

Nina Stephanie Wysocki

Dr. med.

Molekulare und immunologische Charakterisierung des neuen Aktivierungsmoleküls „pKe#83“ in humanen Keratinozyten

Geboren am 18.07.1971 in Heidelberg

Reifeprüfung am 11.05.1990 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991 bis WS 1998

Physikum am 15.03.1994 an der Universität Hamburg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 09.11.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M. D. Kramer

Um neue Gene zu isolieren, die an der Aktivierung von Keratinozyten beteiligt sind, wurde mittels subtraktiver Hybridisierung eine Genbank von ruhenden und aktivierten Keratinozyten erstellt. Die Aktivierung wurde mittels Dispase-vermittelter Ablösung von der Kulturmatrix induziert. Neben bekannten Aktivierungsmarkern wurden auch unbekannte cDNA-Sequenzen isoliert (*Schäfer et al., 2000*). Eine dieser unbekanntes - ca. 2.5 kBp großen - cDNA wurde als pKe#83 bezeichnet und im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Da die im Northern-Blot ermittelte Größe von pKe#83 ca. 4.5-5 kBp betrug, wurde die Gesamtsequenz mittels 5'- Race ermittelt. Aus der anschließend durchgeführten computergestützten Sequenzanalyse ergab sich für pKe#83 ein offener Leserahmen von 3228 Nukleotiden und eine Aminosäuresequenz von 1076 Aminosäuren mit einer C-terminalen Prenyl-Gruppen-Bindungsstelle sowie mehreren möglichen Myristoylierungs- und Phosphorylierungsstellen. Protein-Datenbanksuchen zeigten keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinsequenzen. Expressionsanalysen mittels rt-PCR bestätigten eine Aufregulation von pKe#83 in

normalen humanen epidermalen Keratinozyten nach Dispasebehandlung. Keratinozyten der Zelllinie HaCaT hingegen exprimierten pKe#83 bereits ohne Behandlung. Die Herstellung pKe#83 spezifischer Antikörper erfolgte gegen das rekombinante pKe#83-Teilprotein. Die durch Immunpräzipitation unter Verwendung pKe#83-spezifischer Antikörper ermittelte Größe des nativen pKe#83-Proteins aus HaCaT-Zellen betrug ca. 150 kDa. In der Immunzytologie war das pKe#83-Protein in ruhenden Keratinozyten nicht nachweisbar; erst nach Dispase-vermittelter Ablösung von der Kulturmatrix zeigte sich eine zytoplasmatische Immunreaktion. In eukaryontischen Zellen konnte nur das pKe#83-Teilprotein exprimiert werden. Die Expression des pKe#83-Gesamtproteins war lediglich im zellfreien System möglich.

Mit pKe#83 konnte in der vorliegenden Arbeit ein bisher unbekanntes Protein beschrieben werden, dessen Struktur und Expressionsverhalten vermuten lassen, dass es bei der Aktivierung von Keratinozyten eine Rolle spielt.