreuzung, vor allem bei strukturell ähnlichen Isoformen, von doppelt defizienter Mäusen empfehlenswert.

4.3 Die Wundheilung

Der Vorgang der vollständigen Reorganisation der Haut während der Wundheilung ist ein komplexer Ablauf. Wichtig für die Reepithelialisierung ist das Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsverhalten der Keratinozyten (Martin P). Sie sorgen für eine Reetablierung der Wasser- und Immunbarriere. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Migration und Aktivierung von Immunzellen wie Makrophagen im Bereich der Wunde (Park JE and Barbul A). Sie geben nicht nur die erste Immunantwort, um mögliche Infektionen zu bekämpfen, sondern sind auch eine Quelle für Wachstumsfaktoren und Zytokine (Mori, Kondo et al. 2004). Wie sich eine mögliche Reduzierung in der Aktivierung auf die Wundheilung auswirken kann, soll später an einem Beispiel besprochen werden.

Auch die Angiogenese ist ein entscheidender Faktor im Ablauf der Wundheilung (Echtermeyer, Streit et al. 2001). Im dabei gebildeten Granulationsgewebe regenerieren nicht nur die Blutgefäße, sondern es bildet auch die Grundlage für eine weitere Migration von Immunzellen in den Wundbereich. Zudem fungiert das Granulationsgewebe als Matrix für die Reepithelialisierung der Epidermis (Echtermeyer, Streit et al. 2001).

Wie schon in Kapitel 1.3 dargelegt, verlaufen alle diese Prozesse parallel und in Abhängigkeit zueinander. Funktioniert einer dieser Prozesse nicht optimal, zieht das weitere Heilungsschritte in Mitleidenschaft. Im Folgenden soll am Beispiel der Wundheilung in der PKC- ϵ *knock out* Maus solch ein Fall dargestellt werden.

Schon bei PKC- δ und PKC- η *knock out* Mäusen wurde eine Verzögerung des Wundheilungsprozesses festgestellt (Chida, Hara et al. 2003). Bei PKC- δ defizienten Tieren macht sich der negative Einfluss schon während der Reepithelialisierungsphase bemerkbar. In einer Wildtyp-Maus hat sich bei einer am Anfang 5mm großen Wunde die epidermale Schicht schon nach fünf Tagen wieder rekonstituiert. In der PKC- δ *knock out* Maus dagegen ist das

erst nach sieben Tagen der Fall. Beim PKC- η defizienten Tier, wie in Kapitel 4.1 schon erwähnt, werden erst bei der Remodulierung der Epidermis Defekte deutlich (Chida, Hara et al. 2003). Dies passt zu den Expressionsprofilen der beiden PKC-Isoformen. PKC- δ ist die am stärksten exprimierte Isoform in der Haut und an allen grundlegenden Vorgängen beteiligt, die bei einer Wundheilung induziert werden. PKC- η dagegen scheint nur in die Zelldifferenzierung involviert zu sein. Deshalb setzt der negative Effekt auch erst bei der Remodulierung der schon wieder konstituierten Epidermis ein. Gemeinsam haben beide, dass die Wunden trotz der auftretenden Komplikationen vollständig abheilen (Chida, Hara et al. 2003).

Ein vollständiges Abheilen einer Wunde findet auch in der PKC- ε defizienten Haut statt. Der Zeitpunkt, zu dem die Komplikationen in der Wundheilung einsetzen, liegt, ähnlich wie bei der PKC- δ -defizienten Haut, in der Entzündungsphase. Die Epidermis hat sich nach fünf Tagen noch nicht wieder vollständig konstituiert (Abbildung 37). Die Ursache für die Verzögerung der Wundheilung dürfte allerdings einen anderen Grund haben als bei den oben genannten Isoformen. In dem ermittelten Expressionsprofil von PKC- ε in der Haut gibt es keine Expression in der Epidermis, dafür aber eine ungewöhnlich hohe im Gefäßsystem der Haut, das in die Dermis eingelagert ist. Während der Wundheilung wurde festgestellt, dass die Ausbildung des Granulationsgewebes verzögert ist, was auf Komplikationen in der Angiogenese hindeutet.

Die Neubildung von Gefäßen im Wundbereich ist einer der wichtigsten Vorgänge während der Wundheilung (Li J, Zhang YP - Kirsner et al.). Über das sich wieder aufbauende Blutssystem werden Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff in den Wundbereich transportiert (Li J F, Zhang YP Kirsner et al.). Gibt es Komplikationen bei der Regeneration des Gefäßsystems, hat das entscheidende Auswirkungen auf den gesamten Verlauf der Wundheilung (Echtermeyer, Streit et al. 2001). In einer Syndecan-4-defizienten Mauslinie z.B. wurden Komplikationen bei der Angiogenese als auch bei der Wundheilung festgestellt (Echtermeyer, Streit et al. 2001). Die Syndecane bilden eine Familie von transmembranen Heparan-Sulfat-Glycoproteinen. Sie sind Korezeptoren von Wachstumsfaktoren und Integrinen. Während der Wundheilung wird Syndecan-4 in der Dermis hochreguliert (Woods A - Couchman and States TA. 2001).

Dass die verlangsamte Reepithelialisierung in der PKC- ε Mutante aus dem Defizit in der Angiogenese resultiert, und nicht aus einem physiologischen Defekt in der Epidermisproliferation, wurde anhand des Ki-67 Proliferationsassays und der BrdU-Markierung bewiesen. Die Immunmarkierung mit Ki-67-Antikörpern zeigte gravierende

Unterschiede in der Proliferation. Bei der *knock out* Maus war der Anteil proliferierender Zellen etwa 10fach geringer als im Wildtyp. Da der Ki-67-Antikörper *in situ* verwendet wurde, greifen in diesem Fall auch die Beeinträchtigungen, die aus einer verlangsamten Angiogenese entstehen würden. Bei der BrdU-Markierung gab es fast keine Unterschiede in der Proliferation. Dieser Versuch wurde in einer Keratinozytenzellkultur vorgenommen. Hier greifen Beeinträchtigungen sekundärer Art nicht. Bei beiden Zellkulturen, Wildtyp und mutanten Zellen, lag die Proliferationsrate bei ca. 30%.

Die Verzögerung der Wundheilung resultiert deshalb wahrscheinlich aus den Komplikationen während der Angiogenese. In Endothelzellen, die bilden die Grundlage neu gebildeter Blutgefäße, wurden fünf PKC-Isoformen detektiert: PKC- α , - β , - δ , - ϵ und - η (Wu, Mayo et al. 2000). In Endothelzellen aus dem Gehirn der Ratte wurden noch zusätzlich die Isoformen PKC- γ und - ζ gefunden (Wu, Mayo et al. 2000).

4.4 Die Rolle von PKC- ϵ während der Angiogenese

Die Angiogenese wird von einem Netzwerk von Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert. Einige Faktoren wie TNF, TGF, Angiogenin oder Prostaglandin E₂ beeinflussen die Angiogenese indirekt (Wu, Mayo et al. 2000). Andere spielen bei der Angiogenese direkt eine Rolle, sind aber auch Mitogene für andere Zellen.

VEGF (*Vascular endothelial cell growth factor*), ein dimeres Glycopeptid, ist im Gegensatz dazu ein für Endothelzellen spezifisches Mitogen, welches unablässig ist für die Angiogenese (Harry LE and Paleolog EM). Im ausgewachsenen Organismus wird VEGF nur sehr selten exprimiert (Chen CC, Mo FE - Lau et al.). Zu diesen seltenen Ausnahmen zählen die Prozesse der Wundheilung und regelmäßig wiederkehrende Gefäßbildungen im Rahmen des weiblichen Zyklus. Bei pathologischen Prozessen wird VEGF häufig wieder exprimiert, wie z.B. bei Entzündungsprozessen, unter Hypoxie oder bei bestimmten Tumoren (Harry LE and Paleolog EM). VEGF induziert die Proliferation und Migration von Endothelzellen, die Remodulation der extrazellulären Matrix und die Formation der Kapillaren (Harry LE and Paleolog EM). Die zugehörigen Rezeptoren für VEGF sind Flk1 (das humane Homolog ist KDR) und Flt1 (Wu, Mayo et al. 2000). Bei einer Bindung von VEGF an einen der Rezeptoren kommt es zu dessen Autophosphorylierung. Die Phosphorylierungen dienen intrazellulären SH2-Domänen (Src Homology-2) tragenden Signalproteinen als Bindungsstellen, welche nun eine Signalkaskade einleiten können. Über so eine Signalkaskade können Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die das Signal in eine

Zellantwort umschreiben (Hossain, Bouton et al. 2000). Flk1 aktiviert unter anderem PLC- γ , Akt, FAK (*focal adhesion kinase*) und PKC- ϵ (Chen CC, Mo FE - Lau et al.). PLC- γ und PKC- ϵ wiederum aktivieren die MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*). Bei einer Inhibition von MAP-Kinasen wurde eine verminderte DNA-Synthese, ein weiterer Index für die Zellproliferation, festgestellt. Bei einer Inhibition von durch VEGF aktivierter PKC- ϵ wurde die MAPK-Aktivierung nur geringfügig gestört, die durch VEGF induzierte Proliferation allerdings wurde stark beeinträchtigt. PKC- ϵ ist also nicht nur in die MAPK-abhängige Proliferation involviert, sondern beeinflusst diese auch über unabhängige Signalwege (Hossain, Bouton et al. 2000).

Durch VEGF aktiviertes PKC- ϵ ist während der Angiogenese in die Proliferation der Endothelzellen involviert. Deshalb kommt es während der Wundheilung in der PKC- ϵ defizienten Haut auch zu einer Verzögerung der Angiogenese, die den gesamten Ablauf beeinflusst.

4.5 Die Rolle von PKC- ϵ in der Makrophagenaktivierung

Wie schon in vorher erwähnt, ist das Einwandern von Makrophagen in den Wundbereich ein zentraler Schritt des Wundheilungsverlaufs. Makrophagen sind nach den neutrophilen Granulozyten die zweite Zellart, die aktiv in den Wundbereich migriert (Park JE and Barbul A). Sie erscheinen ab dem zweiten Tag und differenzieren sich vor allem aus im Blut zirkulierenden Monozyten. Die Makrophagen sind nicht nur für die Immunabwehr zuständig, sondern sie sind auch eine wichtige Quelle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Chen CC, Mo FE, Lau et al.). Sie gelten als die „dirigierenden“ Zellen während der Wundheilung (Park JE and Barbul A). Eine Stimulation der Makrophagenfunktion führt zu einer erhöhten mechanischen Festigkeit und einem vermehrten Kollagengehalt der Wunde (Mori, Kondo et al. 2004). Die Injektion von aktivierten Makrophagen in die Wunde beschleunigt das Heilungsverhalten (Mori, Kondo et al. 2004).

Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass viele PKC-Isoformen in die Signalkaskaden des Immunsystems eingebunden sind (Tan SL and Parker P). So weist PKC- α eine hohe Expression in T-Zellen auf (Keenan C, Long A - Kelleher et al.), PKC- β spielt eine wichtige Rolle in der B-Zellmigration und PKC- δ ist unter anderem wichtig für die B-Zelltoleranz (Mathis and King 2002).

PKC- ϵ spielt eine wichtige Rolle während der Makrophagenaktivierung (Castrillo, Pennington et al. 2001). Bei einer bakteriellen Infektion zeigen PKC- ϵ *knock out* Mäuse

erhebliche Störungen in der Immunantwort (Castrillo, Pennington et al. 2001). Die Makrophagen von PKC- ϵ Mutanten zeigen eine verminderte Reaktion auf Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon- γ . Daraus resultiert eine verminderte Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), TNF- α und Interleukin-1 β (Castrillo, Pennington et al. 2001). Weitere Untersuchungen an PKC- ϵ -defizienten Mäusen haben eine verringerte Aktivierung der I κ B-Kinase und von NF κ B gezeigt. Auch die IgG stimulierte Phagozytose der mutanten Makrophagen erfolgt nur eingeschränkt (Larsen, Ueyama et al. 2002). Zusammengenommen bedeutet das, dass PKC- ϵ eine kritische Komponente in der LPS-Aktivierung von Makrophagen ist.

Von diesen Tatsachen ausgehend ist es wahrscheinlich, dass die gestörte Makrophagenaktivierung ebenfalls ein Faktor für die verlangsamte Wundheilung in der PKC- ϵ -defizienten Maus ist.

- Eine reduzierte Bekämpfung der bakteriellen Infektion während der Entzündungsphase der Wundheilung verlangsamt deren Gesamtablauf.
- Eine verminderte Phagozytose verhindert die schnelle Zerstörung von beschädigten Zellen und Fremdkörpern.
- Aktivierte Makrophagen setzen einen Reiz für Fibroblasten, damit diese in den Wundraum einwandern, um neue Zellen zu bilden. Bleibt dieser Reiz aus oder ist abgeschwächt, findet die Fibroblasten Migration in den Wundraum nur eingeschränkt statt.
- Aktivierte Makrophagen stimulieren Blutgefäße durch die Synthese von VEGF, aus dem umliegenden Gewebe in den Wundbereich einzuwandern.

Die Makrophagen stellen zwischen Tag 3 und Tag 5 der Heilung die stärkste und einflussreichste Zellfraktion. In der Entzündungsphase sind sie vor allem für die Immunantwort zuständig. Danach setzt bei einem normalen Verlauf der Wundheilung die Reepithelialisierungsphase ein, und die Makrophagenaktivität geht langsam zurück. Die Immunzellen sind dann in erster Linie Quellen für Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Bei der Wundheilung in der PKC- ϵ -defizienten Maus setzt die Reepithelialisierungsphase später ein und verläuft langsamer, was auf eine verminderte Aktivierung der Makrophagen zurückzuführen sein könnte.

4.6 Ausblick

Um die Funktionen der PKC-Isoformen in der Haut genauer bestimmen zu können sind noch vielfältige Untersuchungen notwendig. Ein erster Schritt wäre die Generierung doppelt defizienten Tieren, um eine mögliche Redundanz zu untersuchen. Im Falle der Wundheilung wäre auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit und des Expressionsprofils die Generierung einer PKC- δ / ϵ Doppel- *knock out* Maus sinnvoll.

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die verlangsamte Wundheilung der PKC- ϵ -defizienten Maus weiter zu untersuchen, wäre eine genauere Untersuchung des Einflusses, den die Makrophagen haben: Gibt es einen Unterschied in der Wildtyp und *knock out* Maus an aktivierten Makrophagen im Wundbereich? Welche Auswirkungen hat eine mögliche Komplikation in der Makrophagenaktivierung auf die anderen Immunzellen, auf die Angiogenese und auf die Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren? Wie sollte man vorgehen? Man könnte z.B. erstmal Makrophagen an sich untersuchen!

Im Bereich der Angiogenese sollte das Hauptaugenmerk der weiteren Untersuchungen auf der Signalkaskade liegen, die von VEGF initiiert wird. In wie fern beeinflusst das Fehlen von PKC- ϵ die weitere Angiogenese. Gibt es alternative Signalkaskaden, oder übernimmt eine andere PKC-Isoform die Funktion von PKC- ϵ ?

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass PKC- ϵ in mehreren Hinsichten den Verlauf der Wundheilung beeinflusst. Mit der Angiogenese und der Makrophagenaktivierung zeigt sie zwei mögliche Mechanismen dieser Beeinflussung auf, deren genauere Untersuchung eine Rekonstitution des spezifischen molekularen Wirkmechanismus dieser PKC-Isoform liefern wird.

5. Zusammenfassung

Der erste Teil der vorgelegten Arbeit bestand in der Erstellung eines Expressionsprofils der verschiedenen PKC-Isoformen in der Maushaut. Als Arbeitsmethoden kamen die RT-PCR, der Western-Blot und die Immunhistochemie zu Einsatz. Als Grundlage für diese Analysen dienten die cDNA und Proteinextrakte aus der Keratinocytenzellkultur, der Epidermis, der Dermis und der gesamten Haut. Für die Immunhistochemie wurden Hautschnitte angefertigt. Das Hauptaugenmerk bei diesen Untersuchungen lag in der Expressionsstärke und -ort.

Positiv getestet wurden die Isoformen PKC- α , - δ , - ε , - η und - ζ . Alle Isoformen, mit Ausnahme von PKC- ε , werden in der Dermis und Epidermis exprimiert. Bei einem Vergleich der Isoformen untereinander lag die stärkste Expression bei PKC- δ . Danach folgten PKC- η und - ζ . Die schwächste Expression hatte PKC- α . Bei einem Vergleich der Expressionsstärke in den Kompartimenten der Haut war eine Reihenfolge erkennbar die sich auf alle Isoformen übertragen ließ: Am stärksten war die Expression in der Dermis, danach folgte die Epidermis und als letztes kam die Expression in der Keratinocytenzellkultur. In der mehrschichtigen Epidermis war eine Lokalisation der Expression auf die beiden unteren, stoffwechselaktiven Zellschichten möglich. In der Dermis scheint die Expression ubiquitär zu sein.

PKC- ε stellte Aufgrund seines Expressionsmusters einen Sonderfall dar. Es wurde im Verlaufe dieser Arbeit nur eine Expression in der Dermis festgestellt. Bei weiterführenden Experimenten konnte eine besonders hohe Expression im in der Dermis eingelagerten Blutkreislaufsystem diagnostiziert werden. Diese Besonderheit wurde genutzt um weitere Erkenntnisse über die Funktion von PKC- ε in der Haut zu gewinnen.

In Wundheilungsversuchen wurde in einem Vergleich zwischen Wildtyp Mäusen und PKC- ε *knock out* Mäusen eine Verlangsamung der Heilung in den mutanten Mäusen festgestellt. Die Reepithelialisierung verlief um ca. drei Tage langsamer. Im Zuge dieser Wundheilungsversuche wurde auch eine reduzierte Angiogenese diagnostiziert. Das Granulationsgewebe, welches die Grundlage für das neue Blutgefäßsystem bildet, wanderte langsamer in den Wundbereich ein. Aufgrund von Proliferationsversuchen, die sowohl *in vivo* (Immunhistochemie) als auch *in vitro* (Keratinocytenzellkultur), ist bewiesen worden, dass die reduzierte Angiogenese zum größten Teil für die verlangsamte Wundheilung in den PKC- ε defizienten Mäusen zuständig ist.

Literaturverzeichnis

- Akita Y LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. PG - 847-52.
- Aksoy E - Goldman, M., F. Goldman M - Willems, et al. Protein kinase C epsilon: a new target to control inflammation and immune-mediated disorders. PG - 183-8.
- Alt A - Gartsbein, M., M. Gartsbein M - Ohba, et al. Differential regulation of alpha6beta4 integrin by PKC isoforms in murine skin keratinocytes. PG - 17-23.
- Alt A - Ohba, M., L. Ohba M - Li, et al. Protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of alpha6beta4 is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment. PG - 4591-8.
- Alt, A., M. Ohba, et al. (2001). "Protein Kinase C{{delta}}-mediated Phosphorylation of {{alpha}}6{{beta}}4 Is Associated with Reduced Integrin Localization to the Hemidesmosome and Decreased Keratinocyte Attachment." Cancer Res **61**(11): 4591-4598.
- Basu A LA - eng GR - Journal Article PT - Review PT - Review, Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. PG - 341-50.
- Brandt, D., M. Gimona, et al. (2002). "Protein Kinase C Induces Actin Reorganization via a Src- and Rho-dependent Pathway." J. Biol. Chem. **277**(23): 20903-20910.
- Brandt, D. T., A. Goerke, et al. (2003). "Protein Kinase C{delta} Induces Src Kinase Activity via Activation of the Protein Tyrosine Phosphatase PTP{alpha}." J. Biol. Chem. **278**(36): 34073-34078.
- Bredel M - Pollack, I. F. Pollack IF LA - eng GR - Journal Article PT - Review PT - Review The role of protein kinase C (PKC) in the evolution and proliferation of malignant gliomas, and the application of PKC inhibition as a novel approach to anti-glioma therapy. PG - 1000-13.
- Brodie C - Bogi, K., P. Bogi K - Acs, et al. Protein kinase C-epsilon plays a role in neurite outgrowth in response to epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. PG - 183-91.
- Castrillo, A., D. J. Pennington, et al. (2001). "Protein Kinase C{epsilon} Is Required for Macrophage Activation and Defense Against Bacterial Infection." J. Exp. Med. **194**(9): 1231-1242.
- Chen CC FAU - Mo, F. E., L. F. Mo - Lau, et al. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. PG - 47329-37.

- Chida, K., T. Hara, et al. (2003). "Disruption of Protein Kinase C ϵ Results in Impairment of Wound Healing and Enhancement of Tumor Formation in Mouse Skin Carcinogenesis." Cancer Res **63**(10): 2404-2408.
- Cohen PR LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, The lunula. PG - 943-53; quiz 954-6.
- Dekker LV - Parker, P. J. and Parker PJ LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Protein kinase C--a question of specificity. PG - 73-7.
- Dempsey, E. C., A. C. Newton, et al. (2000). "Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(3): L429-438.
- Denning MF- Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. PG - 1141-6.
- Denning, M. F., A. A. Dlugosz, et al. (2000). "Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes." Exp Dermatol **9**(3): 192-199.
- Denning MF - Wang, Y., B. J. Wang Y - Nickoloff, et al. Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. PG - 29995-30002.
- Echtermeyer F - Baciuc, P. C., S. Baciuc PC - Saoncella, et al. Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. PG - 3433-41.
- Echtermeyer, F., M. Streit, et al. (2001). "Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4." J. Clin. Invest. **107**(2): R9-14.
- Epidermis/anatomy & histology/physiology MH - Human MH - Skin Diseases/*physiopathology RF - Dermatol Ther 2004;17 Suppl 1:6-15., The stratum corneum: structure and function in health and disease. PG - 6-15.
- Frey, M. R., J. A. Clark, et al. (2000). "Protein Kinase C Signaling Mediates a Program of Cell Cycle Withdrawal in the Intestinal Epithelium." J. Cell Biol. **151**(4): 763-778.
- Fuchs E - Byrne, C. and Byrne C LA - eng GR - - Journal Article PT - Review PT - Review The epidermis: rising to the surface. PG - 725-36.
- Fuchs E - Merrill, B. J., C. Merrill BJ - Jamora, et al. At the roots of a never-ending cycle. PG - 13-25.
- Fuchs E - Raghavan, S. and Raghavan S LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Getting under the skin of epidermal morphogenesis. PG - 199-209.
- Fuchs E LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Keratins and the skin. PG - 123-53.
- Fuchs E LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. PG - 47-77.

- Fuchs E LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Epidermal differentiation: the bare essentials. PG - 2807-14.
- Gavrielides MV - Frijhoff, A. F., C. J. Frijhoff AF - Conti, et al. Protein kinase C and prostate carcinogenesis: targeting the cell cycle and apoptotic mechanisms. PG - 431-43.
- Gillitzer R - Goebeler, M. and Goebeler M LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Chemokines in cutaneous wound healing. PG - 513-21.
- Hackam DJ - Ford, H. R. - Surg Infect (Larchmt) 2002;3 Suppl 1:S23-35. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. PG - S23-35.
- Harry LE - Paleolog, E. M. Paleolog EM LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. PG - 363-74.
- Hart J LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. PG - 205-9.
- Hintermann E - Bilban, M., A. Bilban M - Sharabi, et al. Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin. PG - 465-78.
- Hofmann J LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. PG - 125-46.
- Hornia A - Lu, Z., T. Lu Z - Sukezane, et al. Antagonistic effects of protein kinase C alpha and delta on both transformation and phospholipase D activity mediated by the epidermal growth factor receptor. PG - 7672-80.
- Hossain, M. A., C. M. L. Bouton, et al. (2000). "Induction of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Astrocytes by Lead. *J. Biol. Chem.* **275**(36): 27874-27882.
- Housey GM - Johnson, M. D., W. L. Johnson MD - Hsiao, et al. Structural and functional studies of protein kinase C. PG - 127-40.
- Huang X - Wu, J., S. Wu J - Spong, et al. The integrin alphavbeta6 is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. PG - 2189-95.
- Jacinto A - Martinez-Arias, A., P. Martinez-Arias A - Martin, et al. Mechanisms of epithelial fusion and repair. PG - E117-23.
- Joseloff E - Cataisson, C., H. Cataisson C - Aamodt, et al. Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes. PG - 12318-23.
- Kanitakis J LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. PG - 390-9; quiz 400-1.

- Kashiwagi M - Ohba, M., K. Ohba M - Chida, et al. Protein kinase C eta (PKC eta): its involvement in keratinocyte differentiation. PG - 853-7.
- Keenan C - Long, A., D. Long A - Kelleher, et al. Protein kinase C and T cell function. PG - 113-26.
- Larsen, E. C., T. Ueyama, et al. (2002). "A role for PKC- ϵ in Fc γ R-mediated phagocytosis by RAW 264.7 cells." J. Cell Biol. **159**(6): 939-944.
- Lee YS FAU - Dlugosz, A. A., R. Dlugosz AA - McKay, et al. Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. PG - 44-53.
- Lee, Y.-S., S. H. Yuspa, et al. (1998). "Differentiation of Cultured Human Epidermal Keratinocytes at High Cell Densities is Mediated by Endogenous Activation of the Protein Kinase C Signaling Pathway." J Invest Dermatol **111**(5): 762-766.
- Li J - Zhang, Y.-P., R. S. Zhang YP - Kirsner, et al. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. PG - 107-14.
- Lin MS - Mascaro, J. M. J., Z. Mascaro JM Jr - Liu, et al. The desmosome and hemidesmosome in cutaneous autoimmunity. PG - 9-15.
- Littler CM FAU - Morris, Morris KG Jr FAU - Fagan, et al. Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. PG - H1321-31.
- Lowell S - Watt, F. M. and H. Watt FM LA - eng PT - Journal Article PL - Ireland TA - Mech Dev JID - 9101218 RN - 0 (Actins) RN - 0 (Bicyclo Compounds Delta regulates keratinocyte spreading and motility independently of differentiation. PG - 133-40.
- Marks R LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, The stratum corneum barrier: the final frontier. PG - 2017S-2021S.
- Marshall RC - Orwin, D. F., J. M. Orwin DF - Gillespie, et al. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. PG - 47-83.
- Martin P - Hopkinson-Woolley, J., J. Hopkinson-Woolley J FAU - McCluskey, et al. Growth factors and cutaneous wound repair. PG - 25-44.
- Martin P LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, S. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. PG - 75-81.
- Mathis, D. and G. L. King (2002). "B-cell Signaling: Protein Kinase C δ Puts the Brakes on." Current Biology **12**(16): R554-R556.
- McMillan JR - Akiyama, M., H. Akiyama M - Shimizu, et al. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. PG - 169-77.

- Mori, R., T. Kondo, et al. (2004). "Impairment of Skin Wound Healing in β -1,4-Galactosyltransferase-Deficient Mice with Reduced Leukocyte Recruitment." Am J Pathol **164**(4): 1303-1314.
- Murakami M - Horowitz, A., S. Horowitz A - Tang, et al. Protein kinase C (PKC) delta regulates PKC α activity in a Syndecan-4-dependent manner. PG - 20367-71.
- Nelsestuen GL - Bazzi, M. D. and Bazzi MD LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Activation and regulation of protein kinase C enzymes. PG - 43-61.
- Nishizuka Y - Takai, Y., A. Takai Y - Kishimoto, et al. A role of calcium in the activation of a new protein kinase system. PG - 209-20 FAU - Nishizuka, Y.
- Oancea E - Meyer, T. - Cell 1998 Oct 30;95(3):307-18. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. PG - 307-18.
- O'Kane S LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Wound remodelling and scarring. PG - 296-9.
- O'Toole EA - Marinkovich, M. P., W. K. Marinkovich MP - Hoeffler, et al. Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. PG - 330-9.
- Park JE - Barbul, A. Barbul A LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Understanding the role of immune regulation in wound healing. PG - 11S-16S.
- Parker PJ FAU - Murray-Rust, J. and Murray-Rust J LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review PKC at a glance. PG - 131-2.
- Ramadori G F - Saile, B. and Saile B LA - eng PT - Comment PT - Editorial PT - Review PT - Review Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. PG - 997-1000 FAU - Ramadori, G.
- Rando RR FAU - Kishi, Y. and T. P.-U. Kishi Y LA Structural basis of protein kinase C activation by diacylglycerols and tumor promoters. PG - 2211-8.
- Rees JL LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Genetics of hair and skin color. PG - 67-90.
- Rieck, P. W., S. Cholidis, et al. (2001). "Intracellular Signaling Pathway of FGF-2-modulated Corneal Endothelial Cell Migration during Wound Healing in vitro." Experimental Eye Research **73**(5): 639-650.
- Sabri A - Steinberg, S. F. and Steinberg SF LA - eng GR - Journal Article PT - Review PT - Review Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. PG - 97-101.
- Shen, S., A. Alt, et al. (2001). "PKC δ Activation: A Divergence Point in the Signaling of Insulin and IGF-1--Induced Proliferation of Skin Keratinocytes." Diabetes **50**(2): 255-264.

- Shen, S., E. Wertheimer, et al. (2000). "Characterization of Glucose Transport System in Keratinocytes: Insulin and IGF-1 Differentially Affect Specific Transporters." J Invest Dermatol **115**(6): 949-954.
- Sivakumar B - Harry, L. E., E. M. Harry LE - Paleolog, et al. Modulating angiogenesis: more vs less. PG - 972-7.
- Tan SL FAU - Parker, P. J. and Parker PJ LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. PG - 545-52.
- Tibudan SS - Wang, Y., M. F. Wang Y - Denning, et al. Activation of protein kinase C triggers irreversible cell cycle withdrawal in human keratinocytes. PG - 1282-9.
- Tomlinson A FAU - Ferguson, M. W. J. and Ferguson MW LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Wound healing: a model of dermal wound repair. PG - 249-60.
- Vasioukhin, V. and E. Fuchs (2001). "Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia." Current Opinion in Cell Biology **13**(1): 76-84.
- Vondriska, T. M., J. B. Klein, et al. (2001). "Use of functional proteomics to investigate PKC{epsilon}-mediated cardioprotection: the signaling module hypothesis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(4): H1434-1441.
- Watt FM LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. PG - 3919-26.
- Weber-Nordt RM - Mertelsmann, R., J. Mertelsmann R - Finke, et al. The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. PG - 459-67.
- Wheeler, D. L., K. J. Ness, et al. (2003). "Protein Kinase C{epsilon} Is Linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Tumor Necrosis Factor-{\alpha} Ectodomain Shedding and the Development of Metastatic Squamous Cell Carcinoma in Protein Kinase C{epsilon} Transgenic Mice." Cancer Res **63**(19): 6547-6555.
- Wolfram LJ LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, T. P.-U. S. T.-J. A. A. D. J.-S.-. Human hair: a unique physicochemical composite. PG - S106-14.
- Woods A FAU - Couchman, J. R. - Curr Opin Cell Biol 2001 Oct;13(5):578-83. Syndecan-4 and focal adhesion function. PG - 578-83.
- Woolley K. Martin P LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Conserved mechanisms of repair: from damaged single cells to wounds in multicellular tissues. PG - 911-9.
- Wu, L.-W., L. D. Mayo, et al. (2000). "Utilization of Distinct Signaling Pathways by Receptors for Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Other Mitogens in the Induction of Endothelial Cell Proliferation." J. Biol. Chem. **275**(7): 5096-5103.

Wysocki AB LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. PG - 777-97, v.

Yamaguchi Y FAU - Yoshikawa, K. Yoshikawa K LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review Cutaneous wound healing: an update. PG - 521-34.

Abkürzungsverzeichnis

· α	alpha
· β	beta
· γ	gamma
· δ	delta
· ϵ	epsilon
· η	eta
· ζ	zeta
· A	Ampère
· Abb.	Abbildung
· ATP	Adenosintriphosphat
· BrdU	5-Brom-2-deoxy-Uridin
· BSA	Rinderserumalbumin
· cAMP	zyklisches Adenosin - Monophosphat
· d	Tag
· DAG	Diacylglycerin
· DIG	Dioxygenin
· DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
· DNA	Desoxyribonukleinsäure
· DNase	Desoxyribonuklease
· ECM	extrazelluläre Matrix
· EDTA	Ethylendiamintetraacetat
· EGF-R	Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren
· EtOH	Ethanol
· FCS	fötales Kälberserum
· h	Stunden
· H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
· HCl	Salzsäure
· ILGF-R	Rezeptor für Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
· IP3	Inositoltriphosphat
· JAK	Januskinase
· Jun	Transkriptionsfaktor
· Kb	Kilobasenpaare
· kDa	Kilo - Dalton
· LiCl	Lithiumchlorid
· M	molar
· MAP	mitogen aktivierte Protein Kinase
· MARCKS	'myristolated alanin-rich C kinase substrate'
· MeOH	Methanol
· MgCl ₂	Magnesiumchlorid
· min	Minute
· mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
· n	Anzahl
· NaAc	Natriumazetat
· NaCl	Natriumchlorid
· NF	nuclear factor
· NTP	Adenin-/Thymidin-/Guanin-/Cytosin-Triphosphat
· PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

· PFA	Para-Formaldehyd
· PKC	Protein Kinase C
· RNase	Ribonuklease
· RT	Raumtemperatur
· RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
· s.o.	siehe oben
· SDS	Natriumdodecylsulfat
· src	src-Kinase
· STAT	Transkriptionsfaktor
· T	Threoninrest
· TPA	Tumorpromotor der Phorbolsterklasse
· TRIS	Tris(hydroxymethyl) aminomethan
· U	Einheit
· u.a.	unter anderem
· UV	ultraviolett
· V	Volt
· Vol.	Volumen
· wt	Wildtyp

Wachstumsfaktoren und Zytokine

· VEGF	vascular endothelial growth factor
· PDGF	platelet-derived growth factor
· PDEGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
· EGF	epidermal growth factor
· TGF- α & β	transforming growth factor
· HB-EGF	heparin-binding epidermal growth factor
· IGF-1	insulin-like growth factor
· bFGF	basic fibroblast growth factor
· MAPK	mitogen-activated protein kinase
· IL-1	interleukin

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Hannover, am 24.11.2004

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tarik Hessabi
 Geboren am: 21 August 1972 in Langenhagen
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Eltern: Gholam N. Hessabi
 Karin Hessabi, geb. Schöer

Schulbildung:

1979 – 83	Grundschule Garbsen
1983 – 85	Orientierungsstufe Garbsen
1985 – 93	Johannes Kepler Gymnasium Garbsen
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1993 – 94	Nordstadt Krankenhaus Hannover
-----------	--------------------------------

Studium:

	Biologie an der Universität Hannover
1994 – 96	Grundstudium
1996 – 99	Hauptstudium (Hauptfach: Mikrobiologie)
1999 – 00	Diplomarbeit im Transplantationslabor Klinik für Viszeral – und Transplantationschirurgie MH-Hannover
2000 – 03	Dissertation Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie Hannover Abteilung Signaltransduktion