

**GENERIERUNG UND TRANSDUKTION WACHSTUMSNEGATIVER
SIGNALE DURCH DEN CONTACTINHIBIN-REZEPTOR**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

**am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Isabelle Heit

Mainz, 2000

Jahr der mündlichen Prüfung: 2000

***“I begin to suspect that the matter
may turn out to be much deeper and
more subtle than I at first supposed.”***

Sherlock Holmes

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Einleitung	1
Zielsetzung	23
1. Material und Methoden	25
1.1 Zellkultur	25
1.1.1 Verwendete Zelllinien	25
1.1.2 Kultivieren der Zellen	26
1.1.3 Passagieren der Zellen	30
1.1.4 Bestimmung der Zellzahl	31
1.1.5 Kryokonservierung	32
1.1.6 Test auf Mykoplasmenkontamination	33
1.1.7 Proliferationstest	34
1.1.8 Fixierung von Zellen	36
1.1.9 Hämatoxylin / Eosin-(HE)Färbung	37
1.2 Gewinnung von Proteinen aus der Zellkultur	38
1.2.1 Detergenzextraktion mit Laemmli-Probenpuffer	39
1.2.2 Detergenzextraktion mit CHAPS	39
1.2.3 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren	41
1.3 Biochemische Methoden	42
1.3.1 Proteinisolierung durch Chloroform / Methanol-Fällung	42
1.3.2 Proteinquantifizierung	43
1.3.3 PAP-Verdau von Proteinen	45
1.3.4 Oxidation nach Smith	46
1.4 Elektrophorese	47
1.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese	48

1.4.1.1	Gießen analytischer Gele	49
1.4.1.2	Probenvorbereitung	51
1.4.1.3	Elektrophorese	52
1.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	52
1.4.2.1	Isoelektrische Fokussierung	53
A	Gießen der Röhrchengele	54
B	Vorfokussierung	55
C	Isoelektrische Fokussierung	56
D	Equilibrierung	56
1.4.2.2	2. Dimension: SDS-PAGE	57
A	Herstellung der Gele für die zweite Dimension	57
B	Durchführung der Elektrophorese	57
1.4.3.	Proteindetektion	58
1.4.3.1	Unspezifische Proteindetektion	58
A	Proteindetektion im Gel	58
A1	Coomassie-Färbung	58
A2	Kolloidale Coomassie-Färbung, Roti-Blue	59
A3	Silber-Färbung nach Kluxen	60
B	Proteindetektion nach Transfer auf Trägermembranen	61
B1	Coomassie-Färbung	62
1.4.3.2	Spezifische Proteindetektion	62
1.4.4	Standards für die Elektrophorese	62
1.4.4.1	Coomassie-Gele	62
1.4.4.2	Silber-Gele	63
1.4.4.3	Blots	63
1.5	Immunologische Methoden	64
1.5.1	Gewinnung von Immunglobulinen aus dem Antiserum	64
1.5.2	Western Blot	65
1.5.3	Immunfluoreszenzen	68
1.5.3.1	Einfache Immunfluoreszenz	69
1.5.3.2	Doppelimmunfluoreszenz	70
1.6	Molekularbiologische Methoden	71
1.6.1	Agarose-Gelelektrophorese für Nukleinsäuren	71
1.6.1.1	Native Agarosegele	71
1.6.1.2	Denaturierende Agarosegele	73

1.6.1.3	Standards für die Elektrophorese	74
	A DNA-Standard	74
	B RNA-Standard	75
1.6.2	Nothern Blot	75
1.6.3	Hybridisierung	76
1.6.4	Transformation von E.coli	78
	1.6.4.1 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen nach Hanahan	78
	1.6.4.2 Transformation kompetenter E.coli-Zellen	79
	1.6.4.3 Glycerolstocks	79
1.6.5	Isolierung von Plasmid-DNA	80
1.6.6	Restriktionsverdau	82
1.6.7	RNA-Isolierung	82
1.6.8	Quantifizierung von Nukleinsäuren	83
1.6.9	Transfektion von Säugerzellen	84
2.	Ergebnisse	85
2.1	Arbeiten mit fixierten Zellen	85
2.2	Untersuchung der Interaktion der TGF β 1- und Ci-assozierten Signalwege	90
2.3	Untersuchung einer Beteiligung der Proteinkinase C δ in der Kontaktinhibition	103
3.	Diskussion	127
4.	Zusammenfassung	132
5.	Literaturverzeichnis	134
	Versicherung	142

Abkürzungsverzeichnis

AP konj.	Alkalische Phosphatase konjugiert
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asn	Asparagin
ATP, ADP	Adenosin-Triphosphat, Adenosin-Diphosphat
BCA	Bicinchonic acid
BSA	Bovine serum albumine
CAM-Kinase III	Calmodulin-abhängige Kinase III
cAMP	Cyclo-Adenosin-Monophosphat
CG	Culture Growth
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfat
Ci	Contactinhibin
CiR	Contactinhibinreceptor
CKI	cyclin dependent kinase inhibitor
cpm	counts per minute
D, kD	Dalton, Kilodalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,5,-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
DPP	<i>decapentaplegic</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
eEF2	Elongationsfaktor 2
FCS	Fetal calfserum (Fötales Kälberserum)
Gal	Galaktose
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GTP, GDP	Guanosin-Triphosphat, Guanosin-Diphosphat
HEPES	4(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HSP 27	Hitzeschock-Protein 27
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IP ₃	Insitol-1,3,5-trisphosphat
LAP	latent-associated protein

LLC	large latent complex
LTBP	latentes TGF β -Bindungsprotein
LTGF β	latentes TGF β
LTR	long terminal repeats
Man	Mannose
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NBT	Nitrotetrazoliumblau
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	potato acid phosphatase
PBS	Phosphate buffered saline
PDD	4- α -Phorbol-12,13-didecanoat
PDGF	Platelet derived growth factor
PDK-1	Phosphoinositide-dependent-kinase 1
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat PIP ₂ .
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastom-Gen-Produkt
PSK	Protein-Serin / Threoninkinasen
PSP	Protein-Serin / Threonin-Phosphatase
PTK	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTP	Protein-Tyrosin-Kinase
RT	Raumtemperatur
RCA	Ricinus communis agglutinitn-I
SB	Sample buffer
SDS	Sodium laurylsulphate
SLC	small latent complex
SV 40	Simian Virus 40
Smad	similar to mothers against dpp
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
T β RI	TGF β -Rezeptor Typ I
T β RII	TGF β -Rezeptor Typ II
TGF β	Transforming growth factor beta
TPA	12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat

Einleitung

Nach den Herz-Kreislaufkrankungen stellt Krebs heute die verbreitetste Todesursache dar. Man unterscheidet aus pathologischer Sicht etwa 100 verschiedene Krebsarten, je nach betroffenem Organ oder der Zellart. Aber allen Krebsformen gemeinsam ist der Ursprung: die Entartung einer bisher gesunden Körperzelle, die sich immer weiter teilt und umliegendes gesundes Gewebe verdrängt. Krebs ist also vor allem eine Störung der Wachstumsregulation. Der menschliche Organismus besteht etwa aus 10^{14} Zellen, die ein funktionierendes Ganzes bilden müssen. Zellen können sich grundsätzlich etwa alle 24 Stunden verdoppeln. Im Interesse des Organismus muß jedoch die Teilungsrate von Zellen so reguliert werden, daß die Zahl der neu entstehenden genau der Zahl der absterbenden Zellen entspricht. Denn jedes Ungleichgewicht zieht pathologische Prozesse nach sich. So führt eine Aufhebung der Wachstumshemmung ebenso wie eine Verstärkung der Wachstumsstimulation zu entartetem Wachstum, wie es für Tumorbildung charakteristisch ist. Wie die Wachstumskontrolle in einem gesunden Organismus funktioniert, ist eine entscheidende Frage.

Wie vor allem durch *in-vitro*-Versuche bekannt ist, beruht die Wachstumskontrolle auf einem sensiblen Zusammenspiel sowohl wachstumsfördernder als auch wachstumshemmender Signale. Als Auslöser vor allem wachstumsfördernder Signale sind verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Vitamine bekannt. Diese übermitteln ihre Information über spezifische Rezeptoren und komplizierte, individuelle Signalübertragungsketten ins Zellinnere. Wachstumshemmend dagegen wirken die Produkte sogenannter „Tumorsuppressor Gene“ (z.B. p53), welche unkontrolliertes Wachstum verhindern.

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Wachstums spielt außerdem die Zelldichte: Normale, nicht transformierte Zellen in Kultur wachsen bis zur Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens ("monolayer"), worauf sie ihr Wachstum stark reduzieren oder ganz einstellen (Johnson, T.C., 1994).

Transformierte Zellen unterliegen nicht mehr der normalen Wachstumskontrolle. Sie wachsen unabhängig von der Zelldichte, bis das Nährmedium erschöpft ist. Mit zunehmender Zelldichte kommt es nicht zu der typisch regelmäßigen Ausrichtung der Zellen, sondern zu Überlappungen ("Criss-cross"-Wachstum) und schließlich zur Bildung von vielzelligen, übereinander liegenden Zellhaufen (Foci). Außerdem zeigen viele transformierte Zelllinien eine verminderte Substratadhäsion und bilden in Weich-Agar Kulturen.

Über den Mechanismus der Zelldichte-abhängigen Regulation gesunder Zellen sind eine Reihe von Hypothesen aufgestellt worden:

→ Regulation des Wachstums durch sezernierte Inhibitoren:

Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte synthetisieren und sezernieren die Zellen Wachstumsinhibitoren (Wang, J.L. und Hsu, Y.-M., 1986). In vielen Fällen ist gezeigt worden, daß diese Inhibitoren große Ähnlichkeit mit der TGF β -Familie (transforming growth factors) aufweisen. Dieser Faktor hat überwiegend hemmende Eigenschaften. Dieses konnte *in vivo* in TGF β -knock-out-Mäusen gezeigt werden, deren Hautepithelzellen ein erhöhtes Wachstumspotential aufweisen (Haddow, S., 1991). TGF β wurde ursprünglich als ein Molekül identifiziert, das verschiedene Zellen zu adhäsionsunabhängigem Wachstum befähigt, eine typische Tumorzelleigenschaft (Massague, J., 1987). Tatsächlich wird TGF β auch von Tumorzellen exprimiert, bei denen er keine wachstumshemmende Wirkung ausübt.

→ Inhibierung des Wachstums durch Diffusionsbarrieren:

Durch das mangelnde Bewegungsvermögen der einzelnen Zellen mit zunehmender Zelldichte entsteht ein Nährstoffmangel unmittelbar an der Zelloberfläche. Diffusionsbarrieren, die durch zunehmende Zelldichte geschaffen werden, verhindern den Ausgleich des Nährstoffkonzentrationsgradienten (Stoker, M.P.G., 1973). Diese Hypothese konnte bereits widerlegt werden (Whittenberger, B. and Glaser, L., 1978).

→ Regulation des Zellwachstums über die Zellform:

Folkman postulierte 1978, daß ein Zusammenhang zwischen Zellform und Zellwachstum bestünde (Folkman, J., and Moscona, A., 1978). Er beobachtete bei vereinzelt Zellen einen abgeflachten Zellkörper bei hoher Proliferationsrate, bei konfluentem Zellrasen jedoch eine runde spindelförmige Zellform bei arretiertem Zellwachstum. Für seine Versuche wurde ein spezielles Polymer als Untergrund verwendet. Andere Arbeitsgruppen konnten aber zeigen, daß dieser Untergrund zum Zellwachstum ungeeignet war und die Zellen sich abrundeten, um die Berührungsfläche mit dem Polymer so gering wie möglich zu halten (pers. Mitteilung, Wieser, R.J.).

→ Kontaktabhängige Inhibierung des Wachstums:

Das Wachstum wird über spezifische Zell-Zellkontakte reguliert, die mit zunehmender Zelldichte vermehrt entstehen können. Dieser Ansatz hat sich in den letzten Jahren durchgesetzt. Die Bedeutung von Zell-Zellkontakten für die Wachstumsregulation konnte bereits in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigt werden. Dabei wurde eine Beteiligung von Membran-Glykoproteinen an diesem Mechanismus nachgewiesen. In unterschiedlichen Zellsystemen wurden einige spezifische Oberflächenmoleküle identifiziert, deren Interaktionen und Signalweiterleitungen aber bislang oft nur unzureichend analysiert sind. Zusammenfassend lassen sich die beteiligten Proteine wie folgt charakterisieren (Wieser, R.J. und Oesch, F., 1995):

1. Die aktiven Moleküle gehören zu den Glykoproteinen.
2. Zellmembran-Moleküle aus konfluenten Zellen zeigen eine höhere wachstumshemmende Aktivität als aus proliferierenden Zellen.
3. In Endothel- und Muskelzellen scheinen die aktiven Moleküle dem Glykosaminoglykan-Typ (GAG) zuzuordnen zu sein, eine Klasse von Glykoproteinen mit charakteristischen Strukturmerkmalen, die besonders in der extrazellulären Matrix angereichert vorkommen.

Als ein Beispiel für Glykoproteine, die für die Auslösung der dichteabhängigen Wachstumsregulation verantwortlich sind, ist das aus Mausfibroblasten m5S/1M isolierte N-CAM (neural cell adhesion molecule) zu nennen (Aoki, J., 1991).

Wice et al. isolierten 1995 aus der cDNA Bibliothek von HT29 Zellen ebenfalls ein glykosyliertes Membranprotein, il-TMP (intestinal/liver tetraspan membrane protein). Während HeLa Zellen nicht kontaktinhibiert sind und das Protein nicht exprimieren, führt die Transfektion mit il-TMP zur Induktion der Kontaktinhibition (Wice, 1995).

Doch die hier aufgeführten Beispiele sind nur sehr ungenügend untersucht, und es scheint sich bei diesen Molekülen um einen Zelltyp-spezifischen Mechanismus zu handeln.

Dichteabhängige Wachstumskontrolle durch zwei integrale Membranproteine: Contactinhibin (Ci) und Contactinhibin-Rezeptor (CiR)

In der Arbeitsgruppe Wieser fanden schon sehr früh erste Versuche zur dichteabhängigen Wachstumsregulation statt, welche an FH109 Zellen durchgeführt wurden. Hierbei handelt es sich humane, diploide Lungenfibroblasten, die aus embryonalem Lungengewebe generiert wurden. Sie zeichnen sich durch die Synthese von Kollagen Typ I, III und Fibronectin aus (Wieser, R.J., 1985). Der Karyotyp 46, XX weist keine chromosomalen Aberrationen auf und bleibt über 16 Passagen stabil. FH109 Zellen sind nicht immortal und zeigen eine dichteabhängige Wachstumsregulation. Durch die Isolierung von Contactinhibin (Wieser, R.J., 1990) und dessen spezifischem Rezeptor (Gradl, G., 1995) aus FH109 Zellen ist es zum ersten Mal gelungen, an der Wachstumsregulation beteiligte Moleküle näher zu charakterisieren.

Contactinhibin ist ein integrales Plasmamembranglykoprotein. Es besitzt im reduzierten Zustand ein Molekulargewicht von 60-70 kD und aufgrund unterschiedlicher Sialylierungsgrade verschiedene isoelektrische Punkte. Nach 2-dimensionalen Auftrennung sind 5 distinkte Signale zwischen pH 5,5-6,2 sichtbar. Das Contactinhibin-Molekül trägt Oligosaccharidketten sowohl in N- als auch in O-glykosidischer Bindung, wobei nur die N-Glykoside für die biologische Aktivität notwendig sind (Wieser, R.J. und Oesch, F., 1988). Insbesondere freie endständige β -Galaktose Reste sind für eine spezifische Interaktion mit dem Rezeptormolekül Voraussetzung. Diese β -Galaktose Reste sind in teilungsaktiven, dünn ausgesäten Zellen durch Sialinsäuren maskiert. Die Synthese des Contactinhibins sowie dessen Einbau in die Plasmamembran erfolgt in hoch sialylierter also inaktiver Form. Mit zunehmender Zelldichte kommt es zur Abspaltung der Sialinsäuren durch eine membranständige Sialidase und somit zur Überführung des Contactinhibins in seine wachstumshemmende Form (Wieser, R.J., 1995).

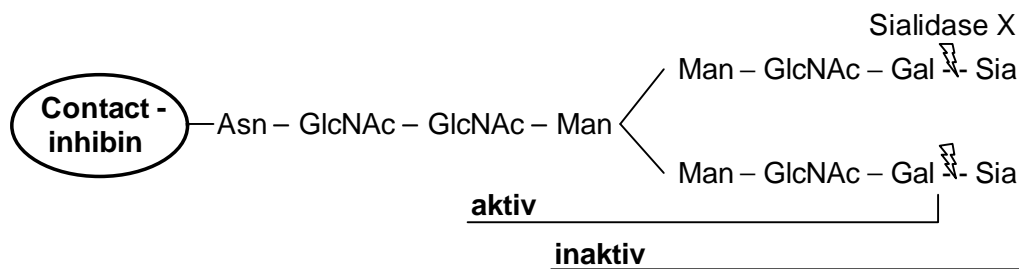


Abb. 1 Minimale Zuckerstruktur des Contactinhibins. GlcNAc: N-Acetylglukosamin, Man: Mannose, Gal: Galaktose, Asn: Asparagin, Sia: Sialinsäure

In konfluenten Fibroblasten-Kulturen, kann mit α -Ci-Antikörper-Behandlung die Kontaktinhibition aufgehoben werden. Die Zellen zeigen unkontrolliertes Wachstumsverhalten ähnlich dem transformierter Zellen.

Transformierte Zellen (Wi38: SV40-transformiert, C₃H/10T1/2: Methylcholanthren-transformiert), unterliegen nicht mehr der dichteabhängigen Wachstumsregulation, obwohl sie Contactinhibin in biologisch aktiver Form exprimieren (Oesch, F., 1987), so daß andere Defekte postuliert werden müssen (siehe unten).

Wichtig für die proliferationshemmende Wirkung von Ci ist, daß das Protein in immobilisierter Form vorliegt. So zeigte lösliches Ci auf dünn ausgesäte FH109-Zellen keinen inhibierenden Effekt, während an Silikabeads gekoppeltes Protein einen Zellzyklusstopp bewirkte. Immunfluoreszenzstudien zeigten, daß Ci mit Vimentin assoziiert vorliegt, was wahrscheinlich zu einem Clustering der Moleküle beiträgt. Da Contactinhibin keine homophilen Wechselwirkungen wie z.B. E-Cadherin oder N-CAMs ausbildet, mußte es also einen Interaktionspartner geben. Mit Hilfe eines dafür etablierten „Aggregations-Assay“ konnte der Bindungspartner von Contactinhibin, sein Rezeptor, identifiziert werden (Gradl et al., 1995). Dabei wurden unterschiedliche Extrakte und gereinigtes Ci an immobilisierte Träger gekoppelt und die jeweilige Aggregation mit Hilfe des Durchlichtmikroskops analysiert.

Als spezifischer **Contactinhibin-Rezeptor (CiR)** konnte ein Plasmamembranglykoprotein identifiziert werden, das ein Molekulargewicht von 92 kD besitzt. Durch heterogene Sialylierung und Phosphorylierung kann man dem Protein verschiedene isoelektrische Punkte im Bereich von 5,9 bis 6,6 zuordnen. Spezifische Wechselwirkung mit Contactinhibin ist ausschließlich dann möglich, wenn dieses in der oben beschriebenen, wachstumshemmenden Form vorliegt. Die Bindungsaffinität des CiR hängt von seinem Phosphorylierungsgrad ab. Im hyperphosphorylierten Zustand ist der CiR inaktiv. Mit abnehmender Phosphorylierung steigt dann auch seine Bindungsfähigkeit für Ci. Zusätzlich hängt eine effektive Bindung von der lokalen Konzentration beider Liganden ab: Erst wenn eine bestimmte Schwellenkonzentration, sowohl für Contactinhibin als auch für seinen Rezeptor, überschritten ist, kann es durch Mehrfachbindungen zu einer ausreichend starken Interaktion kommen. Dieses Prinzip einer "Alles oder Nichts"-Reaktion zeigt die geringe Affinität der einzelnen Bindungen (Gradl, G., 1995). Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Wechselwirkung zwischen Ci und CiR scheint die Immobilisierung der beiden Liganden im Cytoskelett zu sein. In konfluent gewachsenen Zellen liegt der CiR assoziiert an Aktin, das Contactinhibin an Vimentin vor.

Versuche mit anderen Membranglykoproteinen, die auf ihre Bindung an CiR, bzw. auf wachstumshemmende Eigenschaften untersucht worden sind, haben gezeigt, daß ausschließlich Ci die geforderten Eigenschaften erfüllt. Dies zeigt, daß die Interaktion von CiR und Ci von einer hohen Spezifität gekennzeichnet ist.

Wie erwähnt, liegt der Contactinhibin-Rezeptor im inaktiven Zustand in phosphorylierter Form vor. Phosphoaminosäure-Analysen ergaben, daß CiR keine Tyrosin-Phosphorylierung besitzt, sondern an Serin und Threonin phosphoryliert ist (Doktorarbeit, Faust, D., 1997). Da aber eine Behandlung mit Orthovanadat, einem Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmer, eine erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors erzielt, liegt der Schluß nahe, daß eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) einen wichtigen Regulator in der CiR-Phosphorylierung darstellt. Es wäre vorstellbar, daß durch ein Gleichgewicht zwischen einer PTP und einer Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) eine Protein-Ser/Thr-Kinase reguliert wird. Ist die PTP gehemmt, z.B. durch Orthovanadat wird durch die PTK durch Übertragung eines Phosphatrestes auf die Protein-Ser/Thr-Kinase diese aktiviert, welche dann den Rezeptor phosphoryliert. Dadurch wird CiR inaktiviert und kann nicht mehr mit Ci wechselwirken.

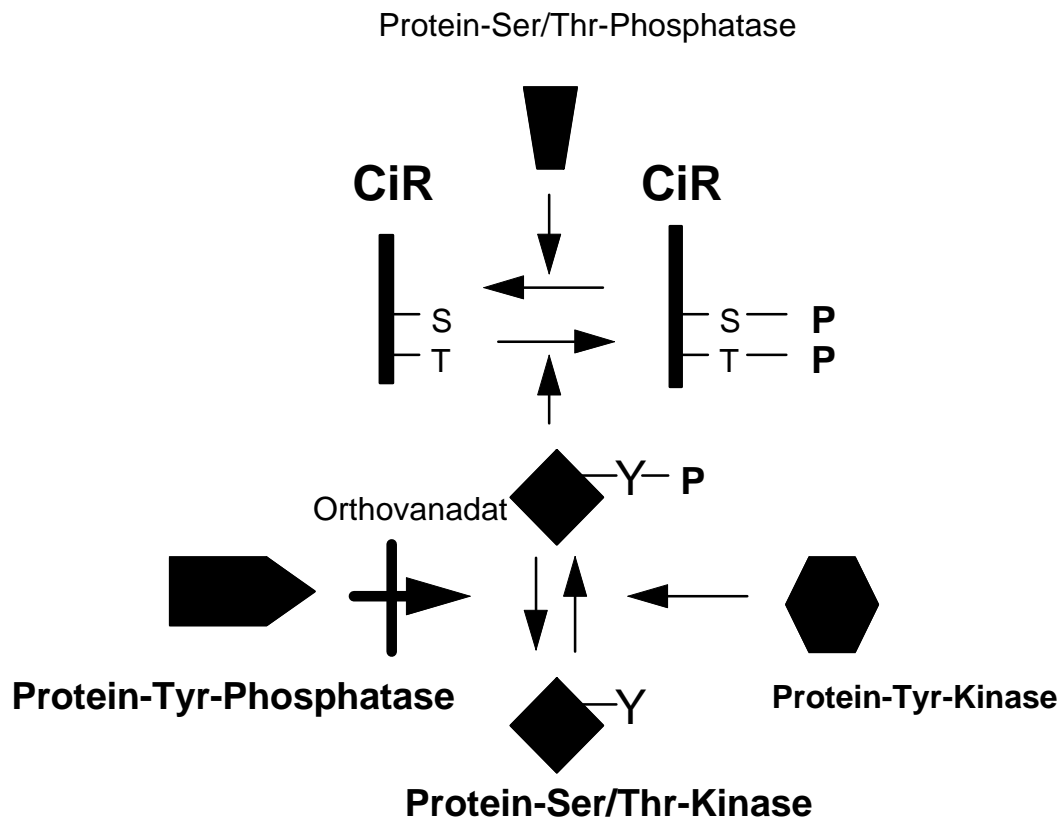


Abb. 2 Hypothetische Regulation des CiR durch Phosphorylierung. Y: Thyrosinrest, S: Serinrest, T: Threoninrest, P: Phosphat.

Immunhistologische Studien haben gezeigt, daß Ci und CiR im lebenden Organismus hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert werden. Das Epithel bildet unter anderem die Epidermis aus, die äußerste Hautschicht. Sie besteht aus mehreren Schichten, die aus Keratinozyten aufgebaut sind, die verschiedene Differenzierungszustände durchlaufen. Dieser auch als Keratinisierung bezeichnete Prozeß besteht aus der Änderung der Expression verschiedener Proteine, der Morphologie und Synthese von Lipiden. Die Basalschicht (Stratum basale) besteht aus Basalzellen, die mit der Basallamina verbunden sind. Etwa 10% dieser Zellen sind Stammzellen. Sie sind dadurch charakterisiert, daß sie fast unbegrenzt teilbar sind und den Differenzierungsprozeß selbst nicht durchlaufen. Ihr Cytoskelett wird aus den Zytokeratinen 5 und 14 im Verhältnis 1:1 aufgebaut. Die durch Teilung entstehenden Tochterzellen verbleiben entweder in der Basalschicht und vermehren sich dort weiter, oder sie beschreiten den endgültigen Differenzierungsprozeß. Im letzteren Fall lösen sie sich von der Basalschicht ab und wandern in die nächst höhere Schicht (Stratum spinosum). Diese Schicht besteht aus Keratinozyten, die durch die Expression von K1 und 10 als erste Differenzierungsmarker charakterisiert

sind. Die Zellen bilden zahlreiche Desmosomen, die Keratin-Filamente benachbarter Zellen miteinander verbinden. Die Keratinozyten, die diese Schicht bilden, heißen auch Stachelzellen. In der nächsten Phase der Keratinisierung gelangen die Zellen in die Schicht der Körnerzellen (Stratum granulosum). Sie stellt die Grenze zwischen den inneren stoffwechselaktiven und der äußeren toten Schicht dar. Die Körnerzellen bilden keine neuen Keratine mehr sondern beginnen verstärkt mit der Filamentbildung. Es entstehen Aggregate von Keratohyalin, die aus dem Protein Filaggrin gebildet werden. Sie sind vermutlich an der intrazellulären Vernetzung der Keratine beteiligt. Zunehmende Durchlässigkeit für Calcium führt zur Aktivierung der Transglutaminase. Sie katalysiert die Bildung von ϵ -(γ -glutamyl)lysin-Bindungen, durch die die Hüllproteine zu einem festen Gitter, dem marginalen Band verknüpft werden. Durch die Freisetzung lytischer Enzyme werden alle metabolischen Aktivitäten eingestellt. Die intrazellulären Organellen verschwinden und es bleibt eine abgeflachte Hornschuppe übrig, die nur noch aus einer polymerisierten Proteinhülle („cornified envelope“) und einer dicht gepackten Keratinmatix besteht. Diese toten Zellen bilden dann das Stratum corneum. Die Plasmamembran der Hornschuppen und der äußeren Körnerzellen sind durch eine dünne Lage (12 nm) aus Involucrin quervernetzt. Der Proteinexpressionslevel von Involucrin korreliert mit der Wanderung der Zellen aus der basalen in eine höhere Schicht.

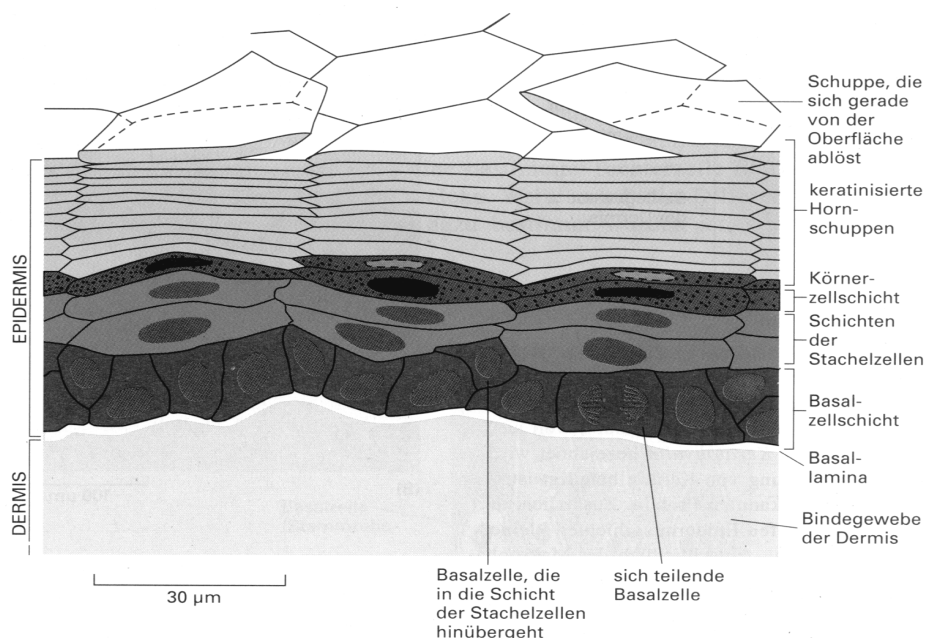


Abb. 3 Schematisch Darstellung der Säuger-Epidermis. („Molekularbiologie der Zelle“, Alberts, B., 1995).

Transforming Growth Factor β (TGF β)

Struktur und Aktivierung

Neben der Kontaktinhibition kennt man in Epithelzellen noch einen weiteren Mechanismus der Wachstumsregulation. TGF β , eine Familie inhibitorischer Cytokine, kontrolliert die Genexpression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen, Differenzierungsfaktoren und Zell-Adhäsionsmolekülen. Die TGF β -Superfamilie beinhaltet außerdem BMPs (bone morphogenetic proteins), Activine/Inhibine und DPPs (decapentaplegic). Ihnen allen sind 7 konservierte Cysteine gemeinsam (Massague, J., 1990). Die TGF β -Familie besteht aus insgesamt 5 Mitgliedern von denen 3 (TGF β 1-3) in Säugerzellen vorkommen. Die Strukturhomologie der unterschiedlichen Formen liegt zwischen 76-80%, die Homologie zwischen unterschiedlichen Spezies ist größer als 97%. TGF β entsteht durch Dimerisierung zweier monomerer Ketten bestehend aus je einer N-terminalen hydrophilen Signal-Peptid-Region (LAP: latent-associated peptide) und der C-terminalen potenten Reiferegion. Die beiden Monomere werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten. Das Dimer (25 kD) wird intrazellulär zwischen den beiden Regionen geschnitten und der entstehende Komplex aus C-Terminus und N-Terminus durch elektrostatische Wechselwirkung zusammengehalten. Szerniert wird TGF β als latentes Vorläufermolekül (LTGF β), das zwischen 390-414 Aminosäuren lang ist. Es ist zusätzlich an das latente TGF β -Bindungsprotein (LTBP) über eine Disulfidbrücke gebunden. Diesen Komplex nennt man den LLC (large latent complex) (Munger, J.S., 1997).

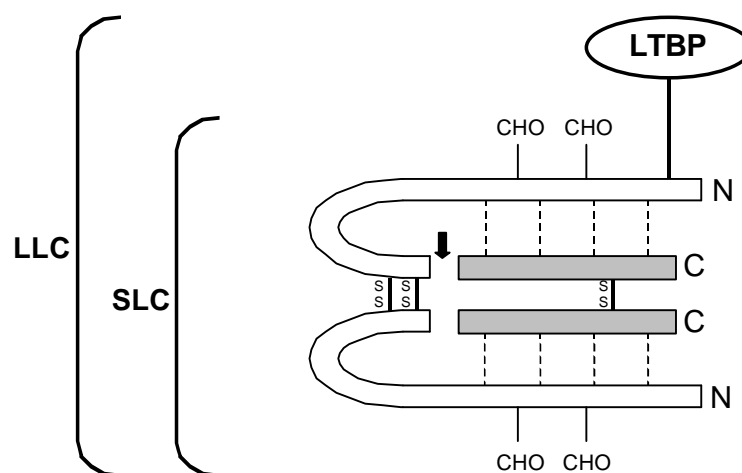


Abb. 4 Struktur des latenten TGF β . Das LAP (weiß) und das Reifeprotein (grau) sind kovalent über Disulfidbrücken (dicke Linie) gebunden. Mannose-6-phosphat-Reste sind als CHO dargestellt (modifiziert aus Gold, L., 1999).

Während rekombinantes latentes TGF β *in vivo* eine Halbwertszeit von 90 min besitzt, existiert aktives TGF β für nur 2-3 min. Die Latente Form dient folglich der Stabilisierung. Aktiviert wird TGF β wahrscheinlich in einem ersten Schritt über die Abspaltung des LTBP und in einem zweiten Schritt über die Abtrennung des LAP. Als Aktivatoren sind Plasmin (Sato, Y., 1989) und Thrombospondin-1 (TSP-1) bekannt (Crawford, S.E., 1998).

TGF β -Rezeptoren

Es gibt 3 TGF β -Rezeptoren und eine Reihe weiterer Oberflächen-bindender Proteine (Massague, J., 1992). Die TGF β -Rezeptor Typ I und II sind entscheidend für die TGF β -Signaltransduktion. Sie gehören zu den Ser/Thr-Kinasen, besitzen eine kurze Cystein-reiche extrazelluläre Domäne, eine einzelne Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Kinase-Einheit. Der Typ-II-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 75-85 kD wird auch Primärer Rezeptor genannt, weil er als erster die Interaktion mit dem Liganden eingeht. Seine Kinasedomäne ist konstitutiv aktiv und autophosphoryliert Ser/Thr-Reste nach Ligandenbindung. Dann wird der Typ I in den Komplex hineingezogen. Er wird auch Transmitter genannt, weil er das TGF β -Signal in das Zellinnere weiterleitet. Er enthält eine Transmembran- und eine Kinasedomäne, die durch sich wiederholende, konservierten Gly/Ser-Sequenzen getrennt werden. In manchen Zellen wird noch ein weiterer Rezeptor Typ III exprimiert mit einem Molekulargewicht von 280 kD. Er enthält Heparin und Chondroitinsulfatketten und dient zur Konzentration von TGF β an der Zelloberfläche. Zwingend notwendig ist der Typ III nur für die Bindung von TGF β 2. Die Signalweiterleitung ist für alle drei TGF β -Formen gleich. Sie unterscheiden sich nur in ihrer Affinität zu den Rezeptoren. Nach TGF β -Bindung bildet der Typ-II- mit Typ-I-Rezeptor einen heteromeren Komplex im Verhältnis 1:1. Typ II phosphoryliert den Typ I in der GS-Domäne.

Smads

Die intrazelluläre Weiterleitung des Signals erfolgt über die Proteine der Smad-Familie. Sie erhielten ihren Namen durch die Vereinigung der Namen der *Drosophila Mad*-(*mothers against DPP*) und *C.elegans Sma*-(*similar to Mad*) Proteine, die zu erst entdeckten Mitglieder der Klasse. Sie bestehen aus zwei konservierten Bindungsdomänen: eine im N-Terminus (MH1, Mad Homologie 1) und eine im C-Terminus (MH2, Mad Homologie 2), die durch einen wenig konservierten Linker getrennt sind. Sind die Smads nicht aktiviert liegen sie als Homodimere vor, wobei jeweils die N-Domäne an die C-Domäne bindet. Man kann sie nach ihrer Funktion in drei Klassen unterteilen. Die erste Gruppe besteht aus Rezeptor-aktivierten Smads. Sie bilden mit dem Typ-I-Rezeptor einen Komplex und werden nach Ligandenbindung durch die aktivierte Kinasedomäne des Rezeptors an Ser-Resten am C-Terminus (SSXS-Motif) phosphoryliert (Kretschmar, M., 1997). BMP aktiviert Smad1, 5 und 9, durch TGF β oder Activin werden Smad2 und 3 aktiviert. Die zweite Gruppe enthält die funktionellen Partner der Rezeptor-assoziierten Smads, in Vertebraten ist dies Smad4. Nach Aktivierung der Rezeptor-aktivierten Smads, dissoziieren diese von der Membran ab und bilden einen Komplex mit Smad4, der dann in den Zellkern transloziert wird. Dort übt der Komplex transkriptionelle Aktivität aus, indem er zusammen mit Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren mit den Promotorsequenzen der Zielgene interagiert. Für den Smad2/4-Komplex ist eine durch Activin/TGF β -induzierte Interaktion mit FAST-1 und -2 beschrieben worden (Labbé, E., 1998). Hingegen kommt es durch TGF β -induzierte Interaktion von Smad3/4 mit c-Jun/c-Fos zur Transkription des PAI-1-, JunB- oder Kollagenase I-Promotors. CBP/p300 können dabei als direkte Koaktivatoren wirken (Derynck, R., 1998).

Die dritte Gruppe der Smads beinhaltet die sogenannten Antagonistischen Smads, oder anti-Smads (Smad6, 7). Sie blockieren den Typ-I-Rezeptor und damit die Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Smads.

TGF β und negative Wachstumskontrolle

Obwohl bereits bekannt ist, wie das durch TGF β -induzierte Signal intrazellulär weitergeleitet wird, fehlen noch die entscheidenden Verbindungsstellen zwischen dem bekannten Teil der Signalkaskade und der letztendlichen biologischen Aktivität. TGF β besitzt im wesentlichen drei Wirkspektren. Zum einen inhibiert TGF β das Wachstum von Epithelzellen und vielen weiteren Zellen, zweitens wirkt es immunsuppressiv (z.B. Inhibierung von T- und B- Lymphozyten). Außerdem fördert es die Expression extrazellulärer Matrixproteine (Collagen, Fibronectin, Tenascin, Glykosaminoglykane und Proteoglykane).

Der wachstumshemmende Effekt von TGF β beruht auf der Aktivierung der Transkription der Cdk-Inhibitoren (CKI) p15^{INK4B}, p21^{WAF}, p27^{KIP1}. Dadurch wird die Phosphorylierung des pRb verhindert und die Zellen arretieren in der G1-Phase. In proliferierenden HaCaT-Zellen führt TGF β 1 zur erhöhten Transkription von p15, was zu einem Anstieg an Cdk4-gebundenem p15 führt. Dadurch wird Cdk4-gebundenes p27 frei und wechselt zu Cdk2. Zusätzlich wird p21 transkriptionell hochreguliert und ergänzt an Cdk2-gebundenes p27 (Reynisdottir, I., 1995) (Abb. 5). Nach dem so induzierten Zellzyklusarrest kommt es teilweise zu einer Abnahme des Proteinlevels von Cdk4, und zur Abnahme der c-myc-Transkription, da E2F als Transkriptionsfaktor nicht mehr binden kann. Über welche Signalkaskade die Cdk-Inhibitoren nach TGF β -Behandlung reguliert werden, ist noch nicht endgültig geklärt. Erst kürzlich konnten Rich J.N. et al. durch Smad3-Nullmäuse zeigen, daß Smad3 für die durch erhöhte Transkription von p15 und p21 ausgelöste Wachstumshemmung notwendig ist. Überexpression von Smad3 und 4 alleine reicht aber nicht aus, um die Transkription von p15 und p21 zu erhöhen (Rich, J.N., 1999). Daher muß eine weitere Signalkaskade beteiligt sein. Da in HaCaT-Zellen das p53-Gen defekt ist, muß die Regulation von p21 durch einen p53 unabhängigen Mechanismus gesteuert werden (Landesman, Y., 1997). In NIH3T3-Zellen konnten Pumiglia, K.M. et al. zeigen, daß durch den MEK/MAPK-Signalweg der Zellzyklusarrest gesteuert wird, was mit der Induktion von p21 einhergeht. Die Gruppe um X.F. Wang bestätigte in HaCaT-Zellen, daß der MAPK-Weg über Ras-Raf-MEK-MAPK in die durch TGF β induzierte Stimulation von p15 und p21 involviert ist (Hu, P.P., 1999). Diese Signalkaskade ist wahrscheinlich dem Smad-Weg nachgeschaltet.

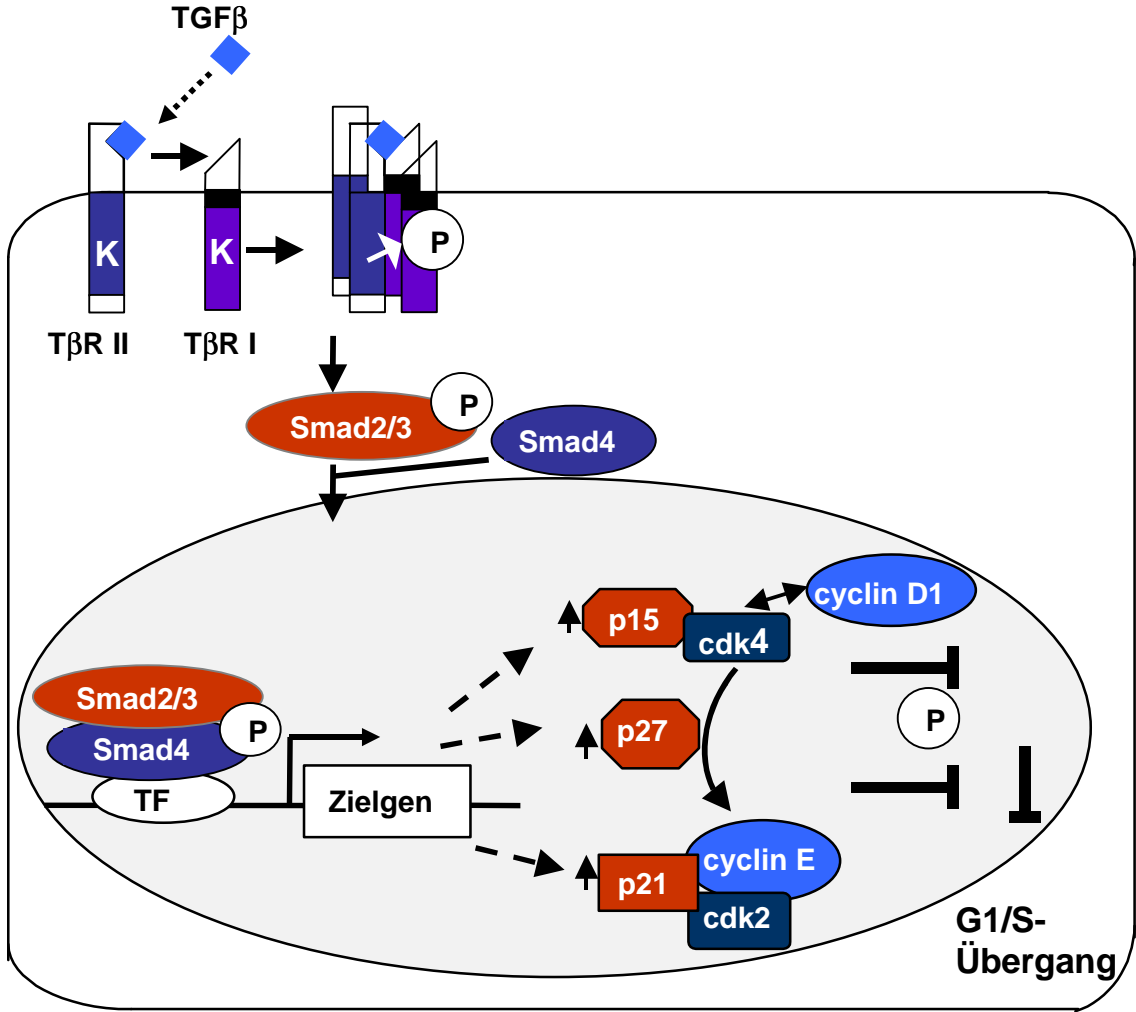


Abb. 5 Mechanismus des wachstumsinhibierenden Signalweges von TGFβ in Keratinozyten.

TGF β und Tumorentstehung

Der Effekt von TGF β in Bezug auf Tumorentstehung und Tumorpromotion wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite ist TGF β ein potenter Wachstumsinhibitor in Epithelzellen. Der Verlust dieser antimitogenen Funktion kann zur malignen Transformation und Hyperproliferation der Zellen führen. So geht in einigen Tumoren die maligne Progression mit einem Defekt in der autokrinen TGF β -Produktion einher (Glick, A.B., 1994). Viele aus Tumoren gewonnene Zelllinien zeigen einen Verlust der wachstumsinhibierenden Antwort durch TGF β (Fyran, T.M. und Reiss, M., 1993). TGF β -Rezeptoren und Smads wirken somit als Tumorsuppressoren (Brattain, M.G., 1996; Hata, A., 1997). Beispielsweise zeigt die erbliche Form des Kolonkarzinoms (HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer) eine Mikrosatelliten-Instabilität, die zur Mutation und damit zur Inaktivierung des TGF β -Rezeptors Typ II führt (Markowitz, S., 1995). Auf der anderen Seite zeigte sich aber in neueren Untersuchungen in vielen Tumoren, unter anderem in Epithelial-, Neuroectodermal- und Mesenchymalkarzinomen, ein starker Anstieg in der Expression von TGF β mRNA und Protein (Gold, L.I., 1999). Da bei zunehmender Tumorprogression die Zellen aber der TGF β -Antwort entkommen, erhalten sie durch die übermäßige TGF β -Produktion einen Selektionsvorteil, da die den Tumor umgebenden Zellen in ihrem Wachstum inhibiert werden. Zusätzlich fördert TGF β die Angiogenese (Yang, E.Y., 1990) und wirkt immunsuppressiv. Durch letzteres kann der Tumor der körperlichen Abwehr entkommen. Auch in Tumoren, die selbst noch auf TGF β mit Wachstumsinhibition reagieren, scheint *in vivo* der direkte Effekt von TGF β auf die Tumorumgebung einen Wachstumsvorteil zu bringen, der den antiproliferativen Effekt überwiegt (Chang, H.L., 1993). So lässt sich erklären, warum TGF β in Anfangsstadien der Tumorentstehung das Wachstum der Zellen hemmt, wohingegen es das Wachstum von progressiven Tumoren indirekt fördert.

Signalkaskade der kontaktabhängigen Wachstumskontrolle

Während wachstumsstimulierende Signalkaskaden, ausgehend von Wachstumsfaktor-Rezeptoren relativ gut beschrieben sind, gibt es bislang nur wenige Hinweise, über welche Signalmechanismen die kontaktabhängige Wachstumshemmung wirkt. Die Bedingungen der Interaktion von Contactinhibin und seinem Rezeptor und deren Auswirkung auf den Zellzyklus sind bereits untersucht. So führen Zell-Zellkontakte bei Erreichen von Konfluenz zum G1/S-Arrest. Dieser Zellzyklusstopp wird zum einen durch den Tumorsuppressor p16 vermittelt (Wieser, R.J., 1999). p16 ist ein Inhibitor des CyclinD1/Cdk4-Komplexes (Sherr, C.J., 1995) und zum anderen durch verstärkte Assoziation des Cdk2-Inhibitors p27 mit dem CyclinE/Cdk2-Komplex (Dietrich, C., 1997; Polyak, K., 1994). Dadurch verbleibt das Retinoblastom-Genprodukt, pRb, in seinem hypophosphorylierten Zustand. Ob der Zellzyklus durchlaufen wird oder nicht, wird in der G1-Phase entschieden (Sherr, C.J., 1993). Hier spielt das Retinoblastom-Genprodukt, pRb, als Regulator die entscheidende Rolle (Beijersbergen, R.L. und Bernards, R., 1996). In der frühen G1-Phase liegt dieses Protein hyperphosphoryliert vor. Es wird von einer Cyclin-abhängigen-Kinase Cdk4 in der Mitte der G1-Phase phosphoryliert und bleibt dann in diesem hyperphosphorylierten Zustand bis zur Mitose, wo es wieder dephosphoryliert wird. In der frühen G1-Phase ist das hyperphosphorylierte pRb-Protein an einen Transkriptionsfaktor der E2F-Familie gebunden und inhibiert so die Aktivierung der Transkription von Genen, die für die DNA-Synthese notwendig sind. Nach der Phosphorylierung dissoziiert das pRb von E2F ab, und die Zelle kann in die S-Phase eintreten. Die Phosphorylierung des pRb wird durch den CyclinD1/Cdk4- und den CyclinE/Cdk2-Komplex bewerkstelligt. Wie gezeigt werden konnte, induziert die kontaktabhängige Wachstumshemmung p16 und bewirkt dadurch die Dissoziation von CyclinD1/Cdk4. p27 assoziiert mit CyclinE/Cdk2 wodurch die Hyperphosphorylierung von pRb unterbunden wird. Als Folge davon arretieren die Zellen in der G1-Phase. Über die Signalwege, die den durch Zell-Zellkontakte induzierten Zellzyklusstopp vermitteln, ist jedoch nur sehr wenig bekannt.

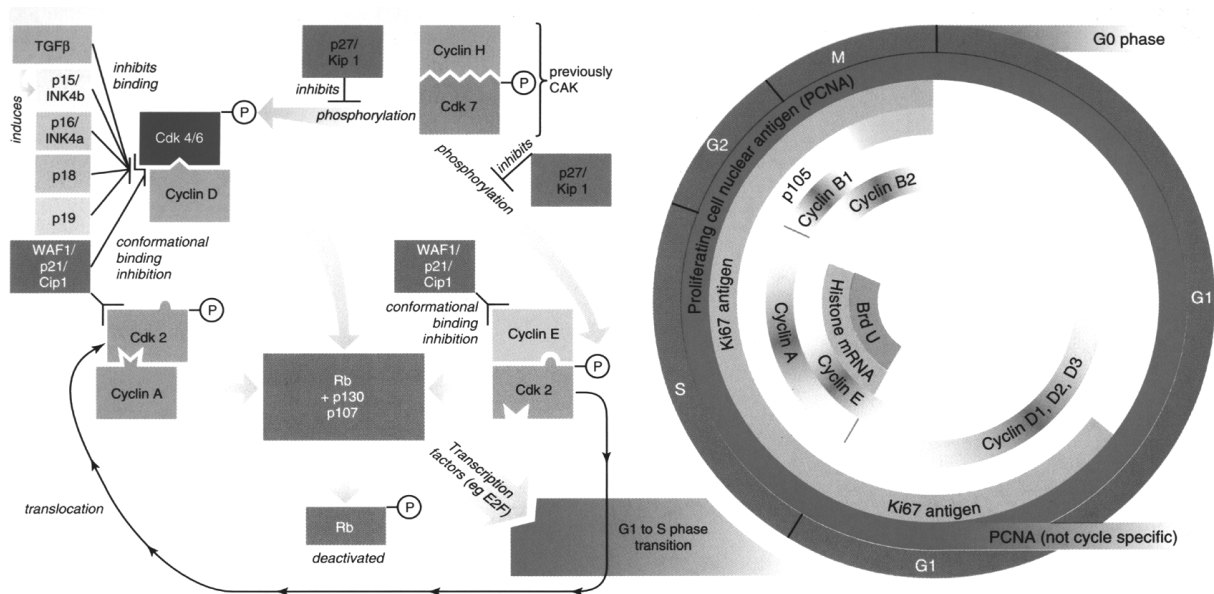


Abb. 6 Expression und Interaktion der Proteine während des Zellzyklus. (aus Novocastra Laboratories)

Der Hauptmechanismus, über den die meisten zellulären Prozesse geregelt werden ist die Phosphorylierung, da über ihn die Zelle innerhalb kürzester Zeit auf veränderte Bedingungen reagieren kann. Die Protein-Phosphorylierung scheint zwei wichtige Funktionen zu besitzen. Sie dient erstens der Weitergabe extrazellulärer Signale wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine, so wird z.B. die Weiterleitung der extrazellulären TGFβ-Bindung hauptsächlich über Phosphorylierungssignale weitergegeben (siehe vorne). Es konnte auch gezeigt werden, daß Zell-Zellkontakte bei Erreichen von Konfluenz die Tyrosin-Phosphorylierung in der Zelle verändern (Batt, D.B., 1998). Zweitens ist Protein-Phosphorylierung verantwortlich für den genauen zeitlichen Ablauf des Zellzyklus (Phosphorylierung des pRb), oder für Prozesse, die in den Zellzyklus eingreifen. Die Phosphorylierung von Proteinen wird über Proteinkinasen katalysiert und durch Proteinphosphatasen wieder umgekehrt. Der Gehalt an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in der Zelle ist sehr gering. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die intrinsische Protein-Tyrosinphosphatase (PTP)-Aktivität zwei bis drei Größenordnungen über der der Proteintyrosinkinasen (PTK) liegt (Sun and Tonks, 1994). Die Phosphorylierung von Proteinen an Serin / Threonin-Resten ist eine der häufigsten Formen der posttranslationalen Modifizierung. Die intrinsischen katalytischen Aktivitäten der meisten Protein-Serin / Threonin-Phosphatasen (PSP)

und der Protein-Serin / Threoninkinasen (PSK) sind ungefähr gleich, ebenso wie ihre intrazelluläre Konzentration (Cohen, P., 1992).

Aus der Vielzahl der in der Zelle vorhandenen Kinasen konnte eine Rolle der Proteinkinase A (PKA) in der Kontaktinhibition bereits ausgeschlossen werden, da die Behandlung von FH109-Zellen mit cAMP keinen Einfluß auf das dichteabhängige Wachstumsverhalten zeigte (Diplomarbeit, Arbes, H., 1994). Im Gegensatz dazu gab es bereits erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C (PKC). Ihre Aktivierung durch den Phorbol-ester 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) führt zu einem von der Zelldichte abhängigen gegensätzlichen Wachstumsverhalten (Oesch, F., 1988). Daher soll nun im Folgenden die PKC näher beschrieben werden.

Proteinkinase C (PKC)

Struktur und Aktivierung

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, daß Proteinkinase C nicht nur in mitogene Prozesse und Tumorentstehung (Borner, C., 1992) sondern auch in die negative Wachstumskontrolle (Watanabe, T., 1992; Mischak, H., 1993a), Differenzierung (Mischak, H., 1993b) und Apoptose (Ghayur, B.T., 1996) involviert ist. Da der Proteinkinase C möglicherweise eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der kontaktabhängigen Wachstumskontrolle zukommt (Hegemann, L., 1994), soll im folgenden näher auf die Aktivierung der PKC eingegangen werden.

Die PKC ist eine Familie von Serin / Threoninkinasen (Nishizuka, Y, 1984), die aus 11 Isoformen bestehen, deren Molekulargewichte zwischen 74 und 116 kD liegen. Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften wie Struktur oder Art der Aktivierung lassen sich die Isoformen in drei Gruppen klassifizieren (Hug, H. und Sarre, T.F., 1993). Zu den konventionellen PKCs (cPKC) gehören die Isoformen α , β I, β II, γ . Sie sind Ca^{2+} -abhängig und lassen sich durch Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin aktivieren. Die Isoformen bestehen aus einer Pseudosubstratdomäne und 4 weiteren homologen Domänen (C), die durch variable isoenzymspezifische Domänen (V) unterbrochen sind. Das Pseudosubstrat bindet im inaktiven Zustand in die Substratdomäne des Enzyms und blockiert so das aktive Zentrum. Die C1-Region setzt sich aus zwei Cystein-reichen Domänen zusammen, die in die DAG-Bindung und zum Teil auch bei der Phosphatidylserin-Interaktion involviert sind. Die C2-Domäne bindet saure Phospholipide und Ca^{2+} . Die C3- und C4-Domänen beinhalten die ATP- und Substratbindungsstelle. Die neuen PKCs

(nPKCs) (δ , ϵ , η , θ) sind Ca^{2+} -unabhängig, da ihnen die C2-Domäne fehlt. Sie werden durch DAG, Phorbolester und Phosphatidylserin reguliert. Dieser Gruppe wird auch die μ -Isoform zugeordnet, die sich in ihrem Aufbau von den anderen Isoformen durch eine putative Pleckstrin-homologe Domäne unterscheidet. Der dritten Gruppe den atypischen PKCs (PKC) gehören die Isoformen ζ , ι an. Sie sind ebenfalls Ca^{2+} -unabhängig und können nicht durch DAG sondern nur durch Phosphatidylserin aktiviert werden. Sie besitzen keine C2 und nur die Hälfte der C1-Domäne.

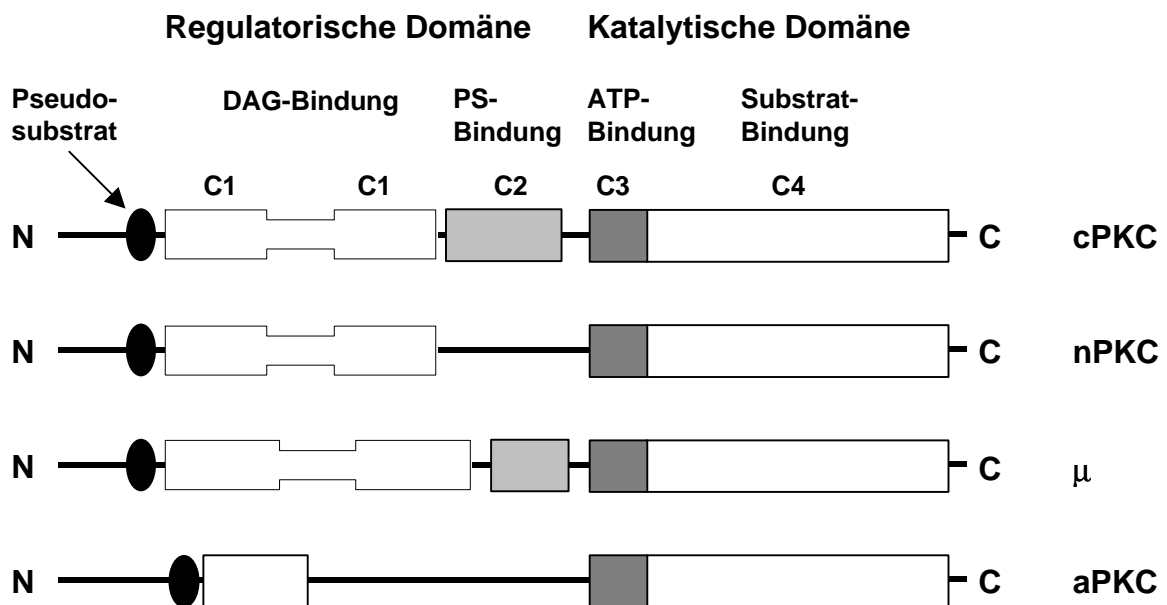


Abb. 7 Struktur der PKC-Isoformen. Dargestellt sind die Pseudosubstrat-Domäne (schwarz) und die Domänen C1-C3. Die Pleckstrin-homologe Domäne der PKC μ ist hinter der C1-Domäne positioniert. Die variablen Domänen sind nicht extra gekennzeichnet. Sie befinden sich zwischen den C-Domänen. N: Amino-Terminus, C: Carboxy-Terminus.

Die Isoformen zeigen nicht nur unterschiedliche enzymatische Charakteristika, sondern werden auch in verschiedenen Geweben exprimiert. Über die unterschiedliche Lokalisierung läßt sich die heterogene Rolle der PKCs in der Signaltransduktion erklären. Denn die gewebespezifische Expression und unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Isoformen führt zur Phosphorylierung individueller Substrate.

Gruppe	Subspecies	Molekulargewicht [kD]	Gewebeexpression
konventionelle PKC (cPKC)	α	82	universal
	β I	96	in manchen Geweben
	β II	80	in vielen Geweben
	γ	80	nur im Gehirn
neue PKC (nPKC)	δ	80	universal
	ϵ	93	Gehirn und andere
	η	80	Lunge, Haut, Herz
	θ	79	Skelettmuskulatur
	μ	116	Lunge, Epithelzellen
atypische PKC (aPKC)	ζ	75	universal
	ι	74	Ovarien, Testes und andere

Tabelle 1 PKC-Isoformen

Die Aktivierung der PKC ist ein komplexer Vorgang, in dem verschiedene Second Messenger zusammen wirken. Dieser Mechanismus soll hier am Beispiel der konventionellen PKC β II erläutert werden:

Neu-synthetisierte PKC β II liegt mit dem Cytoskelett assoziiert vor. Dabei nimmt sie eine Konformation ein, die den Aktivierungsschleife exponiert und den Carboxy-Terminus nahe des aktiven Zentrums binden lässt. Nach Phosphorylierung des Threoninrestes 500 durch das Enzym PDK-1 (Phosphoinositide-dependent-kinase 1), kommt es zur Autophosphorylierung der PKC an Threonin 641 und an Serin 600. Das phosphorylierte Threonin 641 ist wichtig für die katalytische Funktion des Proteins. Der Carboxy-Terminus wird von dem aktiven Zentrum getrennt. Jetzt kann das Pseudosubstrat in dem Zentrum binden und dadurch die Stelle blockieren. Phosphoryliertes Serin 660 stabilisiert die Konformation und bewirkt die Abwanderung ins Cytosol (Newton, A.C., 1997). Das Targeting des Proteins wird durch Ankerproteine reguliert (Molchys-Rosen, D. und Gordon, A.S., 1998). Aktiviert wird die PKC *in vivo* durch DAG. Gebildet wird DAG durch die rezeptorvermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat PIP₂ durch die Phospholipase C (Nishizuka, Y., 1992):

Die Phospholipase C kann entweder über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Phospholipase C- β) oder über Rezeptor-Tyrosinkinasen (Phospholipase C- γ) aktiviert werden. Dieses membrangebundene Enzym hydrolysiert dann die

Phosphodiesterbindung von PIP_2 . Dadurch entstehen zwei Messenger: Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol. IP_3 existiert nur für ein paar Sekunden, dann wird es durch drei Phosphatasen inaktiviert. IP_3 ermöglicht die rasche Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern. Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C durch Bindung an die C1-Domäne. Über die C2-Domäne assoziiert das Enzym mit Phosphatidylserin und Ca^{2+} . Die ausgelöste Konformationsänderung verursacht die Verdrängung des Pseudosubstrats aus dem aktiven Zentrum, und das Enzym ist aktiv.

Der Vorgang der Aktivierung der $PKC\beta II$ ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

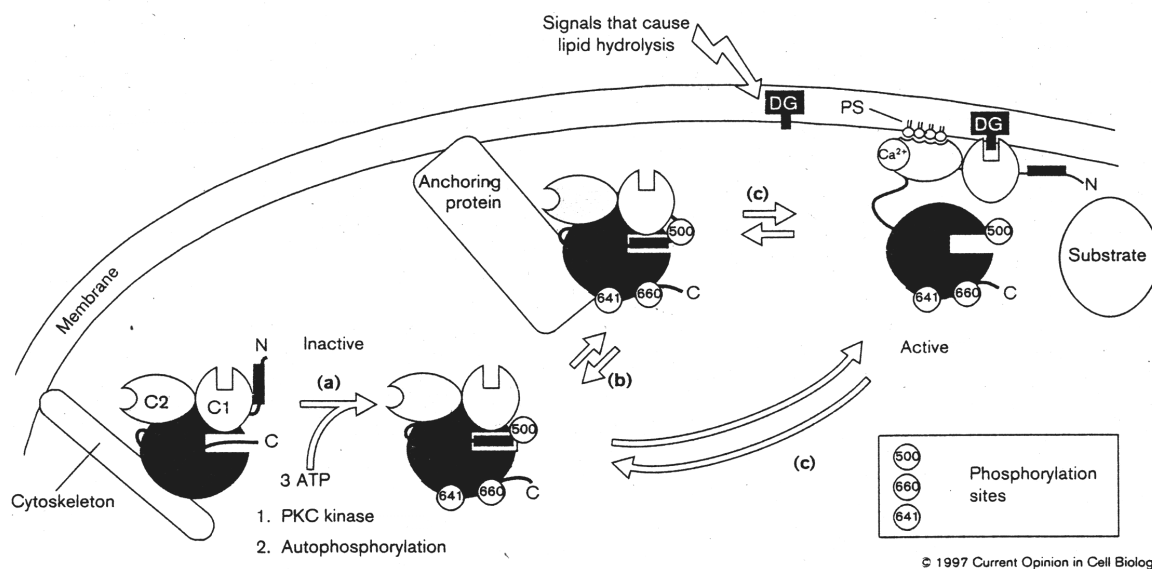


Abb. 8 Schematische Darstellung der Aktivierung von $PKC\beta II$. (a) Phosphorylierung der PKC durch eine PKC-Kinase (PDK-1) und Autophosphorylierung. (b) Targeting des maturierten Enzyms durch Ankerproteine. (c) Bindung von Diacylglycerol und Phosphatidylserin entfernt das Pseudosubstrat aus der Bindungsdomäne und aktiviert PKC. DG: Diacylglycerol, PS: Phosphatidylserin (aus Newton, A.C., 1997).

Bei den anderen PKCs gibt es korrespondierende Phosphorylierungsstellen, die sehr konserviert sind. Eine Ausnahme bei der Aktivierung bildet die $PKC\delta$. Für ihre Aktivierung ist die erste Phosphorylierung am korrespondierenden Threonin der Stelle 505 nicht notwendig, da sie an der Stelle 500 durch Glutamin bereits eine negative Ladung besitzt, die auch zur entsprechenden Konformationsänderung führt (Stempka, L., 1997). $PKC\delta$ ist außerdem die erste Isoform, die durch Tyrosin-Phosphorylierung funktionell moduliert wird. *In vitro* erscheint diese Phosphorylierung nur nach Behandlung mit dem Phorbolster TPA (siehe unten)

oder durch Src. *In vivo* konnte die Tyrosin-Phosphorylierung durch z.B. TPA, PDGF, TGF α , Carbachol (Review, Gschwendet, M., 1999) oder nach Transfektion muriner Keratinozyten mit onkogenem Ha-ras (Denning, M.F., 1993) nachgewiesen werden. Diese Modifikation erhöht die Aktivität der PKC δ gegenüber manchen Substraten. Auf der anderen Seite führt sie zur Herunterregulierung der PKC δ durch proteolytischen Abbau. Somit ist nicht eindeutig geklärt, ob dieser Mechanismus letztlich zur Aktivierung oder Inhibierung der PKC δ dienen soll.

PKC wurde Gegenstand intensiver Untersuchungen, als entdeckt wurde, daß sie der wichtigste zelluläre Rezeptor für Tumor-promovierende Phorbolster ist. Phorbolster wie z.B. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) haben eine ähnliche Struktur wie DAG. Sie binden direkt an die PKC und aktivieren diese (Castagna, M., 1982). Bei der Aktivierung durch Phorbolster ist keine Ca²⁺-Anwesenheit notwendig. Durch Ca²⁺ wird aber die zur vollen Aktivierung benötigte Menge an Phorbolster verringert. Wie auch DAG erhöhen die Phorbolster die Affinität des Enzyms für Ca²⁺. TPA wirkt jedoch länger als DAG, da es langsamer abgebaut wird.

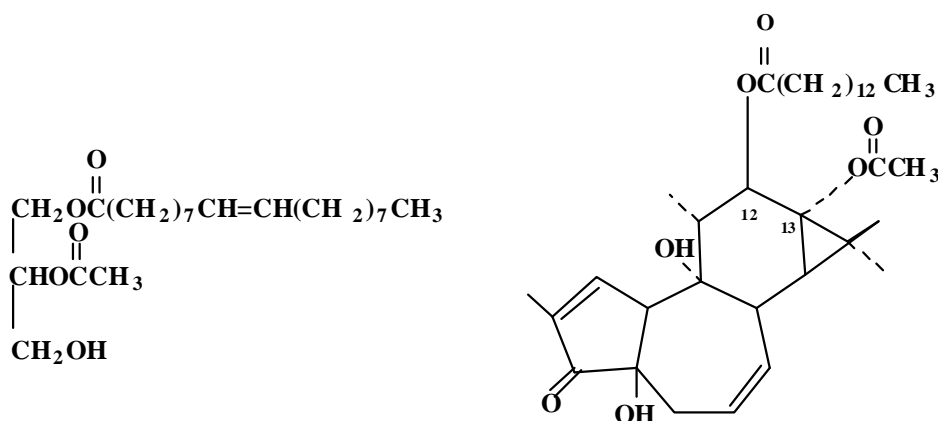


Abb. 9 DAG (links), TPA (rechts)

Mittlerweile wird die Tumor-promovierende Wirkung von TPA eher auf den Mechanismus der Herunterregulierung der konventionellen und neuen PKC-Isoformen zurückgeführt als auf ihre Aktivierung. So kann durch Bryostatin, ebenfalls eine PKC-Aktivator, der Tumor-promovierende Effekt von TPA aufgehoben werden. Dieser Mechanismus läßt sich dadurch erklären, daß unter Bryostatin / TPA-Behandlung die Herunterregulierung der PKC δ als einziger Isoform verhindert wird (Lu., Z, 1997). PKC δ scheint eine der Isoformen zu sein, die in die negative Wachstumskontrolle involviert ist.

PKC und negative Wachstumskontrolle

Eine wichtige biologische Aktivität der Mitglieder der PKC-Familie ist die Regulation des Zellwachstums bzw. des Zellzyklus und der Differenzierung. Sowohl *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Studien haben gezeigt, daß die Kontrollpunkte der PKC im Zellzyklus zum einen am G1→S Übergang und zum anderen am G2→M Übergang liegen. Ob sie diesen Übergang negativ oder positiv beeinflussen hängt vom Zeitpunkt der Aktivierung und von der Isoform ab. Zum Beispiel führt die Überexpression von PKCβI (Housey, G.M., 1988) oder ε (Cacace, A.M., 1993) in R6 embryonalen Ratten-Fibroblasten zu einem gesteigerten Zellwachstum oder bzw. vollständiger Transformation, während die Überexpression der α-Isoform eine starke Wachstumshemmung bewirkt (Borner, C., 1991). In NIH3T3-Maus-Fibroblasten resultiert die Überexpression der PKCε in einer erhöhten Verdopplungszeit und Sättigungsdichte. Im Gegensatz dazu, resultiert die Überexpression der PKCδ im umgekehrten Phänotyp (Mischak, H., 1993). Der gleiche Effekt konnte auch in Ratten-Kolon-Karzinom-Zellen beobachtet werden (Perletti, G.P., 1998; 1999). Der inhibitorische Effekt der PKCs auf den G1→S Übergang beruht auf der Hemmung der Phosphorylierung der Pocket-Proteine. So führt z.B. die Aktivierung der PKC in IEC-18 Ratten-Epithelzellen zur hypophosphorylierten und verringerten Expression von pRb, p107 und p130 (Black, J.D., 2000). Dieser Mechanismus verläuft wahrscheinlich über die Regulation der Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen. PKC-induzierte inhibitorische Effekte auf die Aktivität des CyclinE/ckd2-Komplex konnte in vaskulären Endothel-Zellen beobachtet werden (Zezula, J., 1997). Ashton *et al.* berichten von einer verspäteten Induktion von CyclinD1 nach Überexpression der PKCδ in mikrovaskulären Ratten-Endothel-Zellen (Ashton, A.W., 1999). Doch die meisten Daten deuten darauf hin, daß der inhibitorische Effekt der PKC auf den Zellzyklus durch den CKI, insbesondere p21^{waf1}, vermittelt wird. Seine erhöhte Expression führt zu einer Hemmung der Cdk2-Aktivität in der G1-Phase. Bei späterer Induktion blockiert er den Cdk2/CyclinA-Komplex in der G2-Phase. In einigen Zelllinien konnte auch ein erhöhter Level an p27^{kip1} detektiert werden (Fukamoto, S., 1997; Ashton, A.W., 1999). Interessanterweise gibt es keine Ergebnisse über eine Expression der Mitglieder der INK4-Familie.

Auf Grund der zahlreichen Untersuchungen der Rolle der PKC-Isoformen in der Regulation des Zellzyklus durch Inhibitoren, Aktivatoren und Transfektionsexperimente läßt sich festhalten, daß PKCβ und ε in die positive Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, während PKCα, δ und η in die negative Wachstumskontrolle und Differenzierung involviert sind (Review, Black, J.D., 2000).

Zielsetzung

Im gesunden Organismus ist das Zellwachstum bestimmt durch ein ausbalanciertes System aus wachstumsstimulierenden und hemmenden Mechanismen. In intakten Geweben, wo Zell-Zell-Kontakte ausgebildet sind, findet kaum Proliferation statt, obwohl Wachstumsfaktoren permanent anwesend sind. Kommt es aber zu einem Verlust dieser Kontakte z.B. bei Verletzungen, führt dies zur erneuten Zellteilung, die erst wieder endet, wenn die Zellen Kontakt erreicht haben. Tumorzellen unterliegen nicht mehr dieser dichteabhängigen Wachstumskontrolle. Das führt dazu, daß die Zellen sich ungehindert teilen und umliegendes Gewebe infiltrieren und zerstören. Die kontaktabhängige Wachstumshemmung ist folglich ein wichtiger Kontrollmechanismus im Organismus. Die Aufklärung der Signalkaskade erlangt somit in der Tumorforschung eine besondere Bedeutung, da sie zu neuen therapeutischen Ansätzen führen könnte.

Eine der entscheidenden Fragen hinsichtlich der Wachstumsregulation nichttransformierter Zellen betrifft die Natur der Signale, die durch die kontaktabhängige Wachstumshemmung generiert werden. Während bereits gezeigt wurde, unter welchen Bedingungen die beiden für diesen Wachstums-Regulationsmechanismus wichtigen Moleküle, Contactinhibin und sein Rezeptor, interagieren, ist bislang nicht bekannt, welche Signale dadurch induziert und über welche Kaskaden sie weitergeleitet werden. Durch ihre Aufklärung sollte die Voraussetzung geschaffen werden, mögliche Fehlregulationen in der Signalkaskade aufzuzeigen, welche es transformierten Zellen erlauben, diese sehr stringente Wachstumshemmung zu unterlaufen. Um hier grundlegende Informationen zu bekommen, sollte im Rahmen dieser Arbeit nach zwei unterschiedlichen Gesichtspunkten vorgegangen werden:

TGF β (Transforming Growth Factor) ist ein von Zellen sezernierter Wachstumsinhibitor und Differenzierungsfaktor. Seine Signalkaskade stellt in Epithelzellen einen wichtigen wachstumsregulierenden Mechanismus dar. In Keratinozyten-Zellen haben sich in früheren Arbeiten erste indirekte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Kontaktinhibition und TGF β -Signalweg gezeigt (Doktorarbeit, Ast, S., 1998). In einem ersten Ansatz sollte untersucht werden, ob und wie die durch TGF β und Contactinhibin induzierten Signalkaskaden zusammenhängen.

Im Rahmen der Diplomarbeit und vorangegangener Untersuchungen der Gruppe gab es bereits Hinweise auf eine Beteiligung der Proteinkinase C an der kontaktabhängigen Wachstumshemmung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher gezeigt werden, welche der PKC-Isoformen in die Kontaktinhibition involviert ist und welche Funktion sie besitzt.

1. Material und Methoden

1.1 Zellkultur

1.1.1 Verwendete Zelllinien

Humane diploide embryonale Lungenfibroblasten, FH 109 (Firma LIA, München)

FH 109 sind nicht-immortalisierte Zellen mit einem begrenzten Teilungspotential von 50 Teilungen pro Zelle (Wieser, R.J., 1985). Sie unterliegen *in vitro* einer dichteabhängigen Wachstumshemmung, d.h. sie hören auf zu proliferieren, sobald sie einen einschichtigen Zellrasen (Monolayer) ausgebildet haben. Dabei haben sie die für Fibroblasten typische Spindelform und ordnen sich bei zunehmender Zelldichte parallel zueinander an. Da sich etwa ab Passage 16 Alterserscheinungen zeigen, wurden für die Versuche nur die Passagen 6-11 verwendet.

Maus-Fibroblasten, NIH3T3 (B. Seliger, Mainz)

Die embryonalen Maus-Fibroblasten sind immortal durch spontane Transformation *in vitro* (Todaro, G.J., 1963). Ihr Chromosomensatz ist heteroploid. Die Zelllinie ist aber extrem sensibel auf Zell-Zellkontakte. Nach dem Erreichen von Konfluenz stellen die Zellen die Proliferation komplett ein. In konfluenten Kulturen sind die Zellen spindelförmiger und nicht mehr so flach wie in exponentiell wachsenden Kulturen, daher lassen sie sich sehr leicht abtrypsinisieren. Die Maus-Fibroblasten altern praktisch nicht und sind unbegrenzt teilbar.

Humane Keratinozyten, HaCaT (N.E. Fusenig, DKFZ, Heidelberg)

Die Zelllinie wurde nach spontaner Transformation humaner Keratinozyten *in vitro* aus histologisch normaler Haut gewonnen (Boukamp, P., 1988). Sie sind nach ihren ursprünglichen Kultivierungsbedingungen benannt: human adult skin keratinocytes, low calcium (0,2 mM), high temperature (38,5°C). HaCaT-Zellen haben einen aneuploiden Karyotyp und besitzen zwei mutierte Allele des p53-Gens, wobei jedes je eine Aminosäure-Substitution enthält (Codons 179 und 281/282). Dadurch ist das p53 inaktiv (Landesman, Y., 1997). Die Zellen sind immortal, zeigen aber Kontaktinhibition. In Kultur wachsen sie in einer Doppelschicht, wobei die untere

Basalschicht aus stark proliferierenden aber wenig differenzierten Zellen besteht. In der Suprabasalschicht ist es umgekehrt. Hier wachsen die Zellen kaum und exprimieren die Differenzierungsmarker Keratin 1 und 10, Involucrin und Filaggrin. Da sich ab Passage 70 Alterserscheinungen zeigten, wurden für die Versuche nur die Passagen 34-65 verwendet.

1.1.2 Kultivieren der Zellen

Die Zellen wurden in 20 ml Medium in Petrischalen von 15 cm Durchmesser im Brutschrank bei 10% CO₂, 85% Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank ausgeführt. Die verwendeten Materialien wurden dampfautoklaviert (25 min, 120°C) und steril verpackt aufbewahrt, soweit sie nicht schon steril waren. Vor jedem Arbeitsgang erfolgte eine Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion mit 70%igem Alkohol.

Geräte:

Inkubator	(Labotect)
Vertikal Laminar Flow Box	(InterMed)
Wasserbad	(Gesellschaft für Labortechnik mbH)
Phasenkontrastmikroskop	(Zeiss)
Fluoreszenzmikroskop	(Nikon)
Zentrifuge	(Hettich)
Kryotank	(Taylor Wharton)
Vakuumpumpen	(Leybold-Heraeus)
Dampfsterilisator	(Fraktomat electronic, Fritz Gössner)
Pipettierhilfe	(Pipetus)

Materialien:

Gewebekulturschalen, 6/10/15 cm Durchmesser	(Greiner, Falcon)
Multiwellplatten, 6/96 wells pro Platte	(Greiner)
Sterile Kunststoffpipetten, 1/5/10/25 ml	(Greiner)
Pasteurpipetten	(WV)
Sterilfiltrationseinheiten	(Nalgene)
Kryoröhrchen	(Nunc)
Kryoschienen	(Nunc)
Zentrifugenröhrchen, 15/50 ml	(Falcon)
Glasflaschen mit Teflondichtung	(Schott)
Spitzen für Einfach- und Multipipetten	(Nichiryo)

Reagenzien:

Natriumchlorid	(Roth)
Dinatriumhydrogenphosphat	(Riedel de Haen)
Kaliumchlorid	(Roth)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Roth)
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	(Calbiochem)
Penicillin	(Gibco)
Streptomycin	(Gibco)
Dimethylsulfoxid	(Roth)
N ₂ (l)	(Linde)

Fertige Lösungen:

CG-Medium	(Vitromex)
DMEM-Medium	(PAA)
2,5% Trypsin Stammlösung	(Seromed)
Fötale Kälberserum, FCS	(Greiner)

Kulturmedium

Zur Kultivierung der humanen Fibroblasten (FH109) und der Maus-Fibroblasten (NIH3T3) wurde *Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)* verwendet, ein synthetisches Nährmedium, welches alle essentiellen Aminosäuren, die nichtessentiellen Aminosäuren Glycin und Serin, wasserlösliche Vitamine, Kohlenhydrate, anorganische Salze, Natriumhydrogencarbonat als Puffer und Phenolrot als pH-Indikator mit der angegebenen Menge an fötalem Kälberserum enthält. Es entspricht in dieser Zusammensetzung des von der "Tissue Culture Association" (USA) empfohlenen Mediums.

Zusammensetzung des DMEM-Mediums (High Glucose):

Aminosäure	mg/l
L-Arginin x HCl	84
L-Cystin x 2HCl	63
L-Histidin x HCl x H ₂ O	42
L-Isoleucin	105
L-Leucin	105
L-Lysin x HCl	146
L-Methionin	30
L-Phenylalanin	66
L-Serin	42
L-Threonin	95
L-Tryptophan	16
L-Tyrosin	72
L-Valin	94

Vitamine	mg/l
D-Ca-Pantothenat	4
Cholinchlorid	4
Folsäure	4
i-Inosit	7
Nicotinsäureamid	4
Pyridoxal x HCl	4
Riboflavin	0,4
Thiamin x HCl	4

Anorganische Salze	mg/l
CaCl ₂ x H ₂ O	264
Fe(NO ₃) ₃ x 9H ₂ O	0,1
KCl	400
MgSO ₄	98
NaCl	6400
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	125
NaHCO ₃	3700

Andere Komponenten	mg/l
D-Glukose	4500
Phenolrot	15

Das Medium ist serumfrei. Die essentiellen Nährstoffe und Hormone wurden in Form von fötalem Kälberserum zugesetzt, außerdem eine Antibiotika-Lösung zur Vermeidung von Kontaminationen.

Zu 500 ml DMEM-Medium wurden folgende sterile, aliquotierte Lösungen zugesetzt:

50 ml Fötale Kälberserum	FCS (Greiner)
10 ml L-Glutamin:	200 mM in aqua dest.
5 ml Antibiotika-Lösung:	Penicillin: 10000 U/ml, Streptomycin: 10 mg/ml in aqua dest.

Die humanen Keratinozyten (HaCaT) wurden in *CG-Medium (Cell Growth Medium)* kultiviert, einem ebenfalls synthetischen Nährmedium, dem die essentiellen Nährstoffe und Hormone in Form von fötalem Kälberserum zugesetzt werden.

Zusammensetzung des CG-Mediums (nach Vitromex):

Aminosäuren	mg/l
L-Alanin	19,87
L-Arginin	84,00
L-Asparagin	17,22
L-Asparaginsäure	23,48
L-Cystin	28,00
L-Cystin 2HCl	62,57
L-Glutamin	59,60
L-Glutaminsäure	584,00
Glycin	30,00
L-Histidin HCl x H ₂ O	42,00
L-Isoleucin	105,00
L-Leucin	105,00
L-Lysin HCl	146,00
L-Methionin	30,00
L-Phenylalanin	66,00
L-Prolin	31,79
L-Serin	42,00
L-Threonin	95,00
L-Tryptophan	16,00
L-Tyrosin	103,79
L-Valin	94,00

Vitamine	mg/l
Biotin	0,013
D-Ca-Pantothenat	4,00
Cholinchlorid	4,00
Folsäure	4,00
i-Inosit	7,20
Nicotinsäureamid	4,00
Pyridoxal HCl	4,00
Riboflavin	0,40
Thiamin HCl	4,00
Vitamin B12	0,013

Anorganische Salze	mg/l
CaCl	200,00
Fe(NO ₃) x 9 H ₂ O	0,10
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,075
KCl	400,00
MgSO ₄	97,67
NaCl	6400,00
NaHCO ₃	2500,00
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	125,00
Na ₂ O ₃ Se	0,022

Andere Komponenten	mg/l
Cholesterin	57,50
D-Glukose	4500,00
HEPES	3500,00
Natriumpyruvat	87,42
Phenolrot	15,00
Rinderserumalbumin	1000,00
Sojabohnenlipide	100,00
humanes Transferrin	0,032
β -Mercaptoethanol	50000,00

Zu 500 ml CG-Medium wurden noch folgende sterile, aliquotierte Lösungen zugesetzt:

2,5 ml Fötale Kälberserum FCS (Greiner)
 5 ml Antibiotika-Lösung: Penicillin: 10000 U/ml,
 Streptomycin: 10 mg/ml in aqua dest.

1.1.3 Passagieren der Zellen

Um jederzeit Zellen unterschiedlicher Zelldichte zur Verfügung zu haben, wurden sog. Stammkulturen angelegt. Die Zellen adhären auf dem Boden der Kulturschalen und bilden schließlich einen dichten Zellrasen. Wenn Konfluenz erreicht ist, stellen die Zellen ihr Wachstum ein. Um die Zellen zu erhalten, wurden sie noch vor Dichtearretierung nach Bedarf im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 in frisches Medium passagiert (gesplittet). Die hierbei verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C temperiert.

Lösungen:

"Phosphate buffered saline", PBS:	136,8 mM	NaCl
	2,68 mM	KCl
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄
	3,2 mM	NaH ₂ PO ₄
		in aqua dest.
		(dampfautoklaviert, Lagerung bei 4°C)
Trypsinlösung:	0,025%	Trypsin
	0,02%	EDTA in PBS
		(sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)
EDTA-Lösung:	0,05%	EDTA in PBS
		(dampfautoklaviert, Lagerung bei 4°C)

Humane Fibroblasten (FH109) / Maus-Fibroblasten (NIH3T3)

Procedere:

1. Medium absaugen.
2. Zellrasen 3 x mit PBS waschen.
3. 1 ml Trypsinlösung auf dem Zellrasen verteilen und inkubieren, bis sich die Zellen abrunden und von der Unterfläche ablösen, mikroskopisch kontrollieren.
4. Trypsinisierte Zellen in 9 ml DMEM 10% FCS aufnehmen (durch die im FCS enthaltenen Trypsininhibitoren wird das Trypsin inaktiviert).
5. Zellen mit einer 10 ml Pipette gut resuspendieren.
6. Zellen auf neue Kulturschalen verteilen.

Humane Keratinozyten (HaCaT)

Procedere:

1. Medium absaugen.
2. Zellrasen 3 x mit PBS waschen.
3. 10 ml EDTA-Lösung zugeben und 20 min bei 37°C inkubieren.
4. EDTA-Lösung absaugen, 1 ml Trypsinlösung auf dem Zellrasen verteilen und 5 min bei 37°C inkubieren, Ablösen der Zellen von der Kulturschale mikroskopisch kontrollieren.
5. Trypsinisierte Zellen in 9 ml CG-Medium 5% FCS aufnehmen und resuspendieren (durch den hohen FCS-Gehalt wird das Trypsin inaktiviert).
6. Zellsuspension in ein 15 ml Falcon Tube überführen und 10 min bei 800 Upm zentrifugieren.
7. Überstand absaugen und Zellpellet in CG-Medium 0,5% FCS resuspendieren und auf neue Kulturschalen verteilen.

1.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau versetzt, der nur von toten Zellen mit nicht mehr funktionstüchtiger Plasmamembran aufgenommen wird. Es werden nur lebende, d.h. ungefärbte Zellen gezählt (Cook, J.A. und Mitchell, J.B., 1989).

Materialien:

Neubauer-Zählkammer (Maße: Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,025 mm)
Zweimal 4 Großfelder unterteilt in je 4 x 4 Quadrate

Lösungen:

Trypanblau-Lösung: 0,1% (w/v) Trypanblau (Sigma) in PBS

Procedere:

1. Von der nach dem Trypsinisieren erhaltenen Zellsuspension wird ein Aliquot von 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau-Lösung versetzt.
2. Die ungefärbten Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt pro 4 Großfelder.
3. Die ermittelte Zellzahl multipliziert mit dem Kammerfaktor 2500 und dem Verdünnungsfaktor 2 (durch die Verdünnung mit Trypanblau-Lösung) ergibt die Zellzahl pro ml Suspension.

1.1.5 Kryokonservierung

Insbesondere Zellen niedriger Passagen werden in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert. Durch stufenweises Einfrieren und die Anwesenheit eines Frostschutzmittels (DMSO = Dimethylsulfoxid) soll verhindert werden, daß die Zellen durch die Bildung von Eiskristallen zerstört werden.

Einfrierlösung: 10% DMSO (v/v) / FCS

Procedere:

1. Ermittlung der Zellzahl in der Zellsuspension (siehe 1.1.3).
2. Zellen abzentrifugieren und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Einfrierlösung aufnehmen, gut resuspendieren.
3. In 1-ml-Portionen auf Kryoröhrchen verteilen, in Styropor verpackt bei -20°C einfrieren.
4. 24 h bei -70°C aufbewahren, dann in Kryoschienen im Stickstofftank einlagern.

Der Auftauprozess erfolgte rasch bei 37°C . Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde auf eine mediumgefüllte Petrischale gegeben und das Medium nach einem Tag erneuert, um das DMSO zu entfernen.

1.1.6 Test auf Mykoplasmenkontamination

Frisch aufgetaute Zellen wurden nach einer Passage auf Mykoplasmeninfektion untersucht.

Mykoplasmen sind 125 nm bis 150 µm kleine, zellwandlose Prokaryonten. Im Gegensatz zu Bakterien sind diese Mikroorganismen nicht mikroskopisch erkennbar. Man benutzt daher eine Färbemethode, bei der spezifisch die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',5'-Diamino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (DAPI) angefärbt wird. Liegt eine Infektion mit Mykoplasmen vor, so sind neben den Zellkernen die DNA-Moleküle der Kontaminanten als kleine, gelbe Punkte unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

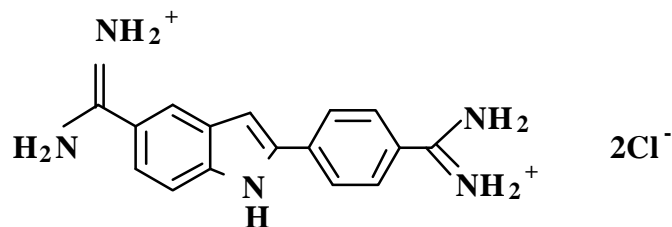


Abb. 1.1.5.1 DAPI

Reagenzien:

DAPI (4',5'-Diamino-2-phenylindol-di-hydrochlorid)	(Boehringer Ingelheim)
Ethanol p.a.	(Roth)
Methanol	(Riedel de Haen)
Essigsäure	(Roth)

Lösungen:

DAPI Stammlösung:	5 µg/ml in PBS, Lagerung bei -20° C
DAPI Gebrauchslösung:	0,2 ml Stammlösung in 10 ml Methanol
Fixierlösung:	Methanol / Essigsäure 3/1 (v/v)

Procedere:

1. In einer Petrischale werden zwei Deckgläschen für 10 min mit 70% Ethanol desinfiziert.
2. Dann werden sie 3 x mit PBS und 1 x mit Medium gewaschen.
3. Zellen werden auf desinfizierten Deckgläschen mindestens 2 Tage kultiviert.
4. Zellen 3 x mit PBS waschen und 2 x je 5 min mit Fixierlösung behandeln.
5. Die luftgetrockneten Deckgläschen 15 min mit 2 ml Gebrauchslösung im Dunkeln färben.
6. Die Zellen 1 x mit Methanol und 1x mit PBS waschen.
7. Deckgläschen werden mit nach unten gerichtetem Zellrasen auf einem Objektträger fixiert.
8. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit einem Ölimmersionsobjektiv bei 60-facher Vergrößerung und Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm.

1.1.7 Proliferationstest

Um die Wirkung definierter Bedingungen auf die Proliferation von Zellen zu untersuchen, ermittelt man die Proliferationsrate. Hierzu werden die Zellen nach entsprechender Behandlung mit Tritium-markiertem Thymidin inkubiert. Als DNA-Baustein wird es in der folgenden DNA-Replikationsphase in den Zellen fixiert. Die Messung der über einen bestimmten Zeitraum aufgenommenen Radioaktivität gibt Aufschluß über die proliferative Aktivität der Zellen.

Als Detektionsmethode benutzt man dafür die Szintillations-Spektroskopie. Die vom radioaktiven Präparat ausgesandte β -Strahlung überträgt ihre Energie durch Kollision auf Lösungsmittelmoleküle und wird dann von diesen in Form von Licht der Wellenlänge 260-340 nm abgegeben. Da diese Wellenlänge von den im Handel befindlichen Geräten nicht gemessen werden kann, wird dem Lösungsmittel eine zweite Komponente (z.B. Diphenyloxazol) zugefügt. Diese Verbindung fluoresziert und wird primärer Szintillator genannt. Das Absorptionsspektrum des Szintillators überlagert komplett das Emissionsspektrum des Lösungsmittels. So wird die vom Lösungsmittel als Licht abgegebene Energie vom Szintillator aufgenommen und bei längerer Wellenlänge als Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben. Diese wiederum kann vom Szintillationszähler über einen Photoverstärker (elektrisch als Lichtimpulse) verarbeitet und als "Impulse pro Minute" angegeben werden.

Geräte und Materialien:

Zellharvester	(Scatron)
Glasfaserfilter	(Whatman)
Trockenschrank	(Mettler)
Vials	(Roth)
Racks	(Packard)
β-Counter	(Hewlett-Packard)
Multiwellplatte mit 96 Vertiefungen	(Greiner)

Lösungen:

[³ H]-Thymidin-Stammlösung:	Methyl-[³ H]-Thymidin, 740 GBq/mmol (Dupont)
[³ H]-Thymidin-Gebrauchslösung:	370 kBq/ml in CG-Medium (Lagerung bei 4°C)
Szintillator	(Rotiszint eco, Roth)

Procedere:

1. Zellen werden in einer bestimmten Anzahl in 96-Well-Platten ausgesät und wie angegeben behandelt.
2. Nach entsprechender Kulturdauer werden in jeden Ansatz 25 µl der [³H]-Thymidin-Gebrauchslösung gegeben und für 4 h inkubiert.

FH109

3. Die Platte wird ausgeschlagen und 3 x mit PBS gewaschen.
4. Pro Well werden 50 µl Trypsinlösung zugegeben. Die Ablösung der Zellen wird mikroskopisch kontrolliert.

HaCaT / NIH3T3

3. Die Zellen werden mit 10 µl 0,5% EDTA in PBS 20 min bei 37°C inkubiert.
4. Dann wird mit 10 µl Trypsinlösung (2,5%) weitere 15 min bei 37°C inkubiert.
5. Die Multiwellplatte wird bei -20°C gelagert, bis die Ansätze vollständig eingefroren sind. Dabei werden die Zellen zerstört und DNA liegt nach dem Auftauen frei vor.
6. Mit Hilfe des Zellharvesters werden die Zellbruchstücke auf Glasfaserfilter gespült.
7. Das Filterpapier wird im Trockenschrank bei 80°C gut getrocknet.
8. Die den einzelnen Wells entsprechenden Filterstücke werden in Vials gegeben und mit jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt.
9. Die Proben werden mit Hilfe des Szintillationszählers ausgewertet.

1.1.8 Fixierung von Zellen

Um eine Kontaktinhibition über den Contactinhibin-Mechanismus, wie es bei konfluenten Zellen der Fall ist, nachzuahmen, werden konfluente Zellen mit Glutardialdehyd fixiert. Dabei bleiben die Zuckerstrukturen des Contactinhibins erhalten, über die es mit seinem Rezeptor wechselwirkt (Gradl, G., 1995). Gibt man die so fixierten Zellen zu semikonfluenten Zellen, kommt es zur Wachstumshemmung, wie es bei konfluenten Zellen der Fall wäre. Um diesen Effekt zu erreichen, müssen die semikonfluenten Zellen vollständig mit fixierten Zellen bedeckt sein. Mit dieser Technik ist es einfacher, den Zeitpunkt der Induktion der Kontaktinhibition in Experimenten (Proliferationstests) genau zu setzen. Andere Effekte wie Mediummangel können hiermit umgangen werden.

Reagenzien:

Glutardialdehydlösung 25%	(Sigma)
Glycin	(Roth)

Lösungen:

PBS	
Trypsinlösung:	0,025% Trypsin 0,02% EDTA / PBS (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)
Fixierlösung 1	Glutardialdehydlösung mit PBS auf 5% (v/v) verdünnen
Fixierlösung 2	Glutardialdehydlösung mit PBS auf 1% (v/v) verdünnen
Blockierlösung	0,1 M Glycin in PBS, sterilfiltriert

Fixierte Zellen in Suspension (FH109 / NIH3T3)

Procedere:

1. Zellen werden bis zur Konfluenz in DMEM-Medium in einer Gewebekulturschale 15 cm ø kultiviert.
2. Das Medium wird abgesaugt und 2 x mit temperiertem PBS gewaschen.
3. Die Zellen werden mit 1 ml Trypsin-Lösung abgelöst.
4. Es wird mit mit 9 ml Medium abgestoppt und die Zellen werden 10 min bei 800 Upm abzentrifugiert.
5. Der Überstand wird abgezogen und das Zellpellet 2 x mit PBS gewaschen.
6. Die Zellen in 12 ml PBS aufnehmen, gut resuspendieren und die Fixierlösung 1 ad 2% (v/v) Endkonzentration an Glutaraldehyd tropfenweise und unter Schütteln dazugeben.

7. Die Suspension 30 min im Eisbad inkubieren und anschließend 10 min bei 1000 Upm abzentrifugieren.
8. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach jedem Mal 10 min bei 1000 Upm abzentrifugieren.
9. Dann die Zellen in 10 ml Blockierlösung aufnehmen und im Eisbad für 30 min inkubieren.
10. Die Suspension 10 min bei 1500 Upm abzentrifugieren.
11. Den Überstand wieder abnehmen und das Pellet 3 x mit kaltem PBS waschen.
12. Die Zellen werden in DMEM-Medium mit 10% FCS resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und dann entsprechend mit Medium verdünnt.

Pro Well einer 96-Mikrotiterplatte benötigt man ca. $1,7 \times 10^5$ Zellen. Die fixierten Zellen müssen immer frisch hergestellt werden. Sie sind höchstens einige Tage bei 4°C haltbar.

Fixierter Zellrasen (HaCaT)

Procedere:

1. 5×10^4 Zellen pro Well aussäen und 24 h in CG-Medium 0,5% FCS bis zu einem konfluenten Zellrasen kultivieren.
2. Das Medium wird abgesaugt und 3 x mit temperiertem PBS gewaschen.
3. 30 min bei RT mit 100 µl Fixierlösung 2 inkubieren.
4. 3 x mit PBS waschen.
5. 30 min bei RT mit 100 µl Blockierlösung inkubieren.
6. 3 x mit PBS waschen.
7. 1 h in CG-Medium bei 37°C inkubieren vor Zugabe der Zellen.

1.1.9 Hämatoxylin / Eosin-(HE)Färbung

Zur Untersuchung der Zellmorphologie werden die Zellen mit Farbstoffen unspezifisch angefärbt. Wobei Hämatoxylin den Zellkern blau färbt. Durch Oxidation wird Hämatoxylin in den eigentlichen Farbstoff Hämatein überführt. Dieser bildet mit Aluminiumionen eine positiv geladene Komplexverbindung, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Zellkern-DNA reagiert. Eosin (Tetrabromfluorescein-Natrium) färbt das Zytoplasma und Kollagenfasern rot.

Lösungen:

Hämatoxylinlösung	(Sigma)
Differenzierungslösung:	75 ml Ethanol (100%) 0,7 ml konz. HCl ad 100 ml aqua dest.
Eosin-Lösung	(Sigma)

Procedere:

1. Zellen in der Kulturschale 3 x mit PBS spülen.
2. Die Zellen werden mit 70% Ethanol 15 min fixiert.
3. Nach 3 x waschen mit PBS werden die Zellen mit Hämatoxylin-Lösung für 3 min gefärbt.
4. Der überschüssige Farbstoff wird mit Leitungswasser kurz abgespült.
5. Damit die Kernfärbung nicht zu stark wird, werden die Zellen kurz in Differenzierungs-Lösung eingetaucht.
6. Die Kulturschalen werden dann für 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend kurz mit aqua dest. gewaschen.
7. Die Zellen werden für 5 min mit der Eosin-Lösung gefärbt.
8. Überschüssiger Farbstoff wird mit aqua dest. gewaschen.
9. Um die Zellen unter dem Mikroskop im Durchlicht zu untersuchen, wird der Boden der Kulturschale nur ein wenig mit aqua dest. bedeckt.

1.2 Gewinnung von Proteinen aus der Zellkultur

Die Methoden zur Gewinnung von zellulären Proteinen beruhen meist auf der Verwendung von Detergenzien, die die Zellmembran solubilisieren. Durch diese Detergenzextraktion gewinnt man integrale Plasmamembranproteine. Der Zellkern, sowie das Zytoskelett und daran assoziierte Proteine, bleiben an der Kulturschale haften. Sollen diese detergenzunlöslichen Komponenten auch erfaßt werden, müssen sie mechanisch vom Substrat abgelöst werden. Daher wird zuerst der Extraktpuffer zugegeben und dann mit diesem die Proteine von der Kulturschale abgeschabt.

Geräte:

Zentrifuge	(Hettich)
Eppendorf Zentrifuge	(Heraeus)

Materialien:

Zellschaber

1.2.1 Detergenzextraktion mit Laemmli-Probenpuffer

Um alle in der Zelle vorhandenen Proteine zu erfassen, wurde die Extraktion mit Laemmli-Probenpuffer durchgeführt. Durch die Zugabe des heißen Puffers und das anschließende Abkochen werden alle Proteine so schnell denaturiert, daß auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren verzichtet werden kann.

Lösungen:

Laemmli-Probenpuffer siehe 1.4.1.2

Procedere:

1. Zellrasen 3 x mit PBS waschen.
2. 0,5 ml heißen Laemmli-Probenpuffer auf eine 60-mm-Platte geben.
3. Die Zellen mit einem Zellschaber schnell von der Platte abschaben, mit Extraktpuffer in ein Eppendorf Cap überführen 10 min bei 96°C inkubieren.
4. Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernen: 10 min, 14000 Upm, 4°C

1.2.2 Detergenzextraktion mit CHAPS

CHAPS ist ein von der Cholsäure abgeleitetes, zwitterionisches Detergenz. Durch seine amphiphile Struktur ist es in der Lage, sich zwischen die Membranproteine zu schieben und diese unter Ausbildung von Addukten in Lösung zu bringen. Dabei bleibt die biologische Aktivität der Proteine vollständig erhalten. Der Proteingehalt von 10^7 Zellen, die in einer Kulturschale mit 15 cm Ø kultiviert wurden, liegt bei ungefähr 1,5 mg.

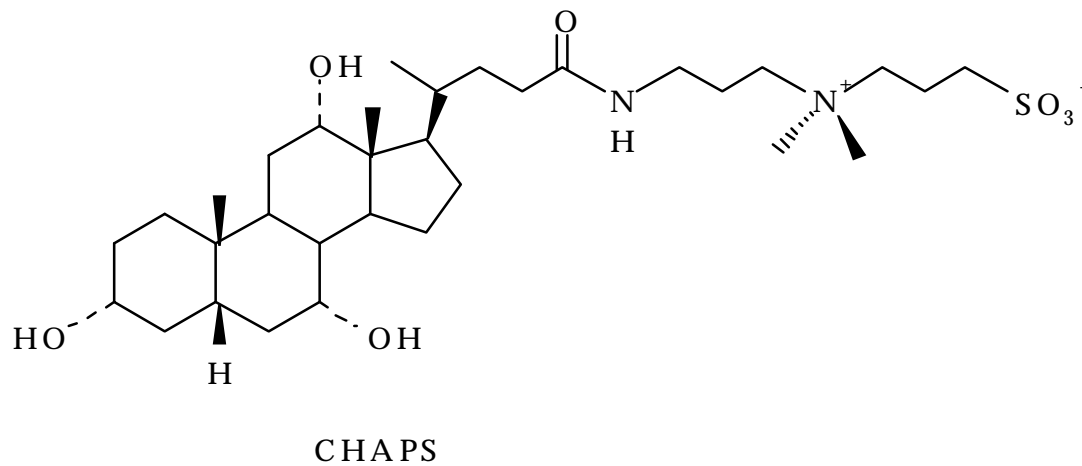


Abb. 1.2.1.1 CHAPS=3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat

Reagenzien:

CHAPS	(Sigma)
Tris	(ICN)
Natriumdesoxycholat	(Merck)
Triton-X-100	(Sigma)
SDS	(Serva)
Natriumorthovanadat	(Sigma)
Natriumfluorid	(Merck)

Lösungen:

PBS	
Detergenzlösung	8 mM CHAPS / PBS

Procedere:

1. Zellrasen 3 x mit PBS waschen.
2. Detergenzlösung gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilen.
(für 15-cm-Petrischale 5 ml, für 60-mm-Schale 0,5 ml Detergenzlösung)
3. Die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abschaben, mit Extraktpuffer in ein Eppendorf-cap überführen und 20 min auf Eis inkubieren.
4. Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernen: 10 min, 14000 Upm, 4°C
5. Überstand auf Eis lagern.

1.2.3 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

Durch den Zellaufschluß werden eine Reihe proteolytischer Enzyme freigesetzt. Um die Bestandteile des gewonnenen Extraktes intakt zu erhalten, wird dem Extraktpuffer eine Kombination unterschiedlicher Proteaseinhibitoren zugefügt. Um den Phosphorylierungsstatus der Proteine aufrecht zu erhalten, wurden die Zellextrakte in Gegenwart von Phosphatase-Inhibitoren (Natriumfluorid und Natriumorthovanadat) durchgeführt. Die Phosphatase-Inhibitoren werden hier aber nicht extra aufgeführt, da sie schon im CHAPS-Extraktpuffer enthalten sind (siehe oben).

Reagenzien:

Aprotinin	(Boehringer Ingelheim)
Sojabohnentrypsininhibitor	(Boehringer Ingelheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid	(Sigma)
Jodacetamid	(Sigma)
Pepstatin	(Sigma)
Leupeptin	(Sigma)

Verwendete Inhibitoren und jeweilige Spezifität:

Proteaseinhibitor	Spezifität der Hemmung	Konzentration im Extrakt in mM
Aprotinin	Serinproteasen	300
Jodacetamid	SH-abhängige Proteasen	0,4
Leupeptin	Serin- u. Cysteinprotease, Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0,02
Pepstatin	Aspartatproteasen	5000
PMSF	Serinproteasen	0,3
Sojabohnentrypsininhibitor	Trypsin	100

1.3 Biochemische Methoden

1.3.1 Proteinisolierung durch Chloroform / Methanol-Fällung

Nach einem Zellaufschluß liegen die löslichen Proteine gemeinsam mit Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und anderen löslichen niedermolekularen Verbindungen vor. Ziel ist das selektive Ausfällen von Proteinen, wobei die anderen Komponenten in Lösung bleiben.

Proteine besitzen an ihrem isoelektrischen Punkt die geringste Löslichkeit. Sie können durch Änderung der Ionenstärke, des pH-Wertes oder, wie bei den hier angewandten Methoden, durch Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, ausgefällt werden. Letzteres führt zur Abnahme der dielektrischen Konstante des Lösungsmittels, was die Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzt geladenen Oberflächenresten der Proteine vergrößert. Dadurch bilden sich große Aggregate, die aus der Lösung ausfallen. Der zusätzliche Effekt der Dehydratation der Proteine in einem Lösungsmittel unterstützt diesen Vorgang.

Die Chloroform / Methanol-Fällung ist besonders für die Isolierung kleiner Proteinmengen geeignet, also für analytische Zwecke.

Geräte:

Zentrifuge	(Hettich)
Eppendorfszentrifuge	(Heraeus)

Materialien:

Polypropylen-Zentrifugenröhrchen	(Eppendorf, Greiner)
----------------------------------	----------------------

Reagenzien:

Methanol	(Riedel de Haen)
Chloroform	(Roth)

Procedere:

1. Proteinlösung in Eppendorf-Cap überführen und mit aqua dest. auf ein Volumen von 100 μ l auffüllen.
2. Nacheinander zugeben und gut vortexen:
 - 100 μ l Chloroform,
 - 400 μ l Methanol und
 - 300 μ l aqua dest.
3. 3 min bei 13000 Upm zentrifugieren.
4. Obere Phase vorsichtig abziehen, das Proteinpellet befindet sich auf der Chloroform-Phase.
5. 300 μ l Methanol zugeben, vorsichtig mischen.
6. 5 min bei 13000 Upm zentrifugieren und Überstand absaugen.

1.3.2 Proteinquantifizierung

Zur Bestimmung der Menge an Gesamtprotein in einer Lösung wurde die Farbreaktion mit BCA (Bicinchoninic acid) in Gegenwart von Kupfer-II-Ionen angewandt (Smith, P.K., 1985).

Dabei handelt es sich um eine Biuretreaktion, bei der reduktive Gruppen im Protein im alkalischen Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduzieren; letztere ergeben einen intensiv gefärbten Komplex mit je zwei Molekülen BCA. Die Absorption der gefärbten Lösung wird bei 562 nm photometrisch bestimmt.

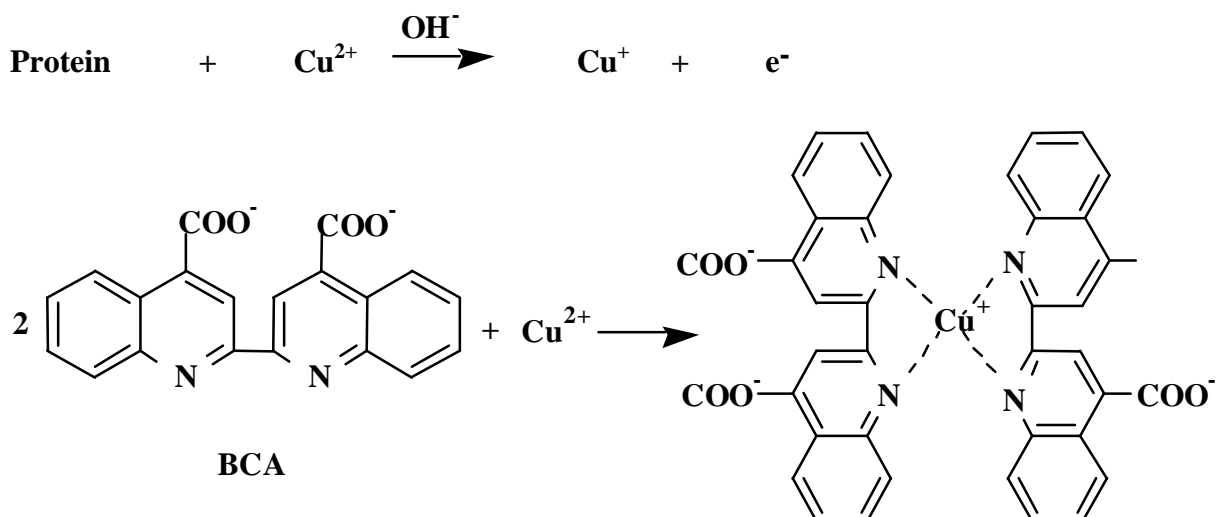


Abb. 1.3.2.1 Bildung des Farbstoffkomplexes

Ein Vorteil der BCA-Proteinbestimmungsmethode gegenüber anderen Methoden ist z.B. die geringere Störanfälligkeit durch Detergenzien. Da jedoch unterschiedliche Proteine verschieden stark mit den Kupferionen reagieren, erhält man, wie bei allen anderen Farbreaktionen, nur Näherungswerte. Störende Reagenzien, wie Reduktionsmittel oder aminohaltige Pufferkomponenten (Tris) müssen wegen Reduktion oder Komplexbildung des Cu^{2+} vor der Bestimmung entfernt werden. In diesem Fall wurde nach 1.4.1.2 gefällt und das Pellet in 50 μl 0,1 N Natronlauge aufgenommen.

Geräte:

Heizblock, 37°C	(Eppendorf)
Spektrophotometer	(Biochrom Ultrospec 4051, LKB)

Reagenzien:

Bicinchoninsäure	(Sigma)
Natriumcarbonat	(Merck)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck)
Dinatriumtartrat	(Merck)
Kupfer(II)sulfat	(Merck)
Bovines Serum Albumin, BSA	(Roth)

Lösungen:

Lösung A:	1% (m/v) BCA
	0,4% (m/v) NaOH
	2% (m/v) NaHCO_3
	0,16% (m/v) Na_2 -Tartrat
	in aqua dest., pH 11,25 / Natronlauge oder Natriumhydrogencarbonat
Lösung B:	4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in aqua dest.
Testlösung:	100 Teile Lösung A / 2 Teile Lösung B
BSA-Lösung:	1 mg/ml aqua dest.

Procedere:

Leerwert und Standards wurden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt:

Lösungen	Leerwert	Standard I	Standard II	Standard III
H_2O	50 μl	--	25 μl	40 μl
BSA-Lösung	--	50 μl	25 μl	10 μl
Testlösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

1. Die Probenlösung wird innerhalb der verwendeten Standardkonzentrationen angesetzt.
2. Die Proteinlösung wird mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und dann mit 1 ml Testlösung versetzt. Die Tests und die Standards werden doppelt angesetzt.
3. Die Ansätze werden bei 37°C für 30 min inkubiert.
4. Die Extinktion E wird bei 562 nm gemessen.

Berechnung der Proteinkonzentration:

$$c = E \times F / V$$

c: Konzentration der Proteinlösung in mg/ml

F: Mittelwert der aus den einzelnen Standardwerten errechneten Faktoren (F_i)

$$F_i = \text{Vol.BSA(ml)} / E$$

E: Mittelwerte der bei 562 nm gemessenen Extinktionen

V: Volumen der Protein- bzw. Standardlösungen

1.3.3 PAP-Verdau von Proteinen

PAP (potato acid phosphatase) ist eine unspezifische saure Phosphatase aus Kartoffeln. Sie spaltet Phosphatreste von hydroxylierten Aminosäuren wie Tyrosin, Serin und Threonin innerhalb eines Proteins ab (Cooper, J.A., 1986). Das pH-Optimum des Enzyms liegt im sauren Bereich.

Reagenzien:

PAP	(Sigma)
Hepes	(Gibco)
Glycerol 87%	(Sigma)
Dithiothreitol	(Sigma)
Magnesiumchlorid	(Merck)
PIPES	(Sigma)
Leupeptin	(Sigma)
Aprotinin	(Boehringer Ingelheim)

Lösungen:

PAP-Aufbewahrungspuffer:	10 mM	Hepes
	0,5 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	DTT
	50% (v/v)	Glycerol
		pH auf 7,5 einstellen
PAP-Stammlösung:	50 u in 833 µl PAP-Aufbewahrungspuffer lösen (0,06u/µl) in 5 µl Aliquots bei -70°C lagern	
PAP-Puffer:	40 mM	PIPES
	1 mM	DTT
	20 µg/ml	Aprotinin
	20 µM	Leupeptin
		pH auf 6 einstellen

Procedere:

- 100 µg Gesamtprotein dem Zellextrakt (ohne Phosphataseinhibitoren) entnehmen und mit PAP-Puffer auf 500 µl auffüllen.
- PAP wird in einer Aktivität von 0,015 u pro µg Protein zugegeben und bei 30°C für 1 h inkubiert.
- Das verdaute Protein wird mit Chloroform / Methanol gefällt (1.3.1) und zur Auftrennung in der 1-D-SDS-PAGE in Probepuffer aufgenommen.

1.3.4 Oxidation nach Smith

Freie benachbarte Hydroxyl-Gruppen (-CH(OH)-CH(OH)-) in Zuckerketten werden von Periodat oxidiert. Dabei wird die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung gespalten (-CHO + OHC-).

Reagenzien:

Natriumacetat	(Merck)
Natriumperiodat	(Sigma)
Glycin	(Roth)

Lösungen:

Natriumacetatpuffer:	0,1 M, pH 5,5, sterilfiltriert
Oxidationslösung:	5 mM NaIO ₄ in Natriumacetatpuffer, sterilfiltriert
PBS	
Blockierlösung	0,1 M Glycin in PBS, sterilfiltriert

Procedere:

1. Zellrasen fixieren (wie unter 1.1.8).
2. 3 x mit PBS waschen.
3. Zellrasen mit 100 μ l Oxidationslösung 15 h bei 4°C inkubieren.
4. 3 x mit PBS waschen.
5. Zellrasen mit je 100 μ l Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur behandeln.
6. 3 x mit PBS waschen.
7. Zellrasen vor Aussaat der Zellen mit je 100 μ l Medium 2 h bei 37°C im Inkubator aufbewahren.

1.4 Elektrophorese

Die Elektrophorese beruht auf der Ionenwanderung im elektrischen Feld. Proteine besitzen in Abhängigkeit von der Anzahl an sauren und basischen Aminosäuren unterschiedliche Gesamtladungen und unterschiedliche pK-Werte. Wird ein geladenes Molekül in ein elektrisches Feld gebracht, so hängt seine elektrophoretische Beweglichkeit von seiner Gesamt-Nettoladung, der Größe und Gestalt, dem pH-Wert, der Temperatur und Ionenstärke des Puffers, der Porengröße des Trägers und der elektrischen Feldstärke ab.

Die Trennung der Proteine wird in einer Trägermatrix durchgeführt, meist in Form eines Gels (Polyacrylamid, Agarose). Durch variable Vernetzungsgrade im Gel kommt ein sogenannter Siebeffekt zum Tragen. Die Moleküle werden nicht nur nach ihrer Ladung, sondern auch nach Größe und Gestalt getrennt.

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, K.K., 1970)

Da die Beweglichkeit eines Proteins im elektrischen Feld sowohl von der Gesamtladung, als auch von seiner Nettoladung abhängt, können zwei Proteine trotz unterschiedlicher Molekülgröße mit derselben Geschwindigkeit zur Anode wandern, wenn der Größenunterschied durch die Ladung ausgeglichen wird. Man kann solche Gelsysteme also nicht zur Molekulargewichtsbestimmung heranziehen.

Im Fall der SDS-Gelelektrophorese wird die individuelle Ladung der Polypeptide durch die Bindung des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) nahezu ausgeschaltet. Proteine werden durch SDS solubilisiert und denaturiert. Das SDS lagert sich dabei gleichmäßig entlang der Aminosäurekette an. Es entsteht ein Komplex mit nach außen gerichteten negativen Sulfat-Gruppen, d.h. die Anzahl der negativen Ladungen verhält sich proportional zur Proteingröße.

Bei der sogenannten diskontinuierlichen Gelelektrophorese führt die Vorlagerung eines weniger stark vernetzten Sammelgels mit erhöhtem pH-Milieu zu einer Konzentrierung des anfänglichen Proteingemisches in einer scharfen Zone. Die Proteine laufen nahezu gleichzeitig in das folgende engporige Trenngel ein. Hier wirkt der molekulare Siebeffekt, der die Proteine nach ihrer Größe trennt. Dieses System erzielt eine besonders scharfe Auftrennung.

Das Netzwerk des Gels wird durch radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden bifunktionellen N, N'-Methylen-bis-acrylamids aufgebaut. Als Radikalstarter werden Ammoniumperoxodisulfat und das tertiäre Amin N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Die Porengröße kann durch das Mengenverhältnis der beiden Komponenten variiert werden. Für unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche können so optimale Trennbedingungen geschaffen werden.

1.4.1. Eindimensionale Gelelektrophorese

Geräte:

Gelgießkammer oder -ständer	
Saugflasche	
Zentrifuge	(Eppendorf)
Heizblock	(Eppendorf)
Elektrophoresekammer	(Pharmacia)
Netzgerät	(Pharmacia)

Materialien:

Glasplatten (8x13 cm, 5x15 cm)	
Spacer (0,5 mm bzw. 2 mm dick)	
Probenkämme (0,5 mm dick)	
Isolierband	(3M)

Reagenzien:

Tris (Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan)	(ICN)
Salzsäure 37%	(Merck)
Acrylamid, 4x krist.	(Roth)
N, N'-Methylen-Bisacrylamid	(Roth)
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	(Serva)
Ammoniumperoxodisulfat	(Serva)
Natriumlaurylsulfat	(Serva)
Ethanol p.a.	(Roth)
Saccharose	(Roth)
Dithiothreitol	(Sigma)
Bromphenolblau	(Serva)

1.4.1.1 Gießen analytischer Gele

Lösungen:

60% Acrylamid Mix:	116,5 g Acrylamid 3,2 g Bisacrylamid aqua dest. ad 200 ml
1,5 M Tris pH 8,8:	181,5 g Tris in 800 ml aqua dest. lösen, mit HCl auf pH 8,8 einstellen, auf 1 l auffüllen. (filtrieren und autoklavieren)
1,0 M Tris pH 6,8:	12,1 g Tris in 80 ml aqua dest. lösen, mit HCl auf pH 6,8 einstellen, auf 100 ml auffüllen. (filtrieren und autoklavieren)
10% SDS:	10 g SDS in 100 ml aqua dest.
10% APS:	1 g Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml aqua dest.
50% (v/v) Ethanol p.a.	in aqua dest.

Die zum Gießen verwendeten Glasplatten wurden vor Gebrauch im Trockenschrank für eine halbe Stunde auf 150°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Glasplatten gründlich mit technischem Alkohol gereinigt. Mit Hilfe eines Klebebandes wurden die Spacer zwischen zwei Platten eingefügt. Um zu gewährleisten, daß die Gelkammern dicht sind, wurden sie im Trockenschrank für etwa 15 min bei 80°C bis 100°C fixiert, anschließend für den Gießvorgang wieder abgekühlt.

Stammlösung für Trenngel:

Für 100 ml eines 7,5%igen Gels:

Aqua dest.	61,5	ml
60% Acrylamid Mix	12,5	ml
1,5 M Tris, pH 8,8	25	ml
10% SDS	1	ml

Die Lösung wird gründlich mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast und eventuell filtriert. Große Gele (17,5 cm x 15 cm) werden in einen offenen Gießständer gegossen und müssen nach unten abgedichtet werden. Dafür wird ein „Sockelgel“ benötigt.

Procedere:

1. 35 ml Trenngel entnehmen.
2. 650 µl APS und 28 µl TEMED als Radikalstarter zugeben.
3. Zügig in den Sockelständer gießen.

Bei kleinen Gelen (8 cm x 13 cm) wird die Trenngel-Lösung direkt in die Gelkammer gegossen, bei großen Gelen wird sie nach Polymerisieren des Sockelgels zwischen die Glasplatten pipettiert.

Für das Trenngel werden pro 100 ml folgende Mengen an Radikalstarter zugegeben:

TEMED	45 µl
APS	750 µl

Das Trenngel wird sofort mit 50% Ethanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Nach der Polymerisierung des Trenngels wird das Ethanol wieder entfernt, und die Probenkämme werden eingesetzt.

Stammlösung für Sammelgel:

Für 10 ml Sammelgel

aqua dest.	7,69 ml	Radikalstarter:	
60% Acrylamid Mix	0,85 ml	APS	0,1 ml
1 M Tris, pH 6,8	1,25 ml	TEMED	10 µl
10% SDS	0,10 ml		

Die Lösung wird vor dem Verwenden entgast. Die Gele werden nach vollständiger Polymerisierung in feuchte Tücher verpackt und luftdicht verschlossen bei 4°C aufbewahrt.

1.4.1.2 Probenvorbereitung

Lösungen:

1,0 M Tris pH 6,8	12,1 g Tris in 80 ml aqua dest. lösen, mit HCl pH 6,8 einstellen, auf 100 ml auffüllen
20% SDS	20 g SDS in 100 ml aqua dest.
1 M DTT	5 g Dithiothreitol in 32 ml aqua dest.
Probenpuffer: (2 x Laemmli Probenpuffer)	1,2 ml 1,0 M Tris pH 6,8 5,0 ml 20% SDS 2g Saccharose aqua dest. ad 10 ml q.s. Bromphenolblau
Nicht reduzierender Probenpuffer:	2 x Laemmli Probenpuffer 1:1 mit aqua dest. mischen
Reduzierender Probenpuffer:	5 Teile 2 x Laemmli Probenpuffer 4 Teile aqua dest. 1 Teil 1 M DTT (muß immer frisch angesetzt werden)

Procedere:

1. Die Proben werden gefällt (1.3.1),
2. dann in 10 bis 20 µl Probenpuffer aufgenommen und gut gevortext.
3. Zur vollständigen Denaturierung werden sie 10 min im Heizblock bei 96°C abgekocht.
4. Vor dem Auftragen werden die Proben kurz zentrifugiert.

1.4.1.3 Elektrophorese

Lösungen:

Elektrophoresepuffer: 15 g Tris
72 g Glycin
6,25 g SDS

Procedere:

1. Der untere Teil der Gelelektrophoresekammer wird mit dem Elektrophoresepuffer gefüllt.
2. Die Gele werden in die Elektrophoresevorrichtung eingehängt (Luftblasen am unteren Ende der Gele durch Schwenken im Puffer vermeiden).
3. Vom unteren Anodenraum wird Puffer in den oberen Kathodenraum gepumpt.
4. Vom Auftragen der Proben bis zum Einlaufen in das Sammelgel bleibt die Pumpe ausgeschaltet, um Aufwirbelungen zu vermeiden.
5. Zum Einlaufen der Proben wird eine Stromstärke von 50 mA angelegt.
6. Haben die Proben das Trenngel erreicht, wird die Stromstärke auf 50 mA pro Gel erhöht und die Pumpe zur Umwirbelung des Elektrophoresepuffers wieder angestellt.
7. Die Auftrennung ist beendet, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hat.

1.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (Rodemann, H.P., 1986)

Will man eine große Anzahl spezifischer Proteine genau auftrennen, wählt man die zweidimensionale Elektrophorese. Hierbei wird das Proteingemisch zuerst einer isoelektrischen Fokussierung in einer Gelkapillare unterzogen. Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Das erreicht man durch einen festen pH-Gradienten im Gel. Dieser wird durch eine Mischung synthetischer, niedermolekularer Polyampholyte (aliphatische Polyamino-polycarbonsäuren) erzeugt, die, in Wasser gelöst, in Polyacrylamid als Trägermatrix "eingebettet" werden.

Vor Anlegen einer Spannung ist der pH-Wert gleich dem Mittel aller Polyampholyte. An Anode (sauer) und Kathode (basisch) herrschen unterschiedliche pH-Werte durch die verwendeten Puffer. Bei der Vorfokussierung findet daher eine Wanderung von H^+ und OH^- -Ionen durch das Röhrchen statt, wodurch die Ampholyte zu wandern beginnen. Sie bleiben dort stehen, wo sie den isoelektrischen Punkt erreichen. Wegen der hohen Pufferkapazität der Ampholyte wird in der Umgebung ein pH-Wert aufgebaut, der dem isoelektrischen Punkt des jeweiligen Ampholyten

entspricht. Der Gradient hat immer seinen niedrigsten pH-Wert an der Anode und den höchsten an der Kathode.

Nach Beendigung der isoelektrische Fokussierung wird das Gel auf ein SLAB-Gel überführt und eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, die die Proteine in zum Gelröhrchen senkrecht liegender Richtung nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Da isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht eines Proteins in keiner Beziehung zueinander stehen, erhält man mit diesen Parametern eine gleichmäßige Verteilung in zwei Dimensionen.

1.4.2.1 Isoelektrische Fokussierung

Geräte:

Gießständer	
Fokussierungskammer	
Netzgerät	(Pharmacia)
Zentrifuge	(Eppendorf)

Materialien:

Glasröhrchen, (Länge 10 cm, Innendurchmesser 2,5 mm)	
Parafilm	(Roth)

Reagenzien:

Acrylamid, 4x kristall.	(Roth)
N,N -Methylen-Bisacrylamid	(Roth)
Ampholine 5-7	(Pharmacia)
Ampholine 5-7	(Serva)
Ampholine 7- 9	(Pharmacia)
Ampholine 3,5 -1 0	(Pharmacia)
Harnstoff	(Roth)
CHAPS	(Sigma)
Nonidet P-40	(Sigma)
Dithiothreitol	(Sigma)
TEMED	(Serva)
Ammoniumpersulfat	(Serva)
Natriumhydroxid	(Roth)
Phosphorsäure 85%	(Merck)
Tris	(ICN)
Salzsäure 37%	(Merck)

Natriumlaurylsulfat	(Serva)
Glycerin 87%	(Merck)

A Gießen der Röhrengelle

Lösungen:

Acrylamidlösung:	2,84 g Acrylamid 0,162 g Bisacrylamid aqua dest. ad 10 ml
10% NP-40:	10% (v/v) NP-40 in aqua dest.
Stammlösung:	5,5 g Harnstoff 1,3 ml Acrylamidlösung 2,45 ml aqua dest. 0,4 ml Ampholine 5-7 (Pharmacia) 0,4 ml Ampholine 5-7 (Serva) 0,12 ml Ampholine 3,5-10
Detergenzlösung:	0,15 g CHAPS 0,5 ml 10% NP-40 0,5 ml aqua dest.
Radikalstarter:	7 µl TEMED 10 µl 10% APS

Procedere:

1. Die gut gereinigten und getrockneten Röhren mit Parafilm an einem Ende verschließen, die Höhe des Gels bei 8 cm markieren und bei 37°C vortemperieren.
2. Die Stammlösung im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmen, bis sich der Harnstoff gelöst hat (Ampholine erst zum Schluß dazugeben).
3. Dann Detergenzlösung hinzufügen und gesamte Lösung gut entgasen und filtrieren.
4. TEMED und APS zugeben und mischen.
5. Die Lösung zügig mit Hilfe einer Pasteurpipette mit langer Spitze in die Röhren blasenfrei bis kurz oberhalb der Markierung auffüllen.
6. Gele mit 10 µl aqua dest. überschichten und ca. 2 h bei Raumtemperatur polymerisieren lassen.

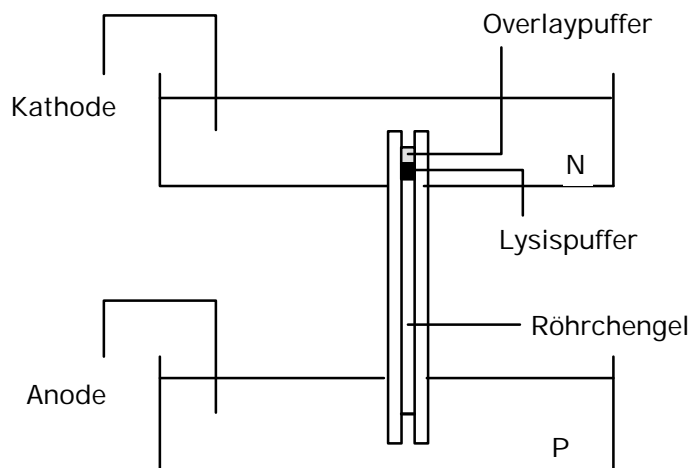


Abb. 1.4.2.1.1 Isoelektrische Fokussierung, (P) Phosphorsäure, (N) Natronlauge

B Vorfokussierung

Lösungen:

Anodenpuffer:	10 mM	Phosphorsäure
Kathodenpuffer:	20 mM	Natronlauge
Lysispuffer:	14,77 g	Harnstoff
	1,0 g	CHAPS
	0,3 g	DTT
	1,25 ml	Ampholine 7-9
	25 ml ad	aqua dest.
Overlaypuffer:	4,8 g	Harnstoff
	0,024 g	DTT
	250 μ l	Ampholine 7-9
	5 ml	10% NP-40
	10 ml ad	aqua dest.

Procedere:

1. Die Anodenlösung in die untere Kammer füllen.
2. Parafilm von den Röhrchen entfernen und in die Halterung stecken, luftblasenfrei in die Anodenkammer stellen.
3. Das Wasser über den Gelen mit einer Spritze abziehen und 3 x mit aqua dest. nachspülen.
4. Die Gele werden mit 10 μ l Lysispuffer und 10 μ l Overlaypuffer überschichtet.
5. Die Glasröhrchen und die obere Kammer mit Kathodenpuffer auffüllen.
6. Anlegen der Spannung:
 - 200 Volt für 15 Minuten,
 - 300 Volt für 30 Minuten,
 - 400 Volt für 60 Minuten.

Im Laufe der Vorfokussierung kommt es zu einer Abnahme der Stromstärke entsprechend der Wanderung der Ampholine.

C Isoelektrische Fokussierung

Probenvorbereitung:

Die Proteinproben werden entweder zuerst gefällt oder direkt in 10-60 µl Lysispuffer bei Raumtemperatur gelöst. Dann werden die Proben auf die Gele aufgetragen.

Procedere:

1. Der Kathodenpuffer wird nach der Vorfokussierung ausgetauscht.
2. Die über den Röhrchengelen befindliche Lösung absaugen und die Geloberfläche mit aqua dest. waschen.
3. Probe auf Gel auftragen und mit 10 µl Overlaypuffer und frischem Kathodenpuffer überschichten.
4. Trennung erfolgt bei einer Spannung von 290 V über 16 h.
5. Dann werden die Röhrchen aus der Apparatur genommen und die Gele mit Druckluft ausgeblasen.

Im präparativen Maßstab konnten mehrere hundert Mikrogramm zufriedenstellend getrennt werden.

D Equilibrierung

Während der Equilibrierungsphase werden die im Röhrchengel aufgetrennten Proteine mit SDS negativ aufgeladen, der durch die Ampholine aufgebaute pH-Gradient zerstört und die Röhrchen somit für die anschließende SDS-PAGE (zweite Dimension) vorbereitet.

Lösungen:

Equilibrierungspuffer:	62,5 ml	1,5 M Tris / HCl pH 6,8
	50 ml	10% SDS
	0,39 g	DTT
	25 ml	Glycerin
	112,5 ml	aqua dest.

Die Gele wurden nach dem Ausblasen für 12 min in 5 ml Equilibrierungspuffer gelassen. Danach wurden sie entweder direkt für die zweite Dimension verwendet oder bis zu einem späteren Zeitpunkt bei -70°C eingefroren.

1.4.2.2 2. Dimension: SDS-PAGE

A Herstellung der Gele für die zweite Dimension

Geräte, Materialien und Reagenzien vgl. eindimensionale Gelelektrophorese 1.4.1.3.

Die Gele werden zwischen zwei ungleich große Glasplatten gegossen (15 cm x 17,5 cm; 17 cm x 17,5 cm). Durch das Einfügen eines einzelnen Spacers in die Mitte des Sammelgels entsteht ein Slot von etwa 3 mm Tiefe für den Molekulargewichtsmarker.

Procedere:

vgl. eindimensionale Gelelektrophorese

B Durchführung der Elektrophorese

Lösungen:

Agarosepuffer:	12,5 ml	1,5 MTris / HCl pH 6,8
	0,5 ml	10% SDS
	0,077 g	DTT
	5,0 ml	Glycerin
	0,5 g	Agarose
	q.s.	Bromphenolblau
	ad 50 ml	aqua dest.

Die fokussierten Röhrengelge werden mit erhitztem Agarosepuffer auf dem Sammelgel der SLAB-Gele fixiert. Dann wird der Spacer in der Mitte des Gels herausgezogen und der Marker aufgetragen. Die Gele werden dann so in die Elektrophoresekammer eingesetzt, daß die dickeren basischen Enden der Röhrengelge vom Überlauf der oberen Pufferkammer wegzeigen, um zu vermeiden, daß die fixierten Röhren durch Verwirbelung abgerissen werden.

Die Elektrophorese wird unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie im 1-dimensionalen Fall unter 1.3.1 beschrieben.

1.4.3. Proteindetektion

Nach der Elektrophorese müssen die Proteine im Gel lokalisiert werden. Man detektiert die Proteine meist als gefärbte Komplexe nach ihrer Reaktion mit Farbstoffen, Silbersalzen oder Fluoreszenzfarbstoffen. Neben diesen unspezifischen Färbemethoden, die direkt im Gel durchgeführt werden, können Proteine auch nach Transfer auf Trägermembranen unspezifisch bzw. spezifisch nachgewiesen werden. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich in ihrer Sensitivität.

1.4.3.1 Unspezifische Proteindetektion

A Proteindetektion im Gel

A1 Coomassie-Färbung

Das Prinzip der Färbung beruht auf einer unspezifischen Adsorption basischer Farbstoffe an Proteine. Sie eignet sich besonders für präparative Gele und größere analytische Proteinmengen (>1 µg).

Geräte:

Schüttler	(Heidolph)
Färbeschalen	

Reagenzien:

Methanol	(Riedel de Haen)
Essigsäure	(Roth)
Coomassie Brilliant Blue G	(Sigma)

Lösungen:

Fixierlösung:	50% Methanol 10% Essigsäure in aqua dest.
Färbelösung:	0,125% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G in Fixierlösung vor Anwendung filtrieren
Entfärbelösung:	30% Methanol 10% Essigsäure in aqua dest.

Procedere:

1. Gel für mindestens 30 min in Fixierlösung schwenken.
2. Gel wird über Nacht in Färbelösung gefärbt.
3. In der Entfärbelösung wird das Gel entwickelt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Lösung gegebenenfalls wechseln.

A2 Kolloidale Coomassie-Färbung, Roti-Blue

Diese Färbemethode verwendet den selben Farbstoff, wie unter A1. Durch kolloidale Färbung ist sie aber wesentlich sensitiver. Man sieht Proteinbanden <30 ng.

Geräte:

Schüttler	(Heidolph)
Färbeschalen	

Reagenzien:

Methanol	(Riedel de Haen)
Essigsäure	(Roth)
ortho-Phosphorsäure 85%	(Merck)
Roti-Blue-Färbelösung	(Roth)

Lösungen:

Fixierlösung:	1 ml o-Phosphorsäure 20 ml Methanol ad 100 ml aqua dest.
Färbelösung:	20% Methanol 20% Roti-Blue-Färbelösung ad 100 ml aqua dest.
Waschlösung	25% Methanol ad 100 ml aqua dest.

Procedere:

1. Gel 60 min in Fixierlösung auf dem Schüttler vorinkubieren.
2. Gel in Färbelösung überführen und 2-15 h unter Schütteln färben.
3. Gel in zweite Schale überführen und 5 min in Waschlösung auf dem Schüttler inkubieren, eventuell ausgefallene Farbstoffkomplexe durch ruckartige Bewegungen in Lösung bringen.

A3 Silber-Färbung nach Kluxen (pers. Mitteilung, 1989)

Eine bedeutend empfindlichere Methode als die Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung. Mit ihr lassen sich bis <1 ng Protein pro Bande nachweisen. Die Methode beruht auf der Fähigkeit von Aminosäureseitenketten, Ag^+ -Ionen zu komplexieren. Durch die Schaffung eines alkalischen Milieus kommt es zur Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber (bräunlicher Niederschlag).

Geräte:

vgl. Coomassie-Färbung

Reagenzien:

Methanol	(Merck)
Ethanol p.A.	(Roth)
Essigsäure	(Roth)
Abschwächer nach Farmer	(Tetenal)
Silbernitrat	(Sigma)
Natriumcarbonat, wasserfrei	(Merck)
Formaldehydlösung, 37%	(Merck)

Lösungen:

Fixierlösung 1:	40% Methanol 10% Essigsäure in aqua dest.
Fixierlösung 2:	10% Ethanol 15% Essigsäure in aqua dest.
Abschwächerlösung:	0,4 g in 100 ml aqua dest. (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)
Silbernitratlösung:	0,2 g AgNO_3 in 100 ml aqua dest.
Entwicklerlösung:	14,4 g Na_2CO_3 und 400 μl Formaldehydlösung in 500 ml aqua dest.
Stopplösung:	5% Essigsäure in aqua dest.

Procedere:

1. Gel 3-5 min in Fixierlösung 1 schwenken.
2. Gel 2-5 min in Fixierlösung 2 schwenken.
3. 3x mit 65°C aqua dest. für 1-2 min waschen.
4. Abschwächerlösung für 60 s.
5. 5-6 x mit 65°C aqua dest. für 1-2 min waschen.
6. 13 min abgedunkelt in Silbernitratlösung schwenken.
7. 90 s in aqua dest. (Raumtemperatur) waschen.

8. 30 s entwickeln, Lösung verwerfen und erneuern.
9. Sind die Proteinbanden in gewünschter Intensität sichtbar, Entwickler abgießen und die Reaktion mit Stopplösung abbrechen.
10. Nach 5 min durch aqua dest. austauschen.

Die gefärbten Gele werden sofort fotografiert und im Dunkeln gelagert.

B Proteindetektion nach Transfer auf Trägermembranen

Der Transfer der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgt aus dem Gel auf die Trägermembran durch elektrophoretische Elution im Naß-Verfahren. Der "Blot" wurde im sog. "Sandwichverfahren" zwischen Filterpapieren durchgeführt.

Die durch SDS negativ aufgeladenen Proteine wandern von der Kathode zur Anode und werden dabei durch eine Membran aus Nitrocellulose, PVDF oder Nylon aufgefangen. Anschließend können die Proteine unspezifisch bzw. spezifisch angefärbt werden.

Geräte:

Blotkammer mit Einsätzen	(BioRad)
Netzgerät	(Pharmacia)
Schüttler	(Heidolph)

Materialien:

Polyvinylidendifluorid-Membran	(Immobilon P, Millipore)
Filterpapier	(Blotting Papiere, Schleicher&Schüll, N GB002)
Schaumstoffkissen	

Reagenzien:

Methanol	(Riedel de Haen)
Tris	(ICN)
Glycin	(Roth)

Lösungen:

Blotpuffer:	25 mM	Tris
	0,192 M	Glycin
	20%	Methanol in aqua dest.

Procedere:

1. Immobilon Membran 1 min in Methanol, anschließend 15 min in aqua dest. Schwenken.
2. Das Gel wird luftblasenfrei auf die Blotmembran überführt und zwischen jeweils 3 Lagen Filterpapier und einem Schaumstoffkissen in einen Bloteinsatz geklemmt.
3. Das "Sandwich" wird in die mit Blotpuffer gefüllte Blotkammer eingehängt und zwar so, daß die Blotmembran der Anode zugewendet ist.
4. Blotten über Nacht bei 100 mA.

B1 Coomassie-Färbung**Reagenzien:**

Coomassie Brilliant Blue G	(Sigma)
Essigsäure	(Roth)

Lösungen:

Färbe- und Entfärbelösungen vgl. Coomassie-Färbung präparativer Gele

Der Blot wurde 1 min gefärbt und bis zur gewünschten Bandenintensität entfärbt.

1.4.3.2 Spezifische Proteindetektion

vgl. immunologischen Methoden "Western Blot"

1.4.4 Standards für die Elektrophorese**1.4.4.1 Coomassie-Gele**

"SDS-PAGE Molecular Weight Standards" (BioRad)

Um den im Gel aufgetrennten Proteinen entsprechende Molekulargewichte zuzuordnen, wird bei der SDS-PAGE ein „Marker“ aufgetragen. Er besteht aus einem Gemisch hochmolekularer oder niedermolekularer Proteine mit bekannter Größe. Für die Coomassie-Färbung wurde die Stammlösung 1:20 in reduzierendem Probenpuffer verdünnt, 10 min bei 96°C abgekocht und in Aliquots zu je 10 µl (=Menge für 1 Probenkammer im Gel) bei -20°C eingefroren.

Molekulargewichte:	200 000 D	Myosin
	116 250 D	β -Galaktosidase, E.coli
	97 400 D	Muskelphosphorylase
	66 200 D	Rinderserumalbumin
	42 699 D	Hühnereialbumin
	31 000 D	Rindercarboanhydrase
	21 500 D	Sojabohnentrypsininhibitor
	14 400 D	Hühnereilysozym

1.4.4.2 Silber-Gele

vgl. Coomassie-Gele, Verdünnung hier 1:100 in reduzierendem Probenpuffer

1.4.4.3 Blots

"Prestained SDS molecular weight markers SDS-7B" (Sigma)

Die Standardproteine sind hier mit einem blauen Farbstoff gekoppelt. Das Lyophilisat wurde nach Angaben von Sigma mit Harnstofflösung und Probenpuffer aufgelöst und in Aliquots zu 10 μ l bei -20°C eingefroren.

Molekulargewichte:	211 000 D	α -Macroglobulin
	119 000 D	β -Galaktosidase
	98 000 D	Fructose-6-phosphat-Kinase
	80 600 D	Pyruvat Kinase
	64 400 D	Fumarase
	44 600 D	Laktatdehydrogenase
	38 900 D	Triosephosphatisomerase

1.5 Immunologische Methoden

1.5.1 Gewinnung von Immunglobulinen aus dem Antiserum (Lindmark, R., 1983)

Für Contactinhibin-Rezeptor-Studien wurde im Kaninchen generiertes polyklonales Antiserum verwendet (Diplomarbeit, Hinz, D., 1993). Der Titer, mittels ELISA und gereinigter CiR-Fraktion bestimmt, beträgt 1:20000. Für Immunpräzipitation mit dem CiR werden jedoch reine IgG's benötigt. Diese wurden aus dem Antiserum isoliert. Immunglobuline der IgG-Klasse kann man durch Affinitätschromatographie isolieren. Man macht sich dabei zunutze, daß der Fc-Teil der Immunoglobine eine hohe Affinität zu einem Oberflächenantigen der Staphylokokken, dem Protein A, besitzt.

Geräte:

UV-Detektionseinheit mit 280 nm-Filter	(Pharmacia)
Schreiber	(Pharmacia)
End-over-end-Schüttler	
Zentrifuge	(Eppendorf)
Druckdialysekammer mit N ₂ -Begasung	(Amicon)

Materialien:

Säule	(Biorad)
Protein A-Sepharose CL-4B	(Sigma)
Papain Sepharose	(Sigma)
Dialyseschlauch, Ausschluß-MG 10000 Da	(Serva)
Membranfilter, Ausschluß-MG 10000 Da	(PY 10, Amicon)

Reagenzien:

Tris	(ICN)
Salzsäure	(Merck)
Glycin	(Roth)
Natriumchlorid	(Roth)
Natriumazid	(Sigma)
Cystein	(Sigma)
EDTA	(Calbiochem)

Lösungen:

PBS	
Waschpuffer:	0,02% (m/v) NaN_3 /PBS
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin / HCl pH 2,3 1 M NaCl
Neutralisierungspuffer:	1 M Tris / HCl pH 9,0

Procedere:

1. Protein-A-Sepharose in PBS quellen und 2-3 ml in die Säule packen. Säule mit ca. 50 ml PBS gut spülen.
2. UV-Detektor und Schreiber anschließen. Säule weiterhin spülen, bis eine konstante Basislinie erreicht ist.
3. Zwischenzeitlich 2,5 ml Antiserum für den Säulenlauf vorbereiten:
Komplement inaktivieren:
→ 30 min bei 56°C
→ 20 min bei 13000 Upm zentrifugieren
4. Überstand mit PBS 1:3 verdünnen und auf die Säule geben.
5. Mit Waschpuffer spülen, bis die nicht gebundenen Serumproteine vollständig eluiert sind und die Basislinie wieder erreicht ist.
6. 20 ml Elutionspuffer aufgeben.
7. Eluat zu 1-ml-Portionen in vorgelegten 100 µl Neutralisationspuffer auffangen.
8. Eluate vereinigen und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysieren. Anschließend, wenn notwendig, in der Druckdialysekammer auf eine Konzentration von 1 mg/ml einengen (Feinabstimmung über Proteinquantifizierung, s. BCA-Test).

Die IgG-Fraktionen werden bei -20°C gelagert.

Die Ausbeute pro ml Antiserum beträgt ca. 7 mg.

1.5.2 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine, die durch Gelelektrophorese getrennt wurden, auf eine Membran transferiert und dort mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Der Immunkomplex wird mit Hilfe eines Enzymkonjugates sichtbar gemacht. Zur Verstärkung des Signals erfolgt die Detektion indirekt über markierte "Zweitantikörper", die gegen den im Immunkomplex gebundenen "Erstantikörper" gerichtet sind. Bei Enzymkonjugaten, wie Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase, erfolgt die Visualisierung durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion.

Dabei wird ein wasserlösliches, farbloses Substrat zu einem wasserunlöslichen, gefärbten Produkt umgesetzt. Das Produkt fällt sofort aus und markiert die Lage des Antigens auf der Membran. Hier wurde die Detektion mittels X-Phosphat / NBT angewendet. Die Proteine werden mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (X-Phosphat) zu einem Indigofarbstoff durch die alkalische Phosphatase umgesetzt. Die entstehenden Reduktionsäquivalente aus dem Indoxyl reduzieren das Tetrazoliumsalz NBT zum purpurfarbenen Diformazan. Sichtbar wird eine violette Mischfarbe aus beiden Farbstoffen. Die Sensitivität des Western-Blots liegt im Bereich von 10 bis 100 Femtomol, was bei einem Molekulargewicht von 50 kD ca. 0,5 bis 5 ng entspricht.

Geräte:

Schüttler (Heidolph)

Reagenzien:

Tris	(ICN)
Salzsäure	(Merck)
Natriumchlorid	(Roth)
Magnesiumchlorid	(Merck)
Tween 20	(Sigma)
BSA	(Roth)
N,N-Dimethylformamid, DMF	(Merck)
Alkalische Phosphatase gekoppelter	
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, X-Phosphat	(Boehringer Ingelheim)
4-Nitrotetrazoliumblausäure, NBT	(Boehringer Ingelheim)

Lösungen:

TBS = Tris buffered saline:	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,5
Blocklösung:	I. 5% BSA / TBS / 0,1% Tween 20 II. 5% Milchpulver / TBS / 0,05% Tween 20
Waschlösung:	I. 0,1% BSA / TBS / 0,1% Tween 20 II. TBS / 0,05% Tween 20
Entwicklungspuffer:	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ , pH 9,5
X-Phosphatlösung:	50 mg X-Phosphat in 1 ml DMF
NBT-Lösung:	75 mg NBT in 1 ml 70% (v/v) DMF / H ₂ O
Entwicklungslösung:	37,5 µl X-Phosphatlösung 50 µl NBT-Lösung in 10 ml Entwicklungspuffer

Procedere:

1. Blot 1 h in Blocklösung schwenken.
2. Spezifisches Antiserum in ausreichender Verdünnung (etwa 1:2000 bis 1:500) in Waschlösung aufgeben, 1,5 h inkubieren.
3. Blot in Waschlösung waschen: 3 x schnell, 3 x 10 min.
4. Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper 1:3000 verdünnt in Waschlösung zugeben, 1,5 h inkubieren.
5. Blot waschen wie unter 3.
6. 1 x kurz in TBS schwenken.
7. Entwicklerlösung aufgeben, bis zum Sichtbarwerden der Banden im Dunkeln unbewegt inkubieren.
8. Blot mit aqua dest. waschen und trocknen.

Erstantikörper	Spezies	eingesetzte Konzentration	Blocklösung/ Waschlösung	Firma
α -Contactinhibin-Rezeptor	Kaninchen	1:5000	I	
α -PKC α	Maus	1:50	II	UBI
α -PKC β I	Kaninchen	1:2000	II	P.P.
α -PKC β II	Kaninchen	1:2000	I	Santa Cruz
α -PKC γ	Kaninchen	1:2000	II	Santa Cruz
α -PKC δ	Kaninchen	1:3000	II	Santa Cruz
α -PKC ϵ	Kaninchen	1:2000	II	Santa Cruz
α -PKC η	Kaninchen	1:2000	II	Santa Cruz
α -PKC θ	Kaninchen	1:2000	II	Santa Cruz
α -PKC μ	Kaninchen	1:200	II	Santa Cruz
α -PKC ι	Maus	1:2500	II	Transduction Laboratories
α -PKC ζ	Kaninchen	1:2000	II	P.P.
α -Retinoblastom	Kaninchen	1:2000	II	Santa Cruz

Zweitantikörper	Konzentration	Firma
α -Kaninchen AP-konj.	1:3000	Cedarlane
α -Maus AP-konj.	1:3000	Cedarlane

1.5.3 Immunfluoreszenzen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine sehr empfindliche Methode, um bestimmte Proteine oder Strukturen in der Zelle nachzuweisen. Dabei wird ein Antikörper gegen das zu untersuchende Protein eingesetzt. Dieser Immunkomplex wird mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs sichtbar gemacht. Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dabei werden die Elektronen des Moleküls vom Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Durch spontane Emission eines Photons kann das Molekül wieder in einen tiefergelegenen Elektronenzustand gelangen. Bei gleicher Spinmultiplizität von Ausgangs- und Endzustand spricht man von Fluoreszenz. Die dabei emittierte Strahlung liegt bei einer längeren Wellenlänge als die absorbierte. Um den Farbeffekt zu verstärken, erfolgt die Detektion der Bindung indirekt über einen zweiten Antikörper, der an den ersten bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Farbreaktion kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes beobachtet werden. Als Lichtquelle dient eine Hg-Dampflampe. Ein Filter läßt nur Licht der bestimmten Wellenlänge passieren, die den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Ein zweiter nachgeschalteter Filter blockiert dieselbe Wellenlänge, so daß nur das durch den Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht passieren kann.

Vor der Färbung müssen die Zellen fixiert, d.h. immobilisiert werden. Organische Lösungsmittel oder Aldehyde permeabilisieren die Zellen für den Antikörper oder Farbstoffe und bilden kovalente Bindungen mit freien Aminogruppen der Proteine und vernetzen so die Makromoleküle.

Material:

- Deckgläschen
- Objektträger
- Glasschale
- Pinzette
- Inkubationskammer

Reagenzien:

Ethanol p.a.	(Roth)
BSA	(Roth)
Mowiol 4-88	(Hoechst)
Glycerin	(Sigma)
Tris	(ICN)
Aceton	(Roth)

Lösungen:

PBS

Blocklösung:

5% BSA in PBS

Eindeckelmedium:

5 g Mowiol 4-88

6 g Glycerin

6 ml aqua dest., 1 h RT quellen lassen

12 ml 0,2 M Tris / HCl pH 8,5

im Wasserbad ca. 15 min kochen

3000 upm 15 min zentrifugieren

längere Lagerung lichtgeschützt bei -20°C

1.5.3.1 Einfache Immunfluoreszenz

Procedere:

1. In einer Petrischale werden 2 Deckgläschen für 10 min mit 70% Ethanol desinfiziert.
2. Dann werden sie 3 x mit PBS und 1 x mit Medium gewaschen.
3. Die Zellen werden auf dem desinfizierten Deckgläschen für 24 h kultiviert.
4. Die Zellen werden 3 x mit PBS gewaschen.
5. Deckgläschen werden mit einer Pinzette in eine Glasschale überführt.
6. Dort werden die Zellen für 5 min mit Aceton -20°C fixiert und permeabilisiert.
7. Die luftgetrockneten Deckgläschen werden 3 x kurz mit PBS gewaschen und in eine feuchte Kammer überführt.
8. Der Blockschritt erfolgt mit 5% BSA in PBS für 20 min.
9. Die fixierten Zellen werden mit dem 1. Antikörper in PBS für 90 min inkubiert.
10. 3 x kurz, 3 x 5 min mit PBS waschen.
11. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper in PBS erfolgt für 60 min.
12. 3 x kurz, 3 x 5 min mit PBS waschen.
13. Die Deckgläschen werden noch einmal in PBS geschwenkt, bevor sie mit nach unten gerichtetem Zellrasen auf einem Objektträger im Eindeckelmedium durch kurzes Andrücken fixiert werden.
14. Nach kurzem Trocknen wird das Deckgläschen rundherum mit Lack luftdicht versiegelt.

1.5.3.2 Doppelimmunfluoreszenz

Procedere:

- 1.-8. vgl. 1.5.4.1 Einfache Immunfluoreszenz
9. Die fixierten Zellen werden mit dem 1. Erstantikörper in PBS für 90 min inkubiert.
10. 3x kurz, 3 x 5 min mit PBS waschen.
11. Es erfolgt die Inkubation mit dem 2. Erstantikörper für 90 min.
12. 3 x kurz, 3 x 5 min mit PBS waschen.
13. 60 min mit einem Gemisch aus beiden Zweitantikörpern inkubieren.
14. 3 x kurz, 3 x 5 min mit PBS waschen.
15. Die Deckgläschen werden 1 x in PBS geschwenkt, bevor sie mit nach unten gerichtetem Zellrasen auf einem Objektträger im Eindeckelmedium durch kurzes Andrücken fixiert werden.
16. Nach kurzem Trocknen wird das Deckgläschen rundherum mit Lack luftdicht versiegelt.

Die rote und grüne Immunfluoreszenz wurde durch Wechsel der Anregungswellenlänge von 550-480 nm detektiert.

verwendete Antikörper

Erstantikörper	Spezies	Konzentration	Firma
α -Contactinhibin-Rezeptor III/V	Kaninchen	1:30	
α -Contactinhibin-Rezeptor IV/5	Kaninchen	1:60	
α -PKC α	Maus	1:50	UBI
α -h-PKC δ	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
α -m-PKC δ	Kaninchen	1:100	Santa Cruz
α -E-Cadherin	Maus	1:200	Transduction Laboratories
α - γ -Catenin	Maus	1:200	Transduction Laboratories

Zweitantikörper	Konzentration	Firma
α -Kaninchen CY3-konj.	1:300	Jackson Immuno Research
α -Kaninchen Alexa 488-konj.	1:300	Molecular Probes
α -Maus CY3-konj.	1:300	Jackson Immuno Research

Zweitantikörper	Spezifität	Konzentration	Firma
Phalloidin FITC-konj.	F-Aktin	1:2	Sigma
RCA ₁₂₀ FITC-konj.	Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc	1:15	Sigma

1.6 Molekularbiologische Methoden

1.6.1 Agarose-Gelelektrophorese für Nukleinsäuren

Agarose ist ein Polysaccharid, das sich beim Aufkochen in Wasser löst und beim Abkühlen geliert. Dabei bildet sich eine Matrix aus Doppelhelices, die sich in Gruppen seitlich zu dicken Fäden zusammenlagern. Die Porengröße entspricht 150 nm bei 1%iger (m/v) bis 500 nm bei 0,16%iger (m/v) Agarose. Die Gelelektrophorese kann unter nativen oder denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Native Gele werden hier zur Auftrennung von DNA und zur Analyse von denaturierten RNA-Proben verwendet. Zur Auftrennung der RNA für eine anschließende Northern-Blot-Analyse werden denaturierende Gele vorgezogen, da die RNA unter denaturierenden Bedingungen stabiler ist. Während der Elektrophorese liegen die Phosphatgruppen der aufzutrennenden Nukleinsäuren ionisiert vor und bewegen sich im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode. Dabei hängt die Beweglichkeit von DNA-Fragmenten nicht ausschließlich von ihrer Größe, sondern auch von ihrer Konformation ab.

1.6.1.1 Native Agarosegele

Geräte:

Netzgerät
Mikrowelle
Eagle Eye

Material:

Gelkammer
Probenkämme

Reagenzien:

Tris	(ICN)
Eisessig	(BDH)
EDTA	(Serva)
Glycerol	(Sigma)
Agarose	(Life Technologies)
Bromphenolblau	(Serva)
DEPC	(Roth)

Lösungen:

50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 aqua dest. ad 1 l (autoklavieren)
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml (Roth)
Elektrophoresepuffer:	20 ml 50 x TAE-Puffer aqua dest. ad 1 l
1%iges Agarose Gel:	1 g Agarose 4 µl Ethidiumbromid-Stammlösung Elektrophoresepuffer ad 100 ml
6 x DNA-Probenpuffer:	1 mM EDTA, pH 8,0 50% (v/v) Glycerol Bromphenolblau q.s. (bei 4°C lagern)
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC in aqua dest. (über Nacht rühren, autoklavieren)

Für die Durchführung der Gelelektrophorese mit RNA-Proben werden alle verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem aqua dest. angesetzt.

Herstellung des Gels:

1. 100 ml der 1%igen Agarose-Lösung in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle vorsichtig aufkochen, bis die Agarose gelöst ist.
2. Nach Abkühlung der Lösung auf 50-60°C werden Undichtigkeiten der Gelkammer mit einer dünnen Agaroseschicht abgedichtet.
3. Der Probenkamm wird ca. 1 cm entfernt vom oberen Rand der Gelkammer eingesetzt.
4. Die Agarose-Lösung wird luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen, bis die Taschenformer fast vollständig eintauchen.
5. Nach ca. 30 min ist die Agarose erstarrt. Der Probenkamm und die Seitenbegrenzungen können nun vorsichtig herausgezogen werden.

Zur Auftrennung von RNA-Proben wird die Elektrophoresekammer vor dem Gießen des Gels gründlich mit Detergenz gereinigt und mit 70% Ethanol gespült. Dann wird die Kammer 15 min mit 3%iger H₂O₂-Lösung behandelt. Das H₂O₂ wird anschließend mit DEPC-behandeltem aqua dest. weggespült.

Probenvorbereitung:

Die DNA-Proben werden mit 6 x Probenpuffer so versetzt, daß dieser 1:6 verdünnt wird. RNA-Proben werden in dem gleichen Puffer aufgenommen, aber vor der Gelelektrophorese nochmal 10 min bei 65°C abgekocht.

Durchführung der Elektrophorese:

1. Das Agarosegel wird mit Elektrophoresepuffer überschichtet.
2. Die Proben werden vorsichtig in die Taschen des Agarosegels pipettiert.
3. Die Elektroden werden in die Elektrophoreselösung ober- und unterhalb des Gels eingetaucht.
4. Zum Einlaufen der Probe wird eine Spannung von 40 V angelegt.
5. Sind die Proben vollständig eingelaufen wird die Spannung auf 80 V erhöht.
6. Die Elektrophorese ist beendet, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau ca. $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen hat.

Das im Gel befindliche Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA-Fragmente. Ethidiumbromid absorbiert UV-Licht der Wellenlänge 302 oder 366 nm und emittiert sichtbares Licht im Bereich von 590 nm, so daß das Gel fotografiert werden kann (Sambrook et al., 1989).

1.6.1.2 Denaturierende Agarosegele

Reagenzien:

Agarose	(Life Technologies)
MOPS	(Biomol)
Formaldehyd	(Merck)
Ethidiumbromid	(Roth)
EDTA	(Calbiochem)
Natriumacetat	(Merck)

Lösungen:

1% Agarose-Gel:	4 g Agarose
	300 ml aqua dest.
Elektrophoresepuffer (10 x MOPS)	0,2 M MOPS
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA, pH 7
2 x RNA-Probenpuffer	250 µl deionisiertes Formaldehyd
	83 µl Formaldehyd
	50 µl 10 x MOPS
	1-2 µl Ethidiumbromid

Herstellung des Gels:

1. 300 ml der 1%-Agarose-Lösung in der Mikrowelle kurz aufkochen, bis sich die Agarose gelöst hat, und dann abkühlen.
2. Nach Erreichen von ca. 67°C werden 40 ml 10 x MOPS und 32 ml Formaldehyd hinzugegeben.
3. Das Gel wird gegossen wie für native Gele beschrieben.

Probenvorbereitung:

1. RNA-Proben in TE-Puffer werden mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer versetzt.
2. Nach 5 min Erhitzen auf 65°C werden sie auf Eis abgekühlt.

Durchführung der Gelelektrophorese:

Die Elektrophorese wird durchgeführt wie oben beschrieben.

1.6.1.3 Standards für die Elektrophorese

A DNA-Standard

„Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker, 3“ (MBI Fermentas)

λ -DNA wurde mit *Eco*R I und *Hind* III verdaut. Der Marker enthält 13 diskrete Fragmente der unten angegebenen Länge.

Molekulargewichte:	21226 bp
	5148 bp
	4973 bp
	4268 bp
	3530 bp
	2027 bp
	1904 bp
	1584 bp
	1375 bp
	947 bp
	831 bp
	564 bp

Die DNA wird in dem mitgelieferten 6 x Probenpuffer aufgenommen in einer Konzentration von 20 ng/ μ l.

B RNA-Standard

"0,24 - 9,5 kb RNA Ladder", (Life Technologies)

Der Marker besteht aus sechs synthetischen Poly(A)-tailed RNAs.

Molekulargewichte:	9490 bp
	7460 bp
	4400 bp
	2370 bp
	1350 bp
	240 bp

1.6.2 Northern Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA nach Molekulargewicht in Agarosegelen werden die Nukleinsäuren zur Hybridisierungsreaktion auf eine Nylonmembran transferiert und dort fixiert.

Materialien:

3MM-Filterpapier	(Whatman)
Hybond N Membran	(Amersham)
UV-Crosslinker	(Stratagene)

Lösungen:

10 x SSC	1,5 M NaCl
	0,15 M Natriumcitrat, pH 7
	in aqua dest.

Procedere

1. Das Gel mit der aufgetrennten RNA wird kurz unter UV-Licht fotografiert, um eine gleichmäßige Beladung des Gels zu überprüfen.
2. Danach wird das Gel einmal mit aqua dest. und zweimal mit 10 x SSC für je 30 min gewaschen.
3. 1 Lage Filterpapier wird mit 10 x SSC befeuchtet und so auf einen Kasten gelegt, daß ihre beiden Enden in ein mit 10 x SSC gefülltes Pufferreservoir tauchen.
4. Dann werden 3 Lagen befeuchtetes Filterpapier in der Größe des Gels in die Mitte des Kastens gelegt.
5. Das Gel wird darauf positioniert. Die Ränder des Gels werden mit Folie abgedeckt, damit der Puffertransfer über das Gel möglich ist.
6. Die Membran wird in Gelgröße zurechtgeschnitten und luftblasenfrei auf dem Gel positioniert.

7. Auf die Membran werden 3 gleichgroße Filterpapiere gelegt.
8. Darauf kommen 2 Stapel Filterpapier und eine Glasplatte. Das ganze wird mit einem Gewicht beschwert.
9. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht.

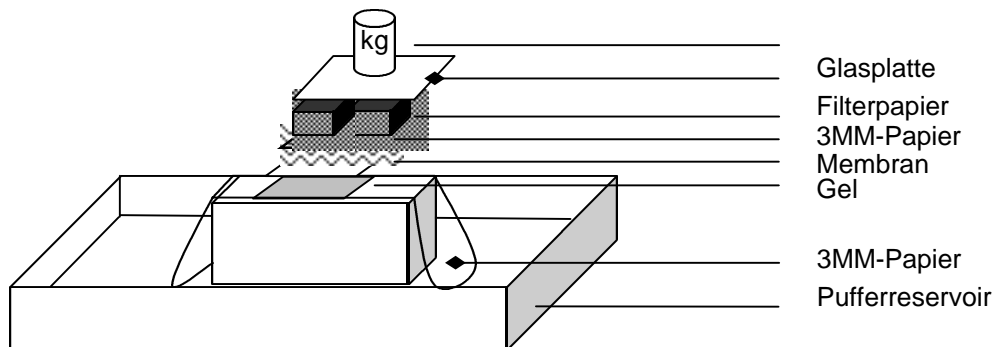


Abb. 1.6.2.1 Nothern-Blot-Aufbau

1.6.3 Hybridisierung

Reagenzien:

Prime-It II Random Primer Labeling Kit: (Stratagene)

Random 9-mer primer:	Pufferlösung	mit	Random-Oligodeoxy-
Ribonukleotiden	(27OD units/ml)		
5 x dATP-Puffer:	0,1 mM dCTP, dGTP, dTTP		
Exo(-)Klenow-gepufferte-	(5 U/μl)		
Glycerol-Lösung	(Sigma)		
Stop mix	0,5 M EDTA, pH 8,0		
[α- ³² P]dATP	(NEN)		

Lösungen:

Hybridisierungspuffer nach Church:	0,5 M	Natriumphosphat, pH 7,2
	7% (m/v)	SDS
	1% (m/v)	BSA
	1 mM	EDTA, pH 8

Procedere:

1. Nach dem Transfer wird die Membran luftgetrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung mit $2 \times 0,12$ Joule kovalent an die Membran gebunden.
2. Die Membran wird luftblasenfrei an die Innenseite einer Hybridisierungsflasche gelegt und im Hybridisierungssofen 2 h bei 65°C unter Drehen prähybridisiert.
3. Währenddessen wird die DNA-Sonde mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ markiert.

Markierung der DNA-Sonden:

1. 25 ng der DNA-Sonde werden mit aqua dest. auf 25 μl aufgefüllt.
2. Dann werden 10 μl random primer hinzugegeben und das Gemisch 5 min im Wasserbad abgekocht.
3. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung kurz abzentrifugiert.
4. Es werden dann 10 μl 5 x Puffer, 5 μl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ und 1 μl Exo(-)Klenow dazugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert.
5. Die Reaktion wird gestoppt durch 2 μl stop mix.
6. Die markierte Sonde wird über eine Säule von der restlichen Radioaktivität gereinigt.
7. Die Säule wird durch einen Durchlauf mit TE-Puffer äquilibriert.
8. Die Sonde wird auf 100 μl mit TE-Puffer aufgefüllt und vorsichtig auf die Säule gegeben.
9. Nachdem die Probe eingesickert ist, wird mit 300 μl TE-Puffer gespült.
10. Zur Elution werden weitere 400 μl auf die Säule gebracht. In dem Durchlauf befindet sich die markierte DNA-Sonde.
11. Die aufgefangene Fraktion wird 5 min im Wasserbad abgekocht und auf Eis abgekühlt.
12. Dann wird die Sonde in ca. 15 ml Hybridisierungspuffer zu der prähybridisierten Membran gegeben.
13. Die Membran wird über Nacht mit der markierten Sonde bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert.
14. Nach der Hybridisierung wird die Membran mit 1% SDS und $0,1 \times \text{SSC}$ 2 x 20 min gewaschen.
15. Die Membran wird dann solange auf einen Phosphoimaging Screen exponiert bis die gemessenen Signale stark genug sind.

1.6.4 Transformation von E.coli

1.6.4.1 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen nach Hanahan

Materialien:

Fernbachkolben	(Schott)
Spektrophotometer	(Biochrom Ultrospec 4051, LKB)

Reagenzien:

Hefeextrakt	(Life Technologies)
Calciumchlorid	(Merck)
Kaliumchlorid	(Roth)
Magnesiumchlorid	(Merck)
Magnesiumsulfat	(Merck)
Natriumchlorid	(Roth)
Pepton140	(Life Technologies)
PIPES	(Sigma)
flüssiger Stickstoff	(Linde)

Lösungen:

SOB-Medium:	2% Pepton140
	0,5% Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	in aqua dest., (dampfautoklaviert)
TB-Puffer:	10 mM PIPES
	15 mM CaCl ₂
	250mM KCl
	in aqua dest., auf pH 6,7 mit KOH einstellen
	55 mM MnCl ₂ zugeben

Procedere:

1. C600-Zellen auf eine LB-Platte ausstreichen und über Nacht bei 37°C inkubieren.
2. 10 große Kolonien (2-3 mm Durchmesser) werden isoliert und damit 250 ml SOB-Medium in einen Fernbachkolben angeimpft.
3. Die Zellen werden ca. 4 h unter kräftigem Schütteln (250 rpm) bei 37°C kultiviert, bis sie bei der Trübungsmessung ein A₆₀₀ von 0,6 erreicht haben.
4. Zur Trübungsmessung wird in regelmäßigen Abständen 1 ml der Kultur entnommen und deren Absorption im Spektrophotometer gegen reines SOB-Medium als Referenz bei der Wellenlänge 600 nm bestimmt.
5. Zellen bei 4°C 10 min bei 2500 x g abzentrifugieren.
6. Das Pellet wird in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

7. Zentrifugationsschritt wiederholen.
8. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. DMSO wird bis zu einer Endkonzentration von 7% langsam hinzugegeben.
9. Nach Inkubation der Zellen für 10 min auf Eis werden sie in 0,2- oder 0,5-ml-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Sie sind so für mehrere Monate haltbar.

1.6.4.2 Transformation kompetenter E.coli-Zellen

Procedere:

1. Kompetente C600 aus 1.6.4.1 werden auf Eis aufgetaut.
2. 0,1-1 μg supercoiled Plasmid-DNA in weniger als 10 μl im Reaktionsgefäß vorlegen und 100 μl kompetente Bakterien zugeben.
3. Durch Antippen vermischen und 30 min auf Eis inkubieren.
4. Der Transformationsansatz wird bei 42°C für 45 s inkubiert und danach 90 s auf Eis abgekühlt.
5. Anschließend werden die Transformationsansätze 1 h bei 37°C auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert.
7. Je 100 μl der Bakterien werden dann auf einer LB-Selektionsplatte ausplattiert. Die Bakterien wachsen Ü/N bei 37°C .

1.6.4.3 Glycerolstocks

Um jederzeit Bakterien zur Verfügung zu haben, die bereits mit einem Plasmid transformiert wurden, wurden die Bakterien eingefroren.

Lösungen:

Glycerol 87%: Glycerol (99%) mit aqua dest. auf 87% verdünnen, dampfautoklavieren

Procedere:

1. Frische Bakterienkultur in 3 ml LB-Medium über Nacht ansetzen.
2. 828 μl der gut resuspendierten Bakterienkultur mit je 172 μl 87% Glycerol gut vermischen und sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren.
3. Stocks werden bei -80°C aufbewahrt.

1.6.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Um größere Mengen an Plasmid-DNA (z.B. zur Transfektion von Säugerzellen) zu erhalten, werden zunächst Bakterien, die mit dem jeweiligen Plasmid transfiziert wurden, in großen Kulturen gezüchtet und anschließend durch Lyse der Bakterien die Plasmid-DNA isoliert und aufgereinigt. Verunreinigung der DNA mit Endotoxinen, (Lipopolysaccharide, LPS) aus der Bakterienmembran können die Transfektionseffizienz stark herabsetzen. Um Endotoxin-freie DNA zu erhalten, wird zur Isolierung der EndoFree Plasmid Kit (Qiagen) benutzt.

Materialien:

EndoFree Plasmid Kit (Qiagen)
QIAfilter Patronen
QIAGEN-tip 500 (Anionenaustauscher-Säule)

Lösungen:

LB-Medium:	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1000 ml aqua dest., dampfautoklavieren
LB-Agar:	15 g Agar ad 1000 ml LB-Medium, dampfautoklavieren
Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in aqua dest.
Puffer P1 (Resuspendierungspuffer):	50 mM Tris / HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A (bei 4°C lagern)
Puffer P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH 1% (v/v) SDS
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer):	3 M KOAc, pH 5,5
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer):	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0
Puffer QC (Waschpuffer):	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
Puffer QN (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl 50 mM MOPS, pH 8,5 15% Isopropanol
TE-Puffer	10 mM Tris / HCl pH 8,0 1 mM EDTA

Puffer ER	
Isopropanol	(Mallinckrodt)
Ethanol p.a.	(Roth)
Ampicillin	(Roth)

Procedere:

1. 3 ml LB-Selektiv-Medium wird mit einer einzelnen C600 Kolonie, die mit dem jeweiligen Plasmid transfiziert wurde, von einer frischen selektierten Agarplatte angeimpft und ca. 8 h bei 37°C unter Schütteln (~300 rpm) inkubiert.
2. 50-100 µl dieser Kultur in 100 ml LB-Selektiv-Medium verdünnen und 12-16 h bei 37°C unter Schütteln (~300 rpm) inkubieren.
3. Bakterien werden bei 3000 x g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand wird vollständig abgegossen.
4. Das Bakterienpellet wird in 10 ml Puffer P1 sorgfältig resuspendiert durch Vortexen.
5. Es werden 10 ml Puffer P2 zugegeben, und durch fünfmaliges Invertieren werden die Puffer vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Dadurch werden die Bakterien lysiert und ihre Zellbestandteile denaturiert.
6. Währenddessen wird die QIAfilter-Patrone vorbereitet. Dazu wird der Auslauf der Patrone mit einer Kappe verschlossen und die Patrone kopfüber in ein 50 ml Röhrchen gestellt.
7. Zu dem Bakterienlysat werden 10 ml gekühlter Puffer P3 zugegeben und durch wiederholtes Invertieren vermischt. Dabei präzipitieren die genomische DNA, Proteine, Zelltrümmer und SDS. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert und bleibt in Lösung. Das Lysat wird sofort in die QIAfilter-Patrone überführt und inkubiert dort für 10 min. Nach dieser Zeit schwimmt das Präzipitat auf der Lösung.
8. Die Verschlusskappe wird nun entfernt und das Lysat mit Hilfe eines Stempels durch einen Filter aus der Patrone gedrückt und in dem 50-ml-Röhrchen aufgefangen.
9. Zu dem gefilterten Lysat werden 2,5 ml Puffer ER gegeben, um im nächsten Schritt die Bindung von Endotoxin an die Anionenaustauscher-Säule zu verhindern. Man inkubiert für 30 min auf Eis.
10. Die Anionenaustauscher-Säule (Quiagen-tip 500) wird mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Es wird gewartet, bis der Puffer durch Gravitation aus der Säule getropft ist.
11. Das Bakterienlysat auf die Säule auftragen und durchtropfen lassen.
12. Die Säule wird mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen, um Kontaminationen zu entfernen.
13. Die gereinigte Plasmid-DNA wird mit 15 ml Puffer QN von der Säule eluiert.
14. Aus dem Eluat wird die DNA durch Zugabe von 10,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol präzipitiert und sofort bei 15000 x g 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Dann den Überstand vorsichtig abgießen.
15. Das Pellet wird mit 5 ml endotoxinfreiem 70% Ethanol gewaschen und bei 15000 x g 10 min zentrifugiert, Überstand abgießen.
16. Das Pellet wird ca. 10 min an der Luft getrocknet und in ca. 200 µl TE-Puffer gelöst.

1.6.6 Restriktionsverdau

Um zu kontrollieren, ob das richtige Plasmid aus den Bakterien aufgereinigt wurde, wurde die Plasmid-DNA durch eine Restriktionsendonuclease linearisiert oder mehrmals gespalten. Nach Auftrennung der gespaltenen DNA-Fragmente in einem nativen Agarosegel konnte durch Bestimmung ihrer Größe die Richtigkeit überprüft werden.

Reagenzien:

EcoRI	(Life Technologies)
Reaktionspuffer	(Life Technologies)

Procedere:

1. 0,3 µl isolierte Plasmid-DNA wird mit 0,3 µl Restriktionsenzym und 1 µl des Reaktionspuffers versetzt.
2. Dann wird mit aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt.
3. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 37°C inkubiert.
4. Die Reaktion wird abgestoppt durch 2 µl DNA-Probenpuffer.
5. Die gesamte Probe wird zur Analyse in einem nativen Agarosegel aufgetrennt.

1.6.7 RNA-Isolierung

Reagenzien:

Chloroform	(Roth)
Isopropanol	(Mallinckrodt)
Ethanol	(Roth)
DEPC	(Roth)

Lösungen:

RNAWIZ RNA Isolation Reagent	(Ambion)
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC in aqua dest. (über Nacht rühren, autoklavieren)

Procedere:

1. 10^7 Zellen mit je 1 ml RNAWIZ RNA Isolation Reagenz lysieren, gut resuspendieren.
2. Die viskose Lösung inkubiert 5 min bei RT.
3. Zur Extraktion mit 0,2 ml Chloroform 20 s mischen und wieder 10 min bei RT inkubieren.
4. Bei 4°C mit 10000 x g für 15 min abzentrifugieren.
5. Die obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein RNase freies cap überführen.
6. Mit 0,5 ml DEPC-H₂O gut mischen.
7. Fällung der RNA mit 1 ml Isopropanol bei RT für 10 min.
8. Das Pellet wird bei 4°C mit 10000 x g für 15 min abzentrifugiert.
9. Überstand vorsichtig abkippen.
10. Pellet mit kaltem 75% Ethanol waschen.
11. Das Pellet wird bei 4°C mit 10000 x g für 15 min abzentrifugiert.
12. Überstand vorsichtig abgießen und Pellet 10 min lufttrocknen.
13. Die RNA wird in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch Auftragen eines Aliquots auf ein natives Agarosegel bestimmt.

1.6.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren**Geräte:**

UV-Photometer

Material:

Quarzküvette (Schott)

Lösungen:

TE-Puffer

Procedere:

1. 5 µl DNA oder RNA-Lösung werden mit TE-Puffer auf 1 ml aufgefüllt.
2. Der Leerwert besteht aus 1 ml TE-Puffer.
3. Die optische Dichte (OD) der Proben wird bei 260 und 280 nm gemessen.

OD 260 = 1	entspricht	50 µg/ml	doppelsträngige DNA
		40 µg/ml	einzelsträngige DNA / RNA

Das berechnete Verhältnis 260/280 muß zwischen 1,8-2,0 liegen. Ein kleinerer Wert deutet auf Proteinkontaminationen hin.

1.6.9 Transfektion von Säugerzellen

Transfektion mit kationischen Liposomen

Kationische Liposomen bilden mit Plasmid-DNA einen Komplex, der in die Zellen aufgenommen wird. Die Zellen müssen sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.

Reagenzien:

Transfektionsreagenz Roti[®]-Fect (Roth)

Procedere:

1. 5×10^5 Zellen / 35-mm-Schale auf Glasplättchen in DMEM / 10% FCS aussäen und 24 h kultivieren.
2. Die DNA-Lösung und das Transfektionsreagenz werden auf Raumtemperatur gebracht.
3. 3 µg DNA und 25 µl Roti-Fect werden jeweils auf 60 µl mit DMEM ohne Serum und Antibiotika aufgefüllt.
4. Die beiden Komponenten werden vereinigt und bei RT 40 min inkubiert.
5. Das Medium wird von den kultivierten Zellen abgesaugt und die Zellen werden 2 x mit temperiertem PBS gewaschen.
6. Die Kulturschale wird mit 0,8 ml DMEM / 10% FCS ohne Antibiotika gefüllt.
7. Der DANN / Lipid-Komplex wird zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt.
8. Nach 6 h wird mit 1,2 ml vollständigem Medium aufgefüllt.
9. Die Zellen werden für weitere 15-20 h im CO₂-Inkubator inkubiert.
10. Am nächsten Tag wird das Transfektionsmedium durch frisches ersetzt.
11. 48 h nach der Transfektion kann das geplante Experiment durchgeführt werden.

Bei stabiler Transfektion werden die Zellen nach 24 h semikonfluent gesplittet und in Selektionsmedium (Geneticin, 0,5 mg/ml, (Life Technologies)) kultiviert, bis sich vereinzelte Kolonien gebildet haben. Diese werden dann mit einer sterilen Pipettenspitze isoliert und zur weiteren Kultivierung vereinzelt in eine neue Schale überführt.

2. Ergebnisse

2.1 Arbeiten mit fixierten Zellen

Die hier verwendeten humanen Lungenfibroblasten (FH109) zeigen in Kultur ein dichteabhängiges Wachstumsverhalten. Nachdem sie Konfluenz erreicht haben, stellen sie ihr Wachstum ein. Dieser Mechanismus beruht, wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, auf der Wechselwirkung von Contactinhibin mit seinem Rezeptor. Durch die Zugabe von Glutardialdehyd-fixierten Zellen (1.1.8) zu dünn ausgesäten Fibroblasten kann diese Interaktion imitiert werden und führt zu einer Wachstumshemmung von 70-80%, was dem Wachstumsverhalten konfluenter Kulturen entspricht (Wieser, R.J., 1985). Die fixierten Zellen werden aus konfluenten Kulturen generiert, da hier das Contactinhibin in seiner aktiven Form vorliegt. Durch den Fixierungsschritt wird das Glykoprotein in der Membran immobilisiert, was dem Clustering *in vivo* entspricht. Dieser Vorgang ist wichtig für die Funktion des Contactinhibin (siehe Einleitung).

Durch frühere Arbeiten konnte eindeutig belegt werden, daß der durch fixierte Zellen ausgelöste wachstumshemmende Effekt allein auf die Interaktion von Contactinhibin und dem Contactinhibin-Rezeptor zurückzuführen ist:

- ◆ Durch die Fixierung werden alle Membranproteine denaturiert und können ihre Funktionen nicht mehr ausüben. Nur die Zuckerstrukturen von membranständigen Glykoproteinen bleiben intakt. Nach quantitativer Entfernung von Contactinhibin durch Immunaффinitäts-Chromatographie zeigen immobilisierte Membranfraktionen keinen wachstumshemmenden Effekt mehr, wenn man sie zu proliferierenden FH109-Zellen gibt (Wieser, R.J., 1990). Damit ist Contactinhibin bis jetzt das einzige identifizierte Glykoprotein, welches das dichteabhängige Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten bewirkt.
- ◆ Wie bereits beschrieben (siehe Einleitung) sind die N-glykosidisch gebundenen, endständigen Galaktose-Reste funktionell wichtig für die Interaktion des Contactinhibins mit seinem Rezeptor. Durch die Vorbehandlung fixierter Zellen oder gereinigten Contactinhibins mit β -Galaktosidase oder Galaktose-spezifischen Lektinen kann der wachstumshemmende Effekt aufgehoben werden (Wieser, R.J., 1988).

- ◆ Nur in konfluenten Zellen liegt Contactinhibin durch Abspaltung der endständigen Sialinsäuren in seiner aktivierten Form vor (siehe Einleitung). Das wachstumshemmende Potential fixierter Zellen ist daher von der Zelldichte der Kulturen abhängig, aus denen sie präpariert wurden. Fixierte Zellen, die aus proliferierenden Kulturen gewonnen wurden, bewirken keine Wachstumshemmung (Doktorarbeit, Faust, D., 1997).
- ◆ FH109-Zellen, in die mit Hilfe kationischer Lipide anti-CiR-Antikörper eingeschleust wurden, werden durch die Zugabe fixierter Zellen nicht mehr in ihrem Wachstum gehemmt, da durch den Antikörper die intrazelluläre Weiterleitung des durch Contactinhibin ausgelösten Signals blockiert ist (Gradl, G., 1995).
- ◆ In Durchfluß-zytometrischen Analysen konnte bestätigt werden, daß in FH109-Fibroblasten sowohl Erreichen von Konfluenz, als auch die Behandlung semikonfluenter Kulturen mit fixierten Zellen zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase führt (pers. Mitteilung, Wieser, R.J.).

Die gezielte Induktion der Kontaktinhibition durch Zugabe Glutardialdehyd-fixierter Zellen zu semikonfluenten Kulturen hat den Vorteil, daß der Zeitpunkt der Kontaktinhibition im Experiment genau bestimmt werden kann. Andere wachstumshemmende Effekte, die in konfluenten Kulturen auftreten, z.B. Mediummangel, können vermieden werden.

Das Zellkulturmodell ist auch auf andere Zellen übertragbar. Immortale NIH3T3-Maus-Fibroblasten, die auch dichteabhängige Wachstumsregulation zeigen, lassen sich durch Zugabe fixierter Zellen ebenfalls in ihrem Wachstum um ca. 40-60% hemmen (Doktorarbeit, Schmitt, C.). Daß die Hemmung durch fixierte Zellen bei NIH3T3-Zellen nicht ganz so stark ist wie bei FH109-Zellen, läßt sich dadurch erklären, daß die Zellen vorher nicht synchronisiert wurden. In DMEM / 0,5% FCS adherieren die Zellen nicht vollständig.

Übertragung des Zellkulturmodells auf Epithelzellen

Während Fibroblasten bei Konfluenz einen Monolayer ausbilden, wachsen Epithelzellen in Kultur in mehreren Schichten, wobei die Basalschicht durch proliferierende und wenig differenzierte Zellen charakterisiert ist. Die Zellen der Suprabasalschichten haben das Wachstum eingestellt und sind in den Differenzierungsprozeß eingetreten (siehe Einleitung).

Humane Keratinozyten (HaCaT) stellen ein gutes *in-vitro*-Modell für das Epithel dar, da sie trotz spontaner Immortalisierung ihre Fähigkeit nicht verloren haben, nach Transplantation *in vivo* eine normal strukturierte Epidermis auszubilden. Das Expressionsmuster der Keratine ist identisch zu dem normaler Keratinozyten in Transplantaten. Bis in hohe Passagen behalten die HaCaT-Zellen ihre Eigenschaften der Differenzierung und Schichtbildung bei (Boukamp, P., 1988). Um den Mechanismus der Kontaktinhibition in diesen Zellen zu untersuchen, werden die Keratinozyten auf einen mit Glutardialdehyd-fixierten Zellrasen ausgesät. Dieser soll die Basalschicht imitieren, so daß darauf ausgesäte Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden und direkt in die Differenzierungsphase übergehen sollen. Im Vergleich zu semikonfluenten Zellen, die nicht auf fixierten Rasen ausgesät wurden, führt der Kontakt mit dem fixierten Rasen zu einer Wachstumshemmung von 50-70%. In Immunfluoreszenzstudien von Zellen auf fixiertem Rasen konnte die Expression von Differenzierungsmarkern nachgewiesen werden (Doktorarbeit, Ast, S., 1998).

Um zu untersuchen, ob die durch den fixierten Rasen ausgelöste Wachstumshemmung auf der spezifischen Wechselwirkung von Ci mit CiR beruht, wurde der Rasen analog zu den Versuchen in FH109-Zellen mit β -Galaktosidase behandelt. Dazu wurden HaCaT-Zellen 6×10^4 / well in Mikrotiterplatten in CG-Medium / 0,5% FCS ausgesät. Nach 24 h wurde der dichte Zellrasen mit Glutardialdehyd fixiert (1.1.8). Nach der Fixierung wurde der Rasen mit 10 und 50 U/ml β -Galaktosidase (aus *E.coli*) in Inkubationspuffer (PBS, 0,5 mM CaCl_2 , 1% (v/v) Mercaptoethanol, pH 7) für 17 h bei 37°C inkubiert. Der Kontrollrasen wurde nur mit Inkubationspuffer behandelt. 10^4 Zellen / well wurden ohne und auf Rasen in CG-Medium / 0,5% FCS ausgesät. Nach 20 h wurde die DNA-Synthese durch [^3H]-Thymidin-Einbau bestimmt (1.1.7). Die Behandlung des Rasens mit β -Galaktosidase zeigte keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Parallel wurde die Effizienz des Enzyms durch Fluoreszenzfärbung mit FITC-konjugiertem Lektin überprüft. Das hierfür verwendete Lektin, Ricinus communis agglutinin-I (RCA-I), bindet mit hoher Affinität an Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc. Bei vollständiger Abspaltung der

Zuckerreste durch die β -Galaktosidase müßte das Ergebnis der Färbung negativ sein. Hierfür wurden parallel in eine 6-well-Platte $1,8 \times 10^6$ Zellen auf desinfizierte Deckplättchen ausgesät. Der Rasen wurde wie der in den Mikrotiterplatten fixiert und anschließend die Galaktosereste mit dem spezifischen Lektin gefärbt (1.5.3.1). Die Färbung des behandelten Rasens war positiv und identisch mit der des Kontrollrasens, was bedeutet, daß es nicht gelungen war, durch β -Galaktosidase-Behandlung die Galaktosereste abzuspalten (Abb. 2.1.1 C). Das läßt sich dadurch erklären, daß das Enzym evtl. durch Fixierung bzw. Verklebung der Zellen miteinander behindert war. Bei dem analogen Versuch in FH109-Zellen lagen die fixierten Zellen vereinzelt in Suspension vor und nicht als kompakter Zellrasen. Um die sterische Hinderung zu umgehen, sollte daher versucht werden, die Zuckermoleküle unspezifisch mit Natriumperodat zu oxidieren (1.3.4).

Die Zellen wurden ausgesät, wie oben beschrieben, und nach der Fixierung mit 5 mM NaIO_4 in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) für 15 h bei 4°C inkubiert. Nach der Entfernung des NaIO_4 durch intensives Waschen mit PBS folgte ein Blockschritt mit 0,1 M Glycin in PBS, um oxidative Gruppen abzusättigen. Die Fluoreszenzfärbung des behandelten Rasens war negativ. Das bestätigte, daß die Zuckerstrukturen durch die Behandlung vollständig oxidiert wurden (Abb. 2.1.1 D). Die Zellen wurden wie beschrieben mit und ohne Rasen in die Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 20 h wurde die DNA-Synthese durch [^3H]-Thymidin-Einbau bestimmt (1.1.7). Durch die Oxidation mit NaIO_4 konnte die wachstumshemmende Wirkung des fixierten Rasens von 69% beim Kontrollrasen auf 54% reduziert werden. Das entspricht einer Wachstumsstimulation von 22% (Abb. 2.1.2). Daß der Effekt des Rasens nicht vollständig aufgehoben werden konnte, liegt vielleicht daran, daß durch die Oxidation möglicherweise gleichzeitig Strukturen zerstört wurden, die für die Anheftung der Zellen wichtig sind. So führten Behandlungen mit höheren Konzentrationen an NaIO_4 , längeren Inkubationszeiten oder höheren Temperaturen zur vollständigen Hemmung des Zellwachstums. Es konnte somit gezeigt werden, daß die Oxidation der Zuckerstrukturen des fixierten Zellrasens zu einer deutlichen Reduktion der Wachstumshemmung führt, was für eine spezifische Wirkung des Zellrasens spricht. Diese Folgerung wird dadurch unterstützt, daß auf fixiertem Zellrasen ausgesäte Keratinozyten Differenzierungsmarker exprimieren (Doktorarbeit, Ast, S., 1998).

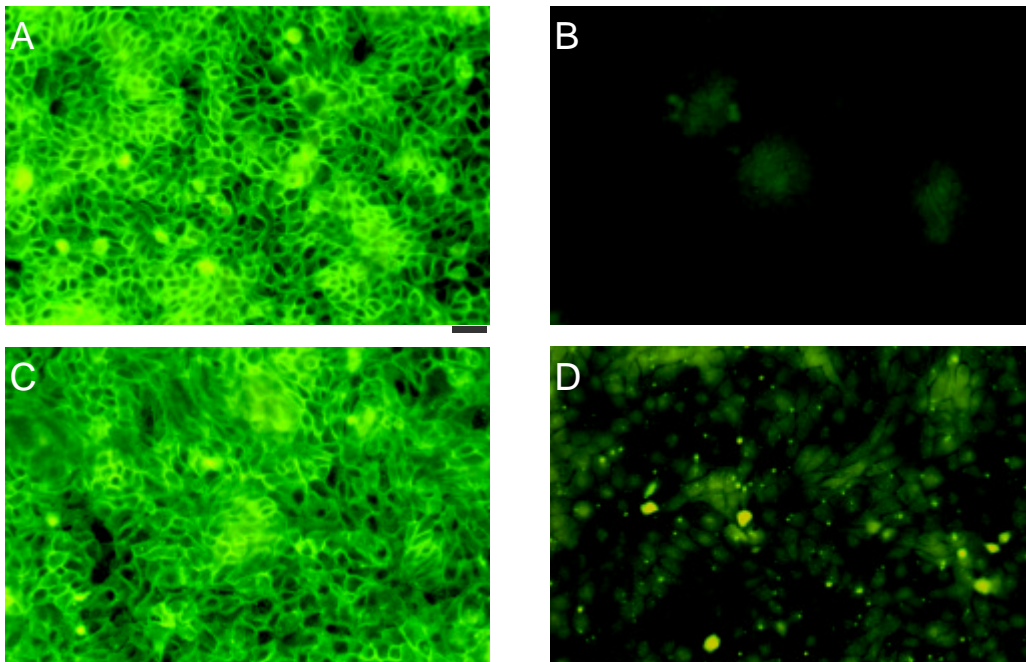


Abb. 2.1.1 Kontrollfärbung nach Abspaltung der Zuckerreste. Der unbehandelte Rasen wurde als Positivkontrolle mit R₁₂₀ gefärbt (A) oder als Negativkontrolle nicht gefärbt (B). (C) repräsentiert den fixierten Rasen nach Behandlung mit β -Galaktosidase (50 U/ml). Nach Behandlung mit 5 mM NaIO₄ sind alle Zuckerreste abgespalten (D) (Balken $\hat{=}$ 40 μ m).

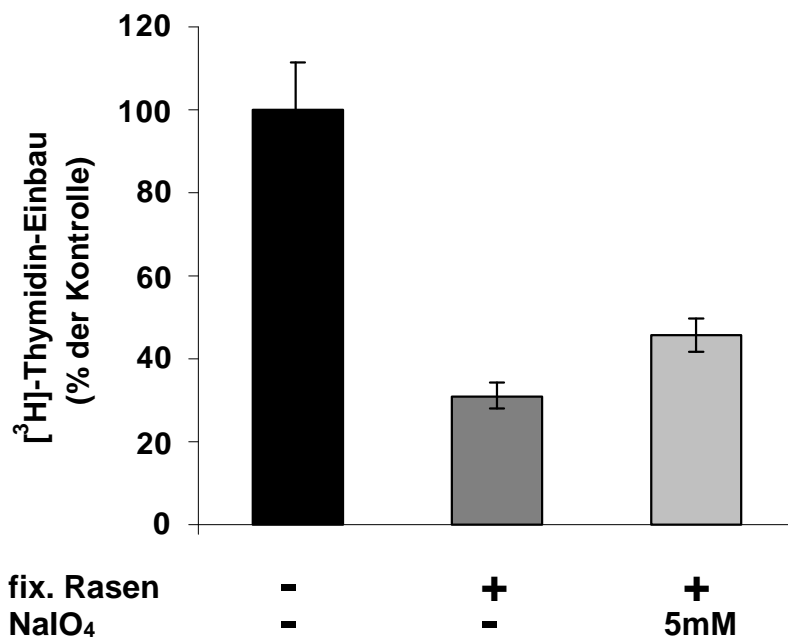


Abb. 2.1.2 Oxidation des fixierten Zellrasens mit NaIO₄ verringert Kontaktinhibition. Auf behandelten (5 mM NaIO₄) oder unbehandelten fixierten Zellrasen wurden 10⁴ HaCaT-Zellen / well ausgesät. Als Kontrolle (100%) dienen jeweils proliferierende Zellen. Messung der DNA-Synthese erfolgte nach 20 h durch [³H]-Thymidin-Einbau. Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 5 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

2.2 Untersuchung der Interaktion der TGF β 1- und Ci- assoziierten Signalwege

Neben der Kontaktinhibition ist in Epithelzellen ein weiterer wachstumsinhibierender Mechanismus bekannt. Die TGF β -Familie gehört zur Gruppe der Cytokine, die im wesentlichen 3 biologische Aktivitäten besitzen. Zum einen inhibieren sie das Wachstum von Epithelzellen und vielen weiteren Zellen, zweitens wirken sie immunsuppressiv. Außerdem fördern sie die Expression extrazellulärer Matrix-Proteine. TGF β 1 inhibiert das Zellwachstum entweder durch Erhöhung der Verdopplungszeit der Zellpopulationen oder durch Zellzyklusarrest in der G1-Phase. In immortalisierten, humanen Keratinozyten (HaCaT) bewirkt TGF β 1 in exponentiell wachsenden Zellen eine weniger stringente Wachstumshemmung. So nimmt die Wachstumsrate ab, aber die Zellzyklusverteilung der Zellen ändert sich nicht (Landesmann, Y., 1992). In HaCaT-Zellen aber, die vorher durch Serumdepletion synchronisiert wurden, kommt es nach TGF β 1-Behandlung zum G1-Arrest. TGF β 1 stoppt den Zellzyklus durch Inhibierung der Cyclin- und Cdk-Expression und durch Inhibierung der Cdk-Aktivität durch Induktion von CKI (p15^{INK4B}, p21^{WAF1}, p27^{kip1}), was die Phosphorylierung des pRb verhindert (siehe Einleitung).

Der G1-Arrest, der durch Zell-Zellkontakte ausgelöst wird, weist einige Parallelen zur Wirkung von TGF β 1 auf. In FH109-Zellen konnte gezeigt werden, daß p16^{INK4} den CyclinD1/Cdk4-Komplex inhibiert und dadurch die Phosphorylierung des pRb verhindert wird (Wieser, R.J., 1999). Zusätzlich wird p27^{kip1} als Inhibitor des CyclinE/Cdk2-Komplexes hochreguliert (Dietrich, C., 1997).

So wie der Verlust der dichteabhängigen Wachstumsregulation ein Charakteristikum von malignen Zellen ist, konnte in vielen Tumoren ein Defekt in der autokrinen TGF β -Produktion oder der durch TGF β induzierten Signalkaskade identifiziert werden. Dabei handelt es sich häufig um eine Mutation im T β RII-Gen. So zeigt z.B. die erbliche Form des Kolonkarzinoms (HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer) eine Mikrosatellit-Instabilität, die zur Mutation und damit zur Inaktivierung von T β RII führt (Markowitz, S., 1995).

In HaCaT-Zellen, die selbst TGF β 1 sezernieren, war eine Wachstumshemmung durch TGF β 1 nur in proliferierenden, nicht aber bei dichtearretierten Zellen zu beobachten (Doktorarbeit, Ast, S., 1998). War der Weg der Kontaktinhibition bereits durch Kultivierung der Zellen auf einem fixierten Zellrasen beschränkt, konnte durch TGF β 1 keine zusätzliche Wachstumshemmung mehr erreicht werden. Die Parallelen

im Zellzyklusarrest und die beschriebenen Experimente deuteten auf einen Zusammenhang zwischen den durch Zell-Zellkontakte oder TGF β 1 induzierten Signalkaskaden hin. Es wären zwei mögliche Verbindungen der Wege denkbar. Nach der ersten Hypothese sind bei der intrazellulären Signalweiterleitung die gleichen signaltransduzierenden Proteine beteiligt. Das bedeutet, daß nach Induktion durch Zell-Zellkontakte oder TGF β 1 die beiden Signalwege zusammenlaufen. Nach einer zweiten Hypothese führen Zell-Zellkontakte zu einerverstarkten Produktion von TGF β 1 und damit zu einer autokrinen Wachstumshemmung.

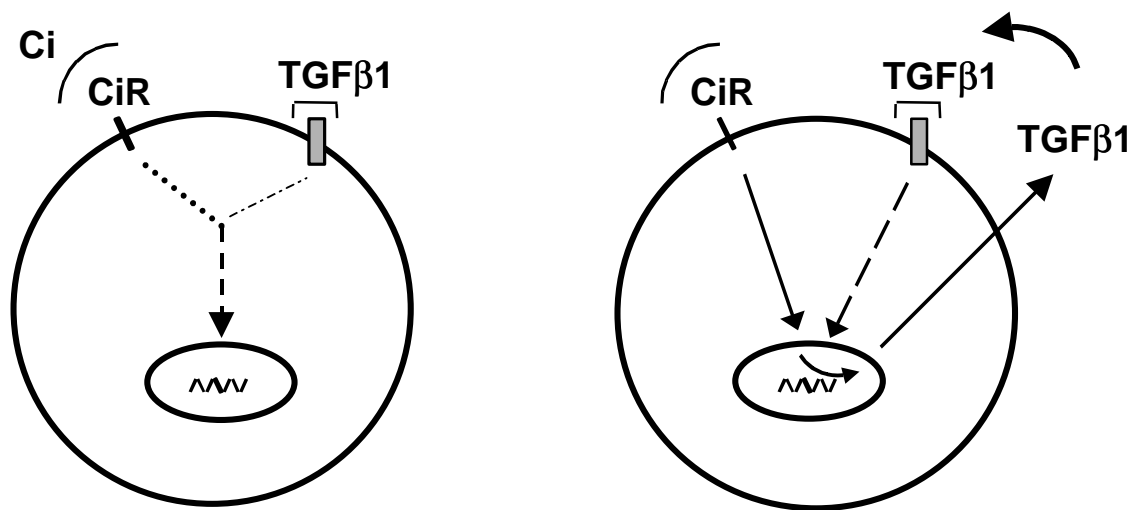


Abb. 2.2.1 Zwei mögliche Hypothesen für die Interaktion der durch TGF β 1 und Ci induzierten Signaltransduktionswege. Hypothese 1 (rechts), Hypothese 2 (links).

Expression einer dominant-negativen Mutante des TGF β -Typ-II-Rezeptors

Um zu untersuchen nach welcher Hypothese die beiden Signalwege miteinander gekoppelt sind, sollten in Kooperation mit PD Dr. Manfred Blessing (Universität Mainz) HaCaT-Zellen mit einem defekten TGF β 1-Signaltransduktionsweg generiert werden. Eine Mutation des TGF β -Typ-II-Rezeptors kann den Signalweg durch einen dominant negativen Mechanismus unterbrechen (Brandt, T., 1993). Inaktivierung des TGF β -Rezeptors Typ II konnte in kutanen T-Zell-Lymphomen (Knaus, P.I., 1996), in verschiedenen humanen Brust-Karzinom-Zelllinien (Kalkhoven, E., 1995) und in Retinoblastom-Zelllinien (Kimchi, A., 1988) beobachtet werden. Die Inaktivierung des T β RII scheint ein allgemeiner Weg für Tumorzellen zu sein, um der durch TGF β induzierten Wachstumsinhibition zu entkommen. Umgekehrt führt die

Überexpression einer dominant-negativen (dn) Mutante des Typ II TGF β -Rezeptors in Brustdrüsen und Lunge von transgenen Mäusen zur gesteigerten Tumorigenese nach Behandlung mit Kanzerogenen (Böttlinger, E.P., 1997). Dies spricht dafür, daß T β RII als Tumorsuppressor wirkt. Daher sollten humane Keratinozyten, HaCaT, mit dem Konstrukt eines dominant-negativen TGF β -Rezeptors Typ II transfiziert werden. Es konnte gezeigt werden, daß eine Mutation im T β RII genügt, um die gesamte durch TGF β induzierte Signalkaskade auszuschalten. Der dominant-negative Effekt beruht auf dem Fehlen der intrazellulären Kinase-Domäne (Brand, T., 1993).

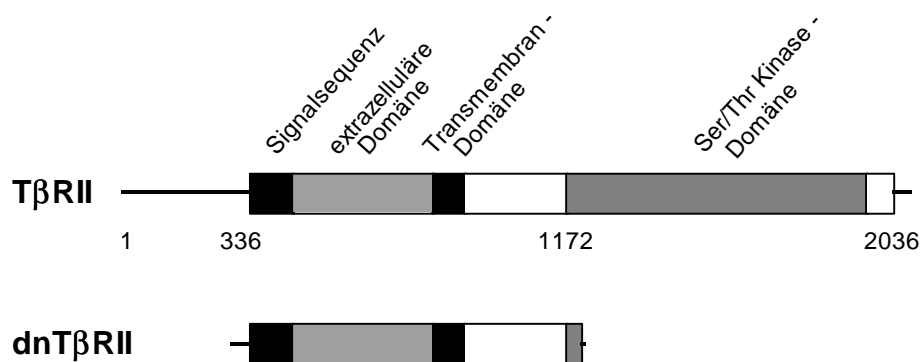


Abb. 2.2.2 Schematische Darstellung des dnT β RII-Konstrukts. Domänen des Wildtyps und des verkürzten humanen T β RII. Die Zahlen repräsentieren die korrekte Nukleotidsequenz.

Die 895 Basenpaare große cDNA des humanen dnT β RII wurde über die Sal-I-Schnittstelle in die Multiple cloning site eines pH β APr-1-Expressionsvektors mit Neomycin-Resistenzgen eingefügt (Okayama, H. und Berg, P. 1994). Das Konstrukt stand unter der Kontrolle eines β -Aktin-Promotors (Leavitt, J., 1984). Das Neomycinresistenzgen wird durch einen SV40-Promotor reguliert. Die stabile Transfektion wurde von Christiane Amend (Arbeitsgruppe Blessing) unter Anwendung der Calcium-Phosphat-Methode durchgeführt.

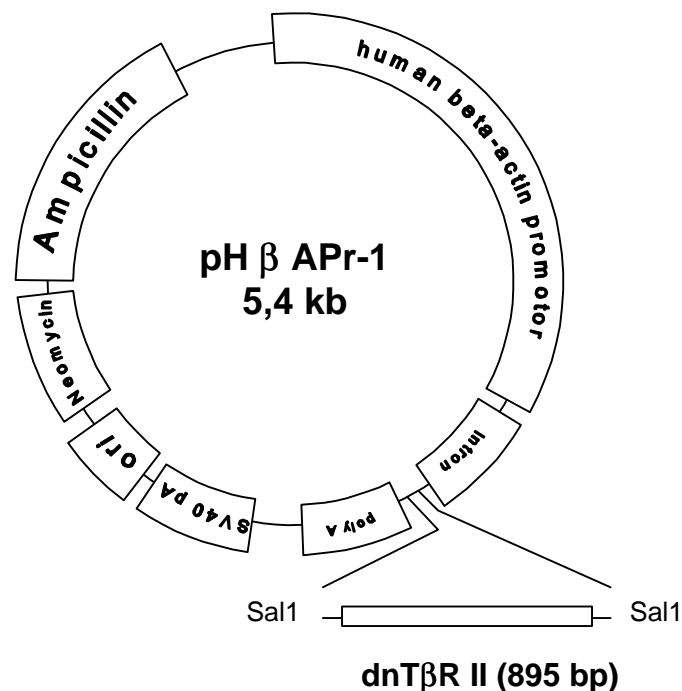


Abb. 2.2.3 Schema des Vektors mit dem Konstrukt der dnT β RII.

Nach der Kultivierung in Selektionsmedium wurden 2 Klone erhalten, die den dnT β RII stabil exprimierten. Die Stärke der Expression wurde durch Northern Blot-Analysen bestimmt. Dafür wurden die Klone und der Wildtyp zu je 10^7 Zellen / 10-cm-Schale ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen abtrypsinisiert (1.1.2) und die Zellzahl bestimmt (1.1.4), um zu berechnen, welche Mengen an RNA-Isolierungsreagenz eingesetzt werden müssen. Dann wurde die Gesamt-RNA isoliert, wie unter 1.6.7 beschrieben. Die erhaltene Menge an RNA wurde durch UV-Spektroskopie bestimmt (1.6.8) und die Qualität der Proben durch eine native Agarose-Gelelektrophorese überprüft (1.6.1.1). 20 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt (1.6.1.2). Im Northern Blot wurde die Expressionstärke der dnT β RII-mRNA gemessen (1.6.2). Als Sonde diente hierbei die dnT β RII-cDNA aus dem Vektor, die zuvor mit [32 P] radioaktiv markiert wurde. Die Expositionsdauer mit dem Phosphoimaging Screen betrug 5 Tage. Klon 10 zeigte eine starke Expression des Konstrukts während Klon 16 einen schwächeren Expressionslevel aufwies. Die Expression des endogenen T β RII war in Klonen und Wildtyp gleich. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels diente die mit Ethidiumbromid angefärbte 28-S-Bande der rRNA.

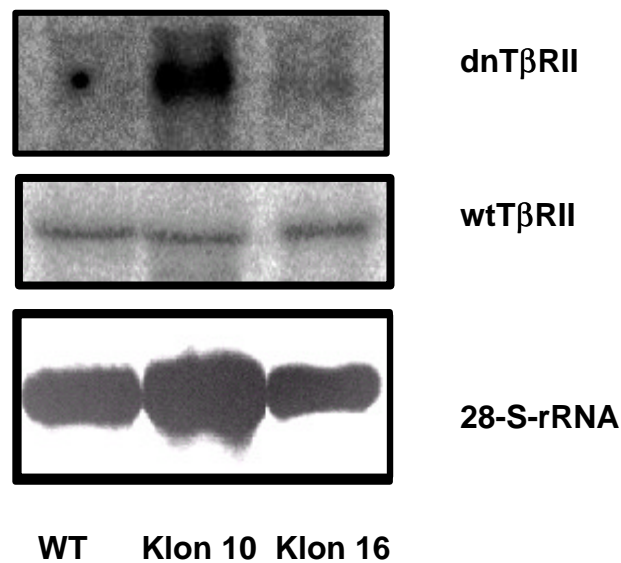


Abb. 2.2.4 mRNA-Expression des dnTβRII und wtTβRII in Wildtyp- und Klon-Zellen. HaCaT-Wildtyp (WT) und -Klone wurden konfluent ausgesät. Nach 24 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach 1% denaturierender Agarose-Gelelektrophorese dnTβRII und wtTβRII im Northern Blot detektiert. Die 28-S-Bande der rRNA zeigt als Kontrolle die Beladung des Gel.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Klonzellen noch auf TGFβ-Behandlung reagierten, bzw. ob der Expressionslevel des dnTβRII ausreichend war, um den durch TGFβ induzierten Signalweg zu unterbrechen. Hierzu wurden Wildtyp- und Klonzellen zu 10^4 Zellen / well in Mikrotiterplatten in CG-Medium / 0,5% FCS in der Anwesenheit und Abwesenheit von 0,1 ng/ml TGFβ1 ausgesät. Nach 20 h wurde die DNA-Synthese durch [3 H]-Thymidin-Einbau bestimmt (1.1.7). Die Proliferationsrate der unbehandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. Die Wildtyp-Zellen wurden durch TGFβ1-Behandlung um 37% gehemmt. Der den dnTβRII schwächer exprimierende Klon 16 ließ sich noch durch TGFβ1 in seiner DNA-Synthese um 28% hemmen, wenn auch in geringem Ausmaß als der Wildtyp. Klon 10, mit starker Expression des Konstrukts, reagierte nicht mehr auf TGFβ1-Behandlung. Die Wachstums-inhibierende Wirkung von TGFβ1 korreliert folglich mit der Expressionsstärke des dnTβRII.

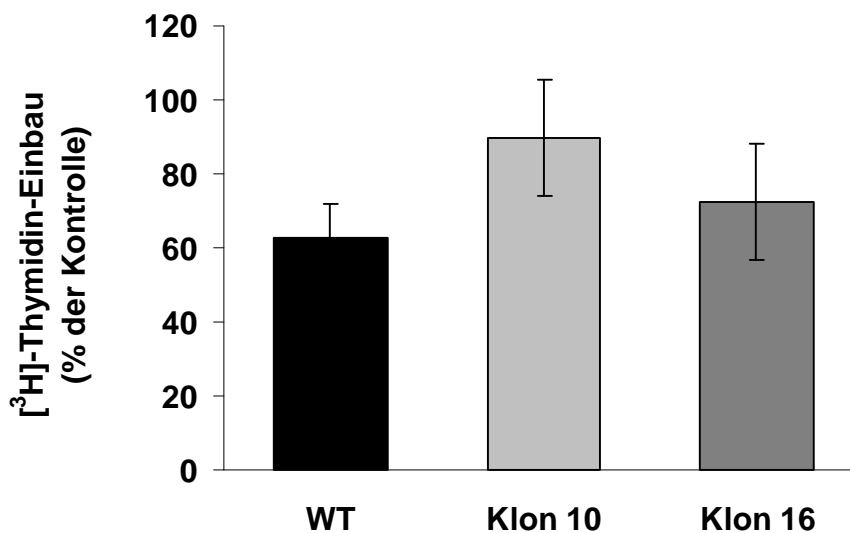


Abb. 2.2.5 Proliferation semikonfluenter HaCaT-Zellen unter TGF β 1-Behandlung. Semikonfluent ausgesäte Wildtyp- und Klonzellen wurden 24 h in Abwesenheit (Kontrolle = 100%) oder Anwesenheit von TGF β 1 (0,1 ng/ml) kultiviert. Die DNA-Synthese wurde durch [³H]-Thymidin-Einbau gemessen. Die Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

Effekt der Expression einer dn-Mutante des TGF β -Typ-II-Rezeptors auf die Kontaktinhibition

Um diese Frage zu beantworten, ob die Expression des dnT β RII in HaCaT-Zellen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten hat, wurde die Sättigungsdichte der Klonzellen im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die Zellen wurden mit 7×10^4 Zellen / well annähernd konfluent ausgesät und in CG-Medium / 0,5% FCS über 3 Tage kultiviert. Alle 24 h wurde ein Ansatz Zellen abtrypsinisiert und die Zellzahl bestimmt (1.1.4). Während der Wildtyp sehr schnell in ein Sättigungsplateau überging, zeigte Klon 16 eine leicht erhöhte, Klon 10 bereits nach 72 h eine um 30% höher liegende Sättigungsdichte ohne Reduktion der Teilungsrate. Die erhöhte Sättigungsdichte deutet bereits auf ein transformiertes Wachstumsverhalten hin.

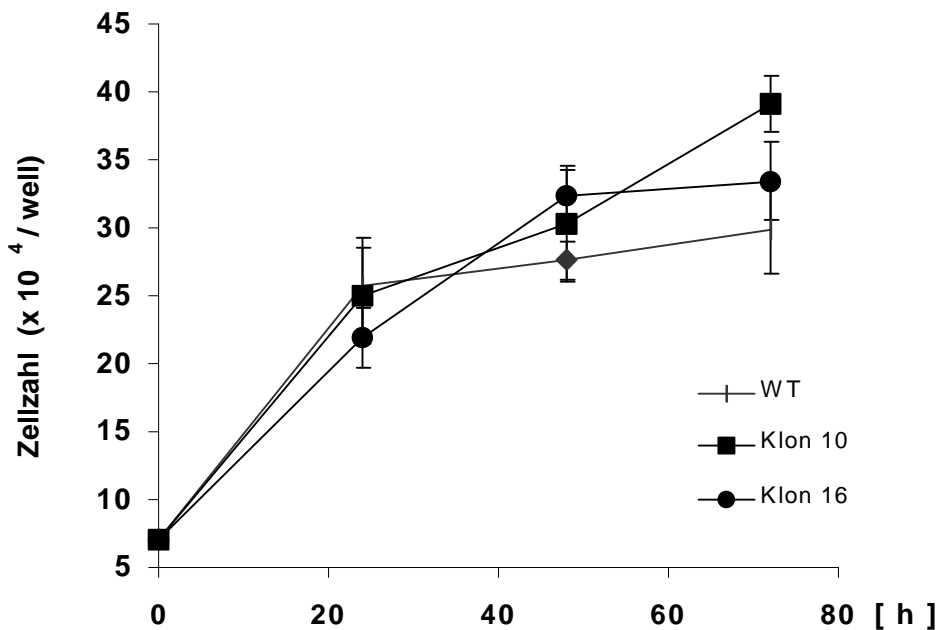


Abb. 2.2.6 Bestimmung der Sättigungsdichte von Wildtyp und Klonzellen. Annähernd konfluent ausgesäte Wildtyp- und Klonzellen wurden 3 Tage kultiviert. Alle 24 h wurde die Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind als Gesamtzellzahl / well angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

In einem nächsten Experiment sollte die dichteabhängige Wachstumsregulation nach dem bereits unter 2.1 beschriebenen Zellkulturmodell genauer untersucht werden. Dazu wurde aus Klon- und Wildtypzellen je ein konfluenten Zellrasen generiert, der dann mit Glutardialdehyd fixiert wurde (1.1.8). Die Klon- und Wildtypzellen wurden jeweils ohne oder in Anwesenheit des fixierten Zellrasens wie bereits beschrieben ausgesät. Die Wachstumsrate von Zellen, die ohne fixierten Rasen kultiviert wurden, wurde auf 100% normiert. Der Wildtyp zeigte durch die Zell-Zellkontakte mit dem fixierten Zellrasen eine Wachstumshemmung von 56%. Im Vergleich dazu wurden die beiden Klone nur um 10-15% gehemmt. Hier konnte der Kontakt mit dem fixierten Zellrasen im Prinzip keine Wachstumshemmung hervorrufen. Zunächst mag es erstaunlich sein, daß Klon 16 hier keine Kontaktinhibition zeigte, obwohl seine Sättigungsdichte kaum erhöht war. Dies läßt sich aber dadurch erklären, daß Klon 16 durch ein morphologisch verändertes Wachstumsverhalten charakterisiert war. Im Gegensatz zu Wildtyp und Klon 10 bildete er nach semikonfluenten Aussaat keinen konfluenten Zellrasen, sondern wuchs hauptsächlich in die Höhe. Die extreme Schichtung führte zum Absterben (Apoptose) (Orford, K., 1999) der oberen Zellen, wodurch sich die relativ geringe

Sättigungsdichte erklären läßt. Nur bei konfluenter Aussaat der Zellen war die Bildung eines geschlossenen Zellrasens zu beobachten.

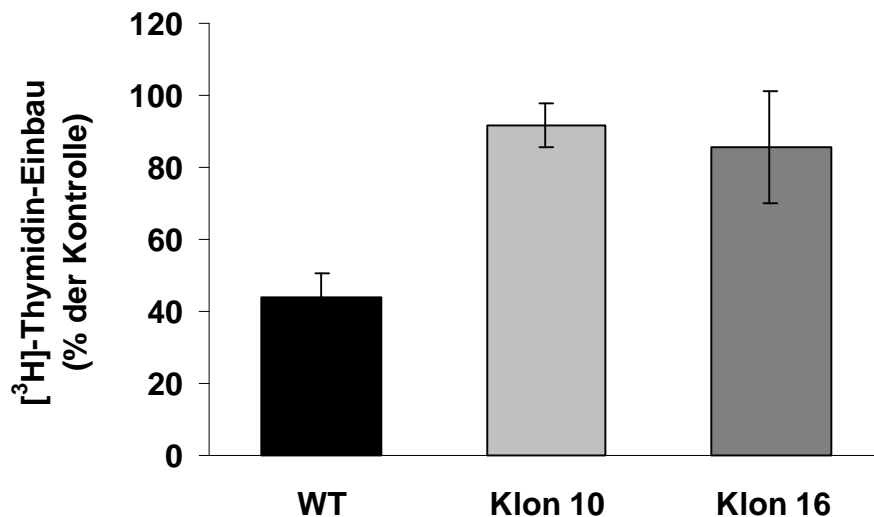


Abb. 2.2.7 Expression des dnT β RII hebt die Kontaktinhibition auf. Semikonfluent ausgesäte Wildtyp- und Klon-Zellen wurden 24 h in Abwesenheit (Kontrolle = 100%) oder Anwesenheit von fixiertem Zellrasen kultiviert. Die DNA-Synthese wurde durch $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau gemessen. Die Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Contactinhibin und dem Contactinhibin-Rezeptor

Es galt nun sicherzustellen, daß die Interaktion von Contactinhibin und seinem Rezeptor in den Klonzellen noch funktionsfähig war. Um zu zeigen, daß die Aufhebung der Kontaktinhibition auf dem Defekt im TGF β -Signalweg beruht und nicht etwa sekundär durch Veränderungen der durch Ci induzierten Signalkaskade ausgelöst wurde, wurde der Wildtyp auf fixierten Klonrasen ausgesät und umgekehrt. Da der Wildtyp auf fixiertem Klonrasen immer noch Kontaktinhibition zeigte (Abb. 2.2.8), konnte davon ausgegangen werden, daß in den Klonzellen Ci in aktiver Form vorlag. Die Klonzellen wurden durch den Wildtyp-Rasen jedoch nicht inhibiert (Abb. 2.2.9).

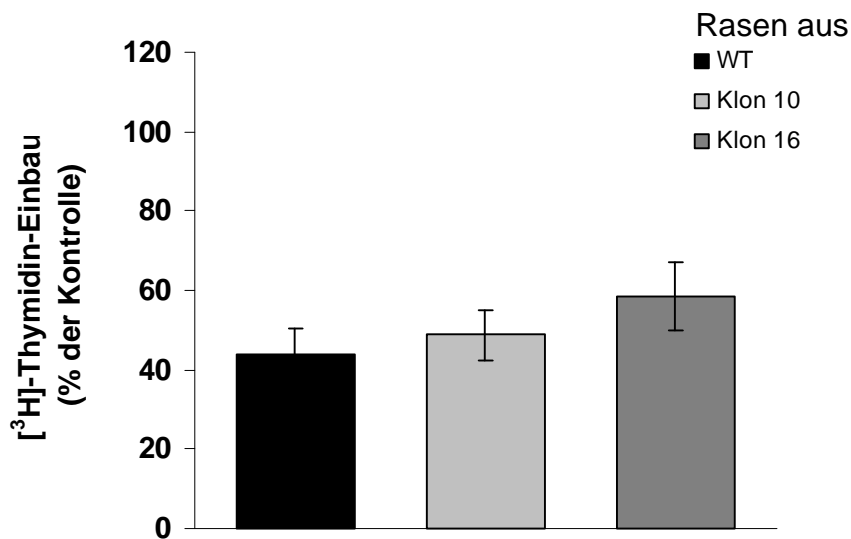


Abb. 2.2.8 Effekt von fixiertem Rasen, generiert aus Wildtyp- und Klonzellen, auf die Kontaktinhibition. Relative Proliferation der Wildtyp-Zellen auf eigenem Zellrasen (■) und Klonzellrasen (□ = Klon 10, ▒ = Klon 16). Kontrolle (100%) sind exponentiell proliferierende Zellen. Die Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung).

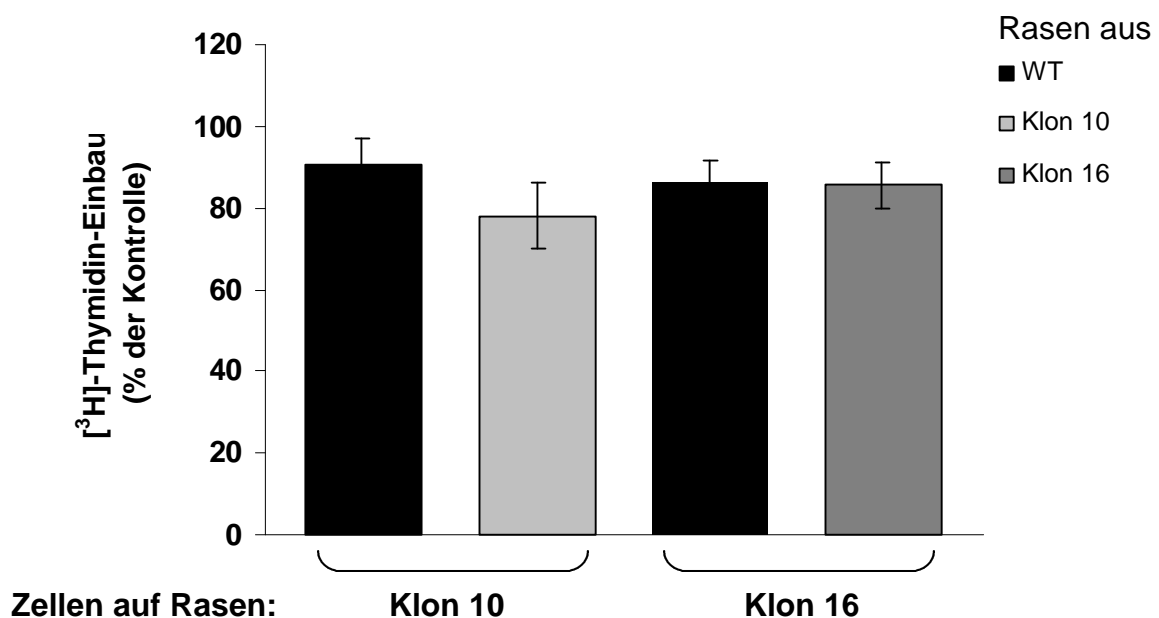


Abb. 2.2.9 Effekt von fixiertem Rasen, generiert aus Wildtyp- und Klonzellen, auf die Kontaktinhibition. Relative Proliferation der Klon-Zellen (Klon 10 (links), Klon 16 (rechts)) auf eigenem Zellrasen (□ = Klon 10, ▒ = Klon 16) und Wildtypzellrasen (■). Kontrolle (100%) sind exponentiell proliferierende Zellen. Die Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung).

Um zu überprüfen, ob in den Klonzellen der CiR verändert vorliegt, wurde in Immunfluoreszenzstudien seine intrazelluläre Lokalisierung bestimmt. Dazu wurden 10^6 Zellen / 60-mm-Schale auf desinfizierte Deckgläschen in CG-Medium / 0,5% FCS ausgesät. Nach 24 h wurde die Verteilung des CiR in der Zelle mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (1.5.3.1). Dabei zeigten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen (1.5.3.2), daß der CiR in Wildtyp-Zellen mit E-Cadherin bzw. γ -Catenin in den Desmosomen kolokalisiert war. Es konnte kein Unterschied in der Lokalisation oder Expressionsstärke des CiR in Klonzellen festgestellt werden (Abb. 2.2.10).

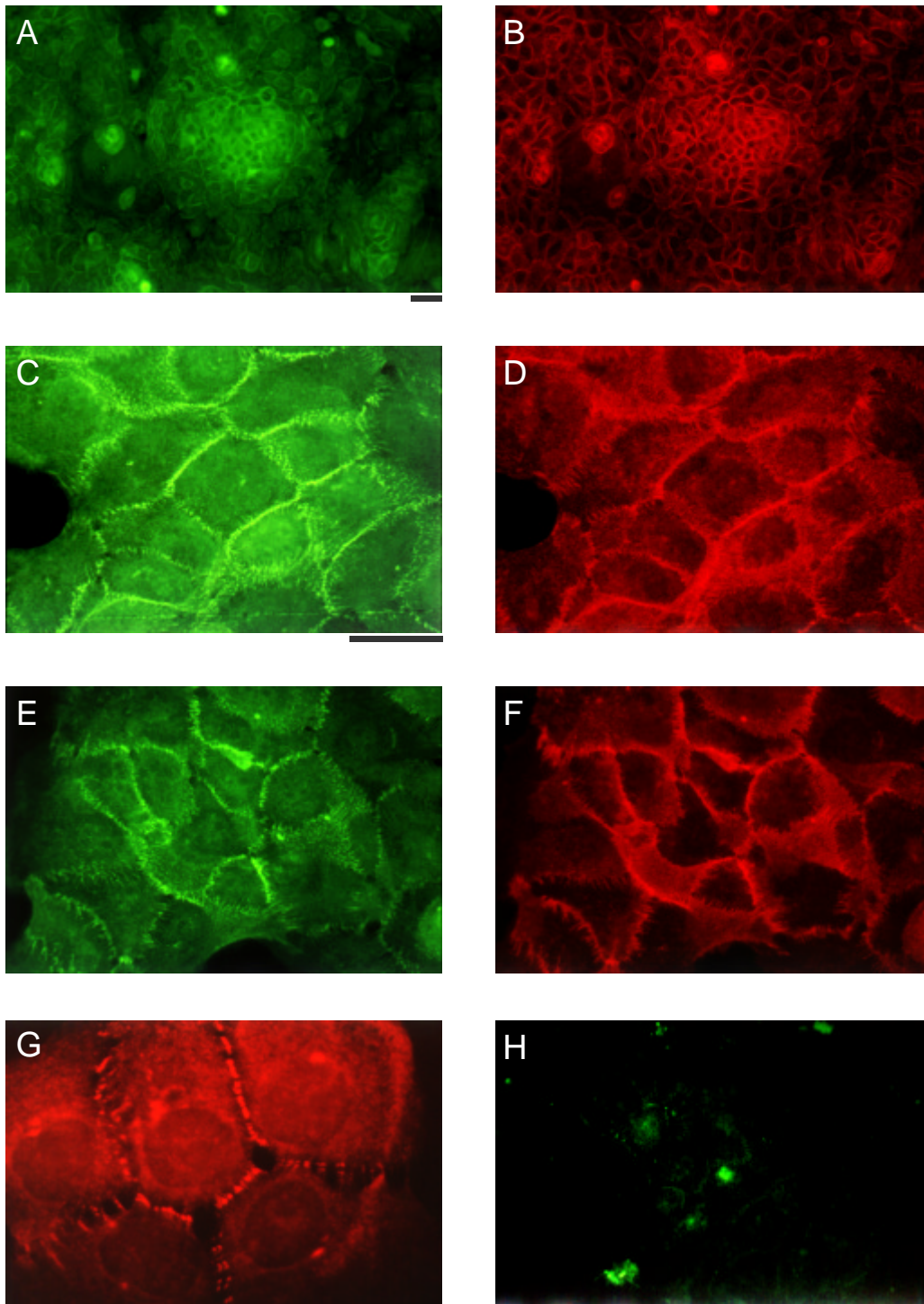


Abb. 2.2.10 In HaCaT-Wildtyp und Klon 10 ist CiR in den Desmosomen lokalisiert. Intrazelluläre Verteilung des CiR (A, C, E) in Wildtyp-Zellen wurde durch Doppelimmunfluoreszenz mit E-Cadherin (B, D) oder γ -Catenin (F) untersucht. Klon 10 (G) zeigt die gleiche Lokalisierung des CiR wie der Wildtyp. Als Negativkontrolle wurde mit Präimmunserum gefärbt (H) (Balken $\hat{=}$ 40 μ M).

Um den Phosphorylierungsstatus des CiR zu überprüfen, wurden CHAPS-Zellextrakte aus konfluenten Wildtyp- und Klon-10-Zellen gewonnen (1.2.2). Je 60 µg Gesamtprotein wurden dann in einer 2-dimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt (1.4.2). Im Western Blot wurde der CiR mit dem α -CiR-Antiserum IV/5 detektiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Mikroheterogenität der Signale, was auf einen gleichen Phosphorylierungsstatus schließen läßt.

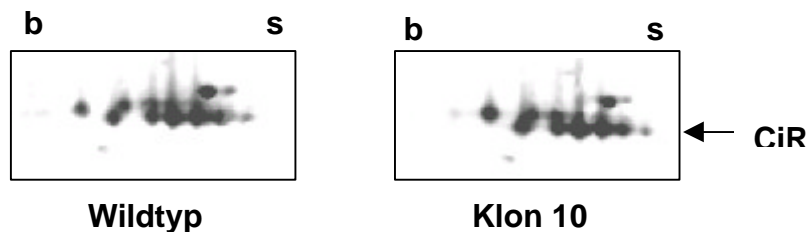


Abb. 2.2.11 Kein Unterschied in der Phosphorylierung des CiR in HaCaT Wildtyp und Klon 10. 8 mM CHAPS-Extrakt aus Wildtyp- und Klon-10-Zellen nach 2-dimensionaler Auftrennung und Detektion des CiR im Western Blot. Die basischen (b) und sauren (s) Enden der Röhrengelle sind gekennzeichnet.

TGF β -Expression in proliferierenden und kontaktinhibierten HaCaT-Zellen

Die Signalweiterleitung über Zell-Zellkontakte schien folglich nicht gestört zu sein. Wenn die zweite Hypothese richtig war, daß über Zell-Zellkontakte die TGF β 1-Produktion reguliert wird, so müßte in konfluenten Zellen der Expressionslevel an TGF β 1-mRNA höher sein als in exponentiell proliferierenden. Um dies zu untersuchen, sollte der Expressionslevel von konfluent gewachsenen und durch Aussaat auf fixierten Zellrasen kontaktinhibierten Kulturen mit dem proliferierender Zellen im Northern Blot verglichen werden.

Zunächst wurde ein Zellrasen generiert, indem 10^7 Zellen / 10-cm-Schale je 3 x ausgesät wurden. Nach 24 h wurde der konfluente Zellrasen fixiert (1.1.8). Exponentiell wachsende HaCaT-Zellen wurden von den Kulturschalen abtrypsinisiert und nach folgendem Schema in CG-Medium / 0,5% FCS ausgesät:

1. semikonfluent: $1,5 \times 10^6$ / 10-cm-Schale je 9 mal
2. auf fix. Rasen: $1,5 \times 10^6$ / 10-cm-Schale je 3 mal
3. konfluent: 1×10^7 / 10-cm-Schale 1 mal

Nach 24 h wurden die Zellen abtrypsinisiert und die Ausbeute der Kulturschalen pro Ansatz vereinigt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die RNA-Isolierung durchgeführt (1.6.7). Die erhaltene Ausbeute an Gesamt-RNA wurde durch UV-Spektroskopie bestimmt (1.6.8) und die Qualität der Proben durch eine native 1%ige Agarose-Gelelektrophorese überprüft (1.6.1.1). Zum Vergleich der proliferierenden und konfluenten Kulturen wurden je 20 µg der Gesamt-RNA in einem denaturierenden 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt (1.6.1.2). Bei dem Vergleich der RNA der Zellen die in Anwesenheit und Abwesenheit von fixiertem Zellrasen kultiviert wurden, wurden jeweils nur 10 µg der Gesamt-RNA auf das Gel aufgetragen, da die Ausbeute geringer ausfiel. Im Northern Blot wurde die Expressionstärke der TGFβ1-mRNA gemessen (1.6.2). Als Sonde diente hierbei die komplette cDNA des simian TGFβ1, die zur humanen TGFβ1-cDNA über 98% Sequenzhomologie aufweist. Die Expositionsdauer mit dem Phosphoimaging Screen betrug 5 Tage. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels diente die 28-S-Bande der mit Ethidiumbromid gefärbten rRNA.

In konfluent ausgesäten Zellen war der Expressionslevel an TGFβ1-mRNA gegenüber proliferierenden Zellen stark erhöht. Das Ergebnis wurde noch weiter dadurch bestätigt, daß sich in durch fixierten Zellrasen kontaktinhibierten Kulturen ebenfalls eine vermehrte Produktion an TGFβ1-mRNA zeigte. Dieses Ergebnis spricht für die zweite Hypothese, nach der durch Zell-Zellkontakte die Produktion an TGFβ1 steigt, was dann letztlich mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer autokrinen Wachstumshemmung führt.

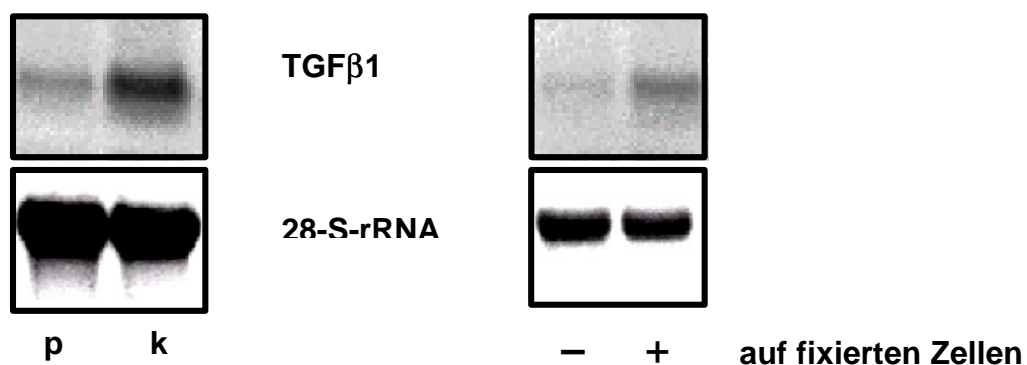


Abb. 2.2.12 Zell-Zellkontakte durch Konfluenz oder fixierten Zellrasen steigern mRNA-Level von TGFβ1. HaCaT-Zellen wurden semikonfluent (p) und konfluent (k) ausgesät (links) oder semikonfluent in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) eines fixierten Zellrasens (rechts) kultiviert. Nach 24 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach 1% denaturierender Agarose-Gelelektrophorese TGFβ1 im Northern Blot detektiert. Die 28-S-Bande der rRNA zeigt als Kontrolle die Beladung des Gels.

2.3 Untersuchung einer Beteiligung der Proteinkinase C δ in der Kontaktinhibition

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse zeigen Interaktionen zwischen der Kontaktinhibition und dem durch TGF β induzierten Signalweg in humanen Keratinozyten auf. Die Signalmoleküle, über die diese beiden Signalkaskaden miteinander verbunden werden, sind bislang noch unbekannt. Um Erkenntnisse darüber zu erlangen, durch welche Transmitter die Interaktion von Contactinhibin und seinem Rezeptor von der Zelloberfläche in das Zellinnere weitergeleitet wird, sollten in einem zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit mögliche Second-messenger-Systeme untersucht werden. Der Hauptmechanismus der Signalweiterleitungen in der Zelle ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmter Zielproteine, die dadurch aktiviert ihrerseits Signale weitergeben oder ausgeschaltet werden. Somit spielen Proteinkinasen und -phosphatasen eine wichtige regulatorische Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion.

Die Proteinkinase C, aktiviert durch DAG, besitzt ein breites Feld von Substraten und ist in viele intrazelluläre Prozesse involviert. Ihre heterogene Rolle kann durch unterschiedliche zelluläre Verteilung und Spezifität der Isoformen für verschiedene Substrate erklärt werden. So hat z.B. die Überexpression der ϵ -Isoform in NIH3T3-Zellen eine gesteigerte Proliferation, erhöhte Sättigungsdichte und Wachstum in Weich-Agar zur Folge, während die δ -Isoform die Zellmorphologie verändert und zu verringertem Wachstum bzw. erniedrigter Sättigungsdichte führt (Mischak, H., 1993a). Von allen PKC-Isoformen ist vor allem die δ -Isoform für ihre anti-proliferative Rolle bekannt. So führt ihre Aktivierung in CHO-(Watanabe, T., 1992), HL60-(Griffiths, G., 1996) und vaskulären glatten Muskelzellen (Fukumoto, S., 1997) zum Zellzyklusarrest. Umgekehrt resultiert aus der Inhibition der δ -Isoform in c-Src-transfizierten Ratten-Fibroblasten ein transformierter Phänotyp, der durch Substrat-unabhängiges Wachstum gekennzeichnet ist (Lu, Z., 1997). Auch *in vivo* ist die PKC δ in Lungenmetastasen der Ratte herunterreguliert (LaPorta, C., 1997). Durch die zahlreichen Ergebnisse, die auf eine Rolle der PKC δ in der negativen Wachstumskontrolle hindeuten, wird sie auch als Tumorsuppressor beschrieben.

Daher lag es nahe, einen möglichen Einfluß der PKC auf die Kontaktinhibition zu untersuchen.

Effekt von PKC-Inhibitoren und Aktivatoren auf die Kontaktinhibition

In einem ersten Schritt sollte die Wirkung von PKC-Inhibitoren und -Aktivatoren auf das Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten, FH109, untersucht werden. Aus früheren Arbeiten der Gruppe war bekannt, daß eine Behandlung von FH109-Zellen mit dem Phorbol-ester TPA, einem Tumorpromoter, der aufgrund seiner DAG-ähnlichen Struktur (siehe Einleitung) ebenfalls die PKC aktiviert, ein von der Zelldichte abhängiges Wachstumsverhalten induziert. So wurde bei konfluent gewachsenen Zellen nach Aktivierung der PKC durch TPA-Behandlung eine 2-fach erhöhte Proliferationsrate gemessen, während dünn kultivierte Zellen auf TPA-Behandlung mit einer Wachstumshemmung um 50% reagierten (Oesch, F., 1988). Die Effekte des TPA hängen aber nicht nur von der Zelldichte, sondern auch vom Zeitpunkt der TPA-Behandlung ab. Stimuliert man die PKC mit TPA, so führt das innerhalb weniger Minuten zu ihrer Aktivierung. Doch mehrere Stunden nach Beginn der Behandlung beobachtet man eine Herunterregulierung der PKC auf Proteinebene durch proteolytische Degradation (Rodriguez-Pena, A. und Rozengurt, E., 1984). Dieser Mechanismus kann als indirekte Inhibition der PKC ausgenutzt werden. Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der PKC in der Kontaktinhibition zu erhalten, wurde in vorangegangenen Untersuchungen die PKC durch Langzeit-Behandlung mit TPA in Serum-depletierten FH109-Zellen herunterreguliert und dann die DNA-Synthese nach Serumstimulation und simultaner Zugabe von Glutardialdehyd-fixierten Zellen bestimmt (1.1.7). Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem inaktiven Isomer 4 α -Phorbol-12,13-didecanoat (PDD) behandelt. Die TPA / PDD-Behandlung betrug insgesamt 48 h. Durch diesen späten Zeitpunkt können Effekte, die auf der frühen Aktivierung der PKC beruhen, weitgehend ausgeschlossen werden. Während die mit PDD behandelten Zellen eine Hemmung der DNA-Synthese nach Zugabe fixierter Zellen von 72% zeigten, ließen sich die TPA-behandelten Zellen nur um 30% hemmen (Abb. 2.3.3). Die Herunterregulierung der PKC führte folglich in humanen Fibroblasten zu einer starken Reduktion der Kontaktinhibition. Da das inaktive Isomer PDD keinen Effekt auf die Kontaktinhibition zeigte, wurde auf eine spezifische Wirkung von TPA geschlossen (Diplomarbeit, Heit, I., 1997). Auf TPA-Behandlung reagieren nur die PKC-Isoformen, die durch DAG aktivierbar sind. Dazu gehören die Klassen der konventionellen und neuen PKCs, wobei die Kinetiken der Downregulation der verschiedenen Isoformen unterschiedlich sein können. Es stellte sich nun die Frage, welche PKC-Isoformen unter den hier angewandten Versuchsbedingungen herunterreguliert wurden und somit für die verminderte Kontaktinhibition

verantwortlich waren. Exponentiell wachsende FH109-Zellen wurden semikonfluent, 2×10^4 Zellen / cm^2 , in DMEM / 0,5% ausgesät und mit TPA oder PDD behandelt bzw. unbehandelt 24 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die Hälfte des Ansatzes durch Zellextraktion mit Probenpuffer geerntet (1.2.1). Die andere Hälfte wurde unter Serumstimulation und fortgeführter TPA-Behandlung weitere 24 h kultiviert. Diese Zellen wurden dann nach insgesamt 48 h geerntet. 15 μg des Zellextrakts wurden durch 1-dimensionale SDS-PAGE aufgetrennt (1.4.1), und im Western Blot wurden die Isoformen mit den jeweiligen Antikörpern detektiert (1.5.2). Von allen Isoformen, die in den FH109-Zellen exprimiert werden, wurden nur die α -, δ -, ϵ - und μ -Isoformen herunterreguliert.

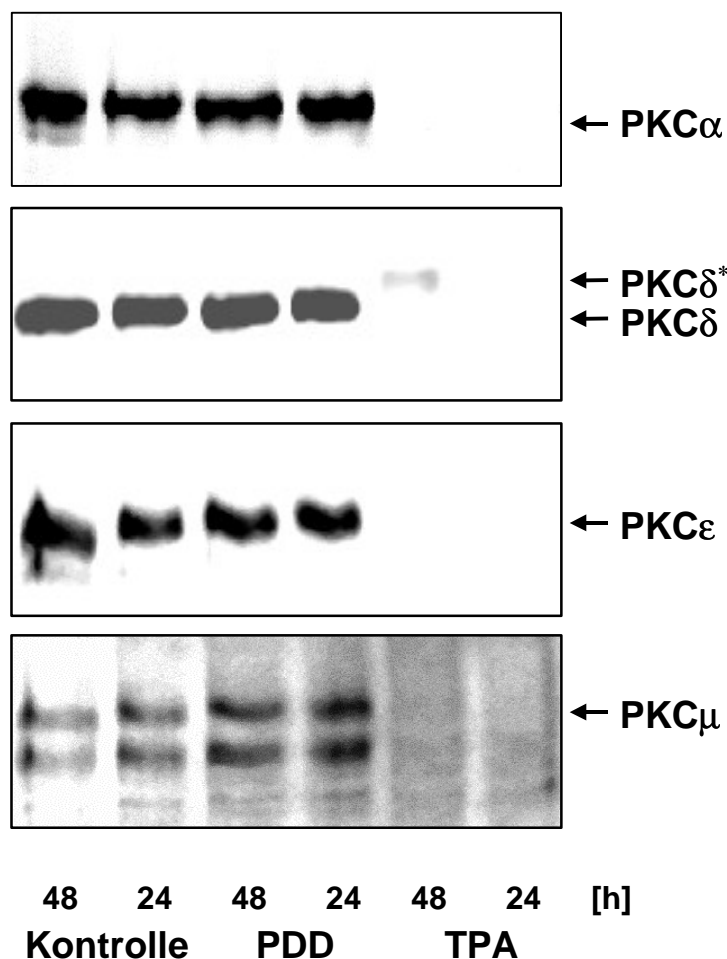


Abb. 2.3.1 Herunterregulierung der PKC-Isoformen nach TPA-Behandlung. Gleiche Mengen an Gesamt-Zellextrakt (je 15 μg) wurden 1-dimensional aufgetrennt (7,5% Polyacrylamidgel) und die Isoformen im Western Blot mit anti-PKC α , anti-hPKC δ , anti-PKC ϵ - oder anti-PKC μ -Antikörpern detektiert. PKC δ^* symbolisiert die Tyrosin-phosphorylierte Form der PKC δ (Li, W., 1994).

Parallel zur Herunterregulierung der PKC δ war eine schwache, in der Gelelektrophorese langsamer wandernde Form detektierbar, die ein apparentes Molekulargewicht von 82 kD besaß. Nach der Literatur handelt es sich dabei um eine Tyrosin-phosphorylierte, aktivierte Form der PKC δ wie sie typischerweise nach TPA-Behandlung auftaucht (Li, W., 1994). Die Versuchsergebnisse deuteten darauf hin, daß die Herunterregulierung der PKC α , PKC δ , PKC ϵ oder PKC μ die Verminderung der Kontaktinhibition bewirkte. Um in einem nächsten Schritt zu klären, welche der PKC-Isoformen in die kontaktabhängige Wachstumshemmung involviert ist, sollten Isoform-spezifische Inhibitoren der PKCs eingesetzt werden. Da einerseits PKC ϵ nur in mitogenen Signalwegen beschrieben wurde (Mischak, H., 1993; siehe auch Einleitung) und andererseits PKC μ in den Zellen nur schwach exprimiert war, wurde mit der Untersuchung der α - und δ -Isoformen begonnen, da zudem aus der Literatur bekannt war, daß diese inhibitorisch auf die Zellproliferation wirken (Watanabe, T., 1992; Borner, C., 1995). Zur Untersuchung der α -Isoform stand der Inhibitor Gö6976 zu Verfügung. Er wirkt als ATP-Antagonist hemmend auf die α und β 1-Isoform (IC₅₀ = 2,3 nM). Rottlerin (5,7-Dihydroxy-2,2-dimethyl-6-(2,4,6-trihydroxy-3-methyl-5-acetylbenzyl)-8-cinnamoyl-1,2-chromen) wurde als selektiver Inhibitor der δ -Isoform (IC₅₀ = 3-6 μ M) beschrieben. Es ist ein Mallotoxin, wird aus *Mallotus philippinensis* isoliert und wirkt wahrscheinlich ebenfalls als kompetitiver Antagonist an der ATP-Bindungsstelle (Gschwendt, M, 1994a).

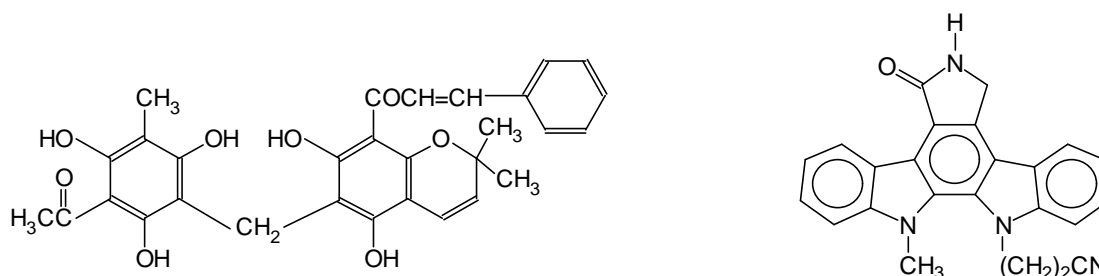


Abb. 2.3.2 PKC δ -Inhibitor Rottlerin (links) und PKC α / β I-Inhibitor Gö6976 (rechts).

Um den Effekt dieser Inhibitoren auf die Kontaktinhibition zu untersuchen, wurden die Zellen semikonfluent, 5×10^3 Zellen / well in DMEM / 0,5% FCS ausgesät. Nach 24 h wurden Serum und fixierte Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit des Inhibitors Gö6976 (10 nM) oder Rottlerin (1 μ M) zugegeben. Nach weiteren 20 h wurde dann die DNA-Synthese bestimmt (1.1.7). Die Behandlung mit dem PKC α/β I-Inhibitor verursachte eine 2-fache Steigerung der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen (nicht gezeigt), während die Wachstumshemmung durch Zugabe fixierter Zellen unbeeinflusst blieb. Im Gegensatz dazu hemmte der PKC δ -selektive Inhibitor Rottlerin die DNA-Synthese-Rate um ca. 50% (nicht gezeigt), wobei die Kontaktinhibition vollständig aufgehoben wurde (Abb. 2.3.3). Dies ließ auf eine Beteiligung der PKC δ in der Kontaktinhibition schließen, während die PKC α keine Rolle zu spielen schien.

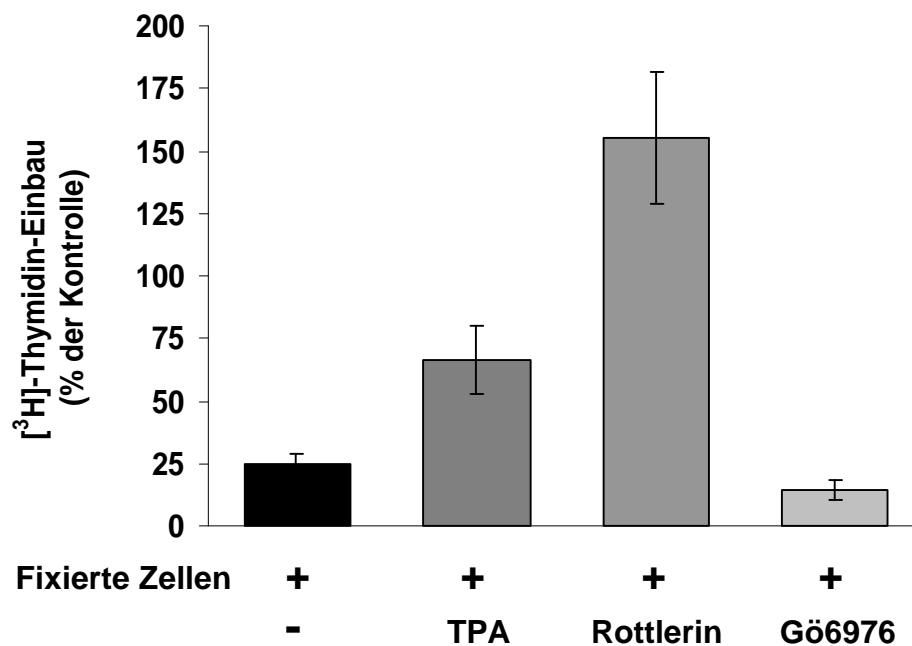


Abb. 2.3.3 Effekt von PKC-Inhibitoren auf die Kontaktinhibition. Semikonfluent ausgesäte FH109-Zellen wurden für 24 h von Serum depletiert und anschließend mit 10% FCS stimuliert in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit der beschriebenen Inhibitoren TPA (0,1 μ M), Rottlerin (1 μ M) und Gö6976 (10 nM) (Kontrolle = 100%). Die TPA-Behandlung begann aber direkt nach Aussaat der Zellen. Die Kontaktinhibition wurde durch simultane Zugabe fixierter Zellen induziert (+ fixierte Zellen). Nach 20 h wurde die DNA-Synthese durch [³H]-Thymidin-Einbau gemessen. Die Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

Rottlerin hemmt neben der PKC δ in äquieffektiven Konzentrationen die Calmodulin-abhängige Kinase III (CAM-Kinase III), ein Enzym, das in proliferationsfördernde Signalwege involviert ist (Gschwendt, M., 1994b). Sie wird durch mitogene Stimuli aktiviert und phosphoryliert den Elongationsfaktor2 (eEF2). Dadurch wird seine Ribosomen-Affinität herabgesetzt, was zur Unterbrechung der Proteinbiosynthese führt (Ryazanov, A.G., 1988). Die CAM-Kinase III ist somit wichtig für das Zellwachstum (Means, A.R., 1984). In humanen Tumoren, besonders in Brustkrebs, wird sie überexprimiert (Chafouleas, J.G., 1981) und erreicht eine hohe Aktivität in schnell wachsenden malignen Glioma-Zellen (Palfrey, H.C., 1987). Ihre Einbindung in wachstumsstimulierende Prozesse liefert eine plausible Erklärung für den proliferationshemmenden Nebeneffekt von Rottlerin in semikonfluenten Zellen.

Um den Rottlerin-Effekt näher zu charakterisieren, wurde der Inhibitor zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Kontaktinhibition durch fixierte Zellen hinzugefügt. Zu einem definierten Zeitpunkt 0 h wurden die synchronisierten Zellen mit Serum stimuliert und fixierte Zellen zugegeben. Die Zellen wurden dann zu den in der Abbildung 2.3.4 angegebenen Zeitpunkten mit Rottlerin behandelt. Nach 20 h wurde die DNA-Synthese durch [3 H]-Thymidin-Einbau bestimmt (1.1.7). Während durch Zugabe von Rottlerin noch 6 h nach Zugabe der fixierten Zellen die Kontaktinhibition vollständig aufgehoben werden konnte, war nach 10 h kein signifikanter Effekt mehr zu beobachten. Dies sprach für einen zellzyklusabhängigen und somit spezifischen Effekt von Rottlerin. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, daß das Auslösen der Kontaktinhibition auf die mittlere G1-Phase beschränkt war. Gibt man 10 h nach Serumstimulation fixierte Zellen zu den Kulturen, ist der Zellzyklus schon soweit fortgeschritten, daß keine Kontaktinhibition mehr ausgelöst werden kann (Wieser, R.J., 1999). Aus Durchfluß-zytometrischen Analysen war bekannt, daß sich die Zellen 10 h nach Serumstimulation in der mittleren G1-Phase befinden. Der Eintritt in die S-Phase erfolgt nach 16-18 h (Dietrich, C., 1996). Somit ist die Wirkung von Rottlerin auf die frühe bis mittlere G1-Phase beschränkt, was auf eine frühe Beteiligung der PKC δ in der Signalkaskade der Kontaktinhibition schließen läßt.

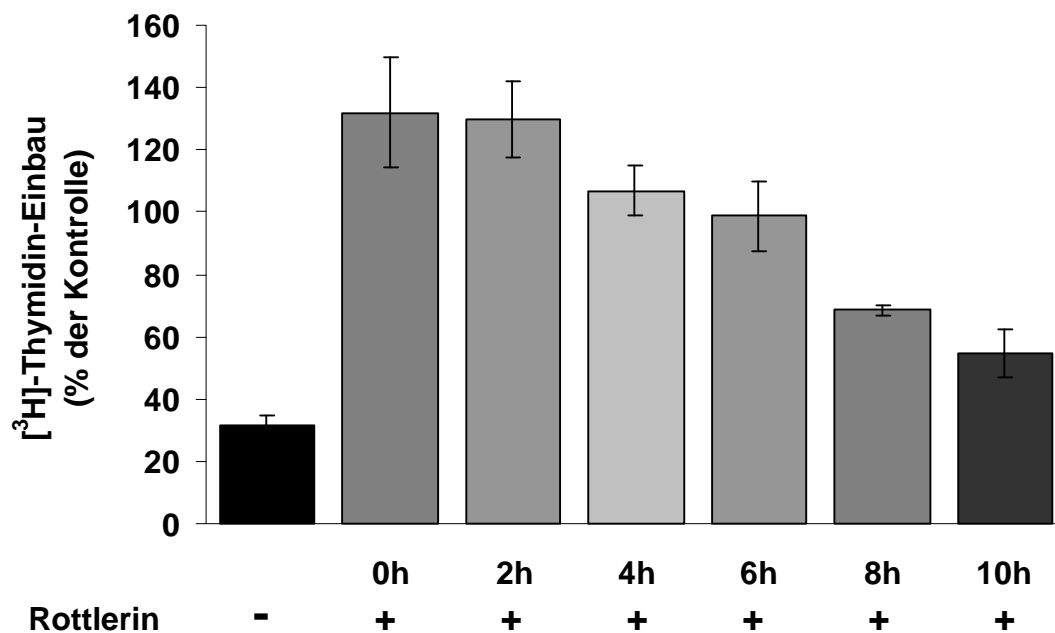


Abb. 2.3.4 Kinetik des Effekts der Rottlerin-Behandlung auf die Kontaktinhibition. Kontaktinhibition in FH109-Zellen wurde durch Zugabe fixierter Zellen ausgelöst. Rottlerin (1 μ M) wurde zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten nach Induktion der Kontaktinhibition zugegeben. Der erste Balken steht für kontaktinhibierte Zellen in Abwesenheit von Rottlerin. Kontrollen waren Serum-stimulierte Zellen ohne Zugabe fixierter Zellen (= 100%). Die Ergebnisse sind in % der korrespondierenden Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

Die Voraussetzung für den Eintritt von Zellen in die S-Phase des Zellzyklus ist die Phosphorylierung des Retinoblastom-Gen-Produkts, pRb. Im Gegensatz dazu verbleibt das pRb in kontaktinhibierten Zellen in seiner hypophosphorylierten Form (Wieser, R.J., 1999 und Abb. 2.3.5). Um die Zellzyklus-abhängige Rolle der PKC δ genauer zu bestimmen, wurden FH109-Zellen semikonfluent ($2,5 \times 10^5$ / 60-mm-Schale) oder konfluent ($3,5 \times 10^6$ / 60-mm-Schale) in DMEM / 10% FCS ausgesät. 4,5 h nach Aussaat war die Mehrzahl der Zellen adhärirt, und dieser Zeitpunkt wurde als 0 h definiert. Die Zellen wurden dann zu den in Abbildung 2.3.5 angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Auftrennung der Gesamtzelleextrakte (1.2.1) über 1-dimensionale SDS-PAGE (1.4.1) wurden pRb und PKC δ im Western Blot detektiert (1.5.2). Die hypophosphorylierte Form des pRb tauchte zum ersten Mal 6 h nach Auslösen der Kontaktinhibition durch Zell-Zellkontakte auf und wurde nach 24 h maximal. Parallel dazu konnte eine im Gel schneller wandernde Form der

PKC δ detektiert werden. Da aus der Literatur bekannt war, daß die Phosphorylierung bzw. Aktivierung der PKC δ in einer Abnahme der elektrophoretischen Mobilität resultiert, konnte daraus geschlossen werden, daß die nach 6 h auftauchende, niedrigere Bande der dephosphorylierten, inaktivierten PKC δ entspricht. Zusätzlich konnte ein ca. 2-facher Anstieg der PKC δ in kontaktinhibierten Zellen im Vergleich zu proliferierenden festgestellt werden.

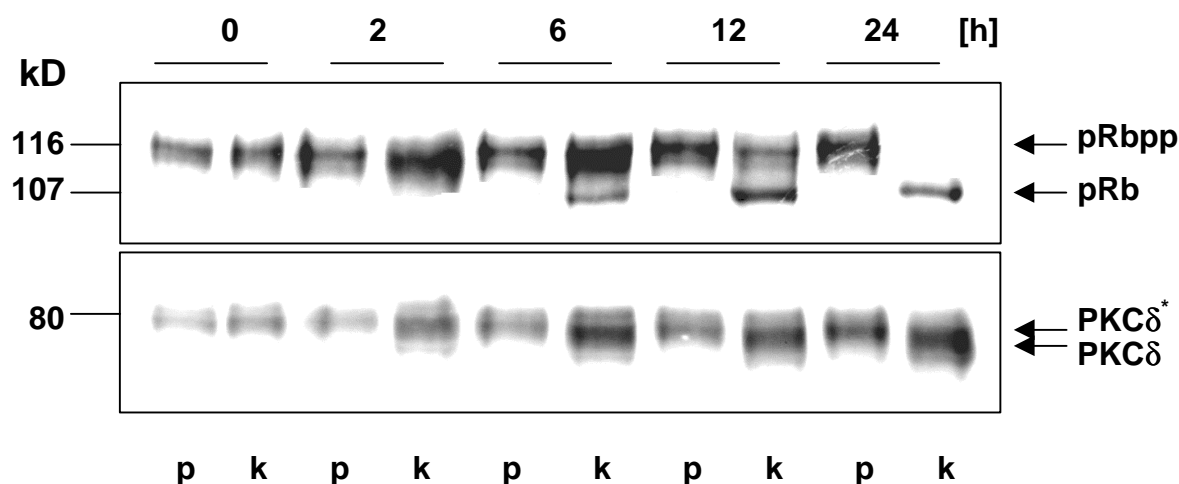


Abb. 2.3.5 Phosphorylierung von pRb und PKC δ in Abhängigkeit von Zell-Zellkontakten. FH109-Zellen wurden semikonfluent (p = proliferierend) oder konfluent (k = kontaktinhibiert) in DMEM / 10% FCS ausgesät. 0 h, 2 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Adhärenz wurden die Zellen geerntet. 15 μ g des Gesamtzellextrakts wurden durch 1-dimensionale SDS-PAGE aufgetrennt und pRB sowie PKC δ im Western Blot detektiert. pRbpp steht für die hyperphosphorylierte Form des pRb, PKC δ^* für die phosphorylierte PKC δ .

Der Phosphorylierungszustand der PKC δ in konfluenten und semikonfluenten Zellen sollte durch den Verdau mit der sauren Phosphatase aus Kartoffeln (PAP = Potato acid phosphatase) überprüft werden. Dieses Enzym spaltet unspezifisch alle Phosphatreste von Proteinen ab. Die Zellen wurden dafür 24 h wie oben beschrieben kultiviert. Um die Effektivität des Verdau zu überprüfen, wurde ein Ansatz semikonfluenter Zellen nach 24 h für 30 min mit TPA behandelt, was eine Tyrosin-Phosphorylierung der PKC δ auslöst. Dann wurde der CHAPS-Extrakt gewonnen (1.2.2), wobei der Hälfte des Ansatzes, die für den Verdau bestimmt war, keine Phosphataseinhibitoren zugesetzt werden durften. Der Verdau wurde wie unter 1.3.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die nichtzuverdauenden Proben in Abwesenheit des Enzyms den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Nach dem Verdau wurden die Proben gefällt und nach Auftrennung durch 1-

dimensionale SDS-PAGE (1.4.1) wurde die PKC δ im Western Blot detektiert (1.5.2). Während bei konfluenten Zellen keine Unterschiede in der Mobilität nach dem PAP-Verdau zu erkennen waren, zeigten die proliferierenden und TPA-behandelten Zellen einen deutlichen Bandenshift nach unten. Dadurch konnte bestätigt werden, daß es sich sowohl bei der TPA-behandelten als auch bei der in proliferierenden Zellen auftretenden Form um eine zu unterschiedlichen Graden phosphorylierte Form der PKC δ handelte, während in konfluenten Zellen PKC δ nicht phosphoryliert zu sein scheint.

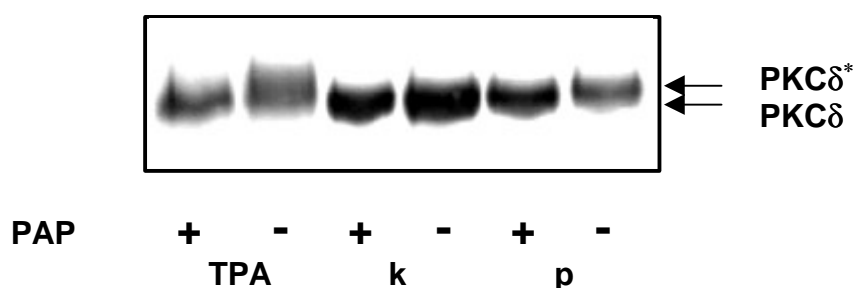


Abb. 2.3.6 Untersuchung des Phosphorylierungsgrades der PKC δ durch PAP-Verdau. FH109-Zellen wurden semikonfluent (p = proliferierend) oder konfluent (k = kontaktinhibiert) in DMEM / 10% FCS ausgesät. Nach 24 h wurden die Proteine durch CHAPS-Extrakt gewonnen und jeweils die Hälfte des Ansatzes einem PAP-Verdau unterworfen. Als Kontrolle für die Effizienz des Verdau wurden semikonfluente Zellen für 30 min mit TPA behandelt. 10 μ g des Gesamtzellextrakts wurden durch 1-dimensionale SDS-PAGE aufgetrennt und PKC δ im Western Blot detektiert. PKC δ steht für die nicht-phosphorylierte, PKC δ^* für die phosphorylierte Form.

Diese Ergebnisse und die der Kinetik deuten darauf hin, daß die PKC δ nach ausgelöster Kontaktinhibition, die sich in dem Auftreten der hypophosphorylierten Form des pRb zeigt, in einen dephosphorylierten inaktivierten Zustand übergeht. Dies bestätigt die Hypothese, daß die PKC δ schon sehr früh im Zellzyklus involviert ist.

Ist die Hypothese, daß PKC δ durch Zell-Zellkontakte aktiviert wird und zum Zellzyklusarrest führt, korrekt, so muß die Aktivierung des Enzyms zu einem Wachstumsstopp führen.

Der Polyether Bistraten A, isoliert aus *Lissoclinum bistratum*, ist als spezifischer Aktivator der PKC δ beschrieben (Watters, D.J., 1999). Nach Behandlung von HL60-Zellen mit Bistraten A konnte eine erhöhte Phosphorylierung, sowie eine Translokation der PKC δ in den Kern, beobachtet werden, was letztlich zum

Zellzyklusarrest führte (Griffiths, G., 1996). Allerdings ist der Mechanismus der Aktivierung noch nicht aufgeklärt.

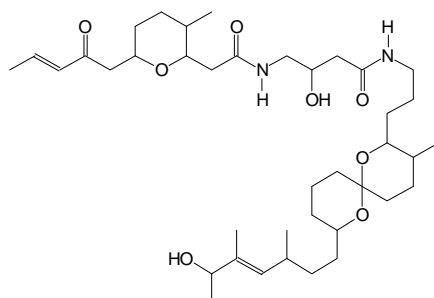


Abb. 2.3.7 Struktur des PKC δ -Aktivators Bistraten A.

Um den Effekt von Bistraten A auf das Wachstumsverhalten von humanen Fibroblasten zu untersuchen, wurden die FH109-Zellen semikonfluent in DMEM / 0,5% FCS ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Serum stimuliert in Anwesenheit und Abwesenheit von nicht-toxischen Konzentrationen an Bistraten A (10-20 nM). Die DNA-Synthese der behandelten Zellen wurde im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bei einer Konzentration von 15 nM auf 27% reduziert. Ein cytotoxischer Effekt des Bistratens konnte durch Trypanblau-Färbung ausgeschlossen werden (1.1.4).

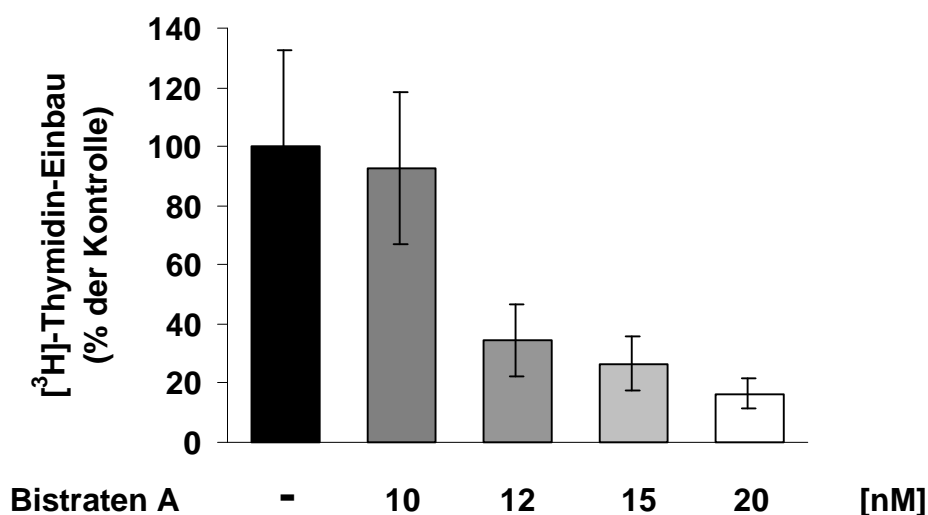


Abb. 2.3.8 Effekt des PKC δ -Aktivators Bistraten A auf das Wachstumsverhalten von FH109-Zellen. Semikonfluent ausgesäte FH109-Zellen wurden für 24 h von Serum depletiert und anschließend mit 10% FCS stimuliert in Abwesenheit (-) (Kontrolle = 100%) oder Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen von Bistraten A. Nach 20 h wurde die DNA-Synthese durch [³H]-Thymidin-Einbau gemessen. Die Ergebnisse sind in % der Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

Somit führt eine Inhibition der PKC δ durch TPA oder den Isoform-spezifischen Inhibitor Rottlerin zur Aufhebung der Kontaktinhibition, während ihre Aktivierung durch Bistraten A das Wachstum hemmt. Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle der PKC δ in der Wachstumsregulation humaner Fibroblasten hin.

Intrazelluläre Lokalisierung der PKC δ

Um weitere Hinweise auf die Funktion der PKC δ in der Kontaktinhibition zu erhalten, wurde ihre intrazelluläre Verteilung in Immunfluoreszenzstudien untersucht. Als Kontrolle galt PKC α , die nicht in die Kontaktinhibition involviert zu sein schien. FH109-Zellen wurden semikonfluent ($2,5 \times 10^5$ / 60-mm-Schale) und konfluent ($3,5 \times 10^6$ / 60-mm-Schale) auf Glasplättchen ausgesät. 24 h nach Adhärenz wurde die Immunfluoreszenz mit anti-PKC δ - und anti-PKC α -Antikörper durchgeführt (1.5.3.1). Die Kontaktinhibition wurde induziert, indem die Zellen konfluent ausgesät wurden. Die Immunfluoreszenzstudien zeigten, daß in proliferierenden FH109-Zellen PKC δ und PKC α ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu konnte in konfluenten Zellen eine Translokation der PKC δ in den Kern beobachtet werden, während PKC α nur im Cytoplasma zu finden war. Um die Relevanz dieser Kernlokalisierung der PKC δ besser zu verstehen, wurde in einem Kontrollexperiment die δ -Isoform durch Kurzzeit-Behandlung mit TPA aktiviert. Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenz ihre Lokalisierung festgestellt. Auch nach 30-minütiger TPA-Behandlung konnte eine Translokation der PKC δ vom Cytoplasma in den Kern, aber auch zu den Fokalkontakten sowie an cytoskelettäre Strukturen beobachtet werden, während das inaktive Isomer PDD keinen Effekt auf die intrazelluläre Verteilung ausübte. Die Tatsache, daß PKC δ nicht vollständig in den Kern transloziert wurde, sondern auch mit der Membran (Abb. 2.3.9 F) oder Fokalkontakten (D, siehe Pfeile) assoziiert war, spricht für eine multifunktionale Rolle der PKC δ . Es wurde somit gezeigt, daß sowohl Zell-Zellkontakte, als auch die Aktivierung der PKC δ durch kurzzeitige Behandlung mit TPA, in einer Kerntranslokation resultieren.

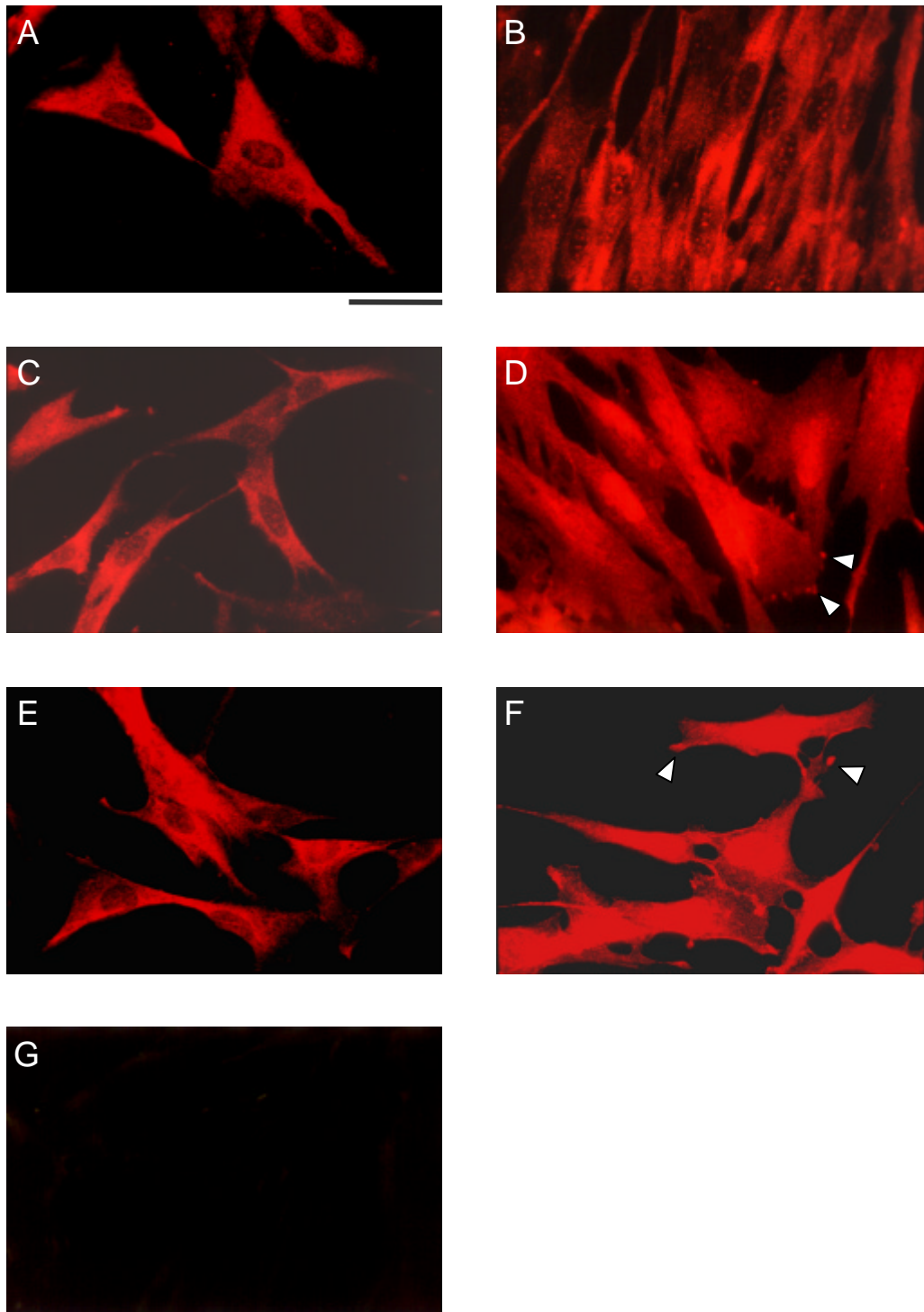


Abb. 2.3.9 Intrazelluläre Verteilung von PKC δ und PKC α . FH109-Zellen wurden semikonfluent (A, C) und konfluent (B, D) in Anwesenheit von Serum ausgesät. Nach 24 h wurde eine Immunfluoreszenz mit anti-PKC δ - (C, D) und anti-PKC α -Antikörper (A, B) durchgeführt. (E, F) Zellen wurden semikonfluent ausgesät und für 30 min mit 0,1 mM TPA (F) oder dem inaktiven Isomer PDD (E) behandelt und dann PKC δ detektiert. Als Negativkontrolle wurde der anti-PKC δ -Antikörper vor der Immunfluoreszenz mit einem Blockpeptid inkubiert (G) (Pfeile zeigen Fokalkontakte, Balken $\hat{=}$ 40 μ M).

Aufgrund der Ergebnisse der Zeitkinetik mit Rottlerin war zu erwarten, daß PKC δ innerhalb der ersten 6 h als Reaktion auf Zell-Zellkontakte in den Kern wandert. Darum wurde die intrazelluläre Verteilung der PKC δ zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Kontaktinhibition untersucht. In exponentiell wachsenden FH109-Zellen war PKC δ zu allen Zeitpunkten nur im Cytoplasma zu detektieren. In Übereinstimmung mit der Hypothese, daß PKC δ schon früh im Zellzyklus involviert ist, wurde PKC δ nach der Induktion von Zell-Zellkontakten in konfluenten Kulturen schnell in den Kern transloziert mit einem Maximum zwischen 2-6 h (Abb. 2.3.10). Dies bestätigt erneut eine Funktion der PKC δ in der Kontaktinhibition während der frühen bis mittleren G1-Phase.

Nach der Behandlung der FH109-Zellen mit Rottlerin war außer der Aufhebung der Kontaktinhibition eine Morphologieänderung der Zellen zu beobachten. Da ein intaktes Cytoskelett essentiell für die Weiterleitung wachstumsinhibierender Signale durch den Contactinhibin-Rezeptor ist, der selber auch mit Aktinfilamenten assoziiert ist, sollte als nächstes das Aktingerüst ohne und mit Rottlerin-Behandlung in Immunfluoreszenzstudien untersucht werden (1.5.3.1). Dazu wurden die Zellen, wie schon beschrieben, semikonfluent in Anwesenheit und Abwesenheit von Rottlerin (1 μ M) ausgesät. Nach 24 h wurde das Aktingerüst mit FITC-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Wie Abbildung 2.3.11 zeigt, bildeten unbehandelte FH109-Zellen schöne, lange Streißfasern aus, während Rottlerin-Behandlung zu einer Zerstörung der Streißfasern und einer polygonalen Zellform führte. Da aus vorangegangenen Versuchen bekannt war, daß der Contactinhibin-Rezeptor geclustert vorliegen muß, um die wachstumsinhibierenden Signale weitergeben zu können, liegt die Vermutung nahe, daß durch die Umlagerung des Cytoskeletts das Clustering verhindert wird, was zu einer Unterbrechung des Signalweges der Kontaktinhibition führt.

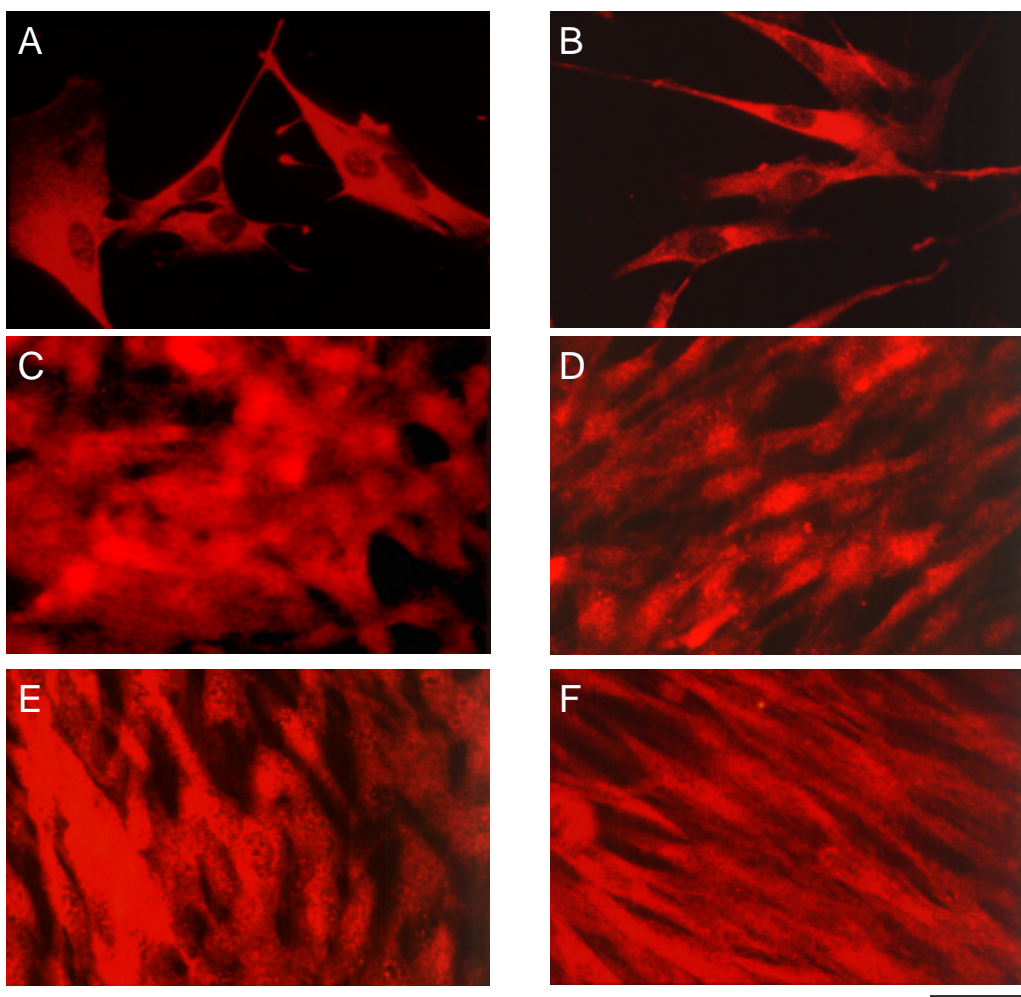


Abb. 2.3.10 Zeitkinetik der Translokation der PKC δ in FH109-Zellen. FH109-Zellen wurden semikonfluent (A, B) ausgesät und mittels Immunofluoreszenz die Lokalisierung der PKC δ zum Zeitpunkt 2 h (A) und nach 24 h (B) detektiert. Induktion der Kontaktinhibition wurde induziert durch Aussäen der FH109-Zelle zu Konfluenz (C, D, E, F). Die Detektion mit dem anti-PKC δ -Antikörper erfolgte nach 2 h (C), 6 h (D), 12 h (E) und 24 h (F) (Balken \cong 40 μ M).

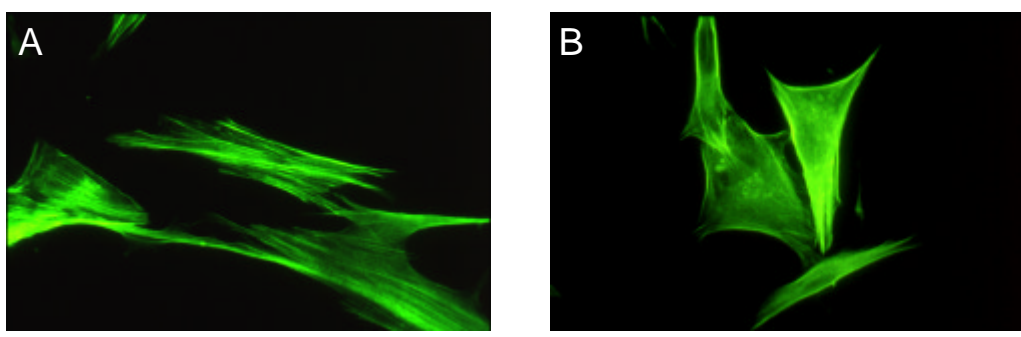


Abb. 2.3.11 Effekt von Rottlerin auf Aktin-Stressfasern in FH109-Zellen. FH109-Zellen wurden semikonfluent ausgesät und in Anwesenheit (B) und Abwesenheit (A) von Rottlerin (1 mM) 24 h kultiviert. Die Aktinfasern wurden durch FITC-konjugiertes Phalloidin angefärbt (Balken \cong 40 μ M).

Untersuchung der Rolle der PKC δ in anderen Zellsystemen

Humane Keratinozyten (HaCaT)

Es war nun interessant zu untersuchen, ob die Rolle der PKC δ in der Kontaktinhibition Zelltyp-spezifisch war, oder ob die Ergebnisse in anderen Zelllinien bestätigt werden können. Aus der Literatur war bekannt, daß die Transfektion von HaCaT-Zellen mit onkogenem Ha-ras zur Sekretion von TGF α führt, was die Herunterregulierung der PKC δ auslöst (Geiges, D., 1995). Somit scheint PKC δ auch in Keratinozyten in die negative Wachstumsregulation involviert zu sein. Im Unterschied zu FH109-Zellen ist die PKC δ selbst in proliferierenden HaCaT-Zellen überwiegend im Kern lokalisiert (Doktorarbeit, Gumpert, N.). Um ihre Rolle in Keratinozyten aufzuklären, wurde der Effekt des PKC δ -Inhibitors Rottlerin auf das Wachstumsverhalten von humanen Keratinozyten untersucht. Die Kontaktinhibition wurde in diesem Zellsystem durch Aussäen der Zellen auf mit Glutardialdehyd-fixierten Zellrasen (1.1.8) induziert, wie bereits beschrieben (2.1). HaCaT-Zellen wurden semikonfluent alleine oder auf fixiertem Zellrasen in Anwesenheit und Abwesenheit von Rottlerin in CG-Medium / 0,5% FCS ausgesät. Während sich die unbehandelten Zellen durch fixierten Zellrasen um 67% hemmen ließen, zeigten die mit Rottlerin behandelten Zellen sogar eine Wachstumssteigerung auf 188%.

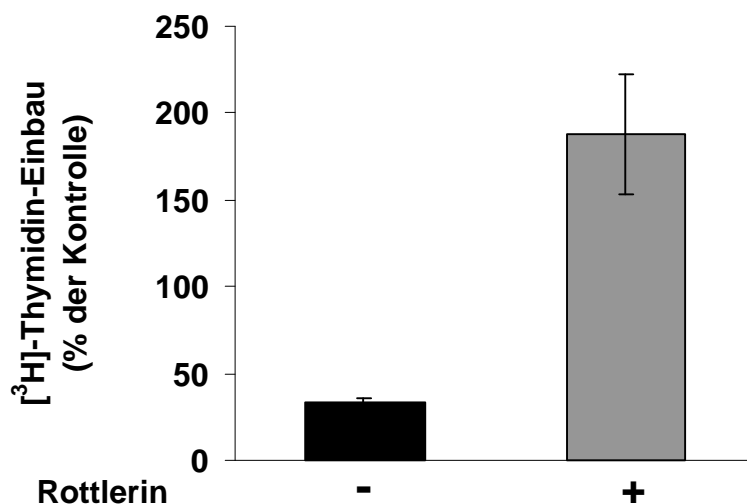


Abb. 2.3.12 Effekt von Rottlerin auf die Kontaktinhibition in humanen Keratinozyten (HaCaT).

Semikonfluente HaCaT-Zellen wurden auf fixiertem Zellrasen in Anwesenheit (linker Balken) und Abwesenheit (rechter Balken) von Rottlerin (1 μ M) kultiviert. Die DNA-Synthese wurde durch [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Kontrollen (100%) sind exponentiell proliferierende Zellen. Ergebnisse werden in % der zugehörigen Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

In HaCaT-Zellen war unter Rottlerin-Behandlung ebenfalls eine Morphologieänderung zu beobachten. Nachdem die Zellen semikonfluent in Abwesenheit und Anwesenheit von Rottlerin ausgesät worden waren, wurde nach 24 h eine Hämatoxylin / Eosin-Färbung durchgeführt (1.1.9), um die Veränderungen zu detektieren. Die normalerweise Pflasterstein-artigen Keratinozyten nahmen unter Rottlerin eine sonst nur für Fibroblasten typische, spindelförmige Form an. In Analogie zu den Ergebnissen in FH109-Fibroblasten führte die Rottlerin-Behandlung zur Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts wie durch Fluoreszenzfärbung (1.5.3.1) mit FITC-konjugiertem Phalloidin gezeigt werden konnte (Abb. 2.3.13). Da jedoch Aktin in HaCaT-Zellen nur schwach exprimiert wird, wurden zusätzliche Änderungen von Intermediärfilamenten untersucht (Doktorarbeit, N. Gumpert). Dabei konnte eine Umorganisation der Filamente des Cytokeratin 7 unter Rottlerin-Behandlung nachgewiesen werden.

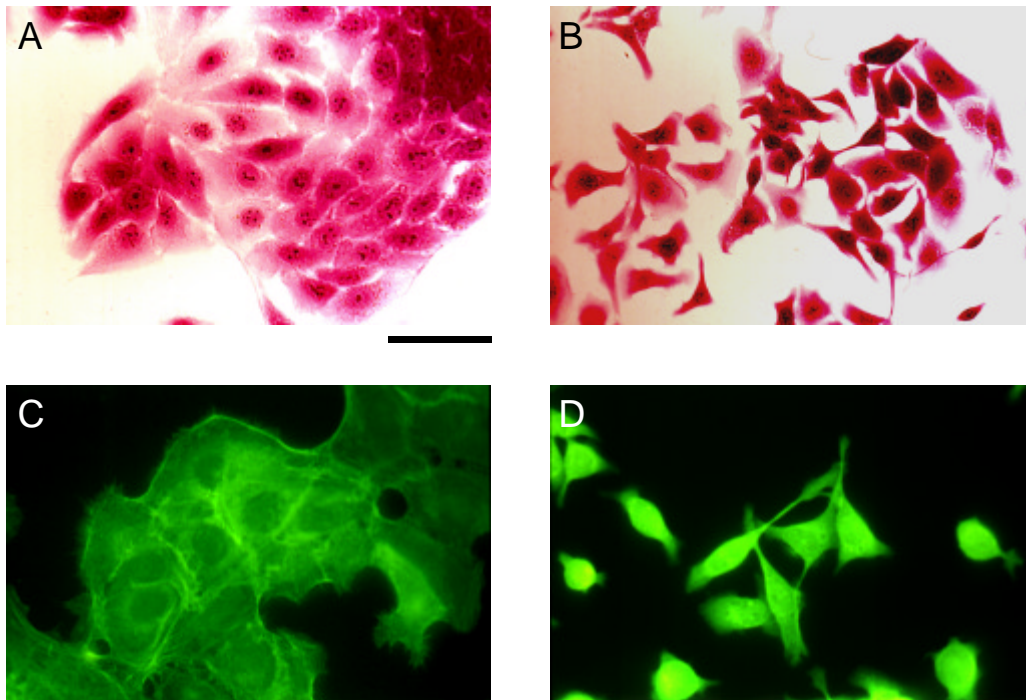


Abb. 2.3.13 Effekt von Rottlerin auf die Zellmorphologie von humanen Keratinozyten. HaCaT-Zellen wurden semikonfluent ausgesät und in Anwesenheit (B, D) und Abwesenheit (A, C) von Rottlerin (1 μM) 24 h kultiviert. Zur Detektion der Zellform wurden die Zellen mit Hämatoxylin / Eosin gefärbt (A, B). Die Aktinfasern wurden durch FITC-konjugiertes Phalloidin angefärbt (C, D) (Balken $\hat{=}$ 40 μM).

Maus-Fibroblasten (NIH3T3)

Von NIH3T3-Zellen ist bekannt, daß die Überexpression des Wildtyps der PKC δ in einer langsameren Wachstumsrate und geringeren Sättigungsdichte resultiert (Mischak, H., 1993). In PKC δ -überexprimierenden Zellen ist auch der Proteinlevel an PKC δ in konfluenten Kulturen höher als in proliferierenden. Daraus läßt sich auf eine mögliche Beteiligung der PKC δ in der Kontaktinhibition schließen. Um in NIH3T3-Zellen den Effekt von Rottlerin auf die kontaktabhängige Wachstumshemmung zu untersuchen, wurden die Zellen nach einem leicht modifizierten Modell kultiviert. Die Aussaat semikonfluenter Zellen erfolgte in DMEM / 10% FCS, da die Zellen sonst nicht ausreichend adhärirten. Nach 24 h wurden dann zu der Hälfte des Ansatzes die fixierten Zellen (1.1.8) und Rottlerin (1 μ M) zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde die DNA-Synthese gemessen (1.1.7). In Abwesenheit von Rottlerin führte die Zugabe fixierter Zellen zu einer Hemmung der DNA-Synthese auf 54%. Daß die Hemmung in NIH3T3-Zellen nicht ganz so hoch ausfiel wie in FH109-Zellen, läßt sich dadurch erklären, daß die Maus-Fibroblasten nicht synchronisiert wurden. Durch Rottlerin-Behandlung konnte auch hier die Kontaktinhibition aufgehoben werden. Der hemmende Nebeneffekt von Rottlerin auf semikonfluente Zellen betrug 43%.

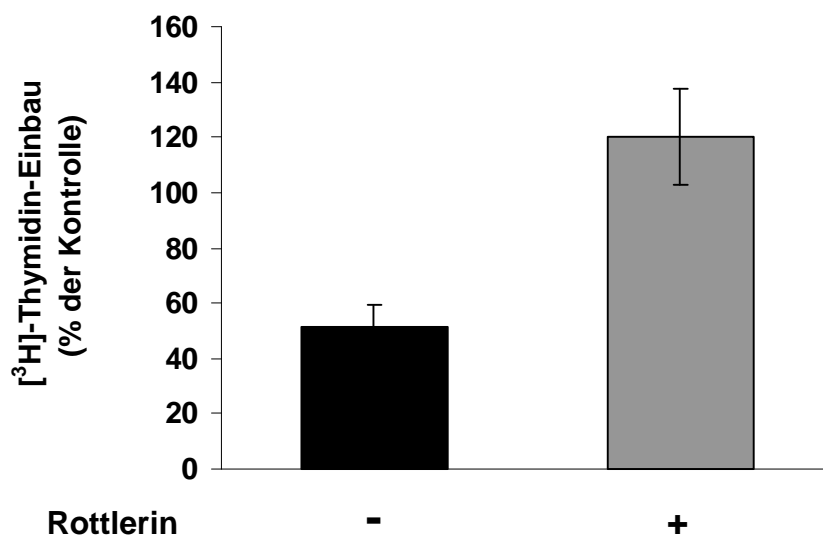


Abb. 2.3.14 Effekt von Rottlerin auf die Kontaktinhibition in Maus-Fibroblasten (NIH3T3). Semikonfluente NIH3T3-Zellen wurden in Anwesenheit (linker Balken) und Abwesenheit (rechter Balken) von Rottlerin (1 μ M) in DMEM / 10% FCS kultiviert. Die Kontaktinhibition wurde durch Zugabe fixierter Zellen ausgelöst. Die DNA-Synthese wurde durch [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Kontrollen (100%) waren exponentiell proliferierende Zellen. Ergebnisse werden in % der zugehörigen Kontrolle angegeben (Mittelwert aus 6 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung).

Aus der Literatur war bekannt, daß die Überexpression der PKC δ in konfluenten Kulturen einen höheren Proteinexpressionslevel annahm als in proliferierenden Zellen (Lehel, C., 1994). Es sollte nun untersucht werden, ob auch unter natürlichen Bedingungen ein in konfluenten Zellen erhöhter Proteinlevel, wie es auch in FH109-Zellen der Fall ist, vorlag. Dazu wurden die Zellen wie schon für FH109-Zellen beschrieben semikonfluent und konfluent ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellextrakte gewonnen (1.2.1) und nach ihrer Auftrennung durch 1-dimensionale SDS-PAGE (1.4.1) die PKC δ -Isoform im Western Blot detektiert (1.5.2). Es mußten jeweils 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen werden, da die endogene PKC δ in NIH3T3-Zellen nur schwach exprimiert wurde. Während die PKC δ in proliferierenden Zellen kaum zu detektieren war, stieg der Proteinlevel in konfluenten Zellen um ein Vielfaches an.

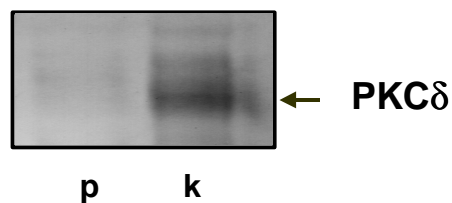


Abb. 2.3.15 Proteinexpression der PKC δ -Isoform NIH3T3-Zellen. Die Zellen wurden semikonfluent (p = proliferierend) oder konfluent (k = kontaktinhibiert) in DMEM / 10% FCS ausgesät. Nach 24 h wurden Zellextrakte gewonnen. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (je 30 μ g) wurden durch 1-dimensionale SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot die PKC δ -Isoform detektiert.

Auch NIH3T3-Zellen zeigten bei Hemmung der PKC δ durch den Inhibitor Rottlerin eine Morphologieänderung, wie sie schon in FH109-Zellen zu beobachten war. Das Cytoskelett wurde umgebaut, und die Zellen nahmen eine polygonale Form an. Außerdem war die Bildung von Zellausläufern vermehrt zu beobachten (Abb. 2.3.16).

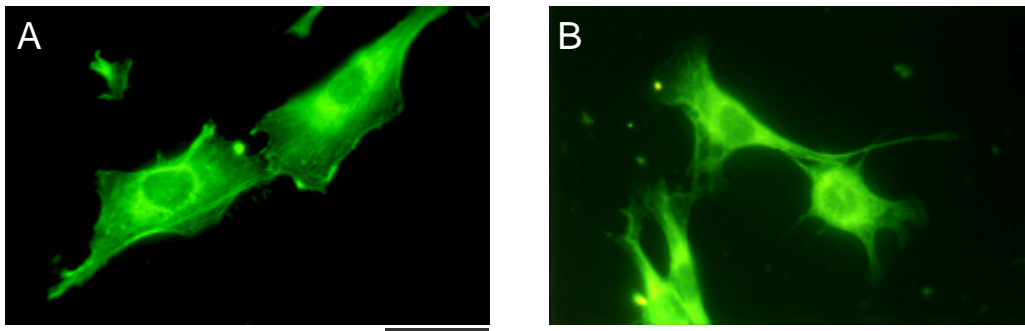


Abb 2.3.16 Effekt von Rottlerin auf Aktin-Stressfasern in NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden semikonfluent ausgesät und in Anwesenheit (B) und Abwesenheit (A) von Rottlerin (1 mM) 24 h kultiviert. Die Aktinfasern wurden durch FITC-konjugiertes Phalloidin angefärbt (Balken $\hat{=}$ 40 μ M).

Expression einer *dnPKC δ* in NIH3T3-Zellen

Um weitere Evidenzen für eine Rolle der PKC δ in der Kontaktinhibition zu erlangen, sollten NIH3T3-Zellen stabil mit einer dominant-negativen Mutante der PKC δ transfiziert werden. Diese Mutante wurde von Shigeo Ohno aus Japan zur Verfügung gestellt. Sie besteht aus der vollständigen cDNA der PKC δ (Hirai, S.I., 1994). Durch den Austausch zweier Arginine gegen Alanin (DR144/145A) in der Pseudosubstrat-Domäne, kann das Pseudosubstrat die Substrat-Domäne nicht mehr blockieren, und das Enzym ist konstitutiv aktiv. Die weitere Punktmutation eines Lysins in Alanin (DK376A) in der ATP-Bindungs-Domäne ist verantwortlich für den dominant-negativen Effekt (Hirai, S.I., 1994). Durch diese Mutation kann kein ATP mehr von dem Enzym gebunden werden, und so ist zwar eine Bindung des Substrats aber keine Phosphorylierung mehr möglich.

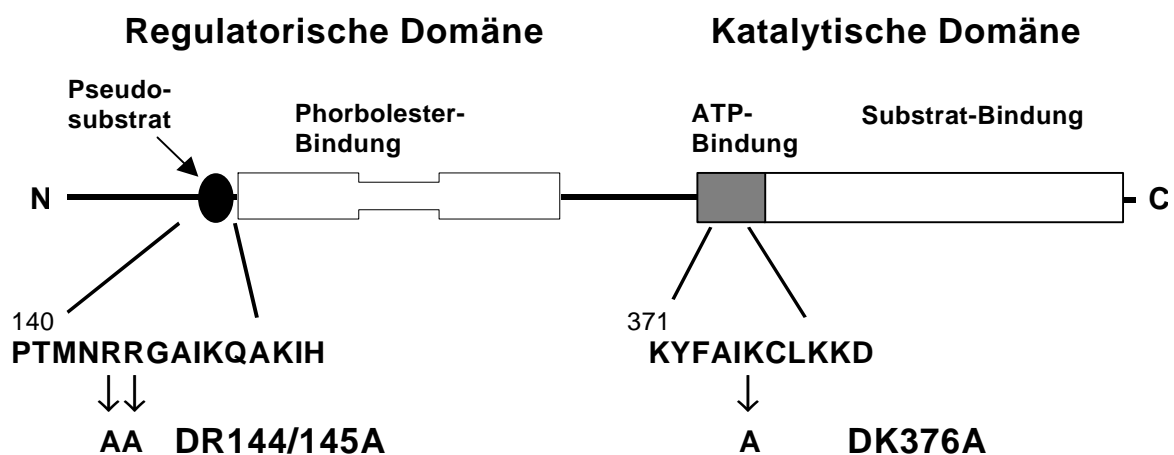


Abb. 2.3.17 Schematische Darstellung Proteinstruktur der *dnPKC δ* . Pfeile symbolisieren Aminosäure-Austausch.

Das Konstrukt der dominant-negativen PKC δ war über eine *EcoRI*-Schnittstelle in einen *pcDL-SR α 296*-Vektor eingefügt worden. Es stand unter der Kontrolle eines SV40-Promotors, dessen Effizienz durch eine zusätzliche R-Sequenz aus dem Long terminal repeat (LTR) gesteigert wurde (Ohno, S., 1988). Der Vektor enthielt keinen Selektionsmarker, sodaß ein zweites Plasmid kotransfiziert werden mußte. Hierfür wurde der *pcDNA3*-Vektor ausgewählt, der ein Neomycin-Resistenzgen besaß, was ebenfalls unter der Kontrolle eines SV40-Promotors stand.

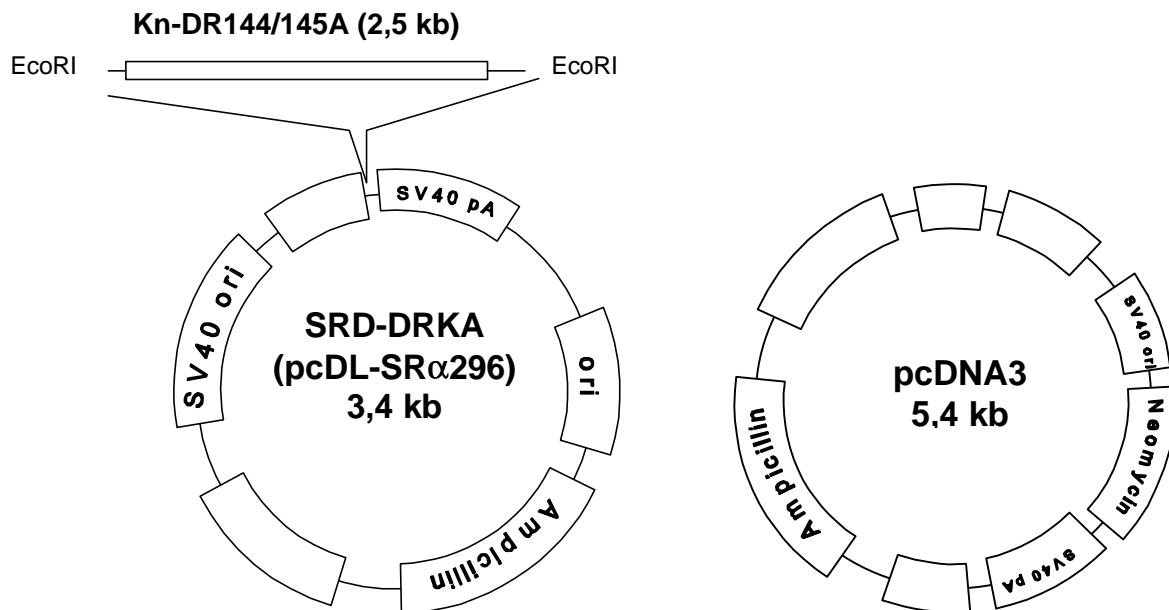


Abb. 2.3.18 Schema des Vektors mit dem Konstrukt der dnPKC δ (links) und des Kovektors mit dem Selektionsgen (rechts).

Die Transfektion der NIH3T3 Zellen wurde, wie unter 1.6.9 beschrieben, mit Hilfe des Transfektionsreagenz Roti-fect durchgeführt. Dabei wurden der Vektor mit der dnPKC δ und der mit dem Selektionsgen im Verhältnis 1:10 eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem leeren pcDL-SR α 296-Vektor transfiziert. Über einen Zeitraum von mehr als drei Wochen wurde in Genitcin-haltigem DMEM / 10% FCS selektioniert. Die Zellen, die mit der dnPKC δ transfiziert wurden, wuchsen immer weniger adhärent, was ein Charakteristikum transformierter Zellen ist. Zusätzlich zeigten sie morphologische Veränderungen. Es gelang jedoch nicht, die Transfektanten in Kultur zu halten, da sie nach und nach abstarben. Höchstwahrscheinlich übernimmt PKC δ eine so essentielle Funktion in der Zellzykluskontrolle, daß ein dauerhaftes Ausschalten der Kinase von der Zelle nicht toleriert wird. In einem nächsten Ansatz sollten die NIH3T3-Zellen daher transient mit der dnPKC δ transfiziert werden. Da die endogene PKC δ in den Zellen nur schwach exprimiert wird, konnten transfizierte von nicht-transfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz unterschieden werden. Diese wurde 48 h nach Transfektionsbeginn durchgeführt. Es ließ sich dadurch eine Transfektionseffizienz von ca. 30% ermitteln. Diese Ausbeute war zu gering, um das Wachstumsverhalten

der Zellen in Proliferationstests zu untersuchen. Es konnten jedoch die morphologischen Veränderungen der Transfektanten detektiert werden. Dazu wurden die Zellen für die Transfektion auf Glasplättchen semikonfluent ausgesät, und nach 24 h wurde die Transfektion durchgeführt. Nach 48 h wurde dann die Immunfluoreszenz mit einem anti-PKC δ -Antikörper vorgenommen, um die transfizierten Zellen zu identifizieren. Während die Kontrollzellen auf der Extrazellulären Matrix gespreitet waren, zeigten die transfizierten Zellen einen abgerundeten Zellkörper und die Ausbildung langer Aktin-haltiger Ausläufer, wie durch Doppelimmunfluoreszenz mit FITC-konjugiertem Phalloidin gezeigt werden konnte (1.5.3.2). Der durch die Expression der dnPKC δ entstandene Phänotyp ist sehr ähnlich dem von mit onkogenem Ha-ras-transfizierten NIH3T3-Zellen (Überall, F., 1999). Neben ihrer morphologischen Veränderung zeigten die mit dnPKC δ transfizierten NIH3T3-Zellen auch Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wuchsen die Transfektanten Foci-ähnlich, was auf einen transformierten Phänotyp hinweist. Solch ein Wachstumsverhalten ist charakterisiert durch den Verlust der Kontaktinhibition (Abb. 2.3.19).

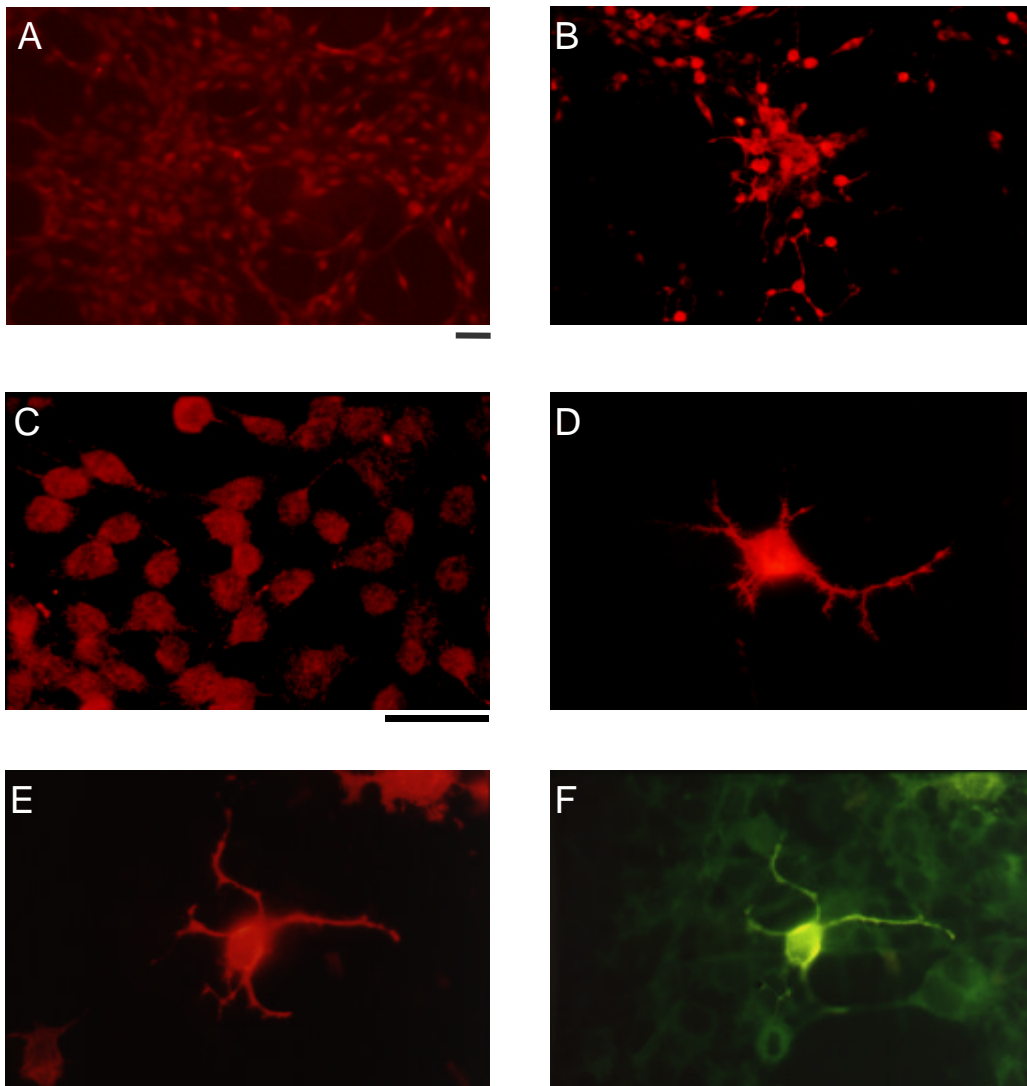


Abb. 2.3.19 **Transiente Expression der dnPKC δ in NIH3T3-Zellen.** NIH3T3-Zellen wurden semikonfluent ausgesät und in DMEM / 10% FCS kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit der dnPKC δ transfiziert (B, D, E, F). 48 h nach der Transfektion wurde eine Immunfluoreszenz mit anti-PKC δ -Antikörper durchgeführt (A, B, C, D). Die morphologische Änderung des Aktin-Cytoskeletts wurde durch Doppelimmunfluoreszenz von PKC δ (E) und Aktin (F) detektiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Vektor ohne Insert transfiziert (A, C) (Balken \cong 40 μ M).

3. Diskussion

TGF β und Kontaktinhibition sind wichtige Regulatoren des Zellwachstums. Die Zerstörung dieser Mechanismen entkoppelt die Zellantwort von der Kontrolle des zellulären Umfelds und führt zu malignem Zellwachstum, was sich *in vitro* durch Criss-Cross-Wachstum und Foci-Bildung manifestiert. Der zunehmende Verlust der Antwort auf diese wachstumsinhibierenden Signale ist meist eng verknüpft mit fortschreitender Tumorprogression. Sowohl Zell-Zellkontakte als auch der durch TGF β -induzierte Signalweg führen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Daher lag der Schluß nahe, daß es noch mehr Parallelen zwischen diesen beiden Signalwegen geben sollte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine dominant-negative Mutante des T β RII in HaCaT-Zellen stabil exprimiert. Die Expression des dnT β RII hatt gegenüber einer Deletion im TGF β 1-Gen den Vorteil, daß das Gleichgewicht zwischen den drei TGF β Isoformen nicht gestört war. Deletion oder Überexpression von TGF β 1 beeinflusst bekanntermaßen auch die Expression von TGF β 2 und TGF β 3 (Escherick, J.S., 1993). Dies führte in früheren Untersuchungen oft zu widersprüchlichen Ergebnissen in der Literatur. Da alle drei Isoformen den gleichen Rezeptor benutzen, unterbricht die Expression einer dominant-negativen Mutante des TGF β -Rezeptors Typ II die Signaltransduktion aller drei TGF β -Isoformen. Folglich wird kein Phänotyp generiert, der auf der Störung des Gleichgewichts zwischen den drei Isoformen beruht.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen Kontaktinhibition und TGF β -induziertem Signaltransduktion gezeigt werden. So führte die Expression einer dominant-negativen Mutante des TGF β -Rezeptors Typ II in humanen Keratinozyten, HaCaT, nicht nur zu einer erhöhten Sättigungsdichte, sondern zu einem Verlust der Hemmung, der durch Glutardialdehyd-fixierten Zellrasen imitierten Zell-Zellkontakte.

Wenn ein Defekt im T β RII genügte um die Kontaktinhibition aufzuheben, so mußte es sich hierbei um einen den Zell-Zellkontakten nachgeschalteten Signalweg handeln. Daß die Induktion der Kontaktinhibition durch Contactinhibin auf fixierten Zellen noch funktionierte, konnte dadurch gezeigt werden, daß ein Zellrasen aus dnT β RII-Klonen durchaus zur Hemmung von Wildtyp-Zellen führt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß durch den Verlust des TGF β -Weges über sekundäre Effekte in der Zelle z.B. Veränderungen in der Zellmembran das Clustering des Contactinhibin-Rezeptors in den Klon-Zellen verhindern und damit die

Voraussetzung für die Interaktion mit Ci stören. In der intrazellulären Lokalisierung und den isoelektrischen Punkten des CiR konnte zwischen Wildtyp und Mutante jedoch kein Unterschied festgestellt werden.

Wie in Zellen die Produktion und Aktivierung von TGF β gesteuert wird, ist nur unzureichend geklärt. Es ist aber bekannt, daß die extrazelluläre Matrix die Expression von TGF β 1 reguliert (Streuli, C.H., 1993). Stimmt die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, daß durch Zell-Zellkontakte der TGF β -Signalweg induziert würde, so wäre dies nur über eine gesteigerte Produktion oder Aktivierung von TGF β möglich. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese haben Northern Blot-Analysen gezeigt, daß Zell-Zellkontakte zu einem erhöhten Expressionlevel an TGF β 1-mRNA führen. Damit konnte zum ersten Mal die Regulation der TGF β 1-Genexpression durch Zell-Zellkontakte gezeigt werden. Die Aufklärung der Mechanismen, über die Zell-Zellkontakte die Produktion von TGF β 1 regulieren, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen der Arbeitsgruppe.

Während die Bedingungen der Interaktion von Contactinhibin und seinem Rezeptor bereits gut untersucht sind, ist nur sehr wenig über die Weiterleitung dieser Signale bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Second-messenger-Systeme identifiziert werden. Signaltransmitter, die entscheidende Knotenpunkte in der negativen Wachstumsregulation innehaben, werden auch als Tumorsuppressoren bezeichnet. Sie besitzen meist die folgenden gemeinsamen Charakteristika:

(i) Ihre Aktivierung führt zu einem Zellzyklusstopp, während ihre Inhibierung zu unkontrolliertem Zellwachstum führt. (ii) Daher findet man sie *in vivo* in transformierten Zellen oft durch Mutation ausgeschaltet oder sie werden gar nicht exprimiert. (iii) In nicht-transformierten, konfluenten Zellen kann ihr Proteinexpressionslevel erhöht sein. Auch die PKC δ zählt zu den Tumorsuppressoren. So wird z.B. die Tumor-promovierende Wirkung des Tumorpromotors TPA nicht mehr auf die Aktivierung der PKC sondern auf die Herunterregulierung bestimmter PKC-Isoformen, vor allem der δ -Isoform, zurückgeführt (siehe Einleitung). Für eine Beteiligung der PKC in der kontaktabhängigen Wachstumskontrolle gab es in Voruntersuchungen bereits erste Anhaltspunkte. So resultierte die Langzeit-Behandlung mit TPA in einer starken Reduktion der Kontaktinhibition. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde unter anderem die δ -Isoform herunterreguliert. Die Behandlung von FH109-, HaCaT- und NIH3T3-Zellen mit dem PKC δ -spezifischen Inhibitor Rottlerin führte zur Aufhebung der Kontaktinhibition. Damit ist der hier zu Grunde liegende Mechanismus nicht Zelltyp-spezifisch sondern scheint allgemein gültig zu sein. Die

Proteinexpressionslevel der PKC δ ist in konfluenten FH109- und NIH3T3-Zellen erhöht im Vergleich zu proliferierenden Kulturen. Daraus läßt sich schließen, daß ihre Expression über Zell-Zellkontakte reguliert wird. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurden in PKC δ -überexprimierenden NIH3T3-(Lehel, C., 1994), vaskulären glatten Muskelzellen (Fukumoto, S., 1997) und C6 Glioma-Zellen (Moreton, K., 1995) die gleichen Beobachtungen gemacht.

Aber nicht nur ihre Expression wird über Zell-Zellkontakte gesteuert. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß PKC δ durch die Induktion von Zell-Zellkontakten vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert wurde. Da es nach Aktivierung der PKC δ durch kurze TPA-Behandlung ebenfalls zu einer Translokation in den Kern kam, beruhte die Änderung der intrazellulären Verteilung der PKC δ durch Zell-Zellkontakte wahrscheinlich auf ihrer Aktivierung. Wie in Kinetiken gezeigt werden konnte, ist die Translokation der PKC δ in den Kern sowie die Wirkung von Rottlerin auf die Kontaktinhibition 2-6 h nach Induktion der Zell-Zellkontakte maximal. Das deutet auf eine zeitlich sehr präzise Rolle der PKC δ in der Zellzyklusregulation hin. In Übereinstimmung damit war in vielen unterschiedlichen Zelltypen die Inhibition der DNA-Synthese dann am effektivsten, wenn ein PKC-Agonist 4-6 h nach Serumstimulation zugegeben wurde (Frey, M.R., 1997; Nakaigawa, N., 1996). In einigen Arbeiten konnte ein inhibitorischer Effekt der PKC auf den Zellzyklus durch die Inhibierung der Phosphorylierung der Pocketproteine nachgewiesen werden (Black, J.D., 2000). So wäre die Interaktion mit Zellzyklusregulatorischen Proteinen, wie z.B. Cyclin-abhängige Kinasen, eine Möglichkeit der PKC δ , den Zellzyklus zu stoppen. Fukumoto *et al.* haben gezeigt, daß die Überexpression der PKC δ in vaskulären glatten Muskelzellen die Herunterregulation von CyclinD1 und CyclinE, sowie die gesteigerte Expression des Cdk-Inhibitors p27 bewirkt (Fukumoto, S., 1997). Auch konnte in vielen Zellen eine PKC-induzierte Heraufregulierung von p21 beobachtet werden (Frey, M.R., 1997; Zezula, J., 1997).

Doch scheint PKC δ eine multiple Funktion in der Signaltransduktion der Zelle zu besitzen, denn zu ihrem Einfluß auf das Wachstumsverhalten kommen durch ihre Inhibition noch starke zellmorphologische Veränderungen dazu. Die dominant-negativen PKC δ -Mutanten zeigten einen transformierten Phänotyp, der durch Zerstörung der Streßfasern, Ausbildung von Zellausläufern und Foci-ähnliches Wachstum charakterisiert war. Ähnliche Beobachtungen wurden durch Lu *et al.* berichtet. Hier resultierte die Inhibierung der PKC δ in c-Src-transfizierten Ratten-Fibroblasten durch PKC δ -Depletion, Rottlerin-Behandlung oder die Expression einer dominant-negativen Mutante in einem transformierten Phänotyp (Lu, Z., 1997). In

c-Src-transfizierten Nager-Fibroblasten konnte eine ähnliche Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts beobachtet werden (Chang, J.H., 1995). Aktivierung von c-Src führt *in vitro*, wie TPA, zu einer initialen Tyrosin-Phosphorylierung und anschließender Herunterregulierung der PKC δ (Gschwendt, M., 1994). *In vivo* wird PKC δ durch PDGF-Stimulation sowohl in c-Src-transfizierten- als auch in Wildtyp-NIH3T3-Zellen degradiert. Umgekehrt führt die Überexpression der PKC δ in den gleichen Zellen zum G1-Arrest (Blake, R.A., 1999).

Die in NIH3T3-Zellen generierten dominant-negativen Mutanten der PKC δ bildeten den selben Phänotyp aus, wie mit onkogenem Ha-ras-transfizierte NIH3T3-Zellen (Überall, F., 1999). So wie c-Src kann auch Ha-ras die PKC δ herunterregulieren, auch wenn hier ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt. Geiges *et al.* konnten zeigen, daß in HaCaT-Zellen durch die Transfektion mit Ha-ras TGF α produziert wird, was zur Herunterregulierung der PKC δ führt (Geiges, D., 1995). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führt Rottlerin-Behandlung auch in HaCaT-Zellen zur Aufhebung der Kontaktinhibition und Reorganisation des Cytoskeletts. So scheinen transformiertes Zellwachstum und veränderte Zellmorphologie eng miteinander verknüpft zu sein, wie auch in c-Src- und Ha-Ras-transfizierten Zellen zu sehen ist.

Daß ein intaktes Cytoskelett eine Voraussetzung für die Übertragung der Kontaktinhibition darstellt, wird weiter dadurch bestätigt, daß die Zerstörung der Aktinfilamente durch Cytochalasin D zur Aufhebung der dichteabhängigen Wachstumsregulation in konfluenten FH109-Zellen bzw. einer verstärkten Proliferation führt (pers. Mitteilung, Wieser, R.J.). Als mögliche Substrate der PKC δ sind also auch Proteine vorstellbar, über die die Organisation des Aktin-Cytoskeletts reguliert wird. Es sind bereits zwei solcher Proteine als spezifische PKC δ -Substrate bekannt. Das Hitzeschock-Protein 27 (HSP27) (Maizels, E.T., 1998) und der Elongationsfaktor eEF1 α (Kielbassa, K., 1995) besitzen beide Aktin-stabilisierende Funktionen (Condeelis, J., 1995; Guay, J., 1997). Aufgrund der aufgetretenen Änderungen der Aktinfilamente nach Inhibierung der PKC δ und dem Ras-ähnliche Phänotyp, wäre auch eine Beteiligung von Rho-Proteinen, insbesondere RhoA, vorstellbar. Die möglichen Substrate der PKC δ sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen der Gruppe.

Die unter Punkt 2 dargestellten Ergebnisse sollen nun dazu verwendet werden, um gemeinsam mit den bereits bekannten Informationen ein Bild von der möglichen Signaltransduktion der Kontaktinhibition zu entwerfen:

Es konnte gezeigt werden, daß in humanen Keratinozyten der TGF β -Signalweg eine Voraussetzung für die kontaktabhängige Wachstumskontrolle ist. Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch Fibroblasten durch TGF β in ihrem Wachstum gehemmt werden und einen TGF β -Rezeptor besitzen (Massague, J., 1996). In Ha-ras-transformierten NIH3T3-Zellen konnte gezeigt werden, daß TGF β -Behandlung zu einer Umkehr des transformierten Phänotyps führt (Moustakas, A., 1999). TGF β induzierte die Reorganisation des Cytoskeletts durch die Bildung von Streßfasern und Ausbildung von Fokalkontakten. Es war eine gesteigerte Expression von RhoB und etwas geringer von RhoA meßbar. Es könnte bei der durch TGF β -induzierten Wachstumshemmung also um einen nicht nur auf Epithelzellen beschränkten Mechanismus handeln. Nach dieser Hypothese würden Zell-Zellkontakte zur Produktion von TGF β führen, welches dann autokrin das Wachstum der Zelle hemmt. Nach der Bindung an seinen Rezeptor wird über die Smad-Proteine ein Signalweg ausgelöst, der zur erhöhten Expression von CKIs führt. Die Gruppe um X.F. Wang zeigte in HaCaT-Zellen, daß der MAPK-Weg über Ras-Raf-MEK-MAPK in die durch TGF β induzierte Stimulation von p15 und p21 involviert ist (Hu, P.P, 1999). PKC δ ist in der Lage den MEK-ERK-Signalweg über einen Ras-unabhängigen Mechanismus zu aktivieren (Ueda, Y., 1996). So könnte PKC δ direkt bei der Hochregulierung der CKIs beteiligt sein. Es wäre eine zusätzliche Rolle der PKC δ bei der Ausbildung des Cytoskeletts denkbar, als Voraussetzung für ein Clustering des Contactinhibins und des Contactinhibin-Rezeptor. Letztlich verhindert die gesteigerte Expression der CKIs die Phosphorylierung des pRb und führt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase.

4. Zusammenfassung

Das Wachstum nicht-transformierter Zellen *in vivo* und *in vitro* wird durch die dichteabhängige Wachstumskontrolle, die durch Zell-Zellkontakte vermittelt wird, reguliert. Aus *in-vitro*-Versuchen ist bekannt, daß die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren, wenn sie Konfluenz erreicht haben. Dieses Phänomen bezeichnet man als Kontaktinhibition. In unserer Gruppe konnten in humanen diploiden Fibroblasten, FH109-Zellen, zwei Membran-Glykoproteine identifiziert werden, Contactinhibin (Ci) und sein Rezeptor (CiR), durch deren Interaktion die Kontaktinhibition ausgelöst wird. Während bereits gezeigt wurde unter welchen Bedingungen die beiden für die kontaktabhängige Wachstumshemmung wichtigen Moleküle interagieren, ist bislang nicht bekannt, welche Signale dadurch induziert und über welche Kaskaden diese weitergeleitet werden. Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Signalweiterleitung über den CiR in Fibroblasten- und Epithel-Zellen. Dadurch sollte die Voraussetzung geschaffen werden, mögliche Fehlregulationen in dieser Signalkaskade aufzuzeigen, welche es transformierten Zellen erlauben, diese ansonsten sehr stringente Wachstumshemmung zu unterlaufen.

Über den transformierenden Wachstumsfaktor TGF β ist bekannt, daß er in den meisten Zelllinien eine antiproliferative Wirkung ausübt. TGF β führt wie die dichteabhängige Wachstumsregulation zum Zellzyklusstopp in der G1-Phase. Auch konnte in vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe gezeigt werden, daß in humanen immortalisierten Keratinozyten (HaCaT), die selbst TGF β sezernieren, eine Wachstumshemmung durch TGF β nur bei proliferierenden nicht aber bei dichtearretierten Zellen zu beobachten war. War der Weg der Kontaktinhibition bereits beschrieben, konnte durch TGF β keine zusätzliche Wachstumshemmung mehr erreicht werden. Daraus folgte, daß zwischen den beiden Signalkaskaden eine mögliche Interaktion stattfinden könnte. Um die Zusammenhänge dieser beiden Signalkaskaden aufzuklären wurden humane Keratinozyten (HaCaT) mit einem dominant-negativen TGF β -Rezeptor Typ II stabil transfiziert (Kooperation, M. Blessing, Mainz). Das Ausschalten des durch TGF β -induzierten Signalweges führte in den generierten Klonen zu einer erhöhten Sättigungsdichte und der Aufhebung der Kontaktinhibition. Die Funktionalität von Contactinhibin wurde aber durch die Transfektion nicht beeinflusst, wie in Kontrollexperimenten gezeigt werden konnte. Ist der TGF β -Weg essentiell für die Kontaktinhibition, so wäre in konfluenten Zellen ein erhöhter Expressionslevel an TGF β zu erwarten. Diese Hypothese konnte durch Überprüfung des mRNA-Levels von TGF β in proliferierenden und kontaktinhibierten

Zellen bestätigt werden. Zell-Zellkontakte führten zu einer erhöhten Expression an TGF β -mRNA.

In einem weiteren Ansatz sollten mögliche Second Messenger der Kontaktinhibition identifiziert werden. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Proteinkinase C (PKC), eine Familie bestehend aus 11 Isoformen, nicht nur in mitogene Prozesse involviert ist, sondern auch in die negative Wachstumskontrolle, Differenzierung und Apoptose. Basierend auf den Ergebnissen früherer Studien der Gruppe sollte die Rolle der PKC in der Kontaktinhibition eingehender untersucht werden. In FH109-Zellen führte die Langzeit-Behandlung mit dem Phorbol ester TPA zu einer starken Reduzierung der Kontaktinhibition. Western Blot-Analysen zeigten, daß unter diesen Versuchsbedingungen die PKC-Isoformen α , δ , ϵ und μ herunterreguliert wurden. Während die Inkubation mit Gö6976, dem spezifischen Inhibitor der α -Isoform, keinen Effekt auf die kontaktabhängige Wachstumshemmung zeigte, führte die Behandlung mit dem δ -spezifischen Inhibitor Rottlerin zu einer vollständigen Aufhebung der Kontaktinhibition. In Kinetiken konnte gezeigt werden, daß der Inhibitor Rottlerin seinen Effekt nur ausübt, wenn er während der frühen-mittleren G1-Phase zu den Zellen gegeben wird. Die Hypothese, daß PKC δ in die Kontaktinhibition involviert ist, wurde dadurch gestützt, daß sowohl die Stärke ihrer Proteinexpression als auch ihre intrazelluläre Verteilung über Zell-Zellkontakte reguliert wird. Durch Hemmung der PKC δ mittels Rottlerin oder Expression einer dominant-negativen Mutante wurde außerdem die Zellmorphologie stark beeinflusst. NIH3T3-Zellen zeigten unter dem Abbau von Streßfasern, sowie die Ausbildung langer Zellausläufer eine Reorganisation des Cytoskeletts. Der durch Expression der dnPKC δ generierte Phänotyp gleicht dem von NIH3T3-Zellen, die onkogenes Ha-ras überexprimieren. Neben ihrer morphologische Veränderung zeigten die mit dnPKC δ transfizierten NIH3T3-Zellen auch ein anderes Wachstumsverhalten. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wuchsen die Transfektanten Foci-ähnlich, was auf einen transformierten Phänotyp hinweist. Dieses Wachstumsverhalten ist charakterisiert durch den Verlust der kontaktabhängigen Wachstumshemmung.

5. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. Molekularbiologie der Zelle, VCH 3. Aufl.: 1368, 1995.

Arbes, H. Untersuchung zur Identifizierung der intrazellulären Signalkette bei der Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Wachstumsinhibierung, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie, 1994.

Ast, S. Der Zusammenhang zwischen Kontaktinhibierung und Differenzierung bei humanen Keratinozyten, Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Medizin, 1998.

Aoki, J., Umeda, M., Takio, K., Titani, K., Utsumi, H., Sasaki, M., and Inoue, K. Neural cell adhesion molecule mediates contact-dependent inhibition of growth of near-diploid mouse fibroblast cell line m5S/1M, *J. Cell Biol.* 115: 1751-1761, 1991.

Batt, D.B., and Roberts, T.M., Cell density modulates protein-tyrosine phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 273: 3408-3414, 1998.

Beijersbergen, R.L., and Bernards, R. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins, *Bba-Rev Cancer.* 1287: 103-120, 1996.

Böttinger, E.P., Jakubczak, J.L., Haines, D.C., Bagnall, K., and Wakefield, L.M., Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor β receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene, *Cancer Res.* 57: 5564-5570, 1997.

Brand, T., MacLellan, W.R., and Schneider, M.D., A dominant-negative receptor for type β transforming growth factors created by deletion of the kinase domain, *J. Biol. Chem.* 268: 11500-11503, 1993.

Brattain, M.G., Markowitz, S.D., and Willson, J.K.V. The type II transforming growth factor- β receptor as a tumor-suppressor gene, *Curr. Opin. Oncol.* 8: 49-53, 1996.

Borner, C., Filipuzzi, I., Weinstein, I., and Imber, R. Failure of wild-type or mutant form of protein kinase C- α to transform fibroblasts, *Nature* 353: 78-80, 1991.

Borner, C., Ueffing, M., Jaken, S., Parker, P., and Weinstein, B. Two closely related isoforms of protein kinase C produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 270: 78-86, 1995.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig N.E. Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.* 106: 761-771, 1988.

Cacace, A.M., Guadagno, S.N., Krauss, R.S., Fabbro, D., and Weinstein, I.B. The ϵ isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts, *Oncogene* 8: 2095-2104, 1993.

Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. Oncogenes and signal transduction, *Cell.* 64: 281-302, 1991.

- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters, *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851, 1982.
- Chang, H.L., Gillett, N., Figari, I., Lopez, A.R., Palladino, M.A., and Derynck, R. Increased transforming growth factor β expression inhibits cell proliferation *in vitro*, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells, *Cancer Res.* 53: 4391-4398, 1993.
- Chafouleas, J.G., Pardue, R.L.M., Brinkley, B.R., Dedman, J.R., and Means, A.R. Regulation of intracellular levels of calmodulin and tubulin in normal and transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 996-1000, 1981.
- Claessonwelsh, L. PDGF Receptors - Structure and Mechanism of Action. *In*: B. Westermark and C. Sorg (eds.), *Biology of Platelet - Derived Growth Factor*, Vol. 5, pp. 31-43. Postfach, CH-4009 Basel, Switzerland: Karger, 1993.
- Cohen, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates, *TIBS.* 17: 408-413, 1992.
- Condeelis, J. Elongation factor 1α , translation and the cytoskelton, *TiBS* 20: 169-170, 1995.
- Cook, J.A., and Mitchell, J.B. Viability measurements in mammalian cell systems, *Anal. Biochem.* 179: 1-7, 1989.
- Crawford, S.E., Stellmach, V. Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, M.F., Lawler, J. Hynes, R.O., Bolvin, G.P., and Bouck, N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 *in vivo*, *Cell* 93: 1159-1170, 1998.
- Denning, M.F., Dlugosz, A.A., Howett, M.K., and Yuspa, S.H. Expression of an oncogenic rasHa gene in murine keratinocytes induces tyrosine phosphorylation and reduced activity of protein kinase C δ , *J. Biol. Chem.* 268: 26079-26081, 1993.
- Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X.H. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses, *Cell* 95: 737-740, 1998.
- Dietrich, C., Bartsch, T., Schanz, F., Oesch, F. and Wieser, R.J. p53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10815-10819, 1996.
- Dietrich, C., Wallenfang, K., Oesch, F., and Wieser R.J. Differences in the mechanisms of growth control in contact-inhibited and serum-deprived human fibroblasts, *Oncogene* 15: 2743-2747 1997.
- Escherick, J.S., DiCunto, F., Flanders, K.C., Missero, C., and Dotto, G.P. Transforming growth factor β 1 induction is associated with transforming growth factors β 2 and β 3 down-modulation in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin hyperplasia, *Cancer Res.* 53: 5517-5522, 1993.
- Faust, D. Signaltransduktion durch den Contactinhibin-Rezeptor (CiR), Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie, 1997.
- Folkman, J., and Moscona, A. Role of cell shape in growth control, *Nature.* 273: 345-349, 1978.

- Frey, M.R., Saxon, M.L., Zhao, X., Rollins, A., Evans, S.S., and Black, J.D. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21^{waf/cip1} and p27^{kip1} and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 272: 9424-9435, 1997.
- Fukumoto, S., Nishizawa, Y., Hosoi, M., Koyama, H., Yamakawa, K., Ohno, S., and Morii, H. Protein kinase C δ inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J. Biol. Chem.* 272: 13816-13822, 1997.
- Fyfan, T.M., and Reiss, M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor- β and its role in oncogenesis, *Critical Rev. Onc.* 4: 493-540, 1993.
- Geiges, D., Marks F., and Gschwendt M. Loss of protein kinase C δ from human HaCaT keratinocytes upon ras transfection is mediated by TGF α , *Exp. Cell Res.* 219: 299-303, 1995.
- Geng, Y., and Weinberg, R.A. Transforming growth factor β effects on expression on G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10315-10319, 1993.
- Ghayur, B.T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbada, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., and Kufe, D. Proteolytic activation of protein kinase c d by ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis, *J. Exp. Med.* 184: 2399-2404, 1996.
- Glick, A.B., Lee, M.M., Darwiche, N., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., and Yuspa, S.H. Targeted deletion of the TGF- β 1 genes causes rapid progression to squamous cell carcinoma, *Genes & Dev.* 8: 2429-2440, 1994.
- Gold, L.I., and Parekh, T.V. Loss of growth regulation by transforming growth factor- β (TGF- β) in human cancers: studies on endometrial carcinoma, *Sem. Reprod. Endo.* 17: 73-92, 1999.
- Grabl, G., Faust, D., Oesch, F., and Wieser, R.J. Density-dependent regulation of growth by contactinhibin and the contactinhibin-receptor, *Curr. Biol.* 5: 526-535, 1995.
- Griffiths, G., Garrone, B., Deacon, E., Owen, P., Pongracz, J., Mead, G., Bradwell, A., Watters, D., and Lord, J. The polyether Bistratene A activates protein kinase C- δ and induces growth arrest in HL60 cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 222: 802-808, 1996.
- Gschwendt, M., Mueller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., and Marks, F. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 199: 93-98, 1994a.
- Gschwendt, M., Kittstein, W., and Marks, F. Elongation factor-2 kinase: effective inhibition by the novel protein kinase inhibitor rottlerin and relative insensitivity towards staurosporine, *FEBS Lett.* 338: 85-88, 1994b.
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J., Huot, J., and Landry, J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27, *J. Cell Sci.* 119: 357-368, 1997.

Gumpert, N. Funktionale Bedeutung der Proteinkinase C δ (PKC δ) in der Reorganisation der cytoskelettären Architektur humaner Keratinozyten, Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Medizin, in Vorbereitung.

Haddow, S., Fowles, D.J., Parkinson, K., Akhurst, R.J., and Balmain, A. Loss of growth control by TGF- β occurs at the late stage of mouse skin carcinogenesis and is independent of ras gene activation, *Oncogene*. 6: 1465-1470, 1991.

Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Lagna, G., and Massague, J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4, *Nature* 388: 82-87, 1997.

Hegemann, L., Kempenaar, J., and Ponc, M. The Involvement of Protein Kinase C in Proliferation and Differentiation of Human Keratinocytes - An Investigation Using Inhibitors of Protein Kinase C, *Arch Dermatol Res*. 286: 278-284, 1994.

Heit, I. Contactinhibin-Rezeptor-Assoziierte Proteine und Signaltransduktion, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Chemie und Pharmazie, 1997.

Heldin, C.H. Purification and Structure of PDGF. *In*: B. Westermark and C. Sorg (eds.), *Biology of Platelet - Derived Growth Factor*, Vol. 5, pp. 1-10. Postfach, CH-4009 Basel, Switzerland: Karger, 1993.

Hirai, S.I., Izumi, Y., Higa, K., Kaibuchi, K., Mizuno, K., Osada S., Suzuki, K., and Ohno, S. Ras-dependent signal transduction is indispensable but not sufficient for the activation of AP1/ Jun by PKC δ . *EMBO J*. 13: 2331-2340, 1994.

Housey, G.M., Johnson, M.D., Hsiao, W.L., O'Brian, C.A., Murphy, J.P., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts, *Cell* 52: 343-354, 1988.

Hu, P.P., Shen, X., Huang, D., Counter, C., and Wang, X.F. The MEK pathway is required for stimulation of p21^{WAF/CIP1} by transforming growth factor- β , *J. Biol. Chem.* 274: 35381-35387, 1999.

Hug, H., and Sarre, T.F. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signaltransduction?, *Biochem. J*. 291: 329-343, 1993.

Johnson, T.C. Negative regulators of cell proliferation, *Pharmac. Ther.* 62: 247-265, 1994.

Josephs, S.F., Ratner, L., Clarke, M.F., Westin, E.H., Reitz, M.S., and Wong-Staal, F. Transforming potential of human c-sis nucleotides encoding platelet-derived growth factor, *Science*. 223: 636-639, 1984.

Kalkhoven, E., Roelen, B.A.J., de Winter J.P., Mummery, C.L., van den Eijnden-van Raaij, A.J.M., van der Saag, P.T., and van der Burg, B. Resistance to transforming growth factor β and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines, *Cell Growth. Diff.* 6: 1151-1161, 1995.

Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Clark, G.J., Kinch, M.S., and Der, C.J. Activation of Rac1 and RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation, *Mol. Cell Biol.* 15: 6443-6453, 1995.

Kielbassa, K., Mueller, H.J., Meyer, H., Marks, F., and M. Gschwendt. Protein kinase C δ -specific phosphorylation of the elongation factor eEF-1 α and an eEF-1 α peptide at threonine 431. *J. Biol. Chem.* 270: 6156-6162, 1995.

Kimchi, A., Wang, X.F., Weinberg, R.A., Cheifetz S., and Massague J., Absence of TGF- β receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells, *Science* 240: 196-199, 1988.

Knaus, P.I., Lindemann, D., DeCoteau, J.F., Perlman, R., Yankelev, H., Hille, M., Kadin, M.E., and Lodish, H.F. A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor β receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma, *Mol. Cell. Biol.*, 16: 3480-3489, 1996.

Kretschmar, M., Lui, F., Hata, A., Doody, J., and Massague, J. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase, *Genes & Dev.* 11: 984-995, 1997.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227: 680-685, 1970.

Landesman, Y., Pagano, M., Draetta, G., Rotter, V., Fusenig, N.E., and Kimchi, A. modifications of cell cycle controlling nuclear proteins by transforming growth factor β in the HaCaT keratinocyte cell line, *Oncogene* 7: 1661-1665, 1992.

Landesman, Y., Bringold, F., Milne, D.D., and Meek, D.W. Modifications of p53 protein and accumulation of p21 and gadd45 mRNA in TGF- β 1 growth inhibited cells, *Cell. Signal.* 9: 291-298, 1997.

LaPorta, C., Tessitore, L., and Comolli, R. Changes in protein kinase C α , δ and in nuclear β isoform expression in tumor and lung metastatic nodules induced by diethylnitrosamine in the rat, *Carcinogenesis* 18: 715-719. 1997.

Leavitt, J., Gunning, P., Porreca, P., Ng, S.Y., Lin, C.S., and Kedes, L. Molecular cloning and characterization of mutant and wild-type human β -actin genes, *Mol. Cell. Biol.* 4: 1961-1969, 1984.

Li, W., Mischak, H., Yu, J.C., Wang, L.M., Mushinski, J.F., Heidaran, M., and Pierce, J. Tyrosine phosphorylation of protein kinase C- δ in response to its activation, *J. Biol. Chem.* 269: 2349-2352, 1994.

Lindmark, R., Thore`n-Tolney, K., and Sjöquist, J. Binding of immunoglobulin. Levels in mammalian sera, *J. Immun. Meth.* 62: 1-3, 1983.

Lu, Z., Hornia, A., Jiang, Y.W., Zang, Q., Ohno, S., and Foster, D. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C δ , *Mol. Cell. Biol.* 17: 3418-3428, 1997.

Maizels, E.T., Peters, C.A., Kline, M., Cutler, R.E., Shanmugam, Jr., M., and Hunzicker-Dunn, M. Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C, *Biochem. J.* 332: 703-712, 1998.

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L.Z., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Brattain, M., and Willson, J.K.V. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability, *Science* 268: 1336-1338, 1995.

- Massague, J. The TGF- β family of growth and differentiation factors, *Cell*. 49: 437-438, 1987.
- Massague, J. The transforming growth factor- β family, *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 597-641, 1990.
- Massague, J. Receptors of the TGF- β family, *Cell* 69: 1067-1070, 1992.
- Means, A.R. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation, *FEBS Lett.* 347: 1-4, 1984.
- Mischak, H., Goodnight, J., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaehtle, C., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Pierce, J., and Mushinski, J.F. Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity, *J. Biol. Chem.* 268: 6090-6096, 1993.
- Molchy-Rosen, D., and Gordon, A.S. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity, *FASEB* 12: 35-42, 1998.
- Moreton, K., Turner, R., Blake, N., Paton, A., Groome, N., and Rumsby, M. Protein expression of the α , γ , δ and ϵ subspecies of protein kinase C changes as C6 glioma cells become contact inhibited and quiescent in the presence of serum, *FEBS Lett.* 372: 33-38. 1995.
- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I., and Rifkin, D.B. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation, *Kidney Int.* 51: 1376-1382, 1997.
- Nakaigawa, N.S., Hirai, S., Mizuno, K., Shuin, M., Hosaka, M., and Ohno, S. Differential effects of overexpression of PKC α and PKC δ/ϵ on cellular E2F activity in late G1 phase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 222: 95-100, 1996.
- Newton, A.C., Regulation of protein kinase C, *Current Opinion in Cell Biology* 9: 161-167, 1997.
- Nishizuka, Y. The role of the protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, *Nature* 308: 693-698, 1984.
- Nishizuka, Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science* 258: 607-614, 1992.
- Oesch, F., Janik-Schmitt, B., Ludewig, G., Glatt, H.-R., and Wieser, R.J. Glutaraldehyde-fixed transformed and non-transformed cells induce contact-dependent inhibition of growth in non-transformed C3H/10T1/2 mouse fibroblasts, but not in 3-methylcholanthrene-transformed cells, *Eur. J. Cell Biol.* 43: 403-407, 1987.
- Oesch, F., Schäfer, A., and Wieser, R.J. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate releases human diploid fibroblasts from contact-dependent inhibition of growth, *Carcinogenesis*. 9: 1319-1322, 1988.
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S., and Suzuki, K. A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family, *Cell* 53: 731-741, 1988.
- Olson, M.F., Ashworth, A., and Hall, A. An essential role for Rho, Rac and CDC42 GTPases in cell cycle progression through G1, *Science* 269: 1270-1272, 1995.

- Okayama, H., and Berg, P. A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 3: 280-289, 1983.
- Orford, K., Orford, C.C., and Byers, S.W. Exogenous expression of β -catenin regulates contact-inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest, *J. Cell Biol.* 146: 855-867, 1999.
- Palfrey, H.C., Nairn, A., Muldoon, L., and Villereal, M. Rapid activation of calmodulin-dependent protein kinase III in mitogen-stimulated human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 262: 9785-9792, 1987.
- Perletti, G.P., Concari, P., Brusafferri, S., Marras, E., Piccinini, F., and Tashjian, A.H. Jr. Protein kinase C ϵ is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway, *Oncogene* 16: 3345-3348, 1998.
- Perletti, G.P., Marras, E., Concari, Piccinini, F., and Tashjian, A.H. Jr. PKC δ acts as a growth and tumor suppressor in rat colon epithelial cells, *Oncogene* 18: 1251-1256, 1999.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. p27^{KIP1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest, *Genes & Dev.* 8: 9-22 1994.
- Qui, R.G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. An essential role for Rac in Ras transformation, *Nature* 374: 457-459, 1995.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone A., and Massague J. Kip/Cip and Ink4 cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β , *Genes & Dev.* 9: 1831-1845, 1995.
- Rich, J.N., Zhang, M., Datto M.B., Bigner, D.D., and Wang X.F. Transforming growth factor- β -mediated p15^{INK4B} induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines, *J. Biol. Chem.* 274: 35053-35058, 1999.
- Rodemann, H.P. and Bayreuther, K. Differential degradation of [³⁵S]methionine polypeptides in Duchenne muscular dystrophy skin fibroblasts *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2086-2090, 1986.
- Rodriguez-Pena, A., and Rozengurt, E. Disappearance of Ca-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120: 1053-1059, 1984.
- Ryazanov, A.G., Shestakova, E.A. and Natapov, P.G. Phosphorylation of elongation factor e ba EF-2 kinase affects rate of translation, *Nature* 334: 170-173, 1988.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989
- Sato, Y., and Rifkin, D.B. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture, *J. Cell Biol.* 109: 309, 1989.
- Schmitt, C. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Medizin, in Vorbereitung.

Schütz, S. Untersuchung zur Biosynthese eines Glykoproteins, das in der kontaktabhängigen Inhibierung des Wachstums humaner diploider Fibroblasten involviert ist. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie, 1989.

Sharples, K., Plowman, G.D., Rose, T.M., Twardzik, D.R. and Purchio, A.F. Cloning and sequence analysis of simian transforming growth factor- β cDNA, *DNA* 6: 239-244, 1987.

Sherr, C.J. Mammalian G(1)-Cyclins, *Cell*. 73: 1059-1065, 1993.

Smith, P.K., Krohn, R.J., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150: 76-85, 1985.

Stempka, L., Girod, A., Müller, H.J., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M., and Bossemeyer, D. Phosphorylation of protein kinase C δ (PKC δ) at threonine 505 is not prerequisite for enzymatic activity, *J. Biol. Chem.* 272: 6805-6811, 1997.

Stoker, M.P.G. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth, *Nature*. 246: 200-203, 1973.

Streuli, C.H., Schmidhauser, C., Kobrin, M., Bissell, M.J., and Derynck, R. Extracellular matrix regulates expression of the TGF- β 1 gene, *J Cell Biol.* 120: 253-260, 1993.

Sun H., and Tonks, N.K. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling, *Trends Biochem. Sci.* 19: 480-485, 1994.

Todaro, G.J., and Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, *J. Cell Biol.* 17: 299-313, 1963.

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K. and Ohno, S. Protein kinase C d activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf, *J. Biol. Chem.* 271: 23512-23519, 1996.

Überall, F., Hellbert, K., Kampfer, S., Maly, K., Villunger, A., Spitaler, M., Mwanjewe, J., Baier-Bitterlich, G., Baier, G., and Grunicke, H. Evidence that atypical protein kinase C- λ and atypical protein kinase C- ζ participate in ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton, *J. Cell. Biol.* 144: 413-425, 1999.

Wang, J.L., and Hsu, Y.-M. Negative regulators of cell growth, *Trends Biochem. Sci.* 11: 24-26, 1986.

Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C- δ subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10159-10163, 1992.

Watters, D.J., and Parsons, P.G., Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells, *Biochem. Pharmacol.* 58: 383-388, 1999.

Whittenberger, B., and Glaser, L. Cell saturation density is not determined by a diffusion-limited process, *Nature*. 272: 821-822, 1978.

Wieser, R.J., Heck, R., and Oesch, F. Involvement of plasma membrane glycoproteins in the contact-dependent inhibition of growth of human fibroblasts, *Exp. Cell Res.* *158*: 493-499, 1985.

Wieser, R.J., and Oesch F. Contact-dependent regulation of diploid human fibroblasts is dependent upon the presence of terminal galactose residues on plasma membrane glycoproteins, *Exp. Cell Res.* *176*: 80-86, 1988.

Wieser, R.J., Schütz, S., Tschank, G., Dienes, H.-P., Thomas, H., and Oesch, F. Isolation and characterization of a 60-70 kD plasma membrane glycoprotein involved in the contact-dependent inhibition of growth, *J. Cell Biol.* *111*: 2681-2692, 1990.

Wieser, R.J., Baumann, C.E., and Oesch, F. Cell-contact mediated modulation of the sialylation of contactinhibin, *Glycoconj. J.* *12*: 672-679, 1995.

Wieser, R.J., Faust, D., Dietrich, C., and Oesch, F. p16^{INK4} mediates contact-inhibition of growth, *Oncogene* *18*: 277-281 1999.

Williams, L.T. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor, *Science.* *243*: 1564-1570, 1989.

Yang, E.Y., and Moses, H.L., Transforming growth factor- β 1 induced changes on cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken allantoic membrane, *J. Cell Biol.* *111*: 731-741, 1990.

Versicherung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfaßt habe und außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln keine weiteren zur Anwendung kamen.

Mainz, den 8. Mai 2000

Isabelle Heit