



Funktion der Somatostatinrezeptoren in der humanen Epidermis

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
des Departments Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Matthias Vockel

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-J. KREIENKAMP
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 18. September 2009

Hamburg, den 04. September 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Ganzhorn".

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau und Funktion der humanen Epidermis	1
1.1.1	Tight Junctions in der Epidermis	2
1.1.2	Epidermale Wundheilung	3
1.1.3	Hormonelle Regulation der Epidermis durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.2	Somatostatin	6
1.2.1	Somatostatinrezeptoren	8
1.2.2	Signaltransduktion durch Somatostatinrezeptoren	10
1.2.3	Somatostatin und Somatostatinrezeptoren in der Haut	12
1.3	Ziel der Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Primärzellen	14
2.1.2	Material für molekularbiologische Arbeiten	14
2.1.3	Material für proteinbiochemische Arbeiten	15
2.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	15
2.1.5	Sonstige Chemikalien	16
2.1.6	Plasmide	16
2.1.7	Antikörper	17
2.2	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	18
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterienstämme	18
2.2.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen mit Plasmid-DNA	18
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA	18
2.2.5	Isolierung von RNA	19
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.2.8	DNA-Sequenzierung	20
2.2.9	Microarray-Expressionsstudien	21
2.3	Proteinbiochemische Methoden	22
2.3.1	Expression und Isolierung rekombinanter Proteine	22
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.3.4	Immunologische Detektion von Proteinen (Westernblot)	24
2.3.5	Generierung und Aufreinigung von Antikörpern	24
2.3.6	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	25
2.3.7	Antikörperkopplung an Protein A/G-Sepharose	25
2.3.8	Peptidkopplung an NHS-Sepharose	25
2.3.9	Affinitätspräzipitationen	26

2.4	Zellbiologische Methoden	26
2.4.1	Kultivierung primärer Keratinozyten und eukaryotischer Zelllinien	26
2.4.2	Kollagenbeschichtung	27
2.4.3	Bestimmung der Zellviabilität	27
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl	27
2.4.5	Zellyse	27
2.4.6	Transfektion eukaryotischer Zellen	27
2.4.7	Messung des transepithelialen Widerstands	28
2.4.8	Bestimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels	28
2.4.9	Proliferationsassay	29
2.4.10	Migrationsassay	29
2.4.11	Koimmunpräzipitation	29
2.4.12	<i>Ex vivo</i> - Wundheilungsmodelle	30
2.4.13	Immunzytologische Fluoreszenzfärbungen	30
2.4.14	Immunhistologische Fluoreszenzfärbungen	30
2.4.15	Statistische Auswertungen	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Expression von Somatostatin in der Epidermis	32
3.1.1	Nachweis von Somatostatin in der Haut	32
3.1.2	Lokalisation von Somatostatin-positiven Zellen in der Epidermis	33
3.2	Expression der Somatostatinrezeptoren in der Epidermis	35
3.2.1	Nachweis der SSTR-Subtypen in der Haut	35
3.2.2	Herstellung eines SSTR3-spezifischen Antikörpers	37
3.2.3	SSTR3-Lokalisation in der humanen Epidermis	38
3.3	Aktivierung der Somatostatinrezeptoren in Keratinozyten	39
3.3.1	Beeinflussung des cAMP-Signalwegs durch SST	39
3.3.2	Beeinflussung des MAPK-Signalweges durch SST	42
3.3.3	Einfluss von SST auf die Genexpression von Keratinozyten	44
3.4	Somatostatin reguliert die Barrierefunktion von Keratinozyten	47
3.4.1	Interaktion des SSTR-Subtyps 3 mit dem Tight Junction-Protein MUPP1	48
3.4.2	Somatostatin erhöht den epithelialen Widerstand von Keratinozyten	51
3.4.3	SSTR-Aktivierung ändert die Zusammensetzung von Tight Junctions	52
3.5	Somatostatin inhibiert die Proliferation von Keratinozyten	53
3.6	Somatostatin inhibiert die Migration von Keratinozyten	54
3.7	Somatostatin beeinflusst die Dynamik des Zytoskeletts	55
3.7.1	Somatostatin verzögert die Lamellipodienbildung	56
3.7.2	Somatostatin verzögert die Ausbildung von Fokaladhäsionen	57
3.7.3	Somatostatin verringert die Aktivität der GTPase Rac1	58
3.8	Somatostatin inhibiert die epidermale Wundheilung	59

4	DISKUSSION	61
4.1	Die Funktion des epidermalen SSTR-Systems	64
4.1.1	Kontrolle der Barrierefunktion	64
4.1.2	Kontrolle der Proliferation	67
4.1.3	Kontrolle der Migration	68
4.1.4	Kontrolle der epidermalen Wundheilung	71
4.1.5	Pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktion von Keratinozyten	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATUR	78

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der humanen Epidermis	1
Abb. 1-2: Modell des Aufbaus einer epithelialen Tight Junction	3
Abb. 1-3: Die Phasen der Wundheilung nach einer Verwundung	4
Abb. 1-4: Struktur und Synthese des Peptidhormons Somatostatin	6
Abb. 1-5: Primärstruktur und Membrantopologie eines Somatostatinrezeptors	8
Abb. 1-6: Beispiel der SST-vermittelten Signaltransduktion	11
Abb. 3-1: Expression des Somatostatingens in humanem Hautgewebe	32
Abb. 3-2: Vergleich von SST-positiven Zellen in Rattenhirn und humaner Haut	33
Abb. 3-3: SST-positive dendritische Zellen in der Epidermis	34
Abb. 3-4: SST-positive Merkelzellen in der Epidermis	34
Abb. 3-5: Expression der Somatostatinrezeptoren in Haut und Keratinozyten	36
Abb. 3-6: Expression von SSTR1-5 in Keratinozyten junger und alter Spender	36
Abb. 3-7: Sensitivität und Spezifität des generierten SSTR3-Antikörper	37
Abb. 3-8: Expression und Lokalisation des Rezeptorsubtyps SSTR3 in der Epidermis	38
Abb. 3-9: Einfluss von SST auf den cAMP-Signalweg in Keratinozyten	40
Abb. 3-10: Konzentrationsabhängige Inhibition des cAMP-Signalweges	41
Abb. 3-11: Einfluss von rezeptorselektiven SSTR-Agonisten auf den cAMP-Spiegel	42
Abb. 3-12: SST-Rezeptoraktivierung führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen	43
Abb. 3-13: ERK-Modulation durch rezeptorselektive SSTR-Agonisten	43
Abb. 3-14: Die SSTR-Aktivierung bewirkt eine Änderung der Genexpression	44
Abb. 3-15: Regulierte Gene nach SST-Rezeptoraktivierung	46
Abb. 3-16: Subzelluläre Verteilung des SSTR3 in Keratinozyten	47
Abb. 3-17: Expression von SSTR3 und MUPP1 in Abhängigkeit von der Differenzierung	48
Abb. 3-18: Expression von MUPP1 in humaner Epidermis und Keratinozyten	49
Abb. 3-19: Spezifische Interaktion von SSTR3 mit MUPP1 in Keratinozyten	50
Abb. 3-20: Kolo-kalisation von SSTR3 und MUPP1 in humanen Keratinozyten	50
Abb. 3-21: Somatostatin erhöht den transepithelialen Widerstand	51
Abb. 3-22: Somatostatin induziert die Expression von Claudin-4	52
Abb. 3-23: Die Proliferation von Keratinozyten wird durch SST inhibiert	53
Abb. 3-24: Einfluss von rezeptorselektiven SSTR-Agonisten auf die Proliferation	53
Abb. 3-25: SST inhibiert die Migration von Keratinozyten	54
Abb. 3-26: Inhibierung der Zellmigration durch selektive SSTR-Agonisten	55
Abb. 3-27: SST verzögert die Ausbildungen von Lamellipodien	56
Abb. 3-28: SST verringert die Ausbildung von Fokaladhäsionen	58
Abb. 3-29: SST verringert die Aktivität von Rac1	59
Abb. 3-30: SST inhibiert die epidermale Wundheilung in der Schweinehaut	60
Abb. 4-1: Die Lokalisation des SST/SSTR-Systems in der humanen Epidermis	63
Abb. 4-2: Die Funktionen der Somatostatinrezeptoren in epidermalen Keratinozyten	74

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CK	Cytokeratin
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	Diamidinophenylindol
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	GPCR-Region (<i>extracellular loop</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Kinase (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
et al.	und andere (<i>et alteri/ alii</i>)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSK	Forskolin
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein (<i>GTPase-activating protein</i>)
GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-triphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GPCRs	G-Protein-gekoppelter Rezeptoren
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
G α	α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine (GTPase)
G $\beta\gamma$	dimere $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICL	GPCR-Region (<i>intracellular loop</i>)
IP	Immunpräzipitation
JAM	TJ-Protein (<i>junctional adhesion molecule</i>)
kDa	Kilodalton
KGM	Keratinocytenmedium (<i>keratinocyte growth medium</i>)
l	Liter
LPA	Lysophosphatidylsäure (<i>lysophosphatidic acid</i>)
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere

MAPK	Kinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Min.	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MUPP1	TJ-Protein (<i>multiple PDZ domain protein 1</i>)
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	Proteindomäne (<i>PSD-95, Discs large, ZO-1</i>)
pH	pH-Wert (<i>potentia hydrogenii</i>)
PTX	Pertussistoxin
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
Rac1	Rho-GTPase (<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)
Rho	Rho-GTPase (<i>ras homology</i>)
RNA(s)	Ribonukleinsäure(n) (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sek.	Sekunde(n)
SST	Somatostatin
sst2,3,4, 5/1	selektive SSTR-Agonisten
SSTR(s)	Somatostatinrezeptor(en)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween 20
TE	Tris-EDTA
TER	transepithelialer Widerstand (<i>transepithelial electrical resistance</i>)
TJ(s)	Tight Junction(s)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit enzymatischer Aktivität (<i>units</i>)
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WB	Westernblot
ZO-1	TJ-Protein (<i>zonula occludens-1</i>)

Des Weiteren wurden für chemische Elemente die international gültigen Elementsymbole und für Aminosäuren der Ein-Buchstaben- sowie der Drei-Buchstaben-Code verwendet.

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau und Funktion der humanen Epidermis

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und besteht aus der äußeren Epidermis und der darunter liegenden Dermis. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das einer ständigen Regeneration durch epidermale Stammzellen unterliegt. Die vorherrschenden Zellen der Epidermis (über 95% der Gesamtzellpopulation) sind die Keratinozyten, die schließlich zu abgeflachten, abgestorbenen Korneozyten differenzieren. Weiterhin treten in der Epidermis melaninsynthetisierende Melanozyten, dendritische Immunzellen (Langerhanszellen), neuroendokrine Merkelzellen sowie freie Nervenendigungen auf. Die Hauptfunktion der Epidermis, die eine semipermeable Barriere bildet, besteht im Schutz gegenüber der Umwelt. Die Barriere wird durch die verhornten Korneozyten des *stratum corneum* und zusätzlich wahrscheinlich durch Tight Junctions der lebenden Keratinozyten gebildet (Abb. 1-1).

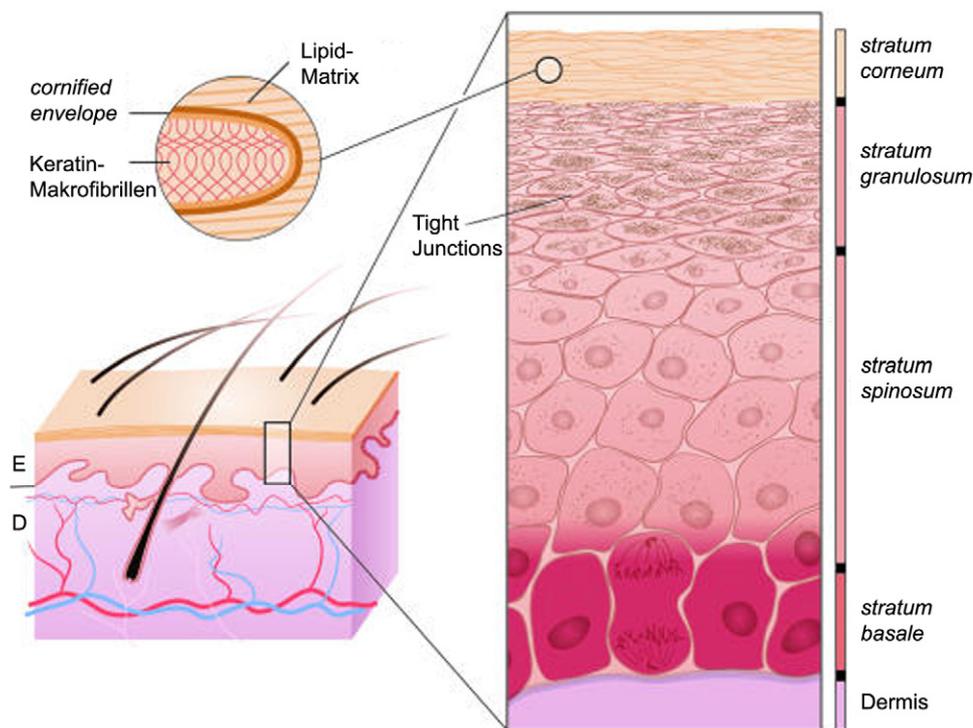


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der humanen Epidermis

Es ist die Epidermis (E, Dicke: etwa 30 μm) mit Hautanhangsgebilden (Haare, Drüsen) und die darunter liegende Dermis (D) gezeigt (links). Zusätzlich sind die unterschiedlichen Differenzierungsstufen von Keratinozyten dargestellt (rechts). Proliferierende Basalzellen differenzieren zu transkriptionell aktiven Keratinozyten, die in den oberen Schichten schließlich abflachen und verhornen. Die Permeabilitätsbarriere wird im *stratum corneum* von intrazellulären Keratinmakrofibrillen, quervernetzten Proteinen (*cornified envelope*) und sekretierten Lipiden sowie vermutlich im *stratum granulosum* von durchgängigen Tight Junctions gebildet (modifiziert nach Segre, 2006).

Die Epidermis dient neben der mechanischen und chemischen Schutzfunktion auch der Thermo- und Osmoregulation sowie der Sinneswahrnehmung. Die Hauptaufgabe der epidermalen Keratinozyten ist ebenfalls der physikalische Schutz (Proksch et al., 2008), darüber hinaus haben diese eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung unterschiedlicher Stimuli (Denda et al., 2007; Lumpkin und Caterina, 2007).

1.1.1 Tight Junctions in der Epidermis

Tight Junctions (TJs) sind abschließende Zellverbindungen, die eine selektive Diffusionsbarriere bilden (Abb. 1-2). Dabei regulieren sie den parazellulären Transport (*Barrierefunktion*) sowie die Proteinverteilung innerhalb der Plasmamembran (*Zaunfunktion*). TJs bestehen aus unterschiedlichen Transmembranproteinen, wie Claudinen oder Occludin, und einem komplexen Netzwerk von zyttoplasmatischen Proteinen (Tsukita et al., 2001). Zu diesen gehören Adapterproteine (wie ZO-1, MAGI und MUPP1), Signalmolekülen (wie heterotrimere G-Proteine und kleine GTPasen) und Regulatoren der Zellpolarität (wie Par3/6 und aPKC, Matter und Balda, 2003b).

Im Gegensatz zu einfachen Epithelien konnte die Existenz von durchgängigen TJ-Strängen in der Epidermis lange Zeit nicht nachgewiesen werden, obwohl die Lokalisation im *stratum granulosum* auf Grund elektronenmikroskopischer Daten schon früh postuliert wurde (Hashimoto, 1971). Nach Identifizierung von TJ-Strukturproteinen (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998) konnte deren Expression in der Epidermis nachgewiesen, aber nur fragmentierte TJs beobachtet werden (Morita et al., 1998). Die funktionelle Bedeutung von epidermalen TJs wurde schließlich durch die Charakterisierung von Claudin-1-defizienten Mäusen (Furuse et al., 2002) bestätigt. Claudin-1 ist eines der TJ-Moleküle, die in der Epidermis exprimiert werden (Tsukita und Furuse, 2002). Die Claudin-1-defizienten Tiere zeigen eine stark faltige Haut und sterben innerhalb des ersten Tages nach der Geburt an Dehydration. Dabei ist der Aufbau der Epidermis unverändert und die Barriere des *stratum corneums* normal ausgebildet. Dies zeigt, dass TJs in der Epidermis neugeborener Mäuse eine entscheidende Bedeutung für die Barrierefunktion haben. Zusätzlich wurde die Morphologie von TJs und die Verteilung verschiedener TJ-Proteine (wie Claudin-1/-4, Occludin, ZO-1) in der murinen Epidermis beschrieben (Furuse et al., 2002). In der menschlichen Epidermis konnten ebenfalls TJs im *stratum granulosum* lokalisiert werden (Brandner et al., 2002; Brandner, 2009). Die Funktionalität von TJs in der humanen Haut ist noch nicht eindeutig bewiesen, in kultivierten humanen Keratinozyten kann aber die Barrierefunktion von TJs durch Widerstandsmessungen gezeigt werden (Yuki et al., 2007).

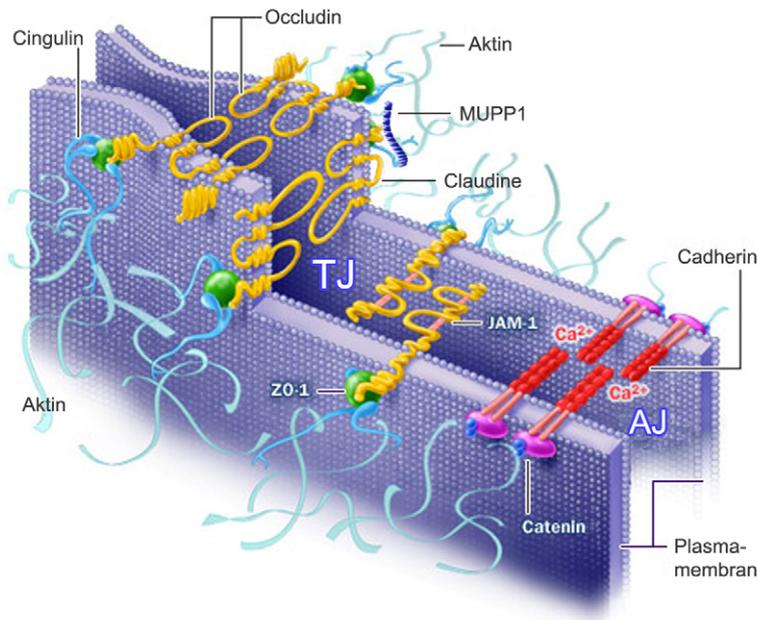


Abb. 1-2: Modell des Aufbaus einer epithelialen Tight Junction (TJ)

Dargestellt sind Transmembranproteine wie Claudine, Occludin und JAM-1, die zwei Plasmamembranen benachbarter Zellen eng verbinden und so eine Diffusionsbarriere bilden. An diese Membranproteine bindet eine große Zahl von zytosomatischen Proteinen wie ZO-1 oder MUPP-1, die u.a. regulatorische Funktionen übernehmen. Über Adapterproteine wie Cingulin können Verbindungen zum Aktinzytoskelett hergestellt werden. Die Strukturproteine einer benachbarten *adherens junction* (AJ) mit Cadherinen und Cateninen sind ebenfalls gezeigt (modifiziert nach Nastech, 2006).

1.1.2 Epidermale Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplex regulierter Prozess, bei dem verschiedene intra- und interzelluläre Signalwege aktiviert werden (Gurtner et al., 2008). Nach einer Verwundung ist eine schnelle Reepithelialisierung zur Eindämmung von Infektionen und Wiederherstellung der Barriere besonders wichtig (Martin, 1997). Dies geschieht kurzfristig durch ein Fibringerinnsel direkt nach der Verwundung. Daraufhin entsteht eine neue Epidermis durch Migration von Keratinozyten von den Wundrändern (und eventuell Haarfollikeln). Während die Epidermis funktionell und strukturell (bis auf die Hautanhangsgebilde) vollständig wiederhergestellt wird, ist die Regeneration der darunter liegenden Dermis unvollständig und es entstehen Narben durch eine gestörte Kollagenablagerung. Die gesamte kutane Wundheilung gliedert sich in drei ineinander übergehende Phasen: Entzündung, Gewebeneubildung und Geweberegeneration (Abb. 1-3). Viele unterschiedliche Signale und Rezeptorsysteme kontrollieren diese komplexen Reparaturprozesse (Werner und Grose, 2003; Santoro und Gaudino, 2005). Während die Signale, die die Proliferation, Migration und Differenzierung der verschiedenen Zelltypen aktivieren und die Reepithelialisierung starten, gut erforscht sind, ist der Einfluss von negativen Regulatoren, die

für eine Deaktivierung dieser Prozesse am Ende der Wundheilung sorgen, noch relativ unbekannt (Martin, 1997; Barrientos et al., 2008).

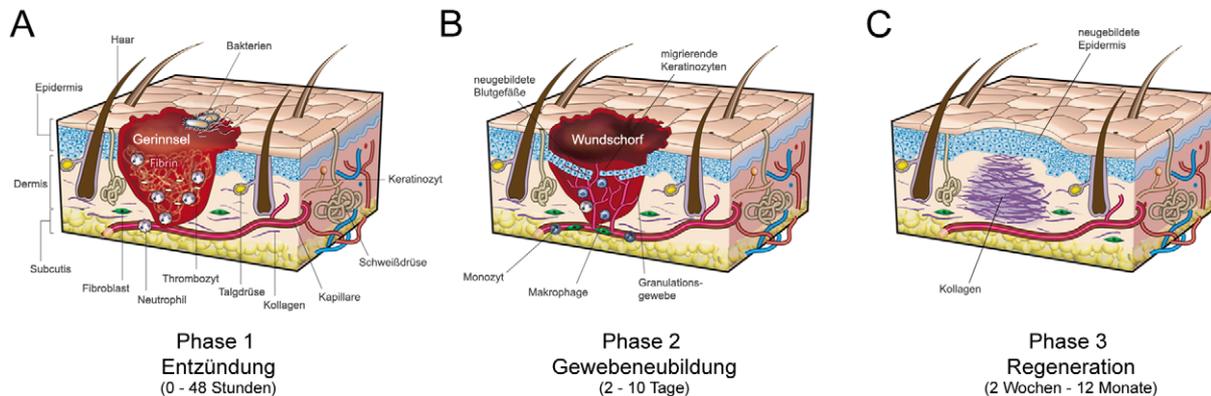


Abb. 1-3: Die Phasen der Wundheilung nach einer Verwundung

Während der ersten Inflammationsphase (**A**) kommt es durch Blutgerinnung zum vorläufigen Wundverschluss und Immunzellen wandern ein, um u.a. Bakterien und tote Zellen zu beseitigen. In der zweiten Phase findet die Gewebeneubildung statt (**B**), bei der auch die Epidermis wiederhergestellt wird. Diese Phase ist durch verstärkte Proliferation und Migration charakterisiert. Dabei lagern Fibroblasten neue extrazelluläre Matrix ab, Blutgefäße werden gebildet und Keratinozyten reepithelialisieren die Wunde. Die langfristige dritte Phase dient der Geweberegeneration (**C**) durch Vernetzung des dermalen Kollagens und der Wundkontraktion. Die meisten Zellen wandern aus dem Granulationsgewebe aus oder sterben ab und alle Wundprozesse werden wieder deaktiviert (modifiziert nach Gurtner et al., 2008).

1.1.3 Hormonelle Regulation der Epidermis durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Epidermale Zellen werden durch extrazelluläre Stimuli wie sekretierte Hormone und Neuropeptide reguliert, die an unterschiedliche Rezeptorsysteme binden und so verschiedene Signalprozesse auslösen (Slominski und Wortsman, 2000; Roosterman et al., 2006). Die größte und vielfältigste Gruppe von Membranrezeptoren sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt sind (Lagerström und Schiöth, 2008). Dementsprechend wirkt der Großteil aller zugelassenen Medikamente über diese Rezeptoren. Nach der Aktivierung zeigen GPCRs eine komplexe Funktionalität, so dass abhängig von der zellulären Umgebung unterschiedliche Signalkaskaden reguliert werden können (Rosenbaum et al., 2009). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen sieben hydrophobe α -Helices von jeweils etwa 25 Aminosäuren, die die Zellmembran durchspannen (Pierce et al., 2002). Nach Bindung eines extrazellulären Liganden werden durch strukturelle Konformationsänderungen zytoplasmatische G-Proteine aktiviert, die dann verschiedenste Signalwege beeinflussen (Oldham und Hamm, 2008). Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur einiger GPCRs konnten wertvolle Erkenntnisse zur Ligandenbindung

sowie Rezeptor- und G-Protein-Aktivierung erlangt werden (Palczewski et al., 2000; Cherezov et al., 2007; Jaakola et al., 2008; Scheerer et al., 2008; Warne et al., 2008).

In der humanen Epidermis wurde die Expression verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nachgewiesen, die durch eine große Vielfalt von Liganden aktiviert werden können (Hakak et al., 2003; Vassilatis et al., 2003; Regard et al., 2008). Nach Aktivierung können diese Rezeptoren viele essentielle Funktionen epidermaler Keratinozyten kontrollieren (Tabelle 1-1). Das Hormon Somatostatin steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die Rezeptoren für Somatostatin werden ebenfalls in der humanen Haut exprimiert, eine Regulation epidermaler Zellen durch Somatostatin konnte aber noch nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 1-1: Funktionen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der Epidermis

Aufgelistet sind die unterschiedlichen zellulären Funktionen, die von epidermalen GPCRs reguliert werden können. Dazu sind die entsprechenden Rezeptoren und ihre Liganden (mit Literaturangaben) angegeben. Die Namen der Rezeptoren sind mit Abkürzungen bezeichnet.

Funktion	Rezeptoren	Liganden	Referenz
Barriere	B2AR	Adrenalin	Denda et al., 2003
	H1/2R	Histamin	Ashida et al., 2001
	D2R	Dopamin	Fuziwara et al., 2005
Differenzierung	CaSR	Calcium	Tu et al., 2001
	P2YR	Nukleotide	Greig et al., 2003
	CB1R	Cannabinoide	Maccarrone et al., 2003
Immunantwort	H1R	Histamin	Giustizieri et al., 2004
	CB1/2R	Cannabinoide	Karsak et al., 2007
	CC4/10R	Chemokine	Fujimoto et al., 2008
Migration	P2Y2R	Nukleotide	Taboubi et al., 2007
	LPAR	Lipide	Sauer et al., 2004
	M3/4R	Acetylcholin	Chernyavsky et al., 2004
	B2AR	Adrenalin	Chen et al., 2002
Pigmentierung	MC1R	Melanocortin	Scott et al., 2002
	B2AR	Adrenalin	Gillbro et al., 2004
	H2R	Histamin	Yoshida et al., 2000
Proliferation	P2YR	Nukleotide	Cook et al., 1995
	S1PR	Lipide	Schuppel et al., 2008
	5HTR	Serotonin	Slominski et al., 2003
Wundheilung	B2AR	Adrenalin	Pullar et al., 2006
	OPDR	Opioide	Bigliardi-Qi et al., 2006
	CXC3R	Chemokine	Yates et al., 2009
	LPAR	Lipide	Demoyer et al., 2000

1.2 Somatostatin

Somatostatin (SST oder *somatotropin release inhibiting factor*, SRIF) ist ein Peptidhormon mit weit verbreiteter Expression (Patel, 1999). Es wird als zyklisches Peptid sezerniert (Abb. 1-4A) und wirkt als Neurotransmitter/–modulator und als Inhibitor von sekretorischen Prozessen sowie der Zellproliferation (Weckbecker et al., 2003). Diese inhibitorische Funktion von SST wurde 1968 postuliert, indem nachgewiesen wurde, dass ein noch unbekannter Faktor aus Hypothalamus-Rohextrakten die Wachstumshormonfreisetzung inhibieren kann (Krulich et al., 1968). Somatostatin konnte schließlich 1972 von der Gruppe um Roger Guillemin aus Extrakten aus 500.000 Schafshypothalami isoliert und sequenziert werden (Brazeau et al., 1973). Guillemin wurde 1977 für seine Entdeckungen von Peptidhormonen im Gehirn gemeinsam mit Andrew Schally und Rosalyn Yalow der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Obwohl Somatostatin als inhibitorisches Hormon des Hypothalamus identifiziert wurde, konnten seitdem vielfältige regulatorische Funktionen in vielen unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden. So wird Somatostatin im zentralen und peripheren Nervensystem, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Immunsystem, Niere, Lunge, Herz und Haut gebildet und dient dort als Modulator von vielfältigen Funktionen (Polak und Bloom, 1986; O'Byrne und Carney, 1993; Badway und Blake, 2005; Ballian et al., 2006; Ferone et al., 2006; Viollet et al., 2008).

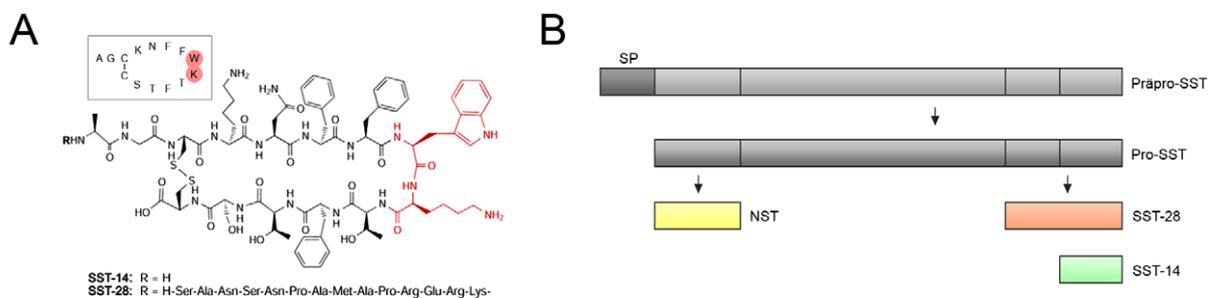


Abb. 1-4: Struktur und Synthese des Peptidhormons Somatostatin

A: Strukturformel des zyklischen Somatostatinrezeptor-Agonisten SST-14 und Sequenz des N-terminal verlängerten SST-28. Das Pharmakophor (Tryptophan und Lysin) ist in rot dargestellt. **B:** Durch proteolytische Prozessierung werden aus dem SST-Vorläufer verschiedene bioaktive Hormone gebildet. Vom Präpro-SST (116 AS) wird das Signalpeptid (SP) im ER durch eine Signalpeptidase abgespalten. Pro-SST (92 AS) wird im Golgiapparat C-terminal weiter prozessiert und so SST-14 gebildet. Alternativ zu SST-14 kann auch SST-28 oder Neuronostatin (NST) produziert werden.

Das humane Somatostatin-Gen ist auf dem Chromosom 3 (Genlokus 3q28) lokalisiert und besteht aus zwei Exons (Shen und Rutter, 1984). Es kodiert für den Vorläufer Präprosomatostatin, aus dem die zwei Isoformen SST-14 und SST-28 gebildet werden (Abb. 1-4B). Kürzlich wurde außerdem Neuronostatin (13 AS) als ein weiteres vom Somatostatingen kodiertes Hormon identifiziert (Samson et al., 2008). Allerdings konnte durch dieses keine Aktivierung von Somatostatinrezeptoren gezeigt werden. Die verschiedenen SST-Formen werden

gewebsspezifisch prozessiert und unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität. Mit Somatostatin evolutionär verwandte Peptide sind Cortistatin (CST, 17 AS), das hauptsächlich im Cortex und Hippocampus exprimiert wird (de Lecea et al., 1996), sowie das Neuropeptid Urotensin II, das Peptid Allatostatin-C aus Insekten und Krebsen und vielfältige weitere SST-Varianten in Knochenfischen (Tostivint et al., 2008).

SST bindet mit hoher Affinität an SST-Rezeptoren auf Zielzellen. Die Wirkungen von SST werden durch dessen β -Schleife (Phe-7, Trp-8, Lys-9, Thr-10) mit den zentralen Aminosäuren Tryptophan-8 und Lysin-9 vermittelt (Patel, 1999, Abb. 1-4A). Aufbauend auf dieses Pharmakophor konnten synthetische Analoga von SST entwickelt werden. In diesen werden zusätzlich stabile D-Aminosäuren verwendet, um die Halbwertszeit im Blutplasma zu verlängern. Eines dieser Analoga ist das Oktapeptid Octreotid, das als Wirkstoff für die Therapie der Akromegalie (hypophysärer Riesenwuchs) und bestimmter Tumoren zugelassen ist (Bauer et al., 1982). Außerdem wurden selektive Rezeptoragonisten entwickelt, die einzelne Subtypen spezifisch aktivieren können. Diese SST-Analoga besitzen hohe Selektivität für die einzelnen Subtypen SSTR1-5 und wurden durch Molekulardesign und kombinatorische Chemie identifiziert. Ausgehend vom SST-Pharmakophor als Leitstruktur wurden kombinatorische Bibliotheken potentieller Wirkstoffe erstellt, aus denen durch Rezeptorbindungsstudien die verschiedenen Nicht-Peptid-Agonisten isoliert werden konnten (Rohrer et al., 1998).

Zur Untersuchung der Funktion von Somatostatin konnte in Mäusen das SST-Gen gezielt deaktiviert werden. Die Charakterisierung dieser SST-defizienten Mäuse zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp, es konnten aber in einzelnen Organen spezifische Effekte dokumentiert werden. So ist in diesen Mäusen die Plasmakonzentration des Wachstumshormons erhöht (Low et al., 2001), allerdings hat dies keine Auswirkung auf die Körpergröße der Tiere. Zusätzlich führt die Defizienz von SST zu einer Erhöhung der Konzentrationen anderer Hormone wie Corticosteron (ACTH), deren Freisetzung aus der Hypophyse durch SST reguliert wird (Luque et al., 2006). Außerdem konnte anhand des SST-*knock out*-Modells gezeigt werden, dass SST im Gastrointestinaltrakt einen positiven Effekt bei der Behandlung der Gastritis besitzt (Zavros et al., 2003). Des Weiteren konnte eine Verringerung der Akkumulation von β -Amyloid-Peptiden, dem Hauptfaktor bei der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit, durch Somatostatin nachgewiesen werden (Saito et al., 2005). SST-defiziente Mäuse zeigen zudem Verhaltensauffälligkeiten beim motorischen Lernen (Zeyda et al., 2001).

1.2.1 Somatostatinrezeptoren

Die Wirkungen von Somatostatin werden durch fünf Rezeptorsubtypen (SSTR1-5) vermittelt, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Abb. 1-5; Moller et al., 2003). Die Rezeptorsubtypen wurden Anfang der 90er Jahre kloniert, was eine genaue Untersuchung der Ligandenbindung und beteiligter Signalwege ermöglicht hat (Tabelle 1-2). Zuerst wurden die Subtypen SSTR1 und SSTR2 aus menschlichen und Maus-Geweben kloniert (Yamada et al., 1992a), danach konnten die humanen Subtypen SSTR3-5 aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Sequenzen identifiziert werden (Yamada et al., 1992b; Rohrer et al., 1993; Panetta et al., 1994).

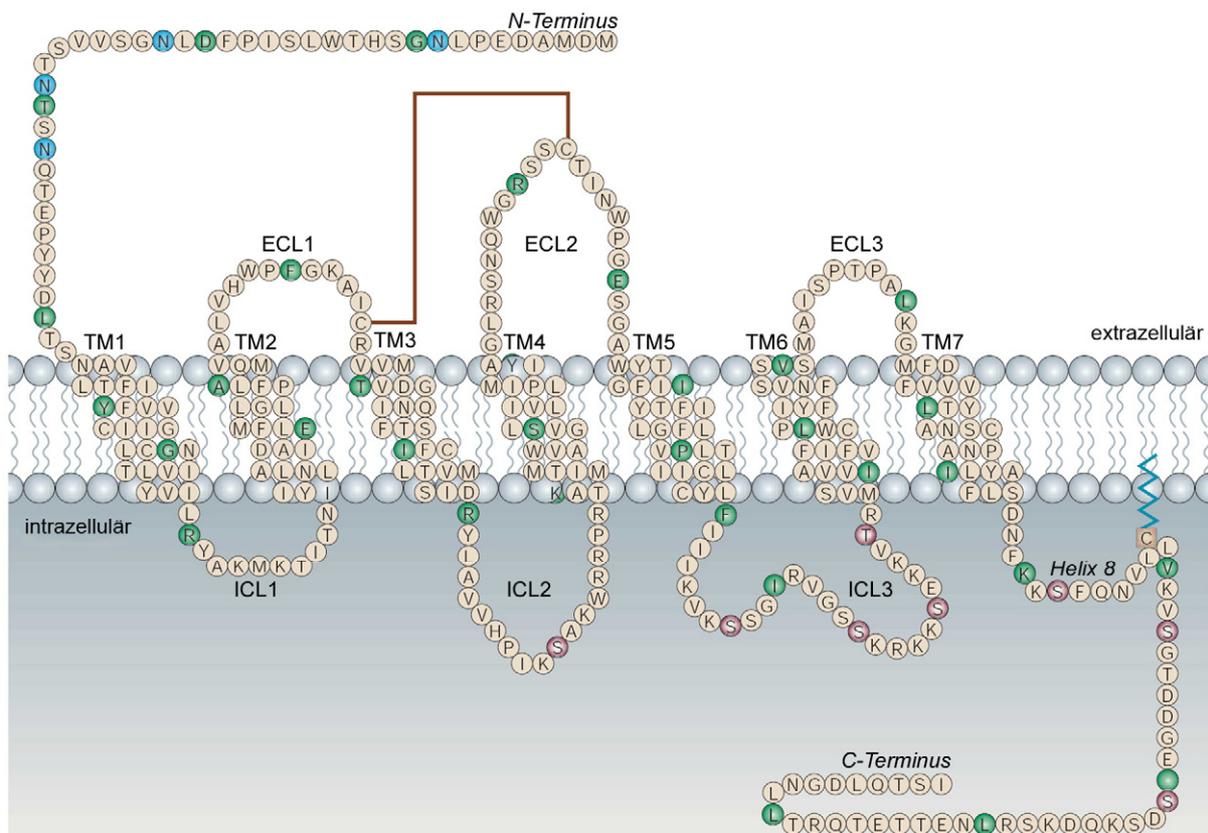


Abb. 1-5: Primärstruktur und Membrantopologie eines Somatostatinrezeptors

Die Rezeptorstruktur ist am Beispiel des SSTR2A dargestellt (sieben Transmembranhelices mit jeweils 3 extrazellulären (ECL) und intrazellulären (ICL) Schleifen). Die Bindung von SST findet an den N-Terminus sowie extrazelluläre Bereiche und die Bindung von G-Proteinen an die intrazellulären Regionen (ICL 2/3) statt. Wichtige Sequenzen für die Aktivierung sind das DRY-Motiv in ICL2 sowie das NPILY-Motiv in TM7. Abstände von zehn Aminosäuren sind jeweils grün markiert. Glykosylierungsstellen sind blau, Phosphorylierungsstellen violett dargestellt. Außerdem ist die extrazelluläre Disulfidbrücke zwischen ECL1 und ECL2 sowie ein palmitoyliertes Cystein in der intrazellulären Helix 8 dargestellt (modifiziert nach Weckbecker et al., 2003).

Die Rezeptoren weisen untereinander hohe Sequenzhomologien auf (39-57% Identität der Aminosäuresequenz, mit der größten Ähnlichkeit in den Transmembrandomänen). Die einzelnen Rezeptorsubtypen sind zu 81-98% zwischen verschiedenen Spezies konserviert (Weckbecker et al., 2003). Die kodierenden Gene für die Subtypen SSTR1/3/4/5 besitzen wie

die meisten Gene der GPCRs keine Introns (Gentles und Karlin, 1999), nur das Gen für den SSTR2 besitzt ein kryptisches Intron am 3'-Ende der Kodierregion, so dass durch alternatives Spleißen zwei Varianten (der ungespleißte SSTR2A und der C-terminal verkürzte SSTR2B) auftreten können (Patel et al., 1993). SST-Rezeptoren werden als Rhodopsin-ähnliche GPCRs klassifiziert und werden phylogenetisch in den SOG (SST/Opioid/Galanin)-Cluster eingeordnet (Fredriksson et al., 2003). Alle Somatostatinrezeptoren besitzen eine charakteristische Signatursequenz in der siebten Transmembrandomäne (YANSCANPI/VLY, Abb. 1-5) und ein PDZ-Bindemotiv am C-Terminus zur Bindung von intrazellulären Signal- und Adapterproteinen.

Tabelle 1-2: Charakteristika der humanen Somatostatinrezeptoren

Für die verschiedenen Subtypen ist angegeben: die humane chromosomale Lokalisation, die Länge der AS-Primärsequenz, die Bindungsaffinität (K_i für radioaktiv markierte Agonisten, in nM) für SST-14, SST-28 sowie Cortistatin-17 und die Bezeichnung synthetischer Agonisten mit deren Subtypeselektivität (aus Patel und Srikant, 1994b; Weckbecker et al., 2003).

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Genlokus	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
Aminosäuren	391	369/356	418	388	364
Affinität (nM)					
SST-14	1,1	1,3	1,6	0,53	0,9
SST-28	2,2	4,1	6,1	1,1	0,07
CST-17	7	0,6	0,6	0,5	0,4
Synthetische Agonisten	L-817,818	L-779,976	L-796,778	L-803,087	L-817,818
	L-797,591	Octreotid	Octreotid	NNC269100	Octreotid
	CH-275	BIM23027	CH-275		BIM23268

Auch für die Rezeptoren SSTR1-5 wurden genetisch defiziente Mausmodelle generiert. Alle SST-Rezeptor-defizienten Mausmodelle sind ebenso wie die SST-Nullmutante sowohl lebensfähig und gesund als auch fertil. Dies ist wahrscheinlich in einer funktionellen Redundanz der verschiedenen Rezeptorsubtypen begründet. So konnte in verschiedenen Geweben die Kompensation einer SSTR-Defizienz durch verstärkte Expression anderer Subtypen nachgewiesen werden (Zeyda und Hochgeschwender, 2008). Durch die Untersuchung des SSTR1-defizienten Mausmodells konnte die Bedeutung dieses Subtypes bei der Inhibition der Wachstumshormonsekretion aus der Hypophyse nachgewiesen werden (Kreienkamp et al., 1999). Des Weiteren konnten SSTR1-spezifische Effekte in der Retina und im Pankreas nachgewiesen werden (Dal Monte et al., 2003; Wang et al., 2006). Die Auswirkungen der SSTR2-Defizienz wurden ebenfalls in mehreren Geweben untersucht (allerdings ist dabei keine Unterscheidung der beiden Spleißvarianten möglich). SSTR2 inhibiert spezifisch die Freisetzung von GHRH (*growth*

hormone releasing hormone, Somatoliberin) im Hypothalamus (Zheng et al., 1997) und die Freisetzung von Glucagon im Pankreas (Strowski et al., 2000). Dieser Subtyp ist auch hauptsächlich für die Inhibierung der Sekretion von Magensäure verantwortlich (Martinez et al., 1998) und wirkt anti-inflammatorisch durch Deaktivierung von Monozyten und Makrophagen (Perez et al., 2003). Außerdem zeigen SSTR2-*knock out*-Mäuse Einschränkungen im motorischen Verhalten (Viollet et al., 2000). Die SSTR3- und SSTR4-*knock out*-Mausmodelle sind noch relativ wenig charakterisiert, aber es gibt Hinweise auf eine Verringerung von Gedächtnis- und Lernleistungen (Zeyda et al., 2008). SSTR5-defiziente Mäuse wurden hauptsächlich auf Funktionen im endokrinen Pankreas untersucht, so hemmt der SSTR5 spezifisch die Insulinfreisetzung (Strowski et al., 2003).

Die stärkste SSTR-Expression findet sich im Gehirn (Hippocampus, Cortex, Cerebellum), der Hypophyse und im Pankreas (Schindler et al., 1996; Epelbaum et al., 1998; Strowski und Blake, 2008). Die SST-Rezeptoren werden ebenfalls in vielen Epithelien exprimiert. So ist eine Expression für das Magenschleimhautepithel, das Prostataadrüsenepithel, das retinale Pigmentepithel und das Nierenepithel gezeigt (Le Romancer et al., 1996; Klisovic et al., 2001; Dizeyi et al., 2002; Bhandari et al., 2008).

1.2.2 Signaltransduktion durch Somatostatinrezeptoren

Alle SST-Rezeptorsubtypen sind an inhibitorische G-Proteine gekoppelt (Law et al., 1991) und lösen nach Aktivierung durch SST eine Inhibition der Adenylatzyklase aus (Patel et al., 1994a; Abb. 1-6). Über die Beeinflussung des *second messenger* cAMP können dann vielfältige Effekte reguliert werden, so z. B. häufig die Inhibition von Sekretionsprozessen oder der Zellproliferation (Csaba und Dournaud, 2001). Ein weiterer zentraler Signaltransduktionsweg, der durch SST beeinflusst wird, ist der MAP-Kinase-Signalweg (Bito et al., 1994; Florio et al., 1999). Allerdings gibt es Unterschiede in der Modulation zwischen verschiedenen SSTR-Subtypen und Zellsystemen. So kann nach SST-Stimulation sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibition der MAP-Kinase-Kaskade ausgelöst werden. MAP-Kinasen können zudem entweder direkt durch SSTRs moduliert oder indirekt durch SSTR-aktivierte Phosphatasen reguliert werden (Cervia und Bagnoli, 2007). Darüberhinaus regulieren SST-Rezeptoren verschiedene Ca^{2+} - und K^{+} -Kanäle und aktivieren $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher (Barber et al., 1989; Wang et al., 1989; Meriney et al., 1994; Kreienkamp et al., 1997). Ebenso können die Phospholipase C und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch SST-Rezeptoren aktiviert werden (Murthy et al., 1996; Bousquet et al., 2006).

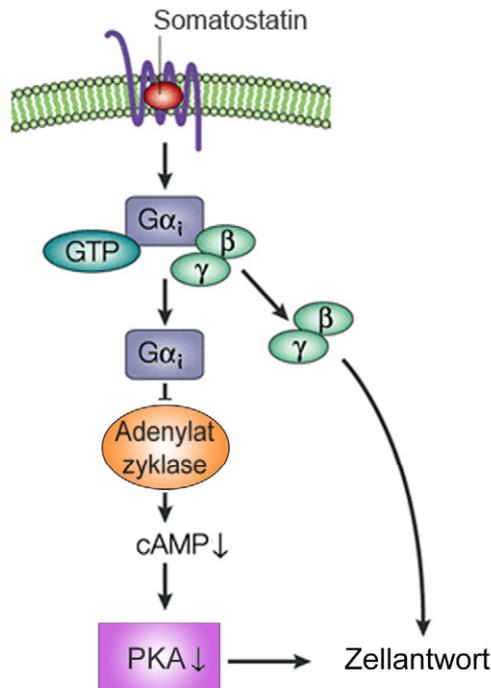


Abb. 1-6: Beispiel der SST-vermittelten Signaltransduktion durch heterotrimere G-Proteine

Die Ligandenbindung an SSTRs führt zum GDP/GTP-Austausch von inhibitorischen G-Proteinuntereinheiten ($G\alpha_i$) und deren Aktivierung und Dissoziation vom Rezeptor. Die resultierende Inhibition der Adenylatzyklase durch $G\alpha_i$ senkt den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dies beeinflusst meist die Aktivität der Proteinkinase A, die wiederum die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine beeinflussen kann (modifiziert nach Pierce et al., 2002).

Die Modulation dieser Signalwege nach Rezeptoraktivierung hat unterschiedliche zelluläre Auswirkungen. Die Inhibition des intrazellulären cAMP- oder Ca^{2+} -Spiegels führt zu einer Verringerung der Sekretion. Dies wird durch alle Rezeptorsubtypen in sekretorischen Zellen ausgelöst (Heisler et al., 1982; Luini et al., 1986; Olias et al., 2004). Ebenfalls führt die Aktivierung aller Subtypen zu einer Inhibition des Zellwachstums in verschiedenen Zellsystemen (Bousquet et al., 2004). Daran ist eine sekundäre, langfristige Inaktivierung von MAP-Kinasen durch eine Aktivierung von Phosphotyrosinphosphatasen beteiligt (Pan et al., 1992; Florio, 2008). Die Subtypen SSTR2/3 besitzen zudem eine pro-apoptotische Wirkung durch die Modulation von Caspasen und dem Tumorsuppressor p53 (Sharma et al., 1996; Liu et al., 2000; Guillermet et al., 2003). Nach SSTR-Aktivierung können auch immunologische und inflammatorische Mechanismen reguliert werden. So wird durch SST-Rezeptoren die Freisetzung von Zytokinen (wie Interferonen und Interleukinen) inhibiert (Karalis et al., 1994; Peluso et al., 1996; Krantic, 2000). Ebenfalls konnte ein Einfluss von SST auf die Zellmotilität bestätigt werden, so inhibieren SSTR-Agonisten die Migration von Prostatakarzinomzellen sowie Lungenfibroblasten (Benali et al., 2000; Buchan et al., 2002; Sun et al., 2007). Zusätzlich wurde eine Rolle von Somatostatin bei der Regulation der neuronalen Migration nachgewiesen (Yacubova und Komuro, 2002).

Nach Ligandenbindung an SST-Rezeptoren können ebenso G-Protein-unabhängige Signalwege aktiviert werden (Bockaert und Pin, 1999; Brzostowski und Kimmel, 2001; Milligan und White, 2001). So besitzen alle SSTRs am intrazellulären C-Terminus PDZ-Bindemotive, mit denen sie mit PDZ-Domänen-Proteinen interagieren. In epithelialen Zelllinien wie MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-Zellen kann der Somatostatinrezeptor 3 (SSTR3) über die Interaktion mit dem zytoplasmatischen TJ-Protein MUPP1 die Permeabilität von TJs regulieren (Liew et al., 2009).

Die antisekretorischen, antiproliferativen, antimigratorischen sowie immunsuppressiven Eigenschaften von Somatostatin werden in klinischen Therapien ausgenutzt. Dabei ist eine pharmakologische Intervention mit SSTR-Agonisten bei der Pathogenese von neuroendokrinen Erkrankungen wie Akromegalie (Lamberts et al., 1985), zur Tumorsuppression (Schally, 1988), sowie zur Behandlungen von inflammatorischen Krankheiten wie rheumatischer Arthritis, multipler Sklerose oder Psoriasis möglich (Weber et al., 1982; Weckbecker et al., 2003).

Die Somatostatinrezeptoren besitzen eine besondere medizinische Relevanz sowohl bei der Diagnose als auch bei der Behandlung unterschiedlicher Tumore (Reubi, 2003). So ist eine starke Überexpression von SST-Rezeptoren (besonders SSTR2) in neuroendokrinen Tumoren, sowie in Brust-, Prostata- und Lungenkarzinomen beschrieben (Volante et al., 2008). Durch die spezifische SSTR-Expression in Tumoren wird eine gezielte Detektion (*in vivo* Rezeptor-Szintigraphie) durch Radionuklid-markierte SST-Analoga möglich (Lamberts et al., 1994). Darüber hinaus erlaubt die SSTR-Radiotherapie eine spezifische Tumorbehandlung unter weitgehender Schonung von umliegendem gesundem Gewebe (van Essen et al., 2009). Durch Kopplung von Radio- oder Chemotherapeutika an SST-Analoga kann eine spezifische Anreicherung dieser zytotoxischen Therapeutika in rezeptorüberexprimierenden Tumorzellen erreicht werden (Stolz et al., 1998; Grotzinger und Wiedenmann, 2004). Zudem wird durch die therapeutische SSTR-Aktivierung das Tumorwachstum deutlich gehemmt. Eine antineoplastische Wirkung von Somatostatinanaloga konnte in verschiedenen Tumorzelllinien, in experimentellen Mausmodellen und in klinischen Studien gezeigt werden (Pyronnet et al., 2008).

1.2.3 Somatostatin und Somatostatinrezeptoren in der Haut

Die Expression von Somatostatin in der kutanen Epidermis wurde durch immunhistologische Untersuchungen und Radioimmunassays gezeigt (Gaudillere et al., 1997). Außerdem konnte eine vereinzelte SST-Expression durch neuroendokrine Merkelzellen in unbehaarter Haut der Hand- bzw. Fußinnenflächen beschrieben werden (Fantini et al., 1995). Somatostatin wird bei Krankheiten, die durch Störungen der Hautbarriere gekennzeichnet sind (beispielsweise

Psoriasis), verstärkt exprimiert (Talme et al., 1999). Die fünf SSTR-Subtypen wurden in immunhistologischen Untersuchungen in allen lebenden Schichten der Epidermis lokalisiert (Hagströmer et al., 2006). Zudem wurden die Subtypen SSTR2 und SSTR3 auf dermalen Fibroblasten detektiert (Gaudillere et al., 1999). Außerdem regulieren SST-Rezeptoren epidermale Nozirezeptoren und somit die Schmerzempfindung in der Haut (Chrubasik et al., 1984; Carlton et al., 2001; Pinter et al., 2006).

1.3 Ziel der Arbeit

Hormonrezeptoren regulieren wichtige physiologische Funktionen von Keratinozyten, den vorherrschenden Zellen in der kutanen Epidermis. Durch immunhistologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl das Peptidhormon SST als auch die Rezeptoren SSTR1-5 in der humanen Haut vorhanden sind. Die funktionelle Bedeutung von Somatostatin in der Epidermis ist aber noch ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zunächst die Genexpression von SST und die Existenz möglicher SST-produzierenden Zellen in der humanen Epidermis nachgewiesen, sowie die Expression der verschiedenen SSTR-Subtypen charakterisiert werden. Daraufhin sollte die Funktionalität dieser endogenen Rezeptoren in Keratinozyten bestätigt werden. Als nächster Schritt sollte der Einfluss der SSTR-Aktivierung auf essentielle Funktionen von Keratinozyten untersucht werden. So sollte die Regulation der parazellulären Barriere, die durch Tight Junctions gebildet wird, nach SSTR-Aktivierung bestimmt werden. Ebenfalls sollte der Einfluss von SST auf das Wachstum sowie die Motilität von Keratinozyten untersucht werden. Dieses kann zudem Rückschlüsse auf die Beteiligung von SST bei der epidermalen Wundheilung geben. Abschließend sollten die beteiligten intrazellulären Signalwege nach der SST-Rezeptoraktivierung identifiziert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Chemikalien und Enzyme wurden im Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“ bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in *aqua bidest.* angesetzt.

2.1.1 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Primärzellen

Es wurden *Escherichia coli* -Bakterien vom Stamm TOP10F' oder DH10B (Invitrogen) und zur Expression von rekombinanten Proteinen vom Stamm BL21(DE3)-CodonPlus (Stratagene) verwendet. Für die eukaryotische Zellkultur wurden primäre Keratinozyten und die Keratinozytenzelllinie HaCaT (DKFZ, Heidelberg) genutzt. Primäre humane Keratinozyten wurden aus neonataler Vorhaut (oder aus adulten Gewebebiopsien) isoliert. Für Wundheilungsexperimente wurden Biopsien aus Schweineohren entnommen. Das Gewebe stammte von etwa sechs Monate alten Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*, Kreuzung aus Yorkshireschwein und deutschem Edelschwein) und wurde direkt nach der Schlachtung verwendet.

2.1.2 Material für molekularbiologische Arbeiten

Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim)
T4 DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
DNase I	Roche (Mannheim)
RNase A	Roche (Mannheim)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Chloramphenicol	Sigma (Taufkirchen)
Kanamycinsulfat	Fluka (Steinheim)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
DNA-Größenstandards	NEB (Frankfurt)
RNeasy Kit	Qiagen (Hilden)
Gene Pool Skin Human Normal cDNA	Invitrogen (Karlsruhe)
PIQOR cDNA Microarrays	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
iScript cDNA Kit	Biorad (München)
iCycler iQ Supermix	Biorad (München)
Tri-Reagenz	Sigma (Taufkirchen)

2.1.3 Material für proteinbiochemische Arbeiten

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 30 %/0,8 %)	Biorad (München)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumsulfat (APS)	Sigma (Taufkirchen)
Dithiothreitol (DTT)	Pierce (Bonn)
Coomassie Brilliant Blue	Serva (Heidelberg)
Proteaseinhibitoren	ICN Biomedicals (Eschwege)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
Precision Plus Dual Color Prestained Standard	Biorad (München)
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma (Taufkirchen)
Protan Nitrozellulose-Membranen	Whatman (Dassel)
Restore Western Blot Stripping Puffer	Pierce/Perbio (Bonn)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Sigma (Taufkirchen)
Whatman-3MM-Chromatographie-Papier	Whatman (Maidstone, UK)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific (Schwerte)
Immun-Star WesternC ECL Detection	Biorad (München)
Cronex 5-Röntgenfilme	Agfa (Mortsel, Belgien)
Bradford Protein Assay	Biorad (München)
Glutathion	Merck (Darmstadt)
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare (München)
Protein A/G-Sepharose	Santa Cruz (Heidelberg)
Dimethylpimelimidat	Sigma (Taufkirchen)
NHS-Sepharose	GE Healthcare (München)
cAMP XS+ HitHunter Kit	GE Healthcare (München)

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
KGM (Keratinocyte Growth Medium) 154	Cascade Biologics (Karlsruhe)
KGM Dermalife	Lifeline Celltech (St. Katharinen)
Ham's F12	Invitrogen (Karlsruhe)
MCDB 153	Invitrogen (Karlsruhe)
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma (Taufkirchen)
Fötale Rinderserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)

Trypsin	Invitrogen (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Serva (Heidelberg)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Hydrocortison	Sigma (Taufkirchen)
Insulin	Sigma (Taufkirchen)
Vitamin C	Sigma (Taufkirchen)
Kollagen I	Sigma (Taufkirchen)

2.1.5 Sonstige Chemikalien

Somatostatin-14 (SST)	Bachem (Weil am Rhein)
Forskolin (FSK)	Sigma (Taufkirchen)
Lysophosphatidylsäure (LPA)	Sigma (Taufkirchen)
SSTR-Agonisten sst2,3,4,5/1	Merck (Rahway, New Jersey)
Pertussistoxin	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Trizma Base (Tris)	Sigma (Taufkirchen)
Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	GE Healthcare (München)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt)
Eosin	Chroma (Münster)
Kristallviolett	Serva (Heidelberg)
Fluorsave	Calbiochem (Darmstadt)
Fluoromount-G	Southern Biotech (Eching)
Natriumchlorid (NaCl)	Baker (Deventer)
Ethanol	Geyer (Hamburg)
Methanol	Baker (Deventer)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma (Taufkirchen)

2.1.6 Plasmide

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pGEX-6P1-SSTR3[50C]	Amp ^r , GST-Fusionsprotein	Liew et al., 2009
pGEX-2TK-PAK1[PBD]	Amp ^r , GST-Fusionsprotein	Benard et al., 1999
pcDNA3-T7-mSSTR5-hSSTR3	Amp ^r , T7-Epitop	Liew et al., 2009
pXMD-MUPP1	Amp ^r	Ullmer et al., 1998

2.1.7 Antikörper

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Es ist der Name des Antikörpers, das Antigen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und die Bezugsfirma angegeben. Die jeweils verwendete Verdünnung ist für Westernblot (WB) und/oder Immunfluoreszenz (IF) angegeben. Für Sekundäntikörper ist zusätzlich das Konjugat beschrieben.

Primäntikörper	Antigen	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-hSSTR3	C-terminales SSTR3-Peptid (CQERPPSRVA)	Meerschweinchen	WB 1:1000 IF 1:100	diese Arbeit
anti-hSSTR3	GST-Fusionsprotein (C-terminale 50 AS) GST-hSSTR3[50C]	Kaninchen	WB 1:500 IF 1:50	diese Arbeit
anti-SST	natives Somatostatin	Maus	IF 1:100	Biomeda (#V1169)
anti-MUPP1	MUPP1-PDZ10	Kaninchen	WB 1:1000 IF 1:100	Liew et al., 2009
anti-CK20	Keratin 20 –C-Term.	Kaninchen	IF 1:400	Epitomics (#2039)
anti-S100	S100 (bovin)	Kaninchen	IF 1:800	Progen (#16100)
anti-ERK1/2	ERK1/2-Peptid	Kaninchen	WB 1:1500	Cell Signaling (#9102)
anti-pERK1/2	synthetisches ERK-Phospho-Peptid (Thr202/Tyr204)	Maus	WB 1:1500	Cell Signaling(#9106)
anti-Claudin4	Claudin4-Peptid	Maus	WB 1:500	Invitrogen (#3E2C1)
anti-Tubulin	natives Tubulin	Maus	WB 1:5000	Abcam (#ab7291)
anti-Vinculin	natives Vinculin	Maus	IF 1:800	Sigma (#V9131)
anti-Rac1	natives Rac1	Maus	WB 1:1000	BD Biosciences (#610650)
Sekundäntikörper	Konjugat	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus-HRP	Meerrettichperoxidase	Schaf	WB 1:5000	GE Healthcare
anti-Kaninchen-HRP	Meerrettichperoxidase	Esel	WB 1:5000	GE Healthcare
anti-Maus-A488	Alexa-Fluor 488	Ziege	IF 1:2000	Invitrogen
anti-Maus-A546	Alexa-Fluor 546	Ziege	IF 1:2000	Invitrogen
anti-Meerschwein-A488	Alexa-Fluor 488	Ziege	IF 1:2000	Invitrogen
anti-Kaninchen-A488	Alexa-Fluor 488	Ziege	IF 1:2000	Invitrogen
anti-Maus-Cy3	Cyanin3	Ziege	IF 1:400	Dianova
anti-Kaninchen-Cy3	Cyanin3	Ziege	IF 1:400	Dianova
Fluorophor	Verdünnung	Hersteller		
Phalloidin- MFP547	IF 1:1000	MoBiTec		
DAPI	IF 1:5000	GE Healthcare		

Tabelle 2-3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Alexa-Fluor 488	495 nm	519 nm
Alexa-Fluor 546	556 nm	573 nm
Cyanin3	550 nm	570 nm
MFP547	557 nm	574 nm
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	358 nm	461 nm

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Für die Anzucht von *Escherichia coli* wurde LB-Medium mit Einzelkolonien von einer Agarplatte oder aus einer Flüssigvorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 220 U/min im Schüttelinkubator inkubiert bzw. Bakteriensuspensionen auf Agarplatten ausgestrichen. Agarplatten mit Bakterienkolonien können bei 4°C ca. 4 Wochen gelagert werden.

LB (*lysogeny broth*)- Vollmedium : 10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt (pH 7)

LB- Plattenagar: LB-Medium, 15 g/l Bacto-Agar

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterienstämme

Zur Herstellung von kompetenten Bakterienzellen wurde eine 5 ml *E. coli*- Vorkultur (TOP10F') in LB-Medium angeimpft und ü. N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde 200 ml LB-Medium mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und ebenfalls bei 37°C und 220 U/min kultiviert. Sobald eine optische Dichte (Messwellenlänge: 600 nm) von 0,3 – 0,4 erreicht war, wurde die Zellsuspension für 20 min auf Eis gelagert und anschließend bei 1200 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TSS resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformations- und Lagerungslösung TSS (*transformation and storage solution*):

85% LB-Medium, 10% (w/v) PEG 3350, 5% (v/v) DMSO, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

2.2.3 Transformation kompetenter *E. coli*- Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von *E. coli* wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10-300 ng Plasmid-DNA in KCM-Puffer versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiminütigem Hitzeschock bei 42°C wurden 800 µl LB-Medium zugefügt und die Zellsuspension bei 37°C für 60 min unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden danach bei 13000 U/min für 1 min abzentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen und die Zellen in dem Restüberstand resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einer selektiven LB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5x KCM: 0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂

Antibiotika: Ampicillin (150 mg/l Medium), Chloramphenicol, (50 mg/l), Kanamycin (25 mg/l)

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels der Minipräparations-Methode isoliert, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Dazu wurden *E. coli*- Übernachtskulturen erstellt und 1,5 ml dieser Kultur für 1 min bei 13.000 U/min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl kalter Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung

II zugegeben, und die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung III. Der Ansatz wurde gut geschüttelt, für 5-10 Min. auf Eis inkubiert und 5 Min. bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Gefäße überführt, die DNA mit 350 µl Isopropanol gefällt, 5 Min. bei 13.000 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach erfolgte eine zweimalige Reinigung durch Zugabe von 500 µl 70% Ethanol und anschließender Zentrifugation. Der Ansatz wurde noch einmal für 5 Min. bei 13.000 U/min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 5-10 Min. bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde die isolierte Plasmid-DNA in bidest. H₂O oder 1x TE aufgenommen und bei -20°C gelagert. Plasmid-DNA in höheren Mengen für die Transfektion eukaryotischer Zellen (Midipräparation) wurde nach alkalischer Lyse der Zellen mit den Materialien der Firma Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Danach wurde die DNA in bidest. H₂O resuspendiert und nach Einstellung der Konzentration (auf 1 µg/µl) bei -20°C aufbewahrt.

Lösung I: 50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA

Lösung II: 0,2 N NaOH; 1 % SDS

Lösung III: 4 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure

TE/RNase-Puffer: 100 µg/ml RNase in 1x TE

1x TE: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5

2.2.5 Isolierung von RNA

Zur RNA-Isolierung wurden Gewebebiopsien oder kultivierte primäre Keratinozyten mit 1 ml Tri-Reagenz homogenisiert. Das Lysat wurde bei RT inkubiert und mit 200 µl Chloroform gemischt. Nach 15 min Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase in 0,5 ml Isopropanol überführt. Die RNA wurde 1 Stunde bei -20°C gefällt und bei 10.000 g zentrifugiert, mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, das Pellet nach Zentrifugation luftgetrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die RNA wurde nach weiterer Aufreinigung über RNeasy-Säulen (Qiagen) und anschließender Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer (NanoDrop) bei -80°C gelagert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlen Ethidiumbromid zugegeben, in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und mit Größenstandard in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter

Spannung von 8 bis 12 V pro Zentimeter Gellänge. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente geschah auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

TAE-Puffer: 100 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0 (eingestellt mit Acetat)

Ethidiumbromid: 1:1.000 verdünnt, 1 µl/10 ml Gel

DNA-Probenpuffer (5x): 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% Glycerin in 1x TAE

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmenten wurde die PCR (*polymerase chain reaction*) in einem Thermocycler mit dreistufigem Reaktionszyklus durchgeführt. Es wurden 5-100 ng Matrizen-DNA mit je 10-50 pmol Primer und 2,5 U Polymerase verwendet. Diese wurden mit 10x PCR-Puffer, Desoxynukleotiden (400 µM je Nukleotid) und H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl gebracht. Nach der Denaturierung des PCR-Ansatzes (2 Min., 94°C) wurden 30 Zyklen aus Denaturierung (30 Sek., 94°C), Anlagerung der Primer (30 Sek., 55-65°C) und Polymerisation (1-5 Min., 72°C) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur richtete sich nach den Schmelzpunkten der beiden verwendeten Oligonukleotide, die Zeit für die Polymerisation nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragments.

Zur Bestimmung von relativen mRNA-Mengen wurde nach reverser Transkription in cDNA eine quantitative *Real Time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt, bei der Intensitäten fluoreszierender Sonden während der exponentiellen Phase der PCR gemessen werden können. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 3 µg isolierte RNA mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) revers transkribiert. Zur Real-Time-PCR wurden Taqman-Expressionsassays (Applied Biosystems) eingesetzt, bestehend aus spezifischen Primern sowie Fluorophor- und Quencher-markierten Taqman-Sonden (SSTR1: Hs00265617_s1, SSTR2: Hs00265624_s1, SSTR3: Hs00265633_s1, SSTR4: Hs01566620_s1, SSTR5: Hs00265647_s1, SST: Hs00356144_m1). Die PCR wurde mit jeweils 100 ng cDNA in einem iCycler iQ5 (BioRad) durchgeführt, als endogene Referenz wurden 18S-rRNA-Sonden (Hs99999901_s1) verwendet.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Kit und dem Sequenzierungsgerät ABI PRISM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems).

Im Terminator-Mix des Sequenzier-Kits waren die Polymerase AmplitaqFS, dNTPs und fluorophormarkierte ddNTPs enthalten. Ein Sequenzieransatz bestand aus 2 µl Terminator-Mix, 0,5 - 1 µg Plasmid-DNA und 10 pmol Sequenzierprimer in einem Volumen von 10 µl. Zur Amplifikation wurden nach 1 min Denaturierung (96°C) 26 Zyklen (20 Sek. bei 96°C, 5 Sek. bei

50°C, 4 min bei 60°C) durchlaufen. Danach wurde die DNA-Lösung mit 55 µl 100 % Ethanol und 2 µl Natriumacetat (3 M) für 15 Minuten bei 13000 U/min gefällt, mit 150 µl 70 % Ethanol gewaschen und gefällt und bei 37 °C für die anschließende Kapillarelektrophorese luftgetrocknet.

2.2.9 Microarray-Expressionsstudien

Zur Untersuchung der spezifischen Genregulation nach einer Stimulation von kultivierten Zellen wurden cDNA-Microarrays verwendet. Dabei kann die mRNA-Expression zweier unterschiedlicher RNA-Präparationen aus unbehandelten Kontrollzellen und den behandelten Zellen verglichen werden. Dazu werden die erhaltenen RNA-Proben in cDNA umgeschrieben und dabei mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Nach der Hybridisierung beider cDNA-Proben auf einen einzelnen Microarray können relative mRNA-Änderungen aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale für jedes einzelne Gen auf dem Array bestimmt werden.

Dazu wurden PIQOR-Microarrays (Miltenyi Biotec) mit individueller Spotbelegung eingesetzt. Diese Arrays bestehen aus jeweils vierfach aufgebracht, 200-300 bp langen humanen *sense*-cDNA-Fragmenten von 1282 unterschiedlichen hautrelevanten Genen (mit zusätzlichen Kontroll-cDNAs). Zur Markierung und Detektion der Proben-cDNAs wurde das Micromax-TSA-Kit (PerkinElmer) verwendet. Für die cDNA-Transkription und -Markierung wurden jeweils 2 µg RNA (Kontrolle / Probe) revers transkribiert und mit Fluoreszenz-Nukleotiden markiert. Dazu wurden 2 µg RNA, 1 µl Fluoreszenznukleotide (Kontrolle: Biotin, Probe: Fluorescein), 2 µl Primer, 1 µl Reaktionsmix in RNase-freien H₂O (ad. 20 µl) gemischt, die RNA für 10 min bei 65°C denaturiert, mit 2 µl AMV reverse Transkriptase (+ RNase Inhibitor) für 60 min bei 42°C transkribiert. Die Reaktion wurde durch 2,5 µl 0,5 M EDTA (pH 8) abgestoppt und die RNA durch 2,5 µl 1 N NaOH 30 min bei 65°C hydrolysiert und anschließend durch 6,5 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert. Die cDNA wurde mit Micron YM-100-Säulen (Millipore) aufgereinigt, die Probe in einer Vakuumkühlfalle auf 1 µl eingengt und mit 15 µl Hybridisierungspuffer (Miltenyi) versetzt. Zur Hybridisierung und Detektion wurden die Microarrays bei 96°C denaturiert und in 96% Ethanol gewaschen. Danach wurde der Microarray in feuchter Hybridisierungskammer bei 65°C für 45 min mit Prähybridisierungslösung inkubiert. Die cDNA der Kontrolle und Probe wurde zusammengegeben, auf dem Array verteilt und mit blasenfrei aufgelegtem Deckglas in feuchter Hybridisierungskammer bei 65°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Microarrays in W1- bzw. W2-Puffer (Miltenyi) bei 50°C stringent gewaschen. Die Microarrays wurden 10 min mit Blockierlösung (PerkinElmer) geblockt und in sterilfiltriertem TNT-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5) gewaschen. Die Detektion der behandelten Probe erfolgte durch anti-Fluorescein-HRP-Antikörper und Cyanin3-Tyramid nach jeweils dreimaligem Waschen für 5 min mit TNT-Puffer. Nach

Inaktivierung durch HRP-Inaktivierungslösung (PerkinElmer) folgte die Detektion der Kontrollprobe durch Streptavidin-HRP und Cyanin5-Tyramid. Nach Waschen wurde der Microarray durch Zentrifugation getrocknet und lichtgeschützt bei RT aufbewahrt. Das Scannen der Microarrays erfolgte in einem GenePix 400B-Scanner (Molecular Devices) bei 532 bzw. 635 nm, wobei durch Abstimmung der Laserintensität die Signale beider Kanäle angeglichen wurden. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software GenePix Pro 6.0 sowie Acuity 4.0 (Molecular Devices). Nachdem die einzelnen cDNA-Spots identifiziert und die Spotbelegung analysiert wurde, wurden die Signale beider Kanäle normalisiert und auswertbare Spots gefiltert, aus den Rohdaten die relativen Expressionsänderungen ausgewertet und signifikant veränderte Gene dargestellt und verglichen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Expression und Isolierung rekombinanter Proteine

Zur rekombinanten Expression von GST-Fusionsproteinen wurde eine Vorkultur von 20 ml LB-Medium und den benötigten Antibiotika mit der entsprechenden Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C und 240 U/min über Nacht inkubiert. Mit den gewachsenen Bakterien wurde eine Hauptkultur aus 500 ml TB-Medium (mit Antibiotika) angeimpft und bei 37°C und 240 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Nach einer Inkubation über Nacht bei 16 °C unter Schütteln wurden die Bakterienzellen bei 5000 U/min (GSA, Sorvall A6.14) für 15 min zentrifugiert und in STE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min abzentrifugiert und in 20 ml STE-Puffer aufgenommen, daraufhin wurden 200 µl Lysozym (10 mg/ml) sowie Proteaseinhibitoren zugefügt und die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Die lysierte Bakterienzellsuspension wurde dann bei -20°C eingefroren. Zum weiteren Aufschluss wurde die Zellsuspension aufgetaut, 5x 5 Sek. mit Ultraschall behandelt und mit 4 ml 10% Triton X-100 in PBS versetzt. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 16000 U/min (Sorvall A8.24) und 4°C für 25 min zentrifugiert. Dem Überstand nach der Zentrifugation wurde 1 ml gewaschene GSH-Sepharose (GE Healthcare) zugefügt und diese 2-8 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 500 g wurde das Pellet 2x mit 10 ml kaltem STE-Puffer gewaschen und die GSH-Sepharose auf eine Säule gegeben. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte in jeweils 500 µl Elutionspuffer in mehreren Fraktionen.

TB (*terrific broth*) Vollmedium (pH 7): 12 g/l Bacto-Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 0,4% (v/v) Glycerin, 2,31 g/l KH_2PO_4 , 12,54 g/l K_2HPO_4

STE-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

PBS: 137 mM NaCl, 8,8 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH_2PO_4

Proteaseinhibitoren: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 100 μM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin

Elutionspuffer: 10 mM Gluthation, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration einer Lösung nach der Bradford-Methode erfolgte durch Farbreaktion mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt, die mit einer BSA-Standard-Lösung erstellt wurde. Zu 200 μl der gebrauchsfertigen Bradford-Lösung wurde die zu untersuchende Proteinlösung pipettiert und die Extinktion bei 595 nm gegen Bradford-Lösung als Referenz gemessen.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit diskontinuierlichem Puffersystem durchgeführt. Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 2-4 hergestellt. Die mit Lämmli-puffer versetzten Proben wurden vor dem Auftragen bei 60-95°C für 5 min vollständig denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-200 V in Mini-Protean III-PAGE-Kammern (Biorad) und das Gel wurde danach entweder in Färbelösung gefärbt und mit Entfärbelösung und Wasser entfärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Lösung	5% Sammelgel	8% Trenngel	10% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel
H ₂ O	2,7 ml	9,3 ml	7,9 ml	6,6 ml	4,6 ml
Acrylamidlösung	0,67 ml	5,3 ml	6,7 ml	8,0 ml	10 ml
Trenngelpuffer	-	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml
Sammelgelpuffer	0,54 ml	-	-	-	-
10% (w/v) APS	40 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
TEMED	4 μl	12 μl	8 μl	8 μl	8 μl

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid

SDS-Sammelgelpuffer: 1 M Tris (pH 6,8), 8 g/l SDS

SDS-Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH 8,8), 4 g/l SDS

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1% (w/v) SDS (pH 8,3)

Lämmli-Probenpuffer (5x): 300 mM Tris, 50% (v/v) Glycerin, 500 mM DTT, 7,5 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau (pH 6,8)

Färbelösung: 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 4 g/l Coomassie brilliant blue R250, 4 g/l Coomassie brilliant blue G250

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

2.3.4 Immunologische Detektion von Proteinen (Westernblot)

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf eine Nitrozellulosemembran bei konstanter Spannung von 100 V für 1 h in Transferpuffer in einer Nassblotapparatur (Biorad) bei 4°C. Nach dem Transfer wurden freie Bindungskapazitäten auf der Membran mit 5% Magermilchpulver oder 5% BSA für 1 h abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten proteinspezifischen Antikörper erfolgte in 0,5% Milchpulver/BSA in TBST über Nacht bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBST entfernt. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Sekundärintikörper. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde Chemilumineszenz-Substrat (ECL, *enhanced chemiluminescence*) benutzt, anschließend Röntgenfilme belichtet und nach ausreichender Exposition entwickelt. Eventuell wurden die Antikörper durch Inkubation in Strippingpuffer 30 min bei 60°C abgewaschen und eine erneute Immundetektion durchgeführt.

Für quantitative Bestimmungen wurden die Lumineszenz der Westernblots mit dem digitalen ChemiDoc XRS- Geldokumentationssystem (Biorad) detektiert und relative Intensitäten mit der Quantity One-Software (Biorad) ausgewertet.

Transferpuffer: 20% Methanol, 9 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,02% SDS

TBST: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,2 % Tween 20 (pH 7,9)

Strippingpuffer: 100 mM Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 7,5

2.3.5 Generierung und Aufreinigung von Antikörpern

Zur Generierung von Meerschweinchen-Antiserums wurde ein C-terminales Peptid des humanen SSTR3 (AS 384–393) verwendet. Dazu wurden zwei Meerschweinchen mit LPH (*Limulus polyphemus hemocyanin*)-konjugierten Peptid immunisiert und Antiserum gewonnen (Biogenes, Berlin). Zur anschließenden Reinigung wurde 1 ml hitzeinaktiviertes Antiserum 1:10 in Blockierlösung (3% BSA in PBS) verdünnt und mit an NHS-Sepharose immobilisiertem Antigen inkubiert. Der gebundene Antikörper wurde dann mit Elutionspuffer eluiert und sofort mit Neutralisierungspuffer neutralisiert und über Nacht in PBS dialysiert. Zur Generierung von Kaninchen-Antiserums (Biogenes) wurde ein bakteriell exprimiertes GST-Fusionsprotein (GST-hSSTR3[50C]) verwendet. Zur anschließenden Reinigung wurde 1 mg Fusionsprotein elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran gebロットet. Nach Färbung mit Ponceau S wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und in 3% BSA in PBS 1 h bei RT geblockt. Daraufhin wurde 1 ml hitzeinaktiviertes (20 min bei 56°C) Antiserum 1:10 in Blockierlösung verdünnt und mit der Membran 2-6 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran 2x 10 min in 10 mM NaCl und 3x 5 min in 1x PBS gewaschen. Der gebundene Antikörper wurde dann mit 5 ml Elutionspuffer eluiert und sofort mit 1 ml Neutralisierungspuffer neutralisiert. Zur weiteren

Aufreinigung wurde GST-spezifischer Antikörper durch Inkubation mit GST-gebundener GSH-Sepharose abgetrennt, der Durchfluss wurde aufgefangen und zur vollständigen Neutralisierung über Nacht in PBS dialysiert. Die aufgereinigten Antikörper wurden mittels Westernblot, ELISA und Immunfluoreszenz überprüft.

Elutionspuffer: 0,2 M Glycin, 1 mM EGTA, pH 2,8

Neutralisierungspuffer: 2 M Tris-HCl, pH 8,0

2.3.6 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Das Antigen (zur Bindung an BSA gekoppelt) wurde in Carbonatpuffer verdünnt (10 ng/μl) und 0,5 μg/*well* bei 4°C ü.N. unter Schütteln in 96 *well* MaxiSorb-Mikrotiterplatten (Nunc) inkubiert. Nach Blocken mit 200 μl TBSF für 30 min wurden die Platten dreimal mit 200 μl TBSTR gewaschen. Der zu testende Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen in TBSF in die *wells* gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 10 min mit TBSTR wurde für 3 Stunden HRP-gekoppelter Zweitantikörper zugegeben und erneut mit TBSTR gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit 100 μl Tetramethylbenzidin (TMB) bei RT. Nach 5 min wurde die Farbreaktion mit 1 M HCl abstoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Carbonatpuffer (50 mM): 5,3 g/1 Na₂CO₃, 4,2 g/1 NaHCO₃, pH 9,6

TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8

TBSF: TBS + 1% FCS

TBSTR: TBS + 0,05 % Triton X-100

2.3.7 Antikörperkopplung an Protein A/G-Sepharose

Es wurde 1 ml aufgereinigter Antikörper mit 200 μl Protein A/G- Sepharose für 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Dann wurde die Sepharose zweimal mit PBS und dreimal mit Kopplungspuffer gewaschen. Dann wurde der Antikörper mit 20 mM DMP (Dimethylpimelimidat) vernetzt und für 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Sepharose in 20% Isopropanol bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer: 0,2 M Natriumborat (pH 8)

2.3.8 Peptidkopplung an NHS-Sepharose

Es wurden 10 mg synthetisches Peptid in 3 ml Kopplungspuffer gelöst und 3 ml NHS-Sepharose 3x mit eiskalter 1 mM HCl gewaschen. Peptid und NHS-Sepharose wurden in Kopplungspuffer über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Dann wurde die Sepharose für 30 min in Waschpuffer I inkubiert, für 1 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Sediment wurde jeweils einmal mit Waschpuffer I sowie Waschpuffer II gewaschen und in Kopplungspuffer/20% Isopropanol resuspendiert. Die Peptid-Sepharose wurde bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl (pH 8)

Waschpuffer I: 0,1 M Tris, 0,5 M NaCl (pH 8)

Waschpuffer II: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl (pH 4)

2.3.9 Affinitätspräzipitationen

Durch Affinitätspräzipitationen können mit Hilfe eines Fusionsproteins oder eines immobilisierten Peptides interagierende Proteine und Proteinkomplexe aus Zelllysaten präzipitiert und die Bindung der Proteine anschließend in einem Immunoblot durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. 30 µl GST-Fusionsprotein-gekoppelte GSH-Sepharose bzw. Peptid-gekoppelte NHS-Sepharose wurde zu Zelllysaten gegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde die Sepharose dreimal mit Lysepuffer (2.4.5) gewaschen (Zentrifugation bei 500 g) und gebundene Proteine mit 2x Lämmli-puffer eluiert. Danach wurde die Sepharose für 1 min bei 1000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, 5 min bei 70°C erhitzt und die eluierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung primärer Keratinozyten und eukaryotischer Zelllinien

Primäre Keratinozyten wurden nach der Methode von Rheinwald und Green (1975) aus neonataler Vorhaut isoliert und in KGM (0,07 mM Ca²⁺) bei 37°C kultiviert. Zum Passagieren wurden Zellen mit Versenepuffer gewaschen, mit 0,1% Trypsin/0,02% EDTA in PBS inkubiert und die abgelösten Zellen mit 10% FCS (in PBS) gewaschen. Zur Kryokonservierung wurden Zellen in Einfriermedium aufgenommen, bei -80°C eingefroren und in flüssigen Stickstoff gelagert. Epidermale Hautmodelle (Epidermal Skin Test EST-1000) der Firma Cellsystems (St. Katharinen) wurden an Luftgrenze in MCDB 153-Basismedium kultiviert, das mit Wachstumsfaktoren und Kalzium supplementiert wurde. Eukaryotische Zelllinien wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wurde dem Medium Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugegeben.

PBS: 137 mM NaCl, 8,8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH₂PO₄

Versenepuffer: 137 mM NaCl, 8,8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH₂PO₄, 1mM EDTA

Einfriermedium: 80% KGM/DMEM, 10% FCS, 10% DMSO

2.4.2 Kollagenbeschichtung

Zellkulturplatten wurden mit 20 µg/ml (5 µg/cm²) Kollagen I - Lösung beschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Platten zur Zellaussaat verwendet oder wurden getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

2.4.3 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zytotoxizität eingesetzter Substanzen wurde über die Freisetzung von zytoplasmatischen Enzyme aus apoptotischen Zellen mittels Lactatdehydrogenase-Assay bestimmt. Dazu wurde nach Inkubation der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz 100 µl Mediumüberstand abgenommen und mit 100 µl LDH-Reagenz (Roche) gemischt. Nach 30 min Inkubation unter Lichtschutz bei RT wurde die Extinktion im Photometer bestimmt. Freigesetzte Lactatdehydrogenase katalysiert dabei die Reduktion von Tetrazolium zu rotem Formazan, das bei einer Wellenlänge von 492 nm nachweisbar ist.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl abgelöster Zellen in Medium wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde ein Tropfen der Zellsuspension unter ein Deckgläschen pipettiert, das zuvor so auf der Zählkammer positioniert wurde, dass Newtonsche Ringe sichtbar waren. Es wurden mehrere Großquadrate des Zählnetzes (Volumen 0,1 mm³) ausgezählt, die Zellzahl pro Milliliter ergab sich aus dem Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10⁴.

2.4.5 Zellyse

Zur Proteinextraktion wurden Zellen mit kaltem PBS gewaschen, für 15 min mit Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) auf Eis permeabilisiert und die Zellysate durch Zentrifugation bei 20.000 g für 15 min bei 4°C gereinigt.

Lysepuffer: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, Proteaseinhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A)

2.4.6 Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen wurden diese mit Plasmiden transient transfiziert; dabei wurde die FuGENE-Transfektionsmethode oder die Nukleofektion angewendet. Es wurden 1,5·x 10⁶ Zellen etwa 24 h vor der Transfektion ausgesät und im Inkubator kultiviert. Transfektionen mit FuGENE-Transfektionsreagenz (Roche) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Nukleofektion wurden 10⁶ Zellen mit 100 µl Transfektionslösung (Amaya, Köln) und 3 µg DNA gemischt. Die Transfektion erfolgte in Elektroporationsküvetten in einem Nukleofektor (Amaya Nucleofector II, Programm T-18).

Die Zellen wurden mit 500 μl Medium in Gewebekulturschalen überführt und das Medium nach 24 h gewechselt.

2.4.7 Messung des transepithelialen Widerstands

Für Messungen des transepithelialen Widerstandes (TER, *transepithelial electrical resistance*) wurden 10^5 primäre Keratinozyten auf Transwell-Filtern ($1,2 \text{ cm}^2$, $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße; Corning, Kaiserslautern) kultiviert. Die konfluenten Keratinozyten wurden mit Differenzierungsmedium ($1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$) für 3 Tage ausdifferenziert und die synchronisierte Bildung von Tight Junctions durch *Ca²⁺-switch* (erneuter Wechsel zwischen Niedrigkalzium- ($0,07 \text{ mM Ca}^{2+}$) und Hochkalzium- ($1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$) Medium) induziert. Der transepitheliale Widerstand zwischen apikalem und basalem Medium wurde mit einem Millicell-ERS-Ohmmeter (Millipore) gemessen. Vor der Messung wurden die ERS-Elektroden in Medium sterilisiert und äquilibriert. Zur Berechnung des TER (Ωcm^2) wurde der Leerwert eines unbewachsenen Filters subtrahiert und der gemessene Widerstand mit der Filterfläche multipliziert.

Differenzierungsmedium: 60% DMEM, 30% Ham's F12, 10% FCS, $0,4 \mu\text{g/ml}$ Hydrocortison, $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin, $50 \mu\text{g/ml}$ Vitamin C

2.4.8 Bestimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels

Zur Bestimmung des cAMP-Spiegels wurde das HitHunter cAMP XS+-Kit (GE Healthcare) verwendet. Dieser Assay verwendet die Komplementation zweier Enzymfragmente der bakteriellen β -Galaktosidase. Zusammen bilden ein grosses Enzymakzeptorfragment (EA) und ein Enzymdonorpeptid (ED) das aktive Enzym, das durch Substrathydrolyse Lumineszenzsignale generieren kann. Als chemilumineszente Enzymsubstrate werden 1,2-Dioxetane eingesetzt. Durch die Verwendung von ED-gekoppeltem cAMP konkurriert dieses mit freiem cAMP aus Zelllysaten um die Bindung an einen cAMP-Antikörper. Nur freies ED-cAMP kann EA-Fragmente komplementieren, so dass die Signalstärke der produzierten Lumineszenz proportional zur Menge des intrazellulären cAMP in den jeweiligen Zelllysaten ist.

Es wurden 25.000 Zellen in 96 *well*-Kulturplatten in KGM ausgesät und über Nacht kultiviert (evtl. unter Zugabe von 400 ng/ml Pertussistoxin). Dann wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und für 30 min bei 37°C mit Phosphodiesterasehemmer ($500 \mu\text{M}$ IBMX) vorinkubiert. Es wurde serumfreies Medium mit cAMP-Antikörperlösung zugefügt und die Zellen mit $10 \mu\text{M}$ Forskolin für 10 min inkubiert. Zusätzlich wurden $1 \mu\text{M}$ SST-14 bzw. unterschiedliche SSTR-Agonisten zugefügt. Die Zellen wurden danach mit Lysepuffer lysiert, der vorher mit Enzymdonorpeptid und Lumineszenzsubstrat versetzt wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation unter Lichtschutz. Daraufhin wurde das Enzymakzeptorfragment

zugegeben und die Mischung für 2 h RT lichtgeschützt inkubiert. Die resultierende Lumineszenz wurde im Luminometer (Berthold Mithras LB940) gemessen.

2.4.9 Proliferationsassay

Für Proliferationsassays wurden Keratinozyten in KGM kultiviert und bei 60-70% Konfluenz in einer Dichte von 50.000 Zellen in 6 *well*-Platten ausgesät und über 3 Tage mit 1 μ M SST-14 kultiviert. Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und in Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde dann in einer Zählkammer oder durch Durchflusszytometrie bestimmt. Zusätzlich wurden 5.000 Zellen in 96 *well*-Mikrotiterplatte ausgesät und für 3 Tage in Medium bei 37°C mit 1 μ M SST-14 inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd für 10 min fixiert und wieder mit PBS gewaschen. Nachdem alle Zellen mit 0,5% Kristallviolett für 5 min unspezifisch gefärbt wurden, wurden diese nach dreimaligem Waschen getrocknet. Die Zellen wurden mit 1% SDS für 10 min lysiert und die Extinktion des Lysates bei 620 nm in einem Photometer bestimmt.

2.4.10 Migrationsassay

Keratinozyten wurden bei 60-70% Konfluenz in einer Dichte von 100.000 Zellen in Kollagen I-beschichtete 12 *well*-Platten ausgesät und bis zum Erreichen von vollständiger Konfluenz in KGM (0,07 mM Ca^{2+}) kultiviert. Durch Bestrahlung der Zellen für 20 min mit 200 keV (0,8 Gy/min) wurde ein Zellzyklusarrest induziert und eine Zellproliferation verhindert. Daraufhin wurde die Verwundungsfläche markiert und die Keratinozytenzellschicht mit einer sterilen Pipettenspitze \sim 200-300 μ m breit abgekratzt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, KGM zugefügt und zu einem Teil der Zellen 1 μ M SST-14 zugegeben. Die Verwundungsfläche wurde mit Phasenkontrast fotografiert und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde die Verwundungsfläche erneut an zuvor markierten Stellen fotografiert. Die unbewachsenen Flächen wurde mit ImageJ (NIH) ausgemessen und die relative Migration im Vergleich zu unbehandelten Zellen berechnet. Zeitrafferaufnahmen migrierender Zellen wurde mit einem Olympus IX71-Mikroskop mit Inkubationskammer durchgeführt und die Migration mit der Cell P- Software (Olympus) aufgezeichnet.

2.4.11 Koimmunpräzipitation

Durch Koimmunpräzipitationsanalysen werden Interaktionen von endogenen Proteinen in Zelllysaten nachgewiesen. Mit Hilfe eines immobilisierten Antikörpers gegen das erste Protein werden Proteinkomplexe präzipitiert und die Anwesenheit des zweiten Proteins in diesen Komplexen wird anschließend in einem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gezeigt.

Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper, der zur Präzipitation genutzt werden soll, auf Protein-A/G- Sepharose immobilisiert und quervernetzt (2.3.7). Pro Ansatz von etwa 1 ml Zellysat wurden 20 µl der Sepharose-Suspension eingesetzt. Die Sepharose wurden mit geklärten Zellysate für eine Stunde auf dem Rotator bei 4°C und 15 U/min inkubiert. Danach wurden die Ansätze durch Zentrifugieren dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Nach Zugabe von 2x Lämmli-puffer wurde die Sepharose zur Denaturierung gebundener Proteine 5 min auf 70°C erhitzt, abzentrifugiert und abschließend per SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

2.4.12 *Ex vivo*- Wundheilungsmodelle

Zunächst wurden von der Innenseite sterilisierter Schweineohren einzelne Gewebebiopsien mit einem Durchmesser von 6 mm ausgestanzt. Daraufhin wurde eine zweite 3 mm große Stanzbiopsie aus dem Zentrum entnommen, so dass die Epidermis und ein Teil der oberen Dermis entfernt wurden. Die entstandenen Modelle wurden mit der Dermis auf Gaze in Medium (DMEM mit 2% FCS, 0,8 µg/ml Hydrocortison und Penicillin/Streptomycin) gesetzt. Es wurden 5 µl PBS oder 2 µM SST-14 in die zentrale Wunde gegeben und die Modelle mit der Epidermis an Luftgrenze bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Wundheilungsmodelle in mit Flüssigstickstoff gekühltem Isopentan eingefroren und bei -80°C gelagert. Danach wurden Gefrierschnitte angefertigt, diese mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und die erfolgte Wundheilung im Lichtmikroskop begutachtet.

2.4.13 Immunzytologische Fluoreszenzfärbungen

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen und Kolokalisationsstudien wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurden Keratinozyten bis zur Konfluenz auf Deckgläschen kultiviert und mit 1,8 mM Ca²⁺ differenziert. Danach wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, für 10 min mit 4% Formaldehyd (in PBS) fixiert und anschließend mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert. Nach Blocken mit 3% BSA in PBS folgte die Inkubation mit primären Antikörpern. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern unter Lichtabschluss inkubiert. Zur Aktinfärbung wurde fluoreszenzmarkiertes Phalloidin verwendet, das hochspezifisch mit F-Aktin interagiert. Zur Kerngegenfärbung wurde DAPI eingesetzt. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in Fluorsave-Medium eingebettet. Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axiovert 135 Epifluoreszenzmikroskop.

2.4.14 Immunhistologische Fluoreszenzfärbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete oder bei -80°C gelagerte Gewebebiopsien von normaler Haut verwendet. Diese stammten aus tumorfreien Nachexzidaten von Patienten der Klinik für Dermatologie. Gekühlte Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2165) in $5\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte geschnitten. Diese wurden in Xylolersatz XEM-200 (Vogel) entparaffiniert und rehydriert (in 100%, 90%, 80% und 70% Ethanol sowie Aqua dest.). Zur Freilegung der Antigenepitope wurden die Schnitte 4×5 min mit TEC-Puffer in der Mikrowelle gekocht und nach Waschen mit PBS in 0,001% Trypsin bei 37° inkubiert. Kryokonserviertes Gewebe wurde im Gefriermikrotom (Leica CM 3050) in Einbettmedium in $6\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte geschnitten, 10 min in Aceton fixiert und getrocknet.

Sowohl entparaffinierte Paraffinschnitte als auch Gefrierschnitte wurden mit Blockierlösung inkubiert, mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit Primärantikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Schließlich wurden die Schnitte in Fluoromount-G-Lösung eingebettet. Die Visualisierungen erfolgten mit einem Zeiss Axiovert 135-Epifluoreszenzmikroskop.

TEC-Puffer (20x): 5 g/l Tris, 10 g/l EDTA, 6,4 g/l Tri-Natriumcitrat, pH 7,8

Blockierlösung: 5% Milchpulver, 0,2% NGS (Ziegen Serum), 0,01% Triton X-100 in PBS

2.4.15 Statistische Auswertungen

Ausgewertete Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung oder Standardfehler angegeben. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem gepaarten t-Test berechnet. Eine Differenz mit einem ermittelten P-Wert kleiner als 0,05 wurde dabei als signifikant definiert. Relative Expressionsanalysen wurden mit REST 2008 (Corbett Lifescience) ausgewertet und mit SPSS (SPSS Inc.) dargestellt. Microarraydaten wurden mit Acuity 4.0 (Molecular Devices) ausgewertet. Dosis-Wirkungskurven wurden mit GraphPad Prism (GraphPad Software) ausgewertet und dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression von Somatostatin in der Epidermis

Als erstes Ziel dieser Arbeit sollte die Expression des Somatostatin-Ligand/Rezeptorsystems in der Epidermis charakterisiert werden. Dazu wurde zunächst die Expression des Somatostatin-Gens in der humanen Haut untersucht. Zusätzlich zum Nachweis der endogenen Somatostatin-mRNA sollte auch die Lokalisation und Identität von möglichen SST-produzierenden Zellen in der Epidermis untersucht werden.

3.1.1 Nachweis von Somatostatin in der Haut

Die SST-Genexpression wurde in Proben aus gesundem humanem Hautgewebe durch RT-PCR überprüft. Die Somatostatin-mRNA konnte durch das Auftreten eines spezifischen PCR-Produktes nachgewiesen werden (Abb. 3-1). Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit dem Nachweis des nativen Peptids durch histologische und chromatographische Methoden (Gaudillere et al., 1997). Als positive Kontrolle wurde zudem die SST-Expression in Gehirngewebe untersucht, da im ZNS (besonders im Hypothalamus und im Cortex) SST-produzierende Zellen in hoher Dichte zu finden sind. Dementsprechend ist in Gehirngewebe eine stärkere Expression als in der Haut zu detektieren. In der Kontrollprobe zur Detektion möglicher Kontaminationen wurde kein PCR-Produkt nachgewiesen.

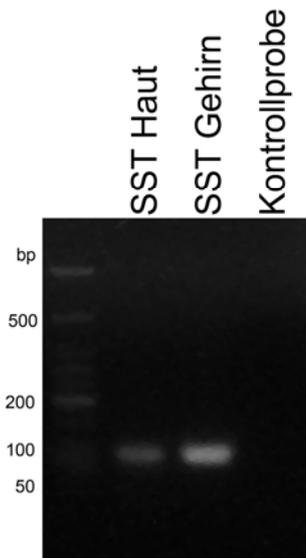


Abb. 3-1: Expression des Somatostatingens in humanem Hautgewebe

mRNA aus humaner Haut und humanen Gehirn wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und ein Fragment der SST-cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Eine deutliche SST-Genexpression in der Haut ist nachweisbar. Als Positivkontrolle der SST-Expression wurde mRNA aus Gehirngewebe verwendet, in der Kontrollprobe (ohne cDNA) ist keine unspezifische Bande sichtbar.

3.1.2 Lokalisation von Somatostatin-positiven Zellen in der Epidermis

Nach der Bestätigung der SST-Genexpression wurde die Expression von Somatostatin in der Epidermis immunhistologisch untersucht und beteiligte Zelltypen charakterisiert. Die Spezifität des verwendeten SST-Antikörpers wurde zunächst in fixierten Gewebeschnitten aus dem Rattenhirn überprüft. Die Expression im Zentralnervensystem ist für SST umfassend charakterisiert; so wird SST auch stark im Hippocampus produziert (Finley et al., 1981). Diese Region wurde als klar identifizierbare Gehirnstruktur für den SST-Nachweis gewählt. In der immunhistologischen Färbung sind dort deutlich SST-positive Einzelzellen vor einem diffusen Hintergrund sichtbar (Abb. 3-2A). Hierbei handelt es sich auf Grund ihrer Lokalisation vermutlich um Interneuronen. Der Nachweis der Expression von SST durch diese Zellen bestätigt somit die Spezifität des verwendeten Antikörpers. Daraufhin wurde die SST-Reaktivität in humanen Hautbiopsien untersucht. In der Epidermis konnten ebenfalls Somatostatin-positiv Einzelzellen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Zellen mit dendritischen Ausläufern, die oberhalb der Basalschicht im *stratum spinosum* zu finden sind (Abb. 3-2B). Die Identifizierung von dendritischen Zellen in der suprabasalen Epidermis deutet auf Langerhanszellen hin; eine SST-Immunreaktivität in diesen epidermalen Immunzellen wurde zuvor beschrieben (Gaudillere et al., 1997).

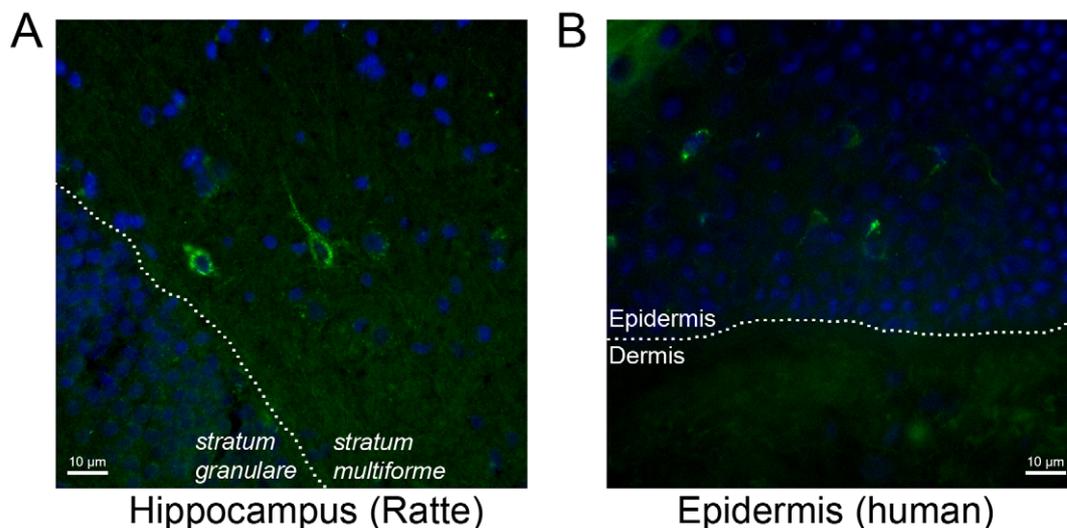


Abb. 3-2: Vergleich von SST-positiven Zellen in Rattenhirn und humaner Haut

In immunhistologischen Färbungen wurden Zellen mit SST-Reaktivität identifiziert. **A:** Als Positivkontrolle der SST-Detektion (grün) wurden Rattenhirnschnitte untersucht, dabei sind SST-positive Einzelzellen sichtbar (Interneuronen im Hippocampus). **B:** In der humanen Epidermis sind mit dem SST-Antikörper suprabasale Zellen mit dendritischen Ausläufern nachweisbar (grün). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Der Nachweis von SST-positiven dendritischen Zellen wurde durch Doppelfärbungen in Hautbiopsien überprüft. Dazu wurde ein Antikörper gegen das Ca^{2+} -bindende Protein S100 als Marker für dendritische Zellen verwendet. Mit diesem Marker konnten Einzelzellen in der

suprabasalen Epidermis und eine Kolokalisation von SST- und S100-Antikörperreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3-3). Zusätzlich war eine diffuse SST-Färbung im oberen *stratum granulosum* und eine S100-Hintergrundfärbung in der Dermis sichtbar. Dabei zeigte nur eine Subpopulation aller untersuchten Zellen gleichzeitig beide Antikörperfärbungen. 66% (+/- 7%) aller identifizierten dendritischen Zellen zeigten auch eine Reaktivität mit dem SST-Antikörper.

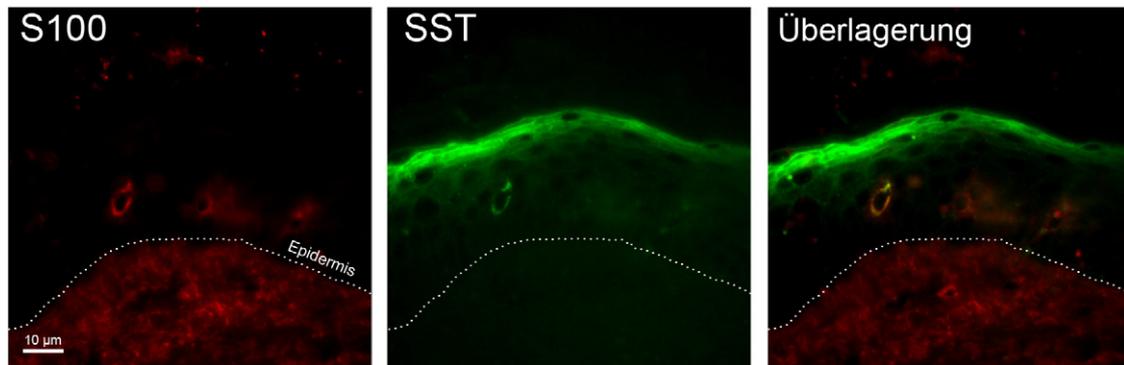


Abb. 3-3: SST-positive dendritische Zellen in der Epidermis

Mit dem spezifischen Zellmarker S100 (rot) konnten suprabasale dendritische Zellen in der humanen Epidermis identifiziert werden (links). In diesen Zellen konnte ebenfalls eine SST-Färbung (grün) festgestellt werden (mittleres Bild). Die Überlagerung beider Bilder (rechts) zeigt die Kolokalisation beider immunhistologischen Färbungen.

Mit dem SST-spezifischen Antikörper konnten zudem weitere mögliche SST-sezernierende Einzelzellen detektiert werden. Diese waren ausschließlich in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert (Abb. 3-4, Mitte). Zur Identifizierung dieses Zelltyps wurde der Merkelzell-spezifische Marker Cytokeratin 20 in Doppelfärbungen verwendet (Abb. 3-4, links). Dabei konnte eine Kolokalisation von Keratin 20 mit SST im *stratum basale* festgestellt werden (Abb. 3-4, rechts).

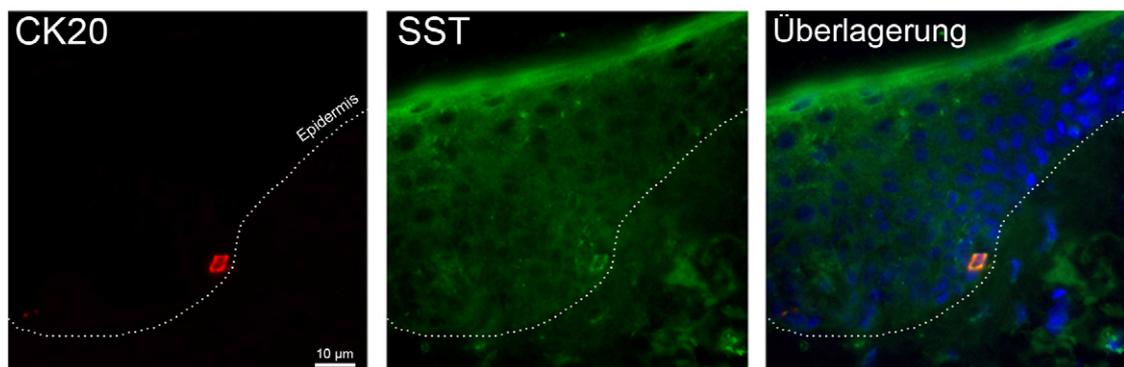


Abb. 3-4: Somatostatin-positive Merkelzellen in der Epidermis

Immunhistologisch konnten Merkelzellen in der Basalschicht der Epidermis mit dem spezifischen Marker Cytokeratin 20 (CK20, rot) lokalisiert werden (links). Der Nachweis von Somatostatin mit einem monoklonalen SST-Antikörper (grün) zeigt eine diffuse Verteilung in der gesamten Epidermis mit deutlicher Färbung der identifizierten Merkelzelle (Mitte). Die Überlagerung beider Bilder (rechts) zeigt die Kolokalisation beider Antikörperfärbungen. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI (blau) gefärbt.

Dies deutet auf die Produktion von Somatostatin durch Merkelzellen in der Epidermis hin. Merkelzellen sind als neuroendokrine Zellen beschrieben, die eine hohe Dichte von intrazellulären sekretorischen Vesikeln aufweisen. Auch hier zeigte nur ein Teil der Keratin 20-positiven Merkelzellen ebenfalls eine SST-spezifische Färbung; es waren 54% (+/- 2%) aller beobachteten Merkelzellen gleichzeitig SST-positiv.

3.2 Expression der Somatostatinrezeptoren in der Epidermis

Zur weiteren Analyse des SST/SSTR-Systems in der humanen Haut wurde die Genexpression aller fünf Rezeptorsubtypen überprüft. In immunhistologischen Untersuchungen wurde zuvor die Proteinexpression der verschiedenen SSTR-Subtypen in gesunder Haut nachgewiesen (Hagströmer et al., 2006). Zur weitergehenden Untersuchung der Proteinexpression wurde zudem ein Rezeptorsubtyp (SSTR3) besonders betrachtet, da für diesen die funktionelle Regulation von epithelialen Zellen belegt ist (Liew et al., 2009). Es wurde ein spezifischer Antikörper generiert, um die subzelluläre Verteilung und Regulation des Subtyps SSTR3 in Keratinozyten genauer zu untersuchen.

3.2.1 Nachweis der SSTR-Subtypen in der Haut

Die Expression der SSTR-mRNAs wurde mittels RT-PCR mit subtypspezifischen Primern in humaner Haut und in Keratinozyten überprüft. Die Untersuchung der PCR-Produkte zeigt, dass in humanem Hautgewebe alle Subtypen (SSTR1-5) exprimiert werden (Abb. 3-5A), übereinstimmend mit immunhistologischen Untersuchungen zur SSTR-Expression in der Epidermis.

Die mRNAs aller SSTRs wurde auch in primären Keratinozyten, die aus neonatalen Vorhautbiopsien isoliert wurden, nachgewiesen (Abb. 3-5B). Es konnte zudem die Expression einzelner Subtypen in einer immortalisierten Zelllinie (HaCaT-Keratinozyten) sowie in kommerziell erhältlichen epidermalen Hautmodellen exemplarisch gezeigt werden. Als Positivkontrolle wurde die Genexpression in humanem Gehirn überprüft, da dort die SST-Rezeptorexpression ebenfalls umfangreich untersucht wurde (Viollet et al., 2008).

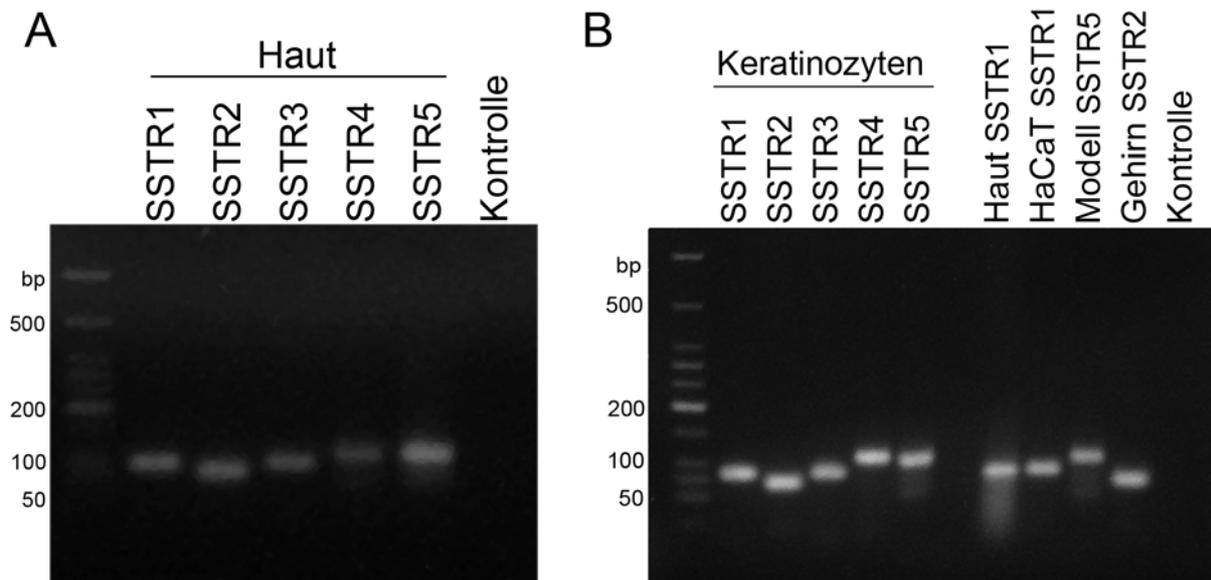


Abb. 3-5: Expression der Somatostatinrezeptoren SSTR1-5 in humaner Haut und Keratinozyten

A: Nachweis der Genexpression der fünf Somatostatinrezeptor-Subtypen in humaner Gesamthaut durch RT-PCR und Agarosegelelektrophorese. **B:** Expression der fünf Somatostatinrezeptor-Subtypen in primären Keratinozyten. Exemplarisch ist die Expression jeweils eines Subtyps in Hautgewebe und immortalisierten HaCaT-Keratinozyten (SSTR1) sowie epidermalen Hautmodellen (SSTR5) gezeigt. Die Genexpression in Gehirngewebe (SSTR2) ist als Positivkontrolle dargestellt. In den Kontrollproben ist keine unspezifische Amplifikation nachweisbar.

Zusätzlich wurde die SSTR-Expression in Keratinozyten unterschiedlicher Hautspender überprüft. Dabei konnte die Expression in unterschiedlichen Altersgruppen (neonatale Spender und Spender älter als 65 Jahre) verglichen werden (Abb. 3-6). Unabhängig vom Alter wurde in allen Keratinozyten eine deutliche SSTR-Genexpression bestätigt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression identifiziert werden, allerdings war die SSTR2 und SSTR3-Expression in Keratinozyten alter Spender leicht erniedrigt sowie die SSTR5-Expression erhöht.

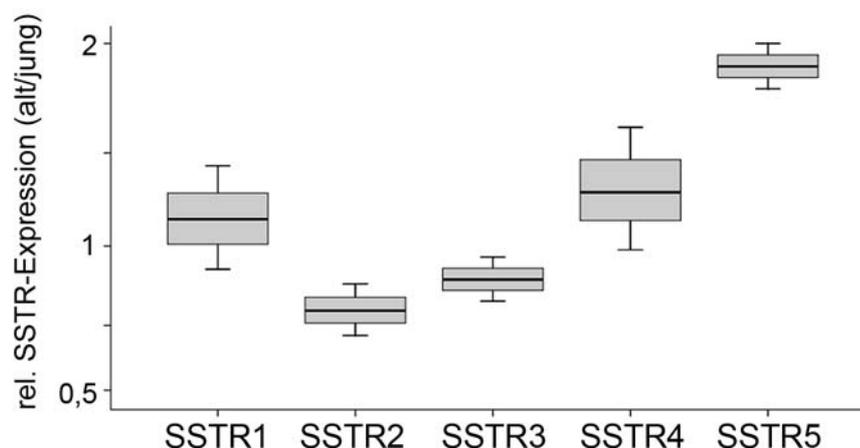


Abb. 3-6: Expression der fünf Somatostatinrezeptoren in Keratinozyten junger und alter Spender

Die SSTR-Expression wurde in Keratinozyten von vier unterschiedlichen Spendern durch qRT-PCR analysiert. Dabei waren die fünf SSTR-Subtypen in allen untersuchten Keratinozyten exprimiert. Die Expression (alt gegen jung) wurde verglichen und als Boxplot dargestellt, als Referenzgen diente die 18S-rRNA. Dabei konnten Expressionsänderungen, aber keine signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (SSTR1: $P=0,422$, SSTR2: $P=0,061$, SSTR3: $P=0,191$, SSTR4: $P=0,281$, SSTR5: $P=0,076$).

3.2.2 Herstellung eines SSTR3-spezifischen Antikörpers

Da für den Subtyp SSTR3 zuvor ein Einfluss auf Epithelzellen nachgewiesen wurde, deutet dies auf eine mögliche Relevanz dieses Subtyps in der Epidermis sowie eine Beeinflussung von Keratinozyten hin. Um den SSTR3 in Keratinozyten immunhistologisch zu lokalisieren, wurde ein Antikörper gegen ein 9-Aminosäuren-Peptid innerhalb des intrazellulären C-Terminus des humanen SST-Rezeptors 3 (Aminosäuren 385-393, Sequenz: QERPPSRVA) generiert. Die Sensitivität des affinitätsgereinigten Antikörpers aus dem Serum immunisierter Tiere wurde im ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) überprüft. Dabei konnte mit immobilisiertem SSTR3-Antigenpeptid die Bindung des Antikörpers über einen sekundären Enzym-gekoppelten Antikörper quantifiziert werden. Es war eine starke Bindung des aufgereinigten polyklonalen Antikörpers bis zu einer Verdünnung von 1:1000 festzustellen (Abb. 3-7A).

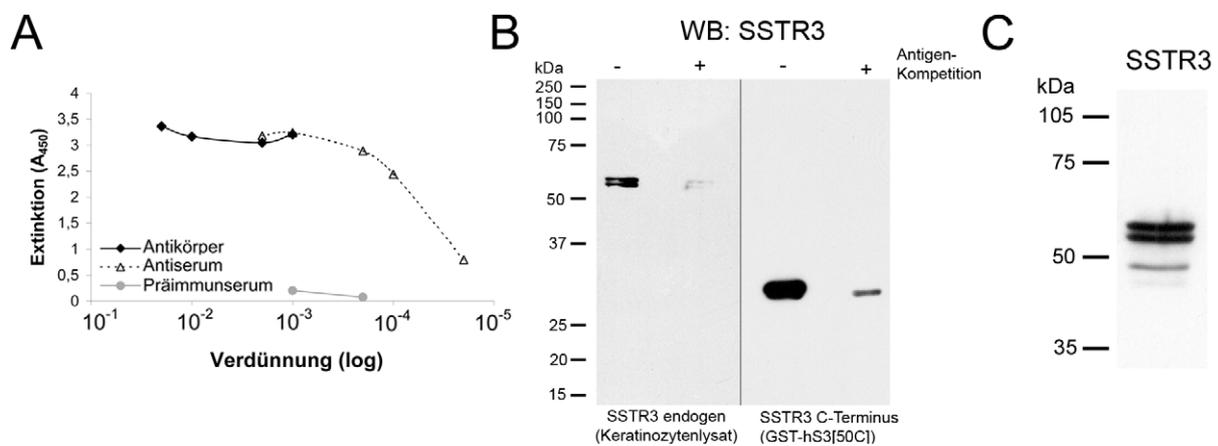


Abb. 3-7: Sensitivität und Spezifität des generierten SSTR3-Antikörper

A: Bestimmung der Sensitivität des SSTR3-Antikörpers im ELISA. Die Antikörperbindung an immobilisiertes BSA-gekoppeltes Antigenpeptid wurde durch eine HRP-katalysierte Farbreaktion im Photometer bei 450 nm gemessen. Aufgereinigter SSTR3-Antikörper zeigte deutliche Bindung an das Antigen bis zu einer Verdünnung von mindestens 1:1000. Die Messung des Antiserums ergab einen Antikörpertiter von mindestens 1:50.000. Antikörper aus dem Serum vor der Immunisierung binden dagegen nicht an das Antigenpeptid. **B:** Spezifischer Nachweis von endogenem SSTR3 aus Keratinozytenlysat (links) und aufgereinigtem SSTR3-Fusionsprotein (GST-hS3[50C], rechts). Durch die gleichzeitige Zugabe des aufgereinigten Antigens (10 µg/ml GST-hS3[50C]) kann die Antikörperbindung spezifisch verhindert werden. **C:** Nachweis der Expression von SSTR3 im Lysat primärer Keratinozyten. SSTR3 ist bei dem berechneten Molekulargewicht von 47 kDa sichtbar, zusätzlich treten zwei weitere Banden von unterschiedlich stark glykosylierten Rezeptoren auf.

Im Serum vor der Immunisierung (Präimmunserum) konnte dagegen keine Bindung von unspezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Das Gesamtserum nach der Immunisierung (Antiserum) wurde ebenfalls untersucht, dabei war eine deutliche Antikörperbindung bei einer Verdünnung von 1:10.000 (bis 1:50.000) detektierbar. Der SSTR3-Antikörper wurde daraufhin in einer Verdünnung von 1:1000 (im Westernblot) sowie 1:100 (für Immunzytochemie) eingesetzt. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Kompetitionsstudien mit überschüssigem Antigen mittels Westernblot überprüft. Dazu wurde ein aufgereinigtes Fusionsprotein des SSTR3-C-Terminus (GST-SSTR3[50C]) verwendet, um den Antikörper zu binden und so eine weitere

Bindung an das immobilisierte Antigen im Westernblot zu verhindern. Sowohl die Detektion von SSTR3 in Keratinozytenlysate als auch die Detektion von aufgereinigtem SSTR3-Fusionsprotein konnte durch gleichzeitige Zugabe des SSTR3-Antigens verringert werden (Abb. 3-7B). Die Verhinderung der Antikörperbindung an konkurrierende Bindungsstellen in Gesamtlysaten durch die Zugabe dieses definierten Antigens zeigt die Spezifität des Antikörpers. Der Nachweis des SSTR3 wurde in Zellysaten aus primären, differenzierten Keratinozyten bestätigt. Im Westernblot konnte SSTR3 bei einem Molekulargewicht von 47 kDa detektiert werden (Abb. 3-7C). Zwei weitere Banden mit höherem Molekulargewicht entsprechen dabei vermutlich unterschiedlich stark glykosylierten SSTR3-Varianten. Eine N-Glykosylierung und damit ein verändertes Molekulargewicht ist im Westernblot für alle SSTRs (bis auf SSTR4) nachweisbar (Helboe et al., 1997).

3.2.3 SSTR3-Lokalisation in der humanen Epidermis

Der so erzeugte Antikörper konnte daraufhin zur Lokalisation des SSTR-Subtyps 3 in der Epidermis genutzt werden. In Gewebebiopsien von gesunder Haut ist eine durchgehende Immunfärbung für SSTR3 an Zellgrenzen von Keratinozyten sichtbar (Abb. 3-8A).

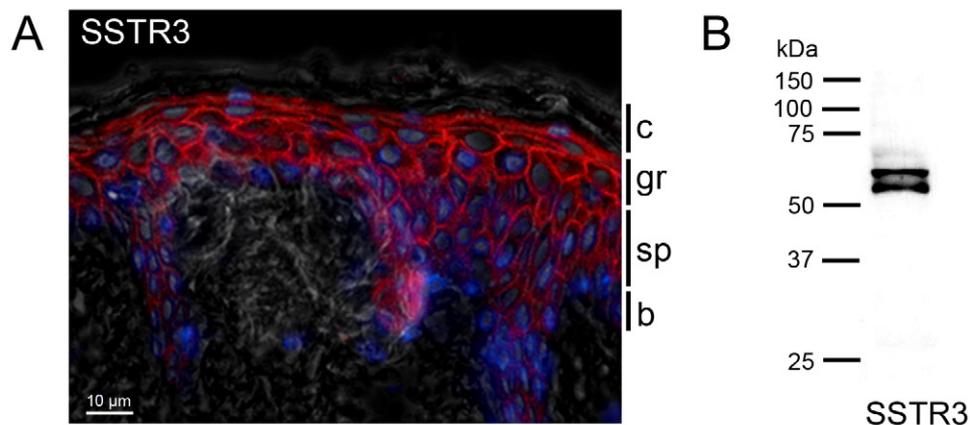


Abb. 3-8: Expression und Lokalisation des Rezeptorsubtyps SSTR3 in der Epidermis

A: Immunhistologisch ist der SSTR3 (rot) auf Keratinozyten der Epidermis nachweisbar, die stärkste Färbung zeigt sich im *stratum granulosum* (gr). Die weiteren epidermalen Zellschichten sind mit c (*stratum corneum*), sp (*stratum spinosum*) und b (*stratum basale*) gekennzeichnet. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. **B:** Die SSTR3-Proteinexpression in der Haut wurde in Lysaten aus Gesamthautbiopsien mittels Westernblot überprüft.

Die stärkste Antikörperreaktivität findet sich dabei im *stratum granulosum* und oberem *stratum spinosum*. In diesem Bereich sind epidermale Tight Junctions (TJs) lokalisiert, wie durch den Nachweis verschiedener TJ-Proteinen gezeigt wurde (Brandner et al., 2006b). Die Expression in der Haut wurde ebenfalls im Westernblot überprüft. In Biopsielysaten ist der SSTR3 deutlich nachweisbar, allerdings sind dabei nur zwei (vermutlich) glykosylierte Formen des Rezeptors mit höherem Molekulargewicht sichtbar (Abb. 3-8B).

3.3 Aktivierung der Somatostatinrezeptoren in Keratinozyten

Nach der Bestätigung der SSTR-Expression in der Epidermis wurde die Funktionalität dieser Rezeptoren in primären Keratinozyten untersucht. Da für manche SSTR-Subtypen eine apoptotische Wirkung nach Rezeptoraktivierung beschrieben wurde (Bousquet et al., 2004), wurden Viabilitätsassays mit SST-stimulierten Keratinozyten durchgeführt. Dabei war kein negativer Einfluss von Somatostatin auf die Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen festzustellen. Sowohl nach SST-Behandlung als auch bei der Kontrolle waren 99% lebende Zellen in epidermalen Hautmodellen nachweisbar (Tabelle 3-1). Auch bei Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 6 bzw. 24 Stunden SST-Stimulation) waren nur geringfügige Veränderungen messbar.

Tabelle 3-1: Zellviabilität von SST-stimulierten epidermalen Hautmodellen

Der Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit Somatostatin wurde durch Lactatdehydrogenase-Freisetzung in das Medium bestimmt. Als Positivkontrolle (100% LDH-Freisetzung) wurden Hautmodelle mit 1% Triton X-100 vollständig permeabilisiert. Für jede Behandlung wurden jeweils drei unterschiedliche Hautmodelle in Dreifachbestimmungen untersucht (Werte mit Standardabweichung).

Zytotoxizität in %	6 h	24 h
Kontrolle	1,17 (+/- 0,04)	0,82 (+/- 0,02)
1 µM SST	1,23 (+/- 0,03)	0,93 (+/- 0,01)
Triton X-100	100	100

Daraufhin wurde die funktionelle Aktivierung der SST-Rezeptoren in primären Keratinozyten und die Modulation verschiedener Signalwege nach SST-Stimulation überprüft.

3.3.1 Beeinflussung des cAMP-Signalwegs durch SST

Ein wichtiger Effektor von aktivierten Somatostatinrezeptoren ist die Adenylatzyklase, die aus ATP den *second messenger* zyklisches AMP (cAMP) bildet (Patel et al., 1994a). Durch die Ligandenbindung von SST an Somatostatinrezeptoren werden inhibitorische G-Protein-Untereinheiten aktiviert und die folgende Inhibierung der Adenylatzyklase erniedrigt den intrazellulären cAMP-Spiegel. Um die Funktionalität der identifizierten SSTRs in Keratinozyten zu überprüfen, wurde der inhibitorische Effekt von SST auf die cAMP-Synthese in primären Keratinozyten untersucht. Dazu wurde ein luminometrischer Assay verwendet, mit dem die cAMP-Konzentration in Zelllysaten bestimmt werden kann. Die Sensitivität des Assays wurde durch Messungen mit synthetischem cAMP bestimmt (Abb. 3-9A). Dabei konnte eine konsistente Lumineszenzzunahme im Bereich der in den Zelllysaten vorhandenen cAMP-Konzentrationen gemessen werden.

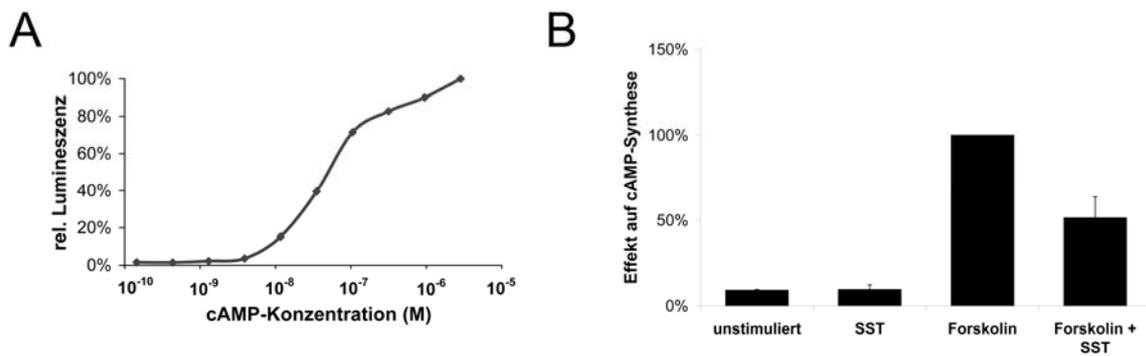


Abb. 3-9: Bestimmung der cAMP-Konzentration und Einfluss von SST auf den cAMP-Signalweg in Keratinozyten

A: Standardkurve der cAMP-Messung (140 pM – 2,8 µM synthetisches cAMP) im luminometrischen Assay. **B:** Effekt von SST auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in Forskolin-stimulierten Keratinozyten. Die maximale Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin entspricht 100 % cAMP-Synthese. Dieser Wert wird durch gleichzeitige Inkubation mit 1 µM SST deutlich herabgesetzt. SST alleine hat dagegen keinen messbaren Einfluss auf den basalen cAMP-Spiegel bei der Zugabe von 1 µM SST zu unstimulierten Keratinozyten (Mittelwerte mit Standardabweichung).

Um eine Inhibition durch SST feststellen zu können, ist eine vorhergehende deutliche Stimulation der cAMP-Synthese notwendig. Dies wird durch Aktivierung der Adenylatzyklase durch das pflanzliche Diterpen Forskolin erreicht (Seamon et al., 1981). Durch Forskolinzugabe wird die cAMP-Synthese von Keratinozyten maximal stimuliert (100% cAMP), eine gleichzeitige Aktivierung von SST-Rezeptoren in diesen Zellen durch 1 µM SST bewirkt dagegen eine deutliche Reduktion des cAMP-Spiegels (auf etwa 50%, Abb. 3-9B). In unstimulierten Zellen (ohne Forskolin) ist dagegen kein messbarer Effekt auf den basalen cAMP-Spiegel durch SST nachweisbar. Durch die Inhibition der Forskolin-vermittelten cAMP-Stimulation in Keratinozyten konnte die Aktivierung endogener SST-Rezeptoren nachgewiesen werden. Weitergehend wurde der Einfluss unterschiedlicher SST-Konzentrationen auf Forskolin-stimulierte Keratinozyten untersucht, um so über eine Dosis-Wirkungskurve den inhibitorischen Effekt von SST zu bestimmen. Es konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung des cAMP-Signalweges durch SST nachgewiesen werden, wobei eine halbmaximale Inhibition bei 32 (+/- 5) nM SST erreicht wird (Abb. 3-10).

Somatostatin bindet an alle SSTR-Subtypen mit ähnlicher Affinität. Um zusätzlich die Funktionalität der exprimierten Subtypen einzeln zu überprüfen, wurde die Inhibition des cAMP-Signalweges durch selektive Rezeptoragonisten bestimmt. Es waren vier selektive Agonisten verfügbar, die die einzelnen Rezeptorsubtypen spezifisch aktivieren können (Tabelle 3-2). Davon zeigen drei Agonisten (sst2, sst3, sst4) hohe Selektivität nur für einen Subtyp (d. h. 100fache bis >10.000fache Bindungsaffinität gegenüber den restlichen Subtypen), ein weiterer Agonist (sst5/1) aktiviert zwei Subtypen spezifisch (Rohrer et al., 1998).

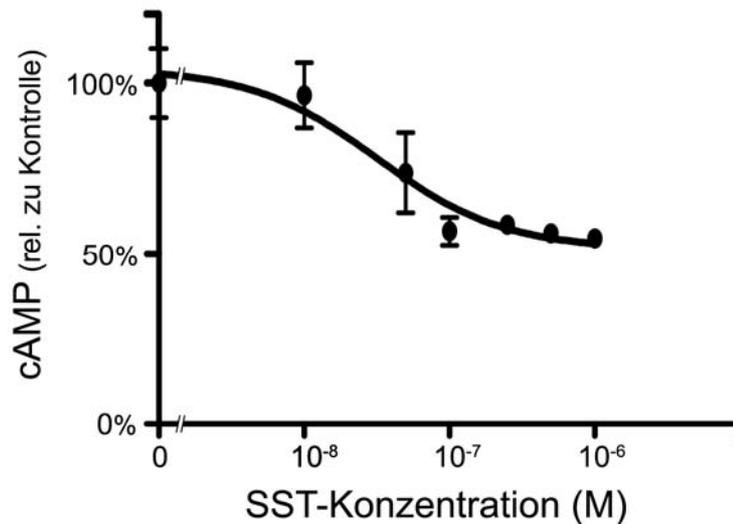


Abb. 3-10: Konzentrationsabhängige Inhibition des cAMP-Signalweges in Keratinozyten

Die Aktivierung endogener SSTRs mit unterschiedlichen SST-Konzentrationen führt zu einer konzentrationsabhängigen Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Primäre Keratinozyten wurden mit Forskolin und SST (10 nM - 1 µM) stimuliert und die relative cAMP-Menge bestimmt. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung gezeigt, die Werte sind auf Kontrollzellen normalisiert, die nur mit Forskolin stimuliert wurden (100 % cAMP).

Nach der Stimulation von Keratinozyten können alle vier verwendeten selektiven Agonisten die Forskolin-vermittelte cAMP-Akkumulation inhibieren (Abb. 3-11). Dabei ist die Inhibition durch die subtypspezifischen Agonisten vergleichbar mit den Änderungen des intrazellulären cAMP-Spiegels durch SST-14.

Tabelle 3-2: Verwendete Somatostatinrezeptor-Agonisten

Es ist die Bezeichnung der SSTR-Agonisten und deren Affinität in nM angegeben. Das Peptidhormon SST-14 bindet an alle fünf Rezeptorsubtypen mit der gleichen Affinität und aktiviert so alle SSTR-Rezeptoren. Die selektiven SSTR-Agonisten sst2-5/1 wurden in Rohrer et al. (1998) beschrieben, die Affinitätsangaben stammen aus Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien. Die SST-Analoga wurden durch kombinatorische Chemie identifiziert und besitzen eine hohe Selektivität für die einzelnen Subtypen.

Name	SST	sst2	sst3	sst4	sst5/1
Substanz	SST-14	SSTR2-Agonist L-779,976	SSTR3-Agonist L-796,778	SSTR4-Agonist L-803,087	SSTR5/1-Agonist L-817,818
Affinität	SSTR1-5: ~1 nM	SSTR2: 0,05 nM	SSTR3: 24 nM	SSTR4: 0,7 nM	SSTR5: 0,4 nM, SSTR1: 3,3 nM

Außerdem wurde der Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die Inhibition der cAMP- Synthese untersucht. Dabei kann durch PTX die SST-abhängige cAMP-Inhibition wieder rückgängig gemacht werden. Pertussistoxin inaktiviert $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten durch ADP-Ribosylierung und verhindert damit die Signalweiterleitung. Der beobachtete PTX-sensitive Effekt auf den cAMP-

Spiegel bestätigt demnach die Beteiligung von inhibitorischen G-Proteinen nach Rezeptoraktivierung. Die ähnlichen Inhibitionseffekte aller eingesetzten SSTR-Agonisten legen nahe, dass vermutlich alle fünf in primären Keratinozyten exprimierten SSTR-Subtypen funktionell und an den gleichen Signalweg gekoppelt sind.

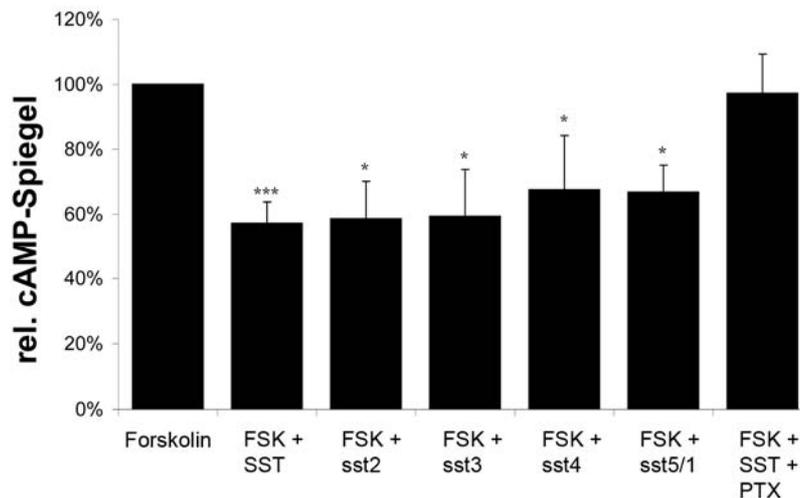


Abb. 3-11: Einfluss von rezeptorselektiven SSTR-Agonisten auf den cAMP-Spiegel

Die Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels in Forskolin (FSK)-stimulierten Keratinozyten mit selektiven Agonisten zeigt die Funktionalität der einzelnen Rezeptorsubtypen in Keratinozyten. SST bzw. die verschiedenen SSTR-Agonisten in einer Konzentration von 1 μ M erniedrigen die cAMP-Synthese gleichermaßen, eine Vorinkubation mit Pertussistoxin (PTX) verhindert die Inhibition durch SST (n= 3, Mittelwerte mit Standardfehler, * P<0,05, *** P<0,005).

3.3.2 Beeinflussung des MAPK-Signalweges durch SST

Ein weiterer wichtiger Signalweg nach Aktivierung von SST-Rezeptoren ist die Regulation von MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen über G-Proteinuntereinheiten (Lahlou et al., 2004). Deshalb wurde der Einfluss der einzelnen Rezeptorsubtypen auf die Aktivität von MAP-Kinasen untersucht. MAP-Kinasen beeinflussen ihrerseits durch Phosphorylierungsreaktionen hauptsächlich die Zellproliferation und -differenzierung. Die wichtigste Gruppe dieser Serin/Threonin-Kinasen sind die ERKs (*extracellular signal-related kinases*) mit den ubiquitär verbreiteten Isoformen ERK1 und ERK2. Deren Phosphorylierung und Aktivierung lässt sich durch die Verwendung von phospho-spezifischen Antikörpern nachweisen. In unstimulierten Keratinozyten ist nur ein geringer Teil der ERK-Gesamtmenge phosphoryliert (Abb. 3-12A). Nach Stimulation der Zellen mit SST kommt es zu einer kurzfristigen Aktivierung von MAP-Kinasen, besonders von ERK2 (MAPK1, Molekulargewicht 42 kDa). Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren (aus Serum, 5% FCS) diente als positive Kontrolle der MAPK-Aktivierung. In allen Zellen war die gleiche Menge von Gesamt-ERK nachweisbar. Die Kombination von SST und FCS führt zu einer weiteren Zunahme der Aktivierung. Die Phosphorylierung ist nach 5 Minuten am stärksten und nimmt nach 10 Minuten sowohl für FCS also auch SST wieder ab. Die

Quantifizierung der MAPK-Aktivierung nach 5 Minuten Stimulation zeigt die signifikante Zunahme von phosphoryliertem ERK1/2 durch SST und ebenfalls die weitere Erhöhung der Wachstumsfaktor-vermittelten ERK-Aktivierung durch SST (Abb. 3-12B).

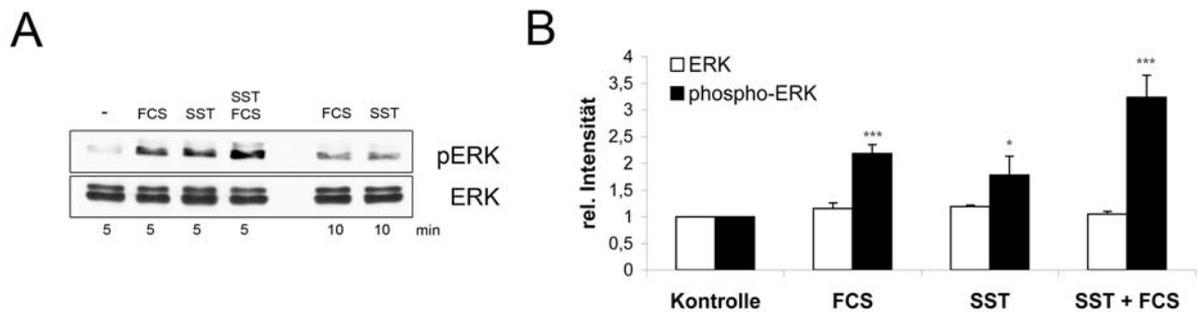


Abb. 3-12: SST-Rezeptoraktivierung führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen in Keratinozyten

A: Die Aktivierung von MAP-Kinasen wurde durch den Nachweis von phosphorylierten ERK bestimmt. Primäre Keratinozyten wurden mit 5% FCS oder 1 μ M SST (oder beidem) für 5 oder 10 Minuten stimuliert. Nach Zellyse wurde der Gehalt von aktiven phospho-ERK1/2 (pERK) und Gesamt-ERK1/2 (ERK) mittels Westernblot mit Antikörpern gegen die MAP-Kinasen ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) bestimmt. **B:** Die MAP-Kinase-Aktivierung wird durch SST signifikant erhöht. Aktivitätsänderungen (nach 5 Minuten) sind relativ zur unstimulierten Kontrolle dargestellt (n= 6, Mittelwerte mit Standardfehler, * P<0,05; *** P<0,005).

Um zu überprüfen, welche Subtypen für die MAPK-Aktivierung verantwortlich sind, wurde die Beeinflussung der MAPK-Phosphorylierung zusätzlich mit den selektiven SSTR-Agonisten überprüft. Dabei führte nur der SSTR4-spezifische Agonist zu einer signifikanten Erhöhung der ERK-Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-13). Diese ist vergleichbar mit der Aktivierung von ERK nach der Stimulation mit SST-14. Die Agonisten sst2 und sst3 hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Aktivierung. Mit dem SSTR5/1-Agonisten konnte dagegen eine signifikante Reduktion der ERK-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

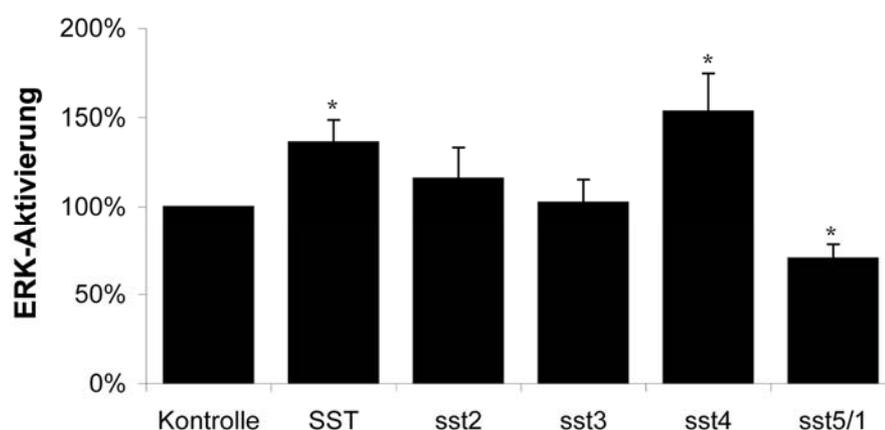


Abb. 3-13: ERK-Modulation durch rezeptorselektive SSTR-Agonisten

Primäre Keratinozyten wurden für 5 min mit 1 μ M SST bzw. selektiven SSTR-Agonisten stimuliert. Nach Zellyse wurde die Menge von phosphoryliertem ERK1/2 mittels Westernblot bestimmt. Der Agonist sst4 erhöht die ERK-Phosphorylierung signifikant, der sst5/1-Agonist führt zu einer signifikanten Verminderung (n= 5, Mittelwerte mit Standardfehler, * P<0,05).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche SSTR-Subtypen spezifische zelluläre Effekte auslösen können. Zudem konnte durch ein weiteres Effektorsystem die Aktivierung endogener SSTRs in primären Keratinozyten bestätigt werden.

3.3.3 Einfluss von SST auf die Genexpression von Keratinozyten

Um die Auswirkungen einer langfristigen SST-Stimulation und mögliche Expressionsänderungen nach Rezeptoraktivierung zu untersuchen, wurden cDNA-Microarray-Experimente durchgeführt. Dazu wurde RNA aus SST-stimulierten Keratinozyten isoliert und mit RNA aus unstimulierten Zellen verglichen. Die mRNA wurde revers transkribiert und Probe- sowie Kontroll-cDNA unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Die erhaltene cDNA wurde auf Microarrays hybridisiert, auf denen 1282 cDNAs von unterschiedlichen hautspezifischen Genen vierfach aufgebracht waren. Durch den Vergleich von behandelter und Kontrollprobe konnten so spezifische Expressionsmuster identifiziert werden. Dabei wurden zusätzlich die Expressionsänderungen in primären Keratinozyten junger sowie alter Spender verglichen. Dazu wurden Keratinozytenkulturen von unterschiedlichen Hautspendern (neonatal bzw. älter als 65 Jahre) angelegt und ausdifferenziert. Jede Kultur wurde jeweils für 24 Stunden mit SST stimuliert, während Kontrollzellen der jeweiligen Kultur unbehandelt blieben. Aus beiden Ansätzen wurde RNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Nach der Hybridisierung der cDNAs auf Microarrays wurden aus den Hybridisierungssignalen die relativen Expressionsänderungen berechnet und signifikant veränderte Gene dargestellt (Abb. 3-14).

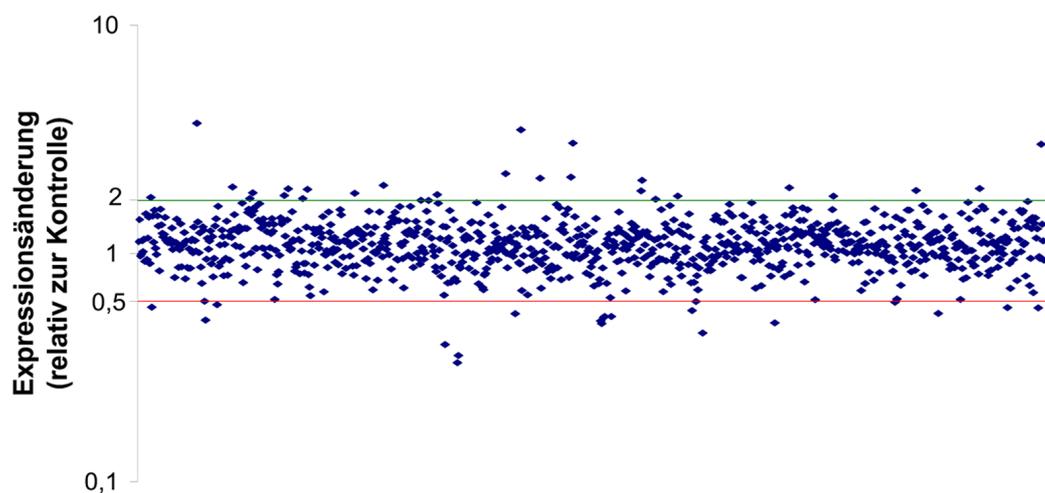


Abb. 3-14: Die SST-Rezeptoraktivierung bewirkt eine Änderung der Genexpression in Keratinozyten

Gezeigt sind die Änderungen der Genexpression von etwa 1000 hautrelevanten Genen nach 24 Stunden SST-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkeratinozyten. Die mRNA stammte aus primären Keratinozyten neonataler Spender. Jeder Datenpunkt entspricht der Expressionsänderung eines Gens, die Mittelwerte aus vier Microarrayexperimenten sind logarithmisch dargestellt. Der Großteil der Gene war nicht signifikant reguliert, einzelne Gene waren nach SST-aktivierung unterschiedlich exprimiert (oberhalb der grünen Linie: signifikant induziert, unterhalb der roten Linie: signifikant reprimiert), diese wurden funktionell weiter charakterisiert.

Die Expressionsdaten aus vier Microarrays wurden zusammengefasst, eine Änderung der Genexpression um den Faktor 2 wurde dabei als signifikant betrachtet. Der Großteil aller mRNAs (über 95%) war nach SST-Stimulation nicht signifikant verändert. Es konnte aber bei einzelnen Genen ein signifikanter Einfluss auf die Expression nach Rezeptoraktivierung festgestellt werden. Zum Vergleich von simultan regulierten Genen wurden die erfassten Daten hierarchisch gruppiert (Abb. 3-15). Dabei konnten zusätzlich mehrere Expressionsgruppen nach SST-Stimulation (für Keratinozyten junger bzw. alter Spender) unterschieden werden.

So wurde beispielsweise eine differentielle Genexpression nach 24-stündiger SST-Stimulation für verschiedene epidermale Rezeptoren nachgewiesen. In jungen Keratinozyten ist die Expression des Serotoninrezeptors 2B sowie des CD44-Hyaluronsäurerezeptors, der sowohl an der Zelladhäsion als auch an der Signaltransduktion durch Interaktion mit Matrixproteasen und Zytoskelettelementen beteiligt ist (Ponta et al., 2003), erhöht. Dagegen ist die Expression des Somatostatinrezeptors 4 nach SST-Stimulation verringert. In Keratinozyten alter Spender wird durch Somatostatinstimulation die Expression des Insulinrezeptors reprimiert. Weitergehend war die Expression des Wachstumsfaktorrezeptors VEGFR und des Neuropeptid Y-Rezeptors induziert. In Zellen junger Spender waren nach SST-Behandlung verschiedene Keratine (CK6/16/17, CK14, CK10) verringert exprimiert. Außerdem ist die Expression von Genen, die für Proteine der extrazellulären Matrix kodieren, geändert. So ist die Expression von Fibronectin in jungen Keratinozyten induziert, während die Kollagenexpression in alten Keratinozyten reduziert ist. Zusätzlich ist die Expression der Matrixprotease MMP-1, die wichtigen Einfluss auf die Zellmigration hat (Pilcher et al., 1997; Sternlicht und Werb, 2001), in Keratinozyten alter Spender reprimiert. Ebenfalls wurden Gene reguliert, die für Tight Junction-Komponenten kodieren. So ist in neonatalen Keratinozyten die Claudin-4-Expression erhöht. Zusätzlich war auch die Genexpression mehrerer Komponenten des cAMP-Signalweges verändert. Nach Rezeptoraktivierung ist beispielsweise die Expression der Adenylatzyklase ADCY7 inhibiert, aber auch die Expression der cAMP-abhängigen Proteinkinase A und der durch diese regulierten Transkriptionsfaktoren CREB2/3. Ein weiterer cAMP-Effektor ist der Guaninnukleotidaustauschfaktor cAMP-GEF (*Epac, exchange protein directly activated by cAMP*). Dieser steuert die Rap1-vermittelte Integrinadhäsion (Bos et al., 2001; Lahlou et al., 2003). Rap1 ist eine kleine GTPase, die Integrine vernetzen und aktivieren kann. Dabei kann über Beeinflussung des cAMP-Spiegels der cAMP-GEF-Signalweg aktiviert werden. In SST-stimulierten Keratinozyten war die Expression des cAMP-GEFII (*Epac2*) erhöht; desweiteren war auch die Expression verschiedener Integrine induziert. Dies könnte eine verstärkte Zelladhäsion bewirken und damit auch Einfluss auf die Zellmigration haben.

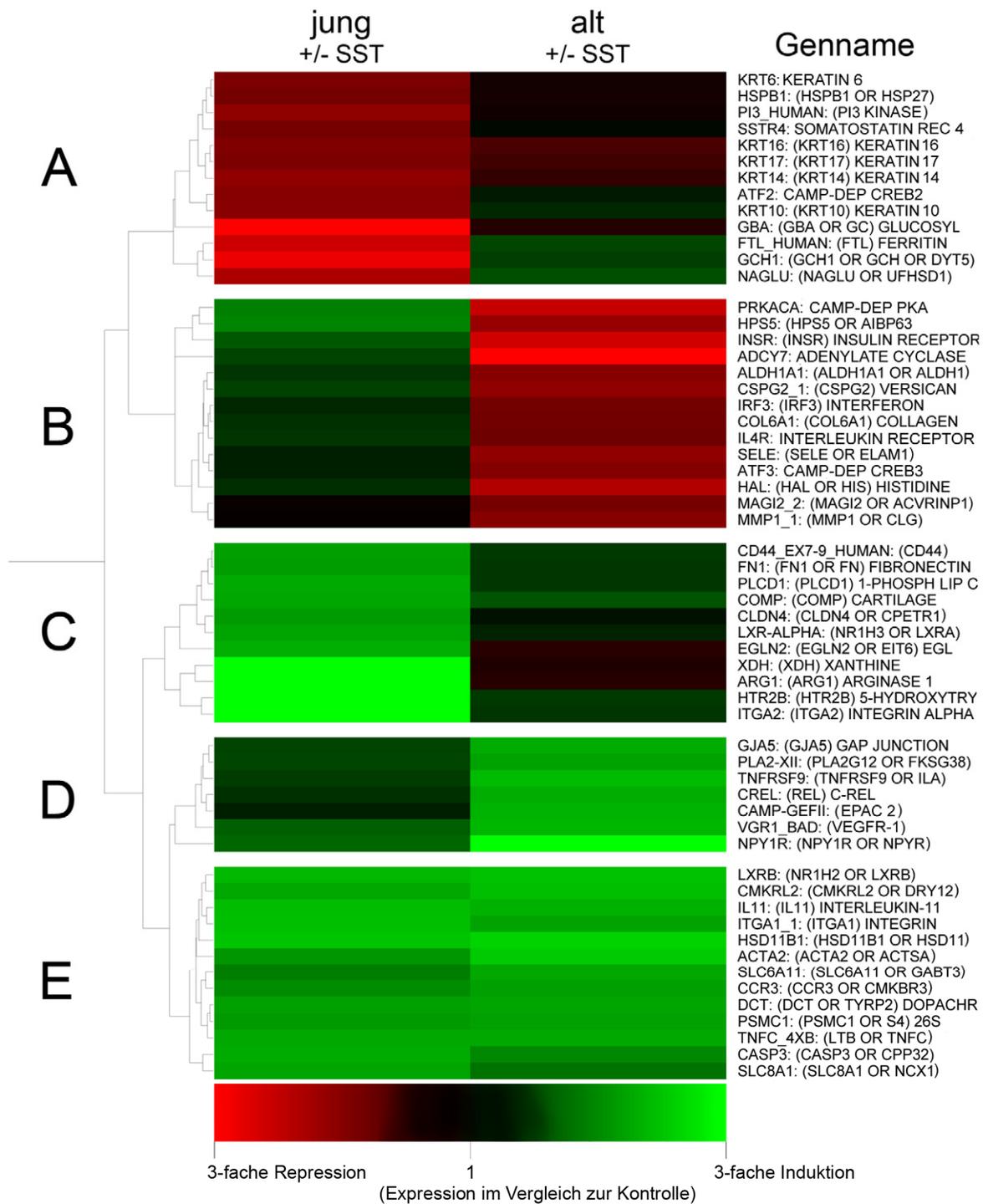


Abb. 3-15: Regulierte Gene nach SST-Rezeptoraktivierung in jungen sowie alten Keratinozyten

Es wurden die RNA-Expressionsunterschiede nach 24-stündiger SST-Stimulation in Keratinozyten junger (neonatal) und alter Spender (>65 Jahre) verglichen. Rote Felder bezeichnen eine signifikante Expressionsrepression der entsprechenden Gene nach SSTR-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, grüne Felder eine signifikante Induktion der Genexpression nach SSTR-Aktivierung. Gennamen sind als Abkürzungen angegeben. Die in jungen bzw. alten Keratinozyten unterschiedlich regulierten Gene sind in einzelne Gruppen geordnet: signifikante Repression in jungen (A) bzw. alten (B) Keratinozyten, signifikante Induktion in jungen (C) bzw. alten (D) Keratinozyten oder Induktion in beiden Gruppen (E). Die Daten sind Mittelwerte aus jeweils 4 unabhängigen Microarrayexperimenten, die Keratinozyten-RNA stammte von 5 neonatalen bzw. 3 alten Spendern.

3.4 Somatostatin reguliert die Barrierefunktion von Keratinozyten

Der Somatostatinrezeptor SSTR3 ist in einfachen Epithelien an der Regulation von Tight Junctions (TJs) beteiligt. Dabei wird der SSTR3 über die Interaktion mit dem PDZ-Domänenprotein MUPP1 (*multiple PDZ domain protein 1*) in TJs lokalisiert und kann nach Aktivierung die epitheliale Permeabilität beeinflussen (Liew et al., 2009). Außerdem wurde in SST-stimulierten Keratinozyten eine Veränderung der Genexpression von TJ-Proteinen festgestellt.

Deshalb wurde die subzelluläre Lokalisation des SSTR3 in primären Keratinozyten untersucht. Dazu wurden diese durch Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration ausdifferenziert und immunzytologische Färbungen durchgeführt. In diesen Zellen ist eine durchgängige SSTR3-Antikörperfärbung an den Zellgrenzen nachweisbar (Abb. 3-16A), was auf eine Lokalisierung in TJs hindeutet. Es ist außerdem eine vermutlich unspezifische Kernfärbung durch den verwendeten Antikörper sichtbar. Die Ausbildung funktioneller TJs zwischen diesen Zellen wurde bestätigt, da vor der Färbung ein deutlich erhöhter transepithelialer Widerstand der Keratinozytenschicht gemessen werden konnte ($450 \Omega\text{cm}^2$, Abb. 3-16B).

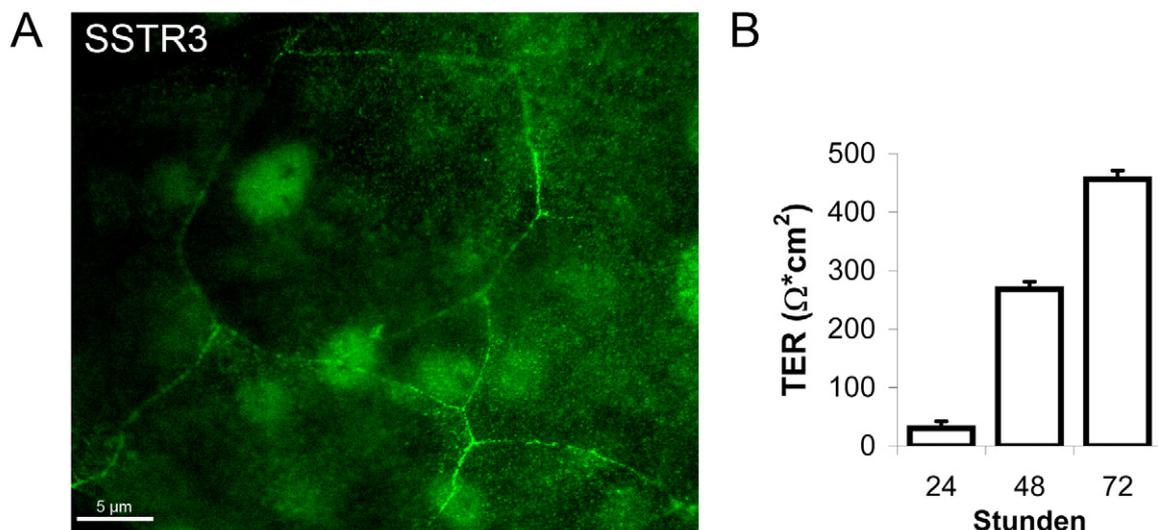


Abb. 3-16: Subzelluläre Verteilung des SSTR3 in differenzierten primären Keratinozyten

A: In der immunzytologischen Färbung ist der endogene SSTR3 (grün) an Zell-Zellgrenzen lokalisiert. Es ist eine durchgängige Membranfärbung sichtbar. **B:** Der transepitheliale Widerstand (TER) der in A gezeigten Keratinozytenschicht. Konfluente Zellen wurden durch Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration differenziert, der TER gemessen und die Zellen nach drei Tagen fixiert und gefärbt. Der hohe parazelluläre Widerstand belegt die Ausbildung funktioneller Tight Junctions (Mittelwerte mit Standardabweichung).

Weitere Experimente zeigten, dass die beobachtete Lokalisation deutlich vom Differenzierungsstatus der Keratinozyten abhängt. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst die Differenzierung von Keratinozyten (Hennings et al., 1980; Yuspa et al., 1989) und funktionelle TJs werden in Keratinozyten erst nach Erhöhung der extrazellulären

Kalziumkonzentration gebildet (Yuki et al., 2007). Bei geringen Kalziumkonzentrationen war in primären Keratinozyten nur eine diffuse Verteilung des SSTR3 und des TJ-Proteins MUPP1 sichtbar; nach Erhöhung der extrazellulären Konzentration auf 1,8 mM Ca^{2+} zeigt sich eine deutliche Membranlokalisation für beide Proteine (Abb. 3-17A). Neben der Lokalisation ändert sich während der Differenzierung gleichzeitig auch die Expression beider Proteine. In Keratinozyten ist unter niedrigen Kalziumbedingungen bereits eine geringe SSTR3- und MUPP1-Expression nachweisbar, diese wird nach dem Wechsel auf 1,8 mM Ca^{2+} in differenzierten Keratinozyten stark erhöht (Abb. 3-17B).

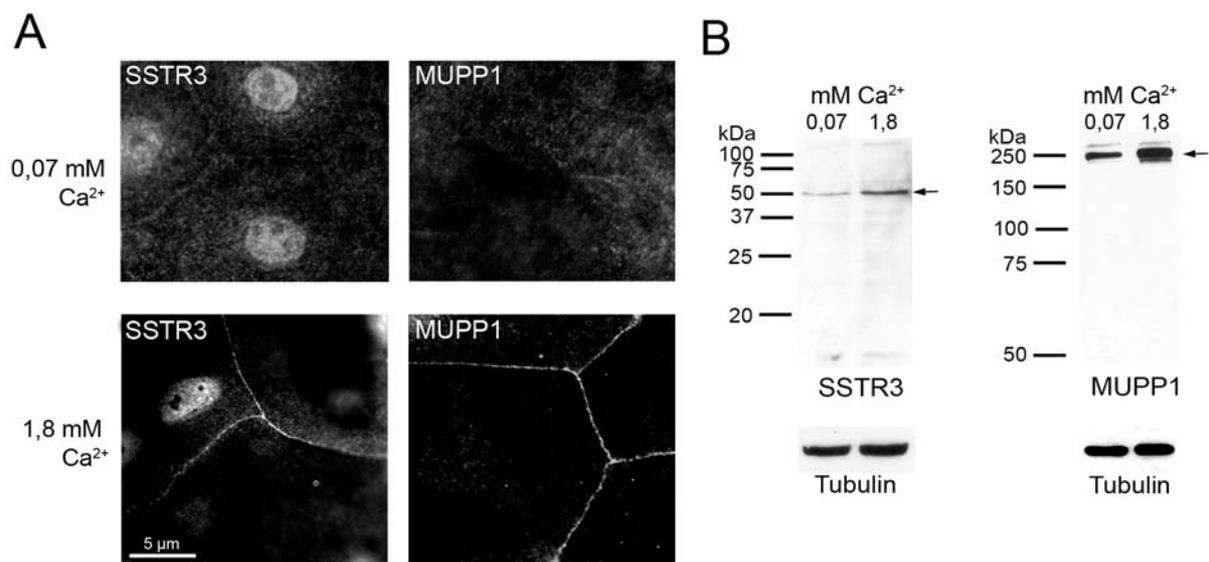


Abb. 3-17: Lokalisation und Expression von SSTR3 und MUPP1 in unterschiedlichen Differenzierungsstadien

A: Immunlokalisation von SSTR3 und MUPP1 in undifferenzierten (0,07 mM Ca^{2+}) und differenzierten (1,8 mM Ca^{2+}) Keratinozyten. Erst bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen wird eine Lokalisation an Zellgrenzen sichtbar. **B:** Die SSTR3- bzw. MUPP1-Expression wurde in Zelllysaten unter unterschiedlichen Kalziumbedingungen mittels Westernblot überprüft. Beide Proteine sind nachweisbar, wobei die Expression nach dem Wechsel auf 1,8 mM Ca^{2+} zunimmt. Es wurden gleiche Proteinmengen analysiert, Tubulin diente als Ladekontrolle.

3.4.1 Interaktion des SSTR-Subtyps 3 mit dem Tight Junction-Protein MUPP1 in Keratinozyten

Da in epithelialen Zelllinien (MDCK-II/MCF7) eine Bindung des TJ-assoziierten Proteins MUPP1 an das C-terminale PDZ-Bindemotiv des SSTR3 nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob in Keratinozyten der SSTR3 ebenfalls mit MUPP1 interagiert.

Zuerst wurde die Expression und Lokalisation von MUPP1 in der humanen Epidermis charakterisiert. In Hautbiopsien ist MUPP1 spezifisch an Zell-Zellgrenzen von Keratinozyten nachweisbar (Abb. 3-18A). Dabei ist eine breite Expression in allen lebenden Schichten der Epidermis sichtbar. Dieses Muster ist vergleichbar mit anderen epidermalen TJ-Proteinen wie Claudin-1 oder JAM-1, die ebenfalls in der gesamten Epidermis und nicht nur im *stratum granulosum* exprimiert werden (Brandner et al., 2006b). Im Westernblot konnte MUPP1 in Lysaten

aus Hautbiopsien bei einem Molekulargewicht von 250 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-18B). In primären Keratinozyten ist ebenfalls eine durchgängige Membranfärbung und ein deutliches TJ-Muster erkennbar (Abb. 3-18C).

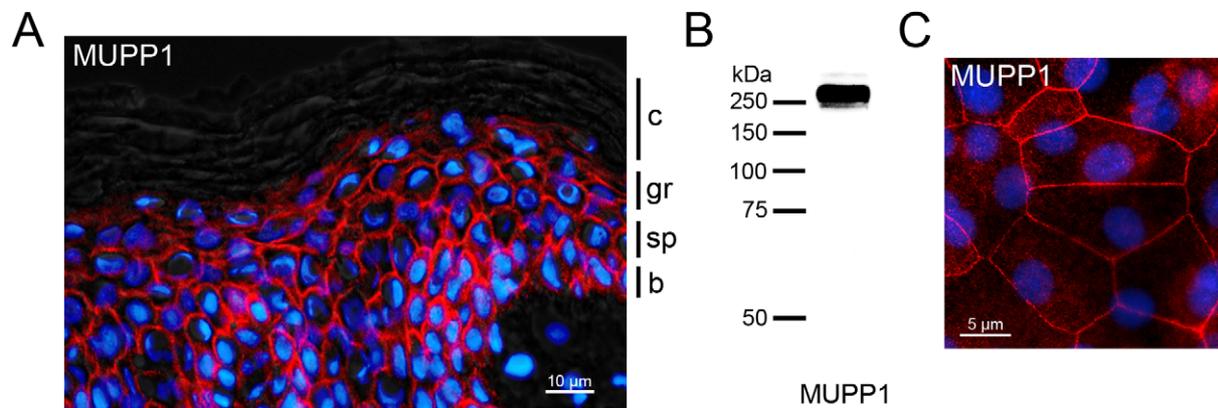


Abb. 3-18: Expression von MUPP1 in humaner Epidermis und Keratinozyten

A: Immunhistologischer Nachweis von MUPP1 (rot) in der Epidermis. MUPP1 wird in der gesamten Epidermis exprimiert; in der Dermis oder im *stratum corneum* ist keine Färbung sichtbar. Die epidermalen Zellschichten sind mit c (*stratum corneum*), gr (*stratum granulosum*), sp (*stratum spinosum*) und b (*stratum basale*) gekennzeichnet. **B:** Detektion von MUPP1 in lysierten Hautbiopsien mittels Westernblot. **C:** Subzelluläre Lokalisation in differenzierten Keratinozyten (rot), es ist ein durchgängiges TJ-Muster erkennbar. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt.

Die physikalische Interaktion zwischen SSTR3 und MUPP1 wurde zunächst durch eine Affinitätspräzipitation von endogenem MUPP1 mit einem C-terminalen SSTR3-Peptid überprüft. Dazu wurden Proteine aus Keratinozytenlysat analysiert, die spezifisch an immobilisiertes SSTR3-Peptid (Sequenz: KSSTMRISYL) binden. Dabei konnte MUPP1 präzipitiert und somit eine Interaktion mit dem SSTR3-C-Terminus nachgewiesen werden (Abb. 3-19A). Zusätzlich zum Nachweis von MUPP1 bei einer Größe von 250 kDa konnte auch eine zweite Bande mit höherem Molekulargewicht detektiert werden. Hierbei könnte es sich um eine der Spleißvarianten handeln, die zuvor beschrieben wurden (Mancini et al., 2000; Liew, 2004). Mit einem unspezifischen Peptid (GKAP (*guanylate kinase associated protein*)-C-Terminus) oder ohne Peptid konnte dagegen kein MUPP1 präzipitiert werden.

Weitergehend wurde die Interaktion von SSTR3 und MUPP1 durch Ko-Immunpräzipitationen charakterisiert. Dazu wurde endogenes MUPP1 aus Keratinozytenlysat präzipitiert und an dieses gebundene Proteine mittels Westernblot untersucht. Im Präzipitat ist SSTR3 als MUPP1-bindendes Protein nachweisbar (Abb. 3-19B). Im reziproken Ansatz, der Präzipitation von endogenem SSTR3 und dem Nachweis der Interaktion mit MUPP1, konnte ebenfalls gebundenes MUPP1 detektiert werden. In dem Kontrollexperiment mit einem unspezifischen Antikörper (gegen das neuronale PDZ-Protein Shank1) war keine Präzipitation von MUPP1 oder SSTR3 aus dem Zellysat möglich.

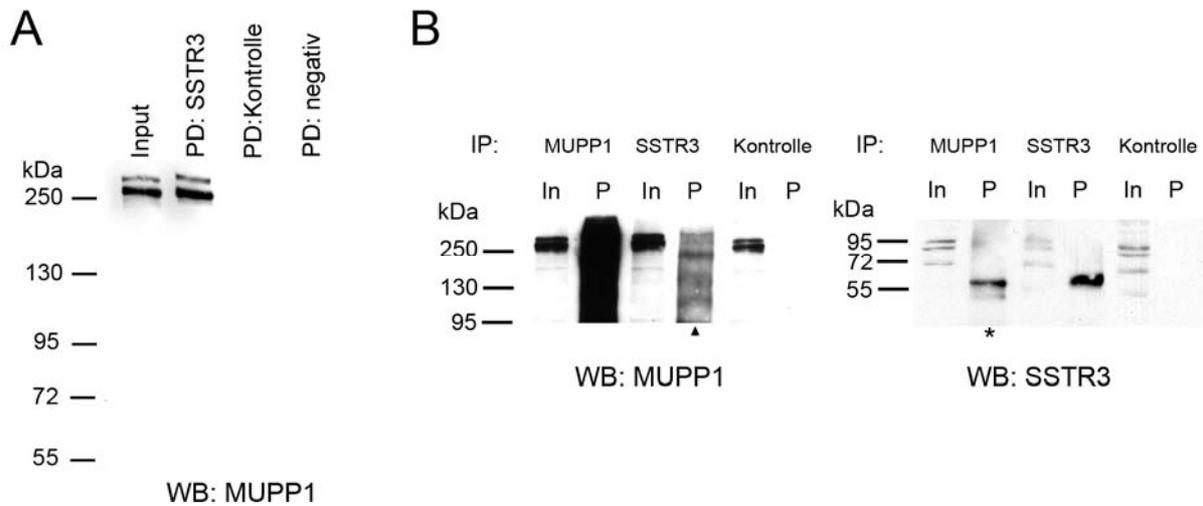


Abb. 3-19: Spezifische Interaktion von SSTR3 mit MUPP1 in Keratinozyten

A: Affinitätspräzipitation von MUPP1 mit einem C-terminalen SSTR3-Peptid. Proteine wurden aus Zelllysaten von differenzierten Keratinozyten (Input) mit dem SSTR3-Peptid, einem Peptid des GKAP-C-Terminus (Kontrolle) oder ohne Peptid (negativ) präzipitiert (Pulldown, PD), und die Bindung von MUPP1 mittels Westernblot (WB) nachgewiesen. MUPP1 kann nur mit dem SSTR3-Peptid spezifisch aus Lysat präzipitiert werden. **B:** Ko-Immünpräzipitation (IP) von SSTR3 sowie MUPP1 aus Keratinozyten. Interagierende Proteine wurden mit Antikörpern gegen MUPP1, SSTR3 und dem PDZ-Protein Shank1 (als Kontrolle) aus Keratinozytenlysaten präzipitiert. Input (In) sowie Präzipitate (P) wurden mit den darunter angegebenen Antikörpern mittels Westernblot (WB) analysiert. Es bindet sowohl SSTR3 an immunpräzipitiertes MUPP1 (markiert durch *), als auch MUPP1 an immunpräzipitierten SSTR3 (markiert durch ▲). Keines der beiden Proteine wurde durch den unspezifischen Kontrollantikörper präzipitiert.

Die Interaktion wurde auch durch Kollokalisationsstudien untersucht. Dabei konnte eine übereinstimmende Lokalisation der beiden endogenen Proteine gezeigt werden (Abb. 3-20A). Diese Kollokalisation ist aber dadurch limitiert, dass beide Antikörper im Bereich der SSTR3-MUPP1-Interaktion (SSTR3-C-Terminus sowie MUPP1-PDZ-Domäne) binden. Deshalb wurde zusätzlich die Lokalisation eines ektopisch exprimierten SSTR3-Konstruktes untersucht. Dabei wurde die Kollokalisation auch in diesen transfizierten Zellen (mit Antikörpern gegen das T7-Epitop des Rezeptors sowie gegen endogenes MUPP1) bestätigt (Abb. 3-20B).

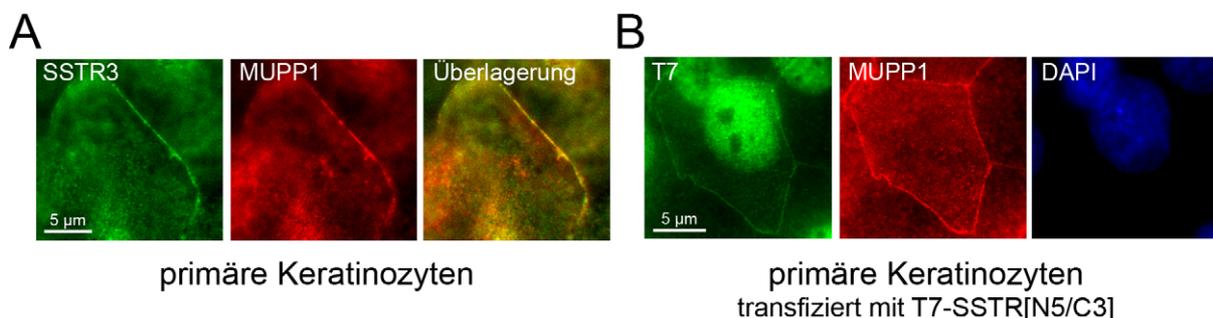


Abb. 3-20: Kollokalisation von SSTR3 und MUPP1 in humanen Keratinozyten

A: In primären Keratinozyten wurde die endogene Expression von SSTR3 und MUPP1 durch spezifische Antikörper detektiert. Die Überlagerung zeigt die Kollokalisation beider Proteine. **B:** Primäre Keratinozyten wurden mit einem SSTR3-Konstrukt (kodiert für ein SSTR5-SSTR3-Fusionsprotein mit N-terminalem T7-Peptidantigen) transfiziert. Die Immunfärbung mit T7- und MUPP1-Antikörpern zeigt eine übereinstimmende Membranlokalisation. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

3.4.2 Somatostatin erhöht den epithelialen Widerstand von Keratinozyten

Um den Einfluss der SST-Rezeptoraktivierung auf die Funktionalität von Tight Junctions in Keratinozyten zu untersuchen, wurde die Permeabilität von konfluenten Keratinozytenzellschichten nach SST-Stimulation bestimmt. Durch Messungen des transepithelialen Widerstandes (TER) kann die parazelluläre Durchlässigkeit von konfluenten Zellen bestimmt werden (Matter und Balda, 2003a). In primären Keratinozytenkulturen dreier unterschiedlicher Hautspender wurden Änderungen des TER nach SST-Stimulation während der Bildung von Tight Junctions bestimmt. Die Messungen wurden über 48 Stunden nach SST-Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt und so ein Zeitverlauf dargestellt (Abb. 3-21). Dabei ist der transepitheliale Widerstand von SST-stimulierten Zellen durchgehend höher als der TER von unbehandelten Zellen. Der Widerstand nimmt innerhalb der ersten 8 Stunden (signifikante Zunahme nach 2, 4, 6 und 8 Stunden) nach Rezeptoraktivierung zu und bleibt auch nach 48 Stunden im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht. Dies belegt einen signifikanten Einfluss von Somatostatin auf die Tight Junction-Permeabilität von Keratinozyten.

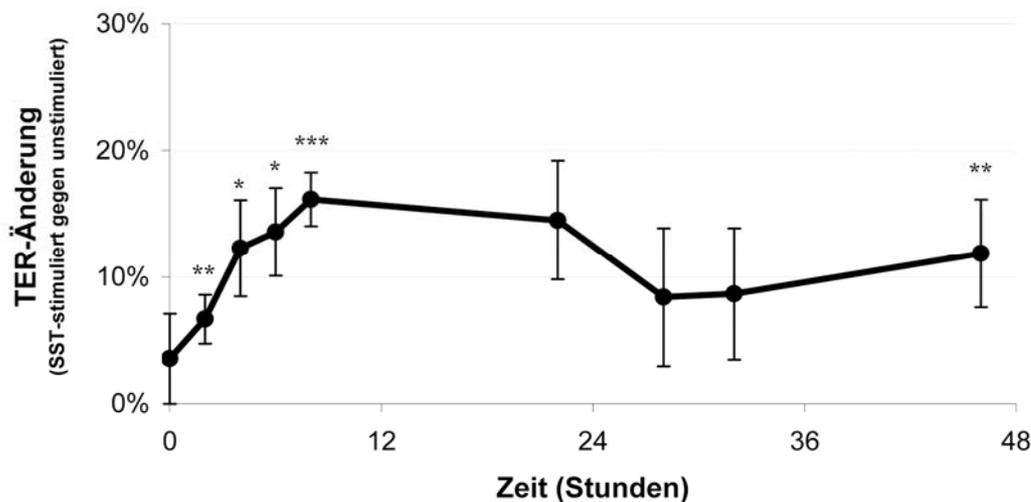


Abb. 3-21: Somatostatin erhöht den transepithelialen Widerstand (TER) von konfluenten Keratinozyten

Differenzierte Keratinozyten wurden mit 50 nM SST stimuliert und der TER der Zellschicht zu den angegebenen Zeitpunkten mit einem Ohmmeter gemessen. Vor der Stimulation wurden Zell-Zellverbindungen mit Niedrig-Ca²⁺-Medium kurzzeitig zerstört und durch erneutes Zugeben von Hoch-Ca²⁺-Medium der synchronisierte Aufbau von Tight Junctions ermöglicht. Die primären Keratinozyten stammten von drei unterschiedlichen Hautspendern. Die Änderungen des transepithelialen Widerstandes (Ωcm^2) der konfluenten Zellschicht sind als Prozentwerte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. (n= 8, Mittelwerte mit Standardfehler, * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,005).

3.4.3 SSTR-Aktivierung ändert die Zusammensetzung von Tight Junctions

Aufbauend auf den Ergebnissen zur Regulation der TJ-Permeabilität wurde der Einfluss von SST auf die Expression von TJ-Proteinen untersucht. Die Expression verschiedener Claudine bestimmt die parazelluläre Durchlässigkeit von Zellen (Tsukita et al., 2002; Turksen und Troy, 2004). Deshalb wurden Änderungen der Claudin-Proteinexpression in SST-stimulierten Keratinozyten überprüft. Die mRNA-Synthese von Claudin-1 und Claudin-4 war in primären Keratinozyten nach 24-stündiger SST-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht. Für Claudin-4 war dabei eine signifikante Zunahme der Expression nachzuweisen (etwa dreifach erhöht im Vergleich zu Kontrollzellen, Abb. 3-22A). Die darauffolgende Untersuchung der Claudin-4-Expression nach 24 Stunden mittels Westernblot zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung durch SST-Stimulation von Keratinozyten (Abb. 3-22B). Die Erhöhung der Claudinexpression korrelierte dabei mit dem Anstieg des transepithelialen Widerstandes in Keratinozyten (Abb. 3-21).

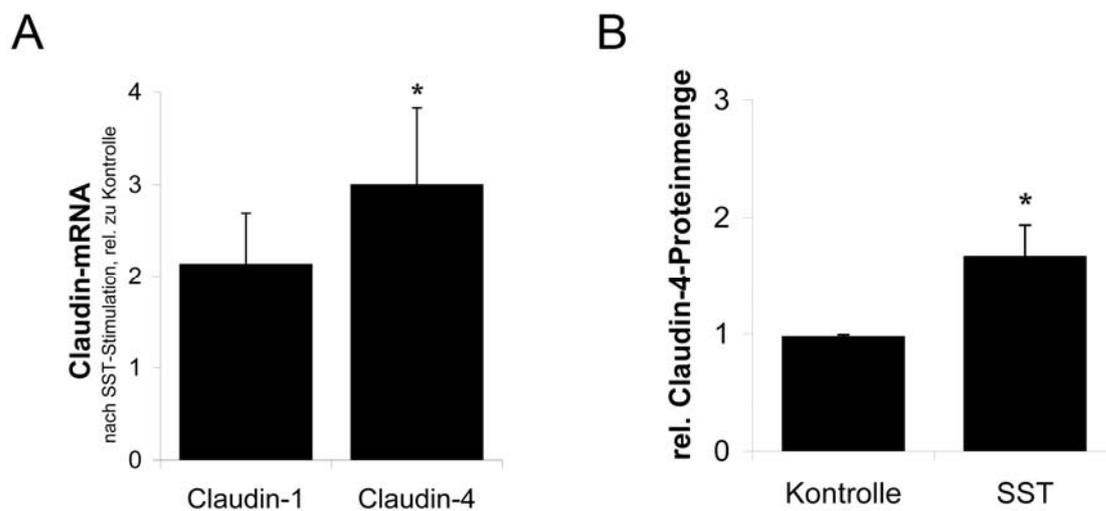


Abb. 3-22: Somatostatin induziert die Expression von Claudin-4 in Keratinozyten

A: Genexpression von Claudin-1 und Claudin-4 in SST-stimulierten Keratinozyten relativ zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Expressionsänderungen wurden in Microarrayexperimenten (n= 4) ermittelt. Nach 24 Stunden Behandlung mit 1 μ M SST ist die Menge der Claudin-4-mRNA signifikant erhöht. **B:** Die Proteinkonzentration von Claudin-4 wird durch 1 μ M SST signifikant erhöht (n= 5, Mittelwerte mit Standardfehler, * P<0,05). Proteinmengen wurden nach 24 Stunden SST-Stimulation von differenzierten Keratinozyten (Tubulin als Ladekontrolle) quantifiziert.

3.5 Somatostatin inhibiert die Proliferation von Keratinozyten

Somatostatin übt eine antiproliferative Wirkung auf viele Zelltypen aus (Moller et al., 2003). Deshalb wurde die Beeinflussung des Wachstums von Keratinozyten nach einer SST-Stimulation untersucht. Durch die Zugabe von Somatostatin zu proliferierenden Keratinozyten konnte eine deutliche Inhibition des Zellwachstums nach 72 Stunden festgestellt werden (Abb. 3-23). Die Zellzahl wurde auf 75% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant reduziert.

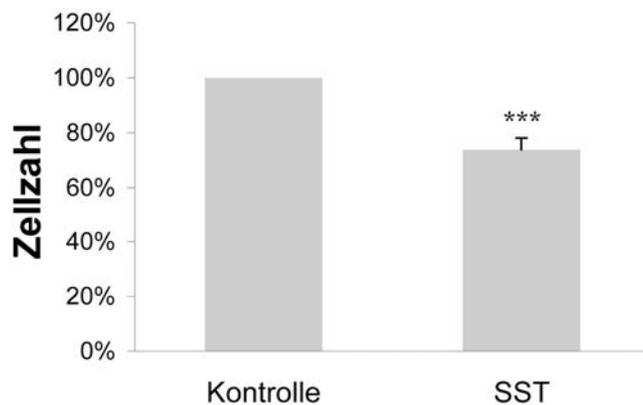


Abb. 3-23: Die Proliferation von Keratinozyten wird durch SST inhibiert

Proliferierende Keratinozyten wurden für 72 Stunden mit 1 μ M SST behandelt und die Zellzahl im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt (n= 13, Mittelwerte mit Standardfehler, *** P<0,005). Dabei wird die Proliferation durch SST-Gabe signifikant vermindert.

Um den Einfluss der einzelnen SSTR-Subtypen auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden erneut die subtypselektiven SSTR-Agonisten (sst2-5/1) verwendet. Dabei inhibierte nur der SSTR5/1-spezifische Agonist signifikant die Keratinozytenproliferation (vergleichbar mit SST), die übrigen rezeptorselektiven Agonisten (sst2,3,4) zeigten dagegen keinen deutlichen Effekt (Abb. 3-24).

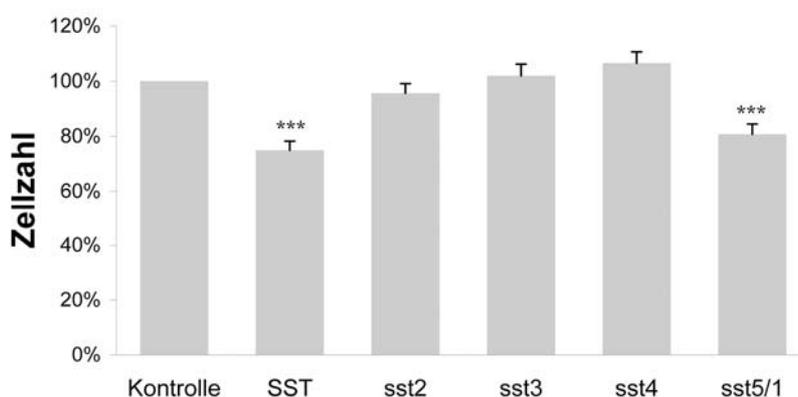


Abb. 3-24: Einfluss von rezeptorselektiven SSTR-Agonisten auf die Proliferation

Proliferierende Keratinozyten wurden für 72 Stunden mit rezeptorselektiven SSTR-Agonisten (1 μ M) behandelt und die Zellzahl im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt. Nur der SSTR5/1-spezifische Agonist inhibiert die Proliferation signifikant (n= 4, Mittelwerte mit Standardfehler, *** P<0,005).

3.6 Somatostatin inhibiert die Migration von Keratinozyten

Die koordinierte Regulation der Keratinozytenmigration ist notwendig zur Reepithelialisierung während der Wundheilung und zum Aufrechterhalten der epidermalen Barriere (Singer und Clark, 1999). Zur Überprüfung des Einflusses von Somatostatin auf den Reepithelialisierungsprozess wurde die Migration von SST-behandelten Keratinozyten untersucht. Durch Verwundungsassays kann die Motilität von Zellen induziert und die Zellmigration *in vitro* untersucht werden (Liang et al., 2007). Nach der Verwundung einer konfluenten Zellschicht beginnen die Zellen am Wundrand zu polarisieren und zu migrieren, um die Wunde zu schließen. Um den Einfluss von SST auf die Migration von Keratinozyten zu untersuchen, wurde die Reepithelialisierung einer verwundeten Fläche über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt und die Größe der Verwundungsfläche zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen. Dabei war eine signifikante Inhibition der Keratinozytenmigration durch Somatostatin im Vergleich zu unbehandelten Zellen festzustellen (Abb. 3-25A).

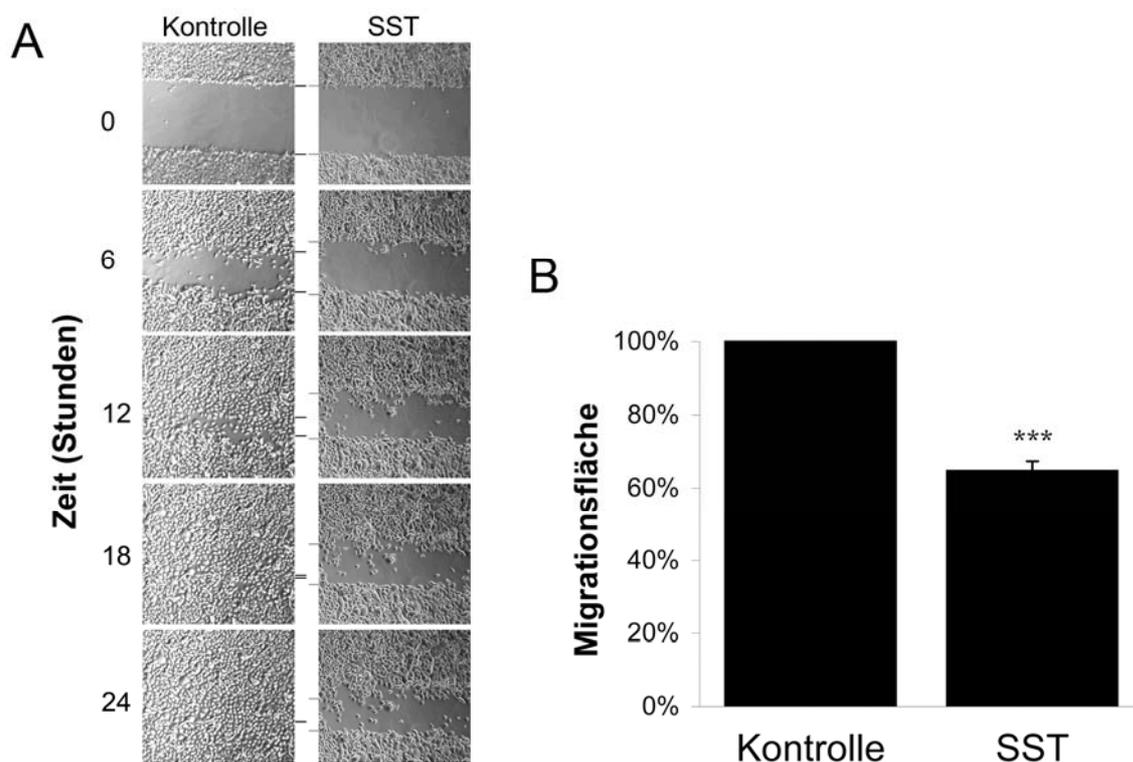


Abb. 3-25: SST inhibiert die Migration von Keratinozyten

A: Im Migrationsassay mit primären Keratinozyten wurde die Reepithelialisierung gleicher Flächen nach einer Verwundung untersucht. Die Migration der Zellen wurde über 24 Stunden nach Behandlung mit 1 μ M SST aufgezeichnet. Die Proliferation der Zellen während des Experimentes wurde durch einen mit ionisierender Röntgenstrahlung induzierten Zellzyklusarrest verhindert. Während Kontrollzellen (links) über die gesamte Verwundungsfläche migrieren, ist bei SST-stimulierten Zellen (rechts) die Migration verzögert. **B:** Die Bestimmung der wiederbewachsenen Fläche nach 24 h SST-Stimulation (relativ zu Kontrollzellen) zeigt eine signifikante Inhibition der Zellmigration ($n=7$, *** $P<0,005$)

Die Zellen wurden zuvor mit Röntgenstrahlung bestrahlt, um Proliferationseffekte bei der Reepithelialisierung auszuschließen. Während Kontrollkeratinozyten die Wunde nach 18 Stunden vollständig reepithelialisiert hatten, migrierten SST-behandelte Keratinozyten über eine deutlich geringere Distanz der Verwundungsfläche. Dies lässt auf eine verlangsamte Migration nach SST-Stimulation schließen. Die Messung und Quantifizierung der bewachsenen Flächen nach 24 Stunden zeigt, dass die SST-behandelten Keratinozyten nur 65 % der Kontrollfläche wiederbewachsen (Abb. 3-25B).

Die Stimulation von migrierenden Keratinozyten mit subtypselektiven SSTR-Agonisten zeigte jeweils vergleichbare Inhibitionsraten zur Stimulation mit SST (Abb. 3-26). Zwischen den einzelnen Agonisten sind keine signifikanten Unterschiede in der Migrationsinhibition zu erkennen. Im Gegensatz zu den Proliferationsexperimenten, in denen nur der SSTR5/1-spezifische Agonist einen Effekt zeigt, können demnach alle SSTR-Subtypen die Zellmigration auf die gleiche Weise inhibieren.

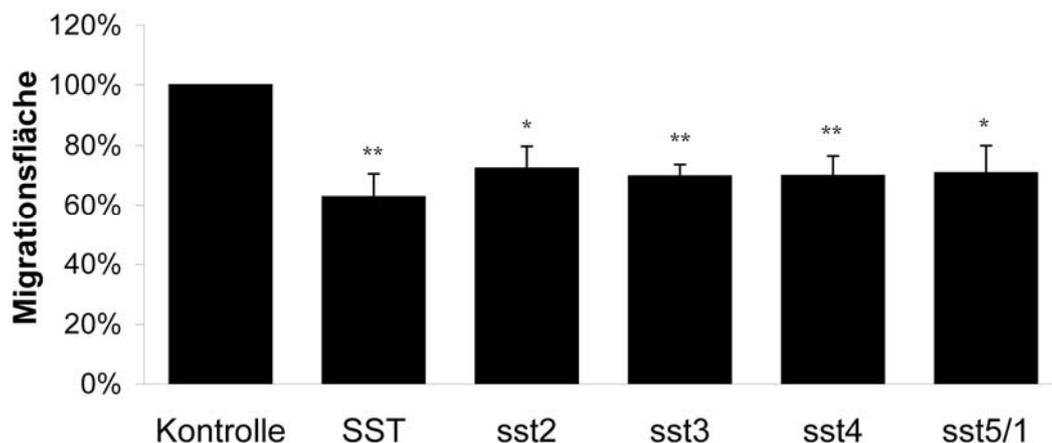


Abb. 3-26: Inhibierung der Zellmigration durch selektive SSTR-Agonisten

In Migrationsassays wurde die Reepithelialisierung gleicher Flächen über 24 Stunden nach Behandlung von primären Keratinozyten mit 1 μ M SST bzw. verschiedenen SSTR-Agonisten untersucht (n= 5, Mittelwerte mit Standardfehler, * P <0,05; ** P <0,01).

3.7 Somatostatin beeinflusst die Dynamik des Zytoskeletts

Um zu ermitteln, über welche zellulären Mechanismen SST die Migration von Keratinozyten beeinflusst, wurden Änderungen des Aktinzytoskeletts von unterschiedlich stimulierten Keratinozyten untersucht. Das Aktinzytoskelett ist essentiell für die zelluläre Bewegung (Pollard und Borisy, 2003). Die Zellmigration beginnt mit der Ausbreitung der Zelle in Migrationsrichtung, dabei wird am Leitsaum ein hochdynamisches, aktinreiches Lamellipodium ausgebildet (Small et al., 2002). Deshalb wurde der Einfluss von SST auf die

Lamellipodiendynamik in frühen Phasen der Migration betrachtet. Die gerichtete Ausbreitung der Lamellipodien lässt sich nach Zellfixierung und Aktinfärbung mit fluoreszenzmarkierten Phalloidin bestimmen.

3.7.1 Somatostatin verzögert die Lamellipodienbildung

Zum Nachweis einer geänderten Aktindynamik in SST-behandelten Keratinozyten wurde die Ausbildung von Lamellipodien nach dreistündiger Migration betrachtet. Unbehandelte Kontrollzellen bildeten dabei deutliche Lamellipodien aus, die sich in Richtung der Verwundung ausbreiteten. Die gebildeten Lamellipodien sind in SST-behandelten Zellen kleiner (Abb. 3-27A).

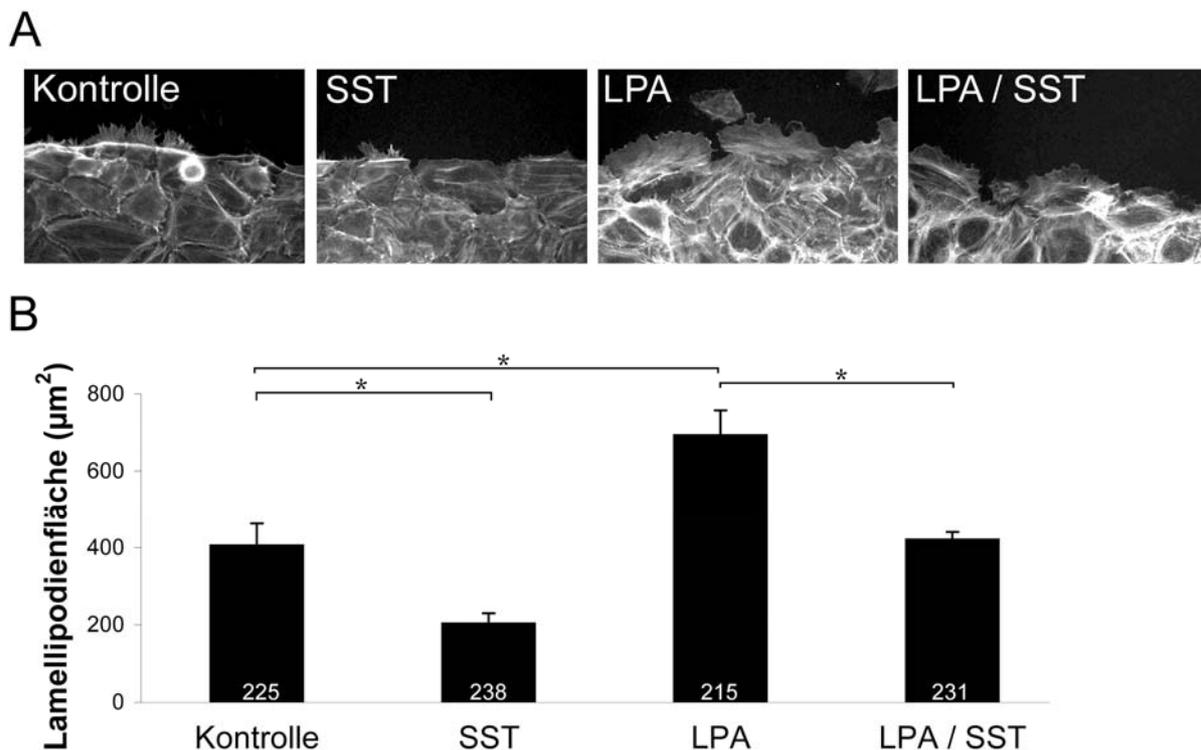


Abb. 3-27: SST verzögert die Ausbildungen von Lamellipodien in migrierenden Keratinozyten

A: Keratinozyten wurden (wie für Migrationsassays beschrieben) verwundet, nach 3 Stunden Migration fixiert und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin visualisiert. SST-behandelte Keratinozyten (1 µM SST) bilden kleinere Lamellipodien als unbehandelte Kontrollzellen aus. Behandlung mit 5 µM LPA führt zu einer starken Aktivierung der Zytoskelettreorganisation. Dies kann durch gleichzeitige Stimulation mit SST inhibiert werden. **B:** Die Messung der Lamellipodienflächen zeigt eine signifikante Verringerung der Zellausbreitung in SST-behandelten Keratinozyten und die Kompensation der LPA-Aktivierung durch SST. Die Gesamtanzahl der ausgezählten Zellen ist in den jeweiligen Balken angegeben (mittlere Flächen (in µm²) mit Standardfehler, n= 3, * P<0,05).

Dies lässt vermuten, dass die Ausbildung von Lamellipodien durch SST verzögert wird. Zur Überprüfung der Lamellipodienregulation wurden die Zellen zusätzlich mit Lysophosphatidylsäure (LPA) behandelt. LPA ist ein Phospholipid, das die Zellmigration stark aktivieren kann (Mills und Moolenaar, 2003). Dabei wird nach Bindung an den LPA-Rezeptor die GTPase Rac1 aktiviert, was zur Aktinreorganisation und einer verstärkten Zellausbreitung führt

(Van Leeuwen et al., 2003). Für Keratinozyten ist ebenfalls eine verstärkte Migration und Wundheilung nach LPA-Stimulation beschrieben (Demoyer et al., 2000; Sauer et al., 2004). Dementsprechend war nach Zugabe von LPA eine verstärkte Ausbildung von Lamellipodien sowie eine starke zytoplasmatische Aktinpolymerisation zu beobachten (Abb. 3-27A). Dieser Effekt von LPA auf die Lamellipodienausbreitung kann durch eine gleichzeitige SST-Stimulation deutlich verringert werden.

Zur quantitativen Analyse dieser Effekte wurden die jeweiligen Lamellipodienflächen von etwa 200 migrierenden Zellen ausgemessen. Hierbei bestätigte sich die verzögerte Zellausbreitung nach SST-Aktivierung. SST-behandelte Zellen zeigten signifikant kleinere Lamellipodienflächen im Vergleich zu Kontrollkeratinozyten (Abb. 3-27B). Nach Behandlung mit LPA nimmt die Lamellipodiengröße signifikant zu, dieser Effekt kann aber durch gleichzeitige Stimulation mit SST wieder rückgängig gemacht werden (Abb. 3-27B). Der Einfluss von SST auf die Lamellipodienausbreitung kann somit die beobachtete Inhibierung der Zellmigration (Abb. 3-25) nach Aktivierung von SST-Rezeptoren erklären.

3.7.2 Somatostatin verzögert die Ausbildung von Fokaladhäsionen

Zusätzlich zur Lamellipodienausbreitung wurde die Ausbildung von Fokaladhäsionen am Leitsaum der Zelle unterschiedlich behandelter Keratinozyten untersucht. Fokaladhäsionen sind Zellverbindungen, die das intrazelluläre Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden. Deshalb spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und erlauben die Fortbewegung über das Substrat. Vinculin ist ein Adapterprotein der Fokaladhäsionen, das Aktin mit Integrinen verbindet und so für die Übertragung mechanischer Kräfte sorgt. Durch eine Vinculinfärbung lassen sich die Zell-Matrix-Verbindungen in gebildeten Lamellipodien und die Adhäsionsdynamik der betrachteten Zellen aufzeigen. Im Vergleich mit Kontrollzellen ist in SST-behandelten Zellen neben der verringerten Lamellipodienausbreitung ebenfalls eine deutliche Abnahme von Fokaladhäsionen sichtbar (Abb. 3-28). Nach Zugabe von LPA als Positivkontrolle kommt es hingegen zu einer massiven Ausbildung von Fokaladhäsionen.

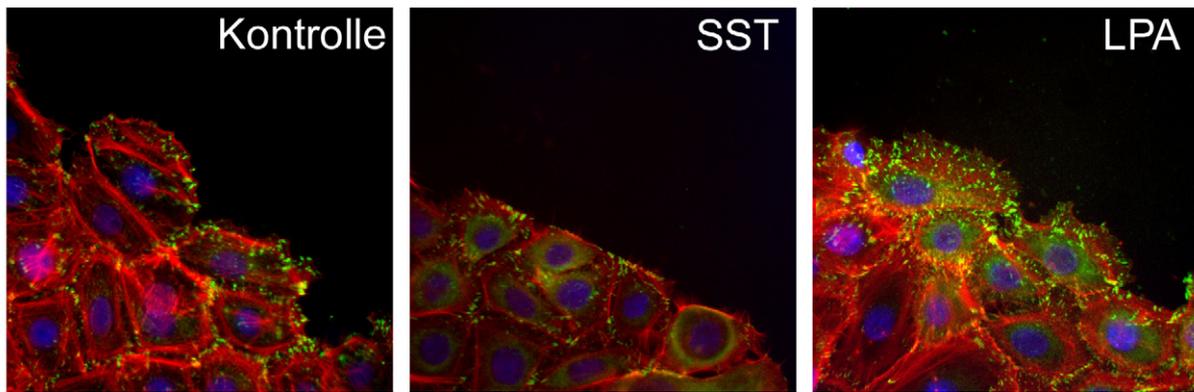


Abb. 3-28: SST verringert die Ausbildung von Fokaladhäsionen in migrierenden Keratinozyten

Konfluente Keratinozyten wurden nach Verwundung unterschiedlich behandelt und nach 3 Stunden Migration fixiert und gefärbt. Gebildete Fokaladhäsionen wurden mit einem Vinculin-Antikörper (grün), aktinreiche Lamellipodien mit Phalloidin (rot) und Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. Nach der Behandlung mit 1 μM SST zeigten Keratinozyten reduzierte Fokaladhäsionen im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die Behandlung mit 5 μM LPA führte dagegen zu einer starken Zunahme von Fokaladhäsionen.

3.7.3 Somatostatin verringert die Aktivität der GTPase Rac1

Die Zellausbreitung in Richtung einer Wunde wird durch die gerichtete Reorganisation des Zytoskeletts erreicht. Die dynamische Organisation des Aktinzytoskeletts wird hauptsächlich durch die Familie der Rho-GTPasen reguliert (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Dabei wird die zu Beginn der Migration wichtige Lamellipodienausbildung besonders durch die Regulation der Aktivität der GTPase Rac1 gesteuert (Ridley et al., 1992; Nobes und Hall, 1999). Auf Grund dessen wurde der Einfluss von Somatostatin auf die Aktivität von Rac1 während der Migration und der Ausbildung von Lamellipodien untersucht. Während der beginnenden Aktinreorganisation wurde die Menge von aktiviertem Rac1 in Zelllysaten von Keratinozyten bestimmt. Dazu wurde aktives, GTP-gebundenes Rac1 spezifisch mit der Bindedomäne des Rac1-Effektors PAK (PAK[PBD]) präzipitiert. Dabei konnte eine Abnahme von aktivem Rac1 in SST-stimulierten, migrierenden Keratinozyten festgestellt werden (Abb. 3-29A). Die Quantifizierung der Rac1-Intensitäten im Westernblot zeigte eine signifikante Abnahme von aktivem Rac1 (um 30%) nach SST-Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 3-29B). Demnach kann nach der Aktivierung endogener SSTRs über die Rac1-Inhibition das Aktinzytoskelett beeinflusst werden, was zu einer langsameren Lamellipodienausbreitung und schließlich verringerter Zellmigration führt.

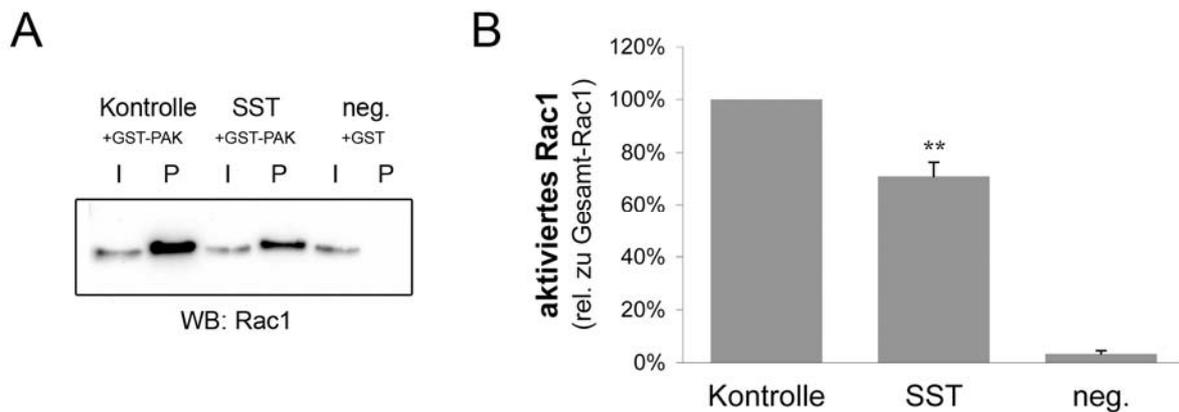


Abb. 3-29: SST verringert die Aktivität von Rac1 in migrierenden Keratinozyten

A: Die Menge von aktivem Rac1 wurde durch Affinitätspräzipitation mit einer Rac1-Effektordomäne bestimmt. Nach 3 Stunden Migration wurden Keratinozyten lysiert und aktives Rac1 mit aufgereinigtem GST-PAK[PBD]-Fusionsprotein präzipitiert (I: Input, P: Präzipitat). In SST-stimulierten Keratinozyten ist die Rac1-Aktivität vermindert. Eine Präzipitation mit GST diente als Negativkontrolle. **B:** Die Quantifizierung der Bandenintensitäten zeigt eine signifikante Verringerung der Rac1-Aktivität nach Stimulation mit 1 μ M SST für 3 Stunden ($n=4$, Mittelwerte mit Standardfehler, $**P<0,01$).

3.8 Somatostatin inhibiert die epidermale Wundheilung

Die beobachtete Inhibition der Proliferation und Migration von Keratinozyten durch SST lässt auf einen Einfluss von SST auf die epidermale Wundheilung schließen. Um die Reepithelialisierung nach einer Verwundung der Epidermis zu untersuchen, wurden *ex vivo*-Wundmodelle aus Schweinehaut verwendet. Dazu wurden 3 mm große Wunden in Gewebeproben aus Schweineohren gestanzt und die Wundheilung nach einer Inkubation von 48 Stunden überprüft. Die Reepithelialisierung der Wunden wurde durch Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Gefrierschnitten der behandelten Modelle lichtmikroskopisch begutachtet. Dabei konnte bei unbehandelten Kontrollmodellen ein (weitgehend) vollständiger Wundschluss durch die regenerierte Epidermis festgestellt werden (Abb. 3-30A). SST-behandelte Wundheilungsmodelle zeigten dagegen eine verzögerte Reepithelialisierung mit deutlich erkennbaren Wundrändern (Abb. 3-30A). Eine quantitative Auswertung der Wundheilungsrate an Hand einer Bewertungsskala zeigte, dass die reepithelialisierte Fläche von SST-behandelten Modellen signifikant kleiner als die der unbehandelten Wundmodelle ist (Abb. 3-30B).

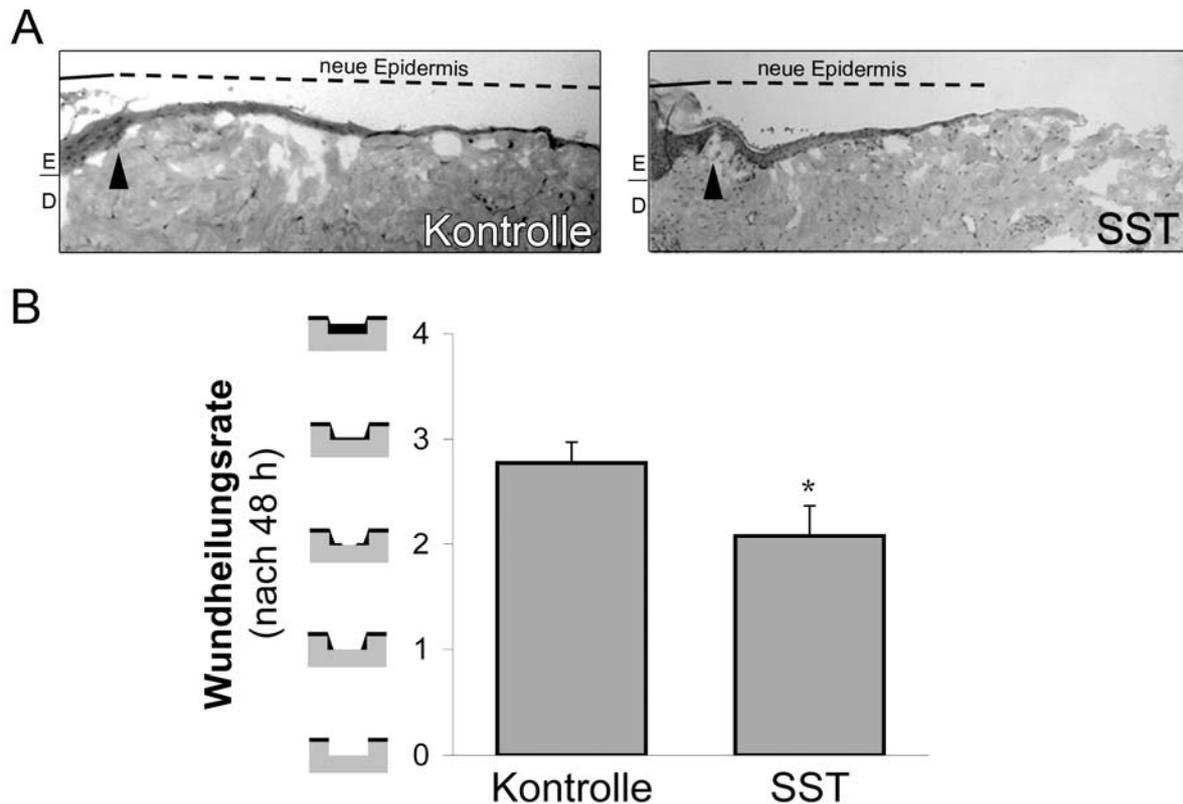


Abb. 3-30: SST inhibiert die epidermale Wundheilung in der Schweinehaut

(A) Regeneration der Epidermis im *ex vivo*-Wundheilungsmodell aus Schweinehaut. Nach 48 Stunden ist die Epidermis des unbehandelten Modells vollständig wiederhergestellt, während durch Zugabe von 2 μ M SST die reepithelialisierte Fläche nach dem gleichen Zeitraum deutlich kleiner ist (Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Epidermis (E) und Dermis (D)). Der Beginn der Wunde ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und die neugebildete Epidermis durch eine gestrichelte Linie markiert. (B) Auswertung der Wundheilung nach verblindeter lichtmikroskopischer Begutachtung. Jedem gefärbten Wundmodell wurde eine Bewertung von 0 bis 4 zugeordnet, die einzelnen Wundheilungsstufen sind schematisch dargestellt (0: keine Wundheilung, 1: kleine Wundzunge, 2: große Wundzunge, 3: geschlossene einschichtige Epidermis, 4: geschlossene mehrschichtige Epidermis). SST-behandelte Modelle zeigten eine signifikant kleinere regenerierte Epidermis. Die Werte stammen aus sechs unabhängigen Experimenten; nicht auswertbare Wundränder wurden ausgeschlossen (Mittelwerte mit Standardfehler, * $P < 0,05$).

4 DISKUSSION

Die Produktion von Somatostatin durch neuroendokrine Zellen sowie Immunzellen ist vielfach beschrieben (Patel, 1999; Weckbecker et al., 2003). Beide Zelltypen sind in der humanen Epidermis vertreten und gehören zum endokrinologischen System der Haut (Roosterman et al., 2006). Der Nachweis der SST-Immunreaktivität in Einzelzellen in der Epidermis deutet auf eine Synthese und nachfolgende Sekretion von SST durch diese Zellen hin. Die Immunreaktivität könnte aber auch durch eine Internalisierung von interzellulär vorhandenem SST durch diese Zellen verursacht werden. Allerdings waren keine weiteren SST-positiven Zelltypen nachweisbar, die für eine SST-Sezernierung in der Epidermis verantwortlich sein könnten. Mit dem spezifischen Marker Cytokeratin 20 (Moll et al., 1995) wurde eine Subpopulation der SST-positiven Zellen in der epidermalen Basalschicht eindeutig als Merkelzellen identifiziert. Merkelzellen kommen vereinzelt (abhängig von der Lokalisation etwa 20-300 Zellen/mm² Hautfläche) im *stratum basale* vor. Obwohl ihre genaue Funktion in der Epidermis noch weitgehend unbekannt ist, konnte durch die Charakterisierung von Merkelzell-defizienten Mäusen eine Rolle bei der Tastsinneswahrnehmung gezeigt werden (Maricich et al., 2009). Da in ihrem Zytoplasma elektronenmikroskopisch eine hohe Dichte von intrazellulären Vesikeln erkennbar ist, werden sie als neuroendokrine Zellen beschrieben. Definierte sekretionsauslösende Stimuli konnten noch nicht nachgewiesen werden, allerdings deuten morphologische und molekulare Untersuchungen darauf hin, dass Merkelzellen nach mechanischer oder elektrischer Stimulation sekretionsaktiv sind (Lumpkin et al., 2007). Zudem wurde die Expression von charakteristischen Proteinen, die an der Vesikelfreisetzung sowie der Hormon- und Neurotransmitterproduktion beteiligt sind, in Merkelzellen nachgewiesen (Haeberle et al., 2004). Als sekretierte Hormone kommen verschiedene Neuropeptide, wie etwa Neuropeptid Y, Neurokinin, VIP (Vasoaktives intestinales Peptid), CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), Galanin oder Substanz P in Frage, deren Expression durch Merkelzellen bestätigt wurde (Hartschuh et al., 1983; Fantini und Johansson, 1995; Cheng-Chew und Leung, 1996; Leung und Wong, 2000). Zusätzlich wurden immunhistologisch sporadisch Somatostatin-positive Merkelzellen in der Leistenhaut (haarlose Haut der Hand- und Fussflächen) nachgewiesen (Fantini et al., 1995). Die molekularbiologischen und immunhistologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen dies. Hierbei konnten auch in der Haut weiterer Körperregionen (der hauptsächlich vorkommenden, behaarten Felderhaut des Körpers) SST-positive Merkelzellen identifiziert werden. Im Gegensatz zu der berichteten sporadischen SST-Reaktivität konnte dabei auch eine SST-Expression in mehr als 50% aller identifizierten Merkelzellen bestätigt werden. Diese lokalen Unterschiede der SST-Expression deuten auf distinkte epidermale Merkelzellpopulationen in

verschiedenen Hautarealen hin. Die Existenz solcher unterschiedlichen Merkelzellpopulationen mit charakteristischen Proteinexpressionsmustern wurde zuvor bestätigt (Eispart et al., 2009).

Zusätzlich wurde Somatostatin in dendritischen Zellen nachgewiesen. Zu den dendritischen Zellen in der Epidermis gehören die suprabasal lokalisierten Langerhanszellen und die Melanozyten, die nur im *stratum basale* auftreten. Langerhanszellen sind antigenpräsentierende und sekretionsaktive Immunzellen (Lambert und Granstein, 1998; Torii et al., 1998). Diese Zellen sekretieren hauptsächlich Zytokine, aber auch verschiedene Neuropeptide (Staniek et al., 1995; Torii et al., 1997; Lambert et al., 2002). In dieser Arbeit wurden epidermale dendritische Zellen mit einem Antikörper gegen das S100-Protein identifiziert. Obwohl die S100-Reaktivität als zuverlässiger Marker für Langerhanszellen beschrieben ist (Cocchia et al., 1981; Modlin et al., 1984), wurde eine vereinzelte Reaktivität auch in Melanozyten dokumentiert. Allerdings konnte eine eindeutige Expression des S100-Proteins nur in Melanomzellen gezeigt werden, während diese in untransformierten Melanozyten nicht festzustellen war (Hachisuka et al., 1986). Ebenso waren mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper ausschließlich Einzelzellen in der suprabasalen Epidermis nachzuweisen. Demnach ist dieser ein spezifischer Marker für epidermale Langerhanszellen. Dies deckt sich mit früheren Arbeiten, in denen Langerhanszellen als mögliche SST-sezernierende Zellen beschrieben wurden (Gaudillere et al., 1997). Weitergehend wurde, vergleichbar zu Merkelzellen, in etwa 60% aller identifizierten dendritischen Zellen eine deutliche SST-Reaktivität festgestellt. Auch in Untersuchungen der Epidermis von Psoriasispatienten konnte eine abgrenzbare Subpopulation von SST-positiven dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Talme et al., 1997). Psoriasis (Schuppenflechte) zeichnet sich durch eine pathologisch erhöhte Keratinozytenproliferation und eine Störung der epidermalen Barriere aus. Verschiedene Neuropeptide können die Entwicklung der Psoriasis beeinflussen (Saraceno et al., 2006). Dementsprechend konnte ebenso eine vermehrte Anzahl SST-positiver Zellen in ausgeprägten Psoriasisläsionen festgestellt werden; diese Zahl wird aber während des Heilungsprozesses wieder reduziert (Talme et al., 1999). Ebenso sind die SST-Konzentrationen von Psoriasispatienten (gemessen im Serum) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht (Geisner et al., 2007). Die Korrelation der SST-Expression mit der Regression psoriatischer Läsionen lässt auf einen positiven Effekt des Somatostatins bei der Heilung schließen. Übereinstimmend wurde Somatostatin in mehreren Studien erfolgreich zur Therapie der Psoriasis eingesetzt (Weber et al., 1982; Venier et al., 1988).

Als nächster Schritt wurde die Expression der Somatostatinrezeptoren in humanem Hautgewebe charakterisiert. So konnten erstmalig die mRNAs aller fünf SSTR-Subtypen in isolierten Keratinozyten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird durch immunhistologischen Untersuchungen unterstützt, bei denen eine epidermale Immunreaktivität für alle SSTR-Subtypen

gezeigt werden konnte (Hagströmer et al., 2006). Dabei konnten sowohl in unterschiedlichen Hautschichten als auch in pathologisch veränderter Haut Expressionsunterschiede der einzelnen Subtypen beobachtet werden. So war in psoriatischer Epidermis im Vergleich zu gesunder Haut die Expression der Subtypen SSTR4 und SSTR5 erhöht (Hagströmer et al., 2006). Eine gleichzeitige Expression verschiedener SSTR-Subtypen wurde ebenfalls in anderen humanen Epithelien festgestellt. In einfachen Epithelien konnte eine Expression aller SSTR-Subtypen in der Niere (Bhandari et al., 2008), der Magenschleimhaut (Le Romancer et al., 1996) und im Darmepithel (Laws et al., 1997; Taniyama et al., 2005) gezeigt werden. In der Prostata sind alle Subtypen in unterschiedlichen Expressionsmustern vorhanden (Sinisi et al., 1997; Dizeyi et al., 2002). Im mehrschichtigen Hornhautepithel konnten zudem die Subtypen SSTR1 sowie SSTR2 nachgewiesen werden (Klisovic et al., 2001). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Somatostatin von neuroendokrinen Merkelzellen sowie dendritischen Langerhanszellen in der Epidermis gebildet wird, während die Somatostatinrezeptoren auf epidermalen Keratinozyten lokalisiert sind (Abb. 4-1).

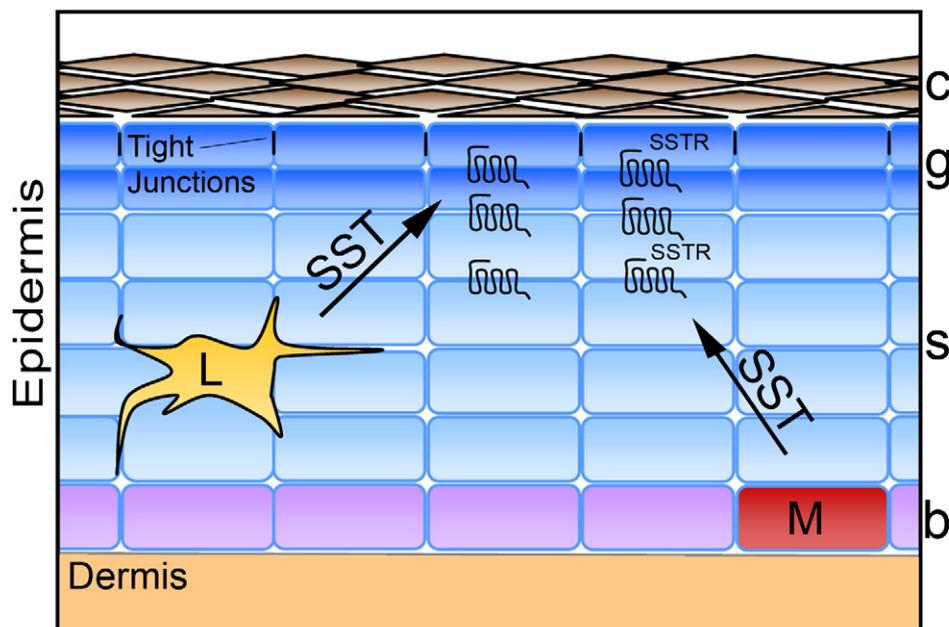


Abb. 4-1: Die Lokalisation des SST/SSTR-Systems in der humanen Epidermis

Dargestellt ist ein Modell der SST- sowie SSTR-Expression in der Epidermis. Dabei wird Somatostatin (SST) von Merkelzellen (M) sowie von dendritischen Langerhanszellen (L) synthetisiert und sezerniert. Die fünf Somatostatinrezeptor (SSTR)-Subtypen sind auf epidermalen Keratinozyten lokalisiert. Eine verstärkte Expression findet sich in terminal differenzierten Keratinozyten in der oberen Epidermis (nachgewiesen für SSTR3), dort sind auch Tight Junctions lokalisiert. Die epidermalen Zellschichten sind mit c (*stratum corneum*), g (*stratum granulosum*), s (*stratum spinosum*) und b (*stratum basale*) gekennzeichnet.

4.1 Die Funktion des epidermalen SSTR-Systems

Als weiterer Schritt wurde die Funktionalität der endogenen SST-Rezeptoren in primären Keratinozyten bestätigt. Nach Ligandenbindung an den Rezeptor werden heterotrimere G-Proteine aktiviert, diese bestehen aus der $G\alpha$ -Untereinheit, die GTPase-Aktivität besitzt, und dem $\beta\gamma$ -Komplex (Gilman, 1987). G-Proteine werden nach der gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit benannt, von denen vier Subfamilien ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$) bekannt sind, die unterschiedliche Signalwege aktivieren können (Simon et al., 1991). Der klassische Signalweg nach Aktivierung von G_i -Protein gekoppelten Rezeptoren ist die Inhibition der Adenylatzyklase. Die darauf folgende Modulation des cAMP-Spiegels ist ein zuverlässiger Nachweis für die SST-Rezeptoraktivierung in vielen Zellsystemen (Patel et al., 1994a; Csaba et al., 2001). Aus diesem Grund wurde dieser Signalweg zur Untersuchung der SSTR-Funktionalität gewählt. Die Funktionalität der einzelnen Subtypen in Keratinozyten wurde durch vier verschiedene rezeptorselektive SSTR-Agonisten bestätigt. Alle untersuchten SSTR-Subtypen in Keratinozyten sind an diesen Signalweg gekoppelt und senken damit den intrazellulären cAMP-Spiegel. In Keratinozyten wurde eine Beeinflussung des cAMP-Signalweges bereits durch andere GPCRs nachgewiesen (Orenberg et al., 1983; Haegerstrand et al., 1989; Takahashi et al., 1993). Zyklisches AMP ist als *second messenger* für die Regulation vieler wichtiger Funktionen von Keratinozyten verantwortlich. So wurde ein Einfluss von cAMP auf die epidermale Barriere festgestellt (Denda et al., 2004), wobei die Verringerung des intrazellulären cAMP die Barriereregeneration beschleunigt. Außerdem wurde beschrieben, dass eine geänderte cAMP-Synthese in der Epidermis einen Einfluss auf die Pathogenese von Psoriasis und atopischer Dermatitis haben kann (Voorhees et al., 1972; Reed et al., 1976). Zudem steuert cAMP die Proliferation (Green, 1978; Takahashi et al., 2004) und Migration (Iwasaki et al., 1994; Pullar und Isseroff, 2005) von Keratinozyten. Der cAMP-Signalweg kann auch längerfristig durch SST-Stimulation beeinflusst werden, da in Microarrayexperimenten ein Einfluss von SST auf die Expression unterschiedlicher Komponenten dieses Signalweges dokumentiert wurde. So könnte die SSTR-Aktivierung sowohl über die Adenylatzyklase als auch durch Transkriptionseffekte verschiedene cAMP-abhängige Prozesse regulieren.

4.1.1 Kontrolle der Barrierefunktion

Der Nachweis der epidermalen Lokalisation des Subtypes SSTR3 konnte weitere Hinweise auf mögliche zelluläre Funktionen geben. Der SSTR3 wurde am stärksten im *stratum granulosum* der Epidermis exprimiert. In dieser Schicht kolokalisieren alle bekannten Tight Junction-Proteine (Brandner et al., 2006b). Außerdem können dort elektronenmikroskopisch TJ-Strukturen identifiziert werden (Brandner et al., 2002). Im *stratum granulosum* der murinen Epidermis wurden

zudem funktionelle TJs, die eine abdichtende parazelluläre Barriere bilden, durch Diffusionsexperimente nachgewiesen (Furuse et al., 2002; Tunggal et al., 2005).

Weitergehend konnte eine direkte Interaktion des SSTR3 mit dem Adapterprotein MUPP1 gezeigt werden. Für MUPP1 wurde zuvor sowohl eine TJ-Lokalisation als auch eine Interaktion mit TJ-Strukturproteinen beschrieben (Hamazaki et al., 2002). Die erhaltenen Daten deuten deshalb darauf hin, dass der Rezeptor über die Interaktion mit MUPP1 in Tight Junctions von Keratinozyten rekrutiert wird. In epithelialen Zellsystemen konnte die Lokalisation des SSTR3 in TJs durch MUPP1 mittels Rezeptor-Deletionsmutanten (ohne MUPP1-interagierende Rezeptordomäne) bewiesen werden (Liew et al., 2009).

Die TJ-Rekrutierung des SSTR3 könnte so eine direkte Regulation von TJs durch heterotrimere G-Proteine erlauben. Die Lokalisation verschiedener α -Untereinheiten von G-Proteinen in epithelialen TJs wurde zuvor dokumentiert (Balda et al., 1991; de Almeida et al., 1994; Dodane und Kachar, 1996; Hamilton und Nathanson, 1997). Die verschiedenen identifizierten G-Proteine können nach Aktivierung die TJ-Bildung und Permeabilität regulieren; so beschleunigen $G\alpha_s$ (Saha et al., 2001), $G\alpha_o$ (Denker et al., 1996) und $G\alpha_i$ (Saha et al., 1998) den TJ-Aufbau, während $G\alpha_{12}$ (Sabath et al., 2008) und $G\alpha_{13}$ (Donato et al., 2009) diesen inhibieren. Die TJ-Lokalisation der G-Proteine kann auch durch eine direkte Interaktion mit TJ-Proteinen vermittelt werden, beispielsweise bindet $G\alpha_{12}$ an ZO-1 (Meyer et al., 2002) und reguliert dadurch die TJ-Permeabilität (Meyer et al., 2003). Eine Lokalisation von $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren in apikalen Zell-Zellverbindungen und ein essentieller Einfluss dieser Rezeptoren bei der Barrierebildung konnte zuvor in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden (Bainton et al., 2005; Schwabe et al., 2005). Die Lokalisation G_q -gekoppelter Rezeptoren (M3R und CCKR) in epithelialen Tight Junctions wurde in pankreatischen Azinuszellen beobachtet (Shin et al., 2001). Außerdem wurde eine Assoziation mit TJ-Proteinen für viele weitere Rezeptoren (wie G-Protein gekoppelte Glutamaterezeptoren) oder Signalproteine (wie MAP-Kinasen und GTPase-Regulatoren) durch biochemische Aufreinigungen bestätigt (Tang, 2006).

In dieser Arbeit wurde ein SST-abhängiger Effekt auf die TJ-Proteinexpression und die TJ-Funktionalität von konfluenten Keratinozyten gezeigt. Nach SST-Stimulation wird die transepitheliale Barriere dieser Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden verstärkt. Eine Regulation der TJ-Barriere durch SST wurde erstmals in epithelialen MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-Zellen nachgewiesen (Liew et al., 2009). Eine ähnliche Barriereverstärkung konnte auch in Korneozyten der okularen Hornhaut nach einer Stimulation mit dem Neuropeptid Substanz P gezeigt werden (Ko et al., 2009). Dabei wurde nach Stimulation eine erhöhte Expression des zytoplasmatischen TJ-Proteins ZO-1 beobachtet, die Expression oder subzelluläre Lokalisation

des beteiligten G-Protein gekoppelten Rezeptors wurde aber nicht untersucht. Der Serotoninrezeptor 5HT7R kann ebenfalls die TJ-Barriere des Brustdrüsenepithels regulieren, auch dies wird durch Änderungen der ZO-1-Expression erreicht (Stull et al., 2007; Pai und Horseman, 2008). Eine ähnliche Regulation von TJs wäre ebenfalls für andere MUPP1-interagierende GPCRs wie den Serotoninrezeptor 5HT2CR (Becamel et al., 2001) oder den Melatoninrezeptor MT1R (Guillaume et al., 2008) denkbar.

Die beobachtete erhöhte Barrierefunktion nach SST-Stimulation lässt eine Regulation durch das beschriebene SSTR3/MUPP1-System in Keratinozyten vermuten. Zusätzlich kommt es zu einer Zunahme der Expression des TJ-Strukturproteins Claudin-4; dies könnte ebenfalls für die verstärkte Barriere verantwortlich sein. SST-Rezeptoren können über vielfältige Signalwege die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und dadurch die Genexpression beeinflussen (Lahlou et al., 2004). Für Claudin-4 konnte zuvor ein Einfluss auf die TJ-Permeabilität in verschiedenen Epithelzelllinien und in Keratinozyten nachgewiesen werden. In MDCK-Zellen senkt eine Claudin-4-Überexpression selektiv die parazelluläre Permeabilität und führt so zu einer erhöhten transepithelialen Barriere (Van Itallie et al., 2001). In IMCD3 (*inner medullary collecting duct*)-Zellen führt eine Erhöhung der Osmolarität zu einer Zunahme von Claudin-4 und einer gleichzeitigen Zunahme von MUPP1, daraus resultiert ebenfalls eine Barriereverstärkung (Lanaspa et al., 2008). In diesen Nierenepithelzellen ist zudem MUPP1 für die korrekte TJ-Lokalisation von Claudin-4 verantwortlich. Claudin-4 ist außerdem in Lungenepithelzellen für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion verantwortlich und reguliert die Lungenpermeabilität *in vivo* (Wray et al., 2009). In humanen Keratinozyten nimmt die Claudin-4-Expression während der Differenzierung und TJ-Bildung deutlich zu (Yuki et al., 2007). Zudem bewirkt der selektive Abbau von Claudin-4 durch Ochratoxin-A eine deutliche Erhöhung der transepithelialen Permeabilität (Yuki et al., 2007). Da gleichzeitig andere Membranproteine (wie Claudin-1, Occludin oder Cadherin) unverändert bleiben, kann dadurch der wichtige Einfluss von Claudin-4 auf die Barrierefunktion von Keratinozyten belegt werden. Interessanterweise ist auch in vielen Tumoren eine verstärkte Expression von Claudin-4 nachweisbar (Oliveira und Morgado-Diaz, 2007), beispielsweise in Prostata-, Brust- oder Hauttumoren (Morita et al., 2004; Landers et al., 2008; Kulka et al., 2009). Obwohl dieses Claudin als ein Marker für aggressive Tumore beschrieben ist, kann die erhöhte Claudin-4-Expression auf Grund der Barriereverstärkung die Invasivität mancher Tumore verringern und korreliert mit einer Prognoseverbesserung (Michl et al., 2003; Ohtani et al., 2009).

Die Änderung der TJ-Permeabilität und TJ-Struktur kann neben der Expressionsregulation auch durch eine kurzfristige Änderung der Proteinverteilung geschehen. TJs sind hochdynamische Strukturen mit wechselnder molekularer Zusammensetzung (Shen et al., 2008). Da Claudin-4 an MUPP1 bindet (Lanaspa et al., 2008), könnte nach Rezeptorrekrutierung von MUPP1 die

Lokalisation von Claudin-4 beeinflusst werden. Zusätzlich können GPCR-gebundene PDZ-Proteine neben ihrer passiven Adapterfunktion auch die Signaltransduktion dynamisch regulieren (Milligan et al., 2001; Mishra et al., 2007). Zudem ist eine kurzfristige TJ-Regulation durch Rho-GTPasen (wie Rac1) möglich (Jou et al., 1998; Hopkins et al., 2000; Mertens et al., 2005).

Die in Hautbiopsien beobachtete epidermale Lokalisation des SSTR3 lässt eine positive Regulation der TJ-Barriere, vergleichbar mit den *in vitro*-Ergebnissen in Keratinozyten, auch in der humanen Epidermis vermuten. Dabei wäre ebenfalls ein Einfluss von Claudin-4 denkbar, da dieses Claudin spezifisch in *stratum granulosum* exprimiert wird (Brandner et al., 2006b) und so eine wesentliche Rolle bei der TJ-Regulation wahrscheinlich ist. Dabei ist allerdings zu beachten, dass eine Funktionalität von TJs in der humanen Epidermis noch nicht eindeutig bewiesen werden konnte (Brandner, 2009). Es gibt aber mehrere Hinweise auf eine essentielle Funktion von TJs in der Epidermis. So bewirken Mutationen im humanen Claudin-1-Gen neben Entzündungen des Gallengangepithels in der Leber auch einen Hautphänotyp (Ichtyosis) (Hadj-Rabia et al., 2004). Außerdem ist bei Krankheiten mit veränderter Barriere (wie Psoriasis) die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen deutlich verändert (Yoshida et al., 2001; Peltonen et al., 2007; Watson et al., 2007). Zudem entwickeln sich TJ-Strukturen während der epidermalen Reepithelialisierung, bevor ein funktionelles *stratum corneum* ausgebildet wird (Brandner et al., 2002). Demnach könnten TJs besonders die Barrierefunktion in der regenerierenden Haut gewährleisten.

4.1.2 Kontrolle der Proliferation

Da die Proliferation und Migration von Keratinozyten von essentieller Bedeutung für die Epidermisregeneration nach einer Verwundung sind, wurde der Einfluss von Somatostatin auf diese Prozesse untersucht. SST wirkt als starker Inhibitor der Proliferation in verschiedenen Zellsystemen (Lehy et al., 1979; Chou et al., 1987; Bousquet et al., 2001). Ein antiproliferativer Effekt von SST und verschiedenen SST-Analoga wurde insbesondere für Tumorzellen beschrieben (Pan et al., 1992; Weckbecker et al., 1992; Keri et al., 1996), so auch für verschiedene Plattenepithelkarzinome (Nagy et al., 1998; Tejada et al., 2006). Ein Einfluss von SST auf die Proliferation von Keratinozyten wurde zuvor aber noch nicht untersucht. Für andere Hormone konnte dagegen eine Regulation der Keratinozytenproliferation gezeigt werden; so induziert VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*) die Proliferation von humanen Keratinozyten (Haegerstrand et al., 1989; Granoth et al., 2000) und Serotonin und Substanz P stimulieren die Proliferation von murinen Keratinozyten (Paus et al., 1995; Maurer et al., 1997).

In dieser Arbeit konnte eine spezifische Inhibition der Proliferation von humanen Keratinozyten durch SST und einen SSTR5/1-selektiven Agonisten gezeigt werden. Wahrscheinlich wird dieser Effekt durch den Subtyp SSTR5 vermittelt, da für diesen zuvor eine spezifische Proliferationsinhibition beschrieben wurde (Cordelier et al., 1997). Zudem besitzt der verwendete Agonist sst5/1 eine achtfach erhöhte Affinität für SSTR5 gegenüber SSTR1 (Rohrer et al., 1998). Ebenfalls konnten antiproliferative Eigenschaften von SSTR5 (und SSTR2) durch Stimulation in CHO (*chinese hamster ovary*)- Zellen gezeigt werden (Buscaïl et al., 1995). Es ist auch eine synergistische Wirkung von SSTR5 und SSTR1 denkbar, wie für die Rezeptoren SSTR1/2/5 in Gliomzellen gezeigt wurde (Barbieri et al., 2008). Auch *in vivo*- Daten sprechen dafür, dass antiproliferative Signale hauptsächlich durch den SSTR5 vermittelt werden. So ist der SSTR5 der einzige Subtyp, für den eine humane Mutation identifiziert werden konnte, die sich auf die SSTR-Signalweiterleitung auswirkt (Lania et al., 2008). Die Mutation befindet sich in der intrazellulären Region ICL3 innerhalb einer Konsensussequenz, die für die Kopplung an G-Proteine verantwortlich ist. Tumorpatienten mit Akromegalie, die diese SSTR5-Mutation tragen, sind resistent gegen eine Octreotidbehandlung, dies wird vor allem dem Verlust der antiproliferativen Wirkung des SSTR5 zugeschrieben (Ballare et al., 2001). Die Octreotidstimulation führt in solchen SSTR5-mutierten Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen sogar zu einer gesteigerten Zellproliferation. Dies belegt, neben der Bedeutung der Proliferationsinhibition bei der SST-Therapie der Akromegalie, dass der Subtyp SSTR5 die Hemmung des Zellwachstums vermittelt.

Die Regulation der Proliferation wird insbesondere durch MAP-Kinasen vermittelt (Chang und Karin, 2001). Auch nach SSTR-Aktivierung wird der antiproliferative Effekt durch eine Inhibition der MAPK-Aktivität ausgelöst (Bousquet et al., 2004). Bei der SSTR5-spezifischen Proliferationsinhibition konnte ebenfalls eine deutliche MAPK-Inaktivierung in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden (Cordelier et al., 1997; Cattaneo et al., 2000; Barbieri et al., 2008). Übereinstimmend konnte in Keratinozyten eine spezifische MAPK-Inhibition mit dem SSTR5/1-spezifischen Agonisten nachgewiesen werden. Die langfristige MAPK-Inhibition wird wahrscheinlich zusätzlich durch SST-aktivierte Tyrosinphosphatasen vermittelt, die durch Dephosphorylierungsreaktionen MAP-Kinasen inaktivieren (Florio, 2008).

4.1.3 Kontrolle der Migration

Die Stimulation von Keratinozyten mit SST führt zu einer signifikanten Inhibition der Zellmigration. Dieser antimigratorische Effekt wird durch alle fünf SSTR-Subtypen vermittelt. Eine solche Kontrolle der Zellmigration ist für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben (Cotton und Claing, 2009). In diesen Fällen werden nach GPCR-Aktivierung das

Aktinzytoskelett und damit die Zellausbreitung beeinflusst; die zentralen Regulatoren der Aktinreorganisation sind dabei GTPasen der Rho-Familie. Die Migration wird in Keratinozyten ebenfalls durch diverse GPCRs reguliert, z.B. durch den P2Y2-Nukleotidrezeptor (Taboubi et al., 2007). Dieser Rezeptor aktiviert $G\alpha_q$ -Untereinheiten und verzögert daraufhin die Lamellipodienbildung und inhibiert die Reepithelialisierung *in vitro*. Dabei wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Rezeptors die Aktindynamik ändert und über eine verringerte Lamellipodiengröße und Zellausbreitung zu einer verlangsamten Migration führt (Taboubi et al., 2007). Der muskarinische Acetylcholinrezeptor M3R inhibiert ebenfalls die Migration von Keratinozyten (Chernyavsky et al., 2004). Dabei werden ebenso $G\alpha_q$ -Untereinheiten aktiviert, dies beeinflusst Rho-GTPasen sowie die Integrinexpression. Dem entsprechend führt die Inaktivierung des M3R durch selektive Antagonisten oder RNA-Interferenz zu einer erhöhten Zellmigration. Auch adrenerge Rezeptoren (wie der β_2 -Adrenalinrezeptor) inhibieren die Keratinozytenmigration *in vitro* und *in vivo* (Pullar et al., 2008). Die Inhibition der Migration durch den Adrenalinrezeptor wird durch $G\alpha_s$ -Untereinheiten ausgelöst; die Aktinreorganisation wird dabei aber durch eine Inhibition von MAP-Kinasen reguliert (Chen et al., 2002).

Die selektive Aktivierung einzelner SSTR-Subtypen führte zu vergleichbaren Effekten auf die Zellmigration; im Gegensatz zur Proliferationsinhibition wurden keine subtypspezifischen Effekte beobachtet. Ähnliche Untersuchungen der Migration von Neuroblastom- bzw. Gliomzelllinien zeigten ebenfalls eine identische Inhibition der Migration durch selektive Agonisten für die Subtypen SSTR1, SSTR2 und SSTR5 wie durch Stimulation mit nicht-selektivem SST (Pola et al., 2003; Cattaneo et al., 2006).

Durch Untersuchungen des Aktinzytoskeletts konnte hier ein deutlicher Einfluss von SST auf die Lamellipodienausbreitung in frühen Phasen der Migration gezeigt werden. Dabei ist nur in Zellen am Wundrand eine deutliche Lamellipodienausbreitung sichtbar. Es konnte durch *in vitro*-Migrationsexperimente zuvor gezeigt werden, dass auch weit von der Wunde entfernte Zellen Lamellipodien ausbilden und aktiv migrieren (Farooqui und Fenteany, 2005). Dies führt zu einer kollektiven Bewegung des Epithels nach der Verwundung (Poujade et al., 2007). Dieser epitheliale Wundverschluss ist Rac1-abhängig (Fenteany et al., 2000). Interessanterweise konnte eine gleichzeitige, kollektive Zellbewegung auch bei der Wundheilung von mehrschichtigen Epithelien *in vivo* gezeigt werden (Zhao et al., 2003).

Nach der SSTR-Aktivierung wurde eine verringerte Aktivität der GTPase Rac1 in Keratinozyten bestätigt. Die Inaktivierung von Rac1 kann zu einer verringerten Aktindynamik und verlangsamten Migration führen (Ridley, 2001). Die beobachtete Regulation der Rac1-Aktivität nach SSTR-Aktivierung könnte dabei durch unterschiedliche Signalwege erreicht werden. Es ist

bekannt, dass GPCRs nach Ligandenbindung die Aktivität von Rho-GTPasen modulieren können (Bhattacharya et al., 2004). Dies geschieht häufig über eine direkte Interaktion von G-Proteinuntereinheiten mit RhoGEFs und einer darauf folgenden Regulation von Rho-GTPase-Aktivität (Seasholtz et al., 1999). GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) katalysieren den GDP/GTP-Austausch von GTPasen und aktivieren diese dadurch (Rossman et al., 2005). Dementsprechend würde eine Inhibition von GEFs zu einer Abnahme der GTPase-Aktivität führen.

Beschriebene RhoGEF-interagierende G-Proteinuntereinheiten sind $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$ oder $G\beta\gamma$ -Dimere (Harhammer et al., 1996; Hart et al., 1998; Suzuki et al., 2003; Lutz et al., 2005). Diese G-Proteinuntereinheiten können ebenfalls durch Somatostatinrezeptoren aktiviert werden (Cervia et al., 2007). Der Einfluss dieser Untereinheiten auf das Aktinzytoskelett wurde außerdem mit konstitutiv aktiven Mutanten untersucht, alle genannten G-Proteinuntereinheiten führen zu einer Rho-GTPase-vermittelten Aktinreorganisation (Buhl et al., 1995; Ueda et al., 2000; Dutt et al., 2002). Ebenso ist eine direkte Beeinflussung der Zellmigration durch diese G-Proteinuntereinheiten nachgewiesen worden (Shan et al., 2006; Ghosh et al., 2008).

Zudem sind verschiedene $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren bekannt, die nach Aktivierung spezifisch die Rac1-Aktivität modulieren können. Dies sind z.B. LPA-, Endothelin-1-, oder Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptoren (Okamoto et al., 2000; Yamauchi et al., 2002; Van Leeuwen et al., 2003). Während LPA Rac1 und damit die Zellmigration aktiviert, kann das Phospholipid S1P sowohl die Migration aktivieren als auch (über den Rezeptor S1PR2) inhibieren (Takuwa, 2002). Bei der S1P-vermittelten Rac1-Inhibition können sowohl $G\alpha_i$ - als auch $G\alpha_{12/13}$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheiten beteiligt sein (Sugimoto et al., 2003; Takashima et al., 2008).

Ein weiterer Signalweg, der die Inhibition von Rac1 vermitteln könnte, wäre die Interaktion von $G\alpha$ -Untereinheiten mit RhoGAPs. GAPs (*GTPase-activating proteins*) überführen G-Proteine in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand durch Beschleunigung der Nukleotidhydrolyse (Bernards und Settleman, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten die Zellmigration inhibieren, indem sie den Regulator p190-RhoGAP aktivieren (Bartolome et al., 2008). p190-RhoGAP besitzt GAP-Aktivität für RhoA, aber auch für Rac1 (Ridley et al., 1993; Zhang et al., 1998). Eine Stimulation der GAP-Aktivität und resultierende Verminderung der GTPase-Aktivität durch aktive $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten wurde auch für Rap1GAP nachgewiesen (Jordan et al., 1999; Mochizuki et al., 1999). Dieses GAP erniedrigt nach Aktivierung die Rac1-Aktivität und inhibiert die Zellmigration (Tsygankova et al., 2007; Takahashi et al., 2008).

Zusätzlich zu α -Untereinheiten von G-Proteinen können auch $\beta\gamma$ -Dimere die Signalwege von GPCRs und Rho-GTPasen vernetzen (Smrcka, 2008). Interessanterweise ist dabei eine direkte

Interaktion von $\beta\gamma$ -Untereinheiten (isoliert aus G_i -Proteinen) mit Rac1 beschrieben, wodurch die Rac1-Aktivität verringert wird (Harhammer et al., 1996). Dabei wird eine spezifische RacGAP-Aktivität dieser $G\beta\gamma$ -Dimeren vermutet (Seasholtz et al., 1999). Ein alternativer Signalweg zur Inhibierung der Rac1-Aktivität durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten wäre ebenfalls die Interaktion mit GEFs. So wurde eine Regulation Rac1-spezifischer GEFs durch $G\beta\gamma$ -Dimere zuvor beschrieben (Kiyono et al., 1999; Welch et al., 2002; Niu et al., 2003; Ueda et al., 2008).

Schließlich wäre auch eine G-Protein-unabhängige Inaktivierung von Rac1 nach SST-Stimulation denkbar. Viele GEFs (z.B. Tiam1, β Pix, p63RhoGEF, Kalirin) besitzen PDZ-Bindemotive an ihrem C-Terminus, mit denen sie mit Adapterproteinen interagieren können (Garcia-Mata und Burridge, 2007). Über eine Interaktion mit rezeptorassoziierten Gerüstproteinen, wie z.B. MUPP1, kann zudem deren GEF-Aktivität reguliert werden (Penzes et al., 2001; Estevez et al., 2008).

4.1.4 Kontrolle der epidermalen Wundheilung

Da SST sowohl die Proliferation als auch die Migration von Keratinozyten reguliert, wurde der Einfluss von SST auf die epidermale Reepithelialisierung in einem *ex vivo*-Wundmodell untersucht. In diesem dreidimensionalen Modell finden sich alle hautspezifischen Zelltypen in ihrer physiologischen Umgebung, wodurch eine funktionelle Untersuchung des Heilungsprozesses ermöglicht wird (Brandner et al., 2006a). Außerdem kann die Wundheilung in den verwendeten Gewebeproben aus Schweinehaut über mehrere Tage verfolgt werden. Da Schweinehaut anatomisch und physiologisch mit humaner Haut vergleichbar ist, stellt diese ein gutes Modellsystem dar. So entspricht sich die Haut beider Organismen in ihrer Epidermisdicke und -struktur, der Erneuerungsdauer, ihrem Haarwuchszyklus sowie Gefäß- und Haarverteilung (Vardaxis et al., 1997). Des Weiteren ist der Mechanismus der Reepithelialisierung nach einer Verwundung ähnlich, so dass funktionelle Untersuchungen zur Wundheilung der Schweinehaut auf den Menschen übertragbar sind (Sullivan et al., 2001). Mit Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist zudem das hormonelle System zwischen Schwein und Mensch stark konserviert (Holmgren und Jensen, 2001). Ebenso ist das endogene SST des Schweins vollständig identisch mit humanem SST (Schally et al., 1976) und wird in der Schweinehaut exprimiert (O'Shaughnessy et al., 1983). Auch die Rezeptorstruktur und Proteinsequenz der verschiedenen SST-Rezeptorsubtypen sind in beiden Organismen hochkonserviert (Matsumoto et al., 1994).

Die Applikation von SST auf die beschriebenen *ex vivo*-Wundmodelle führte zu einer deutlichen Inhibition der Reepithelialisierung und damit zu einer verzögerten Wundheilung. Dies kann

durch die antiproliferativen und antimigratorischen Wirkungen von SST auf epidermale Keratinozyten erklärt werden. Dieses Ergebnis wird zudem durch *in vivo*-Wundheilungsversuche in Ratten unterstützt. Dabei verschlechtert das SST-Analogon Octreotid ebenfalls signifikant die Wundheilung (Waddell et al., 1997). Dazu wurde die Wundstärke nach einer Verwundung und darauf folgender regelmäßiger subkutaner Octreotidinjektion bestimmt; dies geschah durch die Messung der Zugfestigkeit der verheilten Wunden. Octreotid besitzt eine starke Affinität für die Subtypen SSTR2, SSTR3 sowie SSTR5 und wurde in ähnlichen Konzentrationen verwendet, die auch in humanen Therapien eingesetzt werden. Dabei war die Wundstärke nach siebentägiger Heilung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe signifikant vermindert. Die Inhibition durch Octreotid war zudem vergleichbar mit einer Cortisolbehandlung, deren negativer Einfluss auf die Wundheilung belegt ist (Werner et al., 2003).

Andere epidermal sezernierte Neuropeptide und Hormone können ebenfalls einen Einfluss auf die Wundheilung haben (Brain, 1997). Diese bewirken die Modulation der Wundheilungsprozesse gleichermaßen durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. So beschleunigen die Peptide Substanz P und CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) die Wundheilung der Ratte (Benrath et al., 1995; Khalil und Helme, 1996; Toda et al., 2008). GRP (*gastrin-releasing peptide*) verbessert die Wundheilung der Schweinehaut *in vivo* durch eine erhöhte Keratinozytenproliferation- und Migration (Yamaguchi et al., 2002). Die Aktivierung des LPA-Rezeptors beschleunigt ebenfalls die Keratinozytenmigration und damit die epidermale Wundheilung in Mäusen (Demoyer et al., 2000; Balazs et al., 2001). Die Stimulation von β 2-Adrenalinrezeptoren durch Adrenalin verzögert dagegen die Reepithelialisierung während der Wundheilung (Pullar et al., 2006a). Dementsprechend können β 2AR-Antagonisten die Wundheilung verbessern (Pullar et al., 2006b). Außerdem wurde ein Anstieg der lokale Synthese von Adrenalin in der humanen Epidermis nach einer Verwundung festgestellt (Sivamani et al., 2009). Auch eine Zunahme der Migration durch Acetylcholinrezeptoren (Chernyavsky et al., 2004) oder der Proliferation durch Nukleotidrezeptoren (Braun et al., 2006) kann die *in vivo*-Wundheilung positiv beeinflussen. Die Wundheilung wurde auch in GPCR-defizienten Mausmodellen untersucht; so führt die Deletion des Neuropeptid Y-Rezeptors zu einer verzögerter Wundheilung der murinen Haut und Kornea (Ekstrand et al., 2003). In weiteren Mausmodellen inhibiert die Deletion von Opioid- (Bigliardi-Qi et al., 2006), Angiotensin- (Yahata et al., 2006) oder Chemokinrezeptoren (Yates et al., 2009) ebenfalls die epidermale Wundheilung.

Die in dieser Arbeit identifizierten Signalwege könnten durch ihren Einfluss auf die Proliferation und Migration ebenfalls die Wundheilung modulieren. Verschiedene Studien zeigen, dass die Reepithelialisierung durch eine Rac1- bzw. MAPK-Regulation in der regenerierenden Epidermis gesteuert wird. So führt die Rac1-Inhibition in transgenen Mäusen zu einer verzögerten

epidermalen Wundheilung (Tschardt et al., 2007). Dabei können die starken Beeinträchtigungen der Reepithelialisierung sowohl durch eine Rac1-Inhibition mittels einer epidermisspezifischer Expression von dominant-negativem Rac1 als auch eine epidermale Rac1-Deletion mittels eines konditionalen Rac1-*knock outs* ausgelöst werden. In primären Keratinozyten dieser Tiere ist auch eine deutlich verzögerte Lamellipodienausbildung nachweisbar (Tschardt et al., 2007). In den Zellen verringert die Rac1-Deletion außer der Migration auch die Zellproliferation. Deshalb wurde eine duale Funktion von Rac1 bei der epidermalen Regeneration postuliert (DiPersio, 2007). In der Dermis hat Rac1 ebenfalls einen wichtigen Effekt während der Wundheilung. So bewirkt eine fibroblastenspezifische Rac1-Deletion in Mäusen eine verzögerte Wundheilung *in vivo* (Liu et al., 2009). Primäre Fibroblasten dieser Rac1-defizienten Tiere zeigen ebenso eine verringerte Zellausbreitung und Migration. Zudem wird die verstärkte Proliferation der Keratinozyten während der Reepithelialisierung der Wunde durch MAP-Kinasen reguliert (Pullar et al., 2006a; Tschardt et al., 2007; Satoh et al., 2009). Der MAPK-Signalweg kann auch die Keratinozytenmigration bei der epidermalen Wundheilung beeinflussen (Li et al., 2001; Deng et al., 2006; Arnoux et al., 2008).

Die physiologische Rolle von SST während der Wundheilung könnte in der Regulation der massiven Erhöhung der Keratinozytenaktivität liegen. Eine solche limitierende Funktion von SST wurde auch während der Hirnentwicklung nachgewiesen. Dort stoppt SST die neuronale Migration *in vivo* in späten Phasen der Entwicklung und steuert so die lokale Zielfindung von Neuronen (Yacubova et al., 2002). Es gibt erste Hinweise, dass die epidermale SST-Konzentration direkt nach einer Verwundung verringert ist (Senapati et al., 1986). Dies korreliert zeitlich mit der verstärkten Proliferation und Migration zu Beginn der Heilung. Durch die Zunahme von SST in späteren Phasen könnte der stark proliferative und motile Phänotyp von Keratinozyten inaktiviert werden. Es sind zwar viele aktivierende Signale während der epidermalen Wundheilung beschrieben (wie Wachstumsfaktoren), der Einfluss von limitierenden Faktoren ist dagegen noch weitgehend unbekannt (Martin, 1997; Barrientos et al., 2008). Die Homöostase des Reparaturprozesses über negative Regulatoren ist aber wichtig, um die fundamentalen Änderungen der Keratinozytenaktivität nach einer Verwundung zu kontrollieren. Eine unkontrollierte Proliferation und Migration kann zur Tumorbildung führen (Schäfer und Werner, 2008). So könnte endogenes SST eine wichtige Rolle bei der Limitierung von Wundmechanismen nach vollendeter Heilung spielen.

4.1.5 Pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktion von Keratinozyten

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass lokal sezerniertes Somatostatin intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen von Keratinozyten aktivieren und dadurch diverse epidermale Funktionen regulieren kann (Abb. 4-2). Die von Somatostatinrezeptoren aktivierten Signalwege in Keratinozyten könnten durch spezifische Agonisten moduliert werden und so selektive Wirkungen in der Epidermis auslösen. Da durch selektive SSTR-Agonisten Effekte einzelner Subtypen ausgelöst werden (Schonbrunn, 2008), erlaubt der Nachweis subtypspezifischer Effekte dabei eine gezielte pharmakologische Beeinflussung von pathologischen Hautveränderungen.

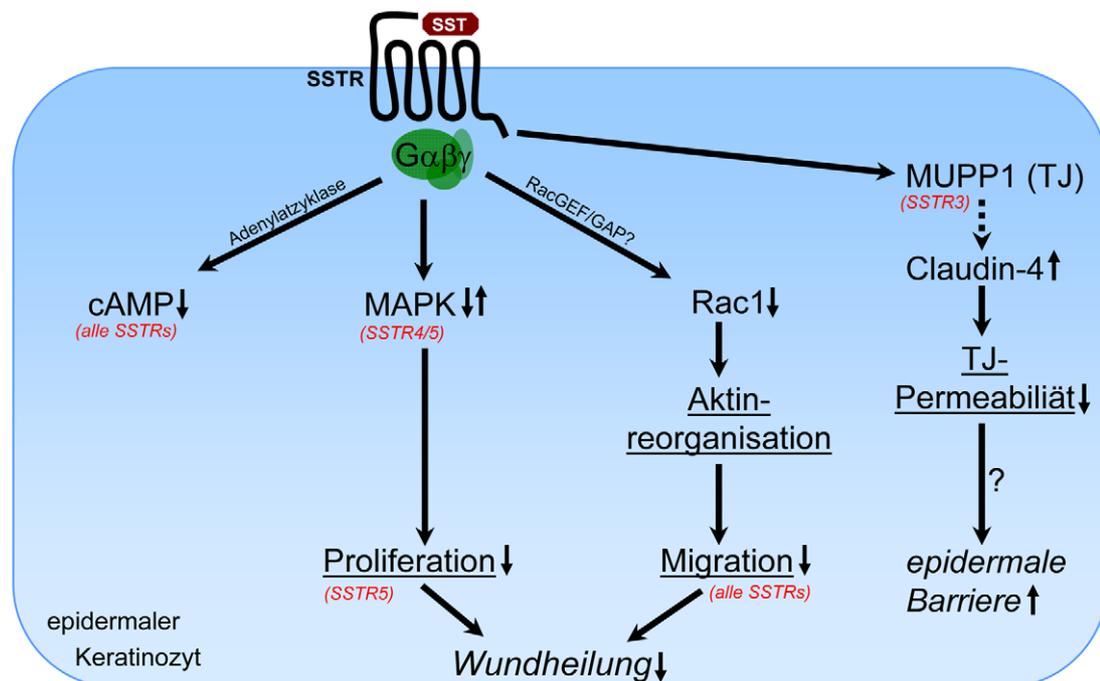


Abb. 4-2: Die Funktionen der Somatostatinrezeptoren in epidermalen Keratinozyten

Gezeigt sind das Modell der intrazellulären Signalwege nach SST-Rezeptoraktivierung und der selektive Einfluss einzelner Rezeptorsubtypen in Keratinozyten. Nach Bindung von SST an die Rezeptoren werden heterotrimere G-Proteine ($G\alpha\beta\gamma$) aktiviert. Dies verringert die Menge des *second messengers* cAMP und beeinflusst die Aktivität von MAP-Kinasen und der GTPase Rac1. Dabei führt die langfristige MAPK-Inaktivierung zur Inhibition der Keratinozytenproliferation. Die Abnahme der Rac1-Aktivität bedingt eine Verzögerung der aktinabhängigen Zellausbreitung und damit eine Verringerung der Keratinozytenmigration. Sowohl Proliferations- als auch Migrationsinhibition führen zu einer Verzögerung der epidermalen Wundheilung. Einzelne Rezeptorsubtypen können zudem über die Proteininteraktion mit MUPP1 in Tight Junctions (TJ) lokalisiert werden, wodurch auch G-Protein-unabhängige Signalwege aktiviert werden können. Nach Rezeptoraktivierung wird außerdem die Claudin-4-Expression erhöht, dadurch wird die parazelluläre Permeabilität verringert und die Barriere von Keratinozyten verstärkt. Dies könnte weitergehend zu einer positiven Regulation der Barrierefunktion der Epidermis führen.

Weitere Vorteile des spezifischen Ansprechens von SST-Rezeptoren sind darüber hinaus die geringen Nebenwirkungen im Vergleich zu anderen GPCR-Agonisten, da trotz ubiquitärer Expression des SST-Systems kaum Beeinflussungen weiterer physiologischer Funktionen (außer den gewünschten Wirkungen in den Zielgeweben) auftreten (Berelowitz, 1995; Urban et al.,

2007). Zur Behandlung von Hautkrankheiten ist eine topische Applikation von SST sinnvoll. Mit geeigneten Penetrationsverstärkern ist sogar eine Passage von Somatostatin durch die Haut in subkutanes Gewebe möglich (Weber et al., 1987). Durch TJ-Permeabilitätsmodulatoren kann zusätzlich die Diffusion von Therapeutika in der Epidermis verbessert werden (Brandner, 2009), demnach könnte dies auch für SST oder niedermolekulare SST-Analoga zutreffen.

Somatostatin wurde zuvor erfolgreich bei der Behandlung der Psoriasis eingesetzt (Weber et al., 1982; Venier et al., 1988). Dabei konnte bei bis zu 80% der Patienten eine Verbesserung der charakteristischen Hauterscheinungen sowie von arthritischen Gelenksbeschwerden erreicht werden. Entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit könnte eine SSTR-Aktivierung in psoriatischer Epidermis dabei sowohl die pathologisch erhöhte Keratinozytenproliferation als auch die Störung der epidermalen Barriere positiv beeinflussen. Außerdem werden die Änderungen des Keratinozytenstatus häufig durch Entzündungsreaktionen ausgelöst. Diese könnten zusätzlich durch die antiinflammatorischen Wirkungen von SST (Karalis et al., 1994) begrenzt werden. Da die Psoriasispathogenese zudem hormonell gesteuert wird, könnte SST auch hierbei einen limitierenden Effekt haben. Es konnte gezeigt werden, dass eine SST-Behandlung die pathologischen Wachstumsfaktorkonzentrationen auf normale Werte erniedrigt und dadurch die Abheilung von psoriatischen Läsionen verbessert (Ghirlanda et al., 1983). Ein Einfluss von SST auf epidermale Pathomechanismen sowie eine Verbesserung nach SST-Behandlung wurde auch für andere Hauterkrankungen (atopische Dermatitis, Rosacea sowie nekrolytisches migratorisches Erythem) beschrieben (Sohier et al., 1980; Pincelli et al., 1990; Pierard-Franchimont et al., 2003).

Die antiproliferativen und antimigratorischen Funktionen von SST eröffnen zudem die Möglichkeit einer therapeutischen Modulation der Wundheilung. Da SST die Wundheilung negativ reguliert, könnte dementsprechend ein Einsatz von SSTR-Antagonisten zu einer Verbesserung der Reepithelialisierung führen. Dadurch wäre auch eine pharmakologische Therapie von chronischen Wunden möglich. Vergleichbar ist eine verminderte Konzentration stimulatorischer Neuropeptide für die verlangsamte Wundheilung in diabetischen Wunden verantwortlich (Gibran et al., 2002). Seit längerem werden verschiedene Neuropeptide, die die Entstehung chronischer Wunden beeinflussen können, als Therapeutika diskutiert (Falanga et al., 1995). Eine weitere Komplikation der Wundheilung ist die Entstehung von hypertrophen Wunden (wie Narben oder Keloiden). Die limitierenden Wirkungen von SST könnten dabei die Ausbildung von hypertrophen Narben verhindern. Die Rolle verschiedener Neuropeptide bei der Pathogenese hypertrophen Wunden ist ebenfalls beschrieben (Scott et al., 2007). In Untersuchungen von hypertrophen Wundgewebe konnten zuvor Konzentrationsänderungen verschiedener Neuropeptide gezeigt werden (Parkhouse et al., 1992; Crowe et al., 1994). Obwohl

die Narbenbildung hauptsächlich ein dermaler Effekt ist, der durch eine Hyperproliferation von Fibroblasten sowie eine erhöhte Kollagenablagerung verursacht wird, werden diese Effekte stark von epidermalen Keratinozyten beeinflusst (Ghahary und Ghaffari, 2007; Werner et al., 2007). So ist in hypertrophen Wunden eine gestörte Epidermishomöostase nachweisbar, die durch dauerhaft aktivierte Keratinozyten verursacht wird (Machesney et al., 1998; Bellemare et al., 2005). Keratinozyten, die aus hypertrophen Wunden isoliert wurden, können die Fibroblastenproliferation sowie die dermale Kollagenproduktion stark erhöhen (Lim et al., 2002; Funayama et al., 2003). Auf Grund dessen könnte ein limitierender Effekt von SST in der Epidermis auch für die Inhibition dermalen Störungen vorteilhaft sein. Da zudem die Expression von SST-Rezeptoren in dermalen Fibroblasten nachgewiesen wurde (Gaudillere et al., 1999), könnte die Narbenbildung auch über eine direkte SST-Inhibition in der Dermis limitiert werden.

Somatostatin könnte ebenfalls zur Therapie von epidermalen Karzinomen eingesetzt werden. Eine topische Applikation von Tumortherapeutika ist sinnvoll, wenn eine chirurgische Entfernung von Hauttumoren zu weiteren Komplikationen führen würde (Patel et al., 2006; Newman und Weinberg, 2007). In klinischen Studien konnte nach Behandlung mit verschiedenen SST-Analoga (als primäre Therapie) eine Abnahme der Tumorgröße um mehr als 80% beobachtet werden (Pyronnet et al., 2008). Die antineoplastische Wirksamkeit von SST beruht dabei auf verschiedenen direkten und indirekten Effekten auf das Tumorstadium, wie der Proliferation, Zellinvasion, Apoptose, Hormonsekretion oder der Angiogenese. So konnte beim Kaposi-Sarkom eine *in vivo*-Wachstumshemmung durch SST nachgewiesen werden (Albini et al., 1999). Dazu wurden humane Tumorzellen aus kutanen Kaposi-Sarkomen isoliert und in Mäuse transplantiert. Die SST-Gabe führte nach 20 Tagen zu einer Verminderung des Tumorstadiums um 90%. Dies ist auf eine Migrationshemmung von Endothelzellen und so sekundär auf eine Verhinderung der Neovaskularisierung zurückzuführen. Auch das *in vivo*-Tumorstadium von malignen Melanomen konnte nach Transplantation in die Haut von Mäusen durch SST gehemmt werden (Schwab et al., 2001; Tejeda et al., 2007). Dabei hemmt die SST-Gabe die Proliferation der Melanomzellen. Auf diese Weise könnte auch in der humanen Haut das antiproliferative und antimigratorische Potential von SST-agonisten ausgenutzt und so das Tumorstadium und die Invasivität von epidermalen Tumorzellen limitiert werden.

Durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse konnte die SST/SSTR-Expression in der humanen Epidermis charakterisiert und die funktionelle Bedeutung von Somatostatin in epidermalen Keratinozyten aufgeklärt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Somatostatin (SST) ist ein inhibitorisches Peptidhormon mit weit verbreiteter Expression in vielen Geweben. Die physiologischen Wirkungen von SST werden durch fünf Rezeptorsubtypen (SSTR1-5) vermittelt, die nach Aktivierung unterschiedliche Signalwege aktivieren können. In dieser Arbeit wurde der Effekt von SST auf Keratinozyten und die Funktion des Somatostatin-Ligand/Rezeptorsystems in der humanen Epidermis untersucht.

Zunächst wurde die Genexpression von SST in der humanen Haut nachgewiesen. SST-positive Einzelzellen in der humanen Epidermis konnten immunhistologisch als endokrine Merkelzellen sowie dendritische Langerhanszellen identifiziert werden. Ebenfalls konnte die Expression aller fünf Rezeptorsubtypen in der Haut und in primären Keratinozyten gezeigt werden. Exemplarisch konnte für den Subtyp SSTR3 die Expression im *stratum granulosum* der Epidermis und die subzelluläre Lokalisation in epithelialen Tight Junctions gezeigt werden. Durch Präzipitationsexperimente konnte eine spezifische Interaktion des SSTR3 mit dem Tight Junction-Protein MUPP1 nachgewiesen werden. Die Expression und Lokalisation des SSTR3 und MUPP1 ist dabei vom Differenzierungsstadium der Keratinozyten abhängig.

Die Funktionalität der SST-Rezeptoren wurde durch die Agonisten-vermittelte Inhibition des cAMP-Signalweges bestätigt. Die SSTR-Aktivierung moduliert ebenfalls den MAP-Kinase-Signalweg, dabei sind subtypspezifische Effekte zu beobachten. SST beeinflusst weitergehend die Barrierefunktion von Keratinozyten, in dem es nach dem Aufbau funktioneller Tight Junctions eine Reduktion der parazellulären Permeabilität bewirkt. Dies wird durch eine SST-vermittelte Änderung der Zusammensetzung von Tight Junctions verursacht, da eine Zunahme der Claudin-4-Expression nach Rezeptoraktivierung festgestellt werden konnte.

Die Aktivierung von SST-Rezeptoren reguliert zudem die epidermale Wundheilung, so bewirkt SST im *ex vivo*- Wundmodell eine Verzögerung der Reepithelialisierung. Zum einen hat die SST-Stimulation einen deutlichen antiproliferativen Effekt auf Keratinozyten; dies wird durch SSTR5 bzw. SSTR1 vermittelt. Zum anderen inhibiert SST die Migration der Zellen; dieser Effekt wird durch alle SSTR-Subtypen vermittelt. Die SSTR-Aktivierung ändert dabei die Aktindynamik und verringert die Lamellipodienausbreitung während der Migration. Diese Regulation des Aktinzytoskeletts lässt sich durch eine geringere Aktivität der Rho-GTPase Rac1 nach SST-Stimulation erklären. Zusammenfassend beeinflusst das SST/SSTR-System vielfältige Funktionen von Keratinozyten wie die Barrierefunktion, die Proliferation und die Migration. Eine Modulation von SST-abhängigen epidermalen Signalwegen durch SSTR-Agonisten oder Antagonisten könnte bei Barrierestörungen der Haut, bei der Wundheilung oder in der Tumorthherapie sinnvoll sein.

6 LITERATUR

- Albini, A., Florio, T., Giunciuglio, D., Masiello, L., Carlone, S., Corsaro, A., Thellung, S., Cai, T., Noonan, D. M. und Schettini, G. (1999). Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Faseb J*, **13**(6), 647-655.
- Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualch, A., Hipskind, R. A. und Savagner, P. (2008). Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol Biol Cell*, **19**(11), 4738-4749.
- Ashida, Y., Denda, M. und Hirao, T. (2001). Histamine H1 and H2 receptor antagonists accelerate skin barrier repair and prevent epidermal hyperplasia induced by barrier disruption in a dry environment. *J Invest Dermatol*, **116**(2), 261-265.
- Badway, A. C. und Blake, A. D. (2005). Somatostatin: a hormone for the heart? *Curr Vasc Pharmacol*, **3**(2), 125-131.
- Bainton, R. J., Tsai, L. T., Schwabe, T., DeSalvo, M., Gaul, U. und Heberlein, U. (2005). moody encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell*, **123**(1), 145-156.
- Balazs, L., Okolicany, J., Ferrebee, M., Tolley, B. und Tigyi, G. (2001). Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**(2), R466-472.
- Balda, M. S., Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R. G., Macias-Silva, M., Torres-Marquez, M. E., Garcia-Sainz, J. A. und Cereijido, M. (1991). Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol*, **122**(3), 193-202.
- Ballare, E., Persani, L., Lania, A. G., Filopanti, M., Giammona, E., Corbetta, S., Mantovani, S., Arosio, M., Beck-Peccoz, P., Faglia, G. und Spada, A. (2001). Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**(8), 3809-3814.
- Ballian, N., Brunicardi, F. C. und Wang, X. P. (2006). Somatostatin and its receptors in the development of the endocrine pancreas. *Pancreas*, **33**(1), 1-12.
- Barber, D. L., McGuire, M. E. und Ganz, M. B. (1989). Beta-adrenergic and somatostatin receptors regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem*, **264**(35), 21038-21042.
- Barbieri, F., Pattarozzi, A., Gatti, M., Porcile, C., Bajetto, A., Ferrari, A., Culler, M. D. und Florio, T. (2008). Somatostatin receptors 1, 2, and 5 cooperate in the somatostatin inhibition of C6 glioma cell proliferation in vitro via a phosphotyrosine phosphatase-eta-dependent inhibition of extracellularly regulated kinase-1/2. *Endocrinology*, **149**(9), 4736-4746.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. und Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, **16**(5), 585-601.
- Bartolome, R. A., Wright, N., Molina-Ortiz, I., Sanchez-Luque, F. J. und Teixeira, J. (2008). Activated Galpha13 impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer Res*, **68**(20), 8221-8230.
- Bauer, W., Briner, U., Doepfner, W., Haller, R., Huguenin, R., Marbach, P., Petcher, T. J. und Pless, (1982). SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci*, **31**(11), 1133-1140.

- Becamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lubbert, H. und Ullmer, C. (2001). Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *J Biol Chem*, **276**(16), 12974-12982.
- Bellemare, J., Roberge, C. J., Bergeron, D., Lopez-Valle, C. A., Roy, M. und Moulin, V. J. (2005). Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J Pathol*, **206**(1), 1-8.
- Benali, N., Cordelier, P., Calise, D., Pages, P., Rochaix, P., Nagy, A., Esteve, J. P., Pour, P. M., Schally, A. V., Vaysse, N., Susini, C. und Buscail, L. (2000). Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(16), 9180-9185.
- Benard, V., Bohl, B. P. und Bokoch, G. M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem*, **274**(19), 13198-13204.
- Benrath, J., Zimmermann, M. und Gillardon, F. (1995). Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. *Neurosci Lett*, **200**(1), 17-20.
- Berelowitz, M. (1995). The somatostatin receptor-a window of therapeutic opportunity? *Endocrinology*, **136**(9), 3695-3697.
- Bernards, A. und Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol*, **14**(7), 377-385.
- Bhandari, S., Watson, N., Long, E., Sharpe, S., Zhong, W., Xu, S. Z. und Atkin, S. L. (2008). Expression of somatostatin and somatostatin receptor subtypes 1-5 in human normal and diseased kidney. *J Histochem Cytochem*, **56**(8), 733-743.
- Bhattacharya, M., Babwah, A. V. und Ferguson, S. S. (2004). Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*, **32**(Pt 6), 1040-1044.
- Bigliardi-Qi, M., Gaveriaux-Ruff, C., Zhou, H., Hell, C., Bady, P., Rufli, T., Kieffer, B. und Bigliardi, P. (2006). Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. *Differentiation*, **74**(4), 174-185.
- Bito, H., Mori, M., Sakanaka, C., Takano, T., Honda, Z., Gotoh, Y., Nishida, E. und Shimizu, T. (1994). Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylate cyclase inhibition, arachidonate release and activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, **269**(17), 12722-12730.
- Bockaert, J. und Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J*, **18**(7), 1723-1729.
- Bos, J. L., de Rooij, J. und Reedquist, K. A. (2001). Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(5), 369-377.
- Bousquet, C., Guillermet-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Archer-Lahlou, E., Lopez, F., Fanjul, M., Ferrand, A., Fourmy, D., Pichereaux, C., Monsarrat, B., Pradayrol, L., Esteve, J. P. und Susini, C. (2006). Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *Embo J*, **25**(17), 3943-3954.
- Bousquet, C., Guillermet, J., Vernejoul, F., Lahlou, H., Buscail, L. und Susini, C. (2004). Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation. *Dig Liver Dis*, **36** (1), S2-7.
- Bousquet, C., Puente, E., Buscail, L., Vaysse, N. und Susini, C. (2001). Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy*, **47** (2), 30-39.

- Brain, S. D. (1997). Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology*, **37**(2-3), 133-152.
- Brandner, J. M. (2009). Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm*, **72**(2), 289-294.
- Brandner, J. M., Houdek, P., Quitschau, T., Siemann-Harms, U., Ohnemus, U., Willhardt, I. und Moll, I. (2006a). An ex-vivo model to evaluate dressings & drugs for wound healing. Example: Influence of *Lucilia sericata* extracts on wound healing progress. *EWM AJ*, **6**, 11-15.
- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. und Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol*, **81**(5), 253-263.
- Brandner, J. M., Kief, S., Wladykowski, E., Houdek, P. und Moll, I. (2006b). Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol*, **19**(2), 71-77.
- Braun, M., Lelieur, K. und Kietzmann, M. (2006). Purinergic substances promote murine keratinocyte proliferation and enhance impaired wound healing in mice. *Wound Repair Regen*, **14**(2), 152-161.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. und Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, **179**(68), 77-79.
- Brzostowski, J. A. und Kimmel, A. R. (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci*, **26**(5), 291-297.
- Buchan, A. M., Lin, C. Y., Choi, J. und Barber, D. L. (2002). Somatostatin, acting at receptor subtype 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. *J Biol Chem*, **277**(32), 28431-28438.
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N. und Johnson, G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem*, **270**(42), 24631-24634.
- Buscail, L., Esteve, J. P., Saint-Laurent, N., Bertrand, V., Reisine, T., O'Carroll, A. M., Bell, G. I., Schally, A. V., Vaysse, N. und Susini, C. (1995). Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(5), 1580-1584.
- Carlton, S. M., Du, J., Zhou, S. und Coggeshall, R. E. (2001). Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *J Neurosci*, **21**(11), 4042-4049.
- Cattaneo, M. G., Gentilini, D. und Vicentini, L. M. (2006). Deregulated human glioma cell motility: inhibitory effect of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, **256**(1-2), 34-39.
- Cattaneo, M. G., Taylor, J. E., Culler, M. D., Nisoli, E. und Vicentini, L. M. (2000). Selective stimulation of somatostatin receptor subtypes: differential effects on Ras/MAP kinase pathway and cell proliferation in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett*, **481**(3), 271-276.
- Cervia, D. und Bagnoli, P. (2007). An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology. *Pharmacol Ther*, **116**(2), 322-341.
- Chang, L. und Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**(6824), 37-40.
- Chen, J., Hoffman, B. B. und Isseroff, R. R. (2002). Beta-adrenergic receptor activation inhibits keratinocyte migration via a cyclic adenosine monophosphate-independent mechanism. *J Invest Dermatol*, **119**(6), 1261-1268.

- Cheng-Chew, S. B. und Leung, P. Y. (1996). Localisation of VIP-and CGRP-like substances in the skin and sinus hair follicles of various mammalian species. *Histochem Cell Biol*, **105**(6), 443-452.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. und Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **318**(5854), 1258-1265.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Wess, J., Karlsson, E. und Grando, S. A. (2004). Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. *J Cell Biol*, **166**(2), 261-272.
- Chou, C. K., Ho, L. T., Ting, L. P., Hu, C. P., Su, T. S., Chang, W. C., Suen, C. S., Huang, M. Y. und Chang, C. M. (1987). Selective suppression of insulin-induced proliferation of cultured human hepatoma cells by somatostatin. *J Clin Invest*, **79**(1), 175-178.
- Chrubasik, J., Meynadier, J., Blond, S., Scherpereel, P., Ackerman, E., Weinstock, M., Bonath, K., Cramer, H. und Wunsch, E. (1984). Somatostatin, a potent analgesic. *Lancet*, **2**(8413), 1208-1209.
- Cocchia, D., Michetti, F. und Donato, R. (1981). Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*, **294**(5836), 85-87.
- Cook, P. W., Ashton, N. M. und Pittelkow, M. R. (1995). Adenosine and adenine nucleotides inhibit the autonomous and epidermal growth factor-mediated proliferation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **104**(6), 976-981.
- Cordelier, P., Esteve, J. P., Bousquet, C., Delesque, N., O'Carroll, A. M., Schally, A. V., Vaysse, N., Susini, C. und Buscail, L. (1997). Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(17), 9343-9348.
- Cotton, M. und Claing, A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Signal*, **21**(7), 1045-1053.
- Crowe, R., Parkhouse, N., McGrouther, D. und Burnstock, G. (1994). Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. *Br J Dermatol*, **130**(4), 444-452.
- Csaba, Z. und Dournaud, P. (2001). Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, **35**(1), 1-23.
- Dal Monte, M., Petrucci, C., Vasilaki, A., Cervia, D., Grouselle, D., Epelbaum, J., Kreienkamp, H. J., Richter, D., Hoyer, D. und Bagnoli, P. (2003). Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology*, **45**(8), 1080-1092.
- de Almeida, J. B., Holtzman, E. J., Peters, P., Ercolani, L., Ausiello, D. A. und Stow, J. L. (1994). Targeting of chimeric G alpha i proteins to specific membrane domains. *J Cell Sci*, **107** (3), 507-515.
- de Lecea, L., Criado, J. R., Prospero-Garcia, O., Gautvik, K. M., Schweitzer, P., Danielson, P. E., Dunlop, C. L., Siggins, G. R., Henriksen, S. J. und Sutcliffe, J. G. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*, **381**(6579), 242-245.
- Demoyer, J. S., Skalak, T. C. und Durieux, M. E. (2000). Lysophosphatidic acid enhances healing of acute cutaneous wounds in the mouse. *Wound Repair Regen*, **8**(6), 530-537.
- Denda, M., Fuziwara, S. und Inoue, K. (2003). Beta2-adrenergic receptor antagonist accelerates skin barrier recovery and reduces epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol*, **121**(1), 142-148.
- Denda, M., Fuziwara, S. und Inoue, K. (2004). Association of cyclic adenosine monophosphate with permeability barrier homeostasis of murine skin. *J Invest Dermatol*, **122**(1), 140-146.

- Denda, M., Nakatani, M., Ikeyama, K., Tsutsumi, M. und Denda, S. (2007). Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Exp Dermatol*, **16**(3), 157-161.
- Deng, M., Chen, W. L., Takatori, A., Peng, Z., Zhang, L., Mongan, M., Parthasarathy, R., Sartor, M., Miller, M., Yang, J., Su, B., Kao, W. W. und Xia, Y. (2006). A role for the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 in epithelial wound healing. *Mol Biol Cell*, **17**(8), 3446-3455.
- Denker, B. M., Saha, C., Khawaja, S. und Nigam, S. K. (1996). Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis. *J Biol Chem*, **271**(42), 25750-25753.
- DiPersio, C. M. (2007). Double duty for Rac1 in epidermal wound healing. *Sci STKE*, **2007**(391), 33.
- Dizeyi, N., Konrad, L., Bjartell, A., Wu, H., Gadaleanu, V., Hansson, J., Helboe, L. und Abrahamsson, P. A. (2002). Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*, **7**(3), 91-98.
- Dodane, V. und Kachar, B. (1996). Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J Membr Biol*, **149**(3), 199-209.
- Donato, R., Wood, S. A., Saunders, I., Gundsambuu, B., Yan Mak, K., Abbott, C. A. und Powell, B. C. (2009). Regulation of epithelial apical junctions and barrier function by Galpha13. *Biochim Biophys Acta*, **1793**(7), 1228-1235.
- Dutt, P., Kjoller, L., Giel, M., Hall, A. und Toksoz, D. (2002). Activated Galphaq family members induce Rho GTPase activation and Rho-dependent actin filament assembly. *FEBS Lett*, **531**(3), 565-569.
- Eispert, A. C., Fuchs, F., Brandner, J. M., Houdek, P., Wladykowski, E. und Moll, I. (2009). Evidence for distinct populations of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol*, **132**(1), 83-93.
- Ekstrand, A. J., Cao, R., Bjorndahl, M., Nystrom, S., Jonsson-Rylander, A. C., Hassani, H., Hallberg, B., Nordlander, M. und Cao, Y. (2003). Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(10), 6033-6038.
- Epelbaum, J., Briard, N., Djordjijevic, D., Dutour, A., Meyerhoff, W., Oliver, C., Slama, A., Viollet, C. und Zhang, J. (1998). Characterization of somatostatin receptor subtypes in mammalian pituitary. *Ann N Y Acad Sci*, **839**, 249-253.
- Estevez, M. A., Henderson, J. A., Ahn, D., Zhu, X. R., Poschmann, G., Lubbert, H., Marx, R. und Baraban, J. M. (2008). The neuronal RhoA GEF, Tech, interacts with the synaptic multi-PDZ-domain-containing protein, MUPP1. *J Neurochem*, **106**(3), 1287-1297.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**(6916), 629-635.
- Falanga, V., Grinnel, F., Gilchrest, B., Maddox, Y. T. und Moshell, A. (1995). Experimental approaches to chronic wounds. *Wound Repair Regen*, **3**(2), 132-140.
- Fantini, F. und Johansson, O. (1995). Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Exp Dermatol*, **4**(6), 365-371.
- Farooqui, R. und Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *J Cell Sci*, **118**(Pt 1), 51-63.
- Fenteany, G., Janmey, P. A. und Stossel, T. P. (2000). Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Curr Biol*, **10**(14), 831-838.

- Ferone, D., Boschetti, M., Resmini, E., Giusti, M., Albanese, V., Goglia, U., Albertelli, M., Vera, L., Bianchi, F. und Minuto, F. (2006). Neuroendocrine-immune interactions: the role of cortistatin/somatostatin system. *Ann N Y Acad Sci*, **1069**, 129-144.
- Finley, J. C., Maderdrut, J. L., Roger, L. J. und Petrusz, P. (1981). The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **6**(11), 2173-2192.
- Florio, T. (2008). Somatostatin/somatostatin receptor signalling: Phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 40-48.
- Florio, T., Yao, H., Carey, K. D., Dillon, T. J. und Stork, P. J. (1999). Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol*, **13**(1), 24-37.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. und Schioth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, **63**(6), 1256-1272.
- Fujimoto, S., Uratsuji, H., Saeki, H., Kagami, S., Tsunemi, Y., Komine, M. und Tamaki, K. (2008). CCR4 and CCR10 are expressed on epidermal keratinocytes and are involved in cutaneous immune reaction. *Cytokine*, **44**(1), 172-178.
- Funayama, E., Chodon, T., Oyama, A. und Sugihara, T. (2003). Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid. *J Invest Dermatol*, **121**(6), 1326-1331.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, **141**(7), 1539-1550.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. und Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, **156**(6), 1099-1111.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, **123**(6 Pt 2), 1777-1788.
- Fuziwara, S., Suzuki, A., Inoue, K. und Denda, M. (2005). Dopamine D2-like receptor agonists accelerate barrier repair and inhibit the epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol*, **125**(4), 783-789.
- Garcia-Mata, R. und Burridge, K. (2007). Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*, **17**(1), 36-43.
- Gaudillere, A., Bernard, C., Abello, J., Schmitt, D., Claudy, A. und Misery, L. (1999). Human normal dermal fibroblasts express somatostatin receptors. *Exp Dermatol*, **8**(4), 267-273.
- Gaudillere, A., Misery, L., Bernard, C., Souchier, C., Claudy, A. und Schmitt, D. (1997). Presence of somatostatin in normal human epidermis. *Br J Dermatol*, **137**(3), 376-380.
- Geisner, B., Skavland, J., Marcusson, J. A., Johansson, O. und Elsayed, S. (2007). Psoriasis and somatostatin in serum. *Acta Derm Venereol*, **87**(6), 538-539.
- Gentles, A. J. und Karlin, S. (1999). Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless? *Trends Genet*, **15**(2), 47-49.
- Ghahary, A. und Ghaffari, A. (2007). Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. *Wound Repair Regen*, **15**(1), S46-53.
- Ghirlanda, G., Uccioli, L., Perri, F., Altomonte, L., Bertoli, A., Manna, R., Frati, L. und Greco, A. V. (1983). Epidermal growth factor, somatostatin, and psoriasis. *Lancet*, **1**(8314-5), 65.

- Ghosh, P., Garcia-Marcos, M., Bornheimer, S. J. und Farquhar, M. G. (2008). Activation of Galphai3 triggers cell migration via regulation of GIV. *J Cell Biol*, **182**(2), 381-393.
- Gibran, N. S., Jang, Y. C., Isik, F. F., Greenhalgh, D. G., Muffley, L. A., Underwood, R. A., Usui, M. L., Larsen, J., Smith, D. G., Bunnett, N., Ansel, J. C. und Olerud, J. E. (2002). Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *J Surg Res*, **108**(1), 122-128.
- Gillbro, J. M., Marles, L. K., Hibberts, N. A. und Schallreuter, K. U. (2004). Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *J Invest Dermatol*, **123**(2), 346-353.
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, **56**, 615-649.
- Giustizieri, M. L., Albanesi, C., Fluhr, J., Gisondi, P., Norgauer, J. und Girolomoni, G. (2004). H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*, **114**(5), 1176-1182.
- Granoth, R., Fridkin, M. und Gozes, I. (2000). VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS Lett*, **475**(2), 78-83.
- Green, H. (1978). Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell*, **15**(3), 801-811.
- Greig, A. V., Linge, C., Terenghi, G., McGrouther, D. A. und Burnstock, G. (2003). Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **120**(6), 1007-1015.
- Grotzinger, C. und Wiedenmann, B. (2004). Somatostatin receptor targeting for tumor imaging and therapy. *Ann N Y Acad Sci*, **1014**, 258-264.
- Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., Malpoux, B., Borg-Capra, C. und Jockers, R. (2008). The PDZ protein MUPP1 promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *J Biol Chem*, **283**(24), 16762-16771.
- Guillemet, J., Saint-Laurent, N., Rochaix, P., Cuvillier, O., Levade, T., Schally, A. V., Pradayrol, L., Buscaïl, L., Susini, C. und Bousquet, C. (2003). Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(1), 155-160.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. und Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, **453**(7193), 314-321.
- Hachisuka, H., Sakamoto, F., Nomura, H., Mori, O. und Sasai, Y. (1986). Immunohistochemical study of S-100 protein and neuron specific enolase (NSE) in melanocytes and the related tumors. *Acta Histochem*, **80**(2), 215-223.
- Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M. und Smahi, A. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, **127**(5), 1386-1390.
- Haeberle, H., Fujiwara, M., Chuang, J., Medina, M. M., Panditrao, M. V., Bechstedt, S., Howard, J. und Lumpkin, E. A. (2004). Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(40), 14503-14508.
- Haegerstrand, A., Jonzon, B., Dalsgaard, C. J. und Nilsson, J. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(15), 5993-5996.

- Hagströmer, L., Emtestam, L., Stridsberg, M. und Talme, T. (2006). Expression pattern of somatostatin receptor subtypes 1-5 in human skin: an immunohistochemical study of healthy subjects and patients with psoriasis or atopic dermatitis. *Exp Dermatol*, **15**(12), 950-957.
- Hakak, Y., Shrestha, D., Goegel, M. C., Behan, D. P. und Chalmers, D. T. (2003). Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. *FEBS Lett*, **550**(1-3), 11-17.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M. und Tsukita, S. (2002). Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*, **277**(1), 455-461.
- Hamilton, S. E. und Nathanson, N. M. (1997). Differential localization of G-proteins, G alpha o and G alpha i-1, -2, and -3, in polarized epithelial MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **234**(1), 1-7.
- Harhammer, R., Gohla, A. und Schultz, G. (1996). Interaction of G protein Gbetagamma dimers with small GTP-binding proteins of the Rho family. *FEBS Lett*, **399**(3), 211-214.
- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C. und Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*, **280**(5372), 2112-2114.
- Hartschuh, W., Weihe, E., Yanaihara, N. und Reinecke, M. (1983). Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *J Invest Dermatol*, **81**(4), 361-364.
- Hashimoto, K. (1971). Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum. *J Invest Dermatol*, **57**(1), 17-31.
- Heisler, S., Reisine, T. D., Hook, V. Y. und Axelrod, J. (1982). Somatostatin inhibits multireceptor stimulation of cyclic AMP formation and corticotropin secretion in mouse pituitary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**(21), 6502-6506.
- Helboe, L., Moller, M., Norregaard, L., Schiodt, M. und Stidsen, C. E. (1997). Development of selective antibodies against the human somatostatin receptor subtypes sst1-sst5. *Brain Res Mol Brain Res*, **49**(1-2), 82-88.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. und Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, **19**(1), 245-254.
- Holmgren, S. und Jensen, J. (2001). Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res Bull*, **55**(6), 723-735.
- Hopkins, A. M., Li, D., Mrsny, R. J., Walsh, S. V. und Nusrat, A. (2000). Modulation of tight junction function by G protein-coupled events. *Adv Drug Deliv Rev*, **41**(3), 329-340.
- Iwasaki, T., Chen, J. D., Kim, J. P., Wynn, K. C. und Woodley, D. T. (1994). Dibutyryl cyclic AMP modulates keratinocyte migration without alteration of integrin expression. *J Invest Dermatol*, **102**(6), 891-897.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. und Stevens, R. C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*, **322**(5905), 1211-1217.
- Jordan, J. D., Carey, K. D., Stork, P. J. und Iyengar, R. (1999). Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem*, **274**(31), 21507-21510.
- Jou, T. S., Schneeberger, E. E. und Nelson, W. J. (1998). Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol*, **142**(1), 101-115.

- Karalis, K., Mastorakos, G., Chrousos, G. P. und Tolis, G. (1994). Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest*, **93**(5), 2000-2006.
- Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., Starowicz, K., Steuder, R., Schlicker, E., Cravatt, B., Mechoulam, R., Buettner, R., Werner, S., Di Marzo, V., Tuting, T. und Zimmer, A. (2007). Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*, **316**(5830), 1494-1497.
- Keri, G., Erchegeyi, J., Horvath, A., Mezo, I., Idei, M., Vantus, T., Balogh, A., Vadasz, Z., Bokonyi, G., Seprodi, J., Teplan, I., Csuka, O., Tejeda, M., Gaal, D., Szegedi, Z., Szende, B., Roze, C., Kalthoff, H. und Ullrich, A. (1996). A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(22), 12513-12518.
- Khalil, Z. und Helme, R. (1996). Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **51**(5), B354-361.
- Kiyono, M., Satoh, T. und Kaziro, Y. (1999). G protein beta gamma subunit-dependent Rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(9), 4826-4831.
- Klisovic, D. D., O'Dorisio, M. S., Katz, S. E., Sall, J. W., Balster, D., O'Dorisio, T. M., Craig, E. und Lubow, M. (2001). Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**(10), 2193-2201.
- Ko, J. A., Yanai, R. und Nishida, T. (2009). Up-regulation of ZO-1 expression and barrier function in cultured human corneal epithelial cells by substance P. *FEBS Lett*, **583**(12), 2148-2153.
- Krantic, S. (2000). Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. *Peptides*, **21**(12), 1941-1964.
- Kreienkamp, H. J., Akgün, E., Baumeister, H., Meyerhof, W. und Richter, D. (1999). Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs. *FEBS Lett*, **462**(3), 464-466.
- Kreienkamp, H. J., Hönck, H. H. und Richter, D. (1997). Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1). *FEBS Lett*, **419**(1), 92-94.
- Krulich, L., Dhariwal, A. P. und McCann, S. M. (1968). Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, **83**(4), 783-790.
- Kulka, J., Szasz, A. M., Nemeth, Z., Madaras, L., Schaff, Z., Molnar, I. A. und Tokes, A. M. (2009). Expression of tight junction protein claudin-4 in Basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*, **15**(1), 59-64.
- Lagerström, M. C. und Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **7**(4), 339-357.
- Lahlou, H., Guillermet, J., Hortala, M., Vernejoul, F., Pyronnet, S., Bousquet, C. und Susini, C. (2004). Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, **1014**, 121-131.
- Lahlou, H., Saint-Laurent, N., Esteve, J. P., Eychene, A., Pradayrol, L., Pyronnet, S. und Susini, C. (2003). sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation. *J Biol Chem*, **278**(41), 39356-39371.
- Lambert, R. W., Campton, K., Ding, W., Ozawa, H. und Granstein, R. D. (2002). Langerhans cell expression of neuropeptide Y and peptide YY. *Neuropeptides*, **36**(4), 246-251.

- Lambert, R. W. und Granstein, R. D. (1998). Neuropeptides and Langerhans cells. *Exp Dermatol*, **7**(2-3), 73-80.
- Lamberts, S. W., Reubi, J. C. und Krenning, E. P. (1994). Somatostatin and the concept of peptide receptor scintigraphy in oncology. *Semin Oncol*, **21**(5 Suppl 13), 1-5.
- Lamberts, S. W., Uitterlinden, P., Verschoor, L., van Dongen, K. J. und del Pozo, E. (1985). Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995. *N Engl J Med*, **313**(25), 1576-1580.
- Lanaspa, M. A., Andres-Hernando, A., Rivard, C. J., Dai, Y. und Berl, T. (2008). Hypertonic stress increases claudin-4 expression and tight junction integrity in association with MUPP1 in IMCD3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(41), 15797-15802.
- Landers, K. A., Samaratunga, H., Teng, L., Buck, M., Burger, M. J., Scells, B., Lavin, M. F. und Gardiner, R. A. (2008). Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer. *Br J Cancer*, **99**(3), 491-501.
- Lania, A., Mantovani, G. und Spada, A. (2008). Genetic abnormalities of somatostatin receptors in pituitary tumors. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 180-186.
- Law, S. F., Manning, D. und Reisine, T. (1991). Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J Biol Chem*, **266**(27), 17885-17897.
- Laws, S. A., Gough, A. C., Evans, A. A., Bains, M. A. und Primrose, J. N. (1997). Somatostatin receptor subtype mRNA expression in human colorectal cancer and normal colonic mucosae. *Br J Cancer*, **75**(3), 360-366.
- Le Romancer, M., Cherifi, Y., Levasseur, S., Laigneau, J. P., Peranzi, G., Jais, P., Lewin, M. J. und Reyl-Desmars, F. (1996). Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae. *Life Sci*, **58**(13), 1091-1098.
- Lehy, T., Dubrasquet, M. und Bonfils, S. (1979). Effect of somatostatin on normal and gastric-stimulated cell proliferation in the gastric and intestinal mucosae of the rat. *Digestion*, **19**(2), 99-109.
- Leung, M. S. und Wong, C. C. (2000). Expressions of putative neurotransmitters and neuronal growth related genes in Merkel cell-neurite complexes of the rats. *Life Sci*, **66**(16), 1481-1490.
- Li, W., Nadelman, C., Henry, G., Fan, J., Muellenhoff, M., Medina, E., Gratch, N. S., Chen, M., Han, J. und Woodley, D. (2001). The p38-MAPK/SAPK pathway is required for human keratinocyte migration on dermal collagen. *J Invest Dermatol*, **117**(6), 1601-1611.
- Liang, C. C., Park, A. Y. und Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, **2**(2), 329-333.
- Liew, C. W. (2004). Regulation of epithelial tight junctions by human somatostatin receptor 3. Dissertation, Universität Hamburg.
- Liew, C. W., Vockel, M., Glassmeier, G., Brandner, J. M., Fernandez-Ballester, G. J., Schwarz, J. R., Schulz, S., Buck, F., Serrano, L., Richter, D. und Kreienkamp, H. J. (2009). Interaction of the human somatostatin receptor 3 with the multiple PDZ domain protein MUPP1 enables somatostatin to control permeability of epithelial tight junctions. *FEBS Lett*, **583**(1), 49-54.
- Lim, I. J., Phan, T. T., Bay, B. H., Qi, R., Huynh, H., Tan, W. T., Lee, S. T. und Longaker, M. T. (2002). Fibroblasts cocultured with keloid keratinocytes: normal fibroblasts secrete collagen in a keloidlike manner. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**(1), C212-222.
- Liu, D., Martino, G., Thangaraju, M., Sharma, M., Halwani, F., Shen, S. H., Patel, Y. C. und Srikant, C. B. (2000). Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **275**(13), 9244-9250.

- Liu, S., Kapoor, M. und Leask, A. (2009). Rac1 expression by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. *Am J Pathol*, **174**(5), 1847-1856.
- Low, M. J., Otero-Corchon, V., Parlow, A. F., Ramirez, J. L., Kumar, U., Patel, Y. C. und Rubinstein, M. (2001). Somatostatin is required for masculinization of growth hormone-regulated hepatic gene expression but not of somatic growth. *J Clin Invest*, **107**(12), 1571-1580.
- Luini, A., Lewis, D., Guild, S., Schofield, G. und Weight, F. (1986). Somatostatin, an inhibitor of ACTH secretion, decreases cytosolic free calcium and voltage-dependent calcium current in a pituitary cell line. *J Neurosci*, **6**(11), 3128-3132.
- Lumpkin, E. A. und Caterina, M. J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, **445**(7130), 858-865.
- Luque, R. M., Gahete, M. D., Hochgeschwender, U. und Kineman, R. D. (2006). Evidence that endogenous SST inhibits ACTH and ghrelin expression by independent pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**(2), E395-403.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rumenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M. und Wieland, T. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem*, **280**(12), 11134-11139.
- Maccarrone, M., Di Rienzo, M., Battista, N., Gasperi, V., Guerrieri, P., Rossi, A. und Finazzi-Agro, A. (2003). The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem*, **278**(36), 33896-33903.
- Machesney, M., Tidman, N., Waseem, A., Kirby, L. und Leigh, I. (1998). Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. *Am J Pathol*, **152**(5), 1133-1141.
- Mancini, A., Koch, A., Stefan, M., Niemann, H. und Tamura, T. (2000). The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity. *FEBS Lett*, **482**(1-2), 54-58.
- Maricich, S. M., Wellnitz, S. A., Nelson, A. M., Lesniak, D. R., Gerling, G. J., Lumpkin, E. A. und Zoghbi, H. Y. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science*, **324**(5934), 1580-1582.
- Martin, P. (1997). Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*, **276**(5309), 75-81.
- Martinez, V., Curi, A. P., Torkian, B., Schaeffer, J. M., Wilkinson, H. A., Walsh, J. H. und Tache, Y. (1998). High basal gastric acid secretion in somatostatin receptor subtype 2 knockout mice. *Gastroenterology*, **114**(6), 1125-1132.
- Matsumoto, K., Yokogoshi, Y., Fujinaka, Y., Zhang, C. und Saito, S. (1994). Molecular cloning and sequencing of porcine somatostatin receptor 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**(1), 298-305.
- Matter, K. und Balda, M. S. (2003a). Functional analysis of tight junctions. *Methods*, **30**(3), 228-234.
- Matter, K. und Balda, M. S. (2003b). Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(3), 225-236.
- Maurer, M., Opitz, M., Henz, B. M. und Paus, R. (1997). The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF-alpha inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci*, **16**(1), 79-84.
- Meriney, S. D., Gray, D. B. und Pilar, G. R. (1994). Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*, **369**(6478), 336-339.

- Mertens, A. E., Rygiel, T. P., Olivo, C., van der Kammen, R. und Collard, J. G. (2005). The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol*, **170**(7), 1029-1037.
- Meyer, T. N., Hunt, J., Schwesinger, C. und Denker, B. M. (2003). Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**(5), C1281-1293.
- Meyer, T. N., Schwesinger, C. und Denker, B. M. (2002). Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *J Biol Chem*, **277**(28), 24855-24858.
- Michl, P., Barth, C., Buchholz, M., Lerch, M. M., Rolke, M., Holzmann, K. H., Menke, A., Fensterer, H., Giehl, K., Lohr, M., Leder, G., Iwamura, T., Adler, G. und Gress, T. M. (2003). Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res*, **63**(19), 6265-6271.
- Milligan, G. und White, J. H. (2001). Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **22**(10), 513-518.
- Mills, G. B. und Moolenaar, W. H. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**(8), 582-591.
- Mishra, P., Socolich, M., Wall, M. A., Graves, J., Wang, Z. und Ranganathan, R. (2007). Dynamic scaffolding in a G protein-coupled signaling system. *Cell*, **131**(1), 80-92.
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K. und Matsuda, M. (1999). Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature*, **400**(6747), 891-894.
- Modlin, R. L., Rowden, G., Taylor, C. R. und Rea, T. H. (1984). Comparison of S-100 and OKT6 antisera in human skin. *J Invest Dermatol*, **83**(3), 206-209.
- Moll, I., Kuhn, C. und Moll, R. (1995). Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol*, **104**(6), 910-915.
- Moller, L. N., Stidsen, C. E., Hartmann, B. und Holst, J. J. (2003). Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1616**(1), 1-84.
- Morita, K., Itoh, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Furuse, M., Yoneda, K., Imamura, S., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998). Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. *J Invest Dermatol*, **110**(6), 862-866.
- Morita, K., Tsukita, S. und Miyachi, Y. (2004). Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br J Dermatol*, **151**(2), 328-334.
- Murthy, K. S., Coy, D. H. und Makhlof, G. M. (1996). Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem*, **271**(38), 23458-23463.
- Nagy, A., Schally, A. V., Halmos, G., Armatis, P., Cai, R. Z., Csernus, V., Kovacs, M., Koppan, M., Szepeshazi, K. und Kahan, Z. (1998). Synthesis and biological evaluation of cytotoxic analogs of somatostatin containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(4), 1794-1799.
- Newman, M. D. und Weinberg, J. M. (2007). Topical therapy in the treatment of actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Cutis*, **79**(4), 18-28.

- Niu, J., Profirovic, J., Pan, H., Vaiskunaite, R. und Voyno-Yasenetskaya, T. (2003). G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production. *Circ Res*, **93**(9), 848-856.
- Nobes, C. D. und Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, **144**(6), 1235-1244.
- O'Byrne, K. J. und Carney, D. N. (1993). Somatostatin and the lung. *Lung Cancer*, **10**(3-4), 151-172.
- O'Shaughnessy, D. J., McGregor, G. P., Ghatei, M. A., Blank, M. A., Springall, D. R., Gu, J., Polak, J. M. und Bloom, S. R. (1983). Distribution of bombesin, somatostatin, substance-P and vasoactive intestinal polypeptide in feline and porcine skin. *Life Sci*, **32**(25), 2827-2836.
- Ohtani, S., Terashima, M., Satoh, J., Soeta, N., Saze, Z., Kashimura, S., Ohsuka, F., Hoshino, Y., Kogure, M. und Gotoh, M. (2009). Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival. *Gastric Cancer*, **12**(1), 43-51.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H. und Takuwa, Y. (2000). Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol*, **20**(24), 9247-9261.
- Oldham, W. M. und Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(1), 60-71.
- Olias, G., Viollet, C., Kusserow, H., Epelbaum, J. und Meyerhof, W. (2004). Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*, **89**(5), 1057-1091.
- Oliveira, S. S. und Morgado-Diaz, J. A. (2007). Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci*, **64**(1), 17-28.
- Orenberg, E. K., Pfenndt, E. A. und Wilkinson, D. I. (1983). Characterization of alpha- and beta-adrenergic agonist stimulation of adenylate cyclase activity in human epidermal keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol*, **80**(6), 503-507.
- Pai, V. P. und Horseman, N. D. (2008). Biphasic regulation of mammary epithelial resistance by serotonin through activation of multiple pathways. *J Biol Chem*, **283**(45), 30901-30910.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**(5480), 739-745.
- Pan, M. G., Florio, T. und Stork, P. J. (1992). G protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor cells. *Science*, **256**(5060), 1215-1217.
- Panetta, R., Greenwood, M. T., Warszynska, A., Demchyshyn, L. L., Day, R., Niznik, H. B., Srikant, C. B. und Patel, Y. C. (1994). Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol*, **45**(3), 417-427.
- Parkhouse, N., Crowe, R., McGrouther, D. A. und Burnstock, G. (1992). Painful hypertrophic scarring and neuropeptides. *Lancet*, **340**(8832), 1410.
- Patel, G. K., Goodwin, R., Chawla, M., Laidler, P., Price, P. E., Finlay, A. Y. und Motley, R. J. (2006). Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol*, **54**(6), 1025-1032.

- Patel, Y. C. (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, **20**(3), 157-198.
- Patel, Y. C., Greenwood, M., Kent, G., Panetta, R. und Srikant, C. B. (1993). Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **192**(1), 288-294.
- Patel, Y. C., Greenwood, M. T., Warszynska, A., Panetta, R. und Srikant, C. B. (1994a). All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*, **198**(2), 605-612.
- Patel, Y. C. und Srikant, C. B. (1994b). Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology*, **135**(6), 2814-2817.
- Paus, R., Heinzelmann, T., Robicsek, S., Czarnetzki, B. M. und Maurer, M. (1995). Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. *Arch Dermatol Res*, **287**(5), 500-502.
- Peltonen, S., Riechokainen, J., Pummi, K. und Peltonen, J. (2007). Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. *Br J Dermatol*, **156**(3), 466-472.
- Peluso, G., Petillo, O., Melone, M. A., Mazzarella, G., Ranieri, M. und Tajana, G. F. (1996). Modulation of cytokine production in activated human monocytes by somatostatin. *Neuropeptides*, **30**(5), 443-451.
- Penzen, P., Johnson, R. C., Sattler, R., Zhang, X., Haganir, R. L., Kambampati, V., Mains, R. E. und Eipper, B. A. (2001). The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, **29**(1), 229-242.
- Perez, J., Viollet, C., Doublier, S., Videau, C., Epelbaum, J. und Baud, L. (2003). Somatostatin binds to murine macrophages through two distinct subsets of receptors. *J Neuroimmunol*, **138**(1-2), 38-44.
- Pierard-Franchimont, C., Quatresooz, P. und Pierard, G. E. (2003). Incidental control of rosacea by somatostatin. *Dermatology*, **206**(3), 249-251.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. und Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(9), 639-650.
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G. und Parks, W. C. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, **137**(6), 1445-1457.
- Pincelli, C., Fantini, F., Massimi, P., Girolomoni, G., Seidenari, S. und Giannetti, A. (1990). Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*, **122**(6), 745-750.
- Pinter, E., Helyes, Z. und Szolcsanyi, J. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther*, **112**(2), 440-456.
- Pola, S., Cattaneo, M. G. und Vicentini, L. M. (2003). Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells: involvement of Rac and MAP kinase activity. *J Biol Chem*, **278**(42), 40601-40606.
- Polak, J. M. und Bloom, S. R. (1986). Somatostatin localization in tissues. *Scand J Gastroenterol Suppl*, **119**, 11-21.
- Pollard, T. D. und Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**(4), 453-465.

- Ponta, H., Sherman, L. und Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(1), 33-45.
- Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A. und Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(41), 15988-15993.
- Proksch, E., Brandner, J. M. und Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, **17**(12), 1063-1072.
- Pullar, C. E., Grahn, J. C., Liu, W. und Isseroff, R. R. (2006a). Beta2-adrenergic receptor activation delays wound healing. *Faseb J*, **20**(1), 76-86.
- Pullar, C. E. und Isseroff, R. R. (2005). Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field. *J Cell Sci*, **118**(Pt 9), 2023-2034.
- Pullar, C. E., Manabat-Hidalgo, C. G., Bolaji, R. S. und Isseroff, R. R. (2008). beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res*, **58**(2), 158-164.
- Pullar, C. E., Rizzo, A. und Isseroff, R. R. (2006b). beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem*, **281**(30), 21225-21235.
- Pyronnet, S., Bousquet, C., Najib, S., Azar, R., Laklai, H. und Susini, C. (2008). Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 230-237.
- Reed, C. E., Busse, W. W. und Lee, T. P. (1976). Adrenergic mechanisms and the adenylyl cyclase system in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, **67**(3), 333-338.
- Regard, J. B., Sato, I. T. und Coughlin, S. R. (2008). Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*, **135**(3), 561-571.
- Reubi, J. C. (2003). Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev*, **24**(4), 389-427.
- Rheinwald, J. G. und Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, **6**(3), 331-343.
- Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, **114**(Pt 15), 2713-2722.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. und Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**(3), 401-410.
- Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J. und Ellis, C. (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *Embo J*, **12**(13), 5151-5160.
- Rohrer, L., Raulf, F., Bruns, C., Buettner, R., Hofstaedter, F. und Schule, R. (1993). Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(9), 4196-4200.
- Rohrer, S. P., Birzin, E. T., Mosley, R. T., Berk, S. C., Hutchins, S. M., Shen, D. M., Xiong, Y., Hayes, E. C., Parmar, R. M., Foor, F., Mitra, S. W., Degrado, S. J., Shu, M., Klopp, J. M., Cai, S. J., Blake, A., Chan, W. W., Pasternak, A., Yang, L., Patchett, A. A., Smith, R. G., Chapman, K. T. und Schaeffer, J. M. (1998). Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science*, **282**(5389), 737-740.
- Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S. W., Bunnett, N. W. und Steinhoff, M. (2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*, **86**(4), 1309-1379.

- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. und Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, **459**(7245), 356-363.
- Rossman, K. L., Der, C. J. und Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**(2), 167-180.
- Sabath, E., Negoro, H., Beaudry, S., Paniagua, M., Angelow, S., Shah, J., Grammatikakis, N., Yu, A. S. und Denker, B. M. (2008). Galpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly. *J Cell Sci*, **121**(Pt 6), 814-824.
- Saha, C., Nigam, S. K. und Denker, B. M. (1998). Involvement of Galphai2 in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junctions. *J Biol Chem*, **273**(34), 21629-21633.
- Saha, C., Nigam, S. K. und Denker, B. M. (2001). Expanding role of G proteins in tight junction regulation: Galpha(s) stimulates TJ assembly. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**(2), 250-256.
- Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S. M., Suemoto, T., Higuchi, M. und Saido, T. C. (2005). Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med*, **11**(4), 434-439.
- Samson, W. K., Zhang, J. V., Avsian-Kretchmer, O., Cui, K., Yosten, G. L., Klein, C., Lyu, R. M., Wang, Y. X., Chen, X. Q., Yang, J., Price, C. J., Hoyda, T. D., Ferguson, A. V., Yuan, X. B., Chang, J. K. und Hsueh, A. J. (2008). Neuronostatin encoded by the somatostatin gene regulates neuronal, cardiovascular, and metabolic functions. *J Biol Chem*, **283**(46), 31949-31959.
- Santoro, M. M. und Gaudino, G. (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res*, **304**(1), 274-286.
- Saraceno, R., Kleyn, C. E., Terenghi, G. und Griffiths, C. E. (2006). The role of neuropeptides in psoriasis. *Br J Dermatol*, **155**(5), 876-882.
- Satoh, Y., Saitoh, D., Takeuchi, A., Ojima, K., Kouzu, K., Kawakami, S., Ito, M., Ishihara, M., Sato, S. und Takishima, K. (2009). ERK2 dependent signaling contributes to wound healing after a partial-thickness burn. *Biochem Biophys Res Commun*, **381**(1), 118-122.
- Sauer, B., Vogler, R., Zimmermann, K., Fujii, M., Anzano, M. B., Schafer-Korting, M., Roberts, A. B. und Kleuser, B. (2004). Lysophosphatidic acid interacts with transforming growth factor-beta signaling to mediate keratinocyte growth arrest and chemotaxis. *J Invest Dermatol*, **123**(5), 840-849.
- Schäfer, M. und Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(8), 628-638.
- Schally, A. V. (1988). Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res*, **48**(24 Pt 1), 6977-6985.
- Schally, A. V., Dupont, A., Arimura, A., Redding, T. W., Nishi, N., Linthicum, G. L. und Schlesinger, D. H. (1976). Isolation and structure of somatostatin from porcine hypothalami. *Biochemistry*, **15**(3), 509-514.
- Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W., Hofmann, K. P. und Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, **455**(7212), 497-502.
- Schindler, M., Humphrey, P. P. und Emson, P. C. (1996). Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, **50**(1), 9-47.
- Schonbrunn, A. (2008). Selective agonism in somatostatin receptor signaling and regulation. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 35-39.

- Schuppel, M., Kurschner, U., Kleuser, U., Schafer-Korting, M. und Kleuser, B. (2008). Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype. *J Invest Dermatol*, **128**(7), 1747-1756.
- Schwab, R. E., Froidevaux, S., Paku, S., Tejada, M., Szende, B., Pap, A., Beglinger, C., Eberle, A. N. und Keri, G. (2001). Antiproliferative efficacy of the somatostatin analogue TT-232 in human melanoma cells and tumours. *Anticancer Res*, **21**(1A), 71-75.
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U. und Gaul, U. (2005). GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in drosophila. *Cell*, **123**(1), 133-144.
- Scott, J. R., Muangman, P. und Gibran, N. S. (2007). Making sense of hypertrophic scar: a role for nerves. *Wound Repair Regen*, **15**(1), S27-31.
- Scott, M. C., Wakamatsu, K., Ito, S., Kadakaru, A. L., Kobayashi, N., Groden, J., Kavanagh, R., Takakuwa, T., Virador, V., Hearing, V. J. und Abdel-Malek, Z. A. (2002). Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci*, **115**(Pt 11), 2349-2355.
- Seamon, K. B., Padgett, W. und Daly, J. W. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**(6), 3363-3367.
- Seasholtz, T. M., Majumdar, M. und Brown, J. H. (1999). Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol*, **55**(6), 949-956.
- Segre, J. A. (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest*, **116**(5), 1150-1158.
- Senapati, A., Anand, P., McGregor, G. P., Ghatei, M. A., Thompson, R. P. und Bloom, S. R. (1986). Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. *Neurosci Lett*, **71**(1), 101-105.
- Shan, D., Chen, L., Wang, D., Tan, Y. C., Gu, J. L. und Huang, X. Y. (2006). The G protein G alpha(13) is required for growth factor-induced cell migration. *Dev Cell*, **10**(6), 707-718.
- Sharma, K., Patel, Y. C. und Srikant, C. B. (1996). Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol*, **10**(12), 1688-1696.
- Shen, L., Weber, C. R. und Turner, J. R. (2008). The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol*, **181**(4), 683-695.
- Shen, L. P. und Rutter, W. J. (1984). Sequence of the human somatostatin I gene. *Science*, **224**(4645), 168-171.
- Shin, D. M., Luo, X., Wilkie, T. M., Miller, L. J., Peck, A. B., Humphreys-Beher, M. G. und Muallem, S. (2001). Polarized expression of G protein-coupled receptors and an all-or-none discharge of Ca²⁺ pools at initiation sites of [Ca²⁺]_i waves in polarized exocrine cells. *J Biol Chem*, **276**(47), 44146-44156.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. und Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, **252**(5007), 802-808.
- Singer, A. J. und Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, **341**(10), 738-746.
- Sinisi, A. A., Bellastella, A., Prezioso, D., Nicchio, M. R., Lotti, T., Salvatore, M. und Pasquali, D. (1997). Different expression patterns of somatostatin receptor subtypes in cultured epithelial cells from human normal prostate and prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**(8), 2566-2569.
- Sivamani, R. K., Pullar, C. E., Manabat-Hidalgo, C. G., Rocke, D. M., Carlsen, R. C., Greenhalgh, D. G. und Isseroff, R. R. (2009). Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. *PLoS Med*, **6**(1), e12.

- Slominski, A., Pisarchik, A., Zbytek, B., Tobin, D. J., Kauser, S. und Wortsman, J. (2003). Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol*, **196**(1), 144-153.
- Slominski, A. und Wortsman, J. (2000). Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev*, **21**(5), 457-487.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E. und Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, **12**(3), 112-120.
- Smrcka, A. V. (2008). G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*, **65**(14), 2191-2214.
- Sohier, J., Jeanmougin, M., Lombrail, P. und Passa, P. (1980). Rapid improvement of skin lesions in glucagonomas with intravenous somatostatin infusion. *Lancet*, **1**(8158), 40.
- Staniek, V., Misery, L., Dezutter-Dambuyant, C., Claudy, A. und Schmitt, D. (1995). Expression of neuropeptides on human epidermal Langerhans cells. *Adv Exp Med Biol*, **378**, 147-150.
- Sternlicht, M. D. und Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 463-516.
- Stolz, B., Weckbecker, G., Smith-Jones, P. M., Albert, R., Raulf, F. und Bruns, C. (1998). The somatostatin receptor-targeted radiotherapeutic [90Y-DOTA-DPhe1, Tyr3]octreotide (90Y-SMT 487) eradicates experimental rat pancreatic CA 20948 tumours. *Eur J Nucl Med*, **25**(7), 668-674.
- Strowski, M. Z. und Blake, A. D. (2008). Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 169-179.
- Strowski, M. Z., Kohler, M., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Li, Z., Szalkowski, D., Gopal-Truter, S., Fisher, J. K., Schaeffer, J. M., Blake, A. D., Zhang, B. B. und Wilkinson, H. A. (2003). Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Mol Endocrinol*, **17**(1), 93-106.
- Strowski, M. Z., Parmar, R. M., Blake, A. D. und Schaeffer, J. M. (2000). Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*, **141**(1), 111-117.
- Stull, M. A., Pai, V., Vomachka, A. J., Marshall, A. M., Jacob, G. A. und Horseman, N. D. (2007). Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(42), 16708-16713.
- Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, H., Sakurada, S. und Takuwa, Y. (2003). Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol*, **23**(5), 1534-1545.
- Sullivan, T. P., Eaglstein, W. H., Davis, S. C. und Mertz, P. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*, **9**(2), 66-76.
- Sun, L. C., Luo, J., Mackey, L. V., Fuselier, J. A. und Coy, D. H. (2007). A conjugate of camptothecin and a somatostatin analog against prostate cancer cell invasion via a possible signaling pathway involving PI3K/Akt, alphaVbeta3/alphaVbeta5 and MMP-2/-9. *Cancer Lett*, **246**(1-2), 157-166.
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. und Kozasa, T. (2003). Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(2), 733-738.

- Taboubi, S., Milanini, J., Delamarre, E., Parat, F., Garrouste, F., Pommier, G., Takasaki, J., Hubaud, J. C., Kovacic, H. und Lehmann, M. (2007). Galpha(q/11)-coupled P2Y2 nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration. *Faseb J*, **21**(14), 4047-4058.
- Takahashi, H., Honma, M., Miyauchi, Y., Nakamura, S., Ishida-Yamamoto, A. und Iizuka, H. (2004). Cyclic AMP differentially regulates cell proliferation of normal human keratinocytes through ERK activation depending on the expression pattern of B-Raf. *Arch Dermatol Res*, **296**(2), 74-82.
- Takahashi, K., Nakanishi, S. und Imamura, S. (1993). Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. *J Invest Dermatol*, **101**(5), 646-651.
- Takahashi, M., Rikitake, Y., Nagamatsu, Y., Hara, T., Ikeda, W., Hirata, K. und Takai, Y. (2008). Sequential activation of Rap1 and Rac1 small G proteins by PDGF locally at leading edges of NIH3T3 cells. *Genes Cells*, **13**(6), 549-569.
- Takashima, S., Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takamura, M., Takata, S., Kaneko, S. und Takuwa, Y. (2008). G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc Res*, **79**(4), 689-697.
- Takuwa, Y. (2002). Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1582**(1-3), 112-120.
- Talme, T., Schultzberg, M., Sundqvist, K. G. und Marcusson, J. A. (1997). Colocalization of somatostatin- and HLA-DR-like immunoreactivity in dendritic cells of psoriatic skin. *Acta Derm Venereol*, **77**(5), 338-342.
- Talme, T., Schultzberg, M., Sundqvist, K. G. und Marcusson, J. A. (1999). Somatostatin- and factor XIIIa-immunoreactive cells in psoriasis during clobetasol propionate and calcipotriol treatment. *Acta Derm Venereol*, **79**(1), 44-48.
- Tang, V. W. (2006). Proteomic and bioinformatic analysis of epithelial tight junction reveals an unexpected cluster of synaptic molecules. *Biol Direct*, **1**, 37.
- Taniyama, Y., Suzuki, T., Mikami, Y., Moriya, T., Satomi, S. und Sasano, H. (2005). Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J*, **52**(5), 605-611.
- Tejeda, M., Gaal, D., Hullan, L., Csuka, O., Schwab, R., Szokoloczi, O. und Keri, G. (2006). A comparison of the tumor growth inhibitory effect of intermittent and continuous administration of the somatostatin structural derivative TT-232 in various human tumor models. *Anticancer Res*, **26**(4B), 3011-3015.
- Tejeda, M., Gaal, D., Hullan, L., Schwab, R., Szokoloczi, O. und Keri, G. (2007). Antitumor activity of the somatostatin structural derivative (TT-232), against mouse and human melanoma tumor models. *Anticancer Res*, **27**(6B), 4015-4019.
- Toda, M., Suzuki, T., Hosono, K., Kurihara, Y., Kurihara, H., Hayashi, I., Kitasato, H., Hoka, S. und Majima, M. (2008). Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. *Biomed Pharmacother*, **62**(6), 352-359.
- Torii, H., Tamaki, K. und Granstein, R. D. (1998). The effect of neuropeptides/hormones on Langerhans cells. *J Dermatol Sci*, **20**(1), 21-28.

- Torii, H., Yan, Z., Hosoi, J. und Granstein, R. D. (1997). Expression of neurotrophic factors and neuropeptide receptors by Langerhans cells and the Langerhans cell-like cell line XS52: further support for a functional relationship between Langerhans cells and epidermal nerves. *J Invest Dermatol*, **109**(4), 586-591.
- Tostivint, H., Lihrmann, I. und Vaudry, H. (2008). New insight into the molecular evolution of the somatostatin family. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 5-17.
- Tscharntke, M., Pofahl, R., Chrostek-Grashoff, A., Smyth, N., Niessen, C., Niemann, C., Hartwig, B., Herzog, V., Klein, H. W., Krieg, T., Brakebusch, C. und Haase, I. (2007). Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *J Cell Sci*, **120**(Pt 8), 1480-1490.
- Tsukita, S. und Furuse, M. (2002). Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol*, **14**(5), 531-536.
- Tsukita, S., Furuse, M. und Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(4), 285-293.
- Tsygankova, O. M., Prendergast, G. V., Puttaswamy, K., Wang, Y., Feldman, M. D., Wang, H., Brose, M. S. und Meinkoth, J. L. (2007). Downregulation of Rap1GAP contributes to Ras transformation. *Mol Cell Biol*, **27**(19), 6647-6658.
- Tu, C. L., Chang, W. und Bikle, D. D. (2001). The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem*, **276**(44), 41079-41085.
- Tunggal, J. A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Gunzel, D., Fromm, M., Kemler, R., Krieg, T. und Niessen, C. M. (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *Embo J*, **24**(6), 1146-1156.
- Turksen, K. und Troy, T. C. (2004). Barriers built on claudins. *J Cell Sci*, **117**(Pt 12), 2435-2447.
- Ueda, H., Itoh, H., Yamauchi, J., Morishita, R., Kaziro, Y., Kato, K. und Asano, T. (2000). G protein betagamma subunits induce stress fiber formation and focal adhesion assembly in a Rho-dependent manner in HeLa cells. *J Biol Chem*, **275**(3), 2098-2102.
- Ueda, H., Nagae, R., Kozawa, M., Morishita, R., Kimura, S., Nagase, T., Ohara, O., Yoshida, S. und Asano, T. (2008). Heterotrimeric G protein betagamma subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*, **283**(4), 1946-1953.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A. und Lubbert, H. (1998). Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett*, **424**(1-2), 63-68.
- Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M. und Mailman, R. B. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, **320**(1), 1-13.
- van Essen, M., Krenning, E. P., Kam, B. L., de Jong, M., Valkema, R. und Kwekkeboom, D. J. (2009). Peptide-receptor radionuclide therapy for endocrine tumors. *Nat Rev Endocrinol*, **5**(7), 382-393.
- Van Itallie, C., Rahner, C. und Anderson, J. M. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, **107**(10), 1319-1327.
- Van Leeuwen, F. N., Olivo, C., Grivell, S., Giepmans, B. N., Collard, J. G. und Moolenaar, W. H. (2003). Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*, **278**(1), 400-406.

- Vardaxis, N. J., Brans, T. A., Boon, M. E., Kreis, R. W. und Marres, L. M. (1997). Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat*, **190**(4), 601-611.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E. und Gaitanaris, G. A. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(8), 4903-4908.
- Venier, A., De Simone, C., Forni, L., Ghirlanda, G., Uccioli, L., Serri, F. und Frati, L. (1988). Treatment of severe psoriasis with somatostatin: four years of experience. *Arch Dermatol Res*, **280** S51-54.
- Viollet, C., Lepousez, G., Loudes, C., Videau, C., Simon, A. und Epelbaum, J. (2008). Somatostatinergic systems in brain: Networks and functions. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 75-87.
- Viollet, C., Vaillend, C., Videau, C., Bluet-Pajot, M. T., Ungerer, A., L'Heritier, A., Kopp, C., Potier, B., Billard, J., Schaeffer, J., Smith, R. G., Rohrer, S. P., Wilkinson, H., Zheng, H. und Epelbaum, J. (2000). Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci*, **12**(10), 3761-3770.
- Volante, M., Rosas, R., Allia, E., Granata, R., Baragli, A., Muccioli, G. und Papotti, M. (2008). Somatostatin, cortistatin and their receptors in tumours. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 219-229.
- Voorhees, J. J., Duell, E. A., Bass, L. J., Powell, J. A. und Harrell, E. R. (1972). The cyclic AMP system in normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, **59**(1), 114-120.
- Waddell, B. E., Calton, W. C., Jr., Steinberg, S. R. und Martindale, R. G. (1997). The adverse effects of octreotide on wound healing in rats. *Am Surg*, **63**(5), 446-449.
- Wang, H. L., Bogen, C., Reisine, T. und Dichter, M. (1989). Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(23), 9616-9620.
- Wang, X. P., Norman, M., Yang, J., Magnusson, J., Kreienkamp, H. J., Richter, D., DeMayo, F. J. und Brunnicardi, F. C. (2006). Alterations in glucose homeostasis in SSTR1 gene-ablated mice. *Mol Cell Endocrinol*, **247**(1-2), 82-90.
- Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G. und Schertler, G. F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **454**(7203), 486-491.
- Watson, R. E., Poddar, R., Walker, J. M., McGuill, I., Hoare, L. M., Griffiths, C. E. und O'Neill, C. A. (2007). Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J Pathol*, **212**(4), 450-458.
- Weber, C. J., Jicha, D., Matz, S., Siverly, J., O'Dorisio, T., Strausberg, L., Laurencot, J., McLarty, A., Norton, J., Kazim, M. und et al. (1987). Passage of somatostatin analogue across human and mouse skin. *Surgery*, **102**(6), 974-981.
- Weber, G., Klughardt, G., Neidhardt, M., Galle, K., Frey, H. und Geiger, A. (1982). Treatment of psoriasis with somatostatin. *Arch Dermatol Res*, **272**(1-2), 31-36.
- Weckbecker, G., Lewis, I., Albert, R., Schmid, H. A., Hoyer, D. und Bruns, C. (2003). Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov*, **2**(12), 999-1017.
- Weckbecker, G., Liu, R., Tolcsvai, L. und Bruns, C. (1992). Antiproliferative effects of the somatostatin analogue octreotide (SMS 201-995) on ZR-75-1 human breast cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res*, **52**(18), 4973-4978.

- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T. und Stephens, L. R. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, **108**(6), 809-821.
- Werner, S. und Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, **83**(3), 835-870.
- Werner, S., Krieg, T. und Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*, **127**(5), 998-1008.
- Wray, C., Mao, Y., Pan, J., Chandrasena, A., Piasta, F. und Frank, J. A. (2009). Claudin 4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **297**(2), 219-227.
- Yacobova, E. und Komuro, H. (2002). Stage-specific control of neuronal migration by somatostatin. *Nature*, **415**(6867), 77-81.
- Yahata, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Yang, L., Dai, X., Tohyama, M., Tsuda, T., Sayama, K., Iwai, M., Horiuchi, M. und Hashimoto, K. (2006). A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J Biol Chem*, **281**(19), 13209-13216.
- Yamada, Y., Post, S. R., Wang, K., Tager, H. S., Bell, G. I. und Seino, S. (1992a). Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(1), 251-255.
- Yamada, Y., Reisine, T., Law, S. F., Ihara, Y., Kubota, A., Kagimoto, S., Seino, M., Seino, Y., Bell, G. I. und Seino, S. (1992b). Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol*, **6**(12), 2136-2142.
- Yamaguchi, Y., Hosokawa, K., Nakatani, Y., Sano, S., Yoshikawa, K. und Itami, S. (2002). Gastrin-releasing peptide, a bombesin-like neuropeptide, promotes cutaneous wound healing. *Dermatol Surg*, **28**(4), 314-319.
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Kokubu, H., Nishii, H., Okamoto, M., Sugawara, Y., Hirasawa, A., Tsujimoto, G. und Itoh, H. (2002). Endothelin suppresses cell migration via the JNK signaling pathway in a manner dependent upon Src kinase, Rac1, and Cdc42. *FEBS Lett*, **527**(1-3), 284-288.
- Yates, C. C., Whaley, D., Hooda, S., Hebda, P. A., Bodnar, R. J. und Wells, A. (2009). Delayed reepithelialization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3. *Wound Repair Regen*, **17**(1), 34-41.
- Yoshida, M., Takahashi, Y. und Inoue, S. (2000). Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H₂ receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol*, **114**(2), 334-342.
- Yoshida, Y., Morita, K., Mizoguchi, A., Ide, C. und Miyachi, Y. (2001). Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, **293**(5), 239-244.
- Yuki, T., Haratake, A., Koishikawa, H., Morita, K., Miyachi, Y. und Inoue, S. (2007). Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol*, **16**(4), 324-330.
- Yuspa, S. H., Kilkenny, A. E., Steinert, P. M. und Roop, D. R. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*, **109**(3), 1207-1217.

- Zavros, Y., Rathinavelu, S., Kao, J. Y., Todisco, A., Del Valle, J., Weinstock, J. V., Low, M. J. und Merchant, J. L. (2003). Treatment of *Helicobacter gastritis* with IL-4 requires somatostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(22), 12944-12949.
- Zeyda, T., Diehl, N., Paylor, R., Brennan, M. B. und Hochgeschwender, U. (2001). Impairment in motor learning of somatostatin null mutant mice. *Brain Res*, **906**(1-2), 107-114.
- Zeyda, T. und Hochgeschwender, U. (2008). Null mutant mouse models of somatostatin and cortistatin, and their receptors. *Mol Cell Endocrinol*, **286**(1-2), 18-25.
- Zhang, B., Chernoff, J. und Zheng, Y. (1998). Interaction of Rac1 with GTPase-activating proteins and putative effectors. A comparison with Cdc42 and RhoA. *J Biol Chem*, **273**(15), 8776-8782.
- Zhao, M., Song, B., Pu, J., Forrester, J. V. und McCaig, C. D. (2003). Direct visualization of a stratified epithelium reveals that wounds heal by unified sliding of cell sheets. *Faseb J*, **17**(3), 397-406.
- Zheng, H., Bailey, A., Jiang, M. H., Honda, K., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M., Leng, G. und Smith, R. G. (1997). Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol Endocrinol*, **11**(11), 1709-1717.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in den Arbeitsgruppen von
PD Dr. H.-J. Kreienkamp, Institut für Humangenetik, UKE (Institutsleitung: Prof. Dr. A. Gal)
PD Dr. J. Brandner, Klinik für Dermatologie und Venerologie (Klinikleitung: Prof. Dr. I. Moll)
Dr. U. Breitenbach, Beiersdorf AG (Leitung Hautforschung: Dr. H. Wenck)
im Zeitraum vom Mai 2006 – Juli 2009 angefertigt.

Ich danke Hans-Jürgen Kreienkamp, Johanna Brandner und Ute Breitenbach für die engagierte und qualifizierte Betreuung dieser Arbeit, viele konstruktive Ratschläge und Diskussionen sowie nicht zuletzt für die tolle Arbeitsatmosphäre. Durch ihre Unterstützung haben sie mir ein selbständiges, wissenschaftliches Arbeiten ermöglicht und mit ihrer Bereitschaft zu kooperativer Zusammenarbeit wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Hans-Jürgen Kreienkamp danke ich auch für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Prof. Dr. K. Wiese (Zoologisches Institut, Universität Hamburg) danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation.

Ich danke Carola Bauch, Corinna Sawallisch, Enno Gößling, Hans-Hinrich Hönck, Sabrina Sieber, Tarja Kokkola und allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik für ihre Hilfe und das freundschaftliche Arbeitsklima. Janin Schütt danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich danke Pia Houdek, Simone Pollok, Nina Kirschner, Ewa Wladykowski, Frank Fischer und allen Mitgliedern des Zellbiologischen Labors der Klinik für Dermatologie für viele Ratschläge und ihre Hilfe bei vielen Gelegenheiten.

Der Beiersdorf AG danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit und allen Mitarbeitern des Labors Trockene Haut für ihre Hilfsbereitschaft.

Zu guter Letzt danke ich Julia für ihre stetige Unterstützung.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich mich zu keiner Zeit anderweitig um Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Hamburg, den 20.07.2009

Matthias Vockel