

***HAX1*: Ein Psoriasis-assoziiertes Gen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt durch Andreas Hippe

aus Neuss

Juni 2007

Aus der Hautklinik

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Bernhard Homey

Koreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 2.7.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	7
1.1	Haut, Psoriasis und HAX1	8
1.1.1	Aufbau der Epidermis	8
1.1.2	Psoriasis.....	10
1.1.3	Dysfunktionale Wundheilung als Modell für Psoriasis.....	11
1.1.4	<i>HAX1</i> und Psoriasis.....	12
1.2	Interaktionspartner von HAX1.....	12
1.2.1	Interaktionspartner mit Funktion in der Apoptose	13
1.2.1.1	Omi/HtrA2.....	15
1.2.1.2	HIV-1 „viral protein R“ (Vpr).....	17
1.2.1.3	Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein.....	18
1.2.2	Interaktionspartner mit Funktion in Aktinzytoskelett-Dynamiken.....	19
1.2.2.1	Cortactin / HS-1	20
1.2.2.2	„Polycystic Kidney Disease“ Protein 2	23
1.2.2.3	G α -Untereinheit des G-Proteins G ₁₃	24
1.2.3	Weitere Interaktionspartner von HAX1	26
1.2.3.1	Interaktionspartner im Zusammenhang mit „Clathrin-coated“ Vesikeln	26
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	28
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Materialien	30
2.1.1	Zelllinien.....	30
2.1.2	Chemikalien	30
2.1.3	Puffer	32
2.1.4	Materialien und Verbrauchsgegenstände	34
2.1.5	Primer, siRNA und Plasmide	35

2.1.6	Antikörper	36
2.1.7	Zellkulturgeräte und –medien	36
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Versuchstiere	37
2.2.2	Zellkultur	38
2.2.3	RNA-Extraktion aus Mausgeweben	39
2.2.4	RNA-Extraktion aus Zellen.....	39
2.2.5	Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung und Qualitäts-Kontrolle	40
2.2.6	Reverse Transkription.....	40
2.2.7	Realtime-PCR.....	41
2.2.8	Northern Blot.....	42
2.2.9	Protein-Experimente	43
2.2.9.1	Proteinextraktion.....	43
2.2.9.2	Western Blot.....	43
2.2.9.3	Caspase 3-Assay	44
2.2.10	Immunhistochemie.....	45
2.2.11	Immunfluoreszenz	47
2.2.12	Konfokale Laser-Mikroskopie.....	48
2.2.13	RNA-Interferenz (RNAi)-Experimente	49
2.2.13.1	Transfektion von HaCaT-Zellen mit siRNA	50
2.2.13.2	In vitro Wundheilungsassay.....	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Untersuchungen der Expression von <i>Hax1</i> in Geweben der Maus.....	52
3.1.1	Ermittlung der <i>Hax1</i> -Transkripte mittels Northern Blot.....	53
3.1.2	Ermittlung der <i>Hax1</i> -Expression mittels Realtime-PCR	54
3.1.3	Analyse der <i>Hax1</i> -Expression über einen Western Blot	56
3.2	Nachweis der Lokalisation von <i>Hax1</i> in Geweben und in Einzelzellen	59

3.2.1	Untersuchungen zur gewebsspezifischen Lokalisation von Hax1	60
3.2.2	Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Hax1 mittels indirekter Immunfluoreszenz	64
3.3	Subzelluläre Lokalisation von HAX1 in HaCaT-Zellen	67
3.4	Funktionelle Analyse von <i>HAX1</i>	70
3.4.1	Etablierung eines <i>HAX1</i> -„ <i>Knock-downs</i> “ durch RNAi	70
3.4.1.1	Kontrolle der siRNA-Transfektion und Etablierung der Transfektionsbedingungen.....	71
3.4.1.2	Kontrolle des Gen-„ <i>Knock-downs</i> “ auf Proteinebene.....	73
3.4.2	Auswirkung eines <i>HAX1</i> -„ <i>Knock downs</i> “ auf die Apoptose-Induktion.....	75
3.4.3	Auswirkung eines <i>HAX1</i> -„ <i>Knock downs</i> “ auf Zellmotilität in einem <i>in vitro</i> Wundheilungsassay	77
3.4.3.1	Kolokalisation von HAX1 und Aktin am Rand eines Risses in einer Zell-„ <i>Monolayer</i> “.....	81
4	Diskussion	83
4.1	Vergleich zwischen der Expression von murinem Hax1, humanem HAX1 und seinen Interaktionspartnern, in Geweben	84
4.2	Gewebsspezifische und zellspezifische Lokalisation von Hax1	86
4.3	Subzelluläre Lokalisation von HAX1 in HaCaT-Zellen	88
4.4	„ <i>Knock-down</i> “ Experimente in HaCaT-Zellen zeigen einen Einfluß von HAX1 auf Motilität.....	90
4.4.1	<i>HAX1</i> -„ <i>Knock-down</i> “ und Apoptose-Induzierung	90
4.4.2	Der „ <i>Knock-down</i> “ von HAX1 führt zu einer Inhibierung der Motilität von HaCaT-Zellen in einem <i>in vitro</i> Wundheilungsassay.....	91
4.5	Die promigratorische Eigenschaft von <i>HAX1</i> in Keratinozyten und das dysfunktionale Wundheilungsmodell als Ursache der Psoriasis	92

5	Zusammenfassung	95
6	Abstract	97
7	Literaturverzeichnis	99
8	Abkürzungsverzeichnis	108

1 EINLEITUNG

„*HS-1 associated protein X-1*“ (HAX1) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein von 35 kDa Größe. Es wurde erstmalig von Suzuki et al. 1997 in einem „*Yeast-Two-Hybrid*“-Experiment beschrieben, in dem das Protein mit „*hematopoietic cell-specific protein 1*“ (HS-1) interagiert. HS-1 ist ein Substrat von rezeptorgekoppelten Tyrosinkinase und es wurde gezeigt, dass es das Signal für die klonale Expansion, bzw. Deletion lymphoider Zellen transduziert (Suzuki et al. 1997). In der Aminosäuresequenz von HAX1 wurden eine PEST-Sequenz (Rogers et al. 1986), eine putative Transmembran-Domäne am C-terminalen Ende und zwei Sequenzen innerhalb des Proteins, die eine schwache Homologie zu „*B Cell leukemia 2*“ (Bcl-2)-Domänen besitzen, gefunden. Außerdem gibt es eine „*Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3*“ (Nip3)-homologe Sequenz (Suzuki et al. 1997). Vor allem die beiden letztgenannten Sequenzeigenschaften von HAX1 lassen es in die Nähe von apoptose-relevanten Proteinen rücken. Eine mögliche antiapoptotische Funktion des Proteins wurde postuliert (Suzuki et al. 1997).

1.1 Haut, Psoriasis und HAX1

Die menschliche Haut ist mit einer Oberfläche von 1,5 bis 2m² flächenmäßig das größte Organ unseres Organismus. Sie wiegt bis zu 10 kg und macht somit 10% - 15% des Gesamtkörpergewichtes aus. Die Funktionen der Haut sind vielfältig. Sie dient der Abgrenzung des Körperinneren von der Außenwelt und ist wichtig für Thermoregulation, Exkretion und Absorption, Konservierung von Flüssigkeiten und Schutz vor Verletzung und äußeren Umwelteinflüssen, wie UV-Einstrahlung und Abwehr von pathogenen Organismen und Stoffen. Außerdem erfüllt sie eine wichtige Aufgabe bei der Wahrnehmung taktiler Stimulationen.

1.1.1 Aufbau der Epidermis

Die Haut wird mit Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) in drei Bereiche aufgeteilt.

Die Epidermis, welche die äußere Grenze der Haut darstellt, ist ein Epithel aus mehreren Zellschichten und wird hauptsächlich aus Keratinozyten gebildet. Sie ist etwa 0,1 mm dick. Dieser Wert ist allerdings, je nach anatomischer Lage, variabel. Der größte Durchmesser wird an den Hand- und Fußsohlen mit einer Epidermisdicke von 0,8 mm bis 1,4 mm erreicht. Diese Zunahme entsteht durch eine Verdickung der Hornschicht.

Die Aufgabe der Epidermis besteht darin, die Barriereeigenschaft der Haut sowie seine Reparatur und Regeneration, zu gewährleisten. Andere Zellen der Epidermis sind die Langerhans-Zellen, deren Aufgabe die immunologische Verteidigung ist, die Melanozyten, zuständig für die Absorption des UV-Lichts sowie die Merkel-Zellen, die als Sensoren für feine mechanische Veränderungen an der Hautoberfläche und in der Epidermis fungieren. Diese Zellen machen allerdings weniger als 20% der epidermalen Zellen in der Haut aus.

Die Epidermis besteht aus verschiedenen Schichten in denen Keratinozyten in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung vorkommen. So ist die Basalschicht (*Stratum basale*) eine einfache Zellschicht aus hochproliferativen Keratinozyten, unterbrochen von Melanozyten und Merkelzellen. Die Basalzell-Keratinozyten teilen sich, wobei etwa 50% der entstehenden Tochterzellen in die oberen Epidermis-Schichten wandern, dabei ihre proliferativen Fähigkeiten verlieren und die terminale Differenzierung durchlaufen. Diese Entwicklung ist charakterisiert durch Vorgänge, die dem programmierten Zelltod (Apoptose) ähneln und mit dem Tod der Zellen endet. Die nachfolgenden Schichten sind die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), Körnerschicht (*Stratum granulosum*) und Hornschicht (*Stratum corneum*). Zwischen dem *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* kann sich zudem eine fünfte Schicht, die Glanzschicht (*Stratum lucidum*), an den Fußsohlen und den Handflächen bilden.

1.1.2 Psoriasis

Die Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine hyperproliferative und entzündliche Hautkrankheit, die durch symmetrische, erythematöse Plaques mit weißen oder silbrigen Schuppen, charakterisiert ist. Prädelektionstellen sind Ellbogen, Knie, Kopf sowie die Arme und Beine (Menter and Barker 1991). Die Psoriasis tritt in verschiedenen klinischen Subtypen auf: als *Psoriasis vulgaris*, als Befall mit Pustelbildung (*Psoriasis pustulosa generalisata*) und als Befall mit Gelenkbeteiligung (*Psoriasis anthropatica*).

Die Ursache der Psoriasis ist bisher nur zum Teil erforscht. Eine genetische Prädisposition gilt dennoch als gesichert. Die Dermatose wird unter anderem z.B. durch Infektion (vor allem mit Streptokokken oder HIV), physischem oder psychischem Stress und durch Medikamente (z.B. β -Blocker, Lithium und Antimalariamittel) provoziert. Die Induktion von Hautveränderungen durch mechanische Reizungen bezeichnet man als Köbner-Phänomen.

Histologisch ist die Psoriasis durch eine Hyperproliferation der Keratinozyten gekennzeichnet (Hyperkeratose), deren Teilungsrate erhöht ist und deren Mechanismus der terminalen Differenzierung gestört ist. Somit ist die Epidermis stark verdickt und in der Hornschicht befinden sich noch lebende, kernhaltige Zellen (Parakeratose). Des Weiteren ist die Epidermis von einem Infiltrat aus immunologischen Zellen durchsetzt.

1.1.3 Dysfunktionale Wundheilung als Modell für Psoriasis

Es gibt mehrere Hypothesen, die versuchen, die Entstehung der Psoriasis auf zellulärer Basis zu erklären. Aufgrund des Infiltrats aus immunologischen Zellen in der verdickten Epidermis bei der Psoriasis, lautet eine Hypothese, dass aktivierte T-Zellen für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich seien. Dabei wird vermutet, dass in Psoriasis-Patienten ein genetischer Defekt der *Memory*-T-Zellen diese dazu befähigt, die Veränderungen der Epidermis nach deren Infiltration der Haut auszulösen (Elder et al. 1994). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Injektion von T-Lymphozyten in nichtläsionale psoriatische Haut eine Veränderung der Haut in einen psoriatischen Phänotyp verursacht (Gilhar et al. 1997; Nickoloff and Wrone-Smith 1999).

Eine andere Hypothese vermutet die Ursache der Psoriasis in einer Veränderung der Keratinozyten der Epidermis. Vor allem wird eine Überexpression des „*Tumor Growth Factor β* “ (TGF β)-Rezeptors (Li, A. G. et al. 2004) und eine Rolle von Interleukin-20 (IL-20) diskutiert (Blumberg et al. 2001).

Eine neue Hypothese beschäftigt sich mit der Erkenntnis, dass psoriatische Keratinozyten eine abnorme, übertriebene Wundheilungsantwort zeigen (McKenzie und Sabin 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von „*Signal Transduction and Transcription 3*“ (STAT3), ein Signaltransduktions- und Transkriptionsfaktor, in Keratinozyten für eine Wundheilung essentiell ist (Sano et al. 1999; Takeda et al. 2000; Sano et al. 2001). Kürzlich konnte in einem „*Severe combined immunodeficiency*“ (SCID)-Mausmodell gezeigt werden, dass konstitutiv aktiviertes STAT3 einen psoriatischen Phänotyp auslösen kann (Sano et al. 2005).

1.1.4 *HAX1* und Psoriasis

Um genetische Veränderungen in psoriatischer Haut zu identifizieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe die differenzielle Expression von Genen im Vergleich zwischen gesunder und psoriatischer Haut auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer DDRT-PCR untersucht (Mirmohammadsadegh et al. 2003). Dabei wurde *HAX1* als eines von zwei Genen identifiziert, die in psoriatischer Haut überexprimiert waren. Das andere Gen wurde als *S100A15* identifiziert (Wolf et al. 2003).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *HAX1* in HaCaT-Zellen, einer spontan immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie (Boukamp et al. 1988), ebenfalls überexprimiert ist und ein „*Knock-down*“ von *HAX1*, durch *antisense*-RNA, Zellen anfällig für eine Induktion der Apoptose durch UV-Bestrahlung macht (Mirmohammadsadegh et al. 2003). Aufgrund der antiapoptotischen Eigenschaften von *HAX1* wurde spekuliert, dass die Überexpression von *HAX1* an der Resistenz der Keratinozyten gegen die terminale Differenzierung in psoriatischen Läsionen beteiligt ist.

1.2 Interaktionspartner von *HAX1*

Mehrere Interaktionspartner von *HAX1* konnten in der Zwischenzeit identifiziert werden. Die Funktionen dieser mit *HAX1* interagierenden Proteine, lassen auf eine Rolle von *HAX1*, einerseits in der Apoptose, andererseits in Dynamiken des Aktinzytoskeletts, schließen.

1.2.1 Interaktionspartner mit Funktion in der Apoptose

Apoptose bezeichnet den Vorgang des „programmierten Zelltodes“, also einem von der Zelle initiierten und gesteuerten Vorgang der Selbstzerstörung. Dieser Mechanismus steht im Gegensatz zu einer Nekrose, die als ungesteuerter und unkoordinierter Tod der Zelle definiert ist. Kennzeichnend für eine Nekrose ist die Permeabilität der Zellmembran, durch die unkontrolliert intrazelluläre Bestandteile in die Umgebung austreten und so zu entzündlichen Reaktionen führen. Die Apoptose hingegen ist durch das Abschnüren so genannter apoptotischer Körperchen charakterisiert, in welchen die abgebauten Zellbestandteile in einer Membranhülle verbleiben und von anderen Zellen zur weiteren Verwendung endozytiert werden können. Eine entzündliche Reaktion bleibt aus. Ein zentraler molekularbiologischer Vorgang, der die Apoptose induziert, ist die Aktivierung einer speziellen Klasse von Proteasen, den Caspasen. Diese können in zwei Klassen eingeteilt werden, Initiator-Caspasen (Caspase 1, 2, 8, 9, 10), die zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose-Aktivierung in ihre aktive Form durch Abspaltung eines Propeptides übergehen und danach die zweite Klasse, die Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7), aktivieren. Die Aktivierung der Effektor-Caspasen führt letztendlich zur Spaltung zahlreicher Proteine. Diese Abbauvorgänge leiten die Veränderungen der Zellen während der Apoptose ein. Eines der frühesten Ziele der Effektor-Caspasen ist Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) (Duriez and Shah 1997). Dieser Vorgang gilt allgemein als der Punkt, an dem die Zelle die Entscheidung zur Apoptose getroffen hat und eine Umkehr nicht mehr möglich ist. Für einen Überblick über Caspasen und ihre Aktivierung von einer inaktiven Pro-Form in ihre

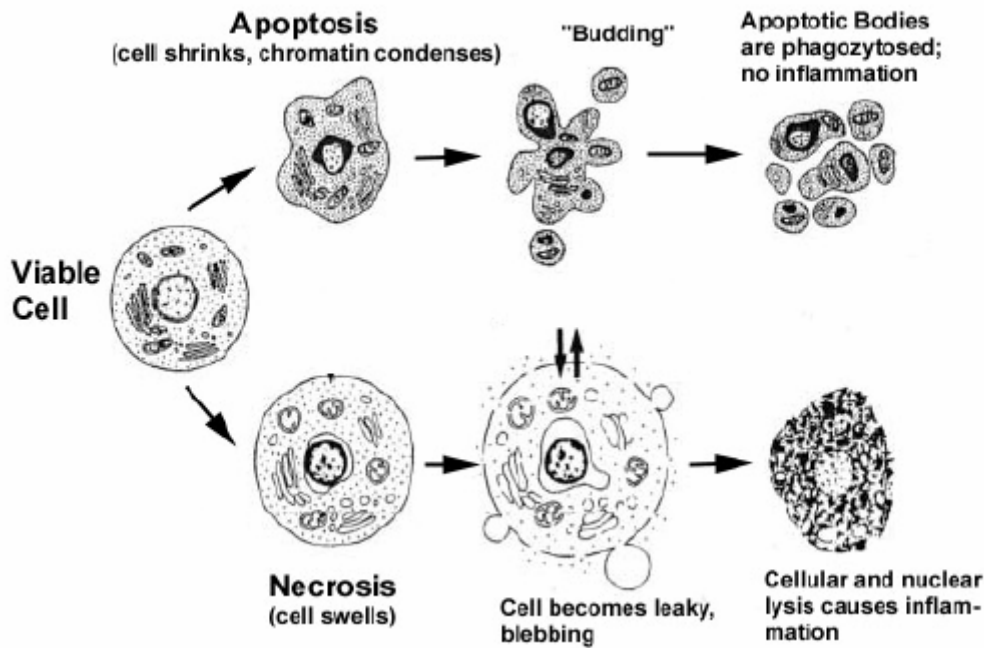


Abbildung 1: Zellmorphologische Darstellung der zwei Formen des Zelltodes. Einerseits die Apoptose, einhergehend mit Volumenabnahme der Zelle, Kondensation des Chromatins und letztendlich der Abschnürung der apoptotischen Körperchen. Andererseits die Nekrose, einhergehend mit Volumenzunahme der Zelle, Membranintegritätsverlust und Lyse der Zelle. Unberücksichtigt ist ein Spezialfall der Apoptose, die terminale Differenzierung (modifiziert übernommen aus Van Cruchten and Van Den Broeck 2002).

aktive Form sei die Publikation von Earnshaw, Martins und Kaufmann empfohlen (Earnshaw et al. 1999).

Die Apoptose kann über zwei Signalwege initiiert werden. Dies ist einerseits der „extrinsische Signalweg“, welcher durch Ligandbindung an Rezeptoren der „Todesrezeptor-Familie“ ausgelöst wird. Neben anderen sind dies die Rezeptoren der Tumornekrose-Faktoren, CD95/Fas/APO-1 und die TRAIL-Rezeptoren (Locksley et al. 2001). Ligand-Rezeptor-Interaktion führt zur Entstehung des „*death inducing signalling complexes*“ (DISC), der aus dem Adaptermolekül FADD und Caspase 8 besteht (Boldin et al. 1996; Muzio et al. 1996). Die Rekrutierung von Caspase 8 in den DISC aktiviert diese, die wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert.

Der zweite Signalweg, der so genannte intrinsische Signalweg, wird über Proteine der Bcl-2-Familie reguliert, welche eine Reihe von pro- bzw. antiapoptotischen Proteinen umfassen. Im Allgemeinen führt Zellstress, vor allem in Form von DNA-Schäden, welche zur Aktivierung von p53 führen, zu einer Aktivierung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg. Durch die Inhibierung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine werden apoptogene Faktoren aus dem Mitochondrion in das Zytoplasma entlassen. Dazu gehören Cytochrom c, und Inhibitoren von so genannten „*Inhibitor of Apoptosis Proteins*“ (IAP), wie Smac/DIABLO (Kluck et al. 1997; Yang, J. et al. 1997; Finucane et al. 1999). Durch die Anwesenheit von Cytochrom c im Zytoplasma entsteht der Apoptosom-Komplex, bestehend aus Apaf-1 und Caspase 9. Durch diesen wird Caspase 9 aktiviert, die wiederum die Effektor-Caspasen aktiviert (Li, P. et al. 1997; Zou et al. 1997).

1.2.1.1 Omi/HtrA2

Omi, auch als *HtrA2* („*high temperature requirement*“) bekannt, gehört zu der *HtrA*-Familie von Serinproteasen, welche in *E. coli* charakterisiert wurden (Lipinska et al. 1988; Lipinska et al. 1990). *HtrA* ist eine 48 kDa große Serinprotease, welche essentiell für das bakterielle Überleben bei Temperaturen über 42°C ist. Diese Protease aus *E. coli* spielt eine Rolle bei der Degradation abnorm gefalteter Proteine bei überhöhten Temperaturen (Kolmar et al. 1996; Kim et al. 1999). Bei niedrigeren Temperaturen scheint dieses Protein eine chaperonartige Funktion zu erfüllen (Spiess et al. 1999). In Säugetieren wurden homologe Proteine dieser Serinprotease gefunden. *HtrA1* wurde in humanen Fibroblasten erstmals identifi-

ziert (Zumbrunn and Trueb 1996), während *HtrA2* über ein „*Yeast-Two-Hybrid*“-Experiment identifiziert werden konnte (Gray et al. 2000).

HtrA2 ist in den Mitochondrien lokalisiert. Nach Induktion der Apoptose verlässt die Protease die Mitochondrien und spaltet IAPs und trägt so zur Aktivierung der Caspasen bei (Suzuki et al. 2001; Verhagen et al. 2002; Srinivasula et al. 2003; Yang, Q. H. et al. 2003). Neben seiner Funktion als proapoptotisches Protein, scheint *HtrA2* auch eine Funktion in der Homeostase der Mitochondrien zu besitzen (Jones et al. 2003) und zeigt somit ebenfalls eine duale Rolle, wie sie bereits für das bakterielle Protein beschrieben wurde.

Cilenti und Mitarbeiter konnten 2004 zeigen, dass *HtrA2* in einem „*Yeast-Two-Hybrid*“-Experiment mit HAX1 interagiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach Induktion der Apoptose *HtrA2* HAX1 degradiert (Cilenti et al. 2004). Diese Degradation konnte durch Zugabe eines Inhibitors von *HtrA2*, ucf-101 (Cilenti et al. 2003), aufgehoben werden. Obwohl *HtrA2* das Mitochondrion nach Apoptose-Induktion verlässt, um IAPs im Zytoplasma zu spalten, beschreiben Cilenti und Mitarbeiter eine Spaltung von HAX1 durch *HtrA2* bereits in Mitochondrien. Die Interaktion zwischen *HtrA2* und HAX1 legt eine antiapoptotische Funktion von HAX1 nahe.

1.2.1.2 HIV-1 „viral protein R“ (Vpr)

Das „*Human Immunodeficiency Virus*“ (HIV) infiziert primär T-Helferzellen (T_H) und Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie, welche das Oberflächenprotein CD4 exprimieren. Der zentrale Vorgang der HIV-Pathogenität ist der langsame und selektive Verlust der $CD4^+$ -T-Lymphozyten. Dieser Verlust könnte sowohl auf einen schnellen „*turnover*“ und Tod der infizierten Zellen zurückgehen, als auch auf den Tod von nicht-infizierten Nachbarzellen durch einen indirekten Effekt infizierter Zellen (Gougeon and Montagnier 1999). Mehrere HIV-1 Proteine, darunter Nef, Vif, Vpr, Vpu, Tat und Ref, stehen im Verdacht Einfluss auf eine Apoptose-Induktion zu haben.

Vpr, ein 14 kDa großes Protein, spielt eine Rolle bei der Pathogenität von HIV-1 *in vivo* (Connor et al. 1995; Gibbs et al. 1995; Goh et al. 1998). Zahlreiche Funktionen innerhalb des viralen Zyklus wurden mit Vpr assoziiert. Eine dieser Funktionen ist eine Induktion der Apoptose in infizierten Zellen (Yao et al. 1998; Stewart et al. 2000). Diese Vpr-abhängige Induktion scheint über die Aktivierung von Caspase 9 in T-Zellen und peripheren mononukleären Blutzellen stattzufinden (Stewart et al. 2000; Muthumani et al. 2002).

In einem „*Yeast-Two-Hybrid*“-Experiment konnten Yedavalli und Mitarbeiter HAX1, als einen Interaktionspartner von Vpr identifizieren. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass Vpr direkt an HAX1 bindet, eine Überexpression von Vpr zu einer Relokalisation von HAX1 aus den Mitochondrien ins Zytoplasma führt und eine Überexpression von HAX1 den proapoptischen Effekt von Vpr unterbindet (Yedavalli et al. 2005).

1.2.1.3 *Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein (EBNA-LP)*

EBNA-LP ist ein virales Phosphoprotein, das als erstes, zusammen mit "*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-2*" (EBNA-2), nach Infektion von B-Zellen mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) exprimiert wird (Alfieri et al. 1991). Dieses Protein scheint eine wichtige Rolle im Virus-induzierten Immortalisierungsprozeß von infizierten B-Zellen zu spielen (Mannick et al. 1991). Dabei weist es eine Multifunktionalität auf und interagiert mit oder kontrolliert mehrere Komponenten der Zelle. Die Funktion von EBNA-LP im viralen Lebenszyklus resultiert aus der Summe dieser Interaktionen (Mannick et al. 1991). In einem „*Yeast-Two-Hybrid*“-Experiment wurde HAX1 als einer dieser Interaktionspartner identifiziert (Kawaguchi et al. 2000; Dufva et al. 2001). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass EBNA-LP mit HAX1 und Bcl-2 interagiert sowie einen Komplex mit BHRF-1, einem EBV-Homolog von Bcl-2, bildet (Matsuda et al. 2003). Dieser Komplex könnte stabilisierend auf die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 und HAX1 wirken, so dass sich EBV über diesen Mechanismus vor einer Induktion der Apoptose in infizierten Zellen schützen kann. Dieser Effekt könnte zu einer Immortalisierung der infizierten B-Zelle führen.

1.2.2 Interaktionspartner mit Funktion in Aktinzytoskelett-Dynamiken

Ein dynamisches Aktinzytoskelett spielt eine integrale Rolle in zellulären Prozessen, die eine Veränderung der Plasmamembran, Zellbewegung oder Bewegung von Vesikeln und Partikeln benötigen (Lauffenburger and Horwitz 1996; Ridley 2001; Engqvist-Goldstein and Drubin 2003; Fehrenbacher et al. 2003). Lamellipodien sind dünne, blattartige Auswüchse an der Vorderkante migrierender Zellen, welche ein gitterartiges Netzwerk von Aktinfilamenten enthalten. Filopodien sind dünne, zylindrische Fortsätze, die aus Bündeln von verbundenen Aktinfilamenten bestehen. Ein Aufbau dieser Strukturen an der Vorderseite der Zellen, zusammen mit einer Schrumpfung am Hinterende der Zellen sind essentiell für Zellmotilität (Lauffenburger and Horwitz 1996; Ridley 2001). Die Reorganisation des Zytoskeletts wird von GTPasen der Rho-Familie reguliert. Dabei fördert die Rac-Unterfamilie die Entstehung von Lamellipodien. GTPasen vom Cdc42-Typ stimulieren das Ausfahren von Filopodien, während Rho-Proteine die Kontraktilität von Aktinomyosin regulieren (Ridley 2001; Burridge and Wennerberg 2004). Aktinpolymerisation wird entweder durch Entfernung der Kappe am Ende des Filaments zur Exposition des „*barbed ends*“ des Filaments, der Spaltung eines Filaments, um neue „*barbed ends*“ herzustellen oder des *de novo* Aufbaus eines Filaments durch den „*actin related protein*“-Komplex 2/3 (Arp2/3) initiiert (Pollard et al. 2000). Der letztere Vorgang spielt eine Rolle bei der Induktion von kortikaler Aktinpolymerisation, welche für die Umwandlung der Plasmamembran von großer Bedeutung ist sowie bei der Erschaffung von Aktinstrukturen, die die Vesikelmotilität regulieren. Die Aktivität des Arp2/3-Komplexes wird durch so genannte „*actin nucleation promoting factors*“ (NPFs) stimuliert. Dazu gehören das „*Wiskott-Aldrich syndrome*

protein“ (WASP) und „*suppressor of cAMP receptor/WASP family verprolin homologous protein*“ (SCAR/WAVE). Diese stellen eine Verbindung zwischen Cdc42 und Rac Aktivierung und der Stimulation der Aktinbildung dar (Higgs and Pollard 2001).

1.2.2.1 Cortactin / HS-1

Cortactin ist ein Protein von etwa 62 kDA Größe, das von dem humanen Gen *EMS1* kodiert wird (Wu et al. 1991; Schuurin et al. 1993). Die N-terminale Region des Proteins enthält einen 21-22 Aminosäuren langen Bereich, der reich an sauren Aminosäuren ist und als N-terminale saure Domäne („*N-terminal acidic domain*“, NTA) bezeichnet wird (Weed et al. 2000). Diese NTA enthält ein tryptophanhaltiges Sequenzmotiv, in Cortactin bestehend aus DDW, welches charakteristisch für NPFs wie WASP, neurales WASP (N-WASP) und SCAR/WAVE sowie Myosin-I-Homologe der Hefe ist, also für Proteine, die mit dem Arp2/3-Komplex interagieren (Weed et al. 2000; Higgs and Pollard 2001). In C-terminaler Richtung folgen dann 6,5 Kopien einer 37 Aminosäuren langen Sequenz. Diese *Repeats* sind in orthologen Proteinen konserviert, auch wenn sich die Anzahl der Kopien unterscheidet. So gibt es in der Ratte, neben Cortactin A mit 6,5 Kopien, zwei Isoformen, Cortactin B und C, welche 5 bzw. 4 Kopien besitzen (Ohoka and Takai 1998), während das *Drosophila*-Cortactin 4 Kopien enthält (Katsube et al. 1998; Weed und Parsons 2001). Außerdem enthält Cortactin am C-terminalen Ende eine „*Src homology domain*“ (SH3).

HS-1 besitzt dieselben Proteindomänen wie Cortactin, allerdings besteht der „*cortactin-type repeat*“ nur aus 3,5 Kopien (Kitamura et al. 1989). Die Sequenzhomologie in diesen Domänen zwischen Cortactin und HS-1 ist sehr groß, NTA hat 68%, „*cortactin-type repeat*“ 69% und die SH3-Region eine 77% Homologie in murinem Cortactin und HS-1 (Daly 2004). Während Cortactin in einem Großteil des untersuchten Mausgewebes vorkommt (Daly 2004), wird *HS-1* nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Kitamura et al. 1989). Da Cortactin in hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert wird, scheint HS-1 seine Rolle in diesen Zellen zu übernehmen (Urano et al. 2003).

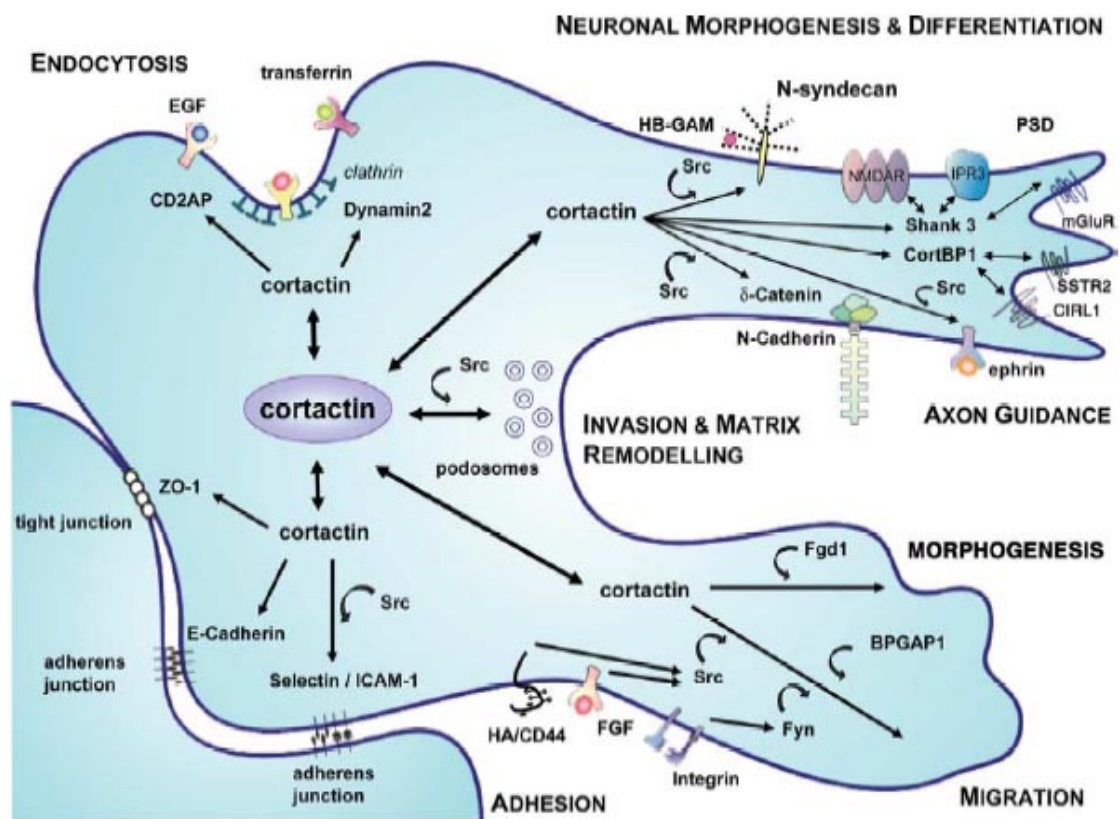


Abbildung 2: Darstellung der vielfältigen Rollen von Cortactin in der Adhäsion, Migration, Morphogenese, Differenzierung, Invasion, Matrix-Umstrukturierung und Endozytose. Phosphorylierung von Cortactin, vor allem durch die Src-Kinase, spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung von Cortactin, sowie in dessen Funktionsspezifität (Abbildung übernommen aus Lua und Low 2005).

Cortactin ist am Aufbau von Aktinfilamenten beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass Cortactin sowohl die Halbwertszeit, die der Arp2/3-Komplex zum Erreichen eines stationären Zustandes der Aktin-Polymerisation benötigt, verringert, als auch die Rate der Aktin-Polymerisation verbessert (Uruno et al. 2001; Weaver et al. 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die GTPase Rac-1, nach Aktivierung durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Cortactin zur Zellperipherie transloziert und Cortactin dort mit F-Aktin interagiert (Weed et al. 1998).

Jede der Cortactin-Domänen spielt eine Rolle bei der Interaktion des Proteins mit dem Aktinzytoskelett. So ist das „*cortactin-repeat*“-Element notwendig für die Bindung des Cortactins an F-Aktin. Die NTA-Domäne des Cortactin ist für die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes zuständig. Zusätzlich zur Arp2/3-Stimulierung, stabilisiert sie die Verzweigungspunkte des Filaments und inhibiert den Abbau des Aktins (Weaver et al. 2001). Es scheint sich ein ternärer Komplex zwischen Arp2/3, N-WASP und Cortactin zu bilden, wobei die NTA-Domäne des Cortactins mit Arp3 interagiert und die „*verprolin homology, cofilin homology and acidic*“ (VCA)-Domäne von N-WASP mit Arp2 assoziiert (Weaver et al. 2002). Die SH3-Domäne von Cortactin wiederum bindet an die Prolin-reiche Region (PRR) von N-WASP (Mizutani et al. 2002), wodurch ein stabiler Komplex entsteht. Die Bindung der SH3-Domäne an PRR von N-WASP wird über die Phosphorylierung dieser durch die Kinasen Erk und Src reguliert (Martinez-Quiles et al. 2004).

Die Phosphorylierung von Cortactin spielt eine große Rolle in der Regulation seiner Aktivität. Mehrere Kinasen sind an diesen Prozessen beteiligt. Eine Übersicht findet sich in der Publikation von Lua (Lua und Low 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass HAX1 ebenfalls mit Cortactin interagiert. Dies erfolgt im Zusammenhang mit „*Polycystic Kidney Disease*“ Protein 2 (PKD2) (Gallagher et al. 2000) und der α -Untereinheit des G-Proteins 13 ($G\alpha_{13}$) (Radhika et al. 2004). Diese Interaktionen werden in den Kapiteln für PKD2 und $G\alpha_{13}$ genauer besprochen.

Die Interaktion zwischen HAX1 und Cortactin sowie die Rolle von Cortactin im Aufbau und der Verzweigung des Aktinzytoskeletts legen, neben der Funktion von HAX1 in der Apoptose, eine weitere Funktion dieses Proteins in der Dynamik des Aktinzytoskeletts nahe.

1.2.2.2 „*Polycystic Kidney Disease*“ Protein 2 (PKD2)

Die autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankheit („*autosomal-dominant polycystic kidney disease*“, ADPKD) ist eine systemische, vererbte Störung, welche in jedem Alter auftreten kann. Sie ist gekennzeichnet durch die Bildung von Zysten in kanalbildenden Organen, vor allem in der Niere und der Leber sowie gastrointestinalen und kardiovaskulären Abnormalitäten und Abnormalitäten des Skelettmuskels (Gabow 1993). Es konnten zwei Gene identifiziert werden, welche bei den meisten Patienten mit ADPKD mutiert sind (Mochizuki et al. 1996). Diese wurden „*Polycystic Kidney Disease*“ 1 und 2 genannt (PKD1, bzw. PKD2). Während PKD1 eine Reihe von Proteinmotiven enthält, die eine Rolle des Proteins in Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion nahe legen (Hughes et al. 1995), hat die Homologie zwischen PKD2 und den α_1 -Untereinheiten der spannungsaktivierten Kalziumkanäle eine mögliche Funktion des Proteins in Kalziumflüssen aufgezeigt

(Mochizuki et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass PKD1 und 2 miteinander über ihre COOH-Enden interagieren und somit Teil desselben Proteinkomplexes oder Signaltransduktionsweges sind (Qian et al. 1997).

Das *PKD2*-Gen kodiert ein 968 AS großes Protein, welches 6 putative Transmembrandomänen besitzt und von dem angenommen wird, dass sowohl der N-Terminus, als auch der C-Terminus in das Zytoplasma ragt (Mochizuki et al. 1996).

Gallagher und Mitarbeiter fanden 2000 heraus, dass PKD2 mit HAX1 an seinem „Loop“ 5 interagiert. Außerdem konnten sie zeigen, dass HAX1 mit Cortactin koimmunopräzipitiert und, dass alle drei Proteine, HAX1, Cortactin und PKD2, auch in Lammellipodien lokalisiert sind (Gallagher et al. 2000). Es wird vermutet, dass die Interaktion dieser drei Proteine eine Rolle bei der Entstehung von Zysten in der ADPKD spielen könnte.

1.2.2.3 *G* α -Untereinheit des G-Proteins *G*₁₃ (*G* α ₁₃)

Die G12-Familie von G-Proteinen, bestehend aus den G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, aktivieren Signalwege, die im Zellwachstum und bei der neoplastischen Transformation eine Rolle spielen (Radhika and Dhanasekaran 2001).

$G\alpha_{13}$ scheint dabei eine Aufgabe bei der Regulation der Zellmigration zu besitzen. Dafür gibt es zwei Hinweise: Einerseits konnte gezeigt werden, dass das *Drosophila*-Protein Cta, ein Ortholog von $G\alpha_{13}$, für Zellbewegungen während der Embryogenese benötigt wird (Parks and Wieschaus 1991). Andererseits zeigten

Fibroblasten mit $G\alpha_{13}$ -Nullmutation den Verlust der chemokinetischen Antwort auf Thrombin und durch den Lysophosphatidylsäure-Rezeptor induzierte Zellbewegungen (Offermanns et al. 1997; Gu et al. 2002). Da $G\alpha_{13}$ Signalwege stimulieren kann, die von der kleinen GTPase Rac reguliert werden (Plonk et al. 1998) und diese bei der Lammelipodienbildung eine Rolle spielen (siehe 1.2.2), könnte Rac und $G\alpha_{13}$ an der Bildung dieser beteiligt sein. $G\alpha_{13}$ kann aber auch die Bildung von fokalen Adhäsionkomplexen über die kleine GTPase Rho stimulieren (Buhl et al. 1995; Hooley et al. 1996). Es scheint also an der Regulierung sowohl der Zelladhäsion, als auch der Zellmigration beteiligt zu sein.

Bei der Suche nach Mechanismen, die diese gegenläufigen Signale regulieren könnten, konnten Radhika und Mitarbeiter 2004 zeigen, dass HAX1 mit $G\alpha_{13}$ interagiert (Radhika et al. 2004). Dabei entdeckten sie, dass $G\alpha_{13}$, HAX1, Rac-1 und Cortactin einen Komplex bilden, und dass HAX1-Überexpression in NIH3T3-Zellen eine Verstärkung der $G\alpha_{13}$ -vermittelten Zellmigration bewirkte, während gleichzeitig $G\alpha_{13}$ -HAX1-Interaktion die $G\alpha_{13}$ -vermittelte Rho-Aktivierung abschwächte (Radhika et al. 2004). HAX1 könnte also dafür verantwortlich sein, bei gleichzeitiger Abmilderung des $G\alpha_{13}$ -vermittelten Zelladhäsionssignals, dass von $G\alpha_{13}$ -vermittelte Signal in Richtung Zellmigration zu lenken.

1.2.3 Weitere Interaktionspartner von HAX1

1.2.3.1 *Interaktionspartner im Zusammenhang mit „Clathrin-coated“ Vesikeln*

Zwei Publikationen in letzter Zeit haben eine weitere mögliche Funktionalität von HAX1 aufgezeigt. Ortiz und Mitarbeiter beschrieben 2004, dass HAX1 ein Interaktionspartner der ATP-Bindungskassetten (ABC)-Transporter „*bile salt export protein*“ (BSEP), sowie der „*multidrug resistance proteins*“ (MDR) 1 und 2 ist (Ortiz et al. 2004). BSEP transportiert konjugierte Gallensäure (Gerloff et al. 1998), während MDR1 die Exkretion von hydrophoben, kationischen Stoffen in die Gallenflüssigkeit vermittelt (Kullak-Ublick et al. 2000) und MDR2 den Transport von Phospholipiden in die Gallenflüssigkeit ermöglicht (Ruetz and Gros 1994; Nies et al. 1996).

Ortiz und Mitarbeiter konnten zeigen, dass HAX1 am intrazellulären Transport dieser ABC-Transporter beteiligt ist. Durch *HAX1*-RNAi-Studien wurde gezeigt, dass die Internalisierung der Transporter gestört ist (Ortiz et al. 2004). Dieser Mechanismus wird wahrscheinlich über „*clathrin-coated*“ Vesikel ausgeführt. Diese Vermutung wird dadurch gestärkt, dass Cortactin an der clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt ist (Cao et al. 2003; Lynch et al. 2003).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass murines Hax1 an der Internalisierung von murinem Immunglobulin E (mIgE) in B-Zellen, sowie HS-1 und Hax1 an einer Endozytose von mIgE über Clathrin-Vesikel beteiligt sind (Oberndorfer et al. 2006).

Weitere Interaktionspartner von HAX1 lassen auf zusätzliche Funktionen des Proteins, abseits der bereits genannten Apoptose, Zytoskelett-Dynamiken und vesikulären Transport, schließen. So assoziiert HAX1 mit der 3'-untranslatierten mRNA von humanem Vimentin (Al-Maghrebi et al. 2002) und lässt so auf RNA-Bindeeigenschaften schließen. Außerdem konnte eine Interaktion zwischen HAX1 und Interleukin-1 α N-terminalem Protein (IL-1 α NLP) nachgewiesen werden (Yin et al. 2001).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe ist an der Aufklärung der molekularbiologischen Ursachen der Psoriasis interessiert. In Vorarbeiten wurde dabei das multifunktionelle Gen *HAX1*, als ein in der Psoriasis überexprimiertes Gen, identifiziert. In dieser Arbeit sollen Untersuchungen durchgeführt werden, die weitere Aufschlüsse über die Funktion von *HAX1* geben. Dabei sollte einerseits die Expression des murinen Orthologs studiert werden, um Aufschlüsse über eine organspezifische Expression des Gens zu erhalten. Das Expressionsmuster von *Hax1* in der Maus kann Rückschlüsse auf die Funktion des Gens liefern. Die Expression wurde einerseits auf Transkriptionsebene über Realtime-PCR und Northern Blot ermittelt, andererseits auf Proteinebene mit Western Blot. Weiterhin wurde die gewebsspezifische Verteilung des Proteins mittels Immunhistochemie untersucht. Die intrazelluläre Lokalisation von *Hax1* sollte über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Um Aufschlüsse über eventuelle zelltypspezifische Lokalisationen von *Hax1* zu gewinnen, wurden die intrazelluläre Lokalisation in Keratinozyten (Pam212-Zellen) und einer neuronalen Zelllinie (N2a) untersucht (Hippe et al. 2006).

Des Weiteren sollten die Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation aus den Mauszellen in humanen Keratinozyten vertieft werden. Dazu wurde die Kolo-kalisation von *HAX1* mit dem endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und mit Aktin untersucht.

In „*Knock-down*“-Experimenten mit *HAX1*-spezifischer siRNA sollte die Funktion des Gens im Hinblick auf Einflüsse auf das Zytoskelett und der Motilität von Keratinozyten untersucht werden. Dabei sollte der „*Knock-down*“ von *HAX1* mit siRNA

optimiert und anschließend in einem *in vitro* Wundheilungsassay, bei dem die Wanderung von Zellen über einen Riss in der Monolayer von Zellen in Kultur untersucht wird, analysiert werden, ob der „*Knock-down*“ von *HAX1* einen Einfluß auf die Beweglichkeit der Keratinozyten hat. Durch indirekte Immunfluoreszenz sollen schließlich Unterschiede von Aktin an einem Riss in Zellen mit normaler *HAX1*-Expression und in „*Knock-down*“ Zellen aufgeklärt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

HaCaT, humane immortalisierte Keratinozyten	(Boukamp et al. 1988)
Pam212, murine Keratinozyten	(Yuspa et al. 1980)
N2a, murine neuronale Zellen, ATCC #CCL-131	LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC Substrate Kit	VECTOR Laboratories
Agarose PEQ Gold	peqlab, Erlangen, Deutschland
Apoptosis Inducer Set I (enthält Camptothecin)	Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Avidin / Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BioRad Protein Assay	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Caspase 3 Assay Kit	BD Biosciences, San Jose, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
CrystalMount®	Biomedex, Foster City, USA
dNTP-Mix	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ECL Western blotting Analysis System	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Formalin-Lösung (4%)	Fischer, Saarbrücken, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Haematoxylin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
High Prime DNA Labeling Kit	Roche, Basel, Schweiz
H ₂ O _{dest}	Merck, Darmstadt, Deutschland

HighPerfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Laemml-Probenpuffer 4x	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, blotting grade	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Oligo(dT)12-18 Primer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
RNAseZap	Ambion, Austin, USA
RNAasin, RNase-Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
20% SDS-Lösung	MP Biomedicals, Solon, USA
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Dako, Hamburg, Deutschland
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vector Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%ig)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Alle weiteren nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma bezogen.

2.1.3 Puffer

Guanidinthiocyanat-Puffer für RNA-Aufreinigung

50 mM Tris-Acetat

4 M Guanidinthiocyanat

10 mM Magnesiumchlorid

pH 7,8

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

pH 7,0

Laemmli Probenpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

20% Glycerol

10% SDS

0,1% Bromphenolblau

20x MOPS SDS Laufpuffer

1 M MOPS

1 M Trizma Base

2% SDS-Lösung

16 mM EDTA

Western Blot Transferpuffer

48 mM Trizma Base

39 mM Glycine

0,03% SDS-Lösung

20% Methanol

Protein Lyse Puffer

25 mM HEPES pH 7,9

50 mM NaF

1% Triton X-100

5 mM EDTA

100 mM NaCl

+ Protease Inhibitor Cocktail III (Merck Biosciences)

PBST Western Blot Waschpuffer

0,02 M Natriumphosphatpuffer (aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4)

0,15 M NaCl

pH 7,2

0,5% Tween 20

HEPES-Puffer für Caspase 3 Assay

40 mM HEPES, pH 7,5

20% Glycerol

4 mM DTT

2.1.4 Materialien und Verbrauchsgegenstände

ABI Prism 7300	Quantitatives Real-time PCR Gerät, ABI Prism 7300, Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarosegel-Elektrophoresekammer	peqlab, Erlangen, Deutschland
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAKO Pen	Dako, Hamburg, Deutschland
Densitometer	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Reaktiongefäße, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybond [®] ECL-Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Kamerasystem, digital	Olympus Camedia C-4040, Olympus, Hamburg, Deutschland
Kulturplatte, 6-well und 24-well	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Laser-Rastermikroskop	IX70 invertiertes Mikroskop, Fluoview 2.0 Software, Olympus, Lake Success, USA
Mikrodismembrator Model U	B.Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Mikrotom	1150/Autocut, Jung-Reichert
Mouse MTN Blot	Clontech, Mountain View, USA
NuPAGE [®] 10% Bis-Tris Polyacrylamid-Gel	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Objekträger, Superfrost plus	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
PCR-Maschine	Mastercycler gradient, Eppendorf
Phosphoimager	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Proteingelkammer	XCell II Mini-Cell, Novex Electrophoresis GmbH, Frankfurt, Deutschland
Röntgenfilm	Hyperfilm, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Time lapse Video-Mikroskopie-System	Inverses Leitz-Mikroskop mit Zellkulturausstattung, Zeiss AxioCam HRc mit AxioVision 4.1 Software, Zeiss, Oberkochen, Deutschland oder Zeiss CellObserver®
Ultraturrax	IKA GmbH, Staufen, Deutschland
Zellkulturflaschen, 175 cm ²	BD Biosciences, San Jose, USA
Zentrifuge, Eppendorf-Reaktionsgefäße	5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Primer, siRNA und Plasmide

TaqMan Gene Expression Assay Mm01623696_sH, spezifisch für murines Hax1	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan Gene Expression Assay Mm00607939_s1, spezifisch für murines β -Aktin	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan Gene Expression Assay Hs00740060_g1, spezifisch für humanes HAX1	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan Gene Expression Assay Hs99999903_m1, spezifisch für humanes β -Aktin	Applied Biosystems, Foster City, USA
Hs_HAX1_1 HP siRNA (NM_001018837), SI00433944	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mm/Hs_MAPK1 control siRNA, 1022564	Qiagen, Hilden, Deutschland
Negative Control siRNA Alexa488 konjugiert, 1022076	Qiagen, Hilden, Deutschland
pCRII-HAX1, HAX1 cDNA kloniert in pCRII	(Hippe et al. 2006)

2.1.6 Antikörper

Maus-IgG1-anti-HAX1 (Clone 52)	BD Biosciences, San Jose, USA
Ziege-IgG-anti-HAX1 (E-20)	Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, USA
Maus-IgM-anti-Aktin (JLA20)	Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Ziege-IgG-anti-Aktin (IL-9)	Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, USA, Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Anna von Mikecz, Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf
Humanes Autoimmunsrum gegen endoplasmatisches Retikulum	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W.M. Keck Center of Autoimmune Diseases, Scripps Research Institute, LaJolla, USA
Humanes Autoimmunsrum gegen Mitochondrien	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W.M. Keck Center of Autoimmune Diseases, Scripps Research Institute, LaJolla, USA
Anti-Maus-Peroxidase gekoppelt	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Anti-Ziege biotinyliert	Dako, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus FITC-konjugiert	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, U.K.
Ziege anti-Human Rhodamin-konjugiert	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, U.K.
Esel anti-Ziege CY2-konjugiert	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, U.K.
Kanninchen anti-Maus CY3-konjugiert	Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, U.K.

2.1.7 Zellkulturgeräte und –medien

DMEM-Medium	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum	Seromed/Biochrom, Berlin, Deutschland
Glutamin	PAA, Pasching, Deutschland
MEM-Medium	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Sterilbank	HBB 2472 S, Heraeus, Hanau, Deutschland
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Zellkultur Inkubator	Cytoperm Incubator, Thermo Electron, Langenselbold, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Drei bis fünf Monate alte C57/BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden von der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bezogen. Die Tierhaltung entsprach den vom Tierschutzgesetz vorgegebenen Richtlinien. Die Mäuse wurden in einem klimatisierten Raum ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, $55 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit) mit einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus (6 bis 18 Uhr Beleuchtung, 320 LUX) untergebracht und in Käfigen ($800\text{ cm}^2 \times 15\text{ cm}$) in Gruppen von drei bis sechs Tieren gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter (SNIFF Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) und zu Trinkwasser (ozonisiert und angesäuert mit HCl, pH 2,6–3,0).

Nach Erhalt der Tiere wurden diese durch eine zervikale Dislokation getötet und die Organe entnommen. Die entnommenen Organe wurden entweder sofort in Folgeversuchen eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Zellkultur

Die immortalisierte, humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (Boukamp et al. 1988) und die murine Keratinozytenzelllinie Pam212 (Yuspa et al. 1980) wurden in DMEM-Medium (Gibco), supplementiert mit 10% FCS, Glutamin und Penicillin/Streptomycin, in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. HaCaT-Zellen wurden 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz passagiert, während Pam212-Zellen mit Erreichen der Konfluenz passagiert wurden.

Die murine, neuronale Zelllinie Neuro-2a (N2a, ATCC #CCL-131, LGC Promochem GmbH) wurde entsprechend der ATCC Richtlinien in MEM-Medium kultiviert. Alle Kultivierungen fanden in einem Cytoperm Inkubator bei 37°C, 5% CO₂-Partialdruck und einer Humidität von 95% statt.

Für die Passagierung der Zellen wurde das Medium abgenommen und anschließend die Zellen von dem Flaschenboden mit Trypsin abgelöst. Für Experimente wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60 % - 80 % herangezogen.

2.2.3 RNA-Extraktion aus Mausgeweben

Die RNA aus Mausgewebe wurde nach Chomczynski und Sacchi (1987) in einem Guanidinthiocyanat-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Gewebe in einem Ultraturrax homogenisiert. Die RNA wurde danach mit Phenol/Chloroform aufgereinigt und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Die gefällte RNA wurde in DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen.

2.2.4 RNA-Extraktion aus Zellen

Die RNA wurde mit TRIzol (Invitrogen), einem Ein-Phasen-Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi (1987) aus Zellen extrahiert. Dabei wurden die Zellen, nach Abnahme des Kulturüberstandes, in 500 µl TRIzol / *well* im *6-well*-Format aufgenommen. Nach Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol wurde der Ansatz zur Phasentrennung 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase mit der RNA wurde abgenommen, während die Interphase mit genomischer DNA und die proteinhaltige, untere Phenolphase verworfen wurden.

Die wässrige Phase wurde mit Isopropanol versetzt und die Nukleinsäuren über Nacht bei -80°C gefällt. Der Ansatz wurde anschließend 30 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 80% Ethanol von Salzen gereinigt und nach einer weiteren Zentrifugation (15 Minuten bei 12000 rpm und 4°C) und Trocknen des Niederschlags in 30-50 µl DEPC-behandeltes H₂O aufgenommen.

2.2.5 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung und Qualitäts-Kontrolle

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Spektralphotometer. Die Absorption bei 280 nm gibt den Proteingehalt der Lösung, die Absorption bei 320 nm dagegen die Streuung an. Durch Erstellen des Quotienten A_{260}/A_{280} erhält man die Reinheit der Nukleinsäureproben. Dieser liegt für saubere Aufarbeitungen bei $\epsilon=1,8$. Der Messwert der Absorption bei 320 nm wird von den Messwerten bei 260 nm und 280 nm abgezogen. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook (Sambrook et al. 1989) berechnet. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption A_{260} von 1 genau 50 μg DNA/ml, für RNA 40 μg RNA/ml.

Zur Bestimmung der Qualität der RNA wurde ein 1 μl Aliquot der RNA-Probe auf einem mit Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzten 1% Agarosegel aufgetragen, die RNA nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend die Qualität anhand der Schärfe der 28S- und 18S-RNA-Banden eingeschätzt. Proben, welche einen zu großen Anteil an degradierter RNA aufwiesen wurden verworfen.

2.2.6 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde 1 μg RNA mit Superscript II nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die mRNA wurde über Oli-

go(dT)12-18-Primer spezifisch umgeschrieben. Zur Inhibierung von RNasen wurde zu den Reaktionsansätzen RNasin und DTT gegeben.

2.2.7 Realtime-PCR

Realtime-PCR-Experimente wurden mit 25 ng cDNA in einem ABIPrism 7300 durchgeführt. Die Realtime-PCR wurde nach der TaqMan[®]-Methode durchgeführt, bei der zusätzlich zu den beiden spezifischen Primern zur Amplifikation der cDNA ein dritter Primer (Probe-Primer) eingesetzt wird. Dieser bindet auf der cDNA zwischen den Erkennungssequenzen der spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Durch Freisetzung eines an den Probe-Primer gebundenen Farbstoffs während der Polymerisation des PCR-Produktes durch Abbau des Probe-Primers kann die Menge an PCR-Produkten indirekt in Echtzeit gemessen werden.

Für eine Detektion von *Hax1* wurde der TaqMan[®] Gene Expression Assay Mm01623696_sH benutzt, welcher vom Hersteller auf seine Spezifität bereits überprüft ist und garantiert wird. Die Expression von β -Aktin diente als endogene Kontrolle (TaqMan[®] Gene Expression Assay Mm00607939_s1). Die PCR-Reaktion wurde im TaqMan[®] Universal PCR Master Mix durchgeführt. Alle eingesetzten cDNA-Proben wurden in Duplikaten gemessen und die Daten nach der komparativen C_T-Methode mit der Expression von β -Aktin als endogene Kontrolle, sowie einer durchschnittlichen *Hax1*-Expression aller untersuchten Organe als primärer Kalibrator, ausgewertet. Die Analyse wurde nach den Richtlinien von Applied Biosystems durchgeführt (Applied Biosystems 2004).

2.2.8 Northern Blot

Ein kommerziell bezogener „*multi-tissue Northern blot*“ mit 2 µg Poly-A⁺-mRNA pro Spur wurde zur Detektion von *Hax1*-mRNA benutzt. Zur Generierung einer Sonde wurde *Hax1* cDNA mit einem „*High Prime DNA Labeling Kit*“ nach den Angaben des Herstellers mit α -³²P-dATP markiert. Die Membran wurde über Nacht bei 42°C mit der Sonde in der vom Hersteller der Membran vorgesehenen Hybridisierungslösung („*ExpressHyb*[™]“) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 2x SSC, 0,1% SDS, bzw. 0.5x SSC, 0,1% SDS gewaschen bis die radioaktive Aktivität der Membran bei ca. 7 Beq lag. Die Signale wurden über einen Röntgenfilm detektiert und über daran anschließende Detektion in einem Phosphorimager quantifiziert.

2.2.9 Protein-Experimente

2.2.9.1 *Proteinextraktion*

Murines Gewebe wurden mit PBS gewaschen und anschließend in Protein-Lyse-Puffer mit einem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 Minuten mit 6000 rpm zur Reinigung von Zelltrümmern zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet, während der Niederschlag verworfen wurde.

Zellen aus der Zellkultur wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend eine geeignete Menge Protein-Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben (200 µl im 6-well-Format). Nach kurzer Inkubation wurde die Lösung aus dem Kulturbedeälter entnommen und 10 Minuten mit 6000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BioRad Protein Assay nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) ermittelt.

2.2.9.2 *Western Blot*

25 µg der Protein Extrakte wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mit einem NuPAGE® 10% Bis-Tris Polyacrylamid-Gel in 1x MOPS-SDS Laufpuffer der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel mit einem Trans Blot SD in Transferpuffer auf eine Hybond-ECL-Nitrocellulosemembran nach der "*Semi-Dry*"-Methode in Anlehnung and Towbin *et al.* (1979) übertragen. Die Blockierung der Membran, nachfolgende Waschschr

und die Immundetektion wurden nach den Vorgaben der Firma Amersham vorgenommen. Monoklonaler Anti-HAX1 Maus-IgG1-Antikörper der Firma BD Biosciences wurde 1:500 für die Inkubation in Blockierungsreagenz verdünnt, während der Anti-Maus-IgG-Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper aus dem ECL Western Analysis Kit 1:10000 in PBST verdünnt wurde. β -Aktin wurde mit einem murinen Anti-Aktin IgM-Antikörper detektiert.

Die Signale wurden mit Röntgenfilmen detektiert und anschließend densitometrisch für die Quantifizierung mit einem kalibrierten Densitometer aufgenommen.

2.2.9.3 Caspase 3-Assay

Die Auswirkung eines *HAX1*-*Knock-downs* auf die Induktion der Apoptose wurde über einen Caspase 3-Assay ermittelt. Dabei wurden HaCaT-Zellen mit 20 μ M Camptothecin behandelt. Camptothecin ist ein pflanzliches Alkaloid, das aus *Camptotheca acuminata* (Chinesischer "Happy Tree") gewonnen wird und einen potenten inhibitorischen Effekt auf Topoisomerase I ausübt. Nach bestimmten Inkubationszeiten (siehe 3.4.2) wurde Protein aus den behandelten Zellen extrahiert (siehe 2.2.9.1) und anschließend 25 μ g des Lysats in den Caspase 3-Assay eingesetzt.

In dem Caspase 3-Assay wird die Aktivität der Caspase über deren Protease-Aktivität ermittelt. Als Substrat dient dabei N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (NAc-DEVD-AMC). Die Aminosäurekette DEVD ist die Erkennungssequenz der Caspase, so dass durch aktivierte Caspase 3 AMC, ein Fluo-

reszenzfarbstoff mit einer Excitationswellenlänge von 380 nm und einer Emissionwellenlänge von 420-460 nm, von dem Peptid abgespalten wird. Freigesetztes AMC wurde in einem Fluorimeter detektiert. Das Experiment wurde nach der Anleitung des „Caspase 3 Assay Kits“ von BD Biosciences durchgeführt. Das Substrat NAc-DEVD-AMC wird in einem HEPES-Puffer mit dem Zelllysat versetzt und bei 37°C drei Stunden inkubiert. Während der Inkubation erfolgte die Messung der Fluoreszenz alle 30 Minuten. Die Messwerte nach einer Stunde Inkubationszeit wurden für die Auswertung des Experimentes benutzt.

2.2.10 Immunhistochemie

Für immunohistochemische Analysen wurden in 4% Formaldehyd fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet, die an einem 1150/Autocut Mikrotom von Jung-Reichert in 4 µm Dicke geschnitten wurden.

Für die Paraffinierung wurden die Gewebestücke erst dehydriert und anschließend in flüssigem Paraffin nach folgendem Protokoll eingebettet:

1. 70% Isopropanol bei RT für 15 Minuten
2. 80% Isopropanol bei RT für 15 Minuten
3. 96% Isopropanol bei RT für 15 Minuten
4. 100% Isopropanol bei RT für 15 Minuten
5. Xylol bei RT für 15 Minuten
6. Xylol bei RT für 15 Minuten
7. Paraffin bei 60 °C für 15 Minuten
8. Paraffin bei 60 °C für 15 Minuten

9. Paraffin bei 60 °C für 15 Minuten

Nach dem Schnitt wurden die Proben auf Superfrost Plus® Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 64°C getrocknet.

Es folgte eine Fixierung der Proben durch Backen der Objektträger bei 70°C für zwei Stunden. Anschließend wurde eine Deparaffinierung mit Xylol mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 2x Xylol-Waschung für 40 Sekunden
2. 99% Ethanol für 40 Sekunden
3. 96% Ethanol für 40 Sekunden
4. 70% Ethanol für 40 Sekunden
5. Waschen in H₂O_{dest}

Anschließend wurden die Proben in PBS-Puffer gelegt.

Die Immunfärbung der Proben wurde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Das Standardvolumen für Inkubationen von Reagenzien auf den behandelten Schnitten war 150 µl. Die zu färbenden Schnitte wurden mit einem Dako-Stift umkreist und 10 Minuten in 0,6% H₂O₂ inkubiert, um vorhandene Peroxidase-Aktivität zu beseitigen. Anschließend fand eine Avidin/Biotin-Blockierung mit dem *Vector Blocking Kit* nach den Vorgaben der Firma statt. Nach einem PBS-Waschschritt wurden die Schnitte 90 Minuten bei 37°C mit 1:20 verdünntem Anti-HAX1 IgG Antikörper inkubiert. Danach wurden die Schnitte, nach einem PBS-Waschschritt, mit einem biotinyliertem Zweitantikörper gegen Ziegen-IgG in einer 1:400 Verdünnung 45 Minuten bei RT inkubiert.

Es folgte eine Inkubation mit 1:500 verdünntem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 45 Minuten bei RT. Das Streptavidin bindet an den biotinylierten Zweitantikörper und ermöglicht so eine Detektion über eine Peroxidase-Reaktion.

Zur Detektion wurden die Schnitte mit chromogenen AEC und H_2O_2 inkubiert, nach erfolgter Färbung mit H_2O gewaschen und mit Haematoxin gegengefärbt. Vor Untersuchung des Ergebnisses wurden die Schnitte in CrystalMount™ Eindeckelmedium eingebettet und 1-2 Stunden bei 37°C getrocknet und anschließend in einem Mikroskop begutachtet.

2.2.11 Immunfluoreszenz

Pam212, N2a und HaCaT-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und nach 24 Stunden Kultivierung mit Aceton fixiert, mit Methanol permeabilisiert und laut den Vorgaben von Chen und Mitarbeitern für eine indirekte Immunfluoreszenz behandelt (Chen et al. 2002). Für eine Detektion von HAX1 wurde ein monoklonaler Maus anti-HAX1 IgG1 Antikörper und für die Detektion des ERs und von murinen Mitochondrien humanes Autoimmenserum (zur Verfügung gestellt vom W.M. Keck Center of Autoimmune Diseases, Scripps Research Institute, La Jolla, USA) benutzt. Mitochondrien in HaCaT-Zellen wurden mit MitoTracker® Deep Red 633 mit dem vom Hersteller angegebenen Protokoll gefärbt. In der Maus wurde als Zweitantikörper Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter anti-Maus IgG1 Antikörper aus der Ziege für Hax1 und RhodaMinuten-konjugierter anti-Human Antikörper aus der Ziege für humanes und murines ER sowie für murine Mitochondrien, benutzt. Zur Färbung von β -Aktin in HaCaT-Zellen wurde anti- β -Aktin IgG Antikörper

aus der Ziege eingesetzt und mit einem CY2-konjugiertem Esel-anti-Ziegen IgG Antikörper detektiert. Der anti-HAX1-Antikörper wurde mit CY3-konjugiertem anti-Maus IgG1 Antikörper aus Kaninchen in HaCaT-Zellen detektiert bzw. mit FITC-markiertem Kaninchen anti-Maus-Antikörper in der HAX1/ER-Doppelfärbung. MitoTracker[®] Deep Red 633 besitzt eine Eigenfluoreszenz im tiefroten Bereich (Emission bei 665 nm). Nach den Inkubationsschritten wurden die Zellen mit Fluoromount-G eingedeckelt.

2.2.12 Konfokale Laser-Mikroskopie

Von den fluoreszierenden Proben wurden Aufnahmen mit einem Laser-Rastermikroskop (Fluoview 2.0, IX70 invertiertes Mikroskop von Olympus), auch "*confocal laser scanning microscope*" (CLSM) genannt, mit einem 60x Öl-Objektiv (UPlanFI, Olympus) angefertigt. FITC und CY2 wurden bei 488 nm angeregt und zwischen 510 und 550 nm detektiert. RhodaMinuten und CY3 wurden bei 568 nm angeregt und zwischen 584 und 640 nm detektiert, während MitoTracker[®] Deep Red 633 bei 647 nm angeregt und bei 660 nm detektiert wurde.

Die Spezifität der Fluoreszenz-markierten Antikörper für ihre jeweiligen IgGs und dass die Signale der grünen, roten und tiefroten Kanäle von den jeweiligen Fluorochromen stammten, wurde über Kontrollen sichergestellt. In Zweifach- und Dreifach-Färbungen konnte keine Überlappung der Kanäle detektiert werden.

2.2.13 RNA-Interferenz (RNAi)-Experimente

RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet ein Verfahren einen „*Knock-down*“ von Genen mit Hilfe von kleinen (21-28 Nukleotide) Doppelstrang-RNAs durchzuführen. Dafür werden die Zellen mit diesen spezifischen „*small interfering RNAs*“ (siRNA) transfigiert. Die kleinen doppelsträngigen RNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu der Sequenz der mRNA des stillzulegenden Gens ist, werden in der Zelle in den „*RNA-induced silencing complex (RISC)*“, einem Proteinkomplex, der sowohl RNA-Helikase-, als auch RNA-Nuklease-Aktivitäten besitzt, eingebaut. Durch die eingebaute siRNA kann RISC an die Ziel-mRNA binden, die dadurch entwunden und gespalten wird.



Abb. 3: Bindestelle der HAX1_1 siRNA von Qiagen in der HAX1-mRNA

Die entstehenden RNA-Fragmente werden schnell durch innerzelluläre Nukleasen abgebaut. Natürlicherweise benutzt die Zelle diesen Mechanismus einerseits, um sich vor Fremd-RNA, z.B. viralen Ursprungs, zu schützen und gleichzeitig als einen Mechanismus der posttranskriptionalen Kontrolle von Genexpressionen. Der Abbau der mRNA führt schlussendlich dazu, dass die Proteinexpression des Gens unterbunden wird.

2.2.13.1 **Transfektion von HaCaT-Zellen mit siRNA**

HaCaT-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz "*HiPerfect Transfection Reagent*" transfiziert. Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^4$ in 24er-wells ausgesät und 24 Stunden bei normalen Kulturbedingungen inkubiert.

Für die Transfektion wurde die gewünschte Menge siRNA (25 – 100 nM in den Testansätzen) in 100 µl Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde zu dem Ansatz die gewünschte Menge "*HiPerfect Transfection Reagent*" zugegeben (6 – 7,5 µl). In den Optimierungsexperimenten wurde ermittelt, dass 100 nM siRNA in 7,5 µl "HiPerfect" den maximalen "*Knock-down*" erzeugte.

Die Ansätze wurden 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend ein Ansatz pro well zu den Zellen gegeben. Die Effizienz der Transfektion wurde 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion untersucht, während für nachfolgende Experimente die Zellen 48 Stunden nach Transfektion inkubiert wurden.

Zur Kontrolle der RNAi-Experimente wurde Alexa488-gekoppelte Negativkontroll-siRNA und eine MAPKinase-spezifische siRNA eingesetzt.

2.2.13.2 *In vitro* Wundheilungsassay

HaCaT-Zellen wurden in *24-well* Platten bis zu 80% Konfluenz kultiviert (siehe 2.2.2) und danach unter optimalen Konditionen (siehe 2.2.13.1) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium entfernt und eine einzelne definierte Wunde wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in den intakten Zellfilm gesetzt.

Der Zustand der Wunden wurde sofort mit Hilfe eines digitalen *Time-Lapse*-Videosystems dokumentiert. Die Auswertung der *End-Point-Assays* erfolgte durch Vergleich des Wundschlusses der mit Negativkontroll-siRNA-transfizierten Kontrollgruppe mit der Wundheilungsantwort der *HAX1*-siRNA-transfizierten HaCaTs.

Für die Untersuchung der Risse mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.7.1 behandelt. Nach Transfektion der Zellen wurden diese auf Deckgläsern ausgesät und eine Wunde 48 Stunden danach in die Zellschicht eingebracht. Die Zellen wurden danach weitere 18 Stunden kultiviert und danach wie im Kapitel 2.2.11 behandelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen der Expression von *Hax1* in Geweben der Maus

In der Maus gibt es ein Ortholog des humanen *HAX1*, welches den Gennamen *Hax1* bekommen hat. Der Vergleich der Expression in verschiedenen Geweben der Maus soll Aufschluss über eine mögliche Funktion des Gens anhand seines Expressionsmusters geben.

Die Expression eines Gens lässt sich über verschiedene Methoden ermitteln. So kann die Menge an Transkripten direkt über einen Northern Blot nachgewiesen werden oder über eine Realtime-PCR, bei der die gesamte mRNA vorher in cDNA revers transkribiert wird, um anschließend die Menge an cDNA-Kopien eines Transkripts mittels spezifischer Primer zu identifizieren (siehe 2.2.7).

Für eine Expressionsstudie ist die Beobachtung der Expression auf Transkriptionsebene allerdings nicht ausreichend, da durch posttranskriptionelle Kontrollen der Translation die Menge an mRNA nicht mit der Menge an tatsächlich translatiertem Protein übereinstimmen muss. Proteine lassen sich über einen Western Blot mit spezifischen Antikörpern über indirekte Immundetektion darstellen und durch Abgleich der ermittelten Proteinbanden mit den Proteinbanden eines „*housekeeping*“-Gens quantifizieren.

3.1.1 Ermittlung der *Hax1*-Transkripte mittels Northern Blot

Für das Experiment wurde ein kommerzieller *multi-tissue* Northern Blot verwendet. Um die Transkripte von *Hax1* sichtbar zu machen wurde eine spezifische DNA-Sonde benötigt, die nach radioaktiver Markierung mit $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dATP}$ die Transkripte durch Bindung über komplementäre Basenpaare detektierbar macht.

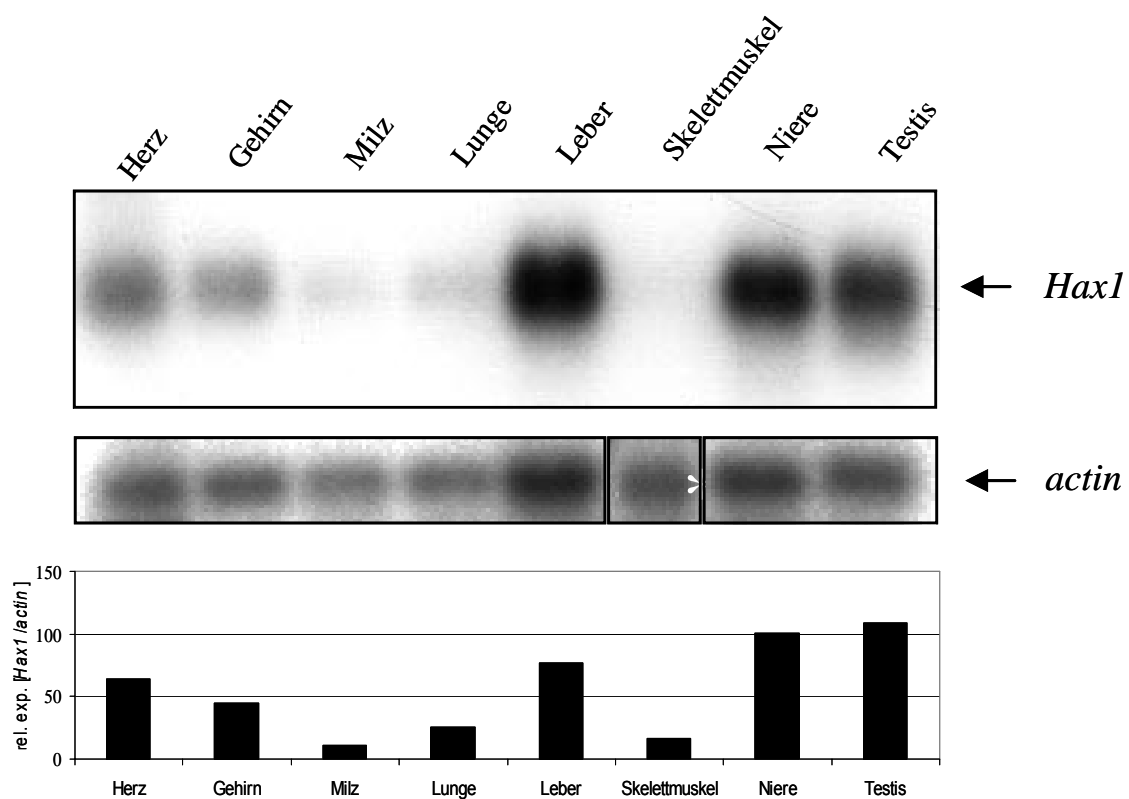


Abb. 4: Transkription von *Hax1* in verschiedenen Geweben. Die *Hax1*-mRNA wurde mit Hilfe einer $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dATP}$ -markierten cDNA-Sonde auf einem kommerziellen Maus-„*multi-tissue*“ Northern Blot detektiert. Die Bandenintensität des *Hax1*-Signals wurde mit der Bandenintensität eines *Aktin*-Signals abgeglichen. Im Falle des Skelettmuskels wurde nicht die mRNA von β -*Aktin* detektiert, sondern von α -*Aktin*. Zur besseren Übersicht wurde das Signal in der Abbildung auf die gleiche Höhe wie das Signal von β -*Aktin* gesetzt.

Zur Herstellung der Sonde wurde die kodierende Sequenz von *Hax1* über spezifische Primer aus Maus-cDNA amplifiziert und anschließend in das Plasmid pCRII kloniert (Hippe et al. 2006). Nach Kontrolle der Integration der korrekten DNA-Sequenz wurde diese mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Plasmid herausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend radioaktiv markiert (2.2.8). Nach der Hybridisierung wurde das Signal der Sonde auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und anschließend quantifiziert. Die benutzte Membran wurde anschließend von der Sonde gereinigt und mit einer Sonde, die komplementär zu murinem *Aktin* ist, ein weiteres Mal behandelt. Das *Aktin*-Signal wurde anschließend ebenfalls quantifiziert und eine relative Expression von *Hax1* ermittelt.

Abb. 4 zeigt die detektierten *Hax1* und *Aktin*-Signale des Northern Blot, sowie die Quantifizierung der einzelnen Banden. Nach Abgleich mit *Aktin* zeigt sich, dass die Expression in den Hoden am höchsten ist, gefolgt von der Expression in der Niere. Herz, Gehirn und Leber zeigen eine moderate Expression, während in der Lunge eine niedrige *Hax1*-Expression zu beobachten ist. In der Milz ist nur eine sehr niedrige Expression zu sehen, während die Expression im Skelettmuskel an der Detektionsgrenze liegt.

3.1.2 Ermittlung der *Hax1*-Expression mittels Realtime-PCR

Eine Realtime-PCR unterscheidet sich von einer normalen PCR dadurch, dass die Synthese der PCR-Produkte während des Synthesevorgangs detektiert und quantifiziert werden kann. Durch einen Vergleich mit einem Standard, im Jargon der Realtime-PCR "Kalibrator" genannt, ist es so möglich quantitative Aussagen über

die Menge vorhandener Transkripte zu treffen, einerseits in relativer Abhängigkeit zu dem verwendeten Kalibrator, andererseits aber auch in absoluten Mengenangaben, wenn die Menge einer eingesetzten Standard-DNA bekannt ist.

Im vorliegenden Fall wurde mRNA aus Gesamt-RNA von Mausgeweben über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde in eine Realtime-PCR eingesetzt mit spezifischen Primern für murines *Hax1* („TaqMan® Gene Expression Assay“ Mm01623696_sH) (siehe 2.2.7). Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.

In der Realtime-PCR konnte eine starke Expression von *Hax1* in der Niere, den Hoden, dem Herz und der Leber nachgewiesen werden. Diese Expressionen liegen 2,8fach bis etwa 4fach über einer mittleren Expressionstärke des Gens.

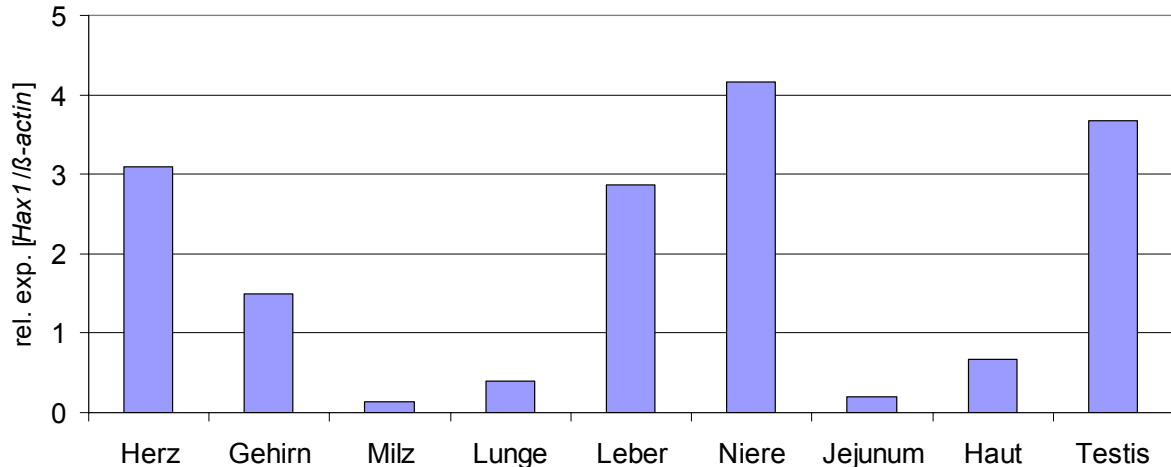


Abb. 5: Ergebnis der Realtime-PCR mit *Hax1*-spezifischen Primern. 25 ng cDNA aus verschiedenen Geweben wurde in eine Realtime-PCR mit einem *Hax1*-spezifischen „Gene Expression Assay“ eingesetzt. Als endogene Kontrolle diente β -Aktin. Als Kalibrator wurde eine mittlere Expression aller untersuchten Gewebe benutzt, dessen relative Expression gleich 1 gesetzt ist.

Im Gehirn entspricht die Expression in etwa der mittleren Gewebsexpression, während in der Haut, in der Lunge, im Jejunum und besonders in der Milz die

Expression teilweise deutlich geringer ist. So ist die Expression in der Haut und in der Lunge nur etwa halb so stark im Vergleich zu einer mittleren Expression, im Jejunum ist nur ein Fünftel dieser Expression nachweisbar, während in der Milz die niedrigste Expression vorhanden ist, die nur einem Siebtel der mittleren Expression entspricht.

3.1.3 Analyse der Hax1-Expression über einen Western Blot

Da die Untersuchung der Expression eines Gens auf transkriptioneller Ebene nur die Menge an vorhandener mRNA aufzeigt, diese durch posttranskriptionelle Kontrollen der Expression allerdings von der tatsächlichen Proteinexpression abweichen kann, wurde die Expression von *Hax1* auch über die Detektion des Proteins in einem Western Blot untersucht. Dabei wurden Proteinproben aus Organen von sechs Mäusen vereinigt, um individuelle Schwankungen der Expression auszugleichen. Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt und nach der Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran, wurde Hax1 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Membran wurde anschließend von den gebundenen Antikörpern gereinigt und mit einem Antikörper gegen β -Aktin behandelt. Die Hax1-Proteinbanden wurden quantifiziert und mit der Quantifizierung der β -Aktin-Signale abgeglichen, um Schwankungen in der Menge an aufgetragenem Gesamtprotein auszugleichen.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, konnte eine hohe *Hax1*-Expression im Gehirn, in der Leber, der Niere sowie den Ovarien nachgewiesen werden. In den Hoden ist eine leicht niedrigere Expression vorhanden, während die restlichen Organe eine

niedrige Expression zeigen. Im Vergleich mit der Expression von *Hax1* auf transkriptioneller Ebene fällt auf, dass diese im Herzen sehr viel niedriger ausfällt. Posttranskriptionelle Kontrollen der Expression könnten für dieses Phänomen verantwortlich sein. In den Hoden scheint die Proteinexpression von *Hax1* im Vergleich mit anderen Organen auch niedriger auszufallen, als dies aufgrund der ermittelten Menge der *Hax1*-mRNA zu erwarten war.

Im Gehirn wiederum ist das Verhältnis zwischen der Transkription und der Proteinexpression umgekehrt, d.h. obwohl auf transkriptioneller Ebene das Verhältnis zwischen der Expression im Gehirn und der Leber bei etwa 1:2 liegt, ist die Proteinexpression in beiden Organen auf einem ähnlichen Niveau. Dieses Phänomen könnte durch eine effektivere Translation der mRNA im Gehirn verursacht werden oder aber auch stabiler in den Gehirnzellen, d.h. seine Halbwertszeit in diesen Zellen höher sein, als in anderen.

Nach dieser allgemeinen Untersuchung der Expressionsstärken von *Hax1* in den Mausorganen, sollte anschließend die Verteilung dieser Expression in den Geweben dieser Organe sichtbar gemacht werden und die Lokalisation von *Hax1* in den Zellen aufgezeigt werden.

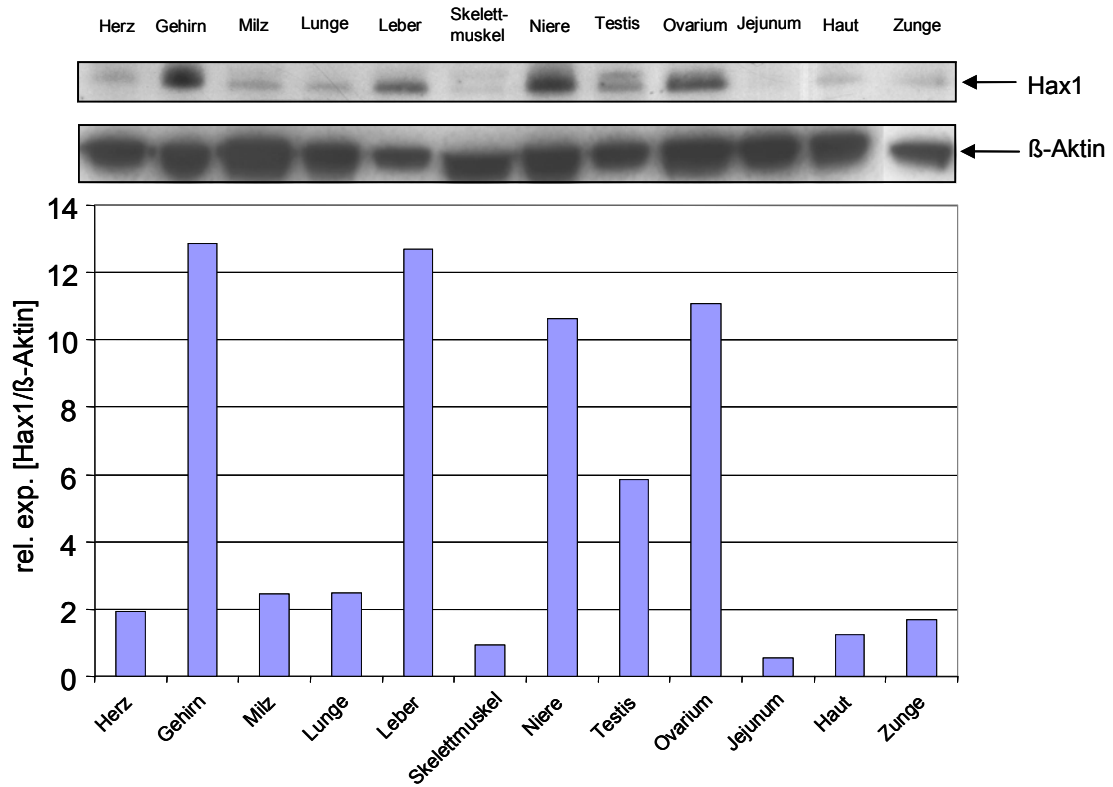


Abb. 6: Proteinexpression von *Hax1* in verschiedenen Geweben. 25 μ g Gesamtprotein aus verschiedenen Geweben wurde auf einem NuPAGE[®] 10% Bis-Tris Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hax1 und β -Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Signalintensitäten wurden mittels Densitometrie ermittelt und die relative Expression durch Abgleich der Hax1-Intensitäten mit der korrespondierenden Aktin-Intensität ermittelt.

3.2 Nachweis der Lokalisation von Hax1 in Geweben und in Einzelzellen

Abgesehen von Unterschieden in der Expression eines Gens in verschiedenen Organen kann auch die Verteilung des Proteins in den Organen einen Aufschluss über die Funktion des Proteins liefern. Da jedes Organ über zahlreiche Zelltypen verfügt, die erst im Verbund die Funktion des Organs ermöglichen, kann eine zelltypspezifische Expression eines Proteins einen Hinweis auf dessen Funktion aufzeigen.

Auch die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle kann ein wichtiges Indiz für dessen Aufgabe liefern. So befinden sich Rezeptormoleküle zumeist in der Plasmamembran, um dort in Kontakt mit Liganden, die von außerhalb der Zelle stammen, zu treten. Transkriptionsfaktoren wiederum befinden sich zumeist im Zellkern, um dort ihre Aufgabe wahrnehmen zu können. Ungewöhnliche Lokalisationen, wie z.B. das Auftreten eines Transkriptionsfaktors im Zytoplasma, können auch Aufschlüsse über mögliche Regulationsmechanismen liefern, wenn dieser Faktor nur bei spezifischen Bedingungen für die Zelle in den Zellkern transportiert wird.

Die gewebsspezifische Verteilung von Hax1 wurde mit Hilfe der Immunhistochemie durchgeführt. Dabei wird in Gewebsschnitten das Protein mit einem spezifischen Antikörper detektiert, welcher wiederum über einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht wird. Dabei macht das gekoppelte Enzym über eine chemische Farbreaktion die Detektion möglich.

Die intrazelluläre Lokalisation wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert, wobei ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Zweitantikörper den an das un-

tersuchte Protein gebundenen Erstantikörper sichtbar macht. Die Detektion der Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt, welches in der Lage ist dünne Schichten der Zelle zu beobachten und somit ein Überstrahlen des Signals an der beobachteten Stelle durch darüber- oder darunterliegende Fluoreszenzen verhindert.

3.2.1 Untersuchungen zur gewebsspezifischen Lokalisation von Hax1

Histologische Gewebsschnitte von Mausorganen wurden angefertigt und diese auf die Lokalisation von Hax1 hin untersucht. Dafür wurden die Präparate mit einem Antikörper gegen Hax1 behandelt. Der Antikörper wurde über eine Peroxidase-reaktion sichtbar gemacht. Alle gefärbten Zellen, die eine Hax1-Expression aufweisen, zeigen eine diffuse, zytoplasmatische Lokalisation von Hax1, welches mit den bisherigen Veröffentlichungen, die eine Lokalisation von Hax1 nachwiesen, übereinstimmt. In der Haut der Maus (Abb. 7a) kann eine hohe Hax1-Expression in der Epidermis, den Haarfollikeln, den Talgdrüsen sowie den unterhalb der Dermis liegenden Muskelbündeln nachgewiesen werden. Die Fibroblasten in der Dermis weisen hingegen keine erkennbare Expression von Hax1 auf. Im Gewebe der Zunge (Abb. 7b) besitzt das Zungenepithel eine hohe Hax1-Expression, während überraschenderweise in der Basalschicht nur eine niedrige bis moderate Expression zu erkennen ist. Da in der Basalschicht proliferierende Zellen liegen, wäre eine höhere Expression des anti-apoptotischen Hax1 zu erwarten gewesen. Die *Lamina propria* zeigt dagegen eine hohe Hax1-Expression, genauso wie die Muskelbündel, die ähnlich wie in der Haut, eine hohe Hax1-Expression aufweisen. In der Lunge (Abb. 7c) kann eine hohe Hax1-Expression vor allem in den Epithe-

lien der Alveolen und der Bronchiolen, sowie in der glatten Muskulatur der Lunge nachgewiesen werden. In der Leber (Abb. 7d) ist eine niedrige bis moderate Expression im gesamten Gewebe zu erkennen, wobei die Endothelien der Gefäße eine höhere Hax1-Expression zeigen. Der gesamte Herzmuskel (Abb. 7e) weist eine hohe Hax1-Expression auf, ähnlich der Expression, die in den Zellen der glatten Muskulatur aller untersuchten Gewebe zu beobachten ist.

In der Niere ist die Hax1-Expression in den Endothelzellen der Gefäße sowohl im renalen Cortex (Abb. 7f), als auch in der Medulla der Niere (Abb. 7g) besonders hoch. Die Glomeruli im renalen Cortex weisen hingegen keine nachweisbare Hax1-Expression auf. Im Epithel der Vili im Darm (Abb. 7h, Abb. 7i (Vergrößerung)) ist eine hohe Hax1-Expression zu erkennen, während in den Krypten des Darms keine Hax1-Expression nachweisbar ist. Wie auch schon in den vorangegangenen Geweben, ist eine deutliche Hax1-Färbung in den Zellen der glatten Muskulatur zu sehen. Im Gewebe der Hoden und der Ovarien (Abb. 7j und k) zeigen nur die Zellen eine Expression von Hax1, welche die keimzellproduzierenden Zellen miteinander verbinden. So zeigen nur die Leydig-Zellen in den Hoden, die in den Zwischenräumen zwischen den einzelnen samenbildenden Tubuli liegen, und die interstitiellen Zellen in den Ovarien, die zwischen den Follikeln liegen, eine Hax1-Färbung.

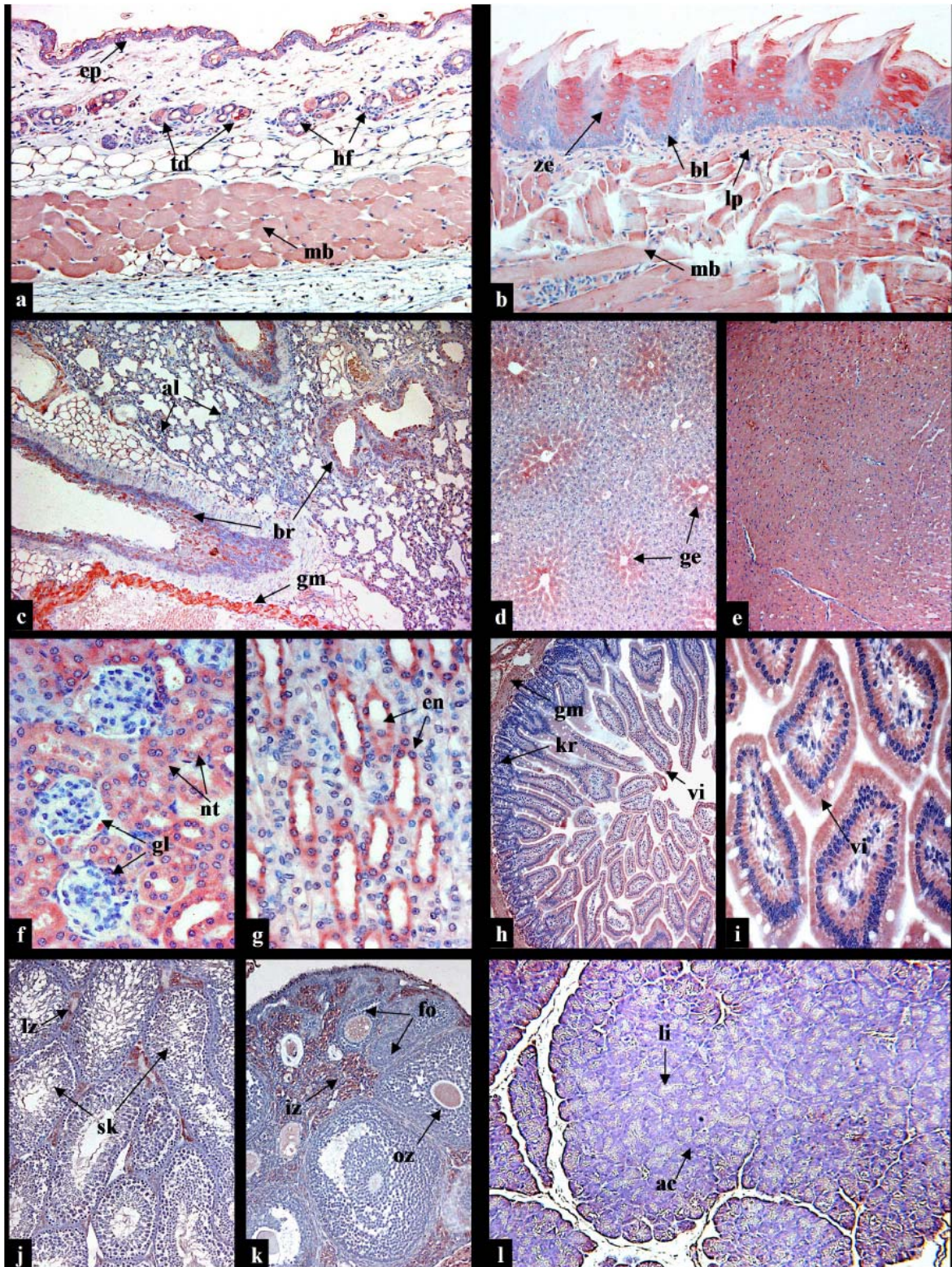


Abb 7: Gewebsspezifische Lokalisation von Hax1: **a** – Haut; ep – Epidermis, td – Talgdrüsen, hf – Haarfollikel, mb – Muskelzellen; **b** – Zunge; ze – Epithelium der Zunge, bl – Basalzellen, lp – Lamina propria, mb – Muskelbündel; **c** – Lunge; al – Alveoli, br – Bronchiolen, gm – glatte Muskulatur; **d** – Leber, ge – Gefäßendothel; **e** – Herz; **f** – Renaler Cortex der Niere; gl – Glomeruli, nt – Nierentubuli; **g** – Medulla der Niere; en – Endothelzellen der Sammel tubuli; **h** – Duodenum; gm – glatte Muskulatur, kr – Krypten, vi – Villi; **i** – Vergrößerung der Villi; vi – Villi; Fortsetzung, siehe nächste Seite

Die Oozyten zeigen eine leichte, diffuse Färbung für Hax1, während die Vorläuferzellen der Spermatozyten keine erkennbare Färbung aufweisen. Im Pankreas (Abb. 7l) ist weder in den Langerhans'schen Inseln, noch in den Acinarzellen, eine Hax1-Expression nachweisbar.

Auffallend an den Ergebnissen der Immunhistochemie ist, dass eine Hax1-Expression vor allem in Epithel- und Endothelzellen nachweisbar ist. Vor allem die Endothelien der Gefäße und das Epithelgewebe, welches die Abgrenzung des Körpers nach Außen bildet, zeigen eine moderate bis starke Färbung von Hax1. Außerdem weisen in allen untersuchten Geweben die Zellen der glatten Muskulatur eine hohe Hax1-Expression auf. Andere Zellarten hingegen sind nur schwach oder gar nicht für Hax1 gefärbt.

Abb. 7 Fortsetzung: j – Testis; lz – Leydig-Zellen, sk – samenbildende Keimzellen; k – Ovarium; fo – Follikel, iz – interstitielle Zellen, oz – Oozyte, l – Pankreas, ac – Acinarzellen, li – Langerhans'sche Inseln

3.2.2 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Hax1 mittels indirekter Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz, bei der Proteine mit spezifischen Antikörpern in den Zellen markiert werden, und diese wiederum durch fluoreszenzmarkierte Antikörper sichtbar gemacht werden, lassen sich subzelluläre Lokalisationen von Proteinen nachweisen. Da Proteinlokalisationen innerhalb der Zelle die Funktion eines Proteins maßgeblich beeinflussen, kann deren Aufklärung Rückschlüsse auf eine unbekannt Funktion liefern.

Exemplarisch wurde in der vorliegenden Arbeit die subzelluläre Lokalisation von Hax1 in einer Nervenzelllinie (N2a) und in einer Hautzelllinie (Pam212) untersucht. Da in der Literatur mehrere mögliche lokalisationsabhängige Funktionen für HAX1 aufgezeigt werden, sollten mögliche Unterschiede in der Lokalisation des Proteins in verschiedenen Zelltypen untersucht werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine zelltypspezifische Funktion von HAX1 liefern. Die antiapoptotische Funktion von HAX1 ist im Zusammenhang mit einer Lokalisation des Proteins in oder an den Mitochondrien beschrieben worden (Suzuki et al. 1997; Cilenti et al. 2004; Yedavalli et al. 2005). Andere Publikationen zeigen, dass Hax1 im endoplasmatischen Retikulum (Gallagher et al. 2000) oder an der Peripherie der Zelle (Ortiz et al. 2004; Radhika et al. 2004; Oberndorfer et al. 2006) lokalisiert ist. Die meisten dieser Untersuchungen wurden mit exogenem HAX1 durchgeführt, das über Plasmide in den untersuchten Zellen exprimiert wurde. Im vorliegenden Experiment wurde endogenes Hax1 nachgewiesen.

Die Fluoreszenz des antikörpermarkierten Hax1 wurde mit einem konfokalen Mikroskop detektiert. Um eine Kolo-kalisation mit dem ER oder den Mitochondrien

nachzuweisen, wurden diese Organellen mit humanen Autoantikörpern detektiert. Hax1 zeigt eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation und eine distinkte, punktarartige Färbung, die in N2a-Zellen hauptsächlich in der Nähe der Plasmamembran auftraten (Abb 8 A und B), während in Pam212-Zellen ebenfalls eine punktarartige Lokalisation um den Nukleus zu beobachten ist (Abb. 8 C und D).

In beiden Zelllinien konnte keine Kolokalisation mit dem ER nach einer Doppelfärbung nachgewiesen werden (Abb. 8 A und C), während eine partielle Kolokalisation in beiden Zelllinien mit Mitochondrien zu sehen ist (Abb. 8 B und D, *merge*).

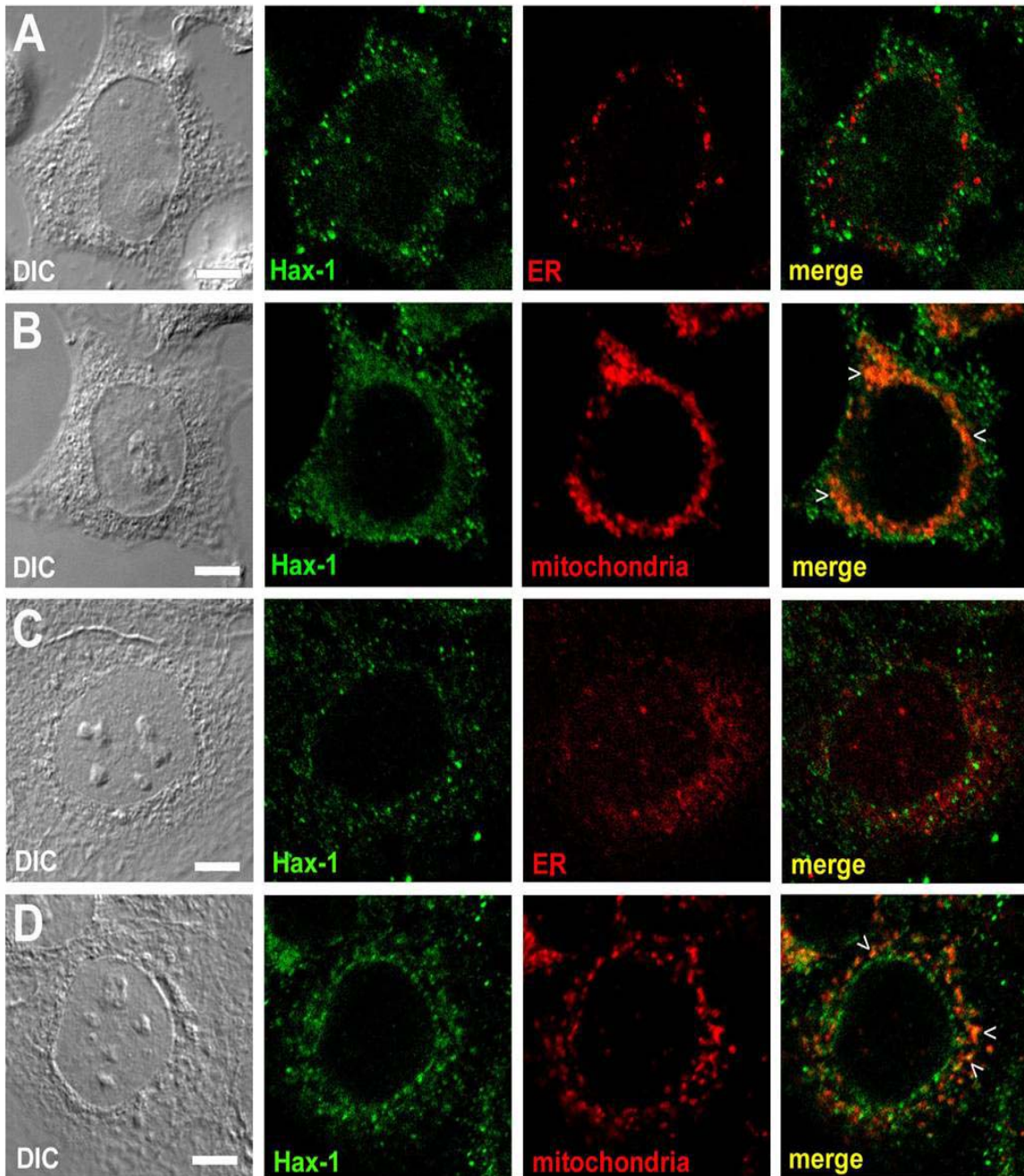


Abb. 8: Subzelluläre Lokalisation von Hax1: N2a-Zellen (A + B) und Pam212-Zellen (C + D) wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz über spezifische Antikörper für Hax1 (grün), ER, bzw. Mitochondrien (rot) angefärbt. In den überlagerten Bildern (*merge*, gelb) ist zu erkennen, dass es eine partielle Lokalisation zwischen Hax1 und Mitochondrien gibt (Pfeile), aber keine Kolokalisation mit dem ER.

3.3 Subzelluläre Lokalisation von HAX1 in HaCaT-Zellen

Die subzelluläre Lokalisation von endogenem HAX1 in HaCaT-Zellen ist noch nicht untersucht worden. Durch die Ergebnisse der Lokalisation von Hax1 in der Maus, in der eine Kolo­kalisierung des Proteins mit Mitochondrien nachgewiesen wurde, aber auch eine noch nicht näher spezifizierte zytoplasmatische Lokalisation zu erkennen war, stellte sich die Frage, ob diese Lokalisationen ebenfalls in humanen Hautzellen zu sehen sind und ob die zytoplasmatische Lokalisation mit Aktin assoziiert ist. Dies könnte eine Funktion von HAX1 in den Dynamiken des Aktinzytoskeletts nahe legen, so wie die Lokalisation an den Mitochondrien eine antiapoptotische Funktion nahelegt.

HAX1 und Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern markiert, während die Mitochondrien mit dem MitoTracker gefärbt wurden. Aufgrund der ausgesuchten Fluoreszenzfarbstoffe, CY3 im Fall von HAX1, CY2 im Fall von Aktin, sowie eine „Far Red“-Färbung der Mitochondrien, konnte eine Dreifach-Färbung durchgeführt werden.

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, korreliert das Ergebnis mit den Untersuchungen in der Maus. HAX1 zeigt einerseits eine diffuse, zytoplasmatische Lokalisation, als auch eine distinkte, punktförmige Lokalisation. Entsprechend dem Ergebnis in der Maus, ist eine partielle Kolo­kalisierung mit den Mitochondrien (Abb. 9B) zu beobachten,

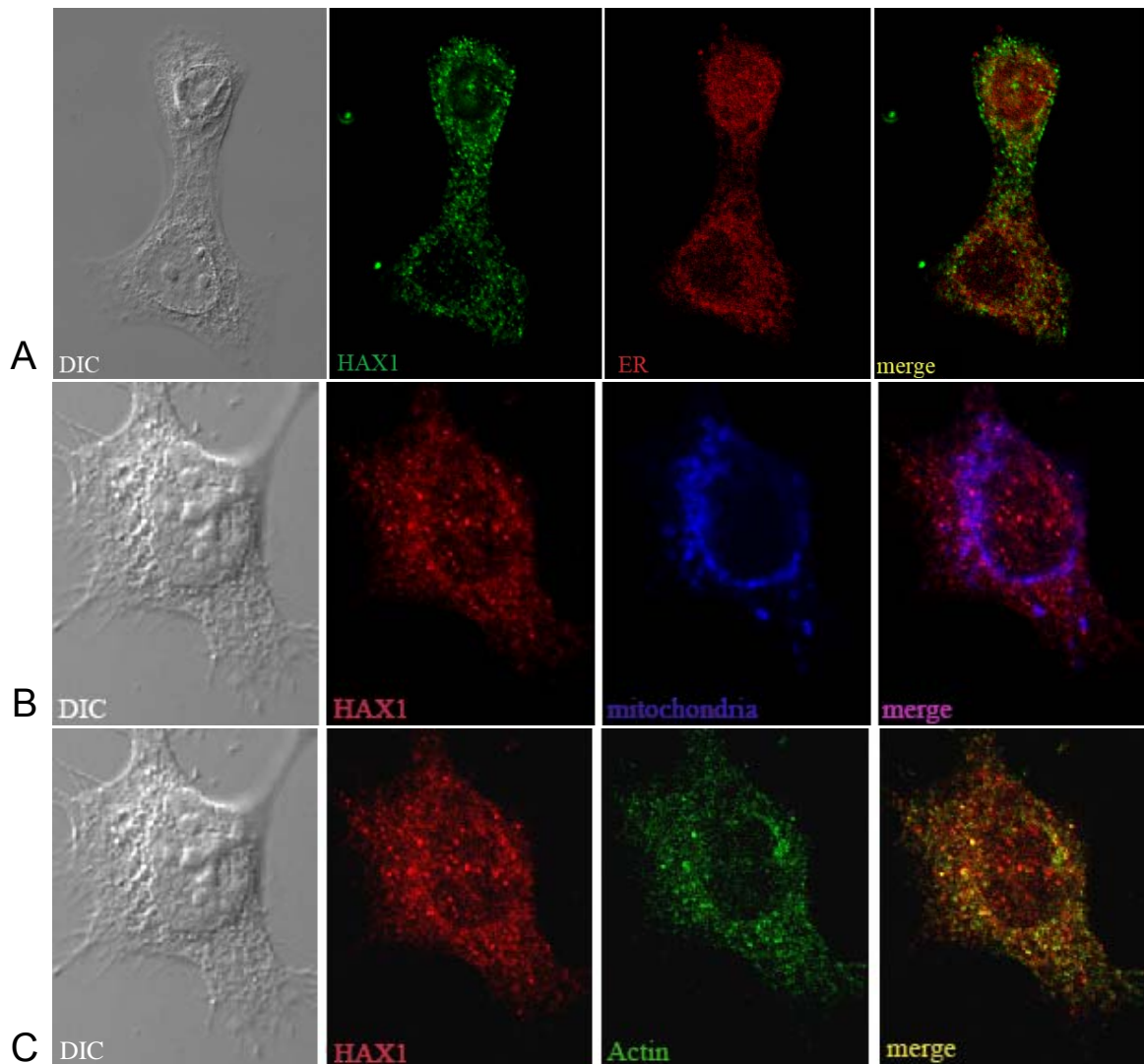


Abb. 3.6: Subzelluläre Lokalisation von HAX1 in HaCaT. HAX1, Aktin und das ER wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper machten die spezifische Bindung sichtbar: HAX1 (CY3/rot, bzw. FITC/grün in der HAX1/ER-Doppelfärbung), ER (Rhodamin/rot), Aktin (CY2/grün). Mitochondrien wurden mit MitoTracker DeepRed 633 (blau) angefärbt. In den überlagerten Bildern (*merge*) ist keine Kolokalisation zwischen HAX1 und ER zu sehen (A), sowie eine partielle Kolokalisation zwischen HAX1 und Mitochondrien (B) und HAX1 und Aktin (C).

aber keine Kolokalisation mit dem ER (Abb. 9A). Interessanterweise zeigt sich aber auch eine Kolokalisation von HAX1 mit Aktin (Abb. 9C), die ebenfalls auf die distinkte, punktförmige Färbung von HAX1 beschränkt ist. Dies ist ein starker Hinweis, dass HAX1 in HaCaT-Zellen ebenfalls eine Rolle im Aktinzytoskelett spielen könnte, wie dies schon für andere Zelltypen beschrieben wurde.

In einer Dreifach-Färbung von HAX1, Aktin und den Mitochondrien wurde der Frage nachgegangen, ob die partiellen Kollokationen von HAX1 mit jeweils Aktin und Mitochondrien eventuell eine HAX1-vermittelte Verbindung zwischen Mitochondrien und Aktin darstellten. Die Dreifachfärbung (Abb. 10) zeigt allerdings, dass die partiellen Kollokationen von HAX1 mit Mitochondrien und Aktin größtenteils distinkt voneinander sind. Nur in seltenen Fällen konnte eine dreifache Kollokation beobachtet werden (Abb. 10, weißer Pfeil) und dies auch nicht in allen untersuchten Zellen. Die Kollokation aller drei untersuchten Strukturen könnte ein Vorgang sein, bei dem das Aktinzytoskelett eine Verbindung mit den Mitochondrien eingeht. Die Polymerisation des neuen Aktinstrangs könnte mit einer Lokalisation von HAX1 an dieser Stelle einhergehen.

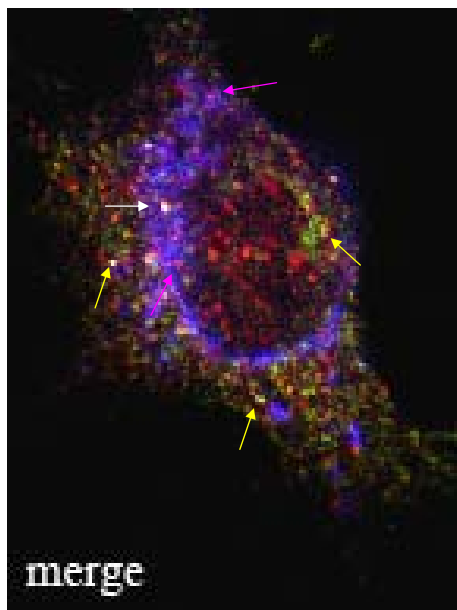


Abb. 10: Dreifach-Färbung von HAX1, Mitochondrien und Aktin. Das Bild zeigt eine Überlagerung aller benutzter Kanäle aus der Färbung von HAX1/Mitochondrien/Aktin aus Abbildung 9.

3.4 Funktionelle Analyse von *HAX1*

In der Literatur wurde vor allem eine Funktion von *HAX1* in der Apoptose (siehe 1.2.1) und in Dynamiken des Aktinzytskeletts (siehe 1.2.2) beschrieben. Die Aufgabe von *HAX1* in den Keratinozyten der Haut sollte nun mit Hilfe von „*Knock-down*“-Experimenten näher untersucht werden. Der Phänotyp der Zelle nach einem "*Knock-down*" des Gens gibt einen Hinweis auf die Funktion des Gens in der Zelle. Im vorliegenden Fall könnte die Rolle von *HAX1* in der Apoptose zu einer stärkeren Empfindlichkeit der Zelle gegenüber einer Induktion der Apoptose nach Verlust von *HAX1* führen. Wenn *HAX1* einen Einfluss auf die Dynamik des Aktinzytoskeletts hat, so könnte durch ein „*Knock-down*“-Experiment eine Störung dieser Dynamiken auftreten, welche durch Zellmotilitätsexperimente gezeigt werden könnte.

3.4.1 Etablierung eines *HAX1*-„*Knock-downs*“ durch RNAi

Vor dem Beginn der funktionellen Experimente musste zuerst der „*Knock-down*“ von *HAX1* in HaCaT-Zellen etabliert werden. Die Transfektionseffizienz der siRNA in HaCaT-Zellen wurde über eine Kontroll-siRNA, die keine Zielsequenz im menschlichen Genom aufweist und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 gekoppelt ist, kontrolliert und die Effizienz des Gen-„*Knock-downs*“ der spezifischen *HAX1*-siRNA über eine Realtime-PCR untersucht.

3.4.1.1 Kontrolle der siRNA-Transfektion und Etablierung der Transfektionsbedingungen

Die Transfektion der HaCaT-Zellen mit 100 nM Alexa488-gekoppelter Kontroll-siRNA und 7,5 µl „HiPerfect“-Transfektionsreagenz in einem *24-Well*-Ansatz zeigte, dass fast alle Zellen 24 Stunden nach erfolgter Transfektion ein positives Fluoreszenz-Signal aufwiesen (siehe Abb. 11).

Um die Effizienz der spezifischen siRNA nachzuweisen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an HAX1-siRNA und unterschiedlichen Volumina von

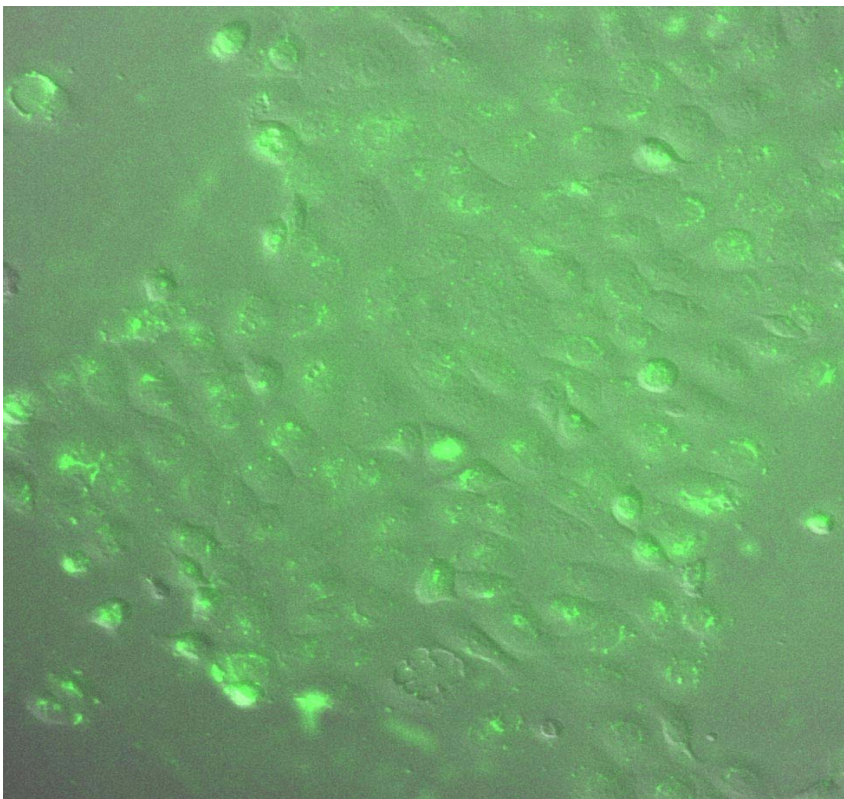


Abb 11: Transfektionseffizienz der siRNA in HaCaT-Zellen. HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit Alexa488-konjugierter Negativkontrollen-siRNA mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die von den Zellen aufgenommene siRNA ist deutlich am grünfluoreszierenden Signal zu erkennen. In den meisten Zellen lässt sich die siRNA in oder an dem Zellkern beobachten. Aufnahme mit 10facher Vergrößerung.

„HiPerfect“-Transfektionsreagenz behandelt und die RNA der Zellen nach 24 Stunden extrahiert. Die RNA wurde in eine RT-PCR eingesetzt und die Menge an spezifischer *HAX1*-cDNA in einer Realtime-PCR nachgewiesen.

Das Ergebnis zeigt, dass bei einem Ansatz von 100 nM spezifischer siRNA mit 7,5 μ l „HiPerfect“ in einem 24er-Well-Ansatz nach 24 Stunden nur noch 2,54% der *HAX1*-Expression vorhanden war, die in einem Ansatz ohne spezifische siRNA vorlag. Diese ermittelten Bedingungen wurden in allen folgenden Experimenten beibehalten.

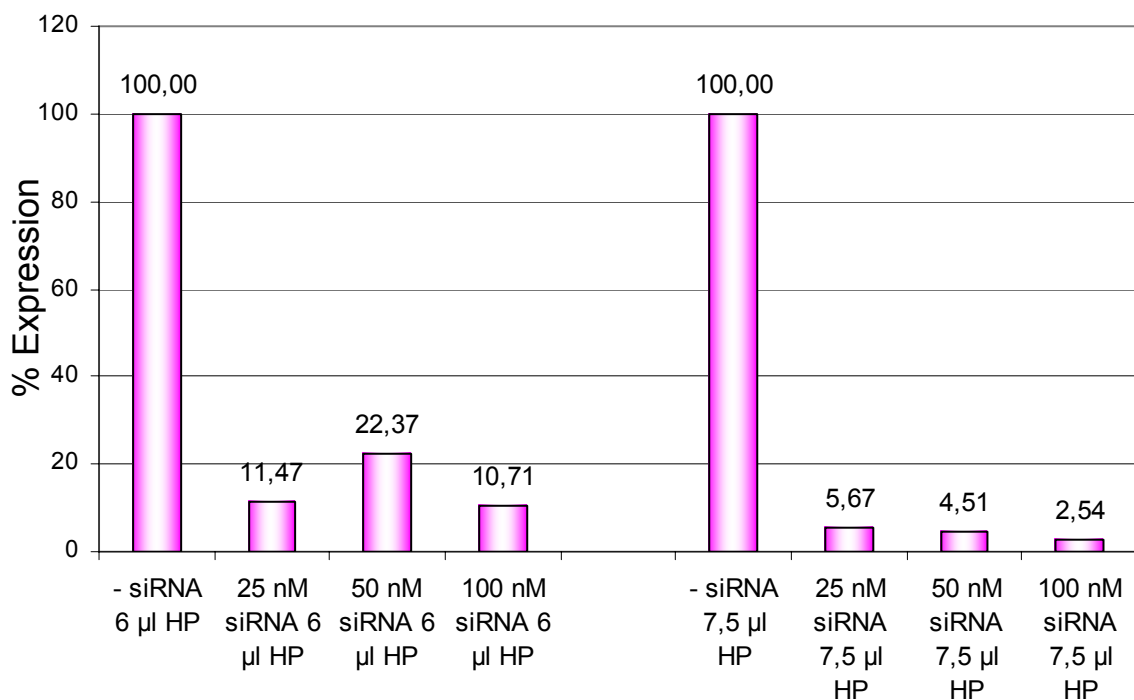


Abb 12: Expression von *HAX1* nach Transfektion mit siRNA. HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen Mengen *HAX1*-siRNA und „HiPerfect“-Volumina (HP) geerntet und RNA extrahiert. Nach erfolgter Umschreibung der mRNA in cDNA wurde 25 ng cDNA in eine Realtime-PCR mit spezifischem *HAX1*-Gene Expression Assay eingesetzt. Die *HAX1*-Expression in der Negativkontrolle (Transfektion ohne siRNA) wurde als 100%ige *HAX1*-Expression gesetzt und die anderen Expressionsdaten auf diese abgeglichen.

3.4.1.2 Kontrolle des Gen-„Knock-downs“ auf Proteinebene

Es reicht nicht aus, die vorhandene Menge an mRNA in der Zelle als Maßstab für eine gelungene Stilllegung des Gens zu nutzen. Ohne die Kontrolle der tatsächlich vorhandenen Proteinmengen in der Zelle, lässt sich keine endgültige Aussage über die Effizienz des „Knock-downs“ gewinnen.

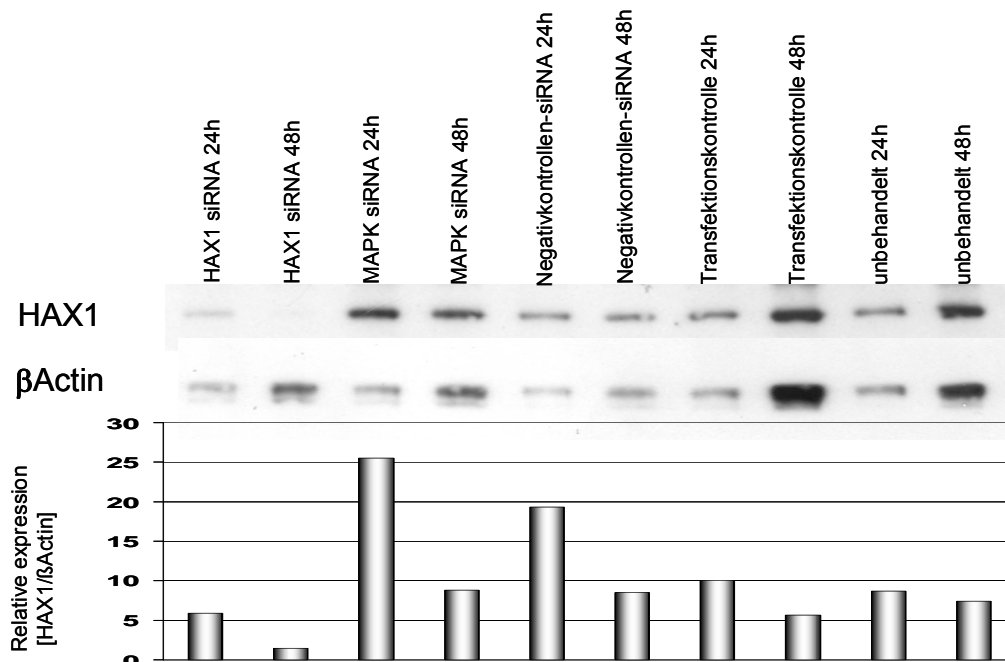


Abb 13: Western Blot nach Transfektion mit siRNA. Die Zellen wurden mit 100 nM spezifischer siRNA, sowie zwei Kontroll-siRNA, mit 7,5 μ l „HiPerfect“-Transfektionsreagenz, transfiziert und nach 24 Stunden und 48 Stunden Zellysate hergestellt. 25 μ g Gesamtprotein wurde danach in einem Western Blot mit spezifischer Antikörpern gegen HAX1 und β -Aktin eingesetzt. Die relative Expression wurde durch densitometrischer Bestimmung der Signalintensitäten und Abgleich der HAX1-Intensitäten mit den β -Aktin-Intensitäten ermittelt.

Da bei einem RNAi-Experiment der „Knock-down“ zwangsläufig transient durchgeführt wird, ist damit zu rechnen, dass die Menge an Protein aufgrund von Protein-Stabilitäten und Abbaugeschwindigkeit, also „turnover“ des Proteins, nicht mit der vorhandenen Menge an mRNA korreliert.

Daher wurde in einem Western Blot-Experiment die vorhandene Proteinmenge relativ quantifiziert. Wie in Abb. 13 zu sehen, befindet sich die HAX1-Expression nach der Transfektion der Zellen mit HAX1-siRNA nach 24 Stunden immer noch auf einem Niveau mit der Expression von HAX1 in Zellen, die entweder nur mit „HiPerfect“-Reagenz oder gar nicht behandelt wurden. Erst nach 48 Stunden ist eine deutliche Abnahme von HAX1 zu erkennen. Interessanterweise scheint die Anwesenheit von Kontroll-siRNA zu einem Anstieg der HAX1-Expression zu führen, bevor diese nach 48 Stunden wieder auf ein normales Niveau absinkt.

Für die folgenden Experimente wurde der HAX1-„*Knock-down*“ mit 100 nM siRNA und 7,5 µl Transfektionsreagenz durchgeführt und die Zellen 48 Stunden nach erfolgter Transfektion in Experimenten eingesetzt. Damit sollte sichergestellt werden, dass zum Zeitpunkt der Experimente das HAX1-Niveau in den Zellen am geringsten war.

3.4.2 Auswirkung eines HAX1-„Knock-downs“ auf die Apoptose-Induktion

Um die Auswirkungen eines HAX1-„Knock-downs“ in HaCaT-Zellen auf die Apoptose-Induktion zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen mit 20 μ M Camptothecin behandelt und die Caspase 3-Aktivität, als Marker für eine Apoptose-Induktion, gemessen. In einem Vorversuch wurde die Auswirkung von Camptothecin auf die Zellen untersucht, bevor siRNA-transfizierte Zellen mit *mock*-transfizierten Zellen verglichen wurden.

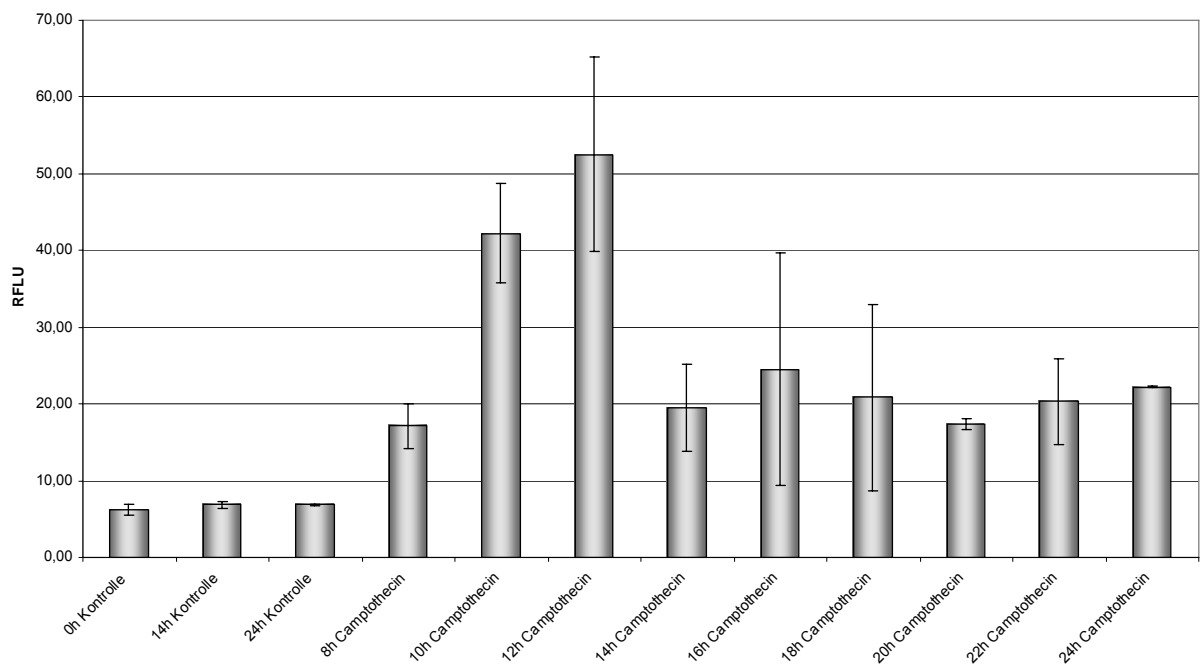


Abb. 14: Induktion der Apoptose mit Camptothecin. HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat in 6-well Platten mit 20 μ M Camptothecin behandelt. 8 bis 24 h nach Camptothecin-Zugabe wurden die Zellen lysiert und Protein präpariert. 25 μ g Gesamtprotein wurden anschließend in einem Caspase 3-Assay (siehe 2.2.9.3) eingesetzt und die Caspase 3-Aktivität über Fluorimetrie bestimmt.

Die Zugabe von 20 μ M Camptothecin zu HaCaT-Zellen bewirkte einen Anstieg der Caspase 3-Aktivität nach 8 Stunden, wobei die Aktivität bis 12 Stunden nach der Zugabe zunahm, um danach auf ein niedrigeres Niveau abzufallen.

Wenn HAX1 eine antiapoptotische Wirkung besitzt und Zellen vor einer Induktion der Apoptose schützt, so sollte der „*Knock-down*“ von *HAX1* die Zellen anfälliger gegenüber der Induktion durch Camptotecin machen. Es ist also zu erwarten, dass die Aktivität von Caspase 3 in den „*Knock-down*“-Zellen früher erhöht ist und/oder eine höhere Caspase 3-Aktivität erreicht wird, als in den Zellen der Negativkontrolle.

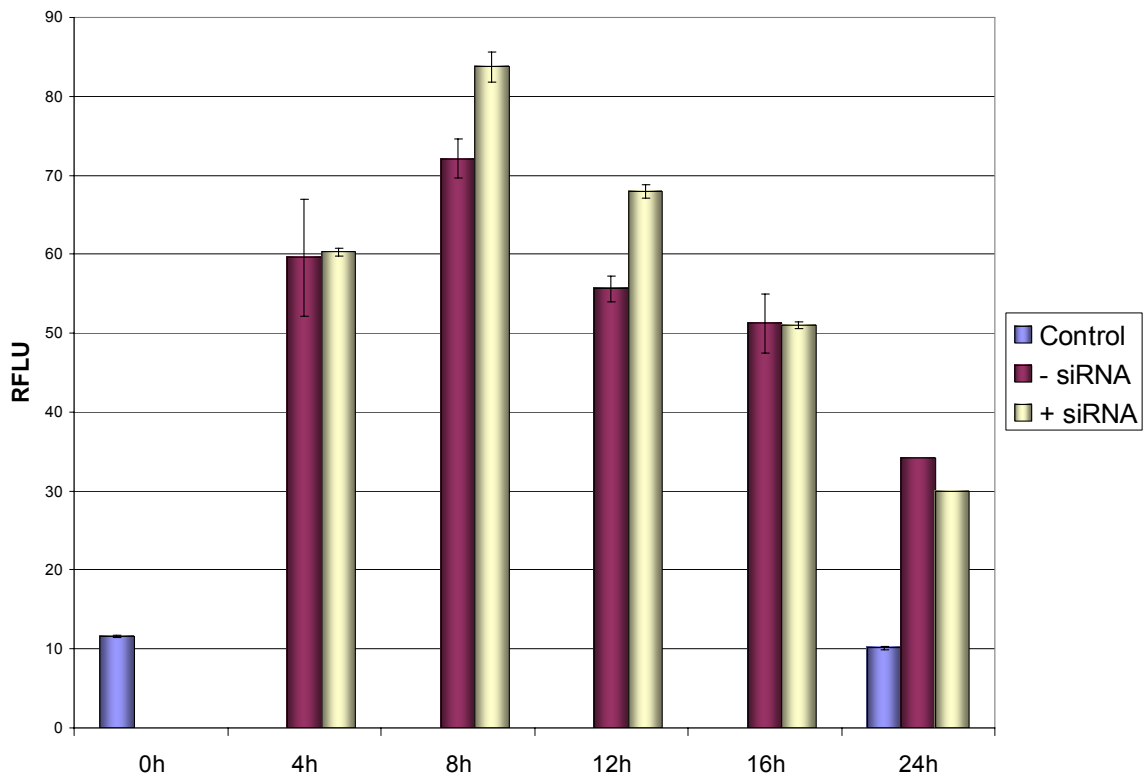


Abb. 15: Auswirkung des *HAX1*-„*Knock-downs*“ auf Apoptose-Induzierung. HaCaT-Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit *HAX1*-siRNA oder einer Transfektion ohne siRNA, wie in der Unterschrift zu Abb. 14 beschrieben, behandelt.

In diesem Experiment, konnte gezeigt werden, dass die Caspase 3-Aktivität nach Camptotecin-Induktion der Apoptose in den HAX1-"*Knock-down*"-Zellen nicht signifikant gegenüber Negativkontrollen-Zellen erhöht war (siehe Abb. 15). Nur nach 8 Stunden und 12 Stunden war die Aktivität von Caspase 3 in den „*Knock-down*“-Zellen leicht erhöht.

3.4.3 Auswirkung eines HAX1-„Knock downs“ auf Zellmotilität in einem *in vitro* Wundheilungsassay

Neben der antiapoptotischen Funktion von HAX1, wurde auch eine Funktion in den Dynamiken des Aktinzytoskeletts beschrieben. Um die Auswirkung die der „Knock-down“ von HAX1 im Zytoskelett haben könnte, zu untersuchen, wurde ein sogenannter *in vitro* Wundheilungsassay durchgeführt. Dabei wird in eine Zell-Monolayer eine künstliche „Wunde“ durch einen Kratzer eingefügt und beobachtet, wie schnell die Zellen die entstandene Lücke in der Monolayer schließen können. Gestörte Zytoskelettdynamiken sollten die Fähigkeit der Zellen, sich zu bewegen und die Lücke zu schließen, inhibieren.

Die HaCaT-Zellen wurden für den Versuch bis zu einer Konfluenz von 80% herangezogen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit HAX1-siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Der Riß in der Zell-Monolayer wurde 44h nach der Transfektion der Zellen eingefügt. Die Zellen wurden anschließend im Mikroskop beobachtet, wobei alle 2 min ein Bild aufgenommen wurde. Exemplarisch ist das Ergebnis in Abb. 16 dargestellt. Im Gegensatz zu den Zellen mit HAX1-„*Knock down*“, sind die Zellen, die mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden, in der Lage

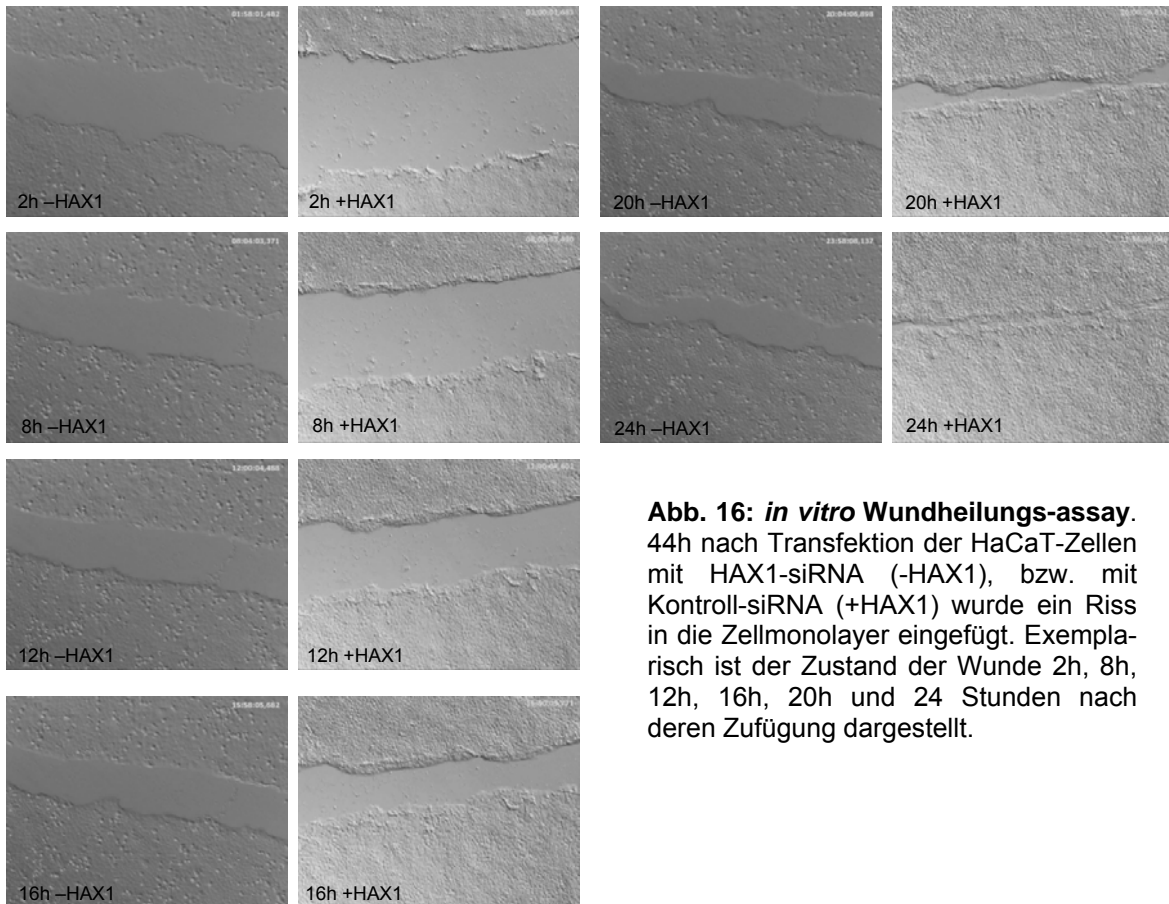


Abb. 16: *in vitro* Wundheilungs-assay. 44h nach Transfektion der HaCaT-Zellen mit HAX1-siRNA (-HAX1), bzw. mit Kontroll-siRNA (+HAX1) wurde ein Riss in die Zellmonolayer eingefügt. Exemplarisch ist der Zustand der Wunde 2h, 8h, 12h, 16h, 20h und 24 Stunden nach deren Zufügung dargestellt.

den Riss nach 24 Stunden zu schließen. Dies geschah durch eine stetige Vorwärtsbewegung der Zellen und war nicht nur ein Produkt neu entstandener Zellen durch Zellteilung. Die HaCaT-Zellen, die mit HAX1-siRNA transfiziert wurden, begannen ebenfalls kontinuierlich den Riss zu schließen, verlangsamten aber ihre Vorwärtsbewegung nach zwei bis vier Stunden und verharrten oder bewegten sich nur noch sehr langsam vorwärts. Nach ca. 16 Stunden begannen die Zellen ihre Vorwärtsbewegung wieder aufzunehmen. Um diesen Effekt graphisch darzustellen, wurde die Strecke, welche die Zellen innerhalb von zwei Stunden zurückgelegt hatten, in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt und zeitlich in Abhängigkeit zu dem Transfektionszeitpunkt mit siRNA dargestellt. Dieses Ergebnis ist in Abb. 17 gezeigt.

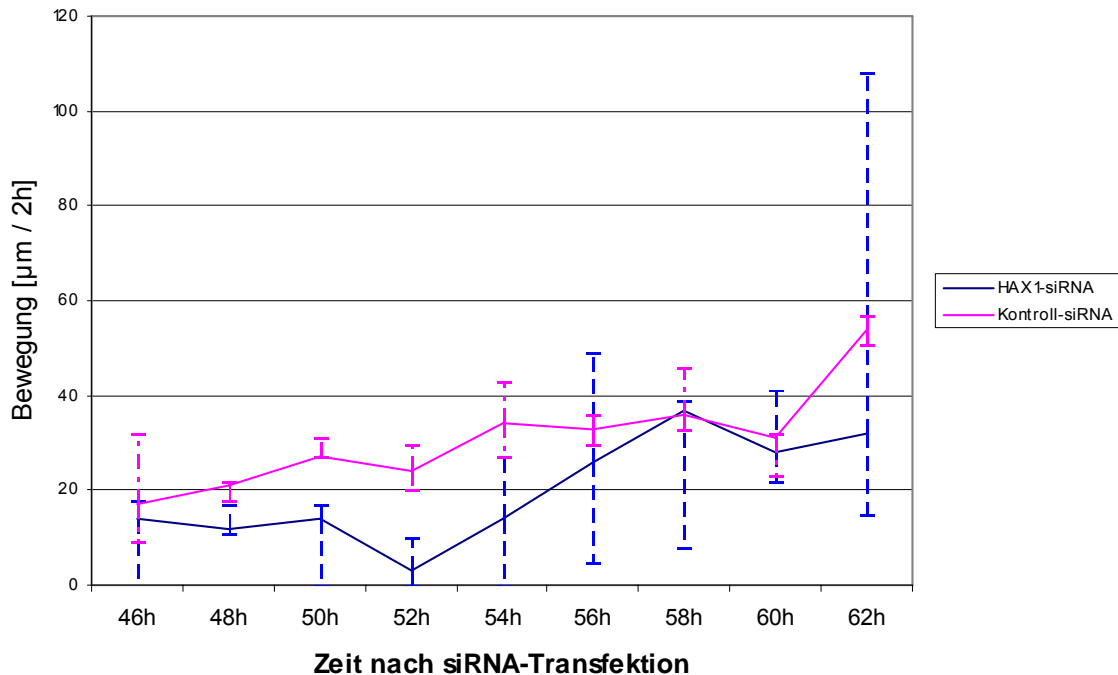


Abb 17: Zusammenfassende Auswertung aller *in vitro* Wundheilungssassay-Ergebnisse. Dargestellt ist die Geschwindigkeit (in $\mu\text{m}/2\text{h}$) der HaCaT-Zellen zu dem jeweiligen Zeitpunkt. Dafür wurde an drei verschiedenen Stellen des Risses dessen Breite gemessen und der Mittelwert gebildet. Die Geschwindigkeit ergab sich aus dem Abzug dieses Wertes von dem Wert zwei Stunden davor. Die Kurven zeigen den Mittelwert dieser Werte aus drei unabhängigen Experimenten. Der höchste gemessene Wert und der niedrigste gemessene Wert sind als Abweichungen dargestellt.

Interessanterweise divergiert die Geschwindigkeit der „*Knock-down*“-Zellen, mit der Geschwindigkeit der Kontroll-Zellen 46 bis 56 Stunden nach der Transfektion, um sich danach wieder aneinander anzunähern. Dies brachte die Frage auf, ob der beobachtete Effekt mit der Transienz der siRNA-Transfektion in Zusammenhang steht. Da die Menge an vorhandenem HAX1 in den „*Knock-down*“-Zellen langsam abnimmt (siehe Abb. 13), besteht die Möglichkeit, dass die HaCaT-Zellen erst nach einem Unterschreiten einer kritischen HAX1-Konzentration die Fähigkeit der Bewegung verlieren. Diese wird wiederhergestellt, nachdem die kritische Kon-

zentration wieder überschritten wird, und die Zellen erlangen ihre Bewegungsfähigkeit zurück, welches dem beobachteten Phänomen entsprechen würde.

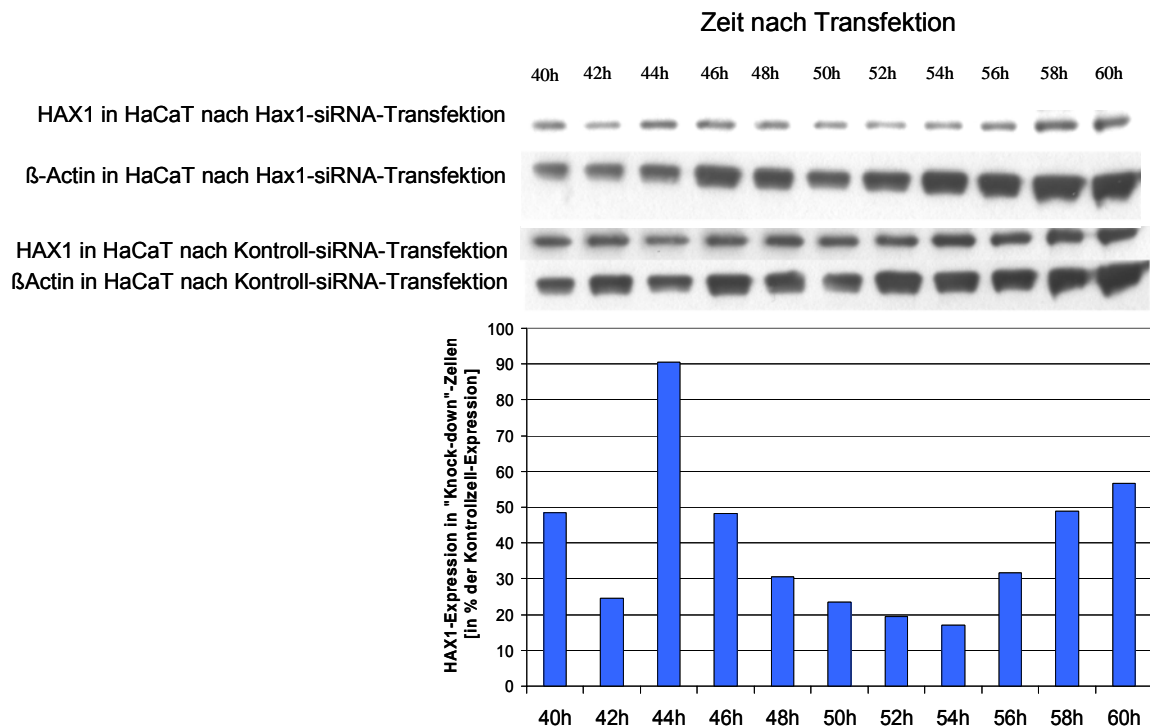


Abb. 18: Prozentwert der verbliebenen HAX1-Expression in „Knock-down“-Zellen in Abhängigkeit von einer Kontroll-Expression. Durch Western Blot Experimente mit je 50 µg Gesamtprotein pro Spur wurde die HAX1-Expression ermittelt. Die Signalintensitäten der HAX1-Signale zu den untersuchten Zeitpunkten wurden dabei mit der Signalintensität von β -Aktin abgeglichen. In der Grafik ist die HAX1-Expression in „Knock-down“-Zellen als Prozentangabe zur Expression in Kontroll-Zellen zum selben Zeitpunkt angegeben.

Um dies zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines Western Blots die Menge an HAX1 in den Zellen während der kritischen Zeit 40 bis 60 Stunden nach der Transfektion bestimmt (siehe Abb. 18).

Durch den Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass der HAX1-„Knock-down“ ein Maximum zwischen 46 und 56 Stunden nach der Transfektion erreicht. Da dieser Zeitpunkt mit dem Bewegungsstopp der HaCaT-Zellen übereinstimmt, gibt es eine Korrelation zwischen Verlust an HAX1 und Verlust der Zellmotilität.

Wenn in der Zelle weniger als 50% der normalen HAX1-Menge vorhanden ist, scheint die Beweglichkeit der Zellen stark eingeschränkt zu sein.

3.4.3.1 *Kolokalisation von HAX1 und Aktin am Rand eines Risses in einer Zell-, „Monolayer“*

Abschließend sollte der Status von Aktin und HAX1 an einer Wunde in der Zellmonolayer mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob HAX1 und Aktin in den Lamellipodien, welche sich am Rand der Wunde bilden und die Vorwärtsbewegung der Zellen einleiten (siehe 1.2.2), kolokalisieren und ob es Unterschiede im Aktin zwischen Zellen, die *HAX1* exprimieren, und „*Knock-down*“-Zellen gibt. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, bildet Aktin längliche, tubusartige Stränge aus, die in die ausgebildeten Lamellipodien hineinreichen. Das gefärbte HAX1 zeigt seine typische punktförmige Verteilung im Zytoplasma der Zelle (vgl. Abb. 8 und 9), aber auch eine strangartige Färbung in den Lamellipodien. In dem Bild, in dem beide Färbungen überlagert sind (Abb. 9, merge) ist zu sehen, dass Aktin und HAX1 teilweise in den punktförmigen Strukturen von HAX1 kolokalisiert sind, wie dies schon vorher beobachtet wurde (vgl. Abb. 8 und 9). HAX1 und Aktin kolokalisieren aber ebenfalls in den strangartigen Auswüchsen in den Lamellipodien.

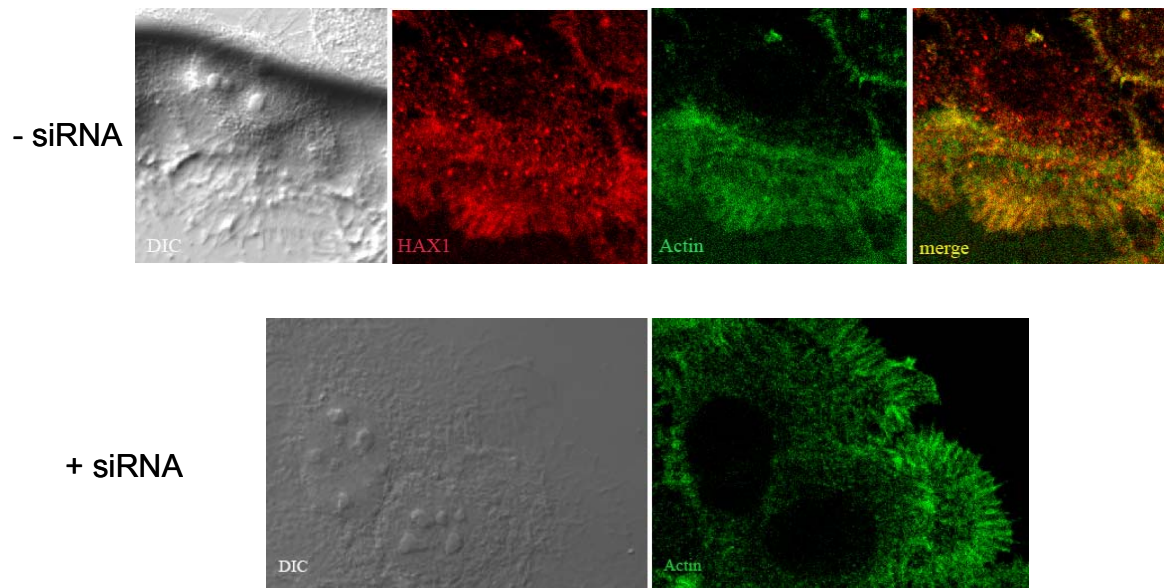


Abb. 19: Immunfluoreszenz-Färbung von HaCaT-Zellen am Rande eines Risses in der Zellmonolayer. In eine Monolayer von HaCaT-Zellen wurde entweder 48 Stunden nach Transfektion (72h nach Aussaat der Zellen) mit siRNA (+siRNA), oder 48 Stunden nach einer „mock“-Transfektion (-siRNA), ein Riss eingefügt und die Zellen 12 Stunden danach behandelt, wie für indirekte Immunfluoreszenz in Kapitel 2.2.11 beschrieben.

Daher ist anzunehmen, dass HAX1 eine Rolle bei dem Aufbau oder dem Erhalt der länglichen Aktinstränge in den Lamellipodien besitzt. In der Aktinfärbung in Zellen, die mit HAX1-siRNA transfiziert wurden, sind die Aktinstränge ebenfalls ohne HAX1 vorhanden. Mit diesem Experiment kann allerdings nicht nachgewiesen werden, ob diese Aktinstränge ihre Dynamik, d.h. die Möglichkeit einer schnellen Polymerisation, bzw. Depolymerisation des Stranges, beibehalten haben, oder starr und unbeweglich sind. Aufgrund der Ergebnisse des *in vitro* Wundheilungssassays ist allerdings davon auszugehen, dass die Stränge ihre Dynamik verlieren und dadurch ein weiteres Vorschieben der Lamellipodien, und damit auch eine Bewegung der gesamten Zelle, unterbunden wird.

4 DISKUSSION

Psoriasis ist eine chronisch rezidivierende Autoimmunkrankheit der Haut an der rund zwei Prozent der Bevölkerung erkranken. Die Pathogenese der Erkrankung ist immer noch weitgehend unbekannt. Die psoriatische Epidermis ist durch ein Infiltrat von Immunzellen gekennzeichnet und es wird angenommen, dass eine Störung der „*Memory*“ (oder Gedächtnis)-T-Zellen für den Phänotyp der Erkrankung verantwortlich ist. Weiterhin ist auch die Funktion von Keratinozyten gestört. Dies äußert sich in der Differenzierungsstörung mit Parakeratose sowie verstärkter Keratinozytenproliferation, die zu einer Verdickung der Epidermis führt (Hyperkeratose). Die verstärkte Proliferation der Keratinozyten führte zur Hypothese, dass die Keratinozyten sich in einem un- oder fehlkontrolliertem Wundheilungszustand befinden. In einem Mausmodell mit konstitutiv aktiviertem STAT3 konnte gezeigt werden, dass dieser für Wundheilungsprozesse wichtige Transkriptionsfaktor einen psoriasisartigen Hautphänotyp auslöst (Sano et al., 2005).

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das *HAX1*-Gen in psoriatischer Haut überexprimiert wird. Es wird angenommen, dass die Funktion von *HAX1* aufgrund zahlreicher Interaktionspartner anti-apoptotisch ist, aber auch die Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Weiterhin wird die Beteiligung von *HAX1* bei der Entstehung und/oder des Transports von "*clathrin-coated*" Vesikeln diskutiert.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Expression und Funktion von *HAX1* durchgeführt. Dabei wurde die Expression des murinen Orthologs in Organen und Geweben untersucht, sowie die subzelluläre Lokalisation von murinem Hax1 und humanem HAX1 in Keratinozyten untersucht. RNAi-Experimente sollten aufzei-

gen, welche Funktion *HAX1* in Keratinozyten wahrnimmt und ob diese Funktionen einen Zusammenhang zur Pathogenese der Psoriasis besitzen könnten.

4.1 Vergleich zwischen der Expression von murinem Hax1, humanem HAX1 und seinen Interaktionspartnern, in Geweben

Die Expression von *HAX1* in verschiedenen humanen Geweben über einen Northern Blot wurde bereits in den Arbeiten von Mirmohammadsadegh und Mitarbeitern 2003 veröffentlicht (Mirmohammadsadegh et al. 2003). Ein Vergleich der Ergebnisse an *HAX1*-Transkripten in humanem Gewebe mit den ermittelten Daten im Mausmodell, welche in Kapitel 3.1 dargelegt wurden, zeigt, dass die relativen Expressionen des Gens zwischen den untersuchten Geweben in Maus und Mensch sehr ähnlich sind. Es konnten hohe Expressionen im Gehirn, der Leber, der Niere, dem Herzen sowie niedrige Expressionen in der Lunge nachgewiesen werden. Allerdings gibt es doch einen bemerkenswerten Unterschied. Die höchste humane *HAX1*-Expression aller untersuchter Organe konnte im Skelettmuskel ermittelt werden (Mirmohammadsadegh et al. 2003). In murinem Skelettmuskel zeigte sich dagegen keine detektierbare *Hax1*-Expression (siehe Abb. 4). Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da *Hax1* eine Rolle in Dynamiken des Zytoskeletts zugeschrieben wird (siehe Kapitel 1.2.2) und auch andere Gewebstudien in dieser Arbeit eine Expression von *Hax1* in Zellen der glatten Muskulatur nachweisen konnten (siehe Abb. 7). Da die Interaktion von Myosin und F-Aktin essentiell für eine Muskel-Kontraktion ist, sollten auch Dynamiken des Aktin-Zytoskeletts eine wichtige Rolle in Muskelzellen spielen. Das *HAX1* in diesem

Zusammenhang eine Bedeutung haben kann, wird durch seine hohe Expression in humanen Muskelzellen zumindest angedeutet. Cortactin ist ein wichtiger Interaktionspartner von HAX1 im Zusammenhang mit Zytoskelett-Dynamiken (siehe 1.2.2.1) und während dieses Protein in humanem fötalen Skelettmuskel ebenfalls eine hohe Expression aufweist (Wu und Montone 1998), ist murines Cortactin nur sehr niedrig im murinen Skelettmuskel exprimiert (Migliarese et al. 1994). Es ist anzunehmen, dass die Aufgaben von Cortactin/HAX1 im menschlichen Skelettmuskel in der Maus von anderen Proteinen wahrgenommen werden und könnte somit eine evolutionäre Divergenz zwischen den beiden Spezies darstellen.

Ein Vergleich zwischen *Hax1*-Transkripten und deren Proteinexpression (siehe Abb. 4 und 5 für Transkript-Expression und 6 für Proteinexpression) zeigt eine gute Korrelation zwischen der Menge an detektierter mRNA und detektiertem Protein. In einigen Organen lassen sich aber auch Diskrepanzen ausmachen. So war die Menge an *Hax1*-mRNA im Herzen sehr hoch, während nur eine geringe Menge an Protein nachgewiesen werden konnte. Ähnlich verhielt es sich in Testis, wo eine hohe Transkriptmenge einer eher moderaten Menge an Protein gegenüberstand. Bei Studien in der Ratte konnte kürzlich ein ähnliches Phänomen in Testis ermittelt werden (Grzybowska et al. 2006). Im Gehirn bot sich ein gegenteiliges Bild. Dort folgte auf eine moderate Transkription eine überraschend hohe Proteinexpression. Eine posttranskriptionelle Regulation von *Hax1*, welche in Zukunft genauer untersucht werden müsste, scheint somit in einigen Organen von Bedeutung für die Expression des Gens zu sein.

4.2 Gewebsspezifische und zellspezifische Lokalisation von Hax1

In der immunhistochemischen Untersuchung der Hax1-Lokalisation in Geweben (siehe Abb. 7) konnte gezeigt werden, dass Hax1 hauptsächlich in Epithelien, Endothelien und Muskelzellen exprimiert wird. Auch interstitielle Zellen, die Verbindungen zwischen anderen Gewebsstrukturen herstellen, zeigten eine hohe Hax1-Expression. Angesichts der Funktion von Hax1 in Zytoskelett-Dynamiken ist der Befund, dass Hax1 in Muskelzellen der glatten Muskulatur exprimiert wird, zu erwarten. Endothelien und Epithelien, die eine Grenzstruktur zwischen Kompartimenten im Körper oder zwischen der Außenwelt und dem Körperinneren darstellen, weisen oft eine starke Polarisation auf. Das Zytoskelett ist für die Ausformung dieser Polarisation essentiell (Knust 2000). Daher ist die beobachtete, erhöhte Hax1-Expression wegen der Funktion des Gens in Zytoskelettdynamiken, zu erwarten. Angesichts der antiapoptotischen Funktion von Hax1 erscheint eine erhöhte Expression in Epithelien ebenfalls plausibel, da sie aufgrund ihrer Abgrenzungsfunktionen in weit erheblicherem Maß Apoptose-induzierenden Umwelttoxinen ausgesetzt sind, als Zellen und Gewebe im Inneren des Körpers.

Da die Funktion von Hax1, ob antiapoptotisch oder zytoskelettdynamisch, im großen Maße von seiner Lokalisation abhängt, war die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Proteins über indirekte Immunfluoreszenz von besonderem Interesse. Eine reine mitochondriale Lokalisation in der Zelle würde eine Funktion von Hax1 in Zytoskelettdynamiken unwahrscheinlich machen, genau wie eine rein zytoplasmatische Lokalisation eine antiapoptotische Aufgabe eher abwegig erscheinen lassen würde, vor allem nach der Beobachtung, dass

eine Relokalisation von HAX1 aus den Mitochondrien in das Zytoplasma zu einer Induktion der Apoptose in HeLa-Zellen führt (Yedavalli et al. 2005). Auch galt es, die Frage zu klären, ob es eventuell zelltypspezifische Lokalisationen von Hax1 gibt. Welche der beschriebenen Funktionen von HAX1 tatsächlich wahrgenommen wird, könnte von der Zellart abhängen, in der das Protein exprimiert wird. Die Ergebnisse (siehe Abb. 8) zeigten, dass sowohl in Keratinozyten (Pam212) als auch in neuronalen Zellen (N2a) der Maus, eine Kolokalisation von Hax1 mit den Mitochondrien zu beobachten ist. Es gibt allerdings auch eine große Menge des Hax1-Proteinpools in der Zelle, die zytoplasmatisch lokalisiert ist. Der Nachweis von endogenem Hax1 an den Mitochondrien deutet stark daraufhin, dass in beiden Zellarten Hax1 eine antiapoptotische Funktion haben könnte. Die Anwesenheit von Hax1 im Zytoplasma hingegen bestärkt die Annahme, dass die Funktion des Proteins in Zytoskelettdynamiken in diesen Zellen ebenfalls wahrgenommen wird. Ob diese zytoplasmatische Lokalisation von Hax1 mit Aktin korreliert, wurde im humanen Modell genauer untersucht (siehe Abb. 9). Da es außerdem Publikationen gab, die eine Lokalisation von HAX1 im endoplasmatischen Retikulum beobachteten (Gallagher et al. 2000), wurde eine eventuelle Kolokalisation von endogenem Hax1 mit dem endoplasmatischen Retikulum studiert. Eine Kolokalisation konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 8 und 9). Diese Abweichung von den Ergebnissen Gallaghers und Mitarbeitern könnte ihre Ursache darin haben, dass diese die Lokalisation von HAX1 in HeLa-Zellen, in denen eine differentielle Lokalisation von HAX1 möglich ist, untersucht haben (Gallagher et al. 2000). Eine subzelluläre Lokalisationsuntersuchung von endogenem HAX1 in humanen B-Lymphom Daubi-Zellen zeigte ebenfalls eine partielle Lokalisation von HAX1 im ER (Suzuki et al. 1997). Die Unterschiede in dieser Lokalisation könnten auch speziesspezifisch

sein, da beide genannten Untersuchungen in humanen Systemen erfolgten, die hier untersuchten Zellen aber murinen Ursprungs waren. Diese Hypothese kann allerdings nach Untersuchungen in humanen Keratinozyten (HaCaT) für diese verworfen werden, da eine den murinen Keratinozyten gleichende subzelluläre Lokalisation von HAX1 nachgewiesen wurde (Abb. 9).

Murine Keratinozyten zeigten allerdings einen interessanten Unterschied gegenüber den neuronalen Zellen in der Hax1-Lokalisation. So war um den Zellkern herum eine Lokalisation von Hax1 in den Pam212-Zellen zu beobachten (siehe Abb. 8), die in den neuronalen Zellen nicht auftrat. Suzuki und Mitarbeiter haben bereits eine ähnliche Lokalisation von HAX1 an der Kernhülle beschrieben (Suzuki et al. 1997). Pam212-Zellen die gerade eine Mitose durchlaufen und deren Kernhülle abgebaut ist, zeigten diese Lokalisation nicht (Daten nicht gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Lokalisation von Hax1 mit der Kernmembran assoziiert ist.

4.3 Subzelluläre Lokalisation von HAX1 in HaCaT-Zellen

Nachdem die subzelluläre Lokalisation von Hax1 in murinen Keratinozyten untersucht war, wurde im Anschluss die Lokalisation von humanem HAX1 in der Keratinozytenzelllinie HaCaT studiert. Dabei war unter anderem von Interesse, ob es Unterschiede in der Lokalisation des Proteins im Menschen und seines Orthologs in der Maus gibt. Die Ergebnisse (siehe Abb. 9) zeigten eine ähnliche Lokalisation von HAX1 in HaCaT-Zellen, wie sie schon in Pam212-Zellen zu beobachten war.

Es konnte keine Kolo­kalisierung zwischen HAX1 und dem ER nachgewiesen werden, was daraufhin deutet, dass die ermittelten partiellen Kolo­kalisierungen von HAX1 und dem ER, welche von Suzuki zum einen und Gallagher zum anderen veröffentlicht wurden (Suzuki et al. 1997; Gallagher et al. 2000), ein zelltypspezifisches Phänomen ist und nicht an einer differentiellen Lokalisation von HAX1 in Keratinozyten von Mensch und Maus liegt.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Lokalisation von HAX1, welche schon bei murinem Hax1 gezeigt wurde (siehe Abb. 8), tatsächlich partiell mit Aktin kolo­kalisiert. Dies ist ein Hinweis auf eine Aufgabe des Proteins in Funktionen des Aktinzytoskeletts. Ebenso konnte die in Pam212-Zellen beobachtete mitochondriale Lokalisation von Hax1 in den HaCaT-Zellen bestätigt werden.

Experimente mit einer dreifachen Färbung der Zellen für HAX1, Mitochondrien und Aktin zeigte, dass die partiellen Kolo­kalisierungen zwischen HAX1 und anderen angefärbten Strukturen jeweils distinkt war, es also keine dreifache Kolo­kalisierung gab. Nur in seltenen Fällen konnte eine Kolo­kalisierung von HAX1, Aktin und den Mitochondrien gezeigt werden, dies könnten aber Ereignisse sein, bei denen das Aktin-Zytoskelett eine Verbindung zu den Mitochondrien aufbaut und HAX1, aufgrund der beschriebenen Funktion in Aktinzytoskelettdynamiken, ebenfalls an diesen Verankerungspunkten kurzzeitig vorhanden ist. Die Dreifach-Färbung zeigt einen weiteren Aspekt auf: Trotz der partiellen Kolo­kalisierung von HAX1 mit den Mitochondrien und mit Aktin ist immer noch zytoplasmatisch lokalisiertes HAX1 zu sehen, welches nicht einer der beiden Strukturen zugeordnet werden kann. Dieses HAX1 könnte eventuell in „*clathrin-coated*“ Vesikeln lokalisiert sein, da es ebenfalls Hinweise darauf gibt, dass HAX1 eine Funktion im Vesikeltransport besitzt (Ortiz et al. 2004; Oberndorfer et al. 2006).

4.4 „*Knock-down*“ Experimente in HaCaT-Zellen zeigen einen Einfluß von HAX1 auf Motilität

4.4.1 *HAX1*-„*Knock-down*“ und Apoptose-Induzierung

In dieser Arbeit wurde der Effekt eines *HAX1*-„*Knock-downs*“ auf die Induktion der Apoptose durch Camptotecin untersucht. Durch die Inhibierung von Topoisomerase I durch Camptotecin wird die Fähigkeit der Zelle zur Replikation und Transkription unterbunden, da die Zellen nicht mehr in der Lage sind, DNA zu entwinden und damit für Polymerasen zugänglich zu machen (Malonne und Atassi 1997). Wenn *HAX1* eine antiapoptotische Funktion in HaCaT-Zellen besitzt, sollte der „*Knock-down*“ des Gens dazu führen, dass die Zellen schneller in die Apoptose eintreten, als die Zellen, in denen eine normale *HAX1*-Expression vorliegt. Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, konnte keine signifikante Veränderung in der Caspase 3-Aktivierung, als Marker für eine Apoptose-Induktion, zwischen *HAX1*-exprimierenden und -nichtexprimierenden Zellen festgestellt werden. Da die Funktion von *HAX1* zelltyp-spezifisch sein kann, ist es möglich, dass in HaCaT-Zellen die antiapoptotische Funktion von *HAX1* keine große Rolle spielt. Allerdings sind kleinere Effekte in der Caspase 3-Aktivierung 8 Stunden und 12 Stunden nach Camptotecin-Zugabe zu beobachten. Zu diesen Zeitpunkten ist eine leicht erhöhte Aktivierung der Caspase in den „*Knock-down*“-Zellen im Vergleich zu den Negativkontroll-siRNA-transfizierten Zellen zu sehen (siehe Abb. 15). Bei den verwendeten Mengen an Camptotecin (20 µM), welche eine eindeutige und leicht messbare Aktivierung der Caspase nach sich zog, ist es durchaus auch möglich, dass der antiapoptotische Effekt von *HAX1* nur noch einen kleinen Einfluss auf die

Induktion der Apoptose haben könnte – eben jene leicht niedriger induzierte Aktivierung, die nach 8 und 12 Stunden in den *HAX1*-exprimierenden Zellen beobachtet wurde.

4.4.2 Der „Knock-down“ von HAX1 führt zu einer Inhibierung der Motilität von HaCaT-Zellen in einem *in vitro* Wundheilungsassay

Der Effekt des *HAX1*-„Knock-downs“ auf Aktinzytoskelettdynamiken wurde mit Hilfe eines *in vitro* Wundheilungsassays durchgeführt. Da die Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin für Motilität von Zellen unerlässlich ist (siehe 1.2.2), sollte ein Verlust an HAX1 eine Auswirkung auf die Geschwindigkeit sich bewegender Zellen haben. Die Ergebnisse des Experiments (siehe 3.4.3) zeigten, dass nachdem die HAX1-Konzentration in der Zelle einen bestimmten Wert unterschritt, HaCaT-Zellen in ihrer Beweglichkeit stark gehemmt waren. Da in den Kollokalisationsuntersuchungen gezeigt wurde, dass HAX1 mit Aktin kolokalisiert, kann der Bewegungsverlust der Zellen mit einer Auswirkung auf das Aktinzytoskelett in Verbindung gebracht werden. Wie in 1.2.2.3 bereits erläutert, konnte gezeigt werden, dass HAX1 in Verbindung mit $G\alpha_{13}$ und der GTPase Rac eine Verbindung mit Cortactin eingeht (Radhika et al. 2004). Das Fehlen von HAX1 könnte den Effekt haben, dass $G\alpha_{13}$ und Rac nun nicht mehr an Cortactin binden können oder diese Bindung gehemmt ist, welches dadurch nicht an F-Aktin transloziert werden kann und nicht mehr für die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes zur Verfügung steht.

Die indirekte Immunfluoreszenz zeigte auch, dass HAX1 und Aktin in den Lamellipodien kolokalisieren. Das Aktinzytoskelett in den Lamellipodien ist entscheidend

an der Motilität der Zelle beteiligt, wie in Kapitel 1.2.2 ausführlich besprochen. Ein Verlust der Dynamik des Zytoskeletts aufgrund der fehlenden Aktivierung des Arp2/3-Komplexes wird daher die Bewegung der Lamellipodien und damit der gesamten Zelle verlangsamen, ein Effekt, welcher im *in vitro* Wundheilungsassay zu beobachten war. Der nahezu vollständige Verlust der Beweglichkeit der HaCaT-Zellen durch das Absinken der HAX1-Konzentration in der Zelle zeigt, dass HAX1 eine entscheidende Funktion in der Zellbeweglichkeit von Keratinozyten besitzt und damit höchstwahrscheinlich ebenfalls von Aktinzytoskelett-Dynamiken (vgl. 1.2.2)

4.5 Die promigratorische Eigenschaft von HAX1 in Keratinozyten und das dysfunktionale Wundheilungsmodell als Ursache der Psoriasis

Epidermale primäre Keratinozyten schließen ohne Stimulation durch Faktoren wie den „*Epidermal Growth Factor*“ (EGF) oder „*Transforming Growth Factor*“ (TGF)- α eine Wunde in einem *in vitro* Wundheilungsassay nicht (Hudson and McCawley 1998). Erst nach einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren verändern Keratinozyten ihr Verhalten und beginnen einen gerichteten Prozess, der die Keratinozyten von ihrem normalen Verhalten, der terminalen Differenzierung, zu einem promigratorischen Verhalten, also Proliferation und Motilität, treibt (Kirfel und Herzog 2004). Keratinozyten schalten ihre Proteinbiosynthese durch diese Wachstumsfaktoren um und gelangen in eine Art „Wundheilungsmodus“. STAT3 ist einer der Transkriptionsfaktoren, der essentiell für diese Umschaltung ist (Sano et al. 1999). Keratinozyten verändern nach Stimulation die Transkription einer ganzen Reihe von Genen. Dies führt zur Expression von Keratinen, Wachstumsfaktoren, anti-

mikrobiellen Peptiden und Matrix-Metalloproteinasen (Raja et al. 2007). Im Hinblick auf die Tatsache, dass antimikrobielle Peptide exprimiert werden, ist die Verbindung der Psoriasis-Marker-Proteine S100 mit der „*Innate Immunity*“, der Antikörper- und Immunzell-unabhängigen Immunantwort von Zellen, von Interesse (Yang, Z. et al. 2007). Die Expression von S100-Proteinen ist in einem Wundheilungsstadium von Keratinozyten erhöht (Boniface et al. 2005) und sie sind in der Psoriasis überexprimiert (Semprini et al. 2002). Es wurde schon vorher aufgezeigt (siehe 1.1.3), dass ein Modell für die Pathogenese der Psoriasis eine gestörte Wundheilung der Keratinozyten ist. Eine Frage, die sich stellt ist, ob die erhöhte Expression von S100-Proteinen und auch von HAX1 in psoriatischer Haut nicht durch eine Regulation der Keratinozyten erfolgt, die sich in einem Wundheilungsstadium befinden. Ob die Expression von *HAX1* in Keratinozyten bei Wundverschluss erhöht ist, wurde noch nicht nachgewiesen. In HaCaT-Zellen konnte eine erhöhte Expression von *HAX1* nachgewiesen werden (Mirmohammadsadegh et al. 2003) und sie sind in der Lage eine Wunde ohne vorherige Stimulation zu schließen, während primäre Keratinozyten eine niedrigere *HAX1*-Expression zeigen (Mirmohammadsadegh et al. 2003) und nicht in der Lage sind, in einem *in vitro* System ohne Stimulation einen Wundverschluss durchzuführen. Dies legt den Verdacht nahe, dass *HAX1* eine wichtige Rolle in der Wundheilung besitzt und in Wunden auch hoch exprimiert sein könnte. Dieser Umstand deutet ebenfalls daraufhin, dass in der Psoriasis diejenigen Gene überexprimiert werden, die für eine Wundheilung der Keratinozyten essentiell sind, aber, und das macht die Pathogenität der Erkrankung aus, die Keratinozyten sich in einem „Wundheilungsmodus“ ohne Wunde befinden. In einer unverwundeten Epidermis sollten aber Keratinozyten, welche versuchen eine nicht vorhandene Wunde zu schließen, zu eben dem Phänotyp führen, der in der Psoriasis zu beobachten ist, also

eine Verdickung der Epidermis, Infiltrat aus Immunzellen, welche durch Signale der Keratinozyten angelockt werden, und eine Resistenz gegen Infektionen, da die Keratinozyten bereits antimikrobielle Peptide sezernieren.

Die Überexpression von *HAX1* in der Epidermis von psoriatischen Läsionen könnte eine Folge einer Störung der Kontrolle von Genen der Wundheilung in Keratinozyten sein. Diese ist vermutlich in der konstitutiven, oder zumindest nicht auf üblichem Wege abzuschaltenden, Aktivierung eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren begründet. Evidenzen aus einem Mausmodell legen nahe, dass einer davon STAT3 sein könnte (Sano et al. 2005). Eine dysfunktionale Wundheilung, verursacht durch STAT3-aktivierte Keratinozyten und aktivierte T-Zellen, ist möglicherweise die Ursache des psoriatischen Krankheitsbildes. Die promigratorische Funktion von *HAX1*, zusammen mit seiner Überexpression in einer Keratinozytenzelllinie die zu autonomen Wundverschluß befähigt ist, liefert einen wichtigen Hinweis für diese Hypothese. In weiteren Experimenten wären – zwecks Bestätigung der Hypothese – die transkriptionelle Kontrolle von *HAX1* aufzuklären und die Funktion des Gens in Wundheilungsvorgängen genauer zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Psoriasis ist eine chronisch rezidivierende Autoimmunkrankheit der Haut an der rund 2% der Bevölkerung erkranken. Die Pathogenese der Erkrankung ist immer noch weitgehend unbekannt. Die psoriatische Epidermis ist durch ein Infiltrat von Immunzellen gekennzeichnet und es wird angenommen, dass eine Störung der „Memory“ (oder Gedächtnis)-T-Zellen für den Phänotyp der Erkrankung verantwortlich ist. Weiterhin ist auch die Funktion von Keratinozyten gestört. Dies äußert sich in der Differenzierungsstörung mit Parakeratose sowie verstärkter Keratinozytenproliferation, die zu einer Verdickung der Epidermis führt (Hyperkeratose). Die verstärkte Proliferation der Keratinozyten führte zur Hypothese, dass die Keratinozyten sich in einem un- oder fehlkontrolliertem Wundheilungszustand befinden. In einem Mausmodell mit konstitutiv aktiviertem STAT3 konnte gezeigt werden, dass dieser für Wundheilungsprozesse wichtige Transkriptionsfaktor einen psoriasisartigen Hautphänotyp auslöst.

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das *HAX1*-Gen in psoriatischer Haut überexprimiert wird. Es wird angenommen, dass die Funktion von *HAX1* aufgrund zahlreicher Interaktionspartner anti-apoptotisch ist, aber auch die Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Weiterhin wird die Beteiligung von *HAX1* bei der Entstehung und/oder des Transports von "*clathrin-coated*" Vesikeln diskutiert.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das murine Ortholog *Hax1*, hauptsächlich in Epithelien, Endothelien und Muskelzellen exprimiert wird. Außerdem konnte eine partielle Kolo-kalisation von murinem und humanem *HAX1* mit Mitochondrien nachgewiesen werden. Im humanen System kolo-kalisiert *HAX1* außerdem mit Aktinfilamenten. Funktionell konnte mit Hilfe von RNAi-Experi-

menten gezeigt werden, dass ein Verlust von *HAX1* keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von Caspase 3 nach einer Apoptoseinduktion hatte. In einem *in vitro* Wundheilungsassay behinderte der Verlust von *HAX1* allerdings die Reparaturkapazität von Keratinozyten und führte zu einer signifikant reduzierten Zellmotilität. In Zellen des Wundrandes assoziierte *HAX1* mit Aktin in den Lamellipodien.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *HAX1* die Reparaturkapazität und Zellmotilität von Keratinozyten beeinflusst. Durch diese Erkenntnisse liefert die Überexpression von *HAX1* in der Epidermis von psoriatischen Läsionen wichtige Hinweise für die Hypothese dysregulierter Wundheilungsprozesse im Rahmen der Psoriasis vulgaris. Weitere Studien, die zeigen wie der Verlust von *HAX1* Aktinzytoskelettdynamiken unterbindet werden wichtig sein, um den exakten molekularen Mechanismus der Rolle von *HAX1* in der Psoriasis und der Wundheilung aufzuklären.

6 ABSTRACT

Psoriasis is a chronic autoimmune disease with a prevalence of 2% among the population. The pathogenesis of the disease is not completely understood. The psoriatic epidermis is infiltrated by immune cells and it is hypothesized that a disorder of memory T-cells is responsible for the phenotype of this disease. An alternate hypothesis also proposes it to be due to a malfunction in keratinocytes. Psoriasis is characterized by inhibition of terminal differentiation thus leading to a thicker epidermis, as well as to parakeratosis. The strong proliferation of keratinocytes as observed in psoriasis lead to the hypothesis that keratinocytes are in a state of dysfunctional wound healing. Experiments in a mouse model with a constitutively activated STAT3 (a transcription factor factor associated with wound healing) showed induction of a psoriasis-like phenotype.

Previous studies in our group showed, that *HAX1* is highly expressed in psoriatic skin. Based on the interaction partners of HAX1 its putative role in apoptosis and in cytoskeleton dynamics is proposed. Further its involvement in development and transport of clathrin-coated vesicles is discussed.

In this work it has been shown for the first time that the murine orthologue *Hax1*, is mainly expressed in endothelial, epithelial and smooth muscle cells. In the present study, a partial co-localization of murine and human HAX1 with mitochondria was observed, and a co-localisation of actin with human HAX1 is demonstrated. Using RNAi mediated experiments, it was observed that a loss of HAX1 had no significant effect on activity of Caspase 3 subsequent to the induction of apoptosis. However an *in vitro* wound healing assay post RNAi mediated loss of HAX1 diminished wound closure. In addition, a co-localization of HAX1 and actin in

lamellipodia (at the edge of the wound) was observed. Thus this study demonstrated that *HAX1* influences cell motility in keratinocytes and that a loss of *HAX1* was responsible for dysfunctional wound healing of keratinocytes. Interestingly the overexpression of *HAX1* in the epidermis of psoriatic lesions further strengthens the evidence for the hypothesis that the psoriatic phenotype is due to a dysfunctional wound healing of keratinocytes. Further insights into whether a loss of *HAX1* abrogates actin cytoskeleton dynamics will be important in elucidating the exact molecular mechanism of *HAX1* in psoriasis and wound healing.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Al-Maghrebi, M., Brule, H., Padkina, M., Allen, C., Holmes, W.M. and Zehner, Z.E. (2002). "The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1gamma and HAX-1." *Nucleic Acids Res* 30(23): 5017-28.
- Alfieri, C., Birkenbach, M. and Kieff, E. (1991). "Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes." *Virology* 181(2): 595-608.
- Applied Biosystems. (2004). "Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR." from http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/performing_rq_gene_exp_rtqcr.pdf.
- Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., Haugen, H., Jelinek, L., Kelly, J.D., Madden, K., Maurer, M.F., Parrish-Novak, J., Prunkard, D., Sexson, S., Sprecher, C., Waggle, K., West, J., Whitmore, T.E., Yao, L., Kuechle, M.K., Dale, B.A. and Chandrasekhar, Y.A. (2001). "Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function." *Cell* 104(1): 9-19.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." *Cell* 85(6): 803-15.
- Boniface, K., Bernard, F.X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.C. and Morel, F. (2005). "IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes." *J Immunol* 174(6): 3695-702.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-71.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N. and Johnson, G.L. (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." *J Biol Chem* 270(42): 24631-4.
- Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004). "Rho and Rac take center stage." *Cell* 116(2): 167-79.
- Cao, H., Orth, J.D., Chen, J., Weller, S.G., Heuser, J.E. and McNiven, M.A. (2003). "Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis." *Mol Cell Biol* 23(6): 2162-70.

- Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch, J. and von Mikecz, A. (2002). "Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen." *Mol Biol Cell* 13(10): 3576-87.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Cilenti, L., Lee, Y., Hess, S., Srinivasula, S., Park, K.M., Junqueira, D., Davis, H., Bonventre, J.V., Alnemri, E.S. and Zervos, A.S. (2003). "Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2." *J Biol Chem* 278(13): 11489-94.
- Cilenti, L., Soundarapandian, M.M., Kyriazis, G.A., Stratico, V., Singh, S., Gupta, S., Bonventre, J.V., Alnemri, E.S. and Zervos, A.S. (2004). "Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death." *J Biol Chem* 279(48): 50295-301.
- Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S. and Landau, N.R. (1995). "Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes." *Virology* 206(2): 935-44.
- Daly, R.J. (2004). "Cortactin signalling and dynamic actin networks." *Biochem J* 382(Pt 1): 13-25.
- Dufva, M., Olsson, M. and Rymo, L. (2001). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 5 interacts with HAX-1, a possible component of the B-cell receptor signalling pathway." *J Gen Virol* 82(Pt 7): 1581-7.
- Duriez, P.J. and Shah, G.M. (1997). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death." *Biochem Cell Biol* 75(4): 337-49.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Elder, J.T., Nair, R.P., Guo, S.W., Henseler, T., Christophers, E. and Voorhees, J.J. (1994). "The genetics of psoriasis." *Arch Dermatol* 130(2): 216-24.
- Engqvist-Goldstein, A.E. and Drubin, D.G. (2003). "Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals." *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 287-332.
- Fehrenbacher, K.L., Boldogh, I.R. and Pon, L.A. (2003). "Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting." *Trends Cell Biol* 13(9): 472-7.
- Finucane, D.M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N.J., Cotter, T.G. and Green, D.R. (1999). "Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL." *J Biol Chem* 274(4): 2225-33.
- Gabow, P.A. (1993). "Autosomal dominant polycystic kidney disease." *Am J Kidney Dis* 22(4): 511-2.
- Gallagher, A.R., Cedzich, A., Gretz, N., Somlo, S. and Witzgall, R. (2000). "The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4017-22.

- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F. and Meier, P.J. (1998). "The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver." *J Biol Chem* 273(16): 10046-50.
- Gibbs, J.S., Lackner, A.A., Lang, S.M., Simon, M.A., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. and Desrosiers, R.C. (1995). "Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx." *J Virol* 69(4): 2378-83.
- Gilhar, A., David, M., Ullmann, Y., Berkutski, T. and Kalish, R.S. (1997). "T-lymphocyte dependence of psoriatic pathology in human psoriatic skin grafted to SCID mice." *J Invest Dermatol* 109(3): 283-8.
- Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and Emerman, M. (1998). "HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo." *Nat Med* 4(1): 65-71.
- Gougeon, M.L. and Montagnier, L. (1999). "Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy." *Ann N Y Acad Sci* 887: 199-212.
- Gray, C.W., Ward, R.V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K.G., West, A., Savopoulos, J., Hassan, N.J., Clinkenbeard, H., Hanning, C., Amegadzie, B., Davis, J.B., Dingwall, C., Livi, G.P. and Creasy, C.L. (2000). "Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response." *Eur J Biochem* 267(18): 5699-710.
- Grzybowska, E.A., Sarnowska, E., Konopinski, R., Wilczynska, A., Sarnowski, T.J. and Siedlecki, J.A. (2006). "Identification and expression analysis of alternative splice variants of the rat Hax-1 gene." *Gene* 371(1): 84-92.
- Gu, J.L., Muller, S., Mancino, V., Offermanns, S. and Simon, M.I. (2002). "Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9352-7.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2001). "Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins." *Annu Rev Biochem* 70: 649-76.
- Hippe, A., Bylaite, M., Chen, M., von Mikecz, A., Wolf, R., Ruzicka, T. and Walz, M. (2006). "Expression and tissue distribution of mouse Hax1." *Gene* 379: 116-26.
- Hooley, R., Yu, C.Y., Symons, M. and Barber, D.L. (1996). "G alpha 13 stimulates Na⁺-H⁺ exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways." *J Biol Chem* 271(11): 6152-8.
- Hudson, L.G. and McCawley, L.J. (1998). "Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility." *Microsc Res Tech* 43(5): 444-55.
- Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millan, J.L., Gamble, V. and Harris, P.C. (1995). "The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains." *Nat Genet* 10(2): 151-60.

- Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z., Davies, E., Hajnoczky, G., Saunders, T.L., Van Keuren, M.L., Fernandes-Alnemri, T., Meisler, M.H. and Alnemri, E.S. (2003). "Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of *mnd2* mutant mice." *Nature* 425(6959): 721-7.
- Katsube, T., Takahisa, M., Ueda, R., Hashimoto, N., Kobayashi, M. and Togashi, S. (1998). "Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse." *J Biol Chem* 273(45): 29672-7.
- Kawaguchi, Y., Nakajima, K., Igarashi, M., Morita, T., Tanaka, M., Suzuki, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M. and Hirai, K. (2000). "Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) with HS1-associated protein X-1: implication of cytoplasmic function of EBNA-LP." *J Virol* 74(21): 10104-11.
- Kim, K.I., Park, S.C., Kang, S.H., Cheong, G.W. and Chung, C.H. (1999). "Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 294(5): 1363-74.
- Kirfel, G. and Herzog, V. (2004). "Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance." *Protoplasma* 223(2-4): 67-78.
- Kitamura, D., Kaneko, H., Miyagoe, Y., Ariyasu, T. and Watanabe, T. (1989). "Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage." *Nucleic Acids Res* 17(22): 9367-79.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* 275(5303): 1132-6.
- Knust, E. (2000). "Control of epithelial cell shape and polarity." *Curr Opin Genet Dev* 10(5): 471-5.
- Kolmar, H., Waller, P.R. and Sauer, R.T. (1996). "The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation." *J Bacteriol* 178(20): 5925-9.
- Kullak-Ublick, G.A., Beuers, U. and Paumgartner, G. (2000). "Hepatobiliary transport." *J Hepatol* 32(1 Suppl): 3-18.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." *Cell* 84(3): 359-69.
- Li, A.G., Wang, D., Feng, X.H. and Wang, X.J. (2004). "Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder." *Embo J* 23(8): 1770-81.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 91(4): 479-89.
- Lipinska, B., Sharma, S. and Georgopoulos, C. (1988). "Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent

- mechanism of heat-inducible transcription." *Nucleic Acids Res* 16(21): 10053-67.
- Lipinska, B., Zylicz, M. and Georgopoulos, C. (1990). "The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase." *J Bacteriol* 172(4): 1791-7.
- Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): 487-501.
- Lua, B.L. and Low, B.C. (2005). "Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control." *FEBS Lett* 579(3): 577-85.
- Lynch, D.K., Winata, S.C., Lyons, R.J., Hughes, W.E., Lehrbach, G.M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S. and Daly, R.J. (2003). "A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* 278(24): 21805-13.
- Malonne, H. and Atassi, G. (1997). "DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives." *Anticancer Drugs* 8(9): 811-22.
- Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A. and Kieff, E. (1991). "The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation." *J Virol* 65(12): 6826-37.
- Martinez-Quiles, N., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., Ramesh, N. and Geha, R.S. (2004). "Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP." *Mol Cell Biol* 24(12): 5269-80.
- Matsuda, G., Nakajima, K., Kawaguchi, Y., Yamanashi, Y. and Hirai, K. (2003). "Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through HS1-associated protein X-1." *Microbiol Immunol* 47(1): 91-9.
- McKenzie, R.C. and Sabin, E. (2003). "Aberrant signalling and transcription factor activation as an explanation for the defective growth control and differentiation of keratinocytes in psoriasis: a hypothesis." *Exp Dermatol* 12(4): 337-45.
- Menter, A. and Barker, J.N. (1991). "Psoriasis in practice." *Lancet* 338(8761): 231-4.
- Migliarese, M.R., Mannion-Henderson, J., Wu, H., Parsons, J.T. and Bender, T.P. (1994). "The protein tyrosine kinase substrate cortactin is differentially expressed in murine B lymphoid tumors." *Oncogene* 9(7): 1989-97.
- Mirmohammadsadegh, A., Tartler, U., Michel, G., Baer, A., Walz, M., Wolf, R., Ruzicka, T. and Hengge, U.R. (2003). "HAX-1, identified by differential display reverse transcription polymerase chain reaction, is overexpressed in lesional psoriasis." *J Invest Dermatol* 120(6): 1045-51.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H. and Takenawa, T. (2002). "Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts." *Cancer Res* 62(3): 669-74.

- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J. and Somlo, S. (1996). "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein." *Science* 272(5266): 1339-42.
- Muthumani, K., Hwang, D.S., Desai, B.M., Zhang, D., Dayes, N., Green, D.R. and Weiner, D.B. (2002). "HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells." *J Biol Chem* 277(40): 37820-31.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* 85(6): 817-27.
- Nickoloff, B.J. and Wrone-Smith, T. (1999). "Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis." *Am J Pathol* 155(1): 145-58.
- Nies, A.T., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. (1996). "ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles." *J Lipid Res* 37(5): 1125-36.
- Oberndorfer, I., Schmid, D., Geisberger, R., Achatz-Straussberger, G., Cramer, R., Lamers, M. and Achatz, G. (2006). "HS1-associated protein X-1 interacts with membrane-bound IgE: impact on receptor-mediated internalization." *J Immunol* 177(2): 1139-45.
- Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J.P. and Simon, M.I. (1997). "Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency." *Science* 275(5299): 533-6.
- Ohoka, Y. and Takai, Y. (1998). "Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90." *Genes Cells* 3(9): 603-12.
- Ortiz, D.F., Moseley, J., Calderon, G., Swift, A.L., Li, S. and Arias, I.M. (2004). "Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* 279(31): 32761-70.
- Parks, S. and Wieschaus, E. (1991). "The *Drosophila* gastrulation gene *concertina* encodes a G alpha-like protein." *Cell* 64(2): 447-58.
- Plonk, S.G., Park, S.K. and Exton, J.H. (1998). "The alpha-subunit of the heterotrimeric G protein G13 activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases." *J Biol Chem* 273(9): 4823-6.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-76.
- Qian, F., Germino, F.J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S. and Germino, G.G. (1997). "PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain." *Nat Genet* 16(2): 179-83.

- Radhika, V. and Dhanasekaran, N. (2001). "Transforming G proteins." *Oncogene* 20(13): 1607-14.
- Radhika, V., Onesime, D., Ha, J.H. and Dhanasekaran, N. (2004). "Alpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1." *J Biol Chem* 279(47): 49406-13.
- Raja, Sivamani, K., Garcia, M.S. and Isseroff, R.R. (2007). "Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing." *Front Biosci* 12: 2849-68.
- Ridley, A.J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." *J Cell Sci* 114(Pt 15): 2713-22.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science* 234(4774): 364-8.
- Ruetz, S. and Gros, P. (1994). "Functional expression of P-glycoproteins in secretory vesicles." *J Biol Chem* 269(16): 12277-84.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, USA.
- Sano, S., Chan, K.S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B.J. and DiGiovanni, J. (2005). "Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model." *Nat Med* 11(1): 43-9.
- Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S. and Takeda, J. (1999). "Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis." *Embo J* 18(17): 4657-68.
- Sano, S., Takeda, J., Yoshikawa, K. and Itami, S. (2001). "Tissue regeneration: hair follicle as a model." *J Invest Dermatol Symp Proc* 6(1): 43-8.
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S. and Michalides, R.J. (1993). "The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites." *Mol Cell Biol* 13(5): 2891-98.
- Semprini, S., Capon, F., Tacconelli, A., Giardina, E., Orecchia, A., Mingarelli, R., Gobello, T., Zambruno, G., Botta, A., Fabrizi, G. and Novelli, G. (2002). "Evidence for differential S100 gene over-expression in psoriatic patients from genetically heterogeneous pedigrees." *Hum Genet* 111(4-5): 310-3.
- Spiess, C., Beil, A. and Ehrmann, M. (1999). "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein." *Cell* 97(3): 339-47.
- Srinivasula, S.M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (2003). "Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2." *J Biol Chem* 278(34): 31469-72.
- Stewart, S.A., Poon, B., Song, J.Y. and Chen, I.S. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation." *J Virol* 74(7): 3105-11.

- Suzuki, Y., Demoliere, C., Kitamura, D., Takeshita, H., Deuschle, U. and Watanabe, T. (1997). "HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases." *J Immunol* 158(6): 2736-44.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. and Takahashi, R. (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." *Mol Cell* 8(3): 613-21.
- Takeda, J., Sano, S., Tarutani, M., Umeda, J. and Kondoh, G. (2000). "Conditional gene targeting and its application in the skin." *J Dermatol Sci* 23(3): 147-54.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S.C. and Zhan, X. (2001). "Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin." *Nat Cell Biol* 3(3): 259-66.
- Uruno, T., Zhang, P., Liu, J., Hao, J.J. and Zhan, X. (2003). "Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization." *Biochem J* 371(Pt 2): 485-93.
- Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W. (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." *Anat Histol Embryol* 31(4): 214-23.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." *J Biol Chem* 277(1): 445-54.
- Weaver, A.M., Heuser, J.E., Karginov, A.V., Lee, W.L., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2002). "Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex." *Curr Biol* 12(15): 1270-8.
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2001). "Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation." *Curr Biol* 11(5): 370-4.
- Weed, S.A., Du, Y. and Parsons, J.T. (1998). "Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1." *J Cell Sci* 111 (Pt 16): 2433-43.
- Weed, S.A., Karginov, A.V., Schafer, D.A., Weaver, A.M., Kinley, A.W., Cooper, J.A. and Parsons, J.T. (2000). "Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex." *J Cell Biol* 151(1): 29-40.
- Weed, S.A. and Parsons, J.T. (2001). "Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly." *Oncogene* 20(44): 6418-34.
- Wolf, R., Mirmohammadsadegh, A., Walz, M., Lysa, B., Tartler, U., Remus, R., Hengge, U., Michel, G. and Ruzicka, T. (2003). "Molecular cloning and

- characterization of alternatively spliced mRNA isoforms from psoriatic skin encoding a novel member of the S100 family." *Faseb J* 17(13): 1969-71.
- Wu, H. and Montone, K.T. (1998). "Cortactin localization in actin-containing adult and fetal tissues." *J Histochem Cytochem* 46(10): 1189-91.
- Wu, H., Reynolds, A.B., Kanner, S.B., Vines, R.R. and Parsons, J.T. (1991). "Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate." *Mol Cell Biol* 11(10): 5113-24.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. and Wang, X. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." *Science* 275(5303): 1129-32.
- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L. and Du, C. (2003). "Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis." *Genes Dev* 17(12): 1487-96.
- Yang, Z., Yan, W.X., Cai, H., Tedla, N., Armishaw, C., Di Girolamo, N., Wang, H.W., Hampartzoumian, T., Simpson, J.L., Gibson, P.G., Hunt, J., Hart, P., Hughes, J.M., Perry, M.A., Alewood, P.F. and Geczy, C.L. (2007). "S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity." *J Allergy Clin Immunol* 119(1): 106-14.
- Yao, X.J., Mouland, A.J., Subbramanian, R.A., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D. and Cohen, E.A. (1998). "Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells." *J Virol* 72(6): 4686-93.
- Yedavalli, V.S., Shih, H.M., Chiang, Y.P., Lu, C.Y., Chang, L.Y., Chen, M.Y., Chuang, C.Y., Dayton, A.I., Jeang, K.T. and Huang, L.M. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1." *J Virol* 79(21): 13735-46.
- Yin, H., Morioka, H., Towle, C.A., Vidal, M., Watanabe, T. and Weissbach, L. (2001). "Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein." *Cytokine* 15(3): 122-37.
- Yuspa, S.H., Hawley-Nelson, P., Koehler, B. and Stanley, J.R. (1980). "A survey of transformation markers in differentiating epidermal cell lines in culture." *Cancer Res* 40(12): 4694-703.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell* 90(3): 405-13.
- Zumbrunn, J. and Trueb, B. (1996). "Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins." *FEBS Lett* 398(2-3): 187-92.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATCC	„American Type Cell Culture“
Beq	Bequerel
bp	Basenpaare
CD	“cluster of differentiation”, Zelloberflächenmarker
Cdc	“Cell division cycle”, Bezeichnung für Proteine, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle haben
cDNA	“copy DNA”, kodierte DNA-Sequenz aus mRNA über reverse Transkription
CY	Cyaninfarbstoff
D	L-Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DDRT	“differential display reverse transcription“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
FCS	Fötales Kälberserum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanidintriphosphat
Glu	L-Glutaminsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAPK	„mitogen activated protein kinase“
MEM	Modifiziertes Eagles Medium
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger-RNA“, Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
PBS	„Phosphate-buffered saline“, phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Val	L-Valin
W	L-Tryptophan
WT	Wildtyp

Danksagung

Prof. Dr. Bernhard Homey danke ich ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit und seine großzügige Unterstützung.

Prof. Dr. Joachim Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die Betreuung der Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Prof. Dr. Dr. hc Thomas Ruzicka danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Ich danke PD Dr. Anna von Mikecz und ihrer Mitarbeiterin Min Chen für die Unterstützung bei den Experimenten der indirekten Immunfluoreszenz sowie den anregenden Diskussionen.

Dr. Matilda Bylaite danke ich für die Hilfe bei der Immunhistochemie und den Einblicken in die Dermatologie.

Ich danke den Mitarbeitern des Zytokinlabors, Dr. Amanda Büchau, Sabine Kellermann, Dr. Gabriela Kukova, Dr. Virginia Lewerenz, Dr. Ronald Wolf und Dr. Markus Walz für die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei allen Problemen im Laboralltag.

Außerdem danke ich Erich Bünemann für die Unterstützung bei den *in vitro* Wundheilungsassays sowie Dr. Arne Gerber und Dr. Stefan Meller für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Auch den anderen Mitarbeitern des Forschungslabors für Dermato-Immunologie und Onkologie danke ich für die immer freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Sandeep Nambiar danke ich für die vielen biologischen und nicht-biologischen Diskussionen und seiner Unterstützung in allen Belangen der englischen Sprache.

Dr. Alexandra Offermanns danke ich für die Korrekturlesung der Arbeit.

Und natürlich danke ich auch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit niemals entstanden wäre.