

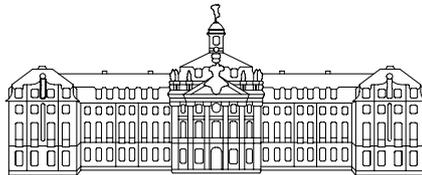
Kerstin Brands

**Analyse der Funktion des Zelloberflächen-Rezeptors Syndecan-4
bei der Wundheilung**

- 2004 -

Biologie

**Analyse der Funktion des Zelloberflächen-Rezeptors
Syndecan-4 bei der Wundheilung**



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Kerstin Brands
aus Stadtlohn

- 2004 -

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster in der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Echtermeyer angefertigt.

Direktor: Prof. Dr. P. Bruckner

Die Arbeit wurde betreut durch Prof. Dr. M. Bähler, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Prof. A. Steinbüchel

1.Gutachter: Prof. Dr. M. Bähler

2.Gutachter: Prof. Dr. P. Bruckner

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2005

Tag der Promotion: 25.02.2005

*„Den Menschen hungert nach Wissen,
aber was ist es? Ein Bissen
Irrtum in Ahnung getunkt,
niemals ein Punkt,
immer ein Fragezeichen.“*

L. M. Beck & H. v. Cube

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Heilung einer Hautwunde	1
1.2 Syndecane und Wundheilung	4
1.2.1 Expression der Syndecane während der Heilung einer Hautwunde.....	4
1.2.2 Wundheilungsdefekte von Syndecan Knockout Mäusen	5
1.3 Fokale Kontakte	6
1.4 Die Familie der Syndecane	8
1.5 Syndecan-4	10
1.5.1 Syndecan-4 in fokalen Kontakten	11
1.5.2 Durch Syndecan-4 beeinflusste Signaltransduktionsvorgänge.....	14
1.6 Signaltransduktion durch den Wachstumsfaktor TGF-β1	15
1.7 Signaltransduktion durch die Mitogen aktivierten Protein Kinasen	17
2 Zielsetzung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte	21
3.1.1.1 Allgemeine Reagenzien.....	21
3.1.1.2 Enzyme	21
3.1.1.3 Standards und Marker.....	21
3.1.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur.....	22
3.1.1.5 Primer für die Typisierung von Syndecan-4 Knockout Mäusen.....	22
3.1.1.6 Vektoren	22
3.1.1.7 Bakterienstämme	23
3.1.1.8 Geräte	23
3.1.2 Antikörper.....	24

3.1.2.1	Primäre Antikörper	24
3.1.2.2	Sekundäre Antikörper für Western Blots	25
3.1.2.3	Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Untersuchungen.....	25
3.1.3	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	25
3.1.3.1	Standardpuffer	25
3.2	Methoden	26
3.2.1	Zellbiologische Methoden	26
3.2.1.1	Zellkulturbedingungen	26
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	26
3.2.1.3	Isolierung primärer Hautfibroblasten	27
3.2.1.4	Immortalisierung von primären Hautfibroblasten	28
3.2.1.5	<i>In Vitro</i> Wundheilungsassay (Scratch-Assay).....	28
3.2.1.6	Immunfluoreszenzfärbung für die mikroskopische Analyse.....	29
3.2.1.7	Isolierung von Kollagen aus Rattenschwänzen.....	30
3.2.1.8	Kollagen-Gel-Kontraktionsassay.....	30
3.2.1.9	Immunfluoreszenzfärbung zur Anfärbung von Kollagen-Gelen.....	31
3.2.1.10	Aktivierung von Zellen mit TGF- β 1	32
3.2.1.11	Aktivierung von Zellen mit TGF- β 1 im serumfreien Zellkultursystem zur Untersuchung der α -smooth-muscle Aktin Expression	33
3.2.1.12	Proliferations-Assay	33
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	34
3.2.2.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen.....	34
3.2.2.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen in Kollagen-Gelen.....	34
3.2.2.3	Herstellung von Zytoplasma- und Nukleus-Extrakten	35
3.2.2.4	Proteinbestimmung nach Lowry.....	36
3.2.2.5	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
3.2.2.6	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	38
3.2.2.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	38
3.2.2.8	Immunologischer Nachweis von phosphorylierten Proteinen.....	39
3.2.2.9	Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	40
3.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	40

3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
3.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Untersuchungen zu den möglichen zellulären Ursachen der reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe in Syndecan-4 Knockout Mäusen	43
4.1.1	Vergleich der Wanderungskapazität der Fibroblasten.....	43
4.1.2	Vergleich der Proliferationsrate.....	46
4.2	Untersuchungen zu den möglichen zellulären Ursachen der fehlenden Wundkontraktion in Syndecan-4 Knockout Mäusen	48
4.2.1	Die Kontraktionsfähigkeit von Hautfibroblasten	48
4.2.2	Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten	50
4.2.2.1	Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur Myofibroblasten-Differenzierung in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten	51
4.2.2.2	Western Blot Analyse zur TGF- β 1 induzierten Expression von α -SMA	53
4.2.2.3	Untersuchung der Myofibroblasten-Differenzierung von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten in einem serumfreien Zellkultursystem	55
4.2.2.3.1	Herstellung von immortalisierten Fibroblasten	55
4.2.2.3.2	TGF- β 1 induzierte Expression von α -SMA in einem serumfreien Zellkultursystem	56
4.3	Untersuchungen zur TGF-β1 Signaltransduktion in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten	58
4.3.1	Die Aktivierung der Smad-Proteine durch TGF- β 1	59
4.3.2	Die Beteiligung der MAP Kinasen an der Signaltransduktion von TGF- β 1.....	62
4.3.2.1	Aktivierung der p38 MAP Kinase durch TGF- β 1	63
4.3.2.2	Aktivierung der JNK1/2 MAP Kinasen durch TGF- β 1	64
4.3.2.3	Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen durch TGF- β 1	66
4.4	Fokale Kontakte in Syndecan-4 defizienten Zellen	68
4.4.1	Die Lokalisation von Vinculin in fokalen Kontakten.....	68
4.4.2	Die Lokalisation von Paxillin in fokalen Kontakten	70

4.4.3	Die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK)	72
4.4.4	Die Lokalisation von Syndecan-2 in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten.....	75
5	Diskussion	77
5.1	Zelluläre Ursachen der reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe in Wunden von Syndecan-4 Knockout Mäusen	77
5.1.1	Veränderungen in der Morphologie und Signalfunktion fokaler Kontakte führen zu einer reduzierten Migrationsfähigkeit von Syndecan-4 -/- Fibroblasten	77
5.1.2	Die Proliferation von Fibroblasten ist durch das Fehlen von Syndecan-4 nicht beeinträchtigt	80
5.2	Zelluläre Ursachen für die reduzierte Wundkontraktion in Syndecan-4 Knockout Mäusen	82
5.2.1	Syndecan-4 Knockout Fibroblasten weisen reduzierte kontraktile Fähigkeiten und eine verminderte Differenzierung zu Myofibroblasten in Antwort auf den Wachstumsfaktor TGF- β 1 auf.....	82
5.2.2	Unterschiede in der TGF- β 1 induzierten Aktivierung der MAP Kinasen in Syndecan-4 -/- Fibroblasten könnten zu der reduzierten Kontraktionsfähigkeit und Myofibroblasten-Differenzierung führen	85
6	Zusammenfassung	89
	Literaturverzeichnis	91
	Lebenslauf	102
	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
% (v/v)	Volumenprozent (volume/volume)
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight/volume)
μ	Mikro
α-SMA	alpha-smooth-muscle Aktin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase
et. al.	und andere
FAK	fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FKS	Fötale Kälberserum
GAG	Glycosaminoglycan
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IF	Immunfluoreszenz
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
IL1	Interleukin-1
ITS-Medium	Insulin-Transferrin-Selenium-Medium
JNK	c-jun N-terminal phosphorylierende Kinase

kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPA	Lyophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mA	Milliampère
MAP Kinase	Mitogene aktivierte Protein Kinase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
p-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Sdc-4	Syndecan-4
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurea
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Heilung einer Hautwunde

Bei der Heilung einer Wunde können drei Phasen unterschieden werden, die z. T. zeitlich parallel ablaufen und ineinander übergreifen: eine inflammatorische, eine proliferative und eine regenerative Phase.

Die inflammatorische Phase beginnt unmittelbar nach einer Verletzung mit der Bildung eines Wundschorfs. Es fließt Blut in die Wunde, wo es in Folge der Gerinnungskaskade koaguliert und so die Wunde mit einem provisorischen Wundschorf ausfüllt. Dieser Wundpfropf besteht aus einem Netz aus Fibrin-Fibrillen, Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin, in das Thrombozyten und rote Blutkörperchen eingebettet sind (Clark 1993). Er bildet einen provisorischen Wundverschluss und dient den in nachfolgenden Prozessen in die Wunde einwandernden Zellen als Matrix. Die aktivierten Thrombozyten im Wundschorf stellen die primäre Quelle für Wachstumsfaktoren und Zytokine dar, die den weiteren Verlauf der Wundheilung bestimmen (Werner & Grose 2003).

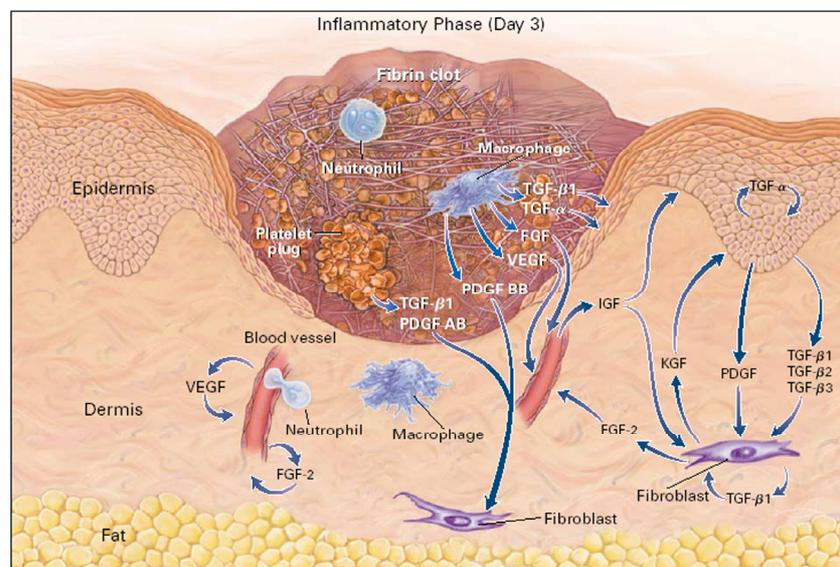


Abbildung 1.1: Die inflammatorische Phase der Wundheilung

Dargestellt ist der Wundpfropf mit den Thrombozyten sowie den weiteren an der inflammatorischen Phase beteiligten Zellen. Zusätzlich sind an der Wundheilung beteiligte Wachstumsfaktoren, ihre jeweilige Quelle (ausgehende Pfeile \curvearrowright) sowie ihr Wirkungsort (eingehende Pfeile \curvearrowleft) eingezeichnet (Singer & Clark 1999).

Diese von den Thrombozyten freigesetzten Faktoren, u. a. PDGF und TGF- β 1, wirken chemotaktisch auf Entzündungszellen, die so in die Wunde rekrutiert werden (Singer & Clark 1999). Dort dienen sie der Säuberung der Wunde, indem sie eingedrungene Bakterien, aber auch Zell- und Gewebereste, phagozytieren. Eine weitere wichtige Funktion der Entzündungszellen, insbesondere der Makrophagen, ist die Ausschüttung von weiteren wichtigen Mediatoren und Wachstumsfaktoren, die die nachfolgende proliferative und regenerative Phase steuern (Singer & Clark 1999; Bennett & Schultz 1993).

Die proliferative Phase der Wundheilung ist durch die Reepithelialisierung und die Bildung von Granulationsgewebe gekennzeichnet. Diese Prozesse laufen nahezu parallel zueinander ab.

Die basalen Keratinozyten der Wundränder beginnen, aktiviert durch die Wachstumsfaktoren EGF, TGF- α und KGF, zu proliferieren und durch die provisorische Matrix des Wundschorfes über die Wundfläche zu wandern. In migrierenden Keratinozyten wird die Synthese von bestimmten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gesteigert, die die Matrix des Wundschorfs verdauen, durch den die Keratinozyten wandern (siehe Abbildung 1.2). Der Endpunkt der Reepithelialisierung ist erreicht, wenn die Wundfläche mit einer einzelligen Schicht von basalen Keratinozyten bedeckt ist. Anschließend erfolgt die Bildung von neuem stratifizierten Epithel mit unterliegender Basalmembran (Martin 1997).

Gleichzeitig mit den Keratinozyten beginnen auch die Fibroblasten der Wundränder sich zu teilen und in das Wundgebiet einzuwandern. Die Proliferation und Migration der Fibroblasten werden insbesondere von den Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β 1 und FGF angeregt (Schaffer & Becker 1999). Im Wundbereich beginnen die eingewanderten Fibroblasten vermehrt Matrixproteine, wie z. B. Kollagen I und Kollagen III, zu synthetisieren. Dieses neu entstehende Bindegewebe ersetzt die provisorische Matrix des Wundschorfs. Gleichzeitig mit der Entstehung neuen Bindegewebes setzt die Neovaskularisation ein. Hauptsächlich durch Einsprossung bestehender Blutgefäße der Wundränder entstehen zahlreiche neue Blutgefäße im Wundbereich. Dieses von zahlreichen Blutgefäßen durchzogene und fibroblastenreiche neue Bindegewebe bezeichnet man als Granulationsgewebe.

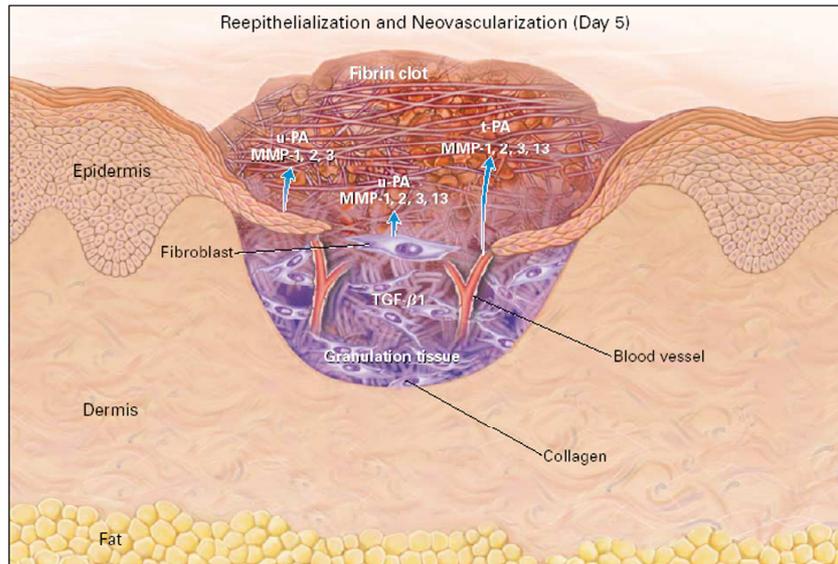


Abbildung 1.2: Die proliferative Phase der Wundheilung

Die Wunde wird durch Einwanderung von Keratinozyten mit einer neuen Epidermis überzogen. Im Granulationsgewebe der Wunde befinden sich zahlreiche Fibroblasten sowie neue Blutgefäße (Singer & Clark 1999).

Während der regenerativen Phase kommt es zur Wundkontraktion und Regeneration des Bindegewebes.

Die Kontraktion einer Wunde geht hauptsächlich von einem bestimmten Zelltyp, den so genannten Myofibroblasten, aus (Gabbiani *et al.* 1971). Die Fibroblasten im Granulationsgewebe differenzieren, hauptsächlich unter dem Einfluss von TGF-β1, zu Myofibroblasten. Diese spezialisierten Fibroblasten zeichnen sich durch eine *de novo* Synthese von α -smooth-muscle Aktin aus (Darby *et al.* 1990; Skalli *et al.* 1986), der Aktin-Isoform der glatten Muskelzellen. Das α -smooth-muscle Aktin wird in das Zytoskelett der Zellen integriert, was ihnen kontraktile Fähigkeiten verleiht. Weiterhin besitzen Myofibroblasten ausgeprägte Zell-Matrix Verbindungen (Fibronexus), die es diesem Zelltyp ermöglichen, Zugkräfte auf die ihn umgebende Extrazellulärmatrix auszuüben und so die Wunde zu kontrahieren (Baur, Jr. & Parks 1983).

Das kontrahierte Granulationsgewebe bildet sich in Narbengewebe um, und die Zahl der Fibroblasten und Myofibroblasten im Wundbereich nimmt, bedingt durch Apoptose, ab. Die Umgestaltung und Reifung des Narbengewebes kann sich über Monate hinziehen, wobei die ursprüngliche Struktur und Reißfestigkeit der Haut nie zu 100 % wiederhergestellt werden kann.

1.2 Syndecane und Wundheilung

Heparansulfat-Proteoglykane, zu denen die Syndecane gehören, sind in der Lage, eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden (Rapraeger 1993; Ruoslahti & Yamaguchi 1991). Da all diese Faktoren eine Rolle bei der Wundheilung spielen, wurde postuliert, dass die Syndecane ebenfalls in diesen Prozess involviert sind (Gallo *et al.* 1996).

1.2.1 Expression der Syndecane während der Heilung einer Hautwunde

Gallo *et al.* (1996) untersuchten die Expression aller vier Syndecane in unverletzter muriner und humaner Haut und in Hautwunden. In unverwundeter Maushaut werden die Syndecane-1 und -4 exprimiert, während Syndecan-2 und -3 nicht nachgewiesen werden können. Syndecan-1 wird in normaler Haut von epidermalen Keratinozyten und epithelialen Haarfollikelzellen exprimiert. Endothelzellen sowie dermale Fibroblasten dagegen zeigen keine Syndecan-1 Expression (Hayashi *et al.* 1987). Syndecan-4 wird in unverletzter muriner Haut ausschließlich in der Epidermis gebildet. Dasselbe Expressionsmuster der Syndecane zeigt sich auch in normaler humaner Haut (Gallo *et al.* 1996; Lundqvist & Schmidtchen 2001).

In Hautwunden von Mäusen werden sowohl die Expression von Syndecan-1 als auch die Expression von Syndecan-4 deutlich erhöht, wohingegen Syndecan-2 und -3 nicht induziert werden. Syndecan-1 wird spezifisch in Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße im Granulationsgewebe der Wunden induziert. Diese spezifische Induktion von Syndecan-1 ist transient und zeigt sich zwischen dem 3. und 10. Tag der Wundheilung. Zudem wird Syndecan-1 verstärkt von proliferierenden und migrierenden Keratinozyten exprimiert (Elenius *et al.* 1991; Gallo *et al.* 1996). Auch Syndecan-4 wird nach Verwundung in den basalen Keratinozyten der hyperproliferativen Epidermis vermehrt gebildet. Eine starke Induktion der Syndecan-4 Expression zeigt sich auch im Granulationsgewebe der Wunde. Im Gegensatz zu Syndecan-1, das spezifisch in Endothelzellen induziert wird, wird Syndecan-4 sowohl von Endothelzellen als auch von Fibroblasten in der gesamten Dermis an den Wundrändern und im Granulationsgewebe exprimiert. Dabei ist der Verlauf der Syndecan-4 Expression ebenfalls transient und beginnt ca. 12 Stunden nach der Verwundung der Haut mit der höchsten Expression am 3. Tag der Wundheilung. Nach ca. 10 Tagen klingt die Expression von Syndecan-4 in den Wunden wieder ab. Insgesamt ist die Erhöhung der Expression von Syndecan-4 während

der Wundheilung deutlich höher als die der Syndecan-1 Expression. Auch während der Wundheilung sind diese Expressionsmuster der beiden Syndecane in der humanen Haut sehr ähnlich.

1.2.2 Wundheilungsdefekte von Syndecan Knockout Mäusen

Um die Funktion der Syndecane während der Wundheilung genauer untersuchen zu können, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen sowohl Syndecan-1 (Kato *et al.* 1995; Stepp *et al.* 2002) als auch Syndecan-4 (Echtermeyer *et al.* 2001; Ishiguro *et al.* 2000) Knockout Mäuse hergestellt. Sowohl Syndecan-1 als auch Syndecan-4 Knockout Mäuse sind äußerlich unauffällig und entwickeln und reproduzieren sich normal. In Wundheilungsexperimenten stellte sich jedoch heraus, dass sowohl Syndecan-1 als auch Syndecan-4 defiziente Mäuse Probleme bei der Heilung von Hautwunden aufweisen.

Sowohl Syndecan-4 heterozygote Mäuse als auch Syndecan-4 Knockout Mäuse zeigen eine deutlich verlangsamte Wundheilung zwischen dem dritten und dem sechsten Tag nach Wundsetzung. Am dritten Tag der Wundheilung hat sich in Wildtyp Mäusen bereits ein gut ausgebildetes Granulationsgewebe unter der Wunde und an den Wundrändern gebildet. Weiterhin sind die Wunden der Wildtyp Mäuse zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich kontrahiert. Im Gegensatz dazu zeigen die Wunden der Syndecan-4 heterozygoten und Knockout Mäuse nach drei Tagen eine deutlich geringere Kontraktion. Auch hat sich zu diesem Zeitpunkt lediglich eine sehr dünne Schicht Granulationsgewebe unter der Wunde gebildet. An den Wundrändern fehlt das Granulationsgewebe völlig. Diese Unterschiede in der Bildung von Granulationsgewebe sind am siebten Tag der Wundheilung nicht mehr vorhanden, und nach neun Tagen sind die Wunden von Wildtyp Mäusen und Syndecan-4 defizienten Mäusen gleichermaßen kontrahiert. Die Kontraktion und Akkumulation von Granulationsgewebe in Syndecan-4 heterozygoten und Knockout Wunden ist demnach vor allem während der ersten Tage der Wundheilung deutlich reduziert. Die Reepithelialisierung der Syndecan-4 defizienten Tiere läuft hingegen normal ab (Echtermeyer *et al.* 2001).

Im Gegensatz zu Syndecan-4 heterozygoten und Knockout Mäusen zeigen die Syndecan-1 Knockout Mäuse vor allem Probleme bei der Reepithelialisierung der Wunden und der anschließenden Stratifizierung der Epidermis. Diese Wundheilungsprobleme resultieren aus Defekten in der Aktivierung der Keratinozyten nach Verwundung. Syndecan-1

Knockout Mäuse zeigen keine Unterschiede in der Kontraktion der Wunden oder in der Bildung von Granulationsgewebe (Stepp *et al.* 2002).

Die starke Induktion von Syndecan-4 in Hautwunden und die deutlich verzögerte Wundheilung in Syndecan-4 Knockout Mäusen lassen vermuten, dass neben Syndecan-1 vor allem Syndecan-4 am Prozess der Wundheilung beteiligt ist. Durch welche zellulären Prozesse Syndecan-4 dabei die Heilung von Wunden beeinflusst, ist bisher jedoch noch völlig unbekannt.

Wie bereits beschrieben, ist die Migration von Zellen ein essentieller Vorgang während der Wundheilung. Voraussetzung für die Migration wiederum ist die Anheftung der Zellen an ihre umgebende Matrix durch Zell-Matrix Adhäsionen, ein Prozess, in den Syndecan-4 involviert ist und der aus diesem Grund im folgenden Abschnitt näher erklärt werden soll.

1.3 Fokale Kontakte

Als fokale Kontakte bezeichnet man Anheftungspunkte von Zellen mit der darunterliegenden Matrix. Fokale Kontakte werden ausschließlich von Zellen gebildet, die in Zellkultur gehalten werden. Es gibt jedoch vergleichbare Strukturen *in vivo*, wie z. B. die Anheftungspunkte von Myofibroblasten im Granulationsgewebe an ihre umgebende Matrix, die man Fibronexus nennt (Tomasek *et al.* 2002). Die Untersuchung von fokalen Kontakten in Zellkultur lässt Rückschlüsse auf die Funktion solcher Strukturen *in vivo* zu.

Fokale Kontakte sind makromolekulare Komplexe aus Zelloberflächen-Rezeptoren und einer Vielzahl von Struktur- und Signalproteinen, die eine enge Verbindung von adhären Zellen zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett herstellen. An diesen Stellen enden die aus Aktinfilamenten bestehenden Stressfasern an der Plasmamembran, wo sie durch Adhäsionsproteine mit Molekülen der extrazellulären Matrix, z. B. Fibronectin, verknüpft werden. Dieses ermöglicht den Zellen, sich an der umgebenden Matrix anzuheften, Zugkräfte auf sie auszuüben und auf der Matrix zu wandern. Neben ihrer Funktion als Verankerungspunkte der Zellen spielen fokale Kontakte auch eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsvorgängen (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka 1996).

Die wichtigsten Rezeptoren für Zell-Matrix Verbindungen sind die Integrine. Die Familie der Integrine besteht aus heterodimeren Rezeptoren, die aus je einer membrandurchspannenden α - und β -Untereinheit mit großen extrazellulären Domänen und kurzen zytoplasmatischen Domänen bestehen. Derzeit sind 8 unterschiedliche

β -Untereinheiten und 18 unterschiedliche α -Untereinheiten bekannt, deren Kombinationen eine Vielzahl verschiedener Integrin-Moleküle bilden können (van der Flier & Sonnenberg 2001). Die wichtigsten Integrin-Rezeptoren in fokalen Kontakten sind $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ Integrin. Die Bindung von Integrinen an Proteine der extrazellulären Matrix bewirkt die Zusammenlagerung mehrere Integrin-Moleküle und als Folge die Aktivierung dieser Integrine. Dies induziert die Rekrutierung weiterer Struktur- und Signalproteine in die neu gebildeten fokalen Kontakte (Hynes 1999). Die Strukturproteine, wie Vinculin, Talin, Paxillin oder α -Actinin, zeichnen sich dadurch aus, dass sie verschiedene Bindungsstellen für Aktin, Zellrezeptoren, andere Struktur- aber auch Signalproteine besitzen und so ein komplexes Molekülgerüst bilden können (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka 1996). Vinculin, eines der häufigsten Proteine in fokalen Kontakten, weist u. a. Bindungsstellen für Talin, Paxillin, α -Actinin und Aktin (Zamir & Geiger 2001) auf und dient, wie viele Strukturproteine in fokalen Kontakten dazu, eine Verknüpfung zwischen den Integrinen und den Aktin-Stressfasern zu bilden. Das durch diese Strukturproteine entstehende „Grundgerüst“ stabilisiert die feste Verankerung der Aktinfilamente an der Membran, was die Voraussetzung für die Ausübung von Zugkräften auf die Zelle ist, die z. B. bei der Wanderung von Zellen entstehen.

Neben diesen Strukturproteinen kommen in fokalen Kontakten auch eine Reihe von Signalproteinen vor, von denen die fokale Adhäsionskinase (FAK) eine zentrale Rolle einnimmt. Diese Tyrosinkinase wird durch die Zusammenlagerung und Aktivierung der Integrin-Moleküle zu den entstehenden fokalen Kontakten rekrutiert (Kornberg *et al.* 1992; Schaller & Parsons 1993). Die Bindung der FAK an Integrine bewirkt die Autophosphorylierung der Kinase am Tyrosinrest 397, eine Voraussetzung für die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (Schaller *et al.* 1994). Die aktive fokale Adhäsionskinase phosphoryliert eine Reihe von Proteinen, die in fokalen Kontakten lokalisiert sind, kann aber auch die Aktivierung intrazellulärer Signalproteine, wie z. B. die MAP Kinasen auslösen (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka 1996). Die FAK beeinflusst wichtige zelluläre Prozesse wie Wachstum, Wanderung und Differenzierung von Zellen (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka 1996).

Neben den Integrinen spielt ein weiterer Zelloberflächen-Rezeptor bei der Ausbildung fokaler Kontakte eine Rolle. Es stellte sich heraus, dass das Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-4 ebenfalls zur Funktion von fokalen Kontakten beiträgt (Woods & Couchman 1994; Woods *et al.* 2000; Saoncella *et al.* 1999; Baciú & Goetinck 1995).

1.4 Die Familie der Syndecane

Die Familie der Syndecane umfasst in Säugern vier homologe Mitglieder, Syndecan-1, -2, -3 und -4, während *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* nur jeweils ein Syndecan besitzen.

Praktisch jeder Zelltyp exprimiert mindestens ein Syndecan, wobei Syndecan-1 das vorherrschende Syndecan der Epithelzellen und Syndecan-2 das der Fibroblasten ist. Syndecan-3 ist fast ausschließlich auf neuronales Gewebe beschränkt. Syndecan-4 wird im Gegensatz dazu von einer Vielzahl verschiedener Zellen wie z. B. Neuronzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Fettzellen und Fibroblasten, jedoch meist nur in geringen Mengen exprimiert (Kim *et al.* 1994). Die Expression der Syndecane unterliegt besonders während der Embryonal- und Organentwicklung und während pathophysiologischer Vorgänge wie z. B. Wundheilung, Nierenerkrankungen oder Tumorentwicklung, einer ausgeprägten Regulation.

Die Syndecane sind an einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse wie z. B. der Adhäsion und der Wanderung von Zellen, der Zelldifferenzierung oder der Proliferation, beteiligt. Sie spielen eine Rolle als Korezeptoren für primäre Zelloberflächen-Rezeptoren und sind so an der Übertragung zahlreicher Signale beteiligt. Viele dieser Funktionen werden dabei von den Glykosaminoglykan-Ketten vermittelt. Durch sie sind die Syndecane in der Lage, eine Reihe heparinbindende Wachstumsfaktoren wie z. B. die FGF Familie, HGF oder PDGF, zu binden und dadurch die Konzentration der Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche lokal zu erhöhen und ihre Wirkung zu modulieren (Park *et al.* 2000). Darüber hinaus können die Syndecane über ihre GAG-Ketten, aber auch zahlreiche Matrixliganden, wie z. B. Fibronectin, Vitronectin, Laminine und fibrilläre Kollagene, binden.

Alle Syndecane sind transmembrane Heparansulfat-Proteoglykane, die aus einem Core-Protein aufgebaut sind, an das eine oder mehrere Glykosaminoglykan-Ketten angeheftet sind. Glykosaminoglykan-Ketten, auch GAG-Ketten genannt, sind unverzweigte Polysaccharid-Ketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, wobei einer der beiden Zuckerreste immer ein Aminozucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin), der zweite Zucker meist eine Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) ist. Je nach Zuckerart und Sulfatierung der Zuckerreste teilt man die Glykosaminoglykane in Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat ein.

Die Glykosaminoglykan-Ketten der Syndecane-2 und -4 sind ausschließlich vom Heparansulfat-Typ, während Syndecan-1 und -3 neben Heparansulfat-Ketten auch Chondroitinsulfat-Ketten tragen können (Rapraeger *et al.* 1985; Kokenyesi & Bernfield 1994).

Die Core-Proteine der Syndecane sind in eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine membrandurchspannende Domäne und eine relativ lange extrazelluläre Domäne, an der die Glykosaminoglykan-Ketten angeheftet sind, unterteilt.

Die extrazellulären Domänen der vier Syndecane weisen, bis auf die konservierten GAG-Anheftungsstellen, wenige Homologien auf. Im Gegensatz dazu sind die kurzen transmembranen und zytoplasmatischen Domänen hochkonserviert. Die transmembrane Domäne besteht aus einer einzigen membrandurchspannenden, hydrophoben Helix. Die Syndecane besitzen die Eigenschaft, Dimere oder Oligomere zu bilden und man nimmt an, dass die Oligomerisierung die Funktion der Syndecane entscheidend beeinflusst (Zimmermann & David 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die transmembrane Domäne der Syndecane diese Oligomerisierung vermittelt.

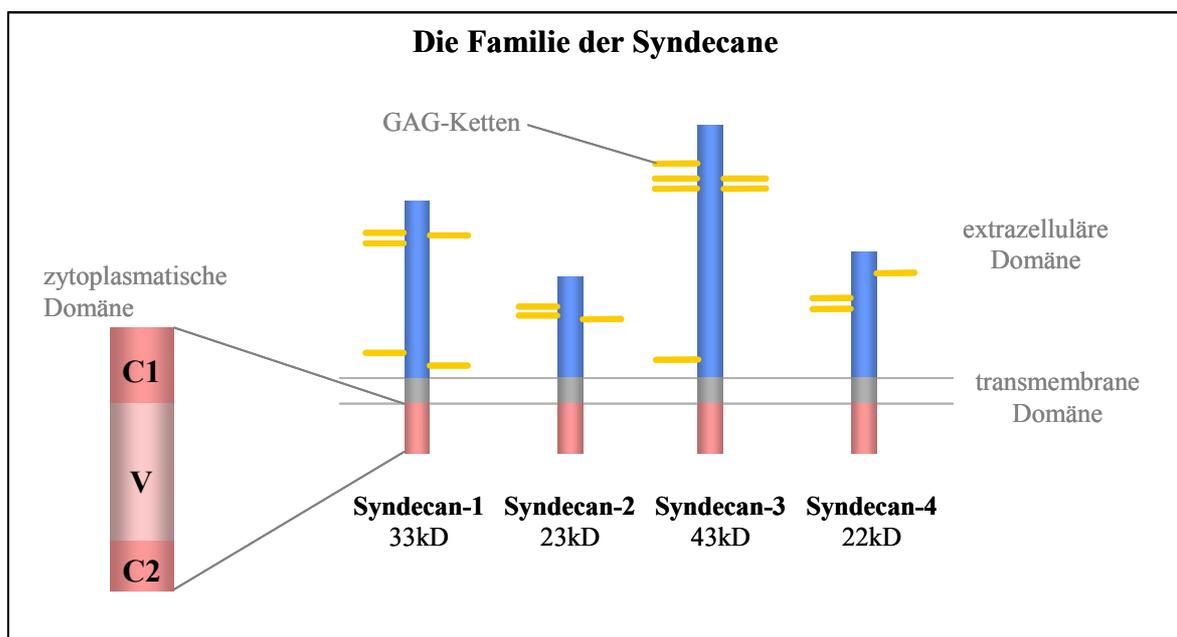


Abbildung 1.3: Die Struktur der vier Syndecane

Alle vier Syndecane besitzen eine relativ lange extrazelluläre Domäne, an der die GAG-Ketten angeheftet sind und eine kurze transmembrane und zytoplasmatische Domäne. Die zytoplasmatische Domäne kann wiederum in zwei hochkonservierte Bereiche (C1 und C2) und eine variable Sequenz (V) unterteilt werden (siehe Ausschnitt).

Die zytoplasmatische Domäne der Syndecane ist unterteilt in zwei homologe Bereiche (C1 und C2), die einen Bereich mit variablen Sequenzen (V) flankieren (siehe Abbildung 1.3). Die Sequenz des 13 Aminosäuren langen Segments C1, das an die transmembrane Domäne anschließt, ist in allen Syndecanen nahezu identisch. Die Funktion dieser Region ist jedoch weitgehend unbekannt. Ebenfalls in allen Syndecanen konserviert ist die Tetrapeptid-Sequenz EFYA (C2) am C-terminalen Ende des Core-Proteins, die ein typisches Sequenzmotiv für die Bindung von PDZ-Domänen darstellt. Proteine mit PDZ-Domänen dienen meist als molekulare Brücken, die mit Hilfe mehrerer PDZ-Domänen Protein-Bindungspartner verbinden.

Die von diesen hochkonservierten Bereichen flankierte variable Sequenz der zytoplasmatischen Domäne ist in allen Syndecanen unterschiedlich. Diese variablen Sequenzen tragen vermutlich zu den spezifischen Eigenschaften der einzelnen Syndecane bei.

1.5 Syndecan-4

Obwohl Syndecan-4 von den meisten Zellarten und in den meisten Geweben exprimiert wird, sind seine genauen physiologischen Funktionen noch wenig bekannt (David *et al.* 1992; Kim *et al.* 1994; Rioux *et al.* 2002). Durch verschiedene Ansätze hat man versucht, mehr über die Funktion von Syndecan-4 zu erfahren.

Zum einen wurde die Expression von Syndecan-4 *in vivo* untersucht. Dabei hat man festgestellt, dass Syndecan-4 bei einer Reihe von pathophysiologischen Vorgängen in den entsprechenden Geweben stark hochreguliert wird. So ist die Syndecan-4 Expression u. a. nach einem Herzinfarkt im betroffenen Herzgewebe, während einer Nierenerkrankung, der so genannten IgA Nephropathie und, wie bereits beschrieben (siehe 1.2.1), in Hautwunden erhöht (Kojima *et al.* 2001; Zhang *et al.* 1999).

Ein weiterer Ansatz, um die Funktion von Syndecan-4 zu untersuchen, war die Herstellung von Syndecan-4 Knockout Mäusen (Echtermeyer *et al.* 2001; Ishiguro *et al.* 2000). Syndecan-4 *-/-* Mäuse entwickeln sich völlig normal und weisen unter normalen Bedingungen keine offensichtlichen Unterschiede zu Wildtyp Mäusen auf. Jedoch zeigen Syndecan-4 Knockout Mäuse Auffälligkeiten, wenn man die Mäuse physiologischen Stressbedingungen aussetzt. Ishiguro *et al.* (2001b) induzierten bei Syndecan-4 Knockout und Wildtyp Mäusen eine Niereninsuffizienz durch Injektion von κ -Carrageenan, einer nierentoxischen Substanz, die sich in den Sammelröhren der Nieren ablagert und so eine

obstruktive Nephropathie hervorruft. Nach Injektion von κ -Carrageenan wurde bei Syndecan-4 Knockout Mäusen eine auffällig hohe Sterblichkeit festgestellt, während keine der Wildtyp Mäuse im Versuch starb. Im Vergleich zu Wildtyp Mäusen wurden bei Syndecan-4 $-/-$ Mäusen höhere Harnstoff-Konzentrationen im Blut, eine vermehrte Ablagerung von κ -Carrageenan in den Nieren sowie eine größere Schädigung der renalen Tubuli festgestellt. Woran genau die Syndecan-4 Knockout Mäuse sterben und wie Syndecan-4 diese Vorgänge beeinflusst ist jedoch unklar und wurde nicht weiter untersucht. Ruft man bei Syndecan-4 Knockout Mäusen durch Injektion von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) einen septischen Schock hervor, reagieren diese ebenfalls mit einer auffällig hohen Sterblichkeitsrate. Im Gegensatz zu ca. 80 % der Wildtyp Mäuse überlebten nur ca. 20 % der Syndecan-4 defizienten eine LPS-Injektion. Bei den Syndecan-4 Knockout Mäusen wurde ein erhöhter Level des proinflammatorischen Zytokins IL-1 festgestellt. Auch in diesem Krankheitsmodell ist jedoch unklar, welche Rolle Syndecan-4 bei einem septischen Schock spielt (Ishiguro *et al.* 2001a). Neben den genannten Problemen weisen Syndecan-4 Knockout Mäuse außerdem eine verzögerte Wundheilung auf (siehe Kapitel 1.2.2). Die genauere Untersuchung der Beteiligung von Syndecan-4 an diesem Prozess ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Aufgrund der beschriebenen Probleme von Syndecan-4 Knockout Mäusen und der Erhöhung der Syndecan-4 Expression während pathophysiologischer Vorgänge nimmt man an, dass Syndecan-4 vor allem während physiologischer Stress-Situationen eine wichtige Rolle spielt (Ishiguro *et al.* 2002; Wilcox-Adelman *et al.* 2002b). Welche Funktionen Syndecan-4 bei der Antwort auf physiologischen Stress übernimmt, ist bisher jedoch noch unbekannt.

Einige Funktionen und Interaktionen von Syndecan-4 bei der Beteiligung an fokalen Kontakten und an Signaltransduktionsvorgängen konnten jedoch bereits geklärt werden.

1.5.1 Syndecan-4 in fokalen Kontakten

Syndecan-4 ist das einzige der vier Syndecane, das bisher in fokalen Kontakten nachgewiesen wurde. In Fibroblasten, die auf Fibronectin, Vitronectin, Laminin oder Kollagen Typ I ausgesät wurden, kolokalisiert Syndecan-4 mit Vinculin in fokalen Kontakten (Woods & Couchman 1994). In ruhenden Fibroblasten befindet sich Syndecan-4 eher in peripheren Kontakten (Woods *et al.* 2000; Longley *et al.* 1999),

während es in migrierenden Fibroblasten in zentrale fokale Kontakte rekrutiert wird (Baciu & Goetinck 1995).

Die Lokalisation von Syndecan-4 in fokalen Kontakten wird jedoch nicht nur über die Interaktionen der Heparansulfat-Ketten mit der extrazellulären Matrix vermittelt, da sich gezeigt hat, dass Syndecan-4, an das keine Heparansulfat-Ketten angeheftet sind, auch in fokalen Kontakten zu finden ist (Echtermeyer *et al.* 1999). In Experimenten, in denen Syndecan-4 ohne die variable Region der zytoplasmatischen Domäne in Zellen exprimiert wurde, verhindert dieses Syndecan-4 Konstrukt die Bildung von fokalen Kontakten (Longley *et al.* 1999). Dies lässt vermuten, dass neben Interaktionen der extrazellulären Domäne auch intrazelluläre Signale, die über die zytoplasmatische Domäne und speziell über die variable Region von Syndecan-4 vermittelt werden, eine Rolle bei der Bildung von fokalen Kontakten spielen.

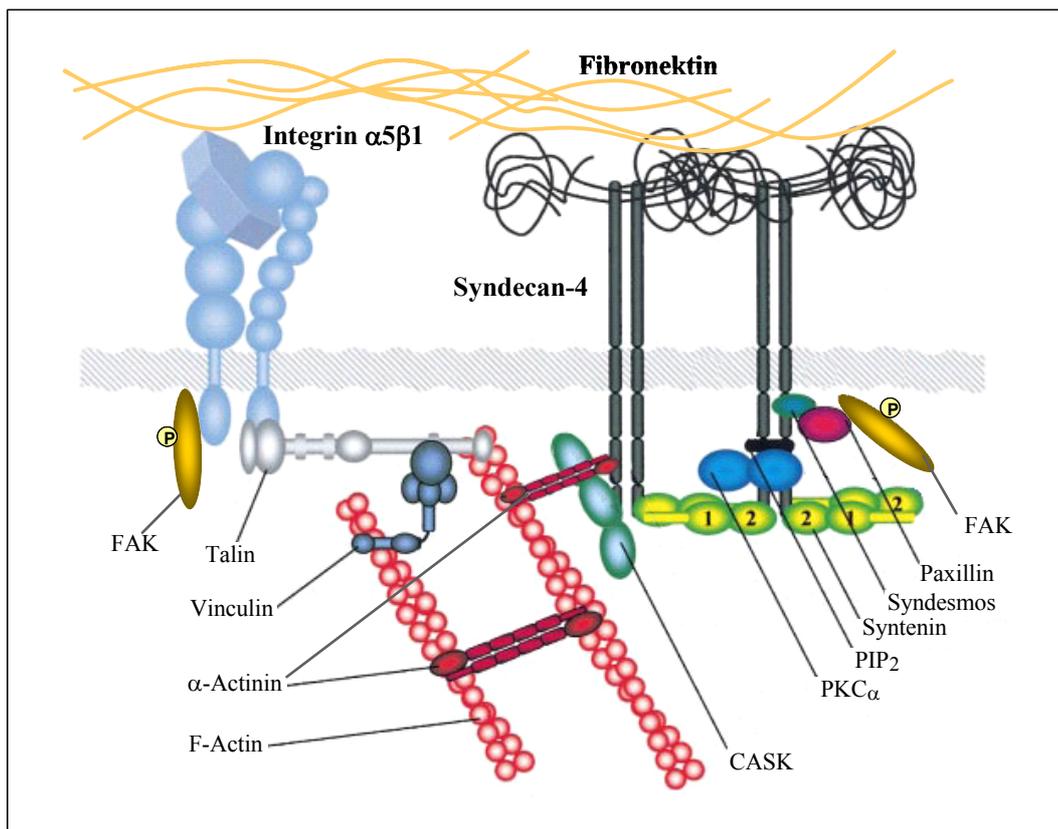


Abbildung 1.4: Die Beteiligung von Syndecan-4 an fokalen Kontakten

Syndecan-4 kann über seine Heparansulfat-Ketten an Fibronectin binden und intrazellulär mit einer Reihe von Proteinen aus fokalen Kontakten interagieren. Über die zytoplasmatische Domäne ist Syndecan-4 z. B. in der Lage die Signalmoleküle PIP₂ und PKC α und die Adapterproteine Syndesmos und α -Actinin zu binden. Modifiziert nach Bass & Humphries (2002).

Syndecan-4 kann über die variable Region der zytoplasmatischen Domäne spezifisch verschiedene Moleküle binden, unter anderem das Signalmolekül PIP₂, Protein Kinase C_α und Syndesmos. All diese Proteine kommen in fokalen Kontakten vor. Das Signalmolekül PIP₂ spielt eine Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Schafer & Cooper 1995), indem es z. B. an α-Actinin und Vinculin binden kann und ihre Assoziation mit dem Zytoskelett reguliert (Fukami *et al.* 1994; Gilmore & Burridge 1996). Die Bindung von PIP₂ an die variable Region von Syndecan-4 induziert die Bindung und anschließende Aktivierung der Protein Kinase C_α durch Syndecan-4 (Longley *et al.* 1999; Horowitz *et al.* 1999; Oh *et al.* 1998). Die Aktivierung der Protein Kinase C_α fördert die Ausbildung fokaler Kontakte (Woods & Couchman 1992; Vuori & Ruoslahti 1993). Durch die direkte Aktivierung der Protein Kinase C_α mit dem Phorbolster PMA wird Syndecan-4 in fokale Kontakte rekrutiert (Baciu & Goetinck 1995), umgekehrt erhöht aber auch die Bindung der PKC_α an Syndecan-4 die Konzentration der Kinase in fokalen Kontakten (Lim *et al.* 2003). Darüber hinaus kann Syndecan-4, wie in Abbildung 1.4 gezeigt, an zwei weitere in fokalen Kontakten vorkommende Proteine, nämlich Syndesmos (Baciu *et al.* 2000) und α-Actinin (Greene *et al.* 2003), binden. Syndesmos ist ein Strukturprotein in fokalen Kontakten und kann dort an Paxillin binden (Baciu *et al.* 2000; Denhez *et al.* 2002). α-Actinin ist ein F-Aktin quervernetzendes Molekül, das ebenfalls in fokalen Kontakten vorkommt und so eine direkte Verbindung zwischen Syndecan-4 und dem Aktin-Zytoskelett bildet (Keum *et al.* 2004).

Dass Syndecan-4 zwar an der Ausbildung von fokalen Kontakten und Aktin-Stressfasern beteiligt, aber nicht unbedingt erforderlich ist, zeigen Experimente mit Syndecan-4 defizienten Fibroblasten. Syndecan-4 Knockout Fibroblasten sind in der Lage, fokale Kontakte und Aktin-Stressfasern zu bilden (Echtermeyer *et al.* 2001; Ishiguro *et al.* 2000). Dies lässt darauf schließen, dass Zellen möglicherweise Mechanismen besitzen, um die Notwendigkeit von Syndecan-4 bei der Bildung von fokalen Kontakten zu umgehen oder sie durch andere Moleküle zu kompensieren. Diese Kompensationsmechanismen sind jedoch bisher nicht bekannt.

Syndecan-4 ist durch Beteiligung in fokalen Kontakten und durch die beschriebenen Interaktionen in der Lage, Signaltransduktionsvorgänge in fokalen Kontakten zu beeinflussen. Darüber hinaus spielt Syndecan-4 aber auch in Signaltransduktionsvorgängen, die unabhängig von fokalen Kontakten sind, eine wichtige Rolle.

1.5.2 Durch Syndecan-4 beeinflusste Signaltransduktionsvorgänge

Wie alle Syndecane ist Syndecan-4 in der Lage, über seine Heparansulfat-Ketten, neben den oben genannten Matrixmolekülen, zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Mediatoren zu binden. Dazu zählen z. B. die Wachstumsfaktoren der FGF Familie, TGF- β 1 und -2, HGF, verschiedene Interleukine (IL-2, -3, -4, -5, -7, -8) und Koagulationsfaktoren wie Anthitrombin III (Varki 2002). Die Syndecane und auch andere Heparansulfat-Proteoglykane wie die Glypicane, spielen eine wichtige Rolle als Korezeptoren für die genannten Faktoren. Durch ihre Bindung an die Heparansulfat-Ketten wird die Konzentration der Faktoren auf der Zelloberfläche erhöht, was die Bindung an ihren jeweiligen primären Rezeptor ermöglicht (Bernfield *et al.* 1999). Zusätzlich nimmt man an, dass die Heparansulfat-Ketten die Dimerisierung der Faktoren und die Bindung mit den jeweiligen Rezeptoren stabilisieren. Besonders gut untersucht ist dieser Mechanismus für den Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (FGFR-1) und seine Liganden FGF-1 und -2 (Rapraeger *et al.* 1991). Heparansulfat bildet mit dem Wachstumsfaktor und dem Rezeptor einen Komplex, wodurch die Liganden-Rezeptor Wechselwirkung beschleunigt und stabilisiert wird (Steinfeld *et al.* 1996).

Syndecan-4 ist bisher das einzige Heparansulfat-Proteoglykan, von dem bekannt ist, dass die FGF-2 Signale sowohl durch die Heparansulfat-Ketten als auch durch das Syndecan-4 Core-Protein selber beeinflusst werden. Die Aktivierung des FGF-Rezeptors durch FGF-2 bewirkt die Dephosphorylierung eines Serinrests der zytoplasmatischen Domäne von Syndecan-4. Dadurch werden die Bindung von PIP₂ und die anschließende Bindung und Aktivierung der PKC α ermöglicht (Horowitz & Simons 1998; Simons & Horowitz 2001; Horowitz & Simons 1998). Man nimmt an, dass die aktivierte Protein Kinase C α an der intrazellulären Übermittlung FGF-2 vermittelter Signale beteiligt sein könnte (Bass & Humphries 2002).

Bisher sind die genauen intrazellulären Signaltransduktionswege, die von Syndecan-4 reguliert werden können, wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass Syndecan-4 über das kleine G-Protein RhoA Signale vermitteln kann. RhoA gehört zur Familie der kleinen monomeren GTPasen und ist u. a. an der Übertragung von Signalen von Zelloberflächen-Rezeptoren zum Zytoskelett beteiligt. Die Notwendigkeit von Syndecan-4 bei der Ausbildung von fokalen Kontakten und Aktin-Stressfasern kann durch eine direkte Aktivierung von RhoA durch Lysophosphatidylsäure (LPA) umgangen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RhoA möglicherweise von Syndecan-4 im

Zusammenspiel mit Integrinen während der Bildung von fokalen Kontakten aktiviert werden kann (Saoncella *et al.* 1999). In Syndecan-4 defizienten Fibroblasten ist darüber hinaus die Menge an aktivem RhoA niedriger als in Wildtyp Fibroblasten, was diese Annahme noch bekräftigt (Wilcox-Adelman *et al.* 2002a). Bisher ist jedoch unbekannt, über welche Signalwege Syndecan-4 die Aktivierung von RhoA beeinflussen kann.

1.6 Signaltransduktion durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1

Der Wachstumsfaktor TGF- β 1 reguliert grundlegende Prozesse der Wundheilung, wie die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten und die Synthese neuer Matrixproteine während der Bildung von Granulationsgewebe (O'Kane & Ferguson 1997). Weiterhin ist bekannt, dass Syndecan-4 TGF- β 1 über seine Heparansulfat-Ketten binden kann (Ishiguro *et al.* 2001a). Aus diesem Grund sollen hier kurz die Signaltransduktionsmechanismen dieses Wachstumsfaktors näher erläutert werden.

In Säugetieren sind drei Isoformen von TGF- β , TGF- β 1, -2 und -3 bekannt. Aktives TGF- β 1 besteht aus zwei TGF- β Molekülen, die kovalent zu einem Homodimer verbunden sind und als inaktive Vorstufe sezerniert werden. Die Aktivierung dieser inaktiven Vorstufe ist noch nicht völlig geklärt, erfolgt jedoch wahrscheinlich unter Beteiligung verschiedener Proteasen, wie z. B. Plasmin oder Thrombin (Verrecchia & Mauviel 2002). Die Weiterleitung des TGF- β Signals wird von zwei transmembranen Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren vermittelt, den TGF- β Rezeptoren I und II (Wrana *et al.* 1992; Lin & Wang 1992). Neben diesen Signaltransduktionsrezeptoren existiert ein weiterer TGF- β Rezeptor, das Zelloberflächen-Proteoglykan Betaglycan (Lopez-Casillas *et al.* 1993; Wang *et al.* 1991). Man nimmt an, dass Betaglycan die Bindung von TGF- β an die Rezeptoren I und II reguliert, indem es die Funktion eines Co-Rezeptors übernimmt, und TGF- β über seine GAG bindet und den eigentlichen Rezeptoren präsentiert (Lopez-Casillas *et al.* 1993). Aktives TGF- β bindet zunächst an den TGF- β Rezeptor II, der eine konstitutiv aktive Kinase-Funktion hat. Die Bindung von TGF- β an den Rezeptor II resultiert in der Bildung eines heterotetrameren Rezeptorkomplexes aus zwei Rezeptor I und zwei Rezeptor II Molekülen. Daraufhin wird der TGF- β Rezeptor I durch den Rezeptor II phosphoryliert und so aktiviert (Heldin *et al.* 1997; Massague 2000).

Intrazellulär werden die TGF- β Signale durch die Familie der Smad-Proteine weitergeleitet. Die so genannten Rezeptor-Smads (R-Smads), Smad2 und Smad3, binden

an den aktivierten TGF- β Rezeptorkomplex und werden vom Rezeptor I durch Phosphorylierung aktiviert (Heldin *et al.* 1997; Massague 1998). Zumindest für Smad2 ist bekannt, dass es im unphosphorylierten Zustand an ein Adaptermolekül, das so genannte SARA (smad anchor for receptor activation) Protein, gebunden vorliegt. Durch SARA wird das unphosphorylierte Smad2 dem aktivierten Rezeptor I präsentiert (Tsukazaki *et al.* 1998). Gleichzeitig verhindert die Bindung an SARA die Translokation von unphosphoryliertem Smad2 in den Nukleus (Xu *et al.* 2000). Ob ein ähnlicher Mechanismus für Smad3 vorliegt, ist nicht bekannt.

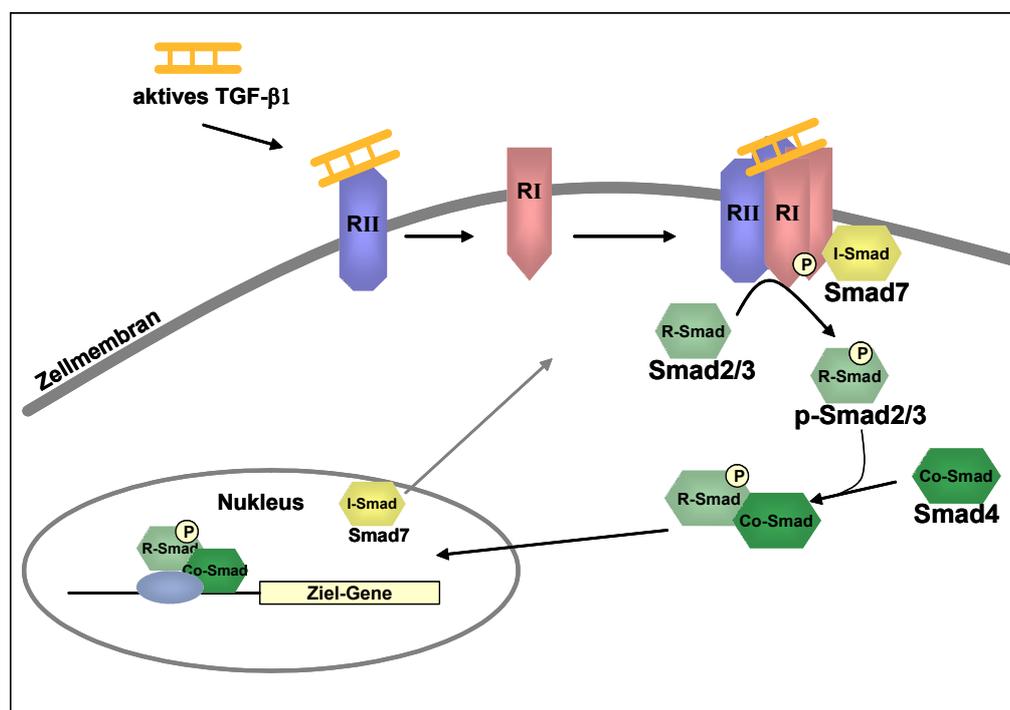


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch TGF- β 1 und die Smad Proteine

Aktives TGF- β 1 bindet an die TGF- β Rezeptoren I und II. Infolge dessen werden die Rezeptor-Smads 2 und 3 aktiviert und bilden mit Smad4 einen Komplex, der in den Zellkern transloziert. Dort werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Das inhibitorische Smad7 kann regulierend auf das TGF- β 1 Signal wirken, indem es an einen TGF- β Rezeptor bindet.

Die aktivierten R-Smads dissoziieren vom Rezeptorkomplex und binden im Zytoplasma an das kooperative Smad (Co-Smad), Smad4, so dass ein heterogener Komplex aus Smad2, 3 und 4 entsteht. Dieser Smad-Komplex wird dann in den Kern transportiert, wo er mit Transkriptionsfaktoren, wie z. B. ATF-2, c-Jun, JunB, JunD oder c-Myc assoziiert und die

Transkription spezifischer Ziel-Gene aktiviert (Heldin *et al.* 1997; Massague 2000) (siehe Abbildung 1.5). Das inhibitorische Smad-Protein Smad7 wirkt als negativer Regulator der TGF- β Signalübertragung. In unstimulierten Zellen ist Smad7 im Nukleus lokalisiert. Zahlreiche Wachstumsfaktoren, unter anderem TGF- β selber, bewirken die Synthese von Smad7 und dessen Translokation in das Zytoplasma. Dort bindet Smad7 an den TGF- β Rezeptorkomplex und inhibiert die Phosphorylierung und Aktivierung der Rezeptor-Smads. Das inhibitorische Smad7 wirkt also durch eine negative Rückkopplung regulierend auf das TGF- β Signal (Chen *et al.* 2001; Itoh *et al.* 1998; Nakao *et al.* 1997).

Neben der Aktivierung der Smad-Proteine kann TGF- β 1 jedoch auch noch andere alternative Signaltransduktionswege beeinflussen. So ist z. B. bekannt, dass die Mitogen aktivierten Protein Kinasen ebenfalls durch TGF- β 1 aktiviert werden können (Massague 2000).

1.7 Signaltransduktion durch die Mitogen aktivierten Protein Kinasen

Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen) werden durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli über Kinasekaskaden aktiviert und beeinflussen eine Reihe von zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose. MAP Kinasen können aber auch kurzfristige Veränderungen, mit denen Zellen auf extrazellulären Stress reagieren, regulieren. Unter anderem können sie während der Assemblierung von fokalen Kontakten durch Signale von Integrinen oder der fokalen Adhäsionskinase aktiviert werden (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka 1996).

MAP Kinasen stellen die distalen Segmente verschiedener Kinasekaskaden dar, die aus mindestens drei Proteinkinasen bestehen und extrazelluläre Signale in den Zellkern übermitteln.

Die Familie der MAP Kinasen umfasst drei Hauptgruppen, die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK1 und 2), die c-jun N-terminal phosphorylierenden Kinasen (JNK1,2,3) und die p38 MAP Kinasen (p38 $_{\alpha-\delta}$). Alle MAP Kinasen werden durch duale Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt jeweils durch eine ihnen übergeordnete MAP Kinase Kinase (MAPK Kinase). Dabei werden die beiden ERK Kinasen 1 und 2 von den MAPK Kinasen MEK1/2, die JNK Kinasen 1, 2 und 3 von den MAPK Kinasen MKK4/7 und die p38 MAP Kinasen von den MAPK Kinasen MKK3/6 aktiviert (siehe Abbildung 1.6). Die MAPK Kinasen werden

ihrerseits ebenfalls von spezifischen Kinasen, den MAPKK Kinasen, phosphoryliert und aktiviert, wobei wiederum jede MAPK Kinase von mehreren MAPKK Kinasen aktiviert werden kann, so dass sehr komplexe und unterschiedliche Aktivierungswege für die einzelnen MAP Kinasen entstehen können (Chang & Karin 2001; Chen *et al.* 2001; Pearson *et al.* 2001).

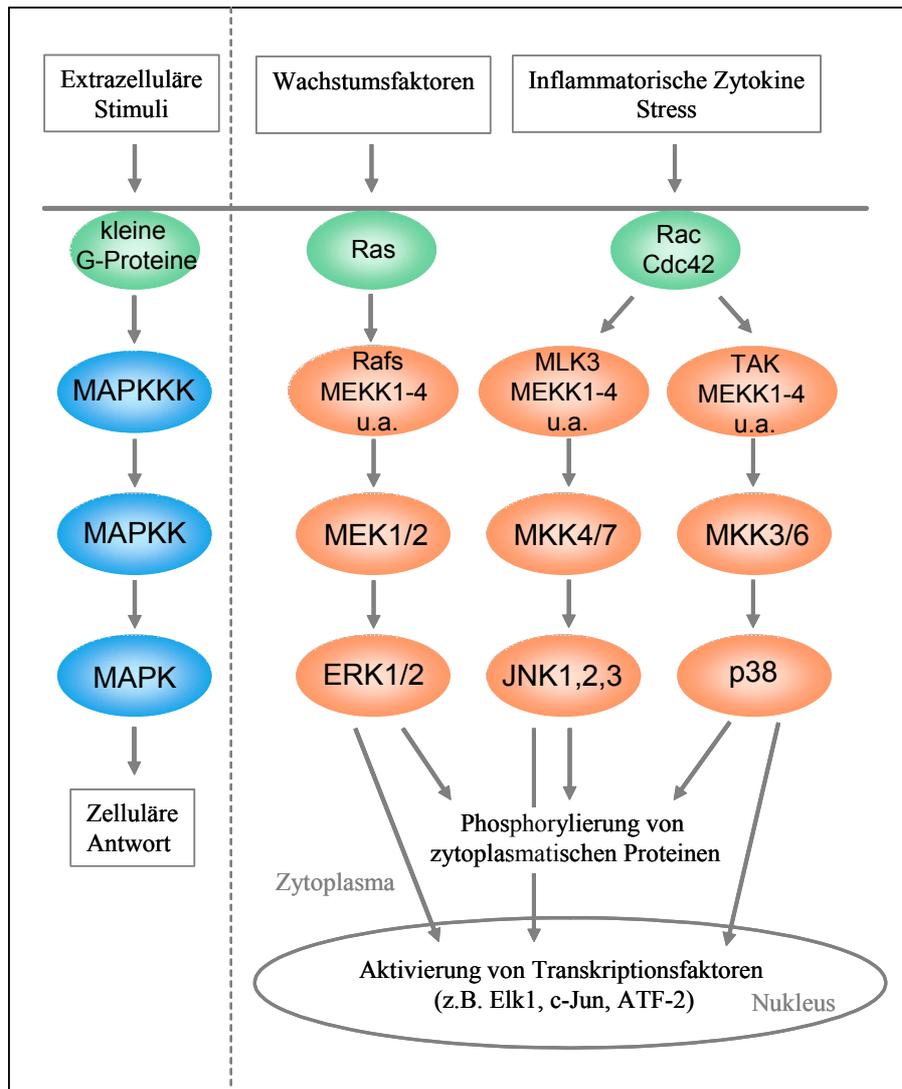


Abbildung 1.6: Signaltransduktionswege der MAP Kinasen

Alle MAP Kinasen werden durch extrazelluläre Stimuli angeregt. Die extrazellulären Signale werden meist über Mitglieder der Familie der kleinen G-Proteine an eine Signalkaskade weitergeleitet. Diese Signalkaskade besteht für jede MAP Kinase aus mehreren MAPK Kinase Kinasen (MAPKKK), die wiederum verschiedene MAPK Kinasen (MAPKK) aktivieren können, durch die schließlich die einzelnen MAP Kinasen aktiviert werden. Die wichtigsten MAPKKK und MAPKK sind für die jeweiligen MAPK dargestellt. Die MAP Kinasen können wiederum eine Reihe von zytoplasmatischen Proteinen sowie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren.

Es ist zu berücksichtigen, dass die einzelnen Signalwege auch untereinander kommunizieren können. Diese Interaktionen wurden der Übersichtlichkeit halber außer Acht gelassen.

Die einzelnen MAP Kinasen werden von verschiedensten extrazellulären Stimuli aktiviert. Die ERK1/2 Kinasen werden in Fibroblasten, z. B. besonders durch Wachstumsfaktoren, Serum und Phorbol ester, aber auch in geringerem Maße durch Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren der TGF- β Familie und osmotischen Stress aktiviert (Chen *et al.* 2001). Dabei wird häufig das membrangebundene G-Protein Ras aktiviert, das wiederum die Aktivierung von MAPKKK der Raf Familie aktiviert, was dann zur Signalweiterleitung führt (Dong *et al.* 2002).

Im Gegensatz zu den ERK Kinasen werden die Kinasen der JNK und p38 Unterfamilien durch inflammatorische Zytokine wie TNF und IL-1 induziert. Außerdem werden diese MAP Kinasen auch stark durch äußere Stressfaktoren, wie osmotischen Schock, Hitze, oxidativen Stress oder UV Strahlung aktiviert. Die Weiterleitung des Signals läuft hier oft über die G-Proteine der Rho Familie Rac und Cdc42 (Dong *et al.* 2002). Alle MAP Kinasen können nach ihrer Aktivierung in den Kern translozieren, wo sie ihrerseits bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Elk1, c-Jun oder ATF-2 phosphorylieren und aktivieren (Hazzalin & Mahadevan 2002). Sie können jedoch auch direkt im Zytoplasma wirksam werden und dort verschiedene Zielproteine, u. a. auch Paxillin, phosphorylieren (Ku & Meier 2000). Diese Fülle der von den einzelnen MAP Kinasen phosphorylierten Substrate sowie die Vielfältigkeit ihrer Aktivierungs- und Regulierungsmöglichkeiten erklären die Komplexität der Wirkungen der MAP Kinase Signaltransduktionswege und ihre Teilnahme an den unterschiedlichsten zellulären Prozessen.

2 Zielsetzung

Syndecan-4 ist ein transmembranes Heparansulfat-Proteoglykan, das von einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird. Es ist an einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse, wie z. B. der Adhäsion und der Wanderung von Zellen, der Zelldifferenzierung oder der Proliferation, beteiligt. In Hautwunden wird die Expression von Syndecan-4 besonders in Fibroblasten stark erhöht. Darüber hinaus wurde bei Syndecan-4 Knockout-Mäusen und bei Syndecan-4 heterozygoten Mäusen eine verzögerte Heilung von Hautwunden festgestellt. Die Wundheilungsprobleme sind auf eine reduzierte Akkumulation von Granulationsgewebe und die fehlende Wundkontraktion während der ersten Tage der Wundheilung zurückzuführen. Welche Funktion Syndecan-4 bei diesen Prozessen hat, ist jedoch bisher noch völlig unklar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die genauen Ursachen der Wundheilungsstörungen von Syndecan-4 defizienten Mäusen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Dazu sollten jeweils primäre dermale Fibroblasten aus Wildtyp Mäusen und Syndecan-4 Knockout Mäusen in geeigneten *in vitro* Wundheilungsmodellen miteinander verglichen werden. Zunächst sollten so die Ursachen für die reduzierte Bildung von Granulationsgewebe analysiert werden. Im Detail sollte geklärt werden, ob sich das Fehlen von Syndecan-4 auf die Wanderungskapazität und die Proliferation von Fibroblasten auswirkt.

Im Kollagen-Gel-Kontraktion-Assay sollten *in vitro* die kontraktilen Fähigkeiten der Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten verglichen werden, um die Ursachen für die fehlende Wundkontraktion von Syndecan-4 $-/-$ Mäusen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten untersucht werden.

Da der Wachstumsfaktor TGF- β 1 während der Wundheilung die Prozesse der Proliferation, Kontraktion und Differenzierung von Fibroblasten maßgeblich beeinflusst bzw. beschleunigt, sollte in den entsprechenden Experimenten jeweils der Einfluss von TGF- β 1 auf die Wildtyp und Syndecan-4 defizienten Fibroblasten getestet und gegebenenfalls Veränderungen in den Signaltransduktionswegen analysiert werden.

Da Syndecan-4 eine Funktion bei der Ausbildung fokaler Kontakte hat, sollte des Weiteren untersucht werden, ob das Fehlen von Syndecan-4 Veränderungen in der Struktur und der Assemblierung fokaler Kontakten hervorruft.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte

3.1.1.1 Allgemeine Reagenzien

Sämtliche gängigen Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, von den Firmen Merck, Sigma, Roth, ICN und Applichem bezogen. Die Bezugsquellen anderer verwendeter Chemikalien werden an entsprechender Stelle in der Methodenbeschreibung angegeben.

3.1.1.2 Enzyme

Polymerasen

Taq DNA Polymerase	NEB
Taq DNA Polymerase	GibcoBRL
Deep Vent DNA Polymerase	NEB
ProofStart DNA Polymerase	Qiagen

3.1.1.3 Standards und Marker

DNA Marker

1 kb DNA Leiter	GibcoBRL
100 bp DNA Leiter	NEB

Protein Marker

Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB
Protein Marker, Broad Range	Biorad

3.1.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

FKS	Biochrom KG
100x Antibiotikum/Antimykotikum	PAA Laboratories
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	PAA Laboratories
MEM nicht essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories
DMSO	Roth
Zeocin	Invitrogen
Zellkulturschalen	Greiner
6-Well Platten	Greiner
24-Well Platten	Greiner
96-Well Platten	Greiner
1 ml Kryoröhrchen	Nunc
Zellschaber	Greiner
Sterile 15 ml Röhrchen	Greiner
Deckgläschen rund Ø 10 mm	Assistent
Neubauer Zählkammer	Brand

3.1.1.5 Primer für die Typisierung von Syndecan-4 Knockout Mäusen

E4 seq.	5'-gtg cca cta gat aac cac atc cc-3'
E4 rev.	5'-ctc agt tct ttc aaa aac gtt g-3'
Neo seq.	5'-gat ctc ctg tca tct cac ct-3'
Neo rev.	5'- atg ggt cac gac gag atc ct-3'

3.1.1.6 Vektoren

Litmus 38 (Klonierungsvektor)	NEB
pCR [®] II/TOPO (TOPO Klonierungsvektor)	Invitrogen
pUC19 (Klonierungsvektor)	Invitrogen
pEF4/ <i>Myc</i> -His A (Expressionsvektor)	Invitrogen
pMSSVLT (Large T)	(Schuermann 1990)

3.1.1.7 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> TOP 10 F ⁺	Invitrogen
BL21 plysS	Stratagene

3.1.1.8 Geräte

Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Kühlzentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Ausschwingrotor Typ A-4-44	Eppendorf
Festwinkelrotor Typ FA-45-30-11	Eppendorf
Ultrazentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Minischüttler	IKA Works Inc.
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf
PCR-Cycler Mastercycler personal	Eppendorf
Präzisionswaage Kern 572	Kern
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Laser-Scan-Mikroskop PCM 2000	Nikon
CO ₂ -Inkubator Modell 311	Forma Scientific
ELISA Reader Dynatech MRX 1.12	Dynatech Laboratories
Digitalkamera Nikon coolpix 4500	Nikon

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primäre Antikörper

Spezifität	Typ	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
Vinculin	Monoklonal, Maus	1:500 IF	Sigma
Paxillin	Monoklonal, Maus	1:500 IF	BD Bioscience
FAK	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB, 1:100 IF	Upstate
p-Tyr ³⁹⁷ FAK	Monoklonal, Maus	1:500 WB, 1:100 IF	Chemicon
Syndecan-2	Polyklonal, Kaninchen	1:500 IF	Santa Cruz
α -smooth muscle Aktin	monoklonal, Maus, FITC konjugiert	1:1000 IF	Sigma
α -smooth muscle Aktin	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB, 1:500 IF	Abcam
Smad2	Monoklonal, Maus	1:500 WB	BD Bioscience
Phospho-smad2	Polyklonal, Kaninchen	1:750 WB,	Cell Signalling, NEB
Smad3	Polyklonal, Kaninchen	1:150 WB, 1:200 IF	Zymed Laboratories
Smad4	Monoklonal, Maus	1:500 WB	Santa Cruz
Smad7	Polyklonal, Ziege	1:150 WB	Abcam
β -Tubulin	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB	Santa Cruz
Phospho-p38 MAPK	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB	Cell Signalling, NEB
p38 MAPK	Polyklonal, Kaninchen	1:750 WB	Cell Signalling, NEB
Phospho-ERK1/2	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB	Cell Signalling, NEB
ERK1/2	Polyklonal, Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signalling, NEB
Phospho-JNK	Polyklonal, Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signalling, NEB
JNK	Polyklonal, Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signalling, NEB

3.1.2.2 Sekundäre Antikörper für Western Blots

Spezifität	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
Donkey Anti Rabbit IgG	Peroxidase konjugiert	1:10000	Amersham
Rabbit Anti Goat IgG	Peroxidase konjugiert	1:5000	Sigma
Goat Anti Mouse IgG	Peroxidase konjugiert	1:5000	Sigma

3.1.2.3 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Spezifität	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
Phalloidin	Alexa Fluor 568 konjugiert	Nach Herstellerangabe	Molecular Probes
Donkey Anti-Goat IgG	Alexa Fluor 488 konjugiert	1:500	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse IgG	Alexa Fluor 488 konjugiert	1:500	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse IgG	Alexa Fluor 568 konjugiert	1:500	Molecular Probes
Goat Anti-Rat IgG	Alexa Fluor 488 konjugiert	1:500	Molecular Probes
Goat Anti-Rat IgG	Alexa Fluor 568 konjugiert	1:500	Molecular Probes
Goat Anti-Rabbit IgG	Alexa Fluor 488 konjugiert	1:500	Molecular Probes
Goat Anti-Rabbit IgG	Alexa Fluor 568 konjugiert	1:500	Molecular Probes

3.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

3.1.3.1 Standardpuffer

1x PBS

150 mM	NaCl
2 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4	

1x TBS

25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA

3.2 Methoden**3.2.1 Zellbiologische Methoden****3.2.1.1 Zellkulturbedingungen**

Die verwendeten Fibroblasten wurden auf 10 cm Zellkulturschalen bei 37° C im Begasungsbrutschrank bei 92,5 % rel. Luftfeuchte und 7,5 % CO₂ gehalten. Als Nährmedium wurde DMEM mit einem Glukosegehalt von 4,5 g/l, 10 % FKS, MEM nicht essentielle Aminosäuren und einer Antibiotika-Antimykotika Lösung verwendet.

Zum Passagieren der Zellen wurden die Fibroblasten kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für ca. 5 min bei 37° C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml DMEM Medium aufgenommen und in entsprechenden Verdünnungen auf frische Kulturschalen überführt.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen langfristig zu lagern, wurden die Zellen einer 10 cm Schale abtrypsiniert und abzentrifugiert (1200 U/min, 10° C, 10 min). Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem Einfriermedium (20 % FCS; 10 % DMSO in DMEM) resuspendiert und je 1 ml in Kryoröhrchen überführt, zunächst für ca. 10 min auf Eis gehalten und anschließend bei -80° C tiefgefroren. Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Um Zellen zu rekultivieren, wurde eine eingefrorene Zellsuspension bei 37° C im Wasserbad aufgetaut und in eine mit 10 ml Nährmedium vorbereitete 10 cm Schale überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um eine Schädigung der Zellen durch DMSO zu vermeiden.

3.2.1.3 Isolierung primärer Hautfibroblasten

Zur Isolierung von primären Hautfibroblasten wurden neugeborene Mäuse verwendet. Diese Mäuse stammten je von zwei Syndecan-4 heterozygoten Eltern, um gewährleisten zu können, dass in einem Wurf möglichst alle drei benötigten Genotypen (Wildtyp, Syndecan-4 heterozygot und Syndecan-4 homozygot) vorhanden waren. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Impfbank durchgeführt. Die Mäuse wurden kurz mit 70 % Ethanol abgesprüht. Anschließend wurden mit einer sterilen Schere der Kopf, der Schwanz und die Extremitäten abgetrennt. Der Schwanz wurde für eine spätere Genotypisierung der Mäuse bei -80°C eingefroren (siehe 3.2.3.1). Die Haut der Mäuse wurde mit einer Schere am Rücken aufgeschnitten und vorsichtig, möglichst unbeschädigt, abgelöst und in ein mit PBS gefülltes Well einer 6-Well-Platte überführt. Zwischen der Präparation der einzelnen Mäuse wurden Scheren und Pinzetten mit Ethanol desinfiziert. Das PBS wurde abgesaugt und die Haut mit der Dermis nach unten vollständig ausgebreitet. Zu jeder Haut wurden vorsichtig 3 ml 25 %iges Trypsin (PAA Laboratories) gegeben, so dass die Häute auf dem Trypsin schwammen. Die Häute wurden so über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag aus dem Trypsin genommen und in eine neue Zellkulturschale mit der Dermis nach unten ausgebreitet. Anschließend wurde die Epidermis mit einer Pinzette vorsichtig von der Dermis abgezogen. Die Dermis wurde mit einem Skalpell in 5 bis 6 Stücke zerteilt und in ein Röhrchen mit 2 ml HBSS (Hanks' balanced salt solution) (PAA Laboratories) gegeben. Zu jedem Röhrchen wurde Collagenase Typ 4 (PAA Laboratories) bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml zugegeben und bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren mit einem sterilen Rührfisch 30 – 60 min inkubiert, so dass die Dermis-Stückchen größtenteils aufgelöst waren. Pro Haut wurde eine 10 cm Zellkulturschale mit 15 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FKS, nicht essentiellen Aminosäuren und Antibiotikum-Antimykotikum) vorbereitet und die aufgelöste Dermis komplett in eine solche Schale gegeben. Die Schalen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert, so dass die Fibroblasten sich absetzen und anhaften konnten. Am nächsten Tag wurden das Medium und die Gewebereste abgesaugt und frisches Medium zugegeben. Die primären Fibroblasten wurden in der ersten Passage eingefroren und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.1.4 Immortalisierung von primären Hautfibroblasten

Für bestimmte Versuche, in denen die Zellen über längere Zeiträume in Kultur gehalten werden sollten, was mit primären Fibroblasten nicht möglich gewesen wäre, sollten immortalisierte Wildtyp, Syndecan-4 +/- und Syndecan-4 -/- Zelllinien hergestellt werden. Dies geschah einmal nach der so genannten „3T3“ Methode. Frisch isolierte primäre dermale Fibroblasten wurden auf 10 cm Schalen kultiviert und alle drei Tage, nach einigen Passagen dann nur noch bei Konfluenz, 1:3 gesplittet. Nach ca. 20-30 Passagen waren die meisten primären Zellen abgestorben. Jedoch waren aus einigen Zellen durch spontane Mutationen schnell wachsende immortalisierte Zellklone hervorgegangen.

Eine zweite Methode, um Zellen zu immortalisieren, ist die Transfektion mit dem Large T-Antigen. Das große Tumor-Antigen (large T) aus dem Polyomavirus Simian Virus 40 immortalisiert und transformiert Zellen, indem es die zellulären Tumorsuppressorproteine p105Rb und p107 bindet und deaktiviert (DeCaprio *et al.* 1988). Für eine Immortalisierung der Zellen ist die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom an beliebiger Stelle erforderlich.

Hierzu wurden primäre Zellen der 3.-5. Passage mit dem pMSSVLT Vektor, der das Large T-Antigen enthält (Schuermann 1990) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen sehr dünn auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, so dass nach einigen Tagen deutlich die schnell wachsenden Klone der transfizierten und immortalisierten Zellen sichtbar waren. Diese Klone wurden einzeln isoliert und weiter kultiviert.

3.2.1.5 *In Vitro* Wundheilungsassay (Scratch-Assay)

Um die migratorischen Fähigkeiten von Zellen zu untersuchen, wurde ein so genannter Scratch-Assay durchgeführt. Dieser Assay stellt eine etablierte *in vitro* Methode dar, um die Zellmigration während der Wundheilung zu testen.

$2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht anhaften lassen. In den konfluenten Zellrasen wurde mit einer 100 μ l Pipettenspitze drei Kratzer pro Well gezogen, der den Wundbereich darstellt. Die Einwanderung der Zellen in diese zellfreien Bereiche wurde alle drei bis vier Stunden kontrolliert und durch Fotografieren dokumentiert, bis die zellfreie Linie durch die eingewanderten Fibroblasten wieder vollständig zugewachsen war. Pro Versuch und Bedingung wurden mindestens Doppelansätze gemessen. Die Fotos der einzelnen Zeitpunkte wurden mit dem

Computerprogramm „Scion Image“ (Scion Corporation) analysiert. Für jeden gemessenen Zeitpunkt wurde so die Fläche der noch offenen Wundfläche berechnet und mit der ursprünglich zum Zeitpunkt „0 Stunden“ offenen Fläche ins Verhältnis gesetzt.

3.2.1.6 Immunfluoreszenzfärbung für die mikroskopische Analyse

Runde Glasplättchen von 10 mm Durchmesser wurden mit Ethanol sterilisiert und in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte gelegt. Darauf wurden $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät und über Nacht oder für mehrere Stunden mit DMEM mit 10 % FKS anhaften lassen. Dann wurde das Medium gewechselt und je nach Versuch mit den jeweiligen Substanzen versetzt. Die Zellen wurden entsprechend der Versuchsanordnung ein bis fünf Tage unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit PFA (4 % Paraformaldehyd, 0,1 % Tween-20 in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in 0,1 M NH_4Cl -Lösung inkubiert, um den pH-Wert auszugleichen. Anschließend wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit 1 % Ziegen Serum (PAA Laboratories) oder 1 % FKS in PBS blockiert. Der Primärantikörper wurde entsprechend in 1 % Ziegen Serum oder 1 % FKS in PBS verdünnt, auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgten drei fünfzehnminütige Waschstufen mit PBS und darauf eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper, ebenfalls verdünnt in 1 % Ziegen Serum oder 1 % FKS in PBS. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS schloss sich je nach Versuchsansatz eine Färbung mit Propidiumjodid (Appllichem) an, um die Zellkerne anzufärben oder mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (Molecular Probes), um das Aktin-Zytoskelett anzufärben. Eine 10 mg/ml Propidiumjodid-Stammlösung wurde 1:5000 in PBS verdünnt und für 10 min auf die Zellen gegeben. Für die Phalloidin-Färbung wurden 5 μl der Phalloidin-Stammlösung in 200 μl PBS verdünnt und für 20 min auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount-G (Biozol) auf Objektträger aufgebracht und über Nacht getrocknet.

Die mikroskopische Analyse erfolgte an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (Nikon PCM 2000) und der dazugehörigen Software (EZ 2000, Version 2.5.79).

3.2.1.7 Isolierung von Kollagen aus Rattenschwänzen

Zur Isolierung von Kollagen wurden 2-3 Rattenschwänze zur Desinfektion für 20 min in 70 % Ethanol eingelegt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Impfbank durchgeführt. Nachdem die Haut von den Schwänzen entfernt worden war, wurden die Sehnen mit einer Pinzette von den Wirbeln abgezogen, für 10 min in 70 % Ethanol eingelegt und getrocknet. Die Sehnen wurden in 250 ml 0,1 % Essigsäure eingelegt und das Kollagen für mindestens 48 h unter leichtem Schwenken bei 4° C isoliert. Um die unlöslichen Anteile zu entfernen, wurde die Lösung 1 h bei 17.000 U/min und 4° C abzentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde bestimmt (siehe 3.2.2.4) und die Lösung in entsprechender Verdünnung eingesetzt.

3.2.1.8 Kollagen-Gel-Kontraktionsassay

Der Kollagen-Gel-Kontraktionsassay dient der Analyse der Kontraktionsfähigkeit von Zellen und stellt einen *in vitro* Assay zur Untersuchung der Wundkontraktion dar. Hierbei werden die Zellen in eine 3D-Gelmatrix aus Kollagen eingesät und die Kontraktion dieser Gele durch die Zellen beobachtet.

Zur Herstellung dieser Gele wurde zunächst die Kollagenlösung auf Eis zusammen pipettiert. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Hierzu wurden, entsprechend der Zahl der Gele, zweifachkonzentriertes DMEM (Invitrogen), FKS, Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung, Rattenschwanzkollagen und H₂O zusammengegeben. Die Kollagen-Endkonzentration in den Gelen betrug 0,2 mg/ml. Da das Rattenschwanzkollagen in 0,1 % Essigsäure gelöst ist, musste die Lösung anschließend mit 0,1 M NaOH neutralisiert werden. Anschließend wurden die entsprechenden Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert und das Zellpellet in 1-2 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und auf 100.000 Zellen pro 100 µl DMEM eingestellt. Für jedes Kollagen-Gel wurden 1400 µl der Kollagen-Lösung mit 100 µl Zellsuspension gemischt. Zu einigen Gelen wurde zusätzlich 10 ng/ml TGF-β1 (R&D Systems) zugegeben. Das Gemisch wurde kurz in der Hand erwärmt und einige Male geschwenkt, um den Zellen die Anheftung an das Kollagen zu ermöglichen und anschließend in eine 3,5 cm Bakterienchale gegeben. Die Benutzung von Bakterienplatten verhinderte ein Anhaften der Zellen und des Kollagens an der Kulturschale, was ein späteres Ablösen des Gels erleichterte. Die Schale mit dem Gel

wurde in den Brutschrank gestellt, wo das Gel nach ca. einer Stunde polymerisiert war. Nach 3-4 h wurde das Gel mit Hilfe einer Pasteurpipette und durch leichtes Schwenken vom Rand der Bakterienplatte gelöst, so dass das Gel frei in der Schale schwamm. Zu jedem Gel wurde 1 ml DMEM mit 0,5 % FKS zugegeben und die Gele über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Kontraktion der Gele durch Fotografieren dokumentiert. Anhand dieser Fotos wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Scion Image“ (Scion Corporation) die Größe der kontrahierten Gelfläche bestimmt. Hierbei diente ein auf jedem Foto mit fotografiertes Lineal als Maßstab.

Pipettierschema für ein Kollagen-Gel:

2-faches DMEM	700 µl
FKS (Endkonzentration = 0,5 %)	7,5 µl
TGF-β1 (Endkonzentration = 10 ng/ml) (optional)	7,5 µl
Antibiotikum/Antimykotikum	150 µl
Rattenschwanzkollagen	ca.250 µl (je nach Konzentration)
0,1 M NaOH	75 µl
dd-H ₂ O	ad 1500 µl
Zellen	100 µl

3.2.1.9 Immunfluoreszenzfärbung zur Anfärbung von Kollagen-Gelen

Primäre Fibroblasten wurden, wie in Kapitel 3.2.1.8 beschrieben, in Kollagen-Gele eingesät. Die Gele wurden jedoch in diesem Fall in 3,5 cm Zellkulturschalen inkubiert, um eine Ablösung der Gele von der Zellkulturschale zu verhindern. Die Zellen wurden für vier Tage in diesen so genannten gestressten Kollagen-Gelen inkubiert und konnten anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen werden. Die Gele blieben während der gesamten Färbeprozedur an den Zellkulturschalen angeheftet, um die Handhabung zu erleichtern. Nachdem die Gele einmal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie für ca. 30 min bei Raumtemperatur mit PFA (4 % Paraformaldehyd, 0,1 % Tween-20 in PBS) fixiert. An die Fixierung schlossen sich drei je 15-minütige Waschschrte mit PBS + 0,01 % Tween-20 an. Die so fixierten Gele wurden über Nacht

bei 4° C mit 1 % Ziegen Serum (PAA Laboratories) oder 1 % FKS in PBS blockiert. Der Primärantikörper wurde entsprechend in 1 % Ziegen Serum oder 1 % FKS in PBS verdünnt, auf die Zellen gegeben und 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei 30-minütige Waschschrte mit PBS + 0,01 % Tween-20 und darauf eine 1-2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper, ebenfalls verdünnt in 1 % Ziegen Serum oder 1 % FKS in PBS. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS + 0,01 % Tween-20 schloss sich je nach Versuchsansatz eine Färbung mit Propidiumjodid (Applichem) an, um die Zellkerne anzufärben, oder mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (Molecular Probes), um das Aktin-Zytoskelett anzufärben (siehe 3.2.1.6). Erst jetzt wurden die Gele vorsichtig von der Zellkulturschale abgelöst. Dazu wurden sie mit einem Skalpell in 2-4 gleichgroße Stücke zerteilt und diese durch Unterspülen mit einer Pipette von der Schale abgelöst. Die einzelnen Stücke wurden jeweils auf Objektträger überführt und mit reichlich Fluoromount-G (Biozol) eingedeckt. Nach dem Trocknen wurden sie mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskopes (Nikon PCM 2000) und der dazugehörigen Software (EZ 2000, Version 2.5.79) analysiert.

3.2.1.10 Aktivierung von Zellen mit TGF- β 1

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht in Medium, das 10 % FKS enthielt, anwachsen lassen. Um eine Voraktivierung der Zellen durch verschiedenste Faktoren aus dem Serum zu minimieren, wurden die Zellen über Nacht für mindestens 12 h in Medium, das nur 0,5 % FKS enthielt, ausgehungert. Diese Minimalkonzentration an Serum war nötig, da primäre Fibroblasten ganz ohne Serum nicht längere Zeit gehalten werden können. Um die Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch TGF- β 1 untersuchen zu können, wurde anschließend zu den Zellen rekombinantes TGF- β 1 (R&D Systems) in einer Konzentration von 5 ng/ml direkt in das Minimalmedium mit 0,5 % FKS gegeben. Die Zellen wurden bei 37° C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten (meist 5, 15, 30 und 60 min) untersucht. Als unstimulierte Kontrolle blieb je eine 10 cm Schale unbehandelt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen sofort in 4° C kaltem PBS mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 15 ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1200 U/min, 5 min, 4° C). Anschließend wurde aus dem Zellpellet entweder der Gesamtprotein-Extrakt (siehe 3.2.2.1) oder der Zytoplasma- und Nukleus-Extrakt (siehe 3.2.2.2) gewonnen.

3.2.1.11 Aktivierung von Zellen mit TGF- β 1 im serumfreien Zellkultursystem zur Untersuchung der α -smooth-muscle Aktin Expression

Um den Einfluss von Serum auf die TGF- β 1 induzierte α -SMA Expression in Kollagen Gelen auszuschließen, wurde der Versuch in einem serumfreien Zellkultursystem (Grotendorst *et al.* 2004) wiederholt. Mit Hilfe der 3T3 Methode (siehe 3.2.1.4) immortalisierte Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten wurden so auf Deckgläschen ausgesät, dass sie nach 6 Tagen in DMEM mit 10 % FKS konfluent gewachsen waren. Anschließend wurde das Medium gegen so genanntes ITS-Medium ausgetauscht. Dieses bestand aus DMEM Medium, das mit Insulin (5 μ g/ml), Transferrin (5 μ g/ml) und Selenium (5 ng/ml) (ITS Premix, BD Biosciences) versetzt wurde. Die Zellen wurden 8 Tage lang in diesem Minimalmedium ausgehungert. Anschließend wurde den Zellen 5 ng/ml TGF- β 1 zugegeben und die Zellen für weitere 2 Tage inkubiert. Um die α -SMA Expression zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen (siehe 3.2.1.6) der Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen α -SMA angefertigt. Zusätzlich wurden Proteinextrakte der Zellen hergestellt, die im Western Blot (siehe 3.2.2.7) mit dem entsprechenden α -SMA Antikörper analysiert wurden.

3.2.1.12 Proliferations-Assay

Die Proliferationskapazität der verschiedenen Fibroblastentypen (Syndecan-4 +/+, Syndecan-4 +/-, Syndecan-4 -/-) wurde mit Hilfe des „Celltiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay“ der Firma Promega bestimmt. In eine 96-Well-Platte wurden primäre Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten in einer Dichte von 2500 Zellen/Well jeweils als Triplets ausgesät und diese für einige Stunden in 10 % FKS anhaften gelassen. Anschließend wurde das Medium gegen Medium mit 0,5 % FKS ausgetauscht und die Zellen darin für mindestens 12 h ausgehungert. Die Fibroblasten wurden dann in folgenden Medien jeweils für 12, 24 und 48 h inkubiert: 0,5 % FKS \pm 5 ng/ml TGF- β 1, 10 % FKS \pm 5 ng/ml TGF- β 1. Nach diesen Inkubationszeiten wurde die Proliferationsrate der Zellen gemessen. Hierzu wurden 20 μ l der „Celltiter 96 Aqueous One“ Lösung direkt in das Medium der Zellen gegeben und exakt für eine Stunde inkubiert. Die Lösung enthält eine Tetrazolium-Komponente, die von metabolisch aktiven Zellen in ein farbiges Formazanprodukt umgewandelt wird. Die Absorption des durch die Zellen in einer Stunde

gebildete Formazanprodukts wurde in einem ELISA Reader bei 490 nm gemessen. Die Menge an gebildetem Formazan und damit auch die Absorption ist proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur bzw. in dem entsprechenden Well. Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte der einzelnen Zeitpunkte aufgetragen und verglichen.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen

Um aus Zellen die Gesamtproteine zu isolieren, wurden die Zellen von ein bis zwei 10 cm Schalen mit einem Zellschaber in kaltem PBS abgekratzt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (1200 U/min, 5 min, 4° C). Das Zellpellet wurde in 100-200 µl Lysepuffer resuspendiert und die Zellen 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden Zellreste durch Zentrifugation (13.000 U/min, 2 min, 4° C) abgetrennt und der Proteingehalt des Zell-Lysats bestimmt (siehe 3.2.2.4).

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

2 mM EDTA

1 % (v/v) Nonidet P-40

0,1 % (w/v) SDS

50 mM NaF

1 mM PMSF

1 Tablette Complete Mini pro 50 ml Puffer (Protease-Inhibitor-Mix, Roche Biochemicals)

3.2.2.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen in Kollagen-Gelen

Um aus Zellen, die in Kollagen-Gele eingesät wurden die Proteine zu isolieren, mussten die Zellen zunächst wieder aus den Gelen herausgelöst werden. Dazu wurde je ein Gel in einer 3,5 cm Schale 10 min bei 37° C mit 300 µl 0,05 % Trypsin/0,5 mmol/l EDTA vorverdaut. Das Trypsin wurde abgesaugt, die Gele mit einem Skalpell in Stückchen geschnitten und in 15 ml Röhrchen überführt. Zu jedem Röhrchen wurde anschließend

300 µl Collagenase Typ 4 (5 mg/ml) gegeben. Die Gelstückchen wurden ca. eine halbe Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren verdaut. Sobald das Kollagen-Gel vollständig aufgelöst war, wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 U/min, 10° C, 10 min). Das Zellpellet wurde je nach Größe in 40-60 µl Lysepuffer (siehe 3.2.2.1) aufgenommen und 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden Zellreste durch Zentrifugation (13.000 U/min, 2 min, 4° C) abgetrennt und je 40 µl der Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 3.2.2.5).

3.2.2.3 Herstellung von Zytoplasma- und Nukleus-Extrakten

Zur Herstellung von zytoplasmatischen Extrakten wurden die Zellen einer 10 cm Schale mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (Greiner) in kaltem PBS von der Platte abgekratzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1200 U/min, 5 min, 10° C) und das Zellpellet in 150 µl Niedrigsalz-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden 10 min lang auf Eis lysiert und anschließend bei 4000 U/min für 2 min bei 4° C abzentrifugiert. Der Überstand, der den zytoplasmatischen Extrakt darstellt, wurde abgenommen und zur Proteinbestimmung aufgehoben. Das die Zellkerne enthaltende Pellet wurde einmal vorsichtig mit Niedrigsalz-Puffer gewaschen, um Verunreinigungen des Nukleus-Extraktes mit zytoplasmatischen Proteinen zu vermeiden. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Hochsalz-Puffer aufgenommen und für 30 min auf Eis lysiert. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (8000 U/min, 2 min, 4° C) wurden die verbliebenen Zellreste abgetrennt. Der Überstand (Nukleus-Extrakt) wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Niedrigsalz-Puffer:

20 mM	HEPES pH 7,9
10 mM	KCl
1 mM	EDTA
0,2 % (v/v)	NP-40
10 % (v/v)	Glycerin
50 mM	NaF
1 mM	PMSF

Hochsalz-Puffer:

20 mM	HEPES pH 7,9
10 mM	KCl
420 mM	NaCl
1 mM	EDTA
20 % (v/v)	Glycerin
50 mM	NaF
1 mM	PMSF

3.2.2.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Sämtliche Proteinbestimmungen wurden mit der Methode nach Lowry in der Modifikation nach Langner (Langner *et al.* 1971) durchgeführt. Als Standard diente eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Von dem Standard wurden 5, 10, 15 und 20 µl gemessen und von den Proben wurden Aliquots von 10 und 20 µl bestimmt. Alle Proben und Standards wurden mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, mit 1 ml Reagenz A versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Reagenz B zugesetzt, gut gemischt und erneut 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Ansätze wurde bei 660 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Standardkonzentrationen berechnet.

Reagenz A:

- 100 Teile 3 % Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH
- 1 Teil 4 % Na⁺/K⁺ -Tartrat in ddH₂O
- 1 Teil 2 % CuSO₄ in ddH₂O

Alle Komponenten wurden zunächst einzeln angesetzt und kurz vor Gebrauch gemischt. CuSO₄ wurde als letzte Komponente zugegeben.

Reagenz B:

- 1 Teil Folin-Reagenz
- 2 Teile ddH₂O

Ebenfalls kurz vor Gebrauch mischen

3.2.2.5 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Für alle SDS-Gelelektrophoresen wurde das Mini-PROTEAN[®] 3 System der Firma Biorad verwandt. Grundsätzlich kamen nur Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel zum Einsatz. Der Aufbau und die Durchführung der SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit 4-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95° C gekocht. Die Elektrophoresen wurde bei konstanter Spannung von 100 V durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie Blue gefärbt oder für Western Blots verwendet (siehe 0).

Zur Färbung wurden die Gele 30 min unter leichtem Schütteln in Coomassie-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie in der Entfärber-Lösung so lange geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren und die Hintergrundfärbung vollständig verschwunden war. Schließlich wurden die Gele fotografiert.

Acrylamid-Stammlösung

40 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Appligene)

Sammelgel

5 %

ddH ₂ O	6 ml
40 % Acrylamid-Lösung	1,25 ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	10 µl

Trenngel

5 %

10 %

ddH ₂ O	6 ml	5 ml
40 % Acrylamid-Lösung	1,25 ml	2,4 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Probenpuffer (4-fach konzentriert)

0,2 M	Tris-HCl pH 6,8
50 %	Glycerin
4 %	SDS
0,2 M	DTT
0,04 %	Bromphenolblau

Elektrophorese-Puffer (1X)

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Coomassie-Lösung

0,25 g	Coomassie Brilliant Blue R250
45 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärber-Lösung

45 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure

3.2.2.6 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden, indem diese durch Elektrotransfer auf proteinbindende Membranen übertragen werden. Hierfür wurde eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran der Firma Millipore verwendet. Die Membran wurde nacheinander kurz in Ethanol und ca. 5 min in Transferpuffer geschwenkt. Der Transfer der Proteine auf die Membranen erfolgte im Tankblotverfahren mit dem Mini Trans-Blot System der Firma Biorad nach Angaben des Herstellers bei 100 V und 350 mA für 1,5 – 2 Stunden.

Transferpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin

3.2.2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zunächst eine Stunde lang bei Raumtemperatur, oder alternativ über Nacht bei 4° C, in Blockierlösung geschwenkt, um vorhandene freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach kurzem Waschen in PBS wurde die Membran für eine bis mehrere Stunden bei Raumtemperatur in der primären Antikörper-Lösung geschwenkt. Es folgten drei mindestens 15-minütige Waschschriffe mit PBS/Tween und anschließend eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden POD-

konjugierten sekundären Antikörper. Nach erneutem Waschen mit PBS/Tween (3 x 15 min) wurde der Blot für 5 min in ECL Lösung (ECL plus System, Amersham) inkubiert, mit Whatman-Filterpapier getrocknet, zwischen zwei klare Plastikfolien eingeschlagen und in eine Filmkassette gelegt. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms (Kodak) detektiert. Zur Auswertung der Intensitäten der einzelnen Banden der Western Blots wurde das Computerprogramm „Scion Image“ (Scion Corporation) benutzt.

PBS/Tween

1x PBS + 0,02 % (v/v) Tween-20

Blockierlösung

5 % Magermilchpulver (w/v) in PBS/Tween-20

Antikörper-Lösung

Primärer bzw. sekundärer Antikörper verdünnt in 5 % Magermilchpulver in PBS/Tween-20

3.2.2.8 Immunologischer Nachweis von phosphorylierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von phosphorylierten Proteinen mit phosphospezifischen Antikörpern erfolgte im wesentlichen wie in Kapitel 3.2.2.7 beschrieben, jedoch ergaben sich folgende Änderungen. Als Waschpuffer wurde TBS/T benutzt. Nachdem die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert wurde (5 % Milchpulver in TBS/T), wurde sie mit den phosphospezifischen Antikörpern immer über Nacht bei 4° C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die phosphospezifischen Antikörper wurden im Gegensatz zu anderen Antikörpern nicht in 5 % Milchpulver verdünnt, da dieses eine Reihe von phosphorylierten Proteinen enthalten kann. Stattdessen wurden die primären Antikörper in 5 % BSA (PAA Laboratories) in TBS/T verdünnt. Die Membran wurde nach der Inkubation mit dem primären Antikörper dreimal für 5 min mit TBS/T gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, verdünnt in 5 % Milchpulver in TBS/T, inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für je 5 min

wurde der Blot wurde für 5 min in ECL Lösung (ECL plus System, Amersham) inkubiert und wie oben beschrieben entwickelt.

TBS/T

TBS + 0,1 % (v/v) Tween-20

3.2.2.9 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Um eine Membran erneut mit einem Antikörper inkubieren zu können, mussten zunächst bereits an die Membran gebundene Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran exakt für 5 min bei RT in 0,2 M NaOH geschwenkt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 1 min bei RT mit reichlich TBS/T gewaschen, erneut blockiert und mit Antikörpern inkubiert (siehe 3.2.2.7).

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Für die Experimente mit primären Fibroblasten musste vorher deren Genotyp (Wildtyp, Syndecan-4 heterozygot oder Syndecan-4 Knockout) (siehe 3.2.1.3) bekannt sein. Dazu wurde eine Genotypisierung der jeweiligen Maus, aus der die Zellen isoliert wurden, anhand des Schwanzgewebes durchgeführt. Für die Isolation der genomischen DNA wurden die tiefgefrorenen Schwänze aufgetaut und mit 500 µl Lysepuffer und 20 µl ProteinaseK (20 mg/ml, Sigma) versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 56° C geschüttelt, wobei sich das Gewebe auflöste und die DNA frei wurde. Diese wurde anschließend durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt. Hierzu wurde zu dem Lyseansatz 500 µl Phenol gegeben, das Gemisch kurz geschüttelt und 10 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Chloroform versetzt, erneut gut geschüttelt und 5 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 0,8 Volumen Isopropanol geschüttelt. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 U/min und 4° C wurde das entstandene DNA-Pellet einmal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst. Der anschließende Nachweis des Neomycin/Syndecan-4 Knockout-Konstrukts in der

genomischen DNA erfolgte mit einer PCR-Reaktion. Dazu wurde die genomische DNA 1:10 mit TE Puffer verdünnt und hiervon 1 µl für einen 25 µl PCR-Ansatz (siehe 3.2.3.4) verwendet. Die verwendeten Primer für die Typisierungs PCR sind in Kapitel 3.1.1.5 aufgeführt. Die PCR wurde folgendem Temperaturprogramm unterzogen:

Primäre Denaturierung:	5 min, 94° C
35 Zyklen:	30 s 94° C
	30 s 58° C
	30 s 72° C
finale Elongation:	2 min 72° C

Lysepuffer

50 mM	Tris-HCl pH 8,0
0,1 M	NaCl
50 mM	EDTA
1 % (w/v)	SDS

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem Beckman-Photometer, indem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O als Referenzwert gemessen wurde. Eine Extinktion von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der DNA/RNA an. Reine DNA weist einen Quotienten von $OD_{260}/OD_{280} = 1,6-1,8$ und reine RNA von 1,8-2,0 auf. Proteinkontaminationen führen zu einer erhöhten Absorption bei der Wellenlänge 280 nm und somit zu einem erniedrigten Koeffizienten.

3.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Zur präparativen und analytischen Auftrennung von DNA wurden, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente, Agarosegele mit einem Agarosegehalt von 0,8 % bis 1,5 % gegossen. Dazu wurde die Agarose in 50-100 ml 1x TBE Puffer unter Aufkochen in

der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen mit 1-3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, ICN) versetzt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein 100 bp DNA Größenmarker (NEB) mit aufgetragen und die Elektrophorese bei ca. 5 V/cm in 1x TBE durchgeführt.

1x TBE Puffer:

100 mM	Tris-HCl ph 8,4
90 mM	Borat
1 mM	EDTA

5x DNA-Probenpuffer:

30 % (w/v)	Glycerin
0.25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF

3.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch die Verwendung von zwei spezifischen Oligonukleotidprimern, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der Ziel-Sequenz sind, begrenzt.

Für die PCR-Reaktionen wurde entweder die Taq-DNA-Polymerase (NEB) oder die Deep-Vent-DNA-Polymerase (NEB) eingesetzt. Die Deep-Vent-DNA-Polymerase weist im Vergleich zur Taq-DNA Polymerase eine erheblich geringere Fehlerrate auf. Der Reaktionsansatz für eine Standard-PCR enthielt folgende Reagenzien:

100 – 300 ng	DNA-Template
2,5 µl	10 x ThermoPol-Puffer (NEB)
0,5 µl	dNTP-Mix (je 10 mM) (Eppendorf)
1 µl	forward Primer (10 pmol/µl)
1 µl	reverse Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Taq- / DeepVent-Polymerase
ad 25 µl	ddH ₂ O

Alle PCR-Reaktionen wurden im „PCR-Cycler Mastercycler personal“ der Firma Eppendorf durchgeführt und der Erfolg der PCR anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

4 Ergebnisse

Syndecan-4 Knockout Mäuse weisen eine deutliche Verzögerung bei der Heilung von Hautwunden auf, die sich durch eine fehlende Akkumulation von Granulationsgewebe sowie einer reduzierten Kontraktion während der ersten Tage der Wundheilung äußert (Echtermeyer *et al.* 2001). Bisher sind die zellulären Ursachen, die diesen Wundheilungsstörungen zu Grunde liegen, jedoch nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die genauen zellulären Mechanismen, die zu den beschriebenen Wundheilungsverzögerungen in Syndecan-4 Knockout Mäusen führen, zu untersuchen.

4.1 Untersuchungen zu den möglichen zellulären Ursachen der reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe in Syndecan-4 Knockout Mäusen

Bei der Heilung von Hautwunden konnte während der ersten Tage eine deutliche Reduktion der Akkumulation von Granulationsgewebe sowohl in Wunden von Syndecan-4 Knockout Mäusen als auch von Syndecan-4 heterozygoten Mäusen festgestellt werden (Echtermeyer *et al.* 2001). In dieser Arbeit wurden zunächst die zellulären Ursachen, die zu dieser reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe in Syndecan-4 defizienten Mäusen führen könnten, untersucht.

4.1.1 Vergleich der Wanderungskapazität der Fibroblasten

Nach einer Hautverletzung werden dermale Fibroblasten aus dem umgebenen unverwundeten Gewebe durch verschiedene Faktoren, wie z. B. PDGF und EGF, aktiviert und wandern von den Wundrändern ausgehend in die Wunde ein. Dort werden sie zur Proliferation angeregt und synthetisieren neue Matrixproteine, die das Granulationsgewebe bilden. Die Einwanderung von dermalen Fibroblasten in das Wundgebiet stellt somit die Voraussetzung für die Bildung von Granulationsgewebe dar. Gleichzeitig beginnen basale Keratinozyten über das Wundbett zu migrieren, um die Wunde mit einer neuen Epidermis zu bedecken. Während der Wundheilung in Syndecan-4 Knockout Mäusen ist dieser Vorgang der Reepithelialisierung im Gegensatz zur Bildung von Granulationsgewebe jedoch nicht verändert oder verzögert (Echtermeyer *et al.* 2001). Aus diesem Grund

wurden nur die migratorischen Fähigkeiten von Syndecan-4 $-/-$ und Syndecan-4 $+/-$ Fibroblasten untersucht und mit Wildtyp Fibroblasten verglichen.

Hierzu wurden primäre dermale Fibroblasten aus neugeborenen Wildtyp, Syndecan-4 $+/-$ und Syndecan-4 $-/-$ Mäusen verwendet. Für die Untersuchung der Wanderungskapazität wurde ein *in vitro* Wundheilungsassay, der so genannte Scratch-Assay, durchgeführt. Primäre dermale Fibroblasten wurden auf Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bis zu einer Konfluenz von 90 % wachsen gelassen. Der Versuch wurde parallel mit je drei Ansätzen pro Genotyp mit 10 % FKS und 0,5 % FKS im Medium durchgeführt. Pro Zelltyp wurden drei Wunden gesetzt, indem an drei verschiedenen Stellen des nahezu konfluenten Zellmonolayers mit einer Pipettenspitze gleichmäßig Zellen entfernt wurden. Anschließend wurde die Einwanderung der Fibroblasten in diese zellfreien Wunden nach 0, 8, 13, 21, 24, 28 und 32 Stunden fotografisch dokumentiert. Es wurden je Ansatz und Zeitpunkt drei „Wundbereiche“ fotografiert und die Fotos mit Hilfe eines Computerprogramms ausgewertet. Es wurde jeweils die Größe der verbliebenen offenen Fläche bestimmt und diese anschließend als Prozent der ursprünglich offenen Fläche aufgetragen (Abbildung 4.1a). Repräsentative Ausschnitte aus solchen Wundbereichen für die jeweiligen Zelltypen mit 10 % FKS direkt nach dem Entfernen der Zellen (0 Stunden) und nach 21 Stunden sind in Abbildung 4.1b) gezeigt.

Wie Abbildung 4.1a) zeigt, waren Wildtyp Fibroblasten in Anwesenheit von 10 % FKS in der Lage, die gesetzten Wunden nach ca. 21-24 Stunden vollständig zu schließen. Im Gegensatz zu den Wildtyp Fibroblasten waren weder Syndecan-4 Knockout Fibroblasten noch Syndecan-4 heterozygote Fibroblasten nach 24 Stunden vollständig in die Wundgebiete eingewandert. Sowohl Syndecan-4 $+/-$ als auch Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten benötigten ca. 28 Stunden, um die offenen Bereiche vollständig zu schließen. Im Parallelversuch mit 0,5 % FKS zeigte sich dasselbe Ergebnis, allerdings mit einer zeitlichen Verzögerung. Die Wildtyp Fibroblasten wiesen auch hier eine höhere Migrationskapazität auf und konnten die Wunden in ca. 28 Stunden vollständig schließen. Die Wunden in den Ansätzen der Syndecan-4 heterozygoten und homozygoten Fibroblasten wiesen nach 32 Stunden keine offenen Bereiche mehr auf.

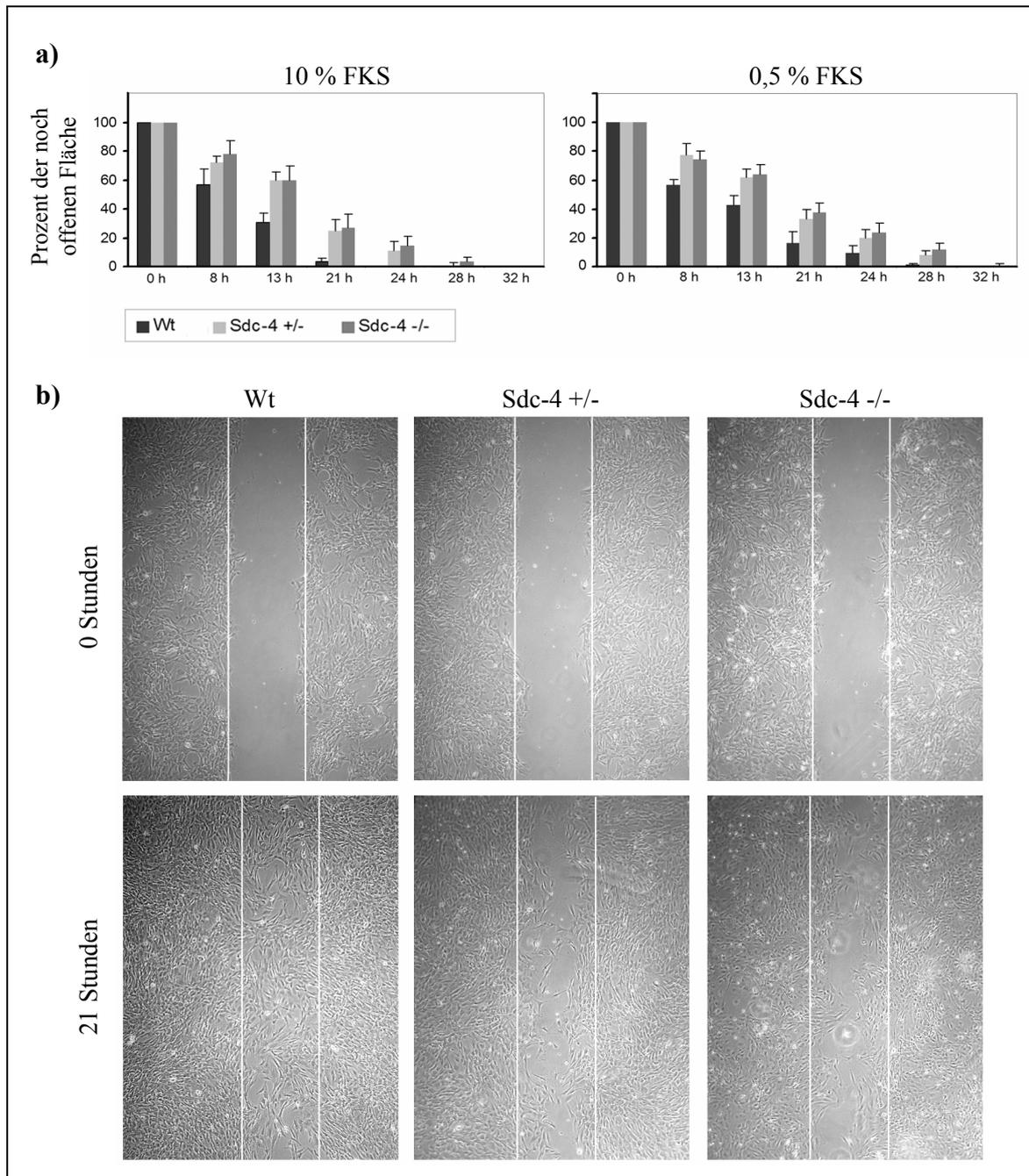


Abbildung 4.1: Migrationskapazität von Syndecan-4 defizienten Fibroblasten

a) Zur Bestimmung der Wanderungskapazitäten von Syndecan-4 +/- und Syndecan-4 -/- Hautfibroblasten wurden in konfluente Zellmonolayer mit einer Pipettenspitze zellfreie Linien gekratzt. Die Migration der Fibroblasten in diese Wundbereiche wurde nach 0, 8, 13, 21, 24, 28 und 32 Stunden fotografiert und die Fläche der offenen Bereiche bestimmt. Der Versuch wurde mit 10 % und 0,5 % FKS im Medium durchgeführt. **b)** Hier dargestellt sind repräsentative Bereiche der Wunden von Syndecan-4 -/- und Syndecan-4 +/- Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp Fibroblasten nach 0 und 21 Stunden in Anwesenheit von 10 % FKS. Zur besseren Übersicht wurden die ursprünglichen Wundränder markiert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl Syndecan-4 -/- Fibroblasten als auch Syndecan-4 +/- Fibroblasten eine geringere Migrationskapazität aufwiesen als Wildtyp Fibroblasten. Diese wurde sowohl in Anwesenheit von 10 % FKS als auch mit einer minimalen Serumkonzentration von 0,5 % FKS nachgewiesen.

Während der Wundheilung beginnen die in die Wunde eingewanderten Fibroblasten zu proliferieren. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Proliferationsrate von Wildtyp- und Syndecan-4 -/- Fibroblasten betrachtet.

4.1.2 Vergleich der Proliferationsrate

Angeregt durch Wachstumsfaktoren in der Wunde, wie FGF oder TGF- β 1, beginnen sowohl Fibroblasten der Wundränder als auch Fibroblasten, die schon in die Wunde eingewandert sind, zu proliferieren und vermehrt Matrix-Moleküle zu synthetisieren. Eine geringere Proliferationsrate von Syndecan-4 defizienten Fibroblasten könnte eine verminderte Einwanderung von Zellen in den Wundbereich sowie eine verminderte Produktion von Matrix-Komponenten zur Folge haben. Um dies zu prüfen, wurde die Proliferation von Syndecan-4 -/- Hautfibroblasten und Wildtyp Fibroblasten verglichen. Die Fibroblasten wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und anhaften gelassen. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 0,5 % FKS für 12 Stunden inkubiert. Das Medium wurde gewechselt und gegen Medium mit 10 % und 0,5 % FKS ausgetauscht. Da der Einfluss von TGF- β 1 auf die Proliferation untersucht werden sollte, wurden die verschiedenen Serumkonzentrationen jeweils mit und ohne 5 ng/ml TGF- β 1 getestet. Die Zellen wurden in diesen Medien 12, 24 und 48 Stunden lang inkubiert. Zur Bestimmung der Proliferation wurde ein Proliferations-Assay verwendet, bei dem ein farbiges Formazanprodukt entsteht (siehe Kapitel 3.2.1.12). Dieses konnte direkt photometrisch bestimmt werden und war proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur bzw. in dem entsprechenden Well. Die Zunahme der Absorption nach 12, 24 und 48 Stunden Inkubation in den unterschiedlichen Medien ist für Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten in Abbildung 4.2 dargestellt.

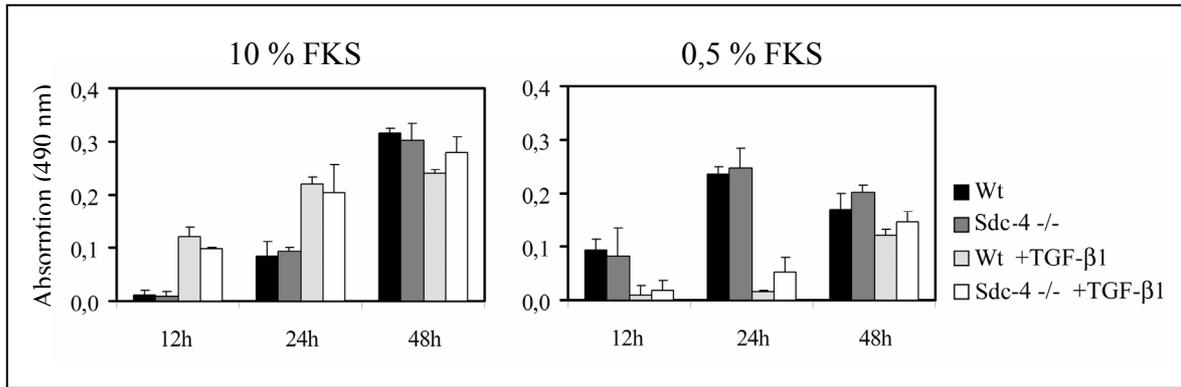


Abbildung 4.2: Einfluss von TGF-β1 auf die Proliferation von Wildtyp und Syndecan-4 Knockout Fibroblasten

Primäre Syn-4 +/+ und Syn-4 -/- Fibroblasten wurden in einer Dichte von je 2500 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 12 Stunden in Medium mit 0,5 % FKS inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 12, 24 und 48 Stunden in 10 % und 0,5 % FKS, jeweils mit und ohne 5 ng/ml TGF-β1, inkubiert. Um die Proliferation zu bestimmen, wurde nach den entsprechenden Zeitpunkten zum Medium 20 µl „CellTiter 96® Aqueous One Lösung“ zugegeben. Diese enthält eine Tetrazolium-Komponente, die von metabolisch aktiven Zellen zu einem kolorimetrisch messbaren Formazanprodukt reduziert wird. Nach einer Inkubation von je 1 Stunde wurde die Absorption bei 490 nm gemessen und die Absorptionzunahme aufgetragen.

Im Medium mit 10 % FKS erhöht sich die Proliferationsrate beider Zelltypen in den ersten 24 Stunden nur gering. Nach 48 Stunden war jedoch eine deutliche Zunahme der Proliferation beider Zelltypen zu verzeichnen. Die zusätzliche Zugabe von TGF-β1 zu den 10 % FKS hatte besonders in den ersten 24 Stunden einen proliferativen Effekt auf die Zellen. Es bestanden jedoch keine Unterschiede in der Proliferation zwischen Wildtyp und Syndecan-4 defizienten Fibroblasten.

Im Medium mit 0,5 % FKS zeigten die Zellen in den ersten 24 Stunden eine hohe proliferative Aktivität. Nach 48 Stunden war diese hohe Proliferationsrate jedoch deutlich abgesunken. Wurde dem Medium mit 0,5 % FKS TGF-β1 zugegeben, wiesen die Zellen im Vergleich zum Medium ohne TGF-β1 in den ersten 24 Stunden eine reduzierte Proliferation auf. Erst nach 48 Stunden war ein Anstieg der Proliferation zu verzeichnen.

Es zeigte sich, dass die Proliferationsrate der Zellen je nach FKS Gehalt des Mediums einen unterschiedlichen Verlauf nahm. Auch die Zugabe von TGF-β1 wirkte sich je nach FKS Anteil entweder proliferativ (10 % FKS) oder antiproliferativ (0,5 % FKS) auf die Zellen aus. Abgesehen von diesen Unterschieden zwischen den einzelnen Medien ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen Wildtyp und Syndecan-4 defizienten Fibroblasten feststellen.

4.2 Untersuchungen zu den möglichen zellulären Ursachen der fehlenden Wundkontraktion in Syndecan-4 Knockout Mäusen

In den Wunden von Syndecan-4 Knockout Mäusen wurde ebenfalls das Fehlen der Wundkontraktion während der ersten Tage der Wundheilung festgestellt. Während die Wunden von Wildtyp-Mäusen bereits drei Tage nach der Wundsetzung deutlich kontrahiert sind, zeigen die Wunden von Syndecan-4 defizienten Mäusen zu diesem Zeitpunkt keine Wundkontraktion (Echtermeyer *et al.* 2001). Im Folgenden wurde untersucht, welche zellulären Ursachen dieser fehlenden Wundkontraktion zu Grunde liegen.

4.2.1 Die Kontraktionsfähigkeit von Hautfibroblasten

Die Kontraktion einer Hautwunde geht von den Fibroblasten im Granulationsgewebe aus, die die Wundränder zusammenziehen. Die Fähigkeit von Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten, eine Kollagen-Matrix zu kontrahieren, wurde mit einem *in vitro* Assay für die Untersuchung von Wundkontraktion, dem Kollagen-Gel-Kontraktionsassay, untersucht. Die gleiche Anzahl an primären Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurde in eine Kollagen-Lösung eingesät, so dass die Fibroblasten in dem auspolymerisierten Gel vollständig von einer Kollagen-Matrix umgeben waren, was den Verhältnissen im Granulationsgewebe einer Wunde nahe kommt. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurden diese vom Rand der Zellkulturschale abgelöst, was eine Kontraktion der Gele ermöglichte. Da bereits bekannt ist, dass Syndecan-4 Knockout Fibroblasten in Anwesenheit von 10 % FKS keine Unterschiede zu Wildtyp Fibroblasten in der Kontraktion zeigen (Echtermeyer *et al.* 2001), wurde der Assay nur mit einer Minimalkonzentration von 0,5 % FKS durchgeführt. Diese Minimalzugabe an FKS war nötig, da ohne FKS nur eine sehr geringe Kontraktion der Gele stattfand. Des Weiteren wurde der Effekt des Wachstumsfaktors TGF- β 1 auf die Kontraktionsfähigkeit der Fibroblasten untersucht. TGF- β 1 beschleunigt die Kontraktion von Kollagen-Gelen deutlich (Montesano & Orci 1988) und spielt außerdem eine wichtige Rolle während der Wundheilung (O'Kane & Ferguson 1997). Jeder Versuch wurde mindestens dreimal parallel mit drei Gelen pro Versuchsbedingung und Zelltyp durchgeführt. Die Gele wurden für 24 Stunden inkubiert und anschließend fotografiert. Anhand dieser Fotos wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Scion Image“ die Größe der kontrahierten Gelflächen bestimmt. Hierbei diente ein auf jedem Foto mit

fotografiertes Lineal als Maßstab. Die Ausgangsgelfläche entsprach der Fläche der Zellkulturschale. Die Kontraktionsrate wurde als Größe der kontrahierten Gelfläche in Prozent der Ausgangsgelfläche berechnet.

Abbildung 4.3a) zeigt den Vergleich der Kontraktionsraten von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten und Wildtyp Fibroblasten mit und ohne TGF- β 1.

Ohne Zugabe von TGF- β 1 zu den Kollagen-Gelen unterschied sich die Kontraktion von Wildtyp Fibroblasten und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten nicht. Die Fläche der kontrahierten Gele betrug im Fall der Wildtyp Fibroblasten ca. 31 % (\pm 4,5 %) der Ausgangsgelfläche und im Fall der Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten ca. 35 % (\pm 3,5 %) der Ausgangsgelfläche.

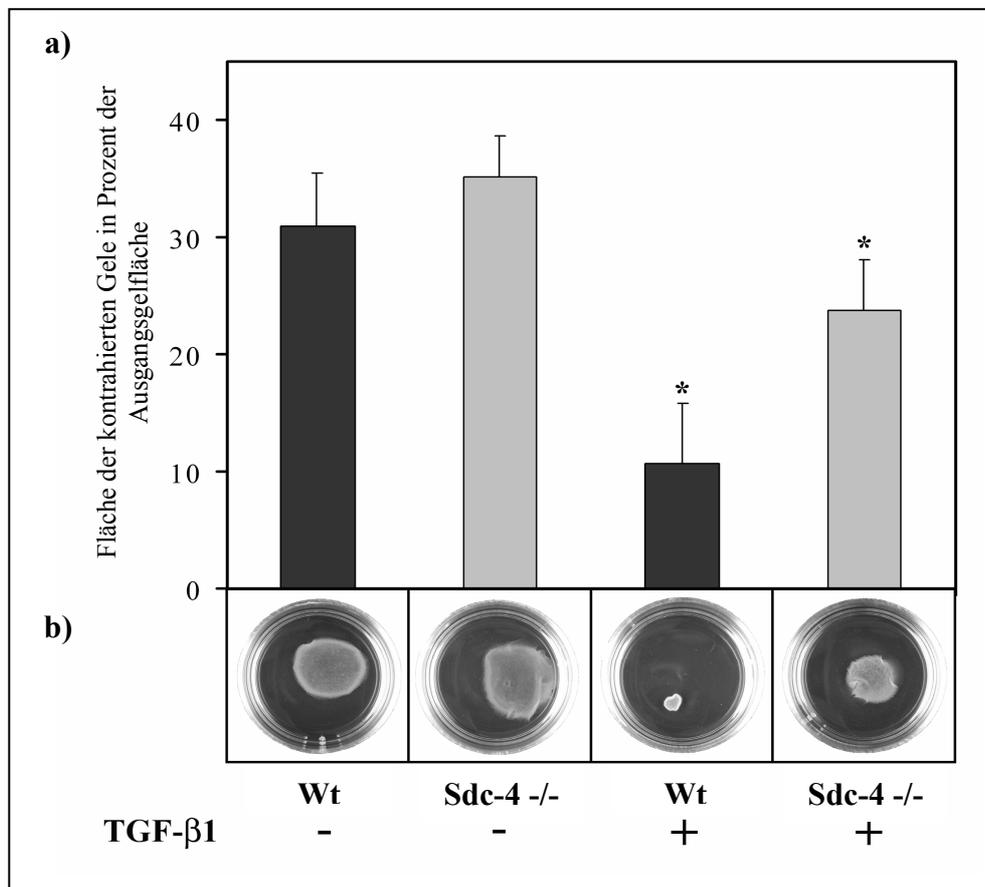


Abbildung 4.3: Untersuchung zur Kontraktionsfähigkeit von Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten

Primäre Fibroblasten wurden in Kollagen-Gele, die 0,5 % FKS bzw. 0,5 % FKS + 10 ng/ml TGF- β 1 enthielten, eingesät. Die Kontraktionsrate (Prozent der verbleibenden Gelgröße von der Ausgangsgelgröße) dieser Gele wurde nach 24 Stunden gemessen. Die Sternchen (*) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied. Abbildung **a)** zeigt den Vergleich der Kontraktionsraten der Syn-4 $-/-$ Fibroblasten und Wildtyp Fibroblasten. In Abbildung **b)** sind repräsentative Fotos der entsprechenden Gele nach 24 Stunden dargestellt.

Durch die Zugabe von TGF- β 1 zu den Gelen wurde sowohl die Kontraktion der Wildtyp Gele als auch die Kontraktion der Syndecan-4 Knockout Gele beschleunigt. Die Wildtyp Fibroblasten kontrahierten die Gele in 24 Stunden auf ca. 10 % (\pm 5 %) ihrer Ausgangsgröße. Sie waren demnach in Anwesenheit von TGF- β 1 in der Lage, die Gele in 24 Stunden um 90 % zu kontrahieren. Die Kontraktion von Syndecan-4 -/- Gelen wurde ebenfalls durch die Zugabe von TGF- β 1 beschleunigt, jedoch nicht in dem Maße wie im Fall der Wildtyp Fibroblasten. In Anwesenheit von TGF- β 1 wiesen Syndecan-4 defiziente Fibroblasten eine Kontraktion der Gele von ca. 25 % (\pm 4 %) ihrer Ausgangsgröße auf. Daraus ergab sich eine Kontraktion der Gele von ca. 75 %, was eine signifikante Reduktion der Kontraktion im Vergleich zu den Wildtyp Fibroblasten darstellte (* $p=0,008$ – signifikant). Die Fotos der Gele (Abbildung 4.3b) zeigen ebenfalls deutlich die geringere Kontraktion der Kollagen-Gele durch Syndecan-4 -/- Fibroblasten in Gegenwart von TGF- β 1.

Die Kontraktion einer Wunde geht zum einen von den Wundfibroblasten selber aus, wird aber zu einem großen Teil von spezialisierten Fibroblasten, den so genannten Myofibroblasten, vermittelt. Aus diesem Grund wurde die Differenzierungsfähigkeit von Syndecan-4 defizienten Fibroblasten in Myofibroblasten untersucht.

4.2.2 Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten

Die an der Kontraktion einer Wunde maßgeblich beteiligten Zellen sind die so genannten Myofibroblasten, die aus den Fibroblasten im Granulationsgewebe entstehen. Die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten wird durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1, sowohl *in vivo* (Desmouliere *et al.* 1993) als auch *in vitro* (Ronnov-Jessen & Petersen 1993), induziert. Myofibroblasten sind gekennzeichnet durch eine *de novo* Synthese von α -SMA, die für glatte Muskelzellen typische Aktin-Isoform und dessen Integration in das Zytoskelett. Dieses ermöglicht den Myofibroblasten starke Zugkräfte auf ihre Umgebung ausüben, was entscheidend zur Wundkontraktion beiträgt.

4.2.2.1 Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur Myofibroblasten-Differenzierung in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten

Um zu untersuchen, ob die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten durch das Fehlen von Syndecan-4 beeinflusst wird, wurden primäre Fibroblasten in Kollagen-Gele eingesät. Nach dem Auspolymerisieren der Kollagen-Lösung wurden diese Gele jedoch nicht, wie vorher beschrieben, von der Zellkulturschale abgelöst, sondern blieben über die ganze Versuchsdauer angeheftet. In diesen so genannten gestressten Kollagen-Gelen entwickelt sich eine Zugspannung, die der im Granulationsgewebe einer Wunde ähnelt (Arora *et al.* 1999), was die optimalen Bedingungen für die Differenzierung von Myofibroblasten darstellt. Die Gele enthielten 0,5 % FKS und zusätzlich 10 ng/ml TGF- β 1, um die Myofibroblasten-Differenzierung zu induzieren. Als Kontroll-Gele wurden parallel Gele nur mit 0,5 % FKS ohne TGF- β 1 analysiert. Alle Gele wurden für vier Tage inkubiert, anschließend fixiert und einer Immunfluoreszenz-Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen α -smooth-muscle Aktin (α -SMA) unterzogen. Für die spätere Auswertung von α -SMA positiven und negativen Fibroblasten wurden die Zellkerne mit Propidiumjodid gegengefärbt. In Abbildung 4.4a) sind Ausschnitte der Gele von Syndecan-4 $-/-$ und Wildtyp Fibroblasten jeweils mit und ohne TGF- β 1 zu sehen. Jeweils vier Immunfluoreszenz-Bilder, die repräsentative Ausschnitte der Gele beinhalteten, wurden mit einem Computerprogramm ausgewertet. Zuerst wurde anhand der Propidiumjodid gefärbten Zellkerne die Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Anschließend wurden nur α -SMA positive Zellen gezählt. Durch die Festlegung eines bestimmten Schwellenwertes für die α -SMA Färbung wurde sichergestellt, dass Zellen, die eine leichte Hintergrundfärbung aufwiesen, nicht als α -SMA positiv in die Zählung eingingen. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind als Prozentsatz der α -SMA positiven Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten jeweils mit und ohne TGF- β 1 in Abbildung 4.4b) dargestellt.

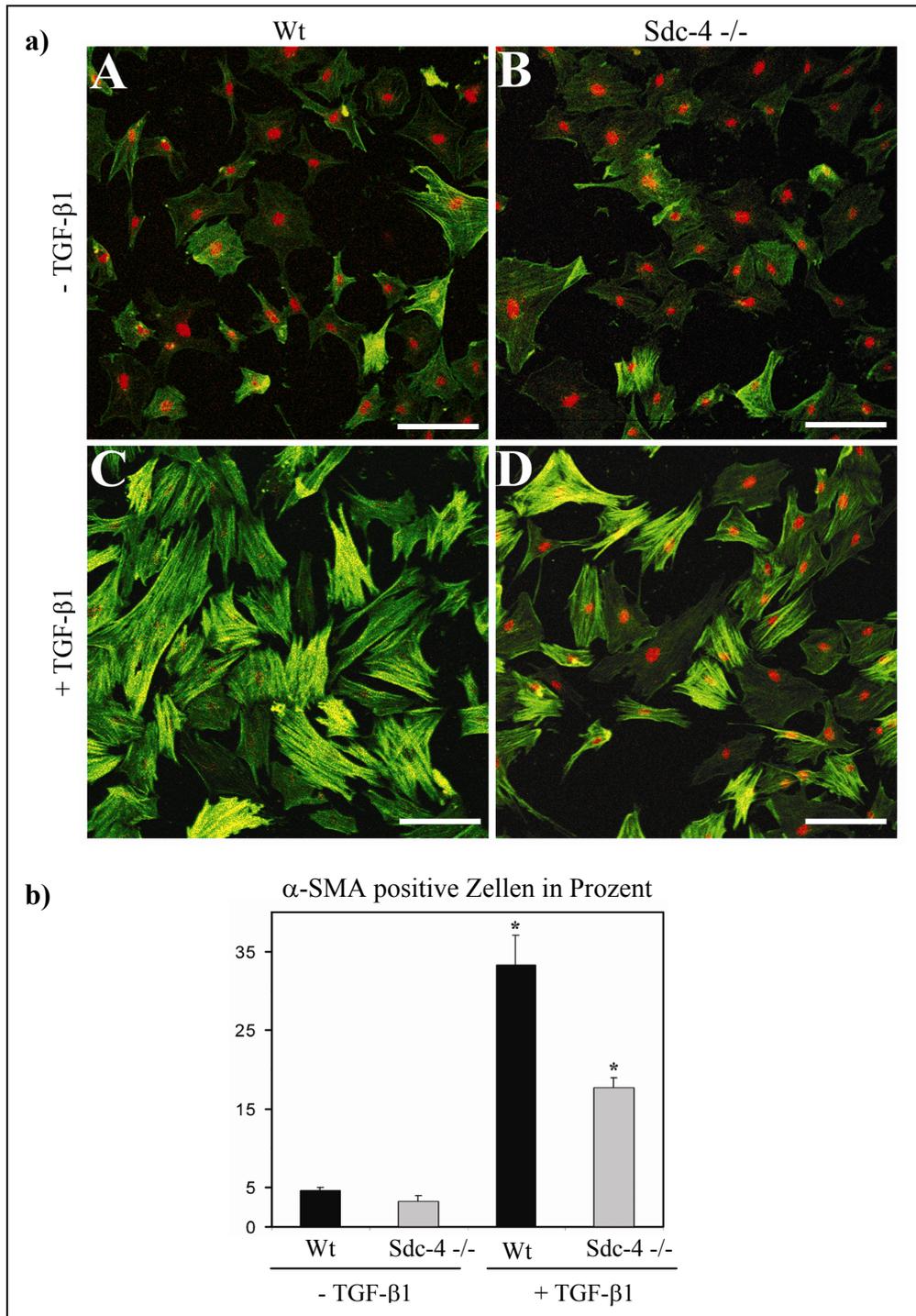


Abbildung 4.4: Untersuchung zur Differenzierung von Syndecan-4 -/- Fibroblasten zu Myofibroblasten

a) Primäre Fibroblasten wurden vier Tage lang in gestressten Kollagen-Gelen kultiviert. Zur Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung wurde einigen Gelen 10 ng/ml TGF-β1 zugegeben (untere Reihe). Die Gele wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen α-SMA (grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hilfe einer Propidiumjodid-Färbung (rot) sichtbar gemacht. Die Balken entsprechen jeweils 100 μm. Die Sternchen (*) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied. Abbildung **b)** zeigt die Prozentsätze an α-SMA positiven Syndecan-4 -/- und Wildtyp Fibroblasten mit und ohne TGF-β1.

Die Immunfluoreszenz-Abbildungen der gefärbten Gele zeigten, dass sowohl Wildtyp Fibroblasten als auch Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten ohne Zugabe von TGF- β 1 kaum α -SMA exprimierten. Ein Großteil der Zellen wies nur eine schwache Hintergrundfärbung auf und nur 4,5 % der Wildtypzellen und 3,3 % der Syndecan-4 $-/-$ Zellen waren eindeutig positiv für α -SMA. Im Fall der Wildtyp Fibroblasten wurde durch Zugabe von TGF- β 1 zu den Gelen die Expression von α -SMA deutlich induziert. Eine große Zahl von Fibroblasten zeigte mit TGF- β 1 eine sehr starke Färbung für α -SMA, und speziell die Aktin-Stressfasern der Zellen waren stark angefärbt, was bedeutet, dass das Protein in das Zytoskelett der Zelle integriert wurde. Die Auswertung der Bilder ergab, dass ca. 35 % der Wildtyp Fibroblasten α -SMA positiv waren. Durch die Zugabe von TGF- β 1 wurde zwar auch in den Syndecan-4 Knockout Fibroblasten die Expression von α -SMA induziert, jedoch wesentlich schwächer als in den Wildtyp Fibroblasten. Nur ca. 17 % der Syndecan-4 defizienten Fibroblasten waren eindeutig positiv für α -SMA.

Die durch TGF- β 1 induzierte Expression von α -SMA und somit die Differenzierung von Myofibroblasten scheint in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten um ca. 50 % reduziert zu sein. Um dieses Ergebnis für eine größere Anzahl von Zellen zu bestätigen, wurde die Expression von α -SMA zusätzlich in Western Blots überprüft.

4.2.2.2 Western Blot Analyse zur TGF- β 1 induzierten Expression von α -SMA

Um die mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbungen erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten, wie oben beschrieben, vier Tage lang in gestressten Kollagen-Gelen mit und ohne TGF- β 1 inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit Collagenase Typ 4 verdaut, um die Zellen aus den Gelen herauszulösen. Die Zellen wurden anschließend lysiert, und die Zell-Lysate wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen α -SMA analysiert (siehe 3.2.2.7). Zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge wurde das gleiche Gel anschließend mit einem Antikörper gegen β -Tubulin inkubiert.

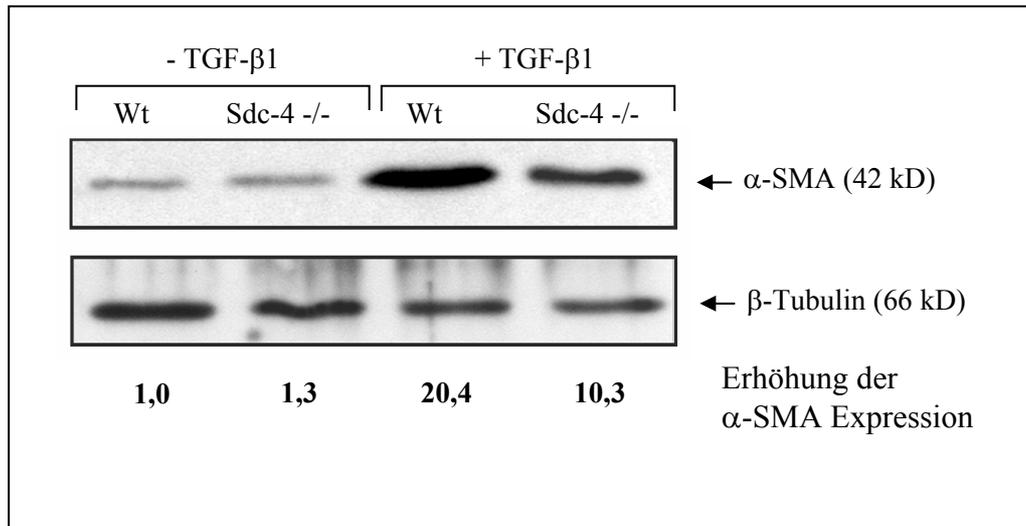


Abbildung 4.5: TGF-β1 induzierte Expression von α-SMA in Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten

Primäre Fibroblasten wurden vier Tage lang in gestressten Kollagen-Gelen kultiviert. Zur Induktion der α-SMA Expression wurde einigen Gelen 10 ng/ml TGF-β1 zugegeben. Die Zellen wurden anschließend aus den Gelen herausgelöst und ein Gesamtzell-Lysat hergestellt. Die Lysate wurden geblottet und mit einem Antikörper gegen α-SMA inkubiert. Zum Vergleich der Proteinmengen wurde ein Anti-β-Tubulin-Antikörper benutzt. Die Intensitäten der α-SMA Banden wurden gemessen und mit den zugehörigen β-Tubulin Banden abgeglichen. Die Werte sind als Erhöhung der α-SMA Expression angegeben, wobei der Wert der Wildtypzellen ohne TGF-β1 gleich 1,0 gesetzt wurde.

Die Analyse des Western Blots bestätigte die Ergebnisse der α-SMA Immunfluoreszenzfärbung (siehe 4.2.2.1). Ohne TGF-β1 wurden von Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten nur geringe Mengen an α-SMA exprimiert. Durch die Inkubation mit TGF-β1 wurde die Expression von α-SMA in beiden Fibroblastentypen induziert. In den Wildtyp Fibroblasten wurde die Expression von α-SMA durch TGF-β1 um das 20fache erhöht. In den Syndecan-4 Knockout Fibroblasten erhöhte sich die Menge an α-SMA nach Inkubation mit TGF-β1 hingegen nur um das 10fache. Die Syndecan-4 defizienten Fibroblasten zeigten sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch im Western Blot eine reduzierte Expression von α-SMA nach Inkubation mit dem Wachstumsfaktor TGF-β1.

4.2.2.3 Untersuchung der Myofibroblasten-Differenzierung von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten in einem serumfreien Zellkultursystem

Um den möglichen Einfluss von 0,5 % Serum auf die TGF- β 1 induzierte Myofibroblasten-Differenzierung ausschließen zu können, wurde die Untersuchung zur Myofibroblasten-Differenzierung von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten in einem serumfreien Zellkultursystem wiederholt. Die Kultur von primären Fibroblasten in diesem serumfreien System über mehr als zwei Wochen war jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wurden für diese Experimente immortalisierte Wildtyp und Syndecan-4 Knockout Fibroblasten hergestellt und verwendet.

4.2.2.3.1 Herstellung von immortalisierten Fibroblasten

Die Immortalisierung der Zellen wurde mit zwei verschiedenen Methoden erreicht. Zum einen wurden die primären Fibroblasten einer Transfektion mit dem großen Tumor-Antigen (large T) des SV40 Virus unterzogen, zum anderen wurden in der so genannten „3T3 Methode“ durch spontane Mutationen entstandene immortalisierte Zellklone selektiert (siehe 3.2.1.4).

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 Knockout Fibroblasten wurden in der 3.-5. Passage mit dem large T-Antigen transfiziert. Die einzelnen, schnell wachsenden Zellklone, die erfolgreich transfizierte und somit immortalisierte Fibroblasten darstellten, wurden isoliert. Parallel dazu wurden einige frisch isolierte Fibroblasten zunächst alle drei Tage, nach einigen Passagen dann nur noch bei Konfluenz, 1:3 gesplittet. Nach ca. 20 Passagen waren die meisten primären Zellen abgestorben. Jedoch waren aus einigen Zellen durch spontane Mutationen schnell wachsende immortalisierte Zellklone hervorgegangen. Diese wurden ebenfalls einzeln isoliert.

Um zu testen, ob sich die immortalisierten Zellen wie die primären Fibroblasten verhielten und zu weiteren Versuchen eingesetzt werden konnten, wurde mit den Zellen ein Migrationsassay durchgeführt. Die immortalisierten „3T3“ Syndecan-4 -/- Fibroblasten wiesen die gleichen Verzögerungen in der Migrationskapazität auf wie die primären Syndecan-4 -/- Fibroblasten. Die mit dem large T-Antigen transformierten Zellen zeigten keine Unterschiede mehr in ihrem Wanderungsverhalten.

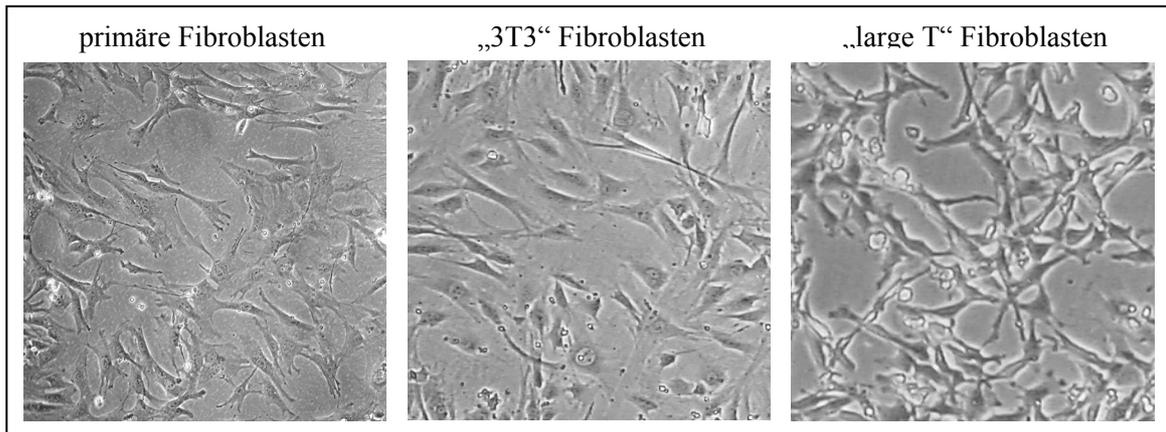


Abbildung 4.6: Immortalisierung primärer Fibroblasten mit verschiedenen Methoden

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurden mit der 3T3 Methode und durch Transfektion mit dem large T-Antigen immortalisiert. Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen der erfolgreich transformierten Zelllinien im Vergleich mit primären Fibroblasten.

Zudem wiesen die large T Zellen deutliche morphologische Unterschiede zu den primären Fibroblasten auf. Die 3T3 Fibroblasten hingegen zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich mit den Primärzellen (Abbildung 4.6). Aus diesem Grund wurden für den nachfolgenden Versuch die mit der 3T3 Methode immortalisierten Fibroblasten verwendet.

4.2.2.3.2 TGF- β 1 induzierte Expression von α -SMA in einem serumfreien Zellkultursystem

Die immortalisierten Wildtyp und Syndecan-4 Knockout Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 6 Tage bis zur Konfluenz in Medium mit 10 % Serum wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 8 Tage in so genanntem ITS-Medium ausgehungert. Dieses Medium besteht aus DMEM, dem ein Mix aus Insulin, Selen und Transferrin zugesetzt wurde. Nach 8 Tagen wurde diesem Medium 5 ng/ml TGF- β 1 zugegeben, um die α -SMA Expression zu induzieren (Grotendorst *et al.* 2004). Nachdem die Zellen für weitere 2 Tage mit TGF- β 1 bzw. als Kontrolle ohne TGF- β 1 inkubiert worden waren, wurden die Zellen einer Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen α -SMA unterzogen. Außerdem wurden Proteinextrakte der Zellen hergestellt und die α -SMA Expression zusätzlich im Western Blot überprüft.

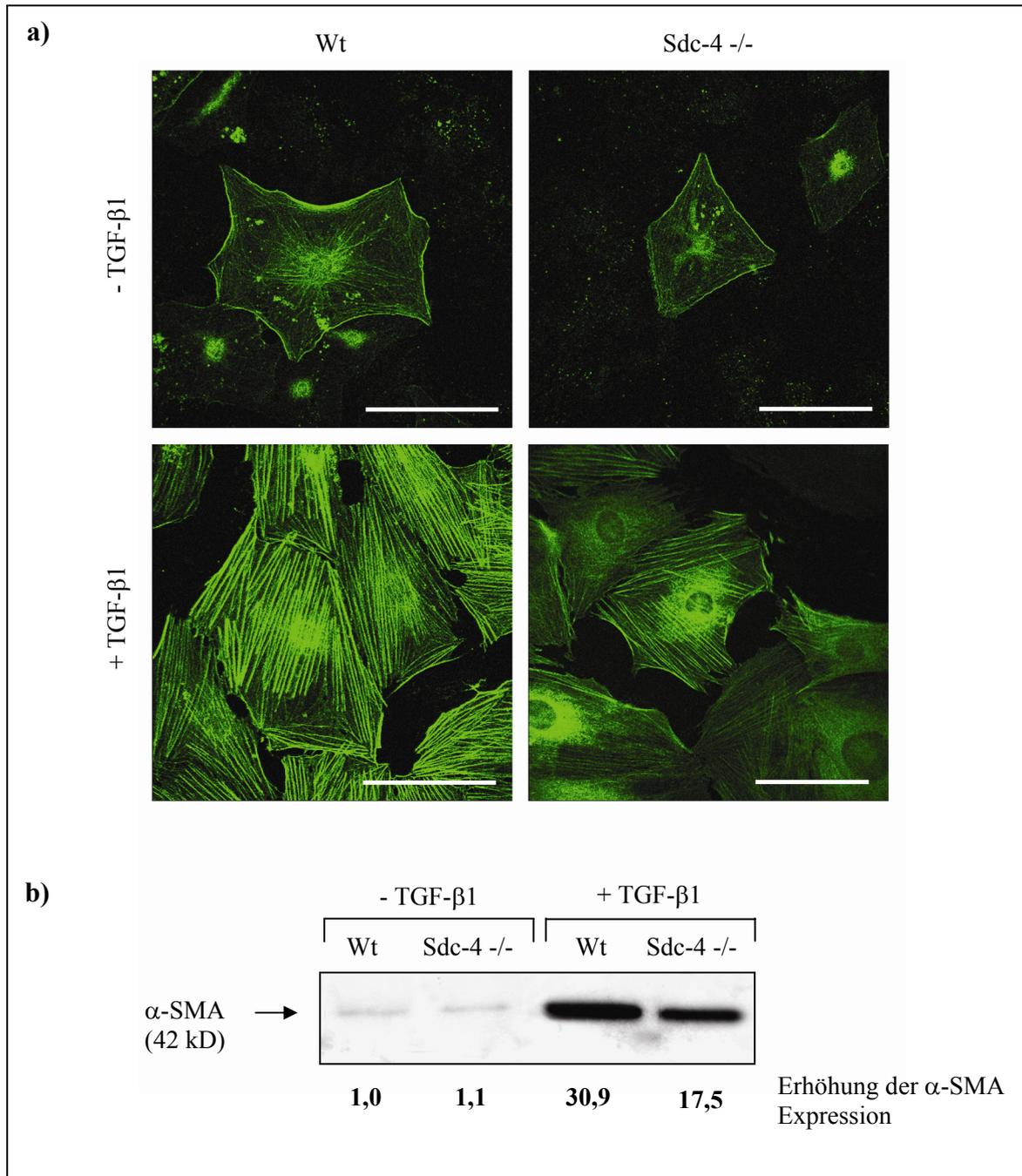


Abbildung 4.7: Untersuchung der α -SMA Expression nach TGF- β 1 Aktivierung der Zellen im serumfreien Zellkultursystem

Immortalisierte Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Fibroblasten wurden 6 Tage lang bis zur Konfluenz in Medium mit 10 % FKS wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 8 Tage in ITS-Medium ausgehungert. Um die Expression von α -SMA zu induzieren, wurden die Zellen anschließend 2 Tage lang in ITS-Medium +/- 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Abbildung **a)** zeigt die Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen mit einem α -SMA Antikörper. Die Balken entsprechen jeweils 100 μ m. **b)** Zusätzlich wurden Proteinextrakte der Zellen im Western Blot ebenfalls mit einem Antikörper gegen α -SMA analysiert. Nach Abgleich mit der β -Tubulin Menge wurde die α -SMA Expression im Vergleich mit den unstimulierten Wildtypzellen berechnet.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten die gleichen Ergebnisse wie die Immunfluoreszenz-Färbungen der Kollagen-Gele (Abbildung 4.4). Ohne TGF- β 1 wird kaum α -SMA von den Zellen gebildet und in die Aktin Stressfasern eingelagert. Auch im Western Blot war für die Wildtypzellen und die Syndecan-4 Knockout Fibroblasten nur eine schwache Bande für α -SMA zu erkennen.

Die Zugabe von TGF- β 1 induzierte auch in diesem Versuch die α -SMA Expression von Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten. Die Immunfluoreszenz-Färbung der Wildtyp Fibroblasten zeigte eine deutliche α -SMA Anfärbung der stark ausgeprägten Aktin-Stressfasern. Im Gegensatz dazu war die α -SMA Anfärbung der Stressfasern in fast allen Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten schwächer. Auch waren die α -SMA positiven Stressfasern der Syndecan-4 defizienten Zellen nicht so ausgeprägt wie die der Wildtypzellen. Die Western Blot Analyse ergab, dass in den Wildtypzellen die Stimulation mit TGF- β 1 die Menge an gebildetem α -SMA um das 30fache erhöhte. In Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten dagegen erhöhte sich die Menge an α -SMA durch TGF- β 1 nur um das 17fache. Zusätzlich zu den vorherigen ergebnissen bestätigt dieser Versuch, dass die TGF- β 1 induzierte Differenzierung von Myofibroblasten in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten eingeschränkt ist. Weiterhin scheint es, dass die reduzierte Expression von α -SMA tatsächlich auf eine eingeschränkte Reaktion der Syndecan-4 defizienten Fibroblasten auf TGF- β 1 zurückzuführen ist und nicht durch Serumbestandteile beeinflusst wird.

4.3 Untersuchungen zur TGF- β 1 Signaltransduktion in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten

Syndecan-4 defiziente Fibroblasten wiesen sowohl in der Kontraktionsfähigkeit (vgl. 4.2.1), als auch in der Differenzierung zu Myofibroblasten (vgl. 4.2.2) eine im Vergleich zu Wildtypzellen verminderte Antwort auf die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 auf. Eine mögliche Ursache für diese Einschränkungen könnte eine Beeinflussung der Signaltransduktion von TGF- β 1 in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten sein. Wie sich die Abwesenheit von Syndecan-4 auf die Übertragung der TGF- β 1 Signale auswirkt, wurde im Folgenden analysiert.

4.3.1 Die Aktivierung der Smad-Proteine durch TGF- β 1

Die Familie der Smad-Proteine stellt die direkten Mediatoren des TGF- β 1 Signals dar (siehe Kapitel 1.6). Die reduzierte Reaktion von Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten auf die Stimulation mit TGF- β 1 während der Kollagen-Gel-Kontraktion und der Differenzierung von Myofibroblasten könnte mit einer verlangsamten oder veränderten Signalübertragung des TGF- β 1 Signals in diesen Zellen zusammenhängen. Da die Smad-Proteine die einzigen bekannten direkten Übermittler des TGF- β 1 Signals sind, wurde zunächst die Aktivierung und der Expressionslevel der Smads untersucht. Die Translokation der Smads in bzw. aus dem Nukleus spielt eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung, deshalb wurde, neben der Expression und Aktivierung der Smads, auch ihre zelluläre Lokalisation betrachtet.

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurden zunächst für mindestens 12 Stunden in Medium mit 0,5 % FKS kultiviert, um eine mögliche Voraktivierung der Zellen zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen für 15 und 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Um die Translokation der Smad-Proteine in den Nukleus verfolgen zu können, wurden jeweils eine zytoplasmatische und eine nukleäre Proteinfraction hergestellt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die entsprechenden Smads untersucht (Abbildung 4.8).

In den Western Blots der beiden Rezeptor-Smads, Smad2 und 3, war deutlich zu erkennen, dass die Menge an phosphoryliertem Smad2 (p-Smad2) nach 15-minütiger TGF- β 1 Stimulation sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern stark zugenommen hatte. Nach 60 Minuten war nur noch eine leichte Zunahme dieses Phosphorylierungs-Levels zu verzeichnen. Bei der Aktivierung von Smad2 nach TGF- β 1 Zugabe zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten. Die Aktivierung von Smad3 konnte nicht direkt untersucht werden, da es keinen kommerziell erhältlichen, spezifisch gegen phosphoryliertes Smad3 gerichteten Antikörper gibt. Die Gesamtmenge an Smad2 sowie auch Smad3 nahm nach 15 und 60 Minuten TGF- β 1 Stimulierung im Zytoplasma ab, während die Menge an Smad2 und Smad3 im Zellkern deutlich zunahm, was jeweils die Translokation der Proteine aus dem Zytoplasma in den Kern belegt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede im Expressionslevel oder der Translokation der beiden Rezeptor-Smads zwischen Wildtyp und Syndecan-4 defizienten Zellen.

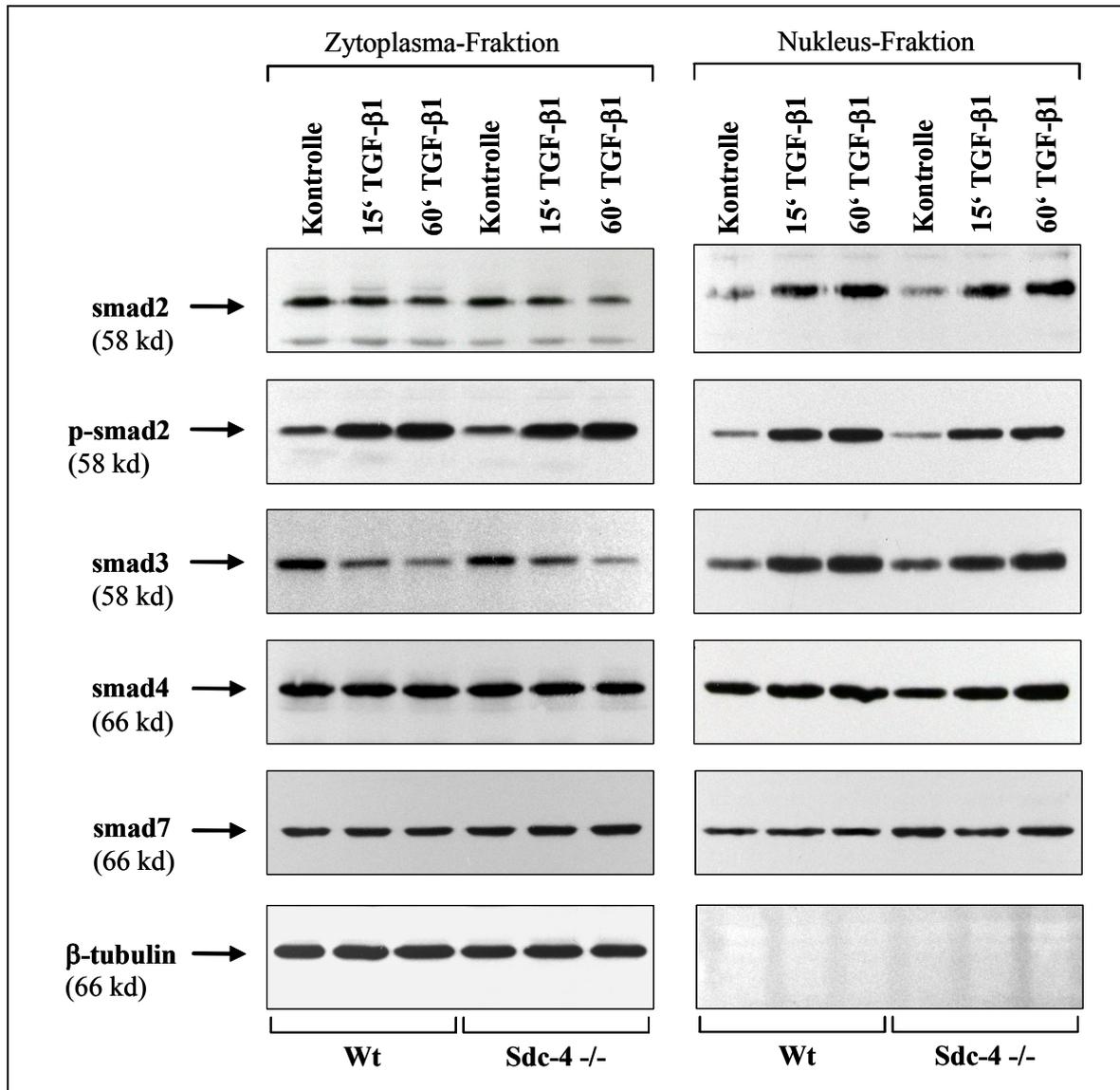


Abbildung 4.8: Western Blot Analysen zur Untersuchung der Expressionslevel, Aktivierung und Translokation der Smad-Proteine nach TGF-β1 Stimulation in Syndecan-4 -/- Fibroblasten

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten wurden für 15 und 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Die Zell-Lysate wurden in zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen aufgetrennt und geblottet. Die Western Blots wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen die Smad-Proteine inkubiert. Zum Vergleich der Proteinmengen und zur Überprüfung der Reinheit der nukleären Fraktionen wurde ein Anti-β-Tubulin-Antikörper benutzt.

Der Level des Co-Smads, Smad4, änderte sich nach TGF-β1 Zugabe im Zytoplasma beider Zelltypen nicht wesentlich und wurde auch im Zellkern nur leicht erhöht. Das gleiche Bild ergab sich für das inhibitorische Smad, Smad7. Die Menge an Smad7 änderte sich weder im Zytoplasma noch im Zellkern.

Zusätzlich zu den Western Blot Analysen wurde der Zeitverlauf der Translokation von Smad3 in den Nukleus innerhalb der ersten 15 Minuten mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Da nur phosphoryliertes Smad3 mit Smad4 einen Komplex bildet und in den Nukleus transportiert werden kann, diente die Immunfluoreszenz-Analyse der Translokation von Smad3 einer zusätzlichen, indirekten Untersuchung der Smad3 Aktivierung.

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausgesät und für mindestens 12 Stunden in Medium mit 0,5 % FKS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 5, 10 und 15 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β 1 aktiviert, fixiert und Immunfluoreszenzen mit dem Smad3-Antikörper angefertigt (Abbildung 4.9).

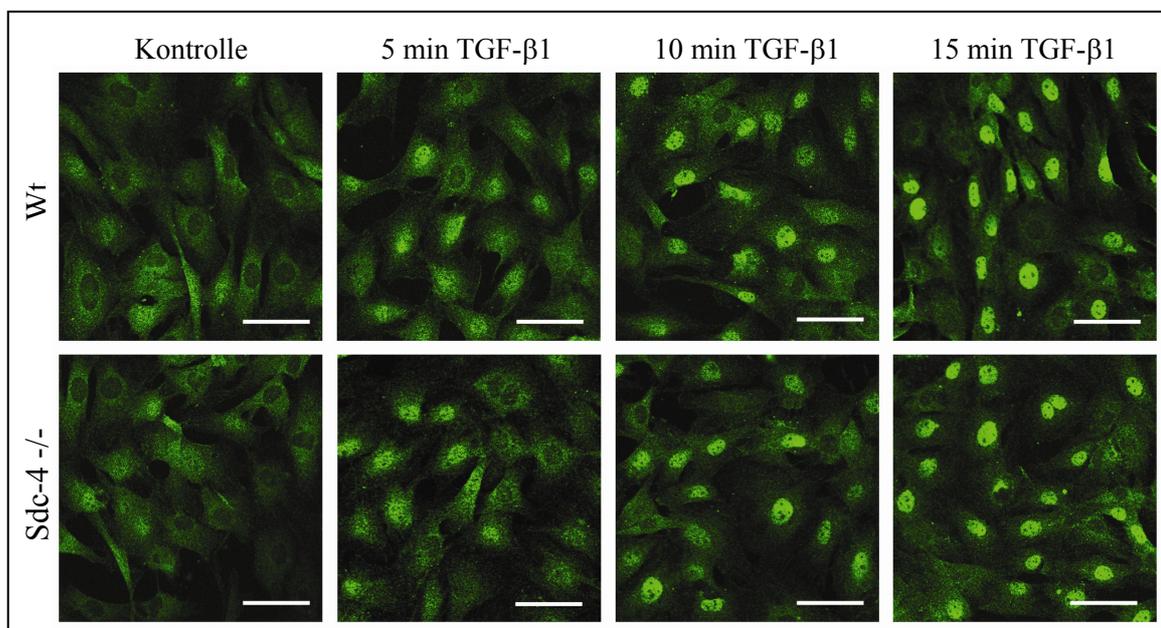


Abbildung 4.9: Immunfluoreszenz-Untersuchung zum Zeitverlauf der TGF- β 1 induzierten nukleären Translokation von Smad3

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 12 Stunden in Medium mit 0,5 % FKS ausgehungert. Anschließend wurden die Zellen für 5, 10 und 15 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β 1 aktiviert, fixiert und mit einem Antikörper gegen Smad3 (grün) gefärbt. Die Balken entsprechen jeweils 100 μ m.

Im unstimulierten Zustand befand sich sowohl in Wildtyp Fibroblasten als auch in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten kaum Smad3 im Zellkern. Es war lediglich eine diffuse Färbung im Zytoplasma zu erkennen. Bereits 5 Minuten nach TGF- β 1 Zugabe ließ sich in beiden Zelltypen eine Akkumulation von Smad3 in einigen Zellkernen erkennen, die sich

nach 10 und insbesondere nach 15 Minuten noch deutlich steigerte. Nach 15-minütiger TGF- β 1 Aktivierung der Zellen waren fast alle Zellkerne intensiv grün gefärbt. Auch in der Immunfluoreszenz der Smad3 Translokation konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten festgestellt werden.

Zusammenfassend gab es weder in der Expression der untersuchten Smad-Proteine noch in der Aktivierung und Translokation nach TGF- β 1 Stimulation Unterschiede zwischen Wildtyp Fibroblasten und Syndecan-4 Knockout Fibroblasten.

Obwohl die Smad-Proteine den einzigen direkten Weg darstellen, TGF- β 1 Signale zu übermitteln, sind noch weitere alternative Signaltransduktionswege bekannt, die durch TGF- β 1 aktiviert werden können. Hierzu gehören z. B. die MAP Kinasen.

4.3.2 Die Beteiligung der MAP Kinasen an der Signaltransduktion von TGF- β 1

Die gefundenen Unterschiede in der Reaktion der Syndecan-4 Knockout Fibroblasten auf eine Aktivierung mit TGF- β 1 scheinen nicht durch die Familie der Smad-Proteine vermittelt zu werden. Es ist jedoch bekannt, dass auch die Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP Kinasen) durch TGF- β 1 aktiviert werden können (Atfi *et al.* 1997; Hanafusa *et al.* 1999; Mucsi *et al.* 1996). Da die MAP Kinasen sowohl am Prozess der Myofibroblasten-Differenzierung als auch an der Kollagen-Kontraktion beteiligt sein können (Hashimoto *et al.* 2001; Lee *et al.* 2000), wurde untersucht, ob die Regulation der MAP Kinasen nach TGF- β 1 Stimulation durch das Fehlen von Syndecan-4 beeinflusst wird.

Primäre dermale Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurden, analog zur Analyse der Smad-Proteine, zunächst für 12 Stunden in Medium mit 0,5 % FKS kultiviert, um eine Voraktivierung der Zellen durch Serum zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen für 15 und 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β 1 stimuliert und sofort lysiert. Da auch im Fall der MAP Kinasen die Translokation der aktivierten Proteine in den Kern eine entscheidende Rolle in der Signalübermittlung spielt, wurden die Zell-Lysate in diesem Versuch ebenfalls in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Western Blot Analysen mit Antikörpern, die spezifisch gegen die jeweilige phosphorylierte Form der MAP Kinasen bzw. gegen die unphosphorylierte Form gerichtet waren, untersucht.

4.3.2.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase durch TGF- β 1

In diesem Versuch wurde die Aktivierung der p38 MAP Kinase in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1 untersucht. Die wie beschrieben (Kapitel 4.3.2) hergestellten zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierte (p-p38) bzw. unphosphorylierte Form der p38 MAP Kinase analysiert. Die Intensität der Western Blot Banden wurde ausgewertet und der Anteil der aktiven, phosphorylierten p38 mit der Gesamtmenge der Kinase verglichen (p-p38/p38). Der Wert für die unstimulierte Wildtyp Kontrolle wurde jeweils gleich 1,0 gesetzt und alle anderen Werte zu diesem in Relation gesetzt (Abbildung 4.10).

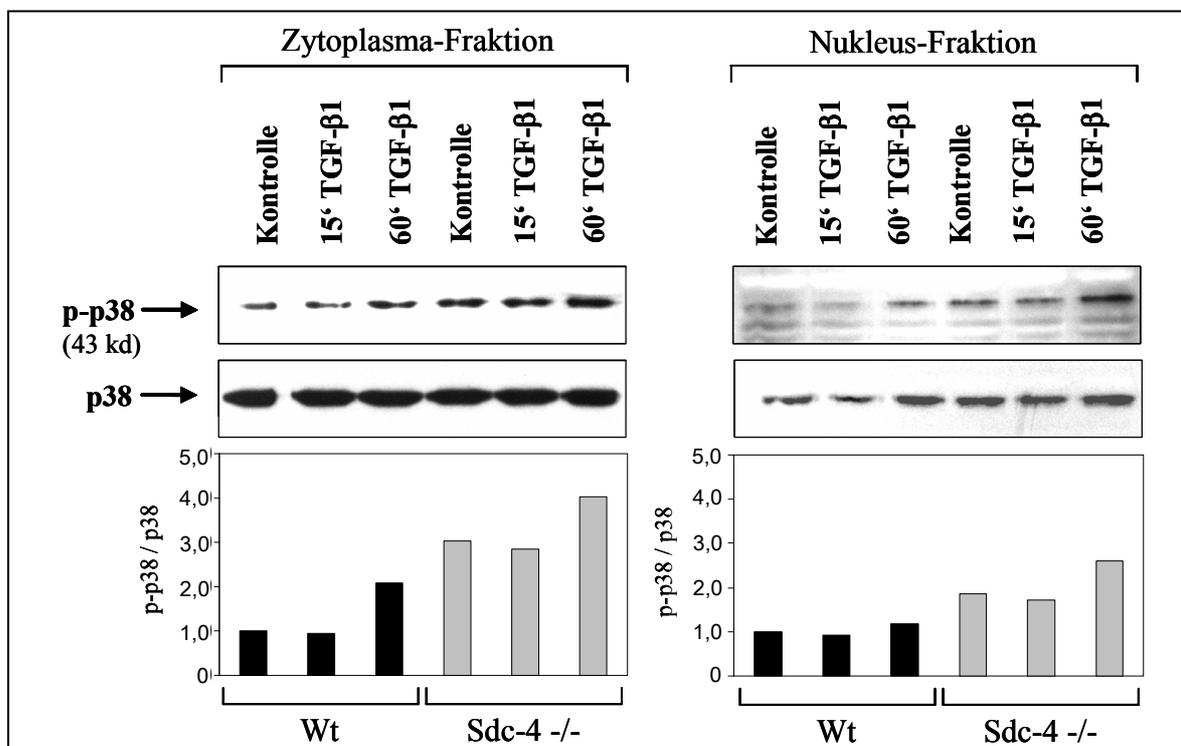


Abbildung 4.10: Western Blot Analyse der Aktivierung der p38 MAP Kinase durch TGF- β 1

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 -/- Fibroblasten wurden für 12 Stunden ausgehungert und anschließend für 15 und 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Die zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakte wurden mit Antikörpern gegen phosphorylierte und unphosphorylierte p38 MAP Kinase analysiert. Das Verhältnis von phosphorylierter p38 zur Gesamtmenge an p38 wurde errechnet und als Balkendiagramm dargestellt. Dabei wurde jeweils der Wert der unstimulierten Wildtyp Kontrolle gleich 1,0 gesetzt.

Im Zytoplasma der Wildtyp Fibroblasten zeigte sich nach 60 Minuten Inkubation mit TGF- β 1 eine ca. 2fache Erhöhung der p38 Phosphorylierung. Im Kern hingegen blieb der Anteil an phosphorylierter p38 nahezu unverändert, d. h. dort fand in den ersten 60 min nach TGF- β 1 Induktion keine Aktivierung der p38 Kinase statt. In den Syndecan-4 -/- Fibroblasten lag der Anteil an phosphorylierter p38 MAP Kinase im Zytoplasma der unstimulierten Zellen um das 3fache höher als in den Wildtypzellen. Im Kern lag eine 1,8fache höhere Phosphorylierung der p38 in den unstimulierten Syndecan-4 Knockout Fibroblasten vor. Eine Aktivierung der p38 Kinase durch TGF- β 1 fand wie in den Wildtypzellen nach 60 Minuten statt. Wie bei den Wildtypzellen fiel diese Aktivierung im Zytoplasma deutlicher aus.

Insgesamt zeigte sich, dass die p38 MAP Kinase in den Wildtypzellen nur langsam durch TGF- β 1 aktiviert wurde. In den Syndecan-4 Knockout Fibroblasten war der Grundlevel an aktiver p38 besonders im Zytoplasma der Zellen deutlich höher, aber auch hier zeigte sich eine Aktivierung nach 60 Minuten.

4.3.2.2 Aktivierung der JNK1/2 MAP Kinasen durch TGF- β 1

Die Analyse der Aktivierung der JNK1/2 durch den Wachstumsfaktor TGF- β 1 in Syndecan-4 -/- Fibroblasten wurde, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die zytoplasmatischen und nukleären Extrakte wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte bzw. unphosphorylierte JNK1/2 untersucht. Der Anteil an phosphorylierter JNK an der Gesamtmenge an JNK in unstimulierten Wildtypzellen wurde hier ebenfalls gleich 1,0 gesetzt.

Im Gegensatz zur p38 Kinase, die erst verzögert durch TGF- β 1 aktiviert wurde, bewirkte die Zugabe von TGF- β 1 eine schnelle Phosphorylierung der JNK1/2 in Wildtypzellen. Bereits 15 Minuten nach TGF- β 1 Stimulierung stieg der Anteil an phosphorylierter JNK (JNK1+2) im Zytoplasma der Wildtypzellen um das 2fache. Im Kern war der Anteil der phosphorylierten JNK1/2 nach 15 Minuten viermal so hoch wie in den unstimulierten Wildtypzellen. Auffällig war, dass dieser schnelle Anstieg der Phosphorylierung im Zytoplasma und im Kern bereits nach 60 Minuten wieder auf das Grundniveau der unstimulierten Zellen bzw. noch niedriger abgesunken war.

Im Gegensatz dazu verursachte die Stimulation der Syndecan-4 defizienten Fibroblasten mit TGF- β 1 ein anderes Aktivierungsmuster der JNK. Der Level an phosphorylierter JNK

lag, wie schon bei der p38 MAP Kinase, in den unstimulierten Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten höher als in den Wildtyp Fibroblasten. Im Zytoplasma war der Anteil der phosphorylierten JNK1/2 zwar nur geringfügig höher (der Wert betrug 1,2 im Vergleich zu 1,0 bei den Wildtypzellen), dagegen war der Unterschied im Nukleus jedoch sehr deutlich. Im Kern wiesen die Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten einen 3fach höheren Level an phosphorylierter JNK1/2 im unstimulierten Zustand auf.

Nach Zugabe von TGF- β 1 fand in den Knockout Zellen, im Gegensatz zu den Wildtypzellen, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus keine weitere Aktivierung der JNK statt. Wie bei den Wildtypzellen sank der Level der JNK Phosphorylierung nach 60 Minuten auf ein niedriges Niveau.

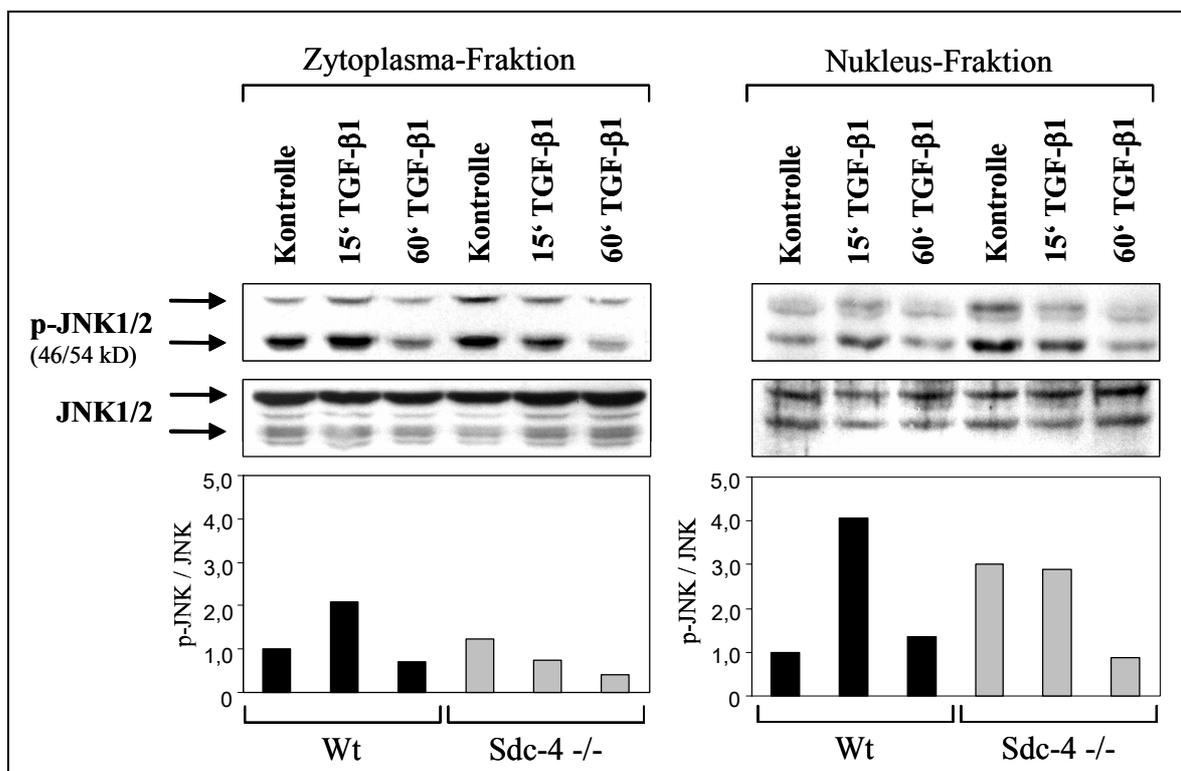


Abbildung 4.11: Western Blot Analyse der Aktivierung der JNK1/2 MAP Kinasen durch TGF- β 1

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurden für 15 und 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Die zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakte wurden mit Antikörpern gegen phosphorylierte und unphosphorylierte JNK1/2 MAP Kinasen analysiert. Das Verhältnis der phosphorylierten JNK1/2 zur Gesamtmenge an JNK1/2 wurde errechnet und als Balkendiagramm dargestellt. Dabei wurde jeweils der Wert der unstimulierten Wildtyp Kontrolle gleich 1,0 gesetzt.

Zusammenfassend hat die Aktivierung mit TGF- β 1 in Wildtyp Fibroblasten eine schnelle, jedoch nur transiente Aktivierung der JNK1/2 zur Folge. In Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten lag der Grundlevel an phosphorylierter JNK1/2 in unstimulierten Zellen deutlich höher als in Wildtyp Fibroblasten. Die Aktivität der JNK1/2 wurde jedoch durch TGF- β 1 in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten nicht weiter stimuliert.

4.3.2.3 Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen durch TGF- β 1

Ein ähnliches Bild wie für die JNK1/2 ergab sich für die Aktivierung der ERK Kinasen 1 und 2 nach TGF- β 1 Stimulierung. Der Versuch zur Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen wurde analog zu den Aktivierungen der p38 und JNK1/2 MAP Kinasen durchgeführt. Der Wert des phosphorylierten Anteils von ERK1/2 an der Gesamtmenge an ERK1/2 in unstimulierten Wildtypzellen wurde auch hier gleich 1,0 gesetzt.

In Wildtypzellen zeigten die beiden ERK Kinasen, ähnlich wie die JNK1/2, bereits nach 15 Minuten eine deutliche Aktivierung durch TGF- β 1. Vergleichbar mit den JNK1/2 Kinasen war auch die ERK1/2 Aktivierung im Nukleus der Wildtypzellen besonders stark, wo die Phosphorylierung von ERK1/2 fast verdreifacht wurde. Nach 60 Minuten war diese transiente Aktivierung sowohl im Zytoplasma der Wildtypzellen als auch im Nukleus bereits wieder abgeklungen. Die Phosphorylierungsraten sanken 60 Minuten nach TGF- β 1 Zugabe auf ein Niveau ab, das sogar noch unter dem Grundlevel der unstimulierten Zellen lag. Diese zeitabhängige Aktivierung der JNK und ERK MAP Kinasen durch TGF- β 1, mit einem Aktivierungsmaximum nach 15 Minuten und der anschließenden Herabregulierung des Signals auf das Grundniveau nach 60 Minuten, wurde u. a. auch für Lungenfibroblasten beschrieben (Hashimoto *et al.* 2001).

Wie auch schon im Fall der beiden anderen MAP Kinasen, war der Level an phosphorylierter ERK1/2 im unstimulierten Zustand in den Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten höher als in den Wildtyp Fibroblasten. Im Zytoplasma der unstimulierten Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten betrug der Anteil der phosphorylierten Form der ERK1/2 das 1,5fache und im Nukleus das 2fache der Wildtyp Fibroblasten. Ebenfalls analog zur Regulation der JNK in den Syndecan-4 defizienten Fibroblasten, wurden auch die ERK1/2 Kinasen durch TGF- β 1 weder im Zytoplasma noch im Nukleus der Syndecan-4 Knockout Zellen weiter aktiviert.

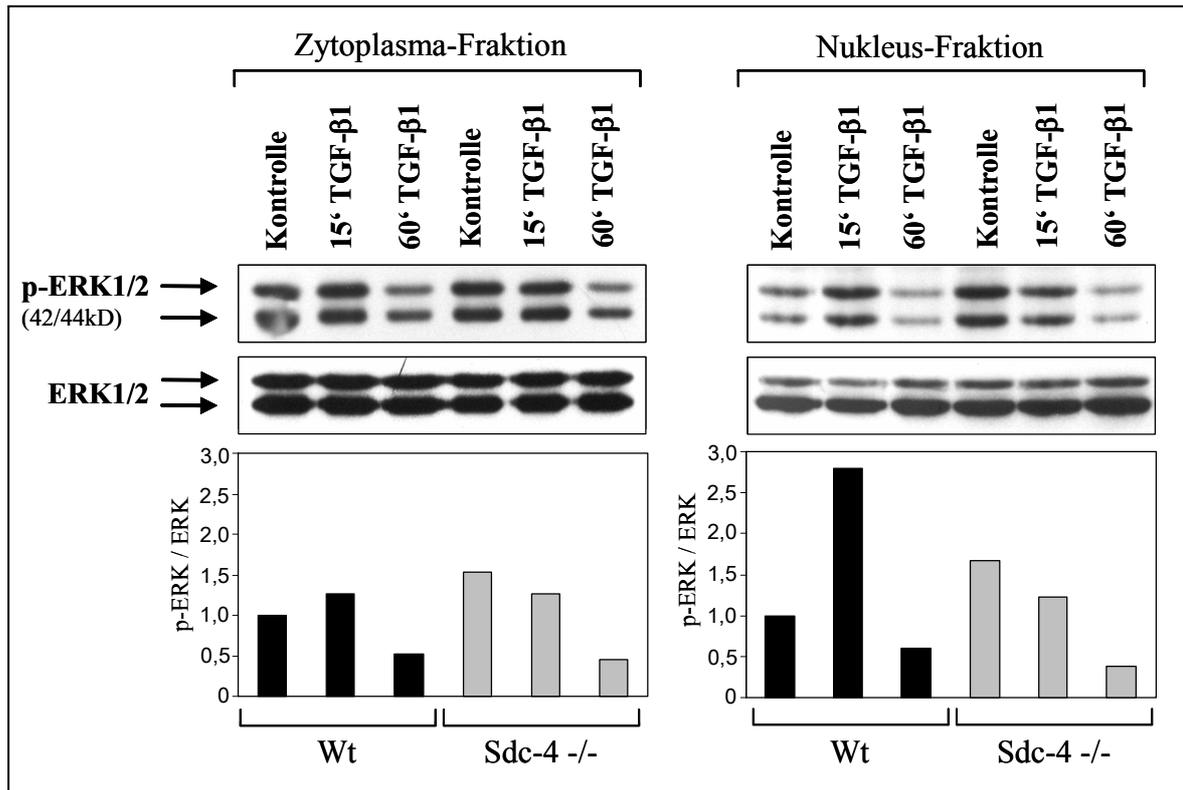


Abbildung 4.12: Western Blot Analyse der Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen durch TGF-β1

Primäre Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten für 15 und 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Die zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakte wurden mit Antikörpern gegen phosphorylierte und unphosphorylierte ERK1/2 MAP Kinasen analysiert. Das Verhältnis der phosphorylierten ERK1/2 zur Gesamtmenge an ERK1/2 wurde errechnet und als Balkendiagramm dargestellt. Dabei wurde jeweils der Wert der unstimulierten Wildtyp Kontrolle gleich 1,0 gesetzt.

Es fand, im Gegensatz zu den Wildtypzellen, in beiden Kompartimenten bereits nach 15 Minuten eine Verringerung der ERK Phosphorylierung statt, bis die Phosphorylierungsrate nach 60 Minuten auf ein sehr niedriges Maß gesunken war.

Auch die ERK1/2 Kinasen zeigten in den Wildtyp Fibroblasten eine schnelle und transiente Aktivierung durch TGF-β1 mit einer anschließenden Abnahme der Phosphorylierung. Auffällig in den Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten war auch im Fall der ERK1/2 Kinasen der hohe Grundlevel an phosphorylierter ERK1/2 in den unstimulierten Zellen. Vergleichbar mit den JNK1/2 Kinasen wurde auch die Aktivität der ERK1/2 Kinasen in den Syndecan-4 $-/-$ Zellen durch TGF-β1 nicht erhöht, sondern eher herabreguliert.

Zusammenfassend wurde in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten für alle drei MAP Kinasen ein erhöhter Grundlevel der jeweiligen phosphorylierten, aktiven Form im

unstimulierten Zustand der Zellen festgestellt. Des Weiteren zeigten Syndecan-4 -/- Fibroblasten Unterschiede in der Regulation der JNK1/2 und ERK1/2 MAP Kinasen nach einer Aktivierung mit TGF- β 1.

4.4 Fokale Kontakte in Syndecan-4 defizienten Zellen

Syndecan-4 ist das einzige der vier Syndecane, das bisher in fokalen Kontakten nachgewiesen wurde. In verschiedenen Untersuchungen konnte belegt werden, dass Syndecan-4 neben den Integrinen ein wichtiger Zellrezeptor bei der Ausbildung von fokalen Kontakten und der Assemblierung von Aktin-Stressfasern ist (Couchman & Woods 1999; Echtermeyer *et al.* 1999). Obwohl Syndecan-4 eine Rolle bei der Ausbildung von fokalen Kontakten spielt, bilden Syndecan-4 Knockout Fibroblasten fokale Kontakte und Stressfasern aus. Es wird angenommen, dass das Fehlen von Syndecan-4 in Syndecan-4 defizienten Zellen durch ein anderes Mitglied der Syndecan Familie kompensiert werden kann. Aus diesem Grund wurden die fokalen Kontakte in Syndecan-4 defizienten Zellen genauer untersucht.

Durch die Ausbildung fokaler Kontakte werden Zellen zur Migration befähigt. Dieser Vorgang ist in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten beeinträchtigt (siehe 4.1.1). Mit dieser Untersuchung sollte weiterhin geklärt werden, ob die beobachtete reduzierte Migration von Syndecan-4 defizienten Zellen möglicherweise mit Unterschieden in den fokalen Kontakten dieser Zellen zusammenhängt. Dazu wurde die Verteilung von Vinculin und Paxillin, zwei Strukturproteinen in fokalen Kontakten, und die Aktivierung des Signalproteins FAK (fokale Adhäsionskinase) mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht.

4.4.1 Die Lokalisation von Vinculin in fokalen Kontakten

Vinculin ist ein in fokalen Kontakten vorkommendes Strukturprotein, das mit einer Reihe weiterer Proteine in fokalen Kontakten interagieren kann und dazu dient, das Aktin-Zytoskelett mit den Rezeptoren der Zelloberfläche zu verbinden. Zur Untersuchung der Lokalisation und der Morphologie fokaler Kontakte in Syndecan-4 +/- und Syndecan-4 -/- Fibroblasten wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem Antikörper gegen Vinculin durchgeführt.

Hierzu wurden primäre dermale Fibroblasten auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend mit einem Antikörper gegen Vinculin und mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, das F-Aktin anfärbt und somit die Aktin-Stressfasern sichtbar macht, gefärbt (Abbildung 4.13).

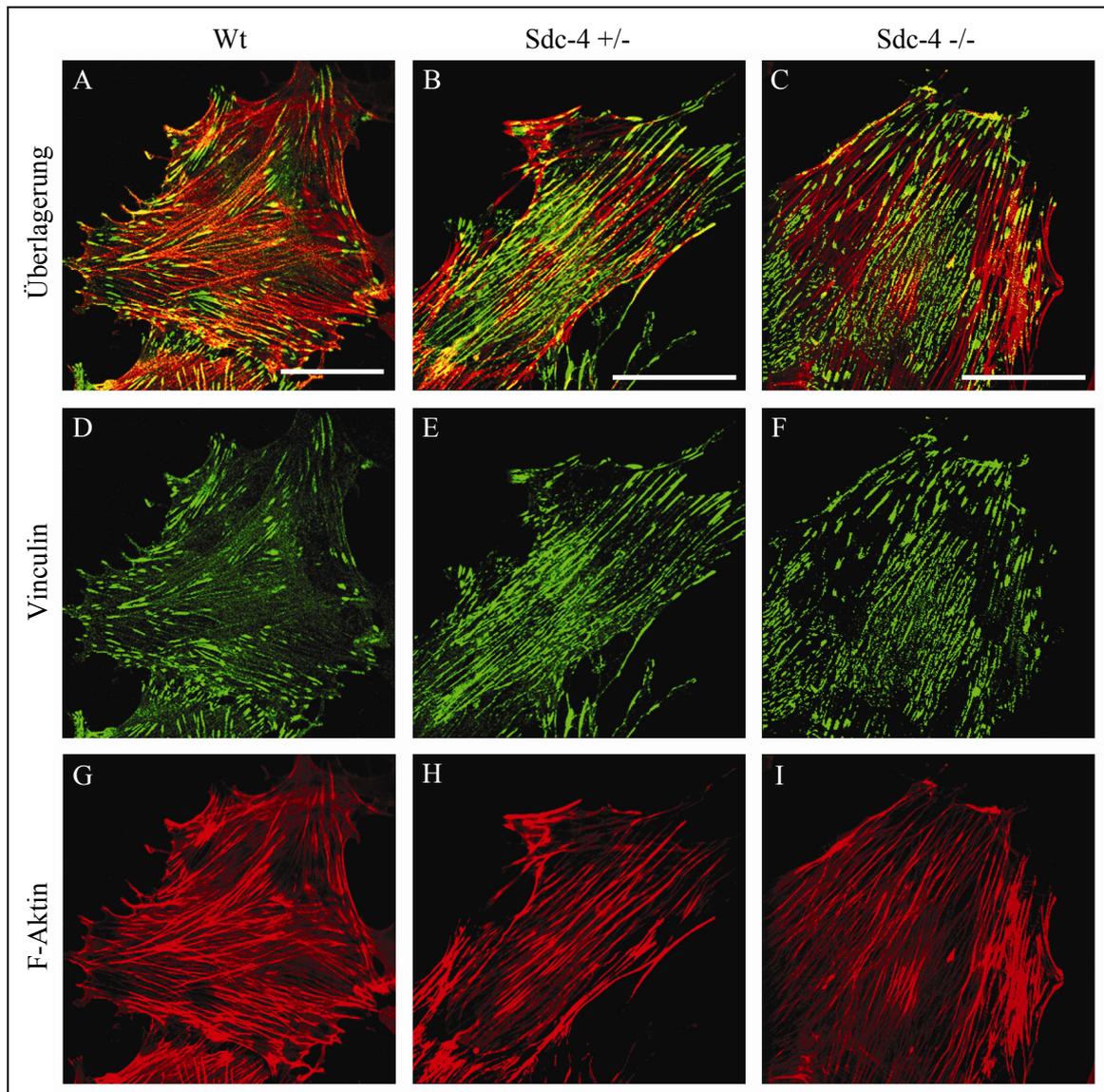


Abbildung 4.13: Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisation von Vinculin in Syndecan-4 defizienten Hautfibroblasten

Zur Untersuchung der Lokalisation von Vinculin wurden dermale Fibroblasten einer Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen Vinculin (grün, D, E, F) unterzogen. Zusätzlich wurden Aktin-Stressfasern mit Hilfe von Phalloidin (rot, G, H, I) angefärbt. Die Abbildungen A, B und C zeigen die Überlagerungen der beiden Färbungen. Die Balken entsprechen 50 µm.

In den Wildtyp Fibroblasten beschränkte sich die Vinculin Färbung hauptsächlich auf die peripheren Bereiche der Zellen. Diese peripheren fokalen Kontakte waren deutlich ausgeprägt, jedoch relativ kurz. Die fokalen Kontakte von Syndecan-4 +/- und Syndecan-4 -/- Fibroblasten zeigten Unterschiede in ihrer Lokalisation und Morphologie. Neben relativ kurzen fokalen Kontakten in der Peripherie der Zellen, ähnlich denen der Wildtyp Fibroblasten, befanden sich in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten zusätzlich eine Vielzahl von Vinculin enthaltenden fokalen Kontakten zentral unter den Zellen. Im Gegensatz zu den peripheren kurzen Kontakten, waren diese zentralen fokalen Kontakte sehr lang gezogen und schienen dünner zu sein. Bei der Ausbildung der Aktin-Stressfasern waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp Fibroblasten und Syndecan-4 defizienten Fibroblasten zu erkennen.

4.4.2 Die Lokalisation von Paxillin in fokalen Kontakten

Paxillin ist ein mit fokalen Kontakten assoziiertes Adaptermolekül, das sowohl eine Vielzahl an Strukturproteinen als auch Signalmoleküle binden kann. Es zeigte sich, dass Syndecan-4 über das Adapterprotein Syndesmos ebenfalls in der Lage ist, an Paxillin zu binden (Denhez *et al.* 2002). Durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem Antikörper gegen Paxillin wurde daher überprüft, ob das Fehlen von Syndecan-4 einen Einfluss auf die Lokalisation von Paxillin hat. Zur besseren Übersicht wurden wiederum die Aktin-Stressfasern mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin angefärbt (Abbildung 4.14).

Der Vergleich von Syndecan-4 homozygoten und heterozygoten Fibroblasten mit Wildtyp Fibroblasten ergab, im Gegensatz zu Vinculin, keine Unterschiede in der Lokalisation und in der Morphologie der Paxillin enthaltenden fokalen Kontakte. Der Großteil der fokalen Kontakte war in allen drei Fibroblastentypen in der Peripherie der Zellen lokalisiert und unterschied sich nicht in Form und Größe. Es fanden sich keine oder nur sehr wenige fokale Kontakte zentral unter den Zellen, wie dies bei der Vinculin-Färbung der Syndecan-4 defizienten Zellen der Fall war (siehe 4.4.1).

Da fokale Kontakte Orte mit hoher Signalübertragungsrates darstellen, sollte neben den beiden Strukturproteinen Vinculin und Paxillin auch untersucht werden, ob die Signaltransduktionsvorgänge in fokalen Kontakten durch das Fehlen von Syndecan-4 beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) näher betrachtet.

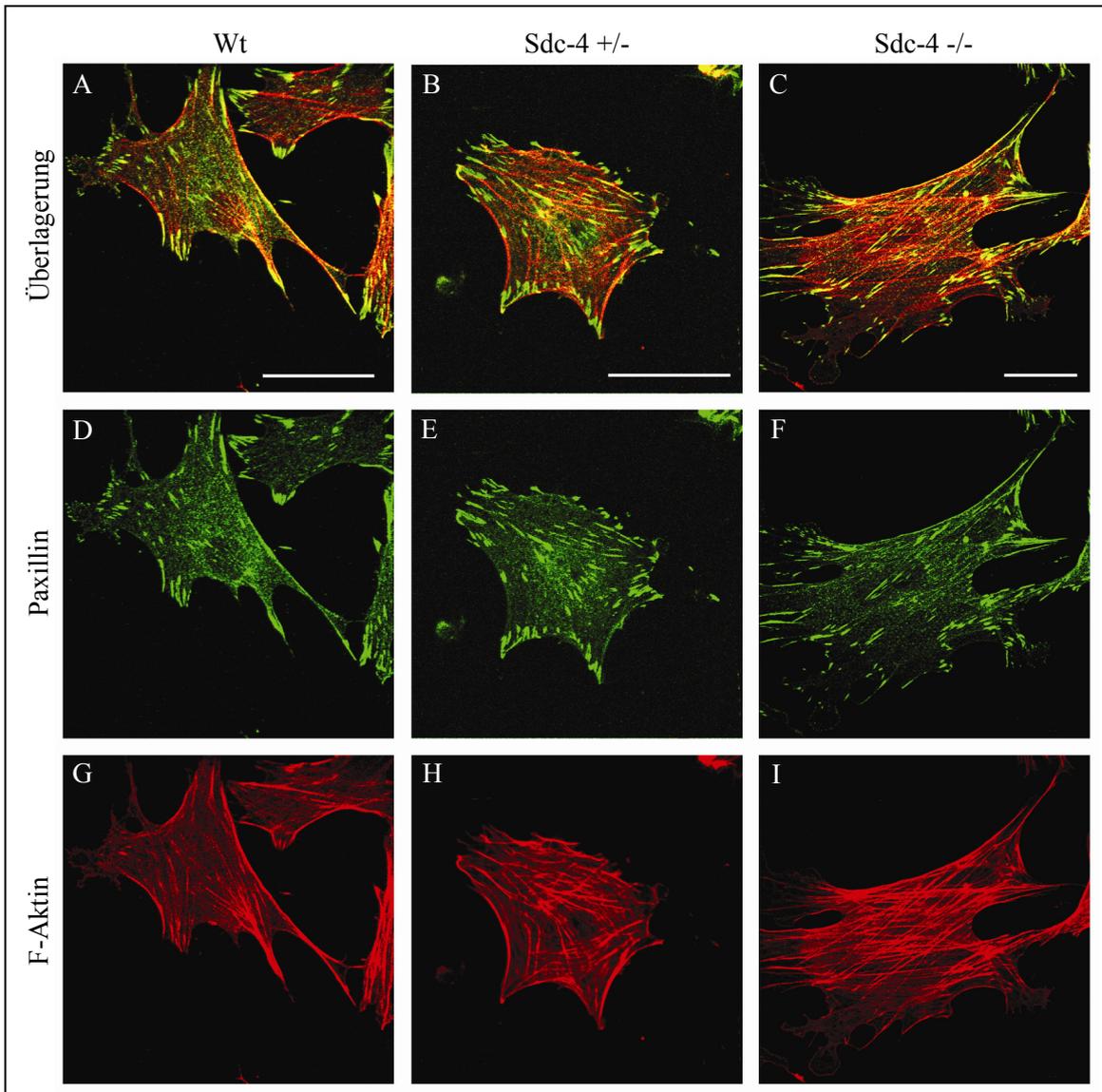


Abbildung 4.14: Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisation von Paxillin in Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten

Um die Lokalisation von Paxillin in fokalen Kontakten zu analysieren, wurden primäre Hautfibroblasten mit einem Antikörper gegen Paxillin (grün, D, E, F) gefärbt. Das Aktin-Zytoskelett der Zellen wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (rot, G, H, I) angefärbt. Die Bilder A, B und C zeigen die Überlagerung der beiden Färbungen. Die Balken entsprechen 50 µm.

4.4.3 Die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK)

Die fokale Adhäsionskinase (FAK) nimmt bei der Signaltransduktion in fokalen Kontakten eine zentrale Rolle ein. Während der Bildung neuer fokaler Kontakte wird FAK durch Autophosphorylierung des Tyrosinrests 397 aktiviert. Diese Phosphorylierung von Tyr³⁹⁷ ist unter anderem eine Voraussetzung für die Zellmigration (Owen *et al.* 1999; Sieg *et al.* 1999).

Um zu erfahren, ob das Fehlen von Syndecan-4 einen Einfluss auf die Signalübertragung in fokalen Kontakten hat, wurde die Aktivierung der FAK mittels Immunfluoreszenz untersucht. Ein spezifisch gegen die phospho-tyr³⁹⁷ FAK gerichteter Antikörper machte es möglich, ausschließlich aktivierte FAK in fokalen Kontakten zu detektieren. Des Weiteren wurde ein Antikörper benutzt, der die Gesamtmenge an FAK erkannte. Die Fibroblasten wurden auf unbeschichtete Deckgläschen ausgesät und über Nacht in Medium mit 10 % FKS wachsen gelassen. Die Abbildung 4.15 und 4.16 zeigen die Ergebnisse der Färbungen für Wildtyp, Syndecan-4 +/- und Syndecan-4 -/- Hautfibroblasten.

Die Anfärbung der Gesamtmenge an FAK (Abbildung 4.15) zeigte, wie erwartet, keine Unterschiede zwischen den einzelnen Fibroblastentypen. Alle drei Fibroblastentypen zeigten eine Akkumulation der FAK in den fokalen Kontakten. Die Analyse mit dem phospho-spezifischen Antikörper zeigte in den Wildtyp Fibroblasten eine deutliche Anfärbung der fokalen Kontakte. Erwartungsgemäß lag hier ein hoher Anteil der FAK in den fokalen Kontakten phosphoryliert und somit im aktiven Zustand vor. Im Gegensatz dazu waren in beiden Syndecan-4 defizienten Fibroblasten weniger fokale Kontakte angefärbt. Weiterhin war die Färbung der positiven Kontakte schwächer im Vergleich zu den Wildtyp Fibroblasten. In Syndecan-4 defizienten Zellen schien ein geringerer Anteil der aktiven Form der FAK in den fokalen Kontakten vorhanden zu sein. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Ergebnissen, die von Wilcox-Adelman *et al.* (2002) veröffentlicht wurden.

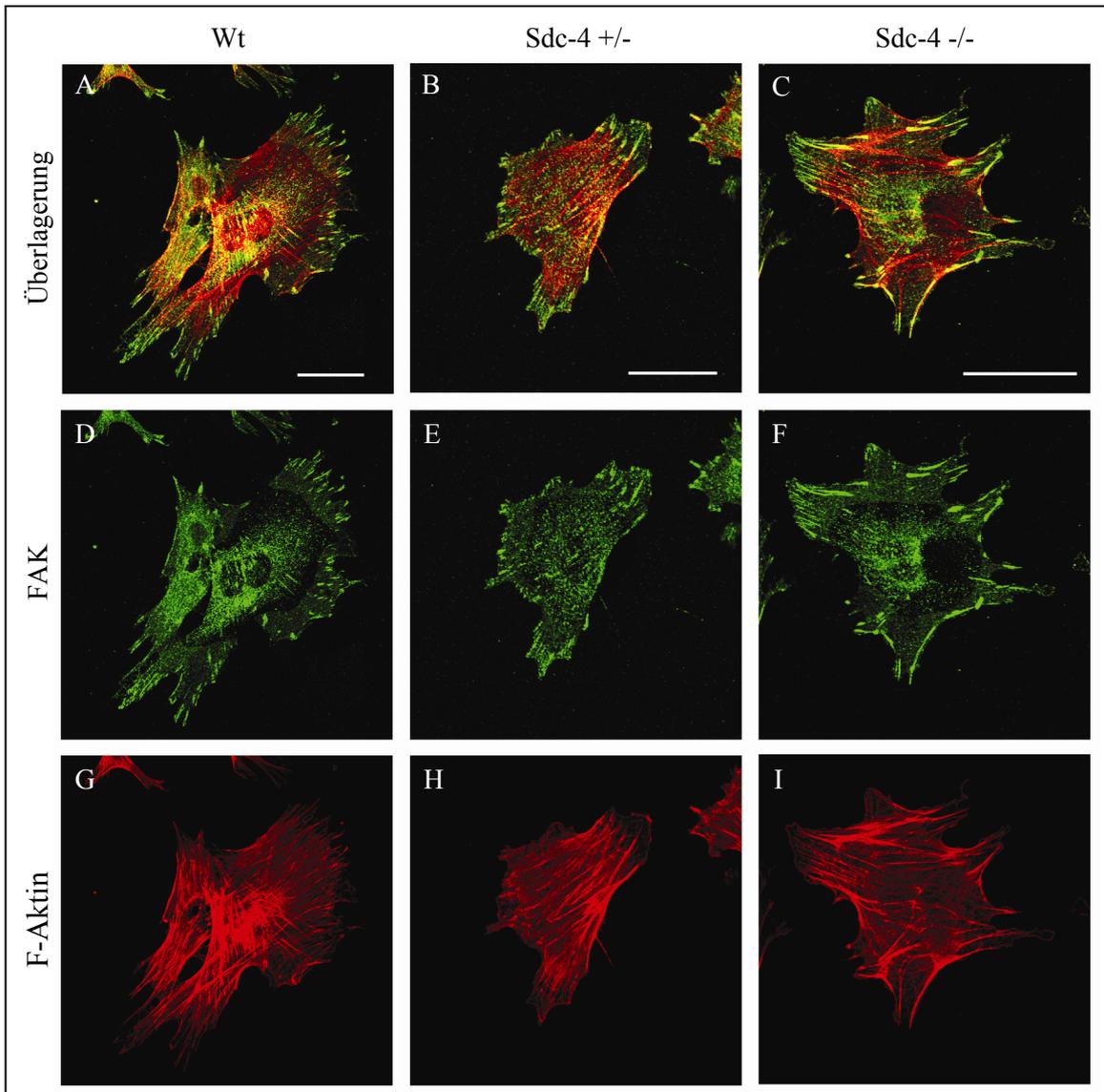


Abbildung 4.15: Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse des Aktivierungsgrades der FAK in Syndecan-4 defizienten Hautfibroblasten

Primäre Hautfibroblasten wurden mit einem Antikörper gegen die fokale Adhäsionskinase (FAK) (D, E, F) gefärbt. Zusätzlich wurden die Aktin-Stressfasern mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sichtbar gemacht (G, H, I). Die Überlagerungen der Färbungen sind jeweils in den Bildern A, B und C dargestellt. Die Balken entsprechen 50 µm.

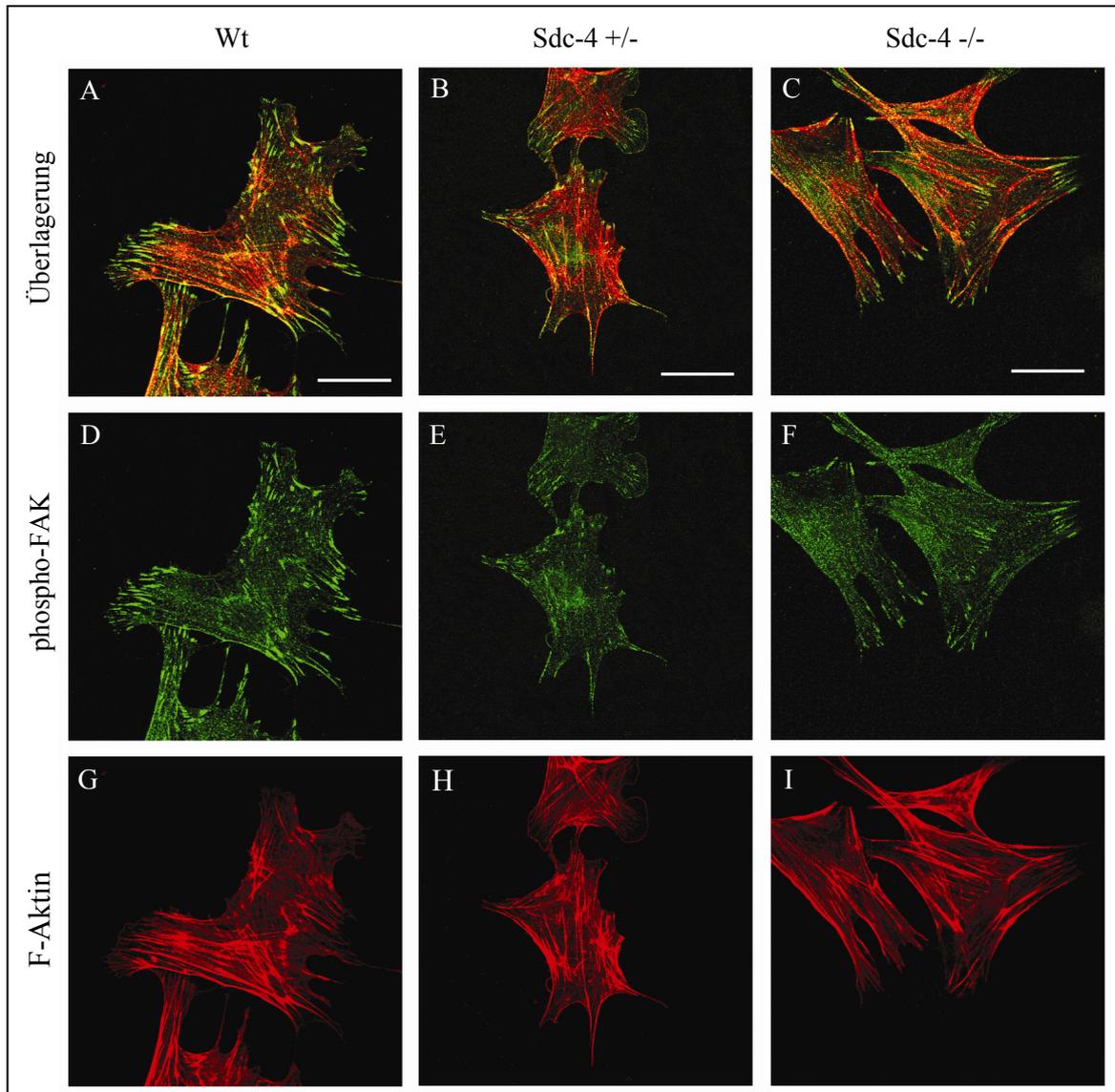


Abbildung 4.16: Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse des Aktivierungsgrades der FAK in Syndecan-4 defizienten Hautfibroblasten

Primäre Hautfibroblasten wurden mit einem Antikörper gegen phosphorylierte FAK (D, E, F) gefärbt. Zusätzlich wurden die Aktin-Stressfasern mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sichtbar gemacht (G, H, I). Die Überlagerungen der Färbungen sind jeweils in den Bildern A, B und C dargestellt. Die Balken entsprechen 50 µm.

Die hier gezeigten Unterschiede in der Lokalisation von Vinculin und der Aktivierung der FAK in fokalen Kontakten von Syndecan-4 defizienten Fibroblasten könnten eine Erklärung für die beobachteten Defizite bei der Wanderung dieser Zellen sein.

Die Tatsache, dass Syndecan-4 defiziente Fibroblasten im Migrationsassay jedoch im Endeffekt auch die gesetzten Wunden schließen und darüber hinaus überhaupt in der Lage sind, fokale Kontakte zu bilden, lässt vermuten, dass der Verlust von Syndecan-4

möglicherweise durch ein anderes Mitglied der Syndecan Familie kompensiert werden kann. Da Syndecan-2 die größten Homologien zu Syndecan-4 aufweist, wurde untersucht, ob möglicherweise Syndecan-2 in fokalen Kontakten von Syndecan-4 defizienten Zellen lokalisiert ist.

4.4.4 Die Lokalisation von Syndecan-2 in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten

Syndecan-2 wird als das mit Syndecan-4 am nächsten verwandte Syndecan betrachtet. In Fibroblasten ist Syndecan-2 das vorherrschende Syndecan. Aus diesen Gründen ist denkbar, dass Syndecan-2 die Funktion von Syndecan-4 zumindest zum Teil übernimmt.

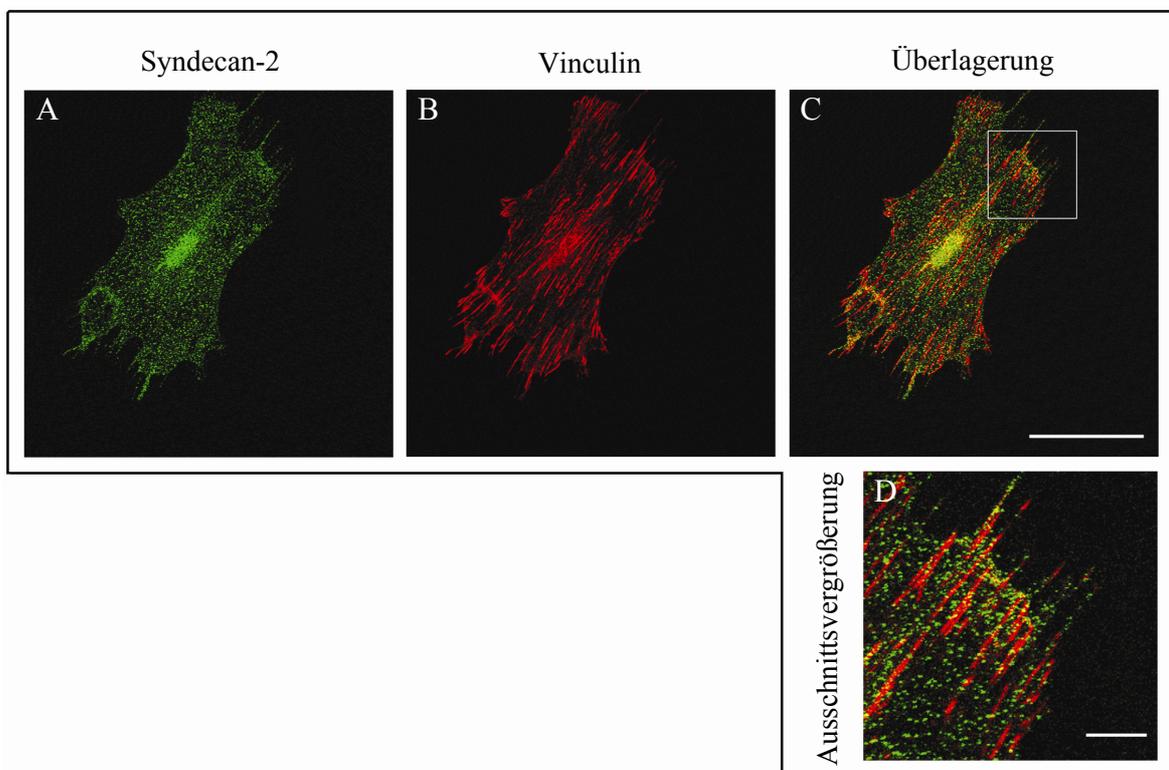


Abbildung 4.17: Immunfluoreszenz-Färbung zur Untersuchung der Lokalisation von Syndecan-2 in Syndecan-4 -/- Fibroblasten

Primäre Syndecan-4 -/- Fibroblasten wurden mit einem Antikörper gegen Syndecan-2 (A) angefärbt. Fokale Kontakte wurden mit einem Antikörper gegen Vinculin (B) sichtbar gemacht. Bild C zeigt die Überlagerung der beiden Färbungen. Zur besseren Übersicht der genauen Lokalisation von Syndecan-2 in Syndecan-4 -/- Fibroblasten ist eine Ausschnittsvergrößerung (D) gezeigt. Die Balken entsprechen 50 µm (C) und 10 µm (D).

Um die Lokalisation von Syndecan-2 in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten zu untersuchen, wurden primäre Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten auf Deckgläschen ausgesät, über Nacht in 10 % FKS wachsen gelassen und anschließend mit einem Antikörper gegen Syndecan-2 einer Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Zur besseren Lokalisation von Syndecan-2 in fokalen Kontakten wurden diese gleichzeitig mit einem Vinculin-Antikörper angefärbt (Abbildung 4.17).

Syndecan-2 war in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten gleichmäßig über die Zellen verteilt. Auffällig ist die punktuelle Verteilung von Syndecan-2. Diese wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen in Wildtyp Fibroblasten festgestellt, und man nimmt an, dass es sich dabei um Syndecan-2 Aggregate handelt (Chen *et al.* 2002; Granes *et al.* 2000). Es zeigte sich jedoch keine Kolo-kalisation von Syndecan-2 und Vinculin in fokalen Kontakten der Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten. Syndecan-2 scheint das Fehlen von Syndecan-4 in fokalen Kontakten nicht zu kompensieren. Genauere Untersuchungen zu Kompensationsmechanismen durch andere Syndecane in Syndecan-4 defizienten Zellen und Mäusen werden zurzeit in unserem Labor von Ferda Cevikbas im Rahmen ihrer Promotion durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Zelluläre Ursachen der reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe in Wunden von Syndecan-4 Knockout Mäusen

In dieser Arbeit wurden die zellulären Ursachen untersucht, die in Syndecan-4 Knockout Mäusen zu einer verzögerten Bildung von Granulationsgewebe in Hautwunden führen. Es wurde vor allem eine reduzierte Migrationsfähigkeit von Syndecan-4 defizienten Fibroblasten festgestellt. Diese resultiert aus Veränderungen in der Morphologie, Lokalisation und vor allem aus der möglicherweise eingeschränkten Signalfunktion der fokalen Kontakte in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten. Unterschiede in der Proliferationsrate der Syndecan-4 Knockout Fibroblasten wurden nicht festgestellt.

5.1.1 Veränderungen in der Morphologie und Signalfunktion fokaler Kontakte führen zu einer reduzierten Migrationsfähigkeit von Syndecan-4 -/- Fibroblasten

Sowohl Syndecan-4 heterozygote als auch Syndecan-4 Knockout Fibroblasten zeigten eine verminderte Wanderungsgeschwindigkeit in einem *in vitro* Wundheilungsassay. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in Gegenwart von 10 % Serum als auch in Minimalmedium, was darauf schließen lässt, dass die gefundenen Unterschiede in der Zellwanderung nicht auf äußere Einflüsse, d. h. die Wirkung verschiedenster Faktoren im Serum, zurückzuführen sind. Die verminderte Wanderungskapazität von Syndecan-4 -/- Fibroblasten werden durch Studien von Echtermeyer *et al.* (2001) bestätigt. Auch hier hatte die Zugabe der Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF keinen Einfluss auf die Migration der Zellen, was die Annahme unterstreicht, dass die gefundenen Unterschiede nicht auf der Wirkung von Wachstumsfaktoren beruhen. Es wurden jedoch, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, keine Unterschiede zwischen der Migrationskapazität von Syndecan-4 heterozygoten Fibroblasten und Wildtyp Fibroblasten festgestellt. Bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wurden für Syndecan-4 +/- Fibroblasten reproduzierbar die gleichen Verzögerungen in der Wanderungsgeschwindigkeit wie für Syndecan-4 -/- Fibroblasten beobachtet. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache untermauert, dass heterozygote Syndecan-4 Mäuse die gleichen Wundheilungsverzögerungen aufweisen wie homozygote Knockout Mäuse (Echtermeyer *et al.* 2001).

Die Wanderung von Zellen ist ein Prozess, der sich in vier verschiedene Schritte unterteilen lässt, die Ausbildung von Lamellipodien, die Bildung neuer Adhäsionspunkte und fokaler Kontakte, die Kontraktion der Zellen und die Auflösung alter fokaler Kontakte (Lauffenburger & Horwitz 1996). Obwohl Syndecan-4 defiziente Fibroblasten fokale Kontakte bilden, zeigten diese jedoch bei genauerer Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit einige Auffälligkeiten. So besaßen Syndecan-4 heterozygote und Syndecan-4 Knockout Fibroblasten mehr fokale Kontakte, die Vinculin enthielten, als Wildtyp Fibroblasten. Diese Unterschiede zeigten sich jedoch fast ausschließlich im Zentrum unter den Zellen, wo eine Vielzahl von sehr langen und dünnen fokalen Kontakten auftrat, die in Wildtypzellen nicht vorhanden waren. Bei diesen zentralen fokalen Kontakten könnte es sich um so genannte fibrilläre Adhäsionen handeln. Fibrilläre Adhäsionen sind lange zentrale Adhäsionsstrukturen, die eine geringere Komplexität aufweisen als klassische fokale Kontakte und vermutlich aus diesen hervorgehen (Pankov *et al.* 2000; Zamir *et al.* 2000). Sie enthalten fast ausschließlich $\alpha 5 \beta 1$ Integrin, das durch Tensin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist. Andere typische Proteine aus fokalen Kontakten, wie Vinculin und Paxillin, kommen nur in sehr geringen Mengen in fibrillären Adhäsionen vor (Zamir & Geiger 2001). Die genaue Funktion dieser fibrillären Kontakte ist bisher nicht geklärt, es wird jedoch angenommen, dass sie eine Rolle bei der Fibronektin Fibrillogenese spielen (Pankov *et al.* 2000). Da die Vinculin enthaltenden Strukturen im Zentrum der Syndecan-4 defizienten Zellen große Ähnlichkeit mit diesen fibrillären Adhäsionen haben, wäre es denkbar, dass das Fehlen von Syndecan-4 die korrekte Lokalisation von Vinculin in Zellen beeinflusst, so dass Vinculin nicht ausschließlich in klassischen fokalen Kontakten verbleibt, sondern auch in fibrillären Adhäsionen zu finden ist. Die Verteilung von Paxillin in den Syndecan-4 defizienten Fibroblasten zeigte jedoch keine Unterschiede. Longley *et al.* (1999) stellten fest, dass auch die Überexpression von Syndecan-4 in CHO Zellen zu einer erhöhten Anzahl an peripheren und zentralen fokalen Kontakten führt. Auch zeigten diese Zellen ebenfalls reduzierte Migrationskapazitäten. Bei den genannten Untersuchungen fällt auf, dass alle Zellen, die eine veränderte Menge an Syndecan-4 besitzen - entweder kein Syndecan-4, halb so viel oder mehr Syndecan-4 als Wildtypzellen - sowohl eine größere Anzahl an fokalen Kontakten aufweisen als auch eine reduzierte Fähigkeit zur Wanderung besitzen. Auf Grund dessen lässt sich vermuten, dass die erhöhte Anzahl an fokalen Kontakten zu einer stärkeren Haftung an der Unterlage und somit zu einer langsameren Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen führen könnte.

Die beschriebenen Unterschiede in der Lokalisation von Vinculin in fokalen Kontakten sind jedoch nicht das einzige Defizit, das bei der Ausbildung fokaler Kontakte gefunden wurde. Weiterhin zeigte sich, dass die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten niedriger ist als in Wildtyp Fibroblasten. Dieses Ergebnis wurde bereits von Wilcox-Adelman *et al.* (2002) veröffentlicht, wobei jedoch nur Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten untersucht wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die geringere Phosphorylierung der FAK auch in Syndecan-4 heterozygoten Fibroblasten festgestellt. In den veröffentlichten Untersuchungen ließ sich die reduzierte Phosphorylierung von Tyrosin³⁹⁷ durch die direkte Aktivierung von RhoA in Syndecan-4 $-/-$ Zellen erhöhen. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass durch Syndecan-4 die Aktivität von RhoA beeinflusst werden könnte und dies wiederum die Phosphorylierung der FAK beeinflussen könnte. Tatsächlich wurden in dieser Studie in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten geringere Mengen an aktivem RhoA gefunden. Wie Syndecan-4 die Aktivität von RhoA beeinflussen könnte, ist bisher jedoch nicht geklärt.

Die niedrigere Aktivierungsrate der FAK ist eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte Migration der Syndecan-4 defizienten Fibroblasten. Es ist bekannt, dass die fokale Adhäsionskinase die Wanderung von Zellen beeinflusst, da FAK $-/-$ Fibroblasten eine reduzierte Wanderung (Ilic *et al.* 1995) und Fibroblasten, die FAK überexprimieren, eine beschleunigte Wanderung aufweisen (Cary *et al.* 1996). Die Phosphorylierung des Tyrosin³⁹⁷ scheint dabei eine Bedingung für die Wanderung der Zellen zu sein. Die Phosphorylierung von Tyr³⁹⁷ schafft eine Bindungsstelle für Proteine mit SH2- und SH3-Domänen, z. B. Kinasen der Src Familie und GTPasen regulierende Proteine. FAK spielt zusammen mit den Integrinen eine Rolle bei der Rekrutierung dieser Proteine in fokale Kontakte und der Assemblierung eines Signalübertragungskomplexes, der wiederum die Ausbildung fokaler Kontakte und die Migration von Zellen beeinflusst (Sieg *et al.* 1999). Das Fehlen von Syndecan-4 könnte die Bildung eines solchen Signalübertragungskomplexes beeinträchtigen, was zu den beobachteten Migrationsproblemen führen könnte. Wir vermuteten, dass das Fehlen von Syndecan-4 durch kompensatorische Effekte ausgeglichen werden kann, da Syndecan-4 Knockout Fibroblasten in der Lage sind, fokale Kontakte zu bilden. Da Syndecan-2 von allen Syndecanen die größten Homologien zu Syndecan-4 aufweist (Carey 1997), wäre denkbar, dass Syndecan-2 zumindest teilweise die Rolle von Syndecan-4 bei der Ausbildung fokaler Kontakte übernimmt. Es konnte jedoch in dieser Arbeit keine Lokalisation von Syndecan-2 in fokalen Kontakten der

Knockout Zellen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass Syndecan-4, möglicherweise wegen der spezifischen Interaktionen seiner zytoplasmatischen Domäne mit Proteinen aus fokalen Kontakten, das einzige Syndecan ist, das in fokalen Kontakten vorkommt. Wie das Fehlen von Syndecan-4 möglicherweise durch andere Syndecane kompensiert wird, ist weiterhin unbekannt und wird zurzeit in unserem Labor von Ferda Cevikbas im Rahmen ihrer Promotion untersucht.

Auffällig bei allen bisher beschriebenen Versuchen ist, dass sich Syndecan-4 heterozygote Fibroblasten immer genau so verhalten wie Syndecan-4 Knockout Fibroblasten. Die Oligomerisierung der Syndecane spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Ausübung ihrer Funktion (Carey 1997; Zimmermann & David 1999). Insbesondere im Fall von Syndecan-4 ist die Oligomerisierung der zytoplasmatischen Domäne eine Voraussetzung für die Funktion von Syndecan-4 (Horowitz *et al.* 1999; Oh *et al.* 1997; Oh *et al.* 1998). Möglicherweise ist ein bestimmter Schwellenwert an Syndecan-4 Molekülen in der Zellmembran nötig, um diese Oligomerisierung und damit die Funktion von Syndecan-4 zu gewährleisten. Dieser Schwellenwert ist in Syndecan-4 heterozygoten Fibroblasten möglicherweise unterschritten. Da Syndecan-4 in nicht aktivierten Zellen nur in geringen Mengen von Zellen exprimiert wird, könnte also bereits die Reduktion der Syndecan-4 Menge einen Funktionsverlust von Syndecan-4 verursachen.

5.1.2 Die Proliferation von Fibroblasten ist durch das Fehlen von Syndecan-4 nicht beeinträchtigt

In einem Proliferations-Assay wurde die Auswirkung von TGF- β 1 auf die Proliferation von Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten getestet. Zwar wirkte sich die Zugabe von TGF- β 1 je nach Serumkonzentration im Medium unterschiedlich aus, es konnten jedoch keine Unterschiede in der Proliferation von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten und Wildtyp Fibroblasten festgestellt werden. Während TGF- β 1 in Gegenwart von 10 % Serum die Proliferation von Fibroblasten erhöht hat, hatte die Zugabe von TGF- β 1 zum Medium mit 0,5 % Serum einen eher antiproliferativen Effekt. Clark *et al.* (1997) stellten die gleiche serumabhängige Änderung der Proliferation nach Zugabe von TGF- β 1 zu humanen Fibroblasten fest. TGF- β 1 kann, je nach Zusammenspiel mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, eine unterschiedliche Wirkung auf Zellen haben. Aktiviert man z. B. Zellen gleichzeitig mit TGF- β 1 und EGF, resultiert daraus die Proliferation der Zellen, im

Gegensatz dazu wird in Zellen, die mit TGF- β 1 und IGF gleichzeitig stimuliert werden, die Differenzierung stimuliert (Grotendorst *et al.* 2004). Somit könnte die beobachtete serumabhängige Reaktion der Zellen auf die TGF- β 1 Zugabe an der unterschiedlichen Konzentration und Verfügbarkeit weiterer Wachstumsfaktoren im Medium liegen.

Obwohl Syndecan-4 in einigen Fällen die Proliferation von Zellen beeinflusst (Bass & Humphries 2002) konnte hier kein Einfluss von Syndecan-4 auf die Proliferation von dermalen Fibroblasten festgestellt werden. Man nimmt an, dass Syndecan-4 die Proliferation von Zellen größtenteils durch die Wechselwirkung seiner Heparansulfat-Ketten mit verschiedenen Wachstumsfaktoren beeinflusst, indem es die Verfügbarkeit dieser Wachstumsfaktoren für die Zelle erhöht (Carey 1997; Clayton *et al.* 2001; Elenius & Jalkanen 1994). Bei einer reduzierten Menge an Heparansulfat auf der Zelloberfläche, bedingt durch das Fehlen von Syndecan-4, könnte man eine Veränderung der Proliferationsrate der Zellen erwarten.

In unserem Labor wurde jedoch festgestellt, dass in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten die Expression von Syndecan-1 erhöht ist (Ferda Cevikbas, unveröffentlichte Daten). Die Überexpression von Syndecan-1 in den Syndecan-4 defizienten Zellen könnte die Menge an Heparansulfat-Ketten auf der Zelloberfläche ausgleichen und die unveränderte Proliferationsrate erklären.

Eine reduzierte Migrationsfähigkeit von Fibroblasten kann eine fehlende Akkumulation von Granulationsgewebe zu Folge haben. Dies wurde z. B. an Studien mit Vimentin Knockout Mäusen nachgewiesen. Bei diesen Tieren ist ebenfalls nur die Migration, nicht aber die Proliferation der Fibroblasten betroffen, und sie zeigen ähnliche Wundheilungsstörungen mit einer reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe wie Syndecan-4 Knockout Mäuse (Eckes *et al.* 2000; Eckes *et al.* 1998).

Zusammenfassend scheint die reduzierte Bildung von Granulationsgewebe in den Wunden der Syndecan-4 Knockout Mäuse hauptsächlich durch die reduzierte Migrationskapazität von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten bedingt zu sein.

5.2 Zelluläre Ursachen für die reduzierte Wundkontraktion in Syndecan-4 Knockout Mäusen

Neben der reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe ist auch die Kontraktion der Wunden von Syndecan-4 Knockout Mäusen während der ersten Tage der Wundheilung stark verringert. In Kollagen-Gel-Kontraktionsassays wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, dass Syndecan-4 defiziente Fibroblasten, nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF- β 1, reduzierte kontraktile Fähigkeiten entwickeln. Weiterhin war die durch TGF- β 1 induzierte Differenzierung von Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten in Myofibroblasten eingeschränkt, was zu der Reduktion der Wundkontraktion der Syndecan-4 Knockout Mäuse führen könnte. Die beobachteten Unterschiede in der Wirkung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 haben ihre Ursachen möglicherweise in der Signaltransduktion des Wachstumsfaktors. Während in der Aktivierung der Smad Proteine durch TGF- β 1 keine Unterschiede zwischen Syndecan-4 $-/-$ und Wildtyp Fibroblasten festgestellt wurden, zeigten sich Unterschiede in der Regulation der MAP Kinasen.

5.2.1 Syndecan-4 Knockout Fibroblasten weisen reduzierte kontraktile Fähigkeiten und eine verminderte Differenzierung zu Myofibroblasten in Antwort auf den Wachstumsfaktor TGF- β 1 auf

Zur Untersuchung der Wundkontraktion *in vitro* wurde das Modell der Kollagen-Gel-Kontraktion gewählt. Syndecan-4 Knockout Fibroblasten wiesen in Gegenwart von 0,5 % Serum keine signifikanten Verzögerungen bei der Kontraktion von Kollagen-Gelen auf. Sie kontrahierten die Kollagen-Gele zwar tendenziell etwas schlechter als Wildtyp Fibroblasten, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Echtermeyer *et al.* (2001) untersuchten die Kontraktion von Kollagen-Gelen in Gegenwart von 10 % FKS und kamen zu demselben Ergebnis, dass Syndecan-4 defiziente Fibroblasten keine signifikanten Unterschiede in der Kontraktion aufweisen, wohl aber die Tendenz, die Gele schlechter zu kontrahieren. Die durchgeführten Versuche ergaben jedoch, dass die Kontraktionsfähigkeit von Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp Fibroblasten in Gegenwart des Wachstumsfaktors TGF- β 1 reduziert war. Es ist bekannt, dass TGF- β 1 die Kontraktion von Kollagen-Gelen durch Fibroblasten stark beschleunigt (Finesmith *et al.* 1990; Fukamizu & Grinnell 1990; Montesano & Orci 1988). Die Kontraktion von nicht angehefteten Kollagen-Gelen durch Fibroblasten wird durch die Kontraktion der Zellen bei

der Zellwanderung hervorgerufen, die auftritt, wenn die Fibroblasten versuchen, sich durch die Kollagen-Matrix zu bewegen. Gleichzeitig erfolgt eine Umstrukturierung der Kollagen-Matrix durch die Fibroblasten, was ebenfalls zur Kontraktion der Gele beiträgt (Grinnell & Lamke 1984; Harris *et al.* 1981; Tomasek *et al.* 2002). Übertragen auf die Situation während der Wundheilung entspricht dies den Kräften, die die dermalen Fibroblasten ausüben, während sie in die Wunde einwandern. Da die Kontraktion von freischwimmenden Kollagen-Gelen durch die Migration von Zellen vermittelt wird, spielen dabei die Adhäsion der Zellen an die Matrix und die Organisation des Zytoskelettes eine entscheidende Rolle. Durch welche Mechanismen TGF- β 1 diese Prozesse stimuliert, ist noch relativ unklar. Nakamura *et al.* (2002) fanden heraus, dass TGF- β 1 die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts von Zellen in Kollagen-Gelen induziert, und dass an diesem Prozess RhoA beteiligt ist. Da nachgewiesen wurde, dass Syndecan-4 den Level an aktivem RhoA beeinflussen kann (Wilcox-Adelman *et al.* 2002), könnte dies im Zusammenhang mit einer reduzierten Kontraktionsfähigkeit der Zellen stehen. Wie sich die Aktivierung mit TGF- β 1 auf den Level an aktivem RhoA in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten auswirkt, wird zur Zeit in unserem Labor untersucht.

Die Kontraktionsfähigkeit der Fibroblasten selber ist jedoch nicht ausreichend, eine Wunde zu kontrahieren. Die in das Wundgebiet eingewanderten Fibroblasten differenzieren zu sogenannten Myofibroblasten. Diese entwickeln kontraktile Kräfte und tragen maßgeblich zur Wundkontraktion bei (Tomasek *et al.* 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Syndecan-4 Knockout Fibroblasten, die über mehrere Tage in Anwesenheit von TGF- β 1 in gestressten Kollagen-Gelen oder in einem serumfreien System inkubiert wurden, in einem deutlich geringeren Maß zu Myofibroblasten differenzierten als Wildtyp Fibroblasten.

Kultiviert man Fibroblasten in gestressten Kollagen-Gelen, entwickeln diese eine Zugspannung im Gel, die der Zugspannung im Granulationsgewebe einer verheilenden Wunde entspricht (Delvoye *et al.* 1991; Kolodney & Wysolmerski 1992). Diese Zugspannung und der Wachstumsfaktor TGF- β 1 induzieren die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Desmouliere *et al.* 1993; Grinnell 1994; Ronnov-Jessen & Petersen 1993). TGF- β 1 induziert unter anderem die *de novo* Synthese von α -smooth-muscle Aktin, dessen kontraktile Eigenschaften für die Wundkontraktion

mitverantwortlich sind (Gabbiani 2003). Diese TGF- β 1 induzierte Expression von α -smooth-muscle Aktin war in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten deutlich reduziert.

TGF- β 1 bewirkt in Fibroblasten, die unter Zugspannung stehen, die Entwicklung von sogenannten „reifen“ fokalen Kontakten (Tomasek *et al.* 2002). Im Gegensatz zu „normalen“ fokalen Kontakten enthalten die fokalen Kontakte in Myofibroblasten erheblich mehr Integrin α 5 β 1 Rezeptoren, Paxillin, Vinculin und fokale Adhäsionskinase. Die fokalen Kontakte in Myofibroblasten sind zudem erheblich größer und länger und tragen dazu bei, die kontraktilen Kräfte der Myofibroblasten auf die umgebende Matrix zu übertragen (Dugina *et al.* 2001; Tomasek *et al.* 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 die Phosphorylierung der FAK, unter anderem am Tyrosinrest 397, erhöht und dass die Phosphorylierung und Aktivierung der FAK Voraussetzungen für die Expression von α -smooth-muscle Aktin sind. Inhibiert man die fokale Adhäsionskinase, wird nach TGF- β 1 Zugabe kaum α -SMA gebildet (Thannickal *et al.* 2003). Denkbar wäre, dass in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten diese durch TGF- β 1 induzierte „Reifung“ der fokalen Kontakte gestört ist und auch hier eine geringere Phosphorylierung der FAK vorliegt. Dies könnte eine geringere Expression von α -SMA zur Folge haben. Um diesbezüglich genauere Aussagen machen zu können, müssten jedoch weitere Untersuchungen der fokalen Kontakte in Myofibroblasten durchgeführt werden.

Die TGF- β 1 induzierte Differenzierung von Syndecan-4 $-/-$ Zellen in Myofibroblasten ist sowohl in Kollagen-Gelen in Anwesenheit von 0,5 % Serum als auch im serumfreien Zellkultursystem eingeschränkt. Dies zeigt, dass die Unterschiede in der α -SMA Expression tatsächlich auf die Wirkung von TGF- β 1 zurückzuführen sind und nicht auf einer möglichen Zusammenwirkung mehrerer Faktoren im Serum beruhen. Somit scheinen in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten Unterschiede in der Weiterleitung des TGF- β 1 Signals vorzuliegen.

Welche intrazellulären Signalwege von TGF- β 1 für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten angeschaltet werden, ist nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert. Hu *et al.* (2003) fanden heraus, dass Smad3 die Übertragung des TGF- β 1 Signals und die Induktion der α -SMA Expression in Lungenfibroblasten vermittelt, während Evans *et al.* (Evans *et al.* 2003) ebenfalls an Lungenfibroblasten zeigten, dass Smad2 und nicht Smad3 für die Expression von α -SMA durch TGF- β 1 verantwortlich ist. In dieser Arbeit konnten jedoch keine Unterschiede in der Aktivierung der Smad Proteine durch TGF- β 1 zwischen

Wildtyp und Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten nachgewiesen werden. Somit scheinen die Signalwege, die zu der verringerten α -smooth-muscle Aktin Expression in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten führen, unabhängig von Smad Proteinen zu sein.

Neben den Smad Proteinen spielen aber auch MAP Kinasen eine Rolle bei der TGF- β 1 induzierten Myofibroblasten-Differenzierung. In Lungenfibroblasten ist die JNK Kinase an der TGF- β 1 induzierten Expression von α -SMA beteiligt (Hashimoto *et al.* 2001). Die p38 und ERK1/2 MAP Kinasen spielen ebenfalls eine Rolle bei der TGF- β 1 Signalübertragung (Hanafusa *et al.* 1999; Hayashida *et al.* 1999). Wahrscheinlich sind sowohl die Smad Proteine als auch die MAP Kinasen an der Differenzierung der Myofibroblasten beteiligt. In Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten ist die Aktivierung der MAP Kinasen durch TGF- β 1 beeinflusst, nicht aber die Aktivierung der Smad Proteine. Dies könnte zu der festgestellten Reduktion der Myofibroblasten-Differenzierung bzw. der α -SMA Expression in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten führen, würde aber auch erklären, warum dieser Prozess nicht komplett unterdrückt ist.

In Wunden der Syndecan-4 Knockout Mäuse würde die reduzierte Fähigkeit der Fibroblasten, in Myofibroblasten zu differenzieren, die fehlende Wundkontraktion während der ersten Tage erklären.

5.2.2 Unterschiede in der TGF- β 1 induzierten Aktivierung der MAP Kinasen in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten könnten zu der reduzierten Kontraktionsfähigkeit und Myofibroblasten-Differenzierung führen

Obwohl in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten die Reaktion der Zellen auf den Wachstumsfaktor TGF- β 1 in einigen Fällen beeinträchtigt war, konnten überraschenderweise keine Veränderungen in der Aktivierung und Menge der Smad Proteine festgestellt werden. Die Rezeptor-Smads sind die direkten Mediatoren des TGF- β 1 Signals. Sie werden unmittelbar vom TGF-Rezeptor-Komplex aktiviert und können dann direkt bestimmte Zielgene aktivieren. Da bekannt ist, dass Syndecan-4 TGF- β 1 über die Heparansulfat-Ketten binden kann (Ishiguro *et al.* 2001), wäre es denkbar, dass Syndecan-4 als Korezeptor für die TGF- β Rezeptoren fungiert und TGF- β 1 seinen Rezeptoren präsentiert. In diesem Fall sollte jedoch in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten weniger TGF- β 1 an die Zelloberfläche und somit an den Rezeptor gebunden

sein, was sich dann in einer niedrigeren Aktivierungsrate der Smad Proteine bemerkbar machen müsste. Auch müssten in diesem Fall Syndecan-4 Knockout Fibroblasten generell eine reduzierte Reaktion auf die Zugabe von TGF- β 1 aufweisen. Die Aktivierung der Smad Proteine war jedoch in Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten nicht verändert. Überdies zeigten Syndecan-4 Fibroblasten nach TGF- β 1 Zugabe keine Veränderungen in der Proliferation. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die reduzierten Reaktionen der Syndecan-4 Fibroblasten auf TGF- β 1 nicht auf einer möglichen Funktion von Syndecan-4 als Korezeptor für die TGF- β Rezeptoren beruht, wie dies erst kürzlich für Syndecan-2 gezeigt werden konnte (Chen *et al.* 2004). In diesem Fall bewirkt die Bindung von TGF- β 1 an Syndecan-2 die erhöhte Expression der TGF-Rezeptoren I und II, was die Antwort von Syndecan-2 überexprimierenden Zellen auf TGF- β 1 beschleunigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Beeinflussung der Signalübertragung von TGF- β 1 durch Syndecan-4 ohne Beteiligung der TGF- β Rezeptoren erfolgt, und die Bindung von TGF- β 1 an seine Rezeptoren nicht beeinträchtigt ist. Vorstellbar wäre, dass Syndecan-4 das TGF- β 1 Signal über Bindungspartner seiner zytoplasmatischen Domäne moduliert. Für den Wachstumsfaktor FGF-2 konnte eine solche Modulation des FGF-2 Signals über die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-4 bereits nachgewiesen werden. In diesem Fall induziert die Bindung von FGF-2 an den FGF-Rezeptor die Bindung und Aktivierung der Protein Kinase C_{α} durch die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-4 (Horowitz & Simons 1998; Simons & Horowitz 2001).

Ein Zusammenhang zwischen Syndecan-4 und der Regulation der MAP Kinasen war bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass die Aktivierung der MAP Kinasen durch TGF- β 1 in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten teilweise beeinträchtigt ist.

In Wildtyp Fibroblasten wurden die untersuchten MAP Kinasen p38, JNK1/2 und ERK1/2 alle durch TGF- β 1 aktiviert. Während im Fall der p38 MAP Kinase diese Aktivierung erst nach 60 Minuten festgestellt werden konnte, wurden die JNK1/2 und ERK1/2 sehr schnell und nur transient aktiviert. Ein ähnliches Aktivierungsmuster aller drei MAP Kinasen nach TGF- β 1 Aktivierung wurde unter anderem auch in Lungenfibroblasten gefunden (Hashimoto *et al.* 2001). In Syndecan-4 $-/-$ Fibroblasten wurde die p38 MAP Kinase ebenfalls nach ca. 60 Minuten durch TGF- β 1 aktiviert. Im Gegensatz dazu bewirkte die

Zugabe von TGF- β 1 in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten keine Aktivierung der JNK1/2 und ERK1/2 Kinasen. Die Aktivität der beiden Kinasen schien in Syndecan-4 -/- Fibroblasten durch TGF- β 1 eher herabreguliert zu werden. Syndecan-4 ist demnach möglicherweise an der TGF- β 1 Signalweiterleitung über die MAP Kinasen beteiligt.

Man nimmt an, dass TGF- β 1 die kleinen G-Proteine der Ras- und Rho-Familie aktivieren kann und dadurch die MAP Kinase Signalkaskaden ausgelöst werden (Massague 2000; Mulder 2000). Wie jedoch die kleinen G-Proteine durch TGF- β 1 aktiviert werden, ist noch völlig unbekannt. Syndecan-4 könnte an dieser Signalweiterleitung des TGF- β 1 Signals an die Ras- und Rho-G-Proteine beteiligt sein, was jedoch noch genauer untersucht werden müsste.

Die Regulation der MAP Kinase Aktivität durch TGF- β 1 kann auch auf Ebene der MAPK Kinasen stattfinden (Hanafusa *et al.* 1999; Hocevar *et al.* 1999), was die Regulationsmöglichkeiten noch erhöht. Auch konnte gezeigt werden, dass die MAP Kinase Signalwege und die Smad Signalwege teilweise ineinander übergreifen und sich so gegenseitig beeinflussen können. So kann z. B. Smad3 direkt oder indirekt über die JNK Kinase und p38 Kinase phosphoryliert werden, wodurch die nukleäre Translokation von Smad3 erhöht wird (Engel *et al.* 1999; Furukawa *et al.* 2003). Wie Syndecan-4 in diese Regulationsmechanismen involviert ist, muss noch im Detail untersucht werden.

In den durchgeführten Versuchen war auffällig, dass in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten die Menge der phosphorylierten Form aller drei MAP Kinasen im unstimulierten Zustand höher war als in Wildtyp Fibroblasten. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse ergaben ebenfalls, dass der Level der phosphorylierten Form der beiden MAP Kinase JNK und p38 in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp Fibroblasten erhöht ist (Saoncella *et al.* 2004). Dies unterstützt die Annahme, dass Syndecan-4 die Regulation der MAP Kinasen beeinflussen kann. Es wurde jedoch kein erhöhter Level für die Phosphorylierung der ERK Kinasen gemessen. Gerade die Phosphorylierung der ERK Kinasen war jedoch in den hier gezeigten Versuchen stark erhöht. Möglicherweise liegt die Ursache für diese Diskrepanz in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen. In der genannten Veröffentlichung adherierten die Zellen auf einer Fibronektinmatrix, wohingegen die Zellen in dieser Arbeit ihre eigene Matrix synthetisiert hatten.

Syndecan-4 könnte in unstimulierten Fibroblasten als negativer Regulator für die Phosphorylierung der MAP Kinasen dienen. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung der

MAP Kinasen in Fibroblasten bei der Ausbildung fokaler Kontakte über die Integrine vermittelt wird (Schlaepfer & Hunter 1996; Schlaepfer *et al.* 1997). Daher wäre es denkbar, dass diese Aktivierung der MAP Kinasen durch Integrine von Syndecan-4 während der Bildung fokaler Kontakte beeinflusst wird. Möglicherweise erfolgt je nach Substrat, auf dem die Zellen wachsen, eine unterschiedliche Regulation der MAP Kinasen, was die oben genannten Unterschiede in der Aktivierung von ERK erklären könnte. Die genauen Mechanismen, die zu einer Fehlregulation der MAP Kinasen in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten führen, müssen jedoch in weiteren Studien geklärt werden.

Wir nehmen an, dass die fehlende Aktivierung der JNK und ERK Kinasen durch TGF- β 1 zu der beobachteten reduzierten Kontraktionsfähigkeit und der reduzierten Differenzierung von Myofibroblasten in Syndecan-4 Knockout Fibroblasten beiträgt.

6 Zusammenfassung

Syndecan-4, ein transmembranes Heparansulfat-Proteoglykan, spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung. In Hautwunden ist die Expression von Syndecan-4 besonders in Fibroblasten stark erhöht. Darüber hinaus weisen Syndecan-4 Knockout Mäuse eine verzögerte Wundheilung auf. Die Probleme bei der Wundheilung resultieren aus der stark reduzierten Akkumulation von Granulationsgewebe und aus der fehlenden Wundkontraktion während der ersten Tage der Wundheilung. Da bisher die genaue Funktion von Syndecan-4 im Prozess der Wundheilung nicht bekannt war, sollten in dieser Arbeit die zellulären Mechanismen untersucht werden, die diesen Verzögerungen der Wundheilung in Syndecan-4 defizienten Mäusen zu Grunde liegen.

In einem *in vitro* Wundkontraktionsmodell wurden die kontraktile Fähigkeiten von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten untersucht. Unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors TGF- β 1 entwickeln Syndecan-4 Knockout Fibroblasten deutlich reduzierte kontraktile Kräfte und sind nicht in der Lage, eine Kollagen-Matrix im gleichen Maß zu kontrahieren wie Wildtyp Fibroblasten. Zudem wurde gezeigt, dass Syndecan-4 defiziente Fibroblasten eine deutlich geringere Differenzierung zu Myofibroblasten, die ebenfalls durch TGF- β 1 induziert wird, aufweisen. Die fehlende Wundkontraktion in Syndecan-4 Knockout Mäusen lässt sich durch die verringerte Kontraktionsfähigkeit und Myofibroblasten-Differenzierung von Syndecan-4 Knockout Fibroblasten unter dem Einfluss von TGF- β 1 erklären.

Diese beobachtete reduzierte Wirkung des Wachstumsfaktor TGF- β 1 auf Syndecan-4 Knockout Fibroblasten ist auf Veränderungen in der TGF- β 1 Signaltransduktion zurückzuführen. Syndecan-4 scheint keinen Einfluss auf die TGF- β 1 Signalweiterleitung durch die Smad-Proteine zu haben. Jedoch stellte sich heraus, dass Syndecan-4 die Aktivierung der MAP Kinasen durch TGF- β 1 beeinflusst. In Syndecan-4 Knockout Fibroblasten konnte, im Gegensatz zu Wildtyp Fibroblasten, keine Aktivierung der JNK und ERK MAP Kinasen durch TGF- β 1 festgestellt werden. Darüber hinaus ist die Phosphorylierung der MAP Kinasen auch in unstimulierten Syndecan-4 Knockout Fibroblasten anders reguliert als in Wildtyp Fibroblasten. Weitere Experimente müssen jedoch klären, wie Syndecan-4 den Aktivierungsgrad der MAP Kinasen beeinflusst.

Mit Hilfe eines *in vitro* Migrationsassays konnte gezeigt werden, dass Syndecan-4 defiziente dermale Fibroblasten eine reduzierte Fähigkeit zur Migration besitzen. Diese reduzierte Migration ist wahrscheinlich durch morphologische und funktionale Veränderungen in fokalen Kontakten der Syndecan-4 defizienten Zellen bedingt. So weisen Syndecan-4 +/- und Syndecan-4 -/- Fibroblasten besonders im Zentrum der Zellen deutlich mehr fokale Kontakte auf, die das Strukturprotein Vinculin enthalten. Darüber hinaus ist in Syndecan-4 defizienten Fibroblasten die Aktivität der fokalen Adhäsionskinase, einem wichtigen Signalmolekül in fokalen Kontakten, deutlich reduziert, was zu der beobachteten verringerten Migration führt. Die Proliferation von Fibroblasten scheint durch das Fehlen von Syndecan-4 nicht wesentlich beeinträchtigt zu sein, so dass die fehlende Akkumulation von Granulationsgewebe primär aus der reduzierten Migrationsfähigkeit von Syndecan-4 defizienten Fibroblasten resultiert.

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen konnten wichtige Einblicke in die Funktion von Syndecan-4 während der Wundheilung gewonnen werden. Eine Funktion von Syndecan-4 bei der Signalübertragung von TGF- β 1 und bei der Regulation der MAP Kinasen war bisher nicht bekannt und bietet neue Ansätze, die zellulären Funktionen von Syndecan-4 besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- Arora, P. D., Narani, N. & McCulloch, C. A. (1999) The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am.J.Pathol.*, 154, 871-882.
- Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R. & Gespach, C. (1997) Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J.Biol.Chem.*, 272, 1429-1432.
- Baciu, P. C. & Goetinck, P. F. (1995) Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts. *Mol.Biol.Cell*, 6, 1503-1513.
- Baciu, P. C., Saoncella, S., Lee, S. H., Denhez, F., Leuthardt, D. & Goetinck, P. F. (2000) Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *J.Cell Sci.*, 113 Pt 2, 315-324.
- Bass, M. D. & Humphries, M. J. (2002) Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem.J.*, 368, 1-15.
- Baur, P. S., Jr. & Parks, D. H. (1983) The myofibroblast anchoring strand--the fibronectin connection in wound healing and the possible loci of collagen fibril assembly. *J.Trauma*, 23, 853-862.
- Bennett, N. T. & Schultz, G. S. (1993) Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am.J.Surg.*, 166, 74-81.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. & Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu.Rev.Biochem.*, 68, 729-777.
- Burridge, K. & Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 12, 463-518.
- Carey, D. J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem.J.*, 327 (Pt 1), 1-16.
- Cary, L. A., Chang, J. F. & Guan, J. L. (1996) Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J.Cell Sci.*, 109 (Pt 7), 1787-1794.
- Chang, L. & Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37-40.

- Chen, L., Couchman, J. R., Smith, J. & Woods, A. (2002) Molecular characterization of chicken syndecan-2 proteoglycan. *Biochem.J.*, 366, 481-490.
- Chen, L., Klass, C. & Woods, A. (2004) Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J.Biol.Chem.*, 279, 15715-15718.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. & Cobb, M. H. (2001) MAP kinases. *Chem.Rev.*, 101, 2449-2476.
- Clark, R. A. (1993) Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am.J.Med.Sci.*, 306, 42-48.
- Clark, R. A., McCoy, G. A., Folkvord, J. M. & McPherson, J. M. (1997) TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J.Cell Physiol*, 170, 69-80.
- Clayton, A., Thomas, J., Thomas, G. J., Davies, M. & Steadman, R. (2001) Cell surface heparan sulfate proteoglycans control the response of renal interstitial fibroblasts to fibroblast growth factor-2. *Kidney Int.*, 59, 2084-2094.
- Couchman, J. R. & Woods, A. (1999) Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J.Cell Sci.*, 112 (Pt 20), 3415-3420
- Darby, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. (1990) Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*, 63, 21-29.
- David, G., Van der, S. B., Marynen, P., Cassiman, J. J. & Van Den, B. H. (1992) Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *J.Cell Biol.*, 118, 961-969.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E. & Livingston, D. M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54, 275-283.
- Delvoye, P., Wiliquet, P., Leveque, J. L., Nusgens, B. V. & Lapiere, C. M. (1991) Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J.Invest Dermatol.*, 97, 898-902.
- Denhez, F., Wilcox-Adelman, S. A., Baciou, P. C., Saoncella, S., Lee, S., French, B., Neveu, W. & Goetinck, P. F. (2002) Syndesmos, a syndecan-4 cytoplasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5. *J.Biol.Chem.*, 277, 12270-12274.
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J.Cell Biol.*, 122, 103-111.

- Dong, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu.Rev.Immunol.*, 20, 55-72.
- Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J. & Gabbiani, G. (2001) Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J.Cell Sci.*, 114, 3285-3296.
- Echtermeyer, F., Baciuc, P. C., Saoncella, S., Ge, Y. & Goetinck, P. F. (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J.Cell Sci.*, 112 (Pt 20), 3433-3441.
- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M. & Goetinck, P. (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J.Clin.Invest.*, 107, R9-R14.
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T. & Martin, P. (2000) Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J.Cell Sci.*, 113 (Pt 13), 2455-2462.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvee, A., Koteliansky, V., Babinet, C. & Krieg, T. (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J.Cell Sci.*, 111 (Pt 13), 1897-1907.
- Elenius, K., Vainio, S., Laato, M., Salmivirta, M., Thesleff, I. & Jalkanen, M. (1991) Induced expression of syndecan in healing wounds. *J.Cell Biol.*, 114, 585-595.
- Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. & Moses, H. L. (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J.Biol.Chem.*, 274, 37413-37420.
- Evans, R. A., Tian, Y. C., Steadman, R. & Phillips, A. O. (2003) TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp.Cell Res.*, 282, 90-100.
- Finesmith, T. H., Broadley, K. N. & Davidson, J. M. (1990) Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their ability to contract a collagen gel in response to growth factors. *J.Cell Physiol*, 144, 99-107.
- Fukami, K., Endo, T., Imamura, M. & Takenawa, T. (1994) alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.*, 269, 1518-1522.
- Fukamizu, H. & Grinnell, F. (1990) Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: effects of serum, transforming growth factor beta, and fibronectin. *Exp.Cell Res.*, 190, 276-282.
- Furukawa, F., Matsuzaki, K., Mori, S., Tahashi, Y., Yoshida, K., Sugano, Y., Yamagata, H., Matsushita, M., Seki, T., Inagaki, Y., Nishizawa, M., Fujisawa, J. & Inoue, K. (2003) p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology*, 38, 879-889.

- Gabbiani, G. (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J.Pathol.*, 200, 500-503.
- Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majne, G. (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27, 549-550.
- Gallo, R., Kim, C., Kokenyesi, R., Adzick, N. S. & Bernfield, M. (1996) Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J.Invest Dermatol.*, 107, 676-683.
- Gilmore, A. P. & Burridge, K. (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, 381, 531-535.
- Granes, F., Urena, J. M., Rocamora, N. & Vilaro, S. (2000) Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J.Cell Sci.*, 113 (Pt 7), 1267-1276.
- Greene, D. K., Tumova, S., Couchman, J. R. & Woods, A. (2003) Syndecan-4 associates with alpha-actinin. *J.Biol.Chem.*, 278, 7617-7623.
- Grinnell, F. (1994) Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J.Cell Biol.*, 124, 401-404.
- Grinnell, F. & Lamke, C. R. (1984) Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. *J.Cell Sci.*, 66, 51-63.
- Grotendorst, G. R., Rahmanie, H. & Duncan, M. R. (2004) Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J.*, 18, 469-479.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. & Nishida, E. (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J.Biol.Chem.*, 274, 27161-27167.
- Harris, A. K., Stopak, D. & Wild, P. (1981) Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290, 249-251.
- Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Matsumoto, K., Maruoka, S. & Horie, T. (2001) Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 163, 152-157.
- Hayashi, K., Hayashi, M., Jalkanen, M., Firestone, J. H., Trelstad, R. L. & Bernfield, M. (1987) Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. *J.Histochem.Cytochem.*, 35, 1079-1088.
- Hayashida, T., Poncelet, A. C., Hubchak, S. C. & Schnaper, H. W. (1999) TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression. *Kidney Int.*, 56, 1710-1720.

- Hazzalin, C. A. & Mahadevan, L. C. (2002) MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 3, 30-40.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-471.
- Hocevar, B. A., Brown, T. L. & Howe, P. H. (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J.*, 18, 1345-1356.
- Horowitz, A., Murakami, M., Gao, Y. & Simons, M. (1999) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. *Biochemistry*, 38, 15871-15877.
- Horowitz, A. & Simons, M. (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *J.Biol.Chem.*, 273, 25548-25551.
- Hu, B., Wu, Z. & Phan, S. H. (2003) Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 29, 397-404.
- Hynes, R. O. (1999) Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.*, 9, M33-M37.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M. & Yamamoto, T. (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377, 539-544.
- Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Iwase, M., Yoshikai, Y., Yanada, M., Yamamoto, K., Matsushita, T., Nishimura, M., Kusugami, K., Saito, H. & Muramatsu, T. (2001a) Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J.Biol.Chem.*, 276, 47483-47488.
- Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Matsuo, S., Kusugami, K., Saito, H. & Muramatsu, T. (2001b) Syndecan-4 deficiency increases susceptibility to kappa-carrageenan-induced renal damage. *Lab Invest*, 81, 509-516.
- Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Tsuzuki, S., Nakamura, E., Kusugami, K., Saito, H. & Muramatsu, T. (2000) Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J.Biol.Chem.*, 275, 5249-5252.
- Ishiguro, K., Kojima, T. & Muramatsu, T. (2002) Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconj.J.*, 19, 315-318.
- Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C. H., Heldin, N. E. & Ten Dijke, P. (1998) Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J.Biol.Chem.*, 273, 29195-29201.

- Kato, M., Saunders, S., Nguyen, H. & Bernfield, M. (1995) Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Mol.Biol.Cell*, 6, 559-576.
- Keum, E., Kim, Y., Kim, J., Kwon, S., Lim, Y., Han, I. & Oh, E. S. (2004) Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- α . *Biochem.J.*, 378, 1007-1014.
- Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L. & Bernfield, M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol.Biol.Cell*, 5, 797-805.
- Kojima, T., Takagi, A., Maeda, M., Segawa, T., Shimizu, A., Yamamoto, K., Matsushita, T. & Saito, H. (2001) Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb.Haemost.*, 85, 793-799.
- Kokenyesi, R. & Bernfield, M. (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J.Biol.Chem.*, 269, 12304-12309.
- Kolodney, M. S. & Wysolmerski, R. B. (1992) Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J.Cell Biol.*, 117, 73-82.
- Kornberg, L., Earp, H. S., Parsons, J. T., Schaller, M. & Juliano, R. L. (1992) Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.*, 267, 23439-23442.
- Ku, H. & Meier, K. E. (2000) Phosphorylation of paxillin via the ERK mitogen-activated protein kinase cascade in EL4 thymoma cells. *J.Biol.Chem.*, 275, 11333-11340.
- Langner, J., Ansorge, S., Bohhley, P., Kirschke, H. & Hanson, H. (1971) Intracellular protein breakdown. I. Activity determinations of endopeptidases using protein substrates. *Acta Biol.Med.Ger*, 26, 935-951.
- Lee, D. J., Rosenfeldt, H. & Grinnell, F. (2000) Activation of ERK and p38 MAP kinases in human fibroblasts during collagen matrix contraction. *Exp.Cell Res.*, 257, 190-197.
- Lim, S. T., Longley, R. L., Couchman, J. R. & Woods, A. (2003) Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C α (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . *J.Biol.Chem.*, 278, 13795-13802.
- Lin, H. Y. & Wang, X. F. (1992) Expression cloning of TGF- β receptors. *Mol.Reprod.Dev.*, 32, 105-110.
- Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369.

- Longley, R. L., Woods, A., Fleetwood, A., Cowling, G. J., Gallagher, J. T. & Couchman, J. R. (1999) Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J.Cell Sci.*, 112 (Pt 20), 3421-3431.
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L. & Massague, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell*, 73, 1435-1444.
- Lundqvist, K. & Schmidtchen, A. (2001) Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *Br.J.Dermatol.*, 144, 254-259.
- Martin, P. (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276, 75-81.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.*, 67, 753-791.
- Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 1, 169-178.
- Montesano, R. & Orci, L. (1988) Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85, 4894-4897.
- Mucsi, I., Skorecki, K. L. & Goldberg, H. J. (1996) Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J.Biol.Chem.*, 271, 16567-16572.
- Mulder, K. M. (2000) Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 11, 23-35.
- Nakamura, Y., Hirano, S., Suzuki, K., Seki, K., Sagara, T. & Nishida, T. (2002) Signaling mechanism of TGF-beta1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 43, 3465-3472.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H. & Ten Dijke, P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 389, 631-635.
- O'Kane, S. & Ferguson, M. W. (1997) Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 29, 63-78.
- Oh, E. S., Woods, A. & Couchman, J. R. (1997) Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J.Biol.Chem.*, 272, 11805-11811.
- Oh, E. S., Woods, A., Lim, S. T., Theibert, A. W. & Couchman, J. R. (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. *J.Biol.Chem.*, 273, 10624-10629.

- Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W. & Hanks, S. K. (1999) Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol. Cell Biol.*, 19, 4806-4818.
- Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B. Z., Matsumoto, K., Lin, D. C., Lin, S., Hahn, C. & Yamada, K. M. (2000) Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.*, 148, 1075-1090.
- Park, P. W., Reizes, O. & Bernfield, M. (2000) Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J. Biol. Chem.*, 275, 29923-29926.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers, G. T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, 22, 153-183.
- Rapraeger, A., Jalkanen, M., Endo, E., Koda, J. & Bernfield, M. (1985) The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.*, 260, 11046-11052.
- Rapraeger, A. C. (1993) The coordinated regulation of heparan sulfate, syndecans and cell behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 844-853.
- Rapraeger, A. C., Krufka, A. & Olwin, B. B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252, 1705-1708.
- Rioux, V., Landry, R. Y. & Bensadoun, A. (2002) Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4. *J. Lipid Res.*, 43, 167-173.
- Ronnov-Jessen, L. & Petersen, O. W. (1993) Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest*, 68, 696-707.
- Ruoslahti, E. & Yamaguchi, Y. (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 64, 867-869.
- Saoncella, S., Calautti, E., Neveu, W. & Goetinck, P. F. (2004) Syndecan-4 regulates ATF-2 transcriptional activity in a Rac1-dependent manner. *J. Biol. Chem.*
- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J. K., Mosher, D. F., Robinson, S. D., Hynes, R. O. & Goetinck, P. F. (1999) Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 2805-2810.
- Schafer, D. A. & Cooper, J. A. (1995) Control of actin assembly at filament ends. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 497-518.

- Schaffer, M. & Becker, H. D. (1999) [Immune regulation of wound healing]. *Chirurg*, 70, 897-908.
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R. & Parsons, J. T. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol.Cell Biol.*, 14, 1680-1688.
- Schaller, M. D. & Parsons, J. T. (1993) Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.*, 3, 258-262.
- Schlaepfer, D. D., Broome, M. A. & Hunter, T. (1997) Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol.Cell Biol.*, 17, 1702-1713.
- Schlaepfer, D. D. & Hunter, T. (1996) Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol.Cell Biol.*, 16, 5623-5633.
- Schuermann, M. (1990) An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic Acids Res.*, 18, 4945-4946.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R. & Schlaepfer, D. D. (1999) Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J.Cell Sci.*, 112 (Pt 16), 2677-2691.
- Simons, M. & Horowitz, A. (2001) Syndecan-4-mediated signalling. *Cell Signal.*, 13, 855-862.
- Singer, A. J. & Clark, R. A. (1999) Cutaneous wound healing. *N.Engl.J.Med.*, 341, 738-746.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzouana, G., Gillessen, D. & Gabbiani, G. (1986) A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J.Cell Biol.*, 103, 2787-2796.
- Steinfeld, R., Van Den, B. H. & David, G. (1996) Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J.Cell Biol.*, 133, 405-416.
- Stepp, M. A., Gibson, H. E., Gala, P. H., Iglesia, D. D., Pajoohesh-Ganji, A., Pal-Ghosh, S., Brown, M., Aquino, C., Schwartz, A. M., Goldberger, O., Hinkes, M. T. & Bernfield, M. (2002) Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J.Cell Sci.*, 115, 4517-4531.
- Thannickal, V. J., Lee, D. Y., White, E. S., Cui, Z., Larios, J. M., Chacon, R., Horowitz, J. C., Day, R. M. & Thomas, P. E. (2003) Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.*, 278, 12384-12389.

- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 3, 349-363.
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. & Wrana, J. L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, 95, 779-791.
- van der, F. A. & Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.*, 305, 285-298.
- Varki, A. (2002) Six blind men and the elephant--the many faces of heparan sulfate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 543-545.
- Verrecchia, F. & Mauviel, A. (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J.Invest Dermatol.*, 118, 211-215.
- Vuori, K. & Ruoslahti, E. (1993) Activation of protein kinase C precedes alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J.Biol.Chem.*, 268, 21459-21462.
- Wang, X. F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F. & Weinberg, R. A. (1991) Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell*, 67, 797-805.
- Werner, S. & Grose, R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.*, 83, 835-870.
- Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F. & Goetinck, P. F. (2002a) Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, 277, 32970-32977.
- Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F., Iwabuchi, T., Saoncella, S., Calautti, E. & Goetinck, P. F. (2002b) Syndecan-4: dispensable or indispensable? *Glycoconj.J.*, 19, 305-313.
- Woods, A. & Couchman, J. R. (1992) Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J.Cell Sci.*, 101 (Pt 2), 277-290.
- Woods, A. & Couchman, J. R. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol.Biol.Cell*, 5, 183-192.
- Woods, A., Longley, R. L., Tumova, S. & Couchman, J. R. (2000) Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Arch.Biochem.Biophys.*, 374, 66-72.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F. & Massague, J. (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, 71, 1003-1014.

-
- Xu, L., Chen, Y. G. & Massague, J. (2000) The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat.Cell Biol.*, 2, 559-562.
- Zamir, E. & Geiger, B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J.Cell Sci.*, 114, 3583-3590.
- Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K. M., Katz, B. Z., Lin, S., Lin, D. C., Bershadsky, A., Kam, Z. & Geiger, B. (2000) Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat.Cell Biol.*, 2, 191-196.
- Zhang, Y., Pasparakis, M., Kollias, G. & Simons, M. (1999) Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. *J.Biol.Chem.*, 274, 14786-14790.
- Zimmermann, P. & David, G. (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.*, 13 Suppl, S91-S100.

Lebenslauf

- Name:** Kerstin Brands
- geboren:** am 28.02.1974 in Stadtlohn
- Familienstand:** ledig
- Eltern:** Franz Brands
Irmgard Brands, geb. Wissing
- Schulbildung:** Grundschule: von 1980 bis 1984 in Gescher
Gymnasium: von 1984 bis 1993 in Coesfeld
- Hochschulreife:** am 28.05.1993, Heriburg-Gymnasium Coesfeld
- Studium:** Oktober 1993 bis Juni 1999, Diplom Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Promotionsstudiengang:** Biologie an der WWU Münster
- Prüfungen**
- Vordiplom:** am 21.09.1995 im Fach Biologie an der WWU Münster
- Diplom:** am 30.06.1999 im Fach Biologie an der WWU Münster
- Tätigkeiten:** *wissenschaftliche Mitarbeiterin:*
September 1999 - Juni 2000 am Institut für Botanik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Juli 2000 - Dezember 2004 am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster
- Beginn der Dissertation:** Juli 2000, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Münster, Betreuer: Dr. F. Echtermeyer, Prof. Dr. M. Bähler (Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster)

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Frank Echtermeyer für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit. Vor allem seine Begeisterung für die interessante Thematik war oft ansteckend und motivierend.

Prof. Dr. Martin Bähler danke ich für die Übernahme der externen Betreuung im Fachbereich Biologie.

Prof. Dr. Peter Bruckner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke den Mitgliedern unserer kleinen netten Arbeitsgruppe - Ferda, Petra und Jürgen - für das nette Arbeitsklima und die technische und menschliche Unterstützung. Ferda danke ich besonders für das wiederholte Korrigieren des Manuskripts.

Bei allen Mitgliedern des Instituts möchte ich mich für die sehr angenehme Atmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders der „1.Etage“ danke ich, dass ich sooft Reagenzien „ausleihen“ durfte.

Bedanken möchte ich mich bei allen Freunden und Bekannten für Ablenkungen und Aufheiterungen jeglicher Art! Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Sandra, meiner „Leidensgenossin“ und „Hüfferstiftbegleiterin“ seit Studienzeiten.

Bei Maria und Roland möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung und für das Korrekturlesen der Arbeit (trotz „Fach-Chinesisch“) bedanken.

Sonja danke ich für so gute Freundschaft seit so langer Zeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Marco und Andrea für ihre großartige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Mein größter Dank gilt Dir Jens, für Dein Verständnis, Deine unglaubliche Geduld und Deinen Glauben an mich. Du hast es immer wieder geschafft mich zu motivieren und aufzumuntern und dadurch einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

