

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Tilgen

**Untersuchungen zur Charakterisierung des Vitamin D₃-Systems in humanen
Sebozyten in vitro**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2008

vorgelegt von: Christina Krämer, geb. Schuler

geb. am: 11.09.1978 in Illingen / Saar

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG | 4 |
| 2 | EINLEITUNG | 6 |
| 2.1 | 1,25(OH) ₂ D ₃ | 6 |
| 2.1.1 | Grundlagen..... | 6 |
| 2.1.2 | Extrarenaler Stoffwechsel..... | 16 |
| 2.1.3 | Physiologische Funktionen des 1,25(OH) ₂ D ₃ | 17 |
| 2.1.4 | Die Wirkung von Vitamin D ₃ auf Hautzellen und seine Bedeutung in der Dermatologie..... | 21 |
| 2.2 | SEBOZYTEN..... | 23 |
| 2.2.1 | Grundlage der Talgdrüse..... | 23 |
| 2.2.2 | Funktion der Sebozyten..... | 24 |
| 2.2.3 | Erkrankungen der Talgdrüsen..... | 25 |
| 2.2.4 | Entwicklung und Charakter von SZ95..... | 29 |
| 3 | ZIELSETZUNG UND EIGENE FRAGESTELLUNG | 31 |
| 4 | MATERIAL UND METHODIK | 32 |
| 4.1 | LISTE DER VERWENDETEN ARBEITSMATERIALIEN UND GERÄTE..... | 32 |
| 4.2 | ZELLEN UND ZELLKULTUR..... | 34 |
| 4.2.1 | SZ95..... | 34 |
| 4.2.2 | Mewo..... | 34 |
| 4.2.3 | Zellkultur..... | 34 |
| 4.3 | VERSUCHSMETHODEN..... | 36 |
| 4.3.1 | LightCycler® (Roche Applied Science)..... | 36 |
| 4.3.2 | Kristallviolett Assay (Crystal Violet Assay)..... | 40 |
| 4.3.3 | WST-1 Assay..... | 43 |
| 4.3.4 | Zellzyklusanalyse mit Propidium-Iodid-Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter)..... | 46 |
| 4.4 | DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG..... | 51 |
| 4.4.1 | Datenverarbeitung..... | 51 |
| 4.4.2 | Signifikanzberechnung..... | 51 |
| 5 | ERGEBNISSE | 52 |
| 5.1 | VORVERSUCHE..... | 52 |
| 5.1.1 | Optimierung der Zellzahl für die 96-well-Platte..... | 52 |
| 5.1.2 | Ermittlung der Toxizität von Ethanol auf SZ95..... | 53 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.1.3 | Untersuchung der BSA-Konzentration auf die Lebensfähigkeit und Proliferation von SZ95 | 54 |
| 5.1.4 | Ermittlung der optimalen BSA-Konzentration im Medium für eine optimale Vitamin D ₃ -Wirkung..... | 59 |
| 5.2 | BESTIMMUNG DER MRNA DES VDR UND DER ENZYME CYP27B1 UND CYP24A1 MITTELS DER REAL TIME PCR (LIGHTCYCLER VON ROCHE®) | 63 |
| 5.2.1 | Graphische Darstellung und Erörterung | 63 |
| 5.3 | EINFLUSS VON AKTIVEN VITAMIN D ₃ -METABOLITEN AUF DIE PROLIFERATION VON SZ95 (KRISTALLVIOLETT-ASSAY)..... | 68 |
| 5.3.1 | Graphische Darstellung und Erörterung der einzelnen Versuche | 68 |
| 5.3.2 | Zusammenfassung der Versuche und durchschnittliche Wachstumsänderungen | 70 |
| 5.3.3 | Statistische Interpretation..... | 73 |
| 5.4 | PRÜFUNG DER PROLIFERATION UND ZELLVITALITÄT MITTELS WST-1-ASSAY | 75 |
| 5.4.1 | Graphische Darstellung und Erörterung der einzelnen Versuche | 75 |
| 5.4.2 | Zusammenfassung der Versuche und durchschnittliche Wachstumshemmung | 77 |
| 5.4.3 | Statistische Interpretation..... | 80 |
| 5.5 | ZELLZYKLUSBESTIMMUNG MIT FACS | 81 |
| 5.5.1 | Graphische Darstellung und Erörterung der einzelnen Versuche | 81 |
| 5.5.2 | Zusammenfassung der Versuche mit SZ95 und mittlere Änderung des G1-Anteils..... | 87 |
| 5.5.3 | Statistische Interpretation der SZ95-Ergebnisse | 90 |
| 5.5.4 | Mewo | 91 |
| 6 | DISKUSSION..... | 95 |
| 6.1 | VORVERSUCHE..... | 95 |
| 6.2 | WIRKUNG VON 1,25(OH) ₂ D ₃ , EB1089 UND 25(OH)D ₃ AUF SZ95 | 96 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 102 |
| 8 | PUBLIKATIONEN UND DANKSAGUNG | 107 |
| 8.1 | PUBLIKATIONEN..... | 107 |
| 8.2 | DANKSAGUNG | 108 |
| 9 | ANHANG..... | 109 |
| 9.1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 109 |
| 9.2 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 110 |
| 9.3 | TABELLENVERZEICHNIS..... | 111 |
| 10 | LEBENS LAUF | 112 |

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob humane Sebozyten den Vitamin D-Rezeptor (VDR) exprimieren und mögliche Zielzellen für eine physiologische oder pharmakologische Wirkung von Vitamin D₃-Metaboliten darstellen. Zusätzlich wurde analysiert, ob Sebozyten über die enzymatische Ausstattung zur Synthese (Vitamin D₃-25-Hydroxylase [CYP27A1]; 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase [CYP27B1]) und zum Metabolismus (1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase [CYP24A1]) von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], dem biologisch aktiven Vitamin D₃-Metaboliten, verfügen. Unter Einsatz der „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte die RNA-Expression von VDR, CYP27A1, CYP27B1 und CYP24A1 in Sebozyten *in vitro* nachgewiesen werden. Inkubation von Sebozyten mit 1,25(OH)₂D₃ bewirkte eine zeit- und dosisabhängige Modulation von Zellproliferation und Zellzyklusregulation. Im Kristallviolett-Assay zeigte sich nach 120 Stunden Inkubation schnell proliferierender Sebozyten mit 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁶ mol/l oder 10⁻⁷ mol/l) eine Proliferationshemmung (55% bzw. 49%). Ähnliche Werte ergaben sich für das aktive Vitamin D₃-Analogon EB1089. Bei Konzentrationen von 10⁻¹⁰ mol/l war die Proliferationshemmung geringer (14% für 1,25(OH)₂D₃, 26% für EB1089). 25(OH)D₃, die Vorstufe des aktiven 1,25(OH)₂D₃, zeigte in hoher Konzentration (10⁻⁷ mol/l) eine geringe Wachstumshemmung von durchschnittlich 4%, welche möglicherweise durch eine intrazelluläre CYP27B1-vermittelte Umwandlung zu 1,25(OH)₂D₃ bedingt war. Zellzyklusuntersuchungen (FACS) zeigten, dass 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus induzieren. 1,25(OH)₂D₃ in Konzentrationen von 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l erhöhte den Anteil der Zellen in der G1-Phase nach 72 - 120 h um 9 - 18%. Bei EB1089 in denselben Konzentrationen liegen die Werte bei 7 - 14%. 25(OH)D₃ in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l beeinflusste den Anteil der Zellen in der G1-Phase nur geringfügig. Die Inkubation mit 1,25(OH)₂D₃ führte zu einer Steigerung der RNA-Expression von VDR und CYP24A1. Somit wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Sebozyten auf RNA-Ebene sowohl über den VDR als auch über die komplette enzymatische Ausstattung zur Synthese (CYP27A1 und CYP27B1) und zum Metabolismus (CYP24A1) von 1,25(OH)₂D₃ verfügen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine physiologische Funktion von Vitamin D₃-Metaboliten in Sebozyten. Es konnte gezeigt werden, dass Sebozyten mögliche Zielzellen für eine physiologische oder pharmakologische Wirkung von Vitamin D₃-Metaboliten darstellen. Es ist bislang unbekannt, inwiefern Veränderungen im Vitamin D₃-Stoffwechsel an der Pathogenese von talgdrüsenassoziierten Hauterkrankungen wie der Akne vulgaris oder der Rosacea beteiligt sind. In zukünftigen Untersuchungen muss analysiert werden, inwieweit talgdrüsenassoziierte Hauterkrankungen wie Akne vulgaris oder Rosacea durch biologisch aktive Vitamin D₃-Analoga oder durch pharmakologische Modulation des Vitamin D₃-Stoffwechsels therapeutisch beeinflusst werden können.

Summary

In this dissertation we researched if human sebocytes express the vitamin D receptor and if sebocytes are target cells for a physiological or pharmacological effect of vitamin D₃ metabolites. Additionally we researched if sebocytes possess the enzymes for the synthesis (vitamin D₃-25-hydroxylase [CYP27A1]; 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase [CYP27B1]) and the metabolism (1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase [CYP24A1]) of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], the biological active vitamin D₃ metabolite. Using the „real time“polymerase chain reaction (PCR), we detected the RNA expression of VDR, CYP27A1, CYP27B1 and CYP24A1 in sebocytes in vitro. The incubation of human sebocytes with 1,25(OH)₂D₃ shows a time and dosis dependent modulation of cell proliferation and cell cycle regulation. Analyses with the cristal violet assay showed an inhibition in cell proliferation (55% and 49%) after incubation of fast proliferating sebocytes with 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁶ mol/l and 10⁻⁷ mol/l). We achieved similar results with the active vitamin D₃ analog EB1089. The inhibition of cell proliferation was lower in concentration of 10⁻¹⁰ mol/l (14% as to 1,25(OH)₂D₃, 26% as to EB1089). 25(OH)D₃, the precursor of the active 1,25(OH)₂D₃, showed an inhibition in cell proliferation to a lesser extent (4%) in concentration of 10⁻⁷ mol/l. This effect may be caused by an intracellular, CYP27B1 assisted conversion to 1,25(OH)₂D₃. Cell cycle analyses showed, that 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 induce an arrest in the G1 phase of cell cycle. 1,25(OH)₂D₃ in concentrations of 10⁻⁶ mol/l and 10⁻⁷ mol/l enhanced the cell fraction in the G1 phase about 9% - 18% after 72 – 120 h. Incubation with EB1089 in the same concentrations enhanced the cell fraction in the G1 phase about 7% – 14%. 25(OH)D₃ in concentration of 10⁻⁷ mol/l had a minimal effect to the cell fraction in G1 phase. Incubation with 1,25(OH)₂D₃ provoked an increase in RNA expression of VDR and CYP24A1. In this dissertation we proved that sebocytes possess the RNA of vitamin D receptor. Additionally we showed that they possess the RNA of the complete enzymatical equipment for the synthesis (CYP27A1 und CYP27B1) and the metabolism (CYP24A1) of 1,25(OH)₂D₃. The results of our experiments argue for a physiological function of vitamin D₃ metabolites in human sebocytes. We showed that sebocytes are target cells for physiological and pharmacological effects of vitamin D₃ metabolites. So far it is unknown, to what extent changes in the vitamin D₃ metabolism are involved in sebocyte associated skin diseases like acne vulgaris or rosacea. Future research will show to what extent sebocyte associated skin diseases can be therapeutically influenced by biological active vitamin D₃ analogs or by pharmacological modulation in the vitamin D₃ metabolism.

2 Einleitung

2.1 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

2.1.1 Grundlagen

Einleitung:

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die Vitamine als Nahrungsbestandteile, die für eine normale Körperfunktion unverzichtbar sind, entdeckt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als wirksame Substanz bei der Behandlung der Rachitis mit Lebertran, wurde 1921 entdeckt (McCollum et al 1921). Gleichzeitig erkannte man, dass der gleiche therapeutische Effekt auch durch Bestrahlung mit UV-Licht möglich war. Die beiden wichtigsten Vertreter der D-Vitamine (Calciferole) in der Natur sind Vitamin D_2 (Ergocalciferol) und Vitamin D_3 (Cholecalciferol). Vitamin D_2 entsteht aus dem Provitamin Ergosterol, das nur in Pflanzen synthetisiert wird. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ leitet sich von dem Provitamin 7-Dehydrocholesterin ab, welches in tierischen Organismen aus Cholesterin synthetisiert werden kann. Deshalb hat es für den Menschen eine wesentlich größere Bedeutung als Vitamin D_2 . Vitamin D_3 nimmt also eine Sonderstellung unter den Vitaminen ein. Es kann sowohl mit der Nahrung aufgenommen werden, als auch – unter dem Einfluss von UV-Licht – im Körper selbst synthetisiert werden. Aufgrund der Eigenschaften des Vitamin D_3 , wie Fähigkeit zur Eigensynthese und endokrine Kontrolle der Eigensynthese, werden die biologisch aktiven Metabolite des Vitamin D_3 heute zu den Hormonen gezählt.

Chemische Struktur und Eigenschaften:

Die Vitamine der D-Gruppe, oder Calciferole genannt, gehören zur Gruppe der Steroide. Der wichtigste Vertreter der Calciferole ist das Cholecalciferol oder Vitamin D_3 , welches selbst nicht biologisch aktiv ist, sondern als Prohormon Ausgangspunkt für die biologisch aktive Form, das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Calcitriol, $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol) ist. Das aktive $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besteht aus einem Steroidgerüst und einer Seitenkette, die die spezifischen Eigenschaften vermittelt. Seine Summenformel ist $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$, es hat eine molare Masse von 384,64 g/mol und liegt bei Raumtemperatur in festem Aggregatzustand vor. Sein Schmelzpunkt liegt bei 113°C . Die Vorstufe des aktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, das $25(\text{OH})\text{D}_3$, ist nur schwach biologisch aktiv und spielt eine Rolle als Speicherform. Das in unseren Versuchen ebenfalls untersuchte EB1089 ist ein weniger kalzämisch wirkendes aktives Vitamin D_3 -Analogon und unterscheidet sich vom natürlichen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch drei Modifikationen an der Seitenkette.

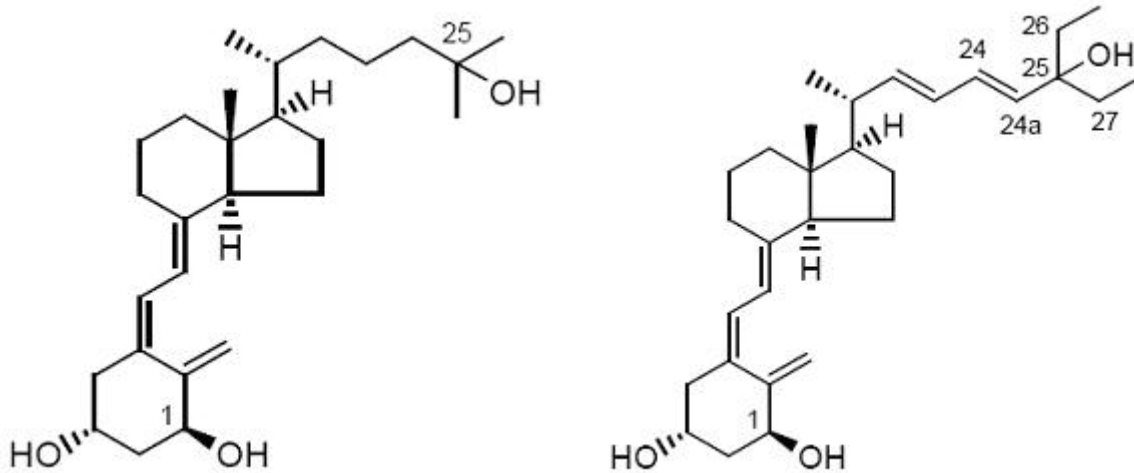


Abbildung 1: Strukturformeln für 1,25(OH)₂D₃ (links) und EB1089 (rechts)

Bedarf und Aufnahme mit der Nahrung:

Der tägliche Bedarf eines Erwachsenen an Vitamin D₃ beträgt 5 – 10 µg. Wie schon erwähnt, können Vitamine der D₃-Gruppe sowohl mit der Nahrung zugeführt werden, als auch vom Körper selbst synthetisiert werden. Der Anteil des benötigten Vitamin D₃, der durch die Nahrung aufgenommen wird, beträgt etwa 15 - 30% des Gesamtbedarfs. Absorbiert wird das fettlösliche Vitamin D₃ im Dünndarm. Es wird in Form von Micellen, welche von Gallensäuren gebildet werden, durch passive Diffusion in die Enterozyten aufgenommen. Die Absorption des Vitamin D₃ ist sehr effizient. 50% bis 80% des Vitamin D₃ in der Nahrung werden vom Darm aufgenommen. Die Enterozyten sezernieren Vitamin D₃ innerhalb von Chylomikronen in das Lymphsystem, wobei es mit dem Lymphstrom ins venöse System und somit über den Körperkreislauf zu den Zielzellen gelangt. Nahrungsmittel mit einem besonders hohen Gehalt an Vitamin D₃ sind Lebertran, Fischöle, Kalbfleisch, Hühnerei und Leber. Bei ausreichender Sonneneinstrahlung auf die Haut ist die Aufnahme mit der Nahrung von untergeordneter Bedeutung. Ein gesunder Erwachsener kann seinen kompletten Bedarf an Vitamin D₃ durch ausreichende Sonnenexposition decken. 1 cm² Haut kann in einer Stunde 10 IE 1,25(OH)₂D₃ bilden (1 IE Calcitriol = 0,025 µg). Das heißt 20 cm² Haut produzieren in einer Stunde ungefähr den Tagesbedarf eines Erwachsenen. Bei Neugeborenen ist heute eine Prophylaxe mit 500 IE 1,25(OH)₂D₃ (12,5 µg) täglich Standard, um dem erhöhten Bedarf im Rahmen des Knochenwachstums gerecht zu werden.

Normalwerte:

Die normalen Werte für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Plasma betragen 16 – 70 ng/L für Erwachsene und 20 – 84 ng/L für Kinder. Die mit Abstand größte Konzentration der Hormone der Vitamin D_3 -Gruppe im Plasma hat das $25(\text{OH})\text{D}_3$. Es stellt eine Speicherform dar und wird häufig – aufgrund der besseren Bestimmbarkeit im Serum – zur Beurteilung des Vitamin D_3 -Haushaltes herangezogen.

Synthese im Körper:

Das Ausgangsmolekül der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese ist das Steroid Cholesterin, das durch das Enzym Cholesterindehydrogenase in den Hepatozyten zu 7-Dehydrocholesterol metabolisiert wird. Dieses gelangt über den Blutweg zu den Keratinozyten der Haut. In der Haut wird der B-Ring des 7-Dehydrocholesterol zwischen C9 und C10 des Steroidgerüsts durch die Einwirkung von UVB-Licht der Wellenlänge 290 – 315 nm aufgebrochen. Durch diese photochemische Isomerisierung entsteht zunächst das rotationsinstabile Prävitamin D_3 , welches dann in einem temperaturabhängigen Schritt spontan durch die Verschiebung eines Wasserstoffatoms in das stabile (Pro)Vitamin D_3 , auch Cholecalciferol oder Calciferol genannt, überführt wird (Esvelt et al 1978). Die Vitamin D_3 -Synthese findet in allen Schichten der Haut statt, hauptsächlich jedoch im Stratum basale und im Stratum spinosum (Holick et al 1980). Das Vitamin D_3 wird aus den Zellen ausgeschleust – wobei der genaue Mechanismus noch nicht völlig geklärt ist – und an Vitamin D-bindende Proteine (DBP) gebunden (Haddad et al 1993). Das Vitamin D_3 , welches in der Haut gebildet oder mit der Nahrung aufgenommen wurde, muss in zwei Schritten durch Hydroxylierung aktiviert werden. Der erste Aktivierungsschritt erfolgt in den Hepatozyten der Leber, wohin das Vitamin D_3 über den Blutweg, gebunden an Vitamin D-bindende Proteine und an Albumin, transportiert wird. Das Vitamin D_3 wird dort vorwiegend in Mitochondrien und Mikrosomen durch eine Cytochrom P450-abhängige mitochondriale Hydroxylase (CYP27A1) am C25-Atom zu 25-Hydroxycholecalciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$), auch Calcidiol genannt, hydroxyliert. Dieser Schritt wird durch eine Produkt-hemmungsreaktion reguliert. Schließlich gelangt $25(\text{OH})\text{D}_3$ über den Blutweg in die Niere und wird dort zusammen mit dem DBP primär filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert. In den Mitochondrien der Tubuluszellen wird das $25(\text{OH})\text{D}_3$ im zweiten Aktivierungsschritt ebenfalls durch eine Cytochrom P450-abhängige mitochondriale Hydroxylase (CYP27B1), am C₁-Atom hydroxyliert. Es entsteht das biologisch wirksame $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). An dieser zweiten Hydroxylierung zum aktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ greift der entscheidende Regulationsmechanismus zur Vermeidung einer Überproduktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein. Gesteuert wird dies über eine Produkthemmung des Enzyms CYP27B, also der Regulierung der 25-Hydroxyvitamin D_3 -1 α -Hydroxylierung.

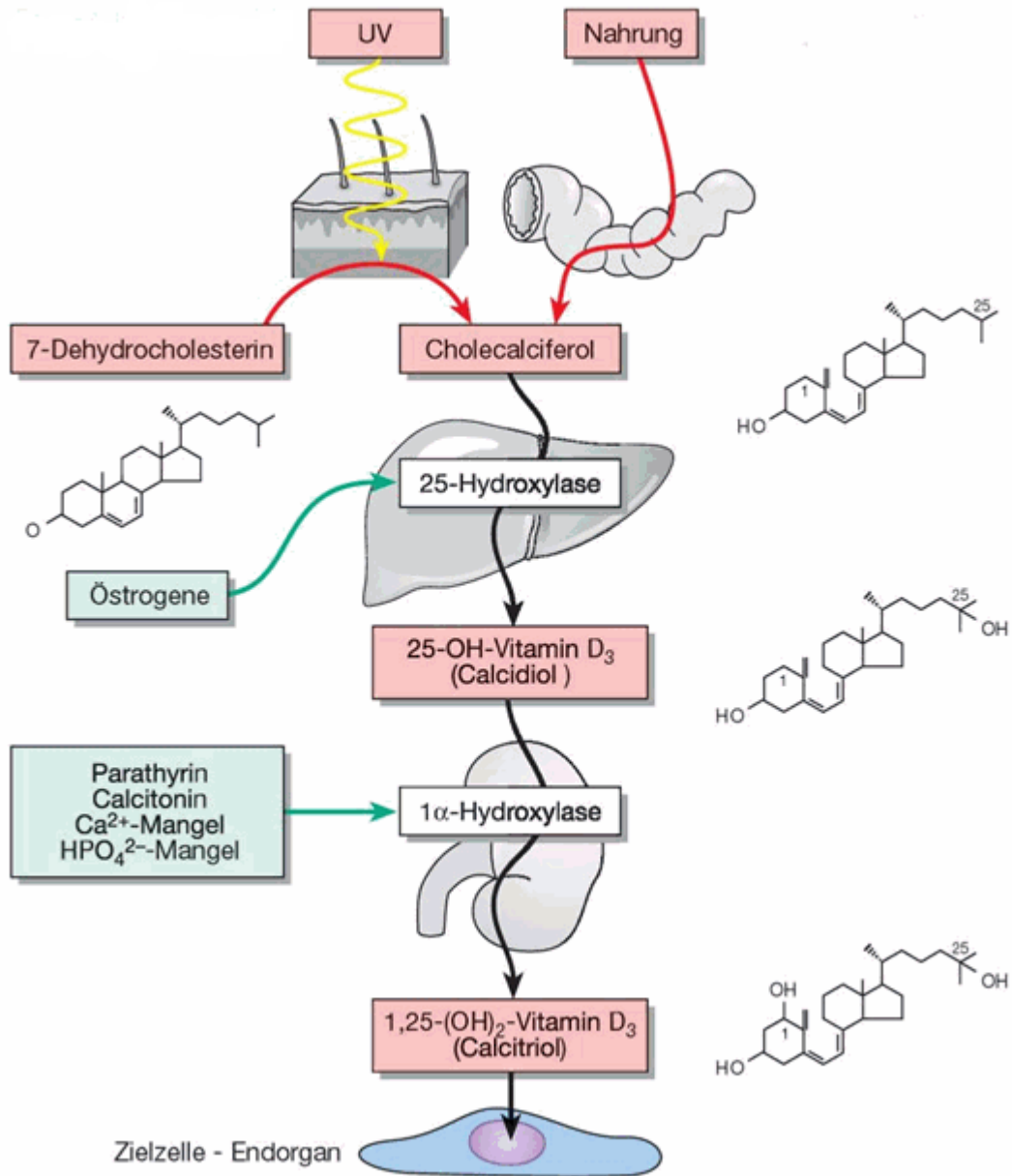


Abbildung 2: Bildung von 1a,25-Dihydroxycholecalciferol (Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag; Deetjen Speckmann, Hescheler: Physiologie 4. Auflage 2004)

Die Rolle der Cytochrom P450-Enzyme in der Bioaktivierung von Vitamin D₃:

Wie bereits erwähnt wurde, erfordert die Aktivierung des Provitamin D₃ zum aktiven 1,25(OH)₂D₃ eine 25-Hydroxylierung in der Leber gefolgt von einer 1 α -Hydroxylierung in der Niere. Für diese Aufgabe sind verschiedene Enzyme notwendig, welche zu der großen Gruppe von P450-Enzymen gehören. Dies sind Hämproteine, die Monooxygenasereaktionen katalysieren, das heißt die Insertion von einem Atom Sauerstoff in ein Substrat. Cytochrom P450-Enzyme in eukaryoten Zellen sind membrangebunden und wirken zum Beispiel mit bei der Steroidhormonsynthese, der Gallensäurenproduktion, der Vitamin D₃-Aktivierung und im Arachidonsäurestoffwechsel. Andere Cytochrom P450-Enzyme wirken bei der Verstoffwechselung von Drogen und Medikamenten mit, indem sie diese wasserlöslich und somit besser ausscheidbar machen. Manche Enzyme werden auch von Medikamenten und anderen Stoffen induziert, wie von Phenobarbital, Ethanol und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Die Cytochrom P450-Enzyme des Säugers können in zwei Klassen eingeteilt werden. Die eine Gruppe kommt in Mitochondrien vor und katalysiert spezifische Reaktionen im Steroidhormonstoffwechsel und bei der Gallensäuresynthese. Die andere Gruppe kommt gebunden ans Endoplasmatische Retikulum (Mikrosomenfraktion) vor. Diese zweite Gruppe kann wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden. Eine Untergruppe ist verantwortlich für den Steroidhormon- und Cholesterol-Stoffwechsel, die andere katalysiert bestimmte Reaktionen von Drogen und anderen Fremdstoffen. In den beiden Gruppen – mitochondriale und mikrosomegebundene Cytochrom P450-Enzyme – sind die Elektronentransportwege von NADPH zum Cytochrom P450 unterschiedlich. Beim mitochondrialen Transport spielt das Flavoprotein Ferridoxinreduktase und das Eisen-Schwefel-Protein Ferridoxin eine wichtige Rolle.

25-Hydroxylierung des Vitamin D₃:

Das Enzym, welches die 25-Hydroxylierung des Vitamin D₃ katalysiert, existiert sowohl in Mitochondrien als auch in Mikrosomen von Leberzellen. 1984 konnte das mitochondriale Enzym isoliert werden. Gleichzeitig stellte man fest, dass es auch die 27-Hydroxylierung von Cholesterol und C27-Steroiden in der Gallensäurebiosynthese katalysierte (Wikvall et al 1984). Einige Jahre später konnte erneut bewiesen werden, dass dieses Enzym, das CYP27A1 genannt wurde, die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ in der Leber katalysierte. Vor einigen Jahren wurde eine mikrosomale Vitamin D₃-25-Hydroxylase aus Schweineleber isoliert (Postlind et al 1997). Sie zeigte große Ähnlichkeit mit den Enzymen der CYP2D-Subfamilie. Diese mikrosomale 25-Hydroxylase wurde CYP2D25 genannt.

1 α -Hydroxylierung des Vitamin D₃:

Bei der 1 α -Hydroxylierung des 25(OH)D₃ in der Niere spielt das mitochondriale Enzym CYP27B1 die Hauptrolle. Man hat herausgefunden dass auch das Enzym CYP27A1, welches die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ katalysiert eine – wenn auch weniger bedeutende – 1 α -Hydroxylaseaktivität besitzt. Außerdem existiert ein mikrosomales Enzym mit 1 α -Hydroxylaseaktivität, welches aus der Mikrosomenfraktion von Schweinenieren isoliert wurde (Axen et al 1994).

Deaktivierung und Abbau:

Wenn zuviel 1,25(OH)₂D₃ vorliegt, wird aus 25(OH)D₃ in der Niere durch ein Cytochrom P450-abhängiges Enzym, der CYP24A1, der Metabolit 24,25(OH)₂D₃ gebildet. Dieses hat eine 10.000mal geringere Aktivität als das 1,25(OH)₂D₃. Die Inaktivierung des 1,25(OH)₂D₃ erfolgt ebenfalls über eine 24-Hydroxylierung. Dabei entsteht 1,24,25(OH)₃D₃, welches eine fünfmal geringere Aktivität besitzt als sein Ausgangsprodukt. Die 24-Hydroxylierung stellt beim Abbau des 1,25(OH)₂D₃ also den entscheidenden Schritt dar. Andere Abbauprodukte von 1,25(OH)₂D₃ sind Calcitronsäure und das Lacton 1 α ,25R-(OH)₂-26,23S-Lacton-Cholecalciferol. Die Abbauprodukte des 1,25(OH)₂D₃ und seiner Metabolite werden primär über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden.

Regulation der Biosynthese:

Die Biosynthese und vor allem die Konzentration des freien 1,25(OH)₂D₃ sind im Körper streng reguliert. Wichtigster Faktor zur Synthese von 1,25(OH)₂D₃ ist das Parathormon (PTH). Beim Absinken des Kalziumspiegels im Blut wird PTH von den Epithelkörperchen vermehrt sezerniert. Es bewirkt über einen Mechanismus, der bisher noch nicht näher bekannt ist, eine Stimulierung der Hydroxylaseaktivität der Enzyme CYP27A1 und CYP27B1 sowie eine Hemmung des Enzyms CYP24A1, wodurch vermehrt 1,25(OH)₂D₃ gebildet wird. Eine Erhöhung des Blutkalziumspiegels hingegen hat durch die verminderte PTH-Sezernierung gegenteilige Effekte auf die entsprechenden Enzyme und die 1,25(OH)₂D₃-Bildung. Einen regulatorischen Einfluss haben neben PTH auch noch 1,25(OH)₂D₃ selbst und der Plasmaphosphatspiegel. So stimuliert 1,25(OH)₂D₃ bei einem Überangebot die Aktivität der CYP24A1 und so seine eigene Inaktivierung (Zierold et al 1994). Hypophosphatämie wirkt wahrscheinlich ähnlich wie PTH. Es stimuliert die 25- und 1 α -Hydroxylierung und hemmt die 24-Hydroxylierung (Baxter und DeLuca 1976; Wu et al 1996). Indirekt, meist über das Parathormon, beeinflussen außer den genannten Substanzen Östrogene, Glucocorticoide, Calcitonin, Wachstumshormon und Prolactin die Bildung von 1,25(OH)₂D₃.

Transport im Blut:

Vitamin D₃ und seine Metabolite werden im Blut in gebundener Form transportiert. Wichtigste Transportproteine sind die Vitamin D-bindenden Proteine (DBP, Transcalfiferin). Sie werden in der Leber synthetisiert und liegen im Plasma in freier Form vor. Sie bilden eine Gruppe aus mehreren sehr ähnlichen α -Globulinen und haben eine hohe Bindungsaffinität zu 1,25(OH)₂D₃ und seinen Metaboliten. Ein Teil des Vitamin D₃ ist auch an Albumin gebunden. Es ist zu beachten, dass über 99% des 1,25(OH)₂D₃ in gebundener Form vorliegt. Nur ca. 0,4% liegt frei im Plasma vor. Während 25(OH)D₃ eine Halbwertszeit von 15 Tagen hat, beträgt die des 1,25(OH)₂D₃ nur wenige Stunden.

Vitamin D-Rezeptoren:

1,25(OH)₂D₃ interagiert innerhalb der Zelle über zwei verschiedene Rezeptoren. Als Steroid-Abkömmling wirkt 1,25(OH)₂D₃ zum einen, indem es nach Bindung an einen nukleären Rezeptor die Transkription bestimmter Zielgene moduliert. Zum anderen wirkt 1,25(OH)₂D₃ über einen plasmamembranständigen Rezeptor, der unter anderem für die schnelle Kalziumaufnahme intestinaler Zellen verantwortlich ist.

a) Vitamin D₃-Rezeptor (VDR):

1,25(OH)₂D₃ wird an DBP gebunden zu den Zielzellen transportiert. Dort wird es über einen DBP-Rezeptor durch Phagozytose in die Zielzelle geschleust. In der Zelle löst es sich vom Protein und diffundiert aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in den Zellkern, wo es an seinen spezifischen Rezeptor, den Vitamin D₃-Rezeptor (VDR) bindet. Der VDR gehört zur Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren, die zu den Kernrezeptoren gehören. Der VDR findet man also überwiegend im Zellkern, jedoch existieren Studien, die den VDR auch im Cytosol nachgewiesen haben (Sher et al 1981; Walters et al 1982; Walters et al 1986). Dort liegt er in der unbesetzten Form vor und steht im Konzentrationsgleichgewicht mit dem Zellkern (Pike et al 1983; Barsony et al 1990). Man fand heraus, dass der VDR im Cytoplasma vor allem im Golgiapparat, im endoplasmatischen Reticulum und in Mikrotubuli vorkommt, jedoch nicht in der Plasmamembran (Barsony et al 1997). Der VDR reguliert die Transkription sowohl aktivierend als auch hemmend durch Bindung von hexameren Strukturen in der Promotorregion von Zielgenen, den VDREs (vitamin D responsive elements). Sie bestehen aus zwei kurzen Sequenzen mit je 6 Basen (half-sites). Diese zwei Hexamere sind entweder in direkter Folge gebaut (DR, Direct Repeat) oder durch Pallindromsequenzen (IP, Inverted Pallindromic) unterbrochen gebaut. VDREs wurden in den Promotorregionen der Gene von Osteocalcin, Osteopontin, CYP24A1 und PTH gefunden.

Das Gen für den VDR des Menschen liegt auf dem Chromosom 12q12-q14 (Faraco et al 1989; Szpirer et al 1991). Ein Gendefekt des VDR führt zur Vitamin D-resistenten Rachitis

Typ 2 und wahrscheinlich zur involutiven Osteoporose. Betrachtet man die Aminosäuresequenz des VDR, zeigt sie große Ähnlichkeit mit anderen Kernrezeptoren wie dem Glucocorticoidrezeptor (GR), Östrogenrezeptor (ER), Androgenrezeptor (AR), Progesteronrezeptor (PR), Thyroidhormonrezeptor (T_3R), Retinoidrezeptor (RAR), Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und weiteren Rezeptoren (Evans RM 1988).

Der VDR besteht - wie auch andere Steroidrezeptoren - aus fünf wichtigen Modulen:

- DNA-bindende Domäne (DBD)
- Ligand-bindende Domäne (LBD)
- A/B-Domäne
- Hinge-Region
- AF-2-Region

Die DNA-bindende Domäne besteht aus den Aminosäuren 22 - 114. Sie bildet zwei Zinkfingerstrukturen zur Bindung an die DNA. Spezielle „Vitamin D Responsive Elements“ (VDRE) besitzen Strukturen, die mit einem Zinkfinger über eine P-box in Verbindung stehen. Man fand heraus, dass die DBD einiger Rezeptoren mit den Aminosäuren, die den Zinkfinger umschließen, zwei n-terminale α -Helices formen (N1 und N2). Die erste Helix liegt über einer Fuge, in die die DNA eingelagert wird und hat Kontakt zu den VDREs.

Die Ligand-bindende Domäne ist unter den nukleären Hormonrezeptoren sehr variabel. An die Ligand-bindende Domäne (Aminosäure 166 - 402) docken $1,25(OH)_2D_3$ und seine Metabolite an. Sie wird von 12 α -Helices gebildet. Helix 12 umschließt den Liganden nach seiner Bindung. Dabei liegt der A-Ring des $1,25(OH)_2D_3$ in der ligandbindenden Tasche. Die Untersuchung von Modellen des VDR, der verschiedene Liganden – darunter EB1089, MC 903 und KH 1060 – gebunden hatte, ließ darauf schließen, dass die LBD sich an die verschiedenen Seitenketten anpassen kann. Untereinheiten der LBD spielen eine Rolle in Signaltransduktion, Dimerisation und Interaktion mit dem Transkriptionskomplex.

Die n-terminale A/B-Domäne (Aminosäure 1 – 22) variiert innerhalb der Menschheit sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der Größe. Die A/B-Domäne enthält die AF-1-Domäne, eine die Transkription aktivierende Struktur, die im Gegensatz zur AF-2-Domäne unabhängig von einem Liganden arbeitet. Die Hinge-Region (Aminosäuren 114 – 16) ist der Teil der Aminosäuresequenz zwischen LBD und DBD. Sie kann durch die Bindung von Liganden und folgender Strukturänderung die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren modulieren.

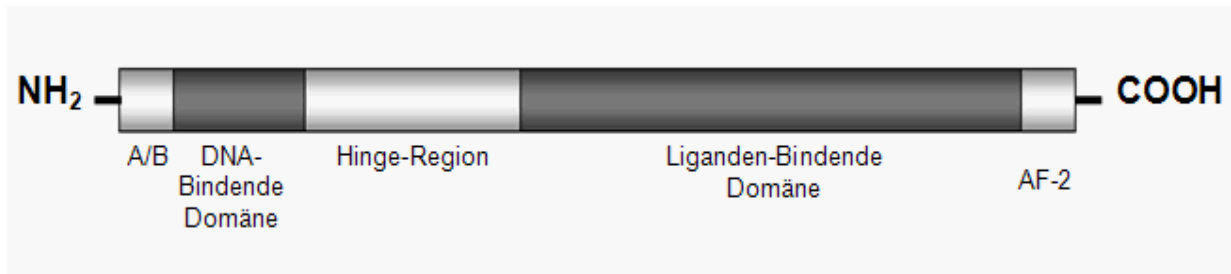


Abbildung 3: VDR

Die Regulatorfunktion des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und seinen Derivaten basieren auf Liganden-vermittelten Protein-Protein-Interaktionen der Liganden-bindenden Domäne (LBD) des VDR mit einem Coaktivator (CoA), einem Corepressor (CoR) und anderen Kernproteinen. Der VDR kann an Serinresten der DBD oder der LBD phosphoryliert werden. Dies verändert z.B. die Bindungsfähigkeit des Rezeptors für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

VDR-Reaktionen bei Abwesenheit eines Liganden:

Bei Abwesenheit eines Liganden interagiert der VDR mit CoR-Proteinen (z.B. NCoR), welche eine Affinität für bestimmte Enzyme, den Histonacetylasen (HDACs), haben. Diese HDACs hemmen die Acetylierung der lysinreichen Anteile der Histone 3 und 4 der Nucleosomen entsprechender DNA. Dieses erhöht ihre positive Ladung und so die Affinität zu negativ geladener DNA. Also beeinflusst der VDR ohne Bindung eines Liganden die Kondensation des Chromatins an bestimmten Zielgenen.

VDR-Reaktionen in Anwesenheit eines Liganden:

Bei Anwesenheit eines Liganden macht die LBD des VDR eine Konformationsänderung durch, welche dazu führt, dass CoR-Protein dissoziieren und CoA-Proteine binden. CoA-Proteine verursachen zwei verschiedene Reaktionen. Die erste Gruppe interagiert mit Histonacetylasen, welche die Zahl der positiven Ladungen der DNA vermindern und somit die Affinität der Nucleosomen für die DNA herabsetzen. Also kann der Liganden-gebundene VDR das Chromatin an bestimmten Zielgenen öffnen. Bei der anderen Gruppe der CoA-Proteine sind diese Teil eines aus ca. 15 Teilen bestehenden größeren Proteinkomplexes, welcher eine Brücke zum Transkriptionskomplex bildet und somit die Transkription aktiviert.

Homodimere und Heterodimere des VDR:

Der VDR kann in Form von VDR-VDR-Homodimeren vorkommen, welche in Abwesenheit eines Liganden an die DNA gebunden vorliegen und somit die Transkription des Gens blockieren können. Lagert sich hier ein Ligand an, verändert das Homodimer seine Tertiärstruktur und die Bindung wird destabilisiert. Folge ist, dass ein VDR durch einen Retinsäurerezeptor

tor des Typs RXR ersetzt wird. Die so entstandenen Dimere VDR-RXR wirken aktivierend auf die Transkription. Auch ohne Ligand ist der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein wichtiger Bindungspartner des VDR. VDR-RXR-Heterodimere haben auch ohne Ligand eine hohe Affinität zur DNA, welche mit VDREs in Verbindung steht.

Polymorphismen des VDR:

Es gibt viele Allele des VDR-Gens auf Chromosom 12 innerhalb der menschlichen Bevölkerung, abhängig z.B. von Herkunft und ethnischer Zugehörigkeit. Die Unterschiede gehen mit unterschiedlicher Knochendichte, Neigung zu Hyperparathyreoidismus, Ansprechen auf Vitamin D-Therapie, Infektanfälligkeit und Neigung zu bestimmten Autoimmunerkrankungen sowie malignen Erkrankungen einher.

b) Plasmamembranständiger Vitamin-D₃-Rezeptor:

Ursprünglich ging man davon aus, dass Steroidhormone nur über einen Kernrezeptor wirken. Toffolo und Mitarbeiter berichteten über einen nach 30 Minuten beobachtbaren verbesserten Kalzium-Transport nach 1,25(OH)₂D₃-Gabe zu intestinalen Zellen der Ratte (Toffolo et al 1975). Einige Zeit später fand man erneut einen direkten, innerhalb von fünf Minuten auftretenden Effekt des 1,25(OH)₂D₃ auf die Kalziumaufnahme von intestinalen Zellen der Ratte (Nemere und Szego 1981) und postulierte die Existenz eines plasmamembranständigen Vitamin D₃-Rezeptors. Es stellt sich die Frage, ob der klassische VDR oder ein anderes Protein die plasmamembrangebundenen Reaktionen verantwortet. Später wurde gezeigt, dass es einen plasmamembranständigen Rezeptor für 1,25(OH)₂D₃ gibt, der für die hormonvermittelte schnelle Aufnahme von Kalzium und Phosphat in intestinale Zellen verantwortlich ist (Zhao et al 2002; Nemere et al 1996; Nemere et al 2004). Dieser wurde 1,25-D₃-MARRS-Rezeptor (1,25-D₃ membrane-associated rapid response steroid binding) genannt. Trotzdem wurde die Theorie des VDR als Membranrezeptor noch nicht zurückgeworfen. So zeigte sich eine Translokation des VDR vom Zellkern in die Mikrosomenfraktion von Hühnermyoblasten, nachdem sie eine Kurzzeitbehandlung mit 1,25(OH)₂D₃ erhielten, sowie eine erhöhte VDR-Menge in der Plasmamembran. Daraufhin vermutete man, auch der VDR könnte als membranständiger Rezeptor wirken, der für die schnellen 1,25(OH)₂D₃-Wirkungen verantwortlich ist (Capiati et al 2002).

Außerdem wurde entdeckt, dass der Verlust der DBD des VDR sowohl die genomischen als auch die nichtgenomischen Wirkungen des 1,25(OH)₂D₃ aufhebt (Erben et al 2002). Die Frage, ob der 1,25-D₃-MARRS-Rezeptor alleine oder auch der VDR plasmamembrangebundene Funktionen des 1,25(OH)₂D₃ vermittelt, wird weiter untersucht.

2.1.2 Extrarenaler Stoffwechsel

Mitte der 80er Jahre wurde gezeigt, dass mehrere extrarenale Zellen in vitro die Enzyme für die 1α -Hydroxylierung exprimieren und dass sie somit eine Konvertierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durchführen können (De Luca et al 1983). Mittlerweile geht man davon aus, dass die renalen und die extrarenalen Enzyme für die 1α -Hydroxylierung des Vitamin D_3 aus demselben Genprodukt stammen (Jones et al 1999). Jedoch gibt es Unterschiede in der Regulation von renaler und extrarenaler Synthese des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die in vitro Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde in folgenden extrarenalen Zellen festgestellt: Knochenzellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Makrophagen, Blutmonozyten, Plazentazellen, Prostatazellen, T-Lymphozyten und Karzinomzellen (Sarkom, Lymphom, Melanom, Lungen- und andere Tumoren) (Hewison et al 2000; Bikle et al 1986; Charhon et al 1985; Schwarz et al 1998; Cadranel et al 1990; Jones et al 1999). Des Weiteren wurden mehrere Gewebe mit 1α -Hydroxylaseaktivität gefunden, nämlich Parathyroidea, Pankreas, Nebennierenmark, Colon, Kleinhirn, Lymphknoten, Haarfollikel und Schweißdrüsen (Hewison et al 2000). Die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist in Niere und extrarenalen Geweben sehr ähnlich. Jedoch finden sich Unterschiede in der Regulierung der Aktivität der 25-Hydroxy-Vitamin D_3 - 1α -Hydroxylase (CYP27B1) und der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D_3 -24-Hydroxylase (CYP24A1). Die renale Synthese ist stark abhängig von den Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Dusso et al 1991), die extrarenale Synthese hingegen ist nicht so streng reguliert.

| CYP27B1 | CYP24A1 |
|--|--|
| PTH (+) | 1,25(OH) ₂ D ₃ (+) |
| Calcitonin (+) | |
| Kalzium (-) | |
| Phosphat (-) | |
| 1,25(OH) ₂ D ₃ (-) | |

Tabelle 1: Substanzen, die die Enzyme CYP27B1 (25-Hydroxy-Vitamin- D_3 - 1α -Hydroxylase) und CYP24A1 (1,25-Dihydroxy-Vitamin- D_3 -24-Hydroxylase) in der Niere fördern (+) und hemmen (-)

| CYP27B1 | CYP24A1 |
|--|--|
| PTH (+) Kalzium (-) 1,25(OH) ₂ D ₃ (-) | 1,25(OH) ₂ D ₃ (+) |

Tabelle 2: Substanzen, die die Enzyme CYP27B1 (25-Hydroxy-Vitamin-D₃-1 α -Hydroxylase) und CYP24A1 (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-24-Hydroxylase) in extrarenalen Geweben fördern (+) und hemmen (-)

Wie man sehen kann, wird das entscheidende 1,25(OH)₂D₃-abbauende Enzym, die CYP24A1, welche die 24-Hydroxylierung des 1,25(OH)₂D₃ katalysiert, von diesem selbst induziert. Jedoch ist in extrarenalen Zellen hierfür eine größere Menge 1,25(OH)₂D₃ erforderlich als in renalen Zellen (Bell 1998). Heute wird davon ausgegangen, dass das 1,25(OH)₂D₃, welches in extrarenalen Geweben produziert wird, einer autokrinen oder parakrinen Regulation unterliegt, die von den Zellen ausgeht, die es produzieren. Mitte der 90er Jahre entdeckte man, dass auch das Enzym für die 25-Hydroxylierung des 1,25(OH)₂D₃ (CYP27A1) nicht nur in der Leber vorkommt, sondern auch in anderen Zellen wie Osteoblasten, Keratinozyten, Duodenum, Lunge und Milz (Andersson et al 1989; Ichikawa et al 1995). Die Regulation der extrahepatischen Vitamin D₃-25-Hydroxylierung ist aber bisher noch nicht geklärt.

2.1.3 Physiologische Funktionen des 1,25(OH)₂D₃

Kalzämische Effekte des 1,25(OH)₂D₃:

Die wichtigste Funktion des 1,25(OH)₂D₃ ist die Mitwirkung an einem stabilen Kalziumspiegel im Organismus. In diesem streng regulierten System wirken verschiedene Organe bei der Aufrechterhaltung des benötigten Kalziumspiegels mit. Der Dünndarm wirkt als Ort der enteralen Kalzium- und Phosphatabsorption, die Nieren als der Ort der renalen Kalzium- und Phosphatausscheidung, der Reabsorption beider sowie der Synthese von 1,25(OH)₂D₃ und schließlich das Knochengewebe, das durch einen ständigen Auf- und Abbau einen flexiblen Kalziumspeicher darstellt. Des Weiteren spielt die Nebenschilddrüse durch das Parathormon eine Rolle in der Regulation des Kalziumhaushaltes.

Funktionen des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Darm:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist unabdingbar, um die Absorption von Kalzium und Phosphat im Dünndarm zu ermöglichen. Die Resorption von Kalzium aus dem Darm ins Blut kann man in drei Schritte einteilen. Erstens die Aufnahme des Kalziums aus dem Darmlumen über die Mikrovilli der Dünndarmenterozyten ins Zytoplasma. Zweitens der Transport von der lumenseitigen Membran der Enterozyten Richtung kapillarseitige Zellmembran und drittens der Übertritt von Kalzium durch die Enterozytenmembran in die Blutkapillaren. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkt auf alle drei Schritte der Kalziumresorption ein. Die Kalziumionen werden entlang des elektrochemischen Gradienten durch die lumenseitige Membran über Calciumkanäle aufgenommen. Hier wird eine nicht-genomische Vermittlung der Resorption durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermutet (Matsumoto et al 1981; Bickle et al 1983). In den Enterozyten bewirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine über den VDR vermittelte vermehrte Expression von epithelialen Kalziumkanälen (ECaC) (Okano 2004). Diese werden nur in solchen Geweben exprimiert, die Kalziumionen transportieren und gehören zur Familie der „Transient Receptor Potential“ (TRP) Kanäle. Liegt ein $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel vor, wird zwar Kalzium aus dem Darmlumen aufgenommen, es verbleibt aber innerhalb der Enterozyten im Bereich der Mikrovilli, wo es an Calmodulin gebunden vorliegt. Der Kalziumtransport durch die Enterozyten erfolgt gebunden an Calbindin D9K bis zu kapillarseitig gelegenen Kalzium-Pumpen der Enterozytenmembran. Diese Pumpen geben das Kalzium entgegen dem Konzentrationsgradienten mittels eines energieverbrauchenden Prozesses nach extrazellulär ab. Hier wirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulierend, indem es die Synthese von Calbindin und der Kalzium-Pumpe induziert. Außerdem wurde ein Soforteffekt der Kalziumabsorption in den Enterozyten beschrieben, wobei es innerhalb weniger Minuten zu einer verstärkten Kalziumabsorption aus dem Darmlumen durch ladungsgesteuerte Kalziumkanäle kommt. Lag jedoch ein $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel in den Enterozyten vor, konnte dieser Soforteffekt nicht beobachtet werden (Nemere et al 1984; Nemere und Norman 1987, 1991; de Bolland und Norman 1990). Außerdem steigert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die aktive Phosphat-Absorption durch einen stimulierenden Einfluss der Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters.

Funktionen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere:

Die Niere ist in zweierlei Hinsicht wichtig für die Aufrechterhaltung des normalen Kalziumspiegels. Zum einen findet im proximalen Tubulus eine strenge Kontrolle der Homöostase durch die Aktivierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sowie die Aktivierung der abbauenden Enzyme statt, zum anderen ist die Niere das Organ, das über Ausscheidung bzw. Reabsorption von Kalzium und Phosphat entscheidet. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhöht die Calciumabsorption im proximalen Tubulus durch eine Aktivierung der Transkription des renalen Kalziumkanals und des Calbindin (Dusso et al 2005). Im distalen Tubulus beschleunigt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die parathormonabhängige Kalziumsekretion.

Außerdem fördert das Zusammenwirken von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PTH im distalen Tubulus die Rückresorption von Kalzium (Yamamoto et al 1984). Dabei ist PTH für den aktiven Übertritt von Kalzium durch die Membran verantwortlich. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert diesen Prozess durch die Induktion der Synthese von PTH-Rezeptormolekülen (Friedman und Gesek 1995). Der Transport von den Tubulusepithelzellen ins Interstitium erfolgt vermutlich durch einen aktiven Transporter. Dabei scheint eine Plasmamembran-Kalziumpumpe (PMCA) von entscheidender Bedeutung zu sein (Friedman und Gesek 1995). In der Niere gibt es zwei wichtige kalziumbindende Proteine, Calbindin D9K und Calbindin D28K. Calbindin D28K dient vermutlich als intrazellulärer Speicher und stimuliert den transzellulären Transport. Calbindin D9K hingegen dient wohl der basolateralen Ausschleusung von Kalzium über die ATP-abhängige PMCA. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktiviert die Syntheserate beider Proteine und spielt somit bei der renalen Kalziumrückresorption eine entscheidende Rolle (Bouhtiauyet al 1994). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PTH verbessern die renale Phosphatabsorption (Dusso et al 2005)

Wirkungen des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Knochengewebe:

Das Knochengewebe stellt den größten Kalziumspeicher im Organismus dar. Die gesamte Knochenmasse eines Erwachsenen enthält ca. ein Kilogramm reines Kalzium. Es ist bekannt, dass im Knochengewebe ständig Aufbau, Abbau und Umbauprozesse stattfinden. Für die Regulierung des Knochenstoffwechsels ist vor allem Parathormon (PTH) verantwortlich. Auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spielt eine Rolle, wobei noch nicht genau geklärt ist in welchem Umfang. Zellen der osteoblastären Zellreihe exprimieren im Zellkern VDR (Narbaitz et al 1983), wobei reife Osteoklasten diese Eigenschaft im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen nicht mehr besitzen. Als gesichert gilt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Proliferation von Osteoblasten und deren Produktion von Typ I Kollagen, alkalischer Phosphatase und Osteocalcin reguliert (Reichel et al 1989). Außerdem wurde experimentell gezeigt, dass die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ innerhalb weniger Tage zu einer vermehrten Bildung von Knochenmatrix führt (Boyce und Weisbrode 1985). Es gibt aber auch Anhaltspunkte für die Vermutung, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Resorption von Knochen eine Rolle spielt. Im Experiment wurde gezeigt, dass durch hoch dosierte Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Stimulation der Knochenresorption verursacht wurde. Ob dieser Effekt auch im Organismus bei normalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen im Plasma eine Rolle spielt, ist noch unklar (Erben et al 1997). Die knochenprotektive Wirkung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ geht wohl primär von seinen kalzämischen Effekten in Darm und Niere aus. Experimente geben Hinweise darauf, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine physiologisch relevanten direkten Effekte am Knochen besitzt. Im Experiment hat man Ratten mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel mit einer kalzium-, phosphat- und laktosereichen Diät ernährt. Auch über einen längeren Zeitpunkt hinweg hat man keine Beeinträchtigungen der Knochenmineralisierung feststellen können (Weinstein et al 1984; Walters et al 1992)

Wirkungen an der Nebenschilddrüse:

1,25(OH)₂D₃-Mangel führt zu einer Nebenschilddrüsenhyperplasie und zu einer vermehrten Parathormonsynthese und –exkretion. Umgekehrt kann 1,25(OH)₂D₃ beides hemmen. Der VDR-1,25(OH)₂D₃-Komplex unterdrückt die Transkription des Parathormon-Gens. 1,25(OH)₂D₃ selbst stimuliert die Expression seines eigenen Rezeptors in der Nebenschilddrüse (Dusso et al 2005).

Nichtkalzämische Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃:

1979 wurde erstmals entdeckt, dass der VDR in Zellen vieler verschiedener Gewebe exprimiert wird, die nicht mit dem Kalziumstoffwechsel in Verbindung stehen. Das Vorkommen des VDR ist in Zellkernen von Gonaden, Hypophyse, Thymus, Pankreas, Magen, Brustdrüse und Haut beschrieben worden (Stumpf et al 1979). Auch in Zellen des Immunsystems wie B- und T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, Herzmuskelzellen und Myoblasten sowie verschiedener Tumorzellen ist der VDR gefunden worden (Hollick 1995). In der Pankreas beeinflusst 1,25(OH)₂D₃ die Insulinausschüttung.

1,25(OH)₂D₃ hat Einfluss auf Nervenzellen. Es erhöht die Nervenleitgeschwindigkeit in Motoneuronen und induziert die Synthese von neutropischen Faktoren wie Nerve Growth Factor. Während der Embryonalentwicklung wirkt es bei der Gehirnentwicklung mit. Im Tierversuch verursachte ein Mangel an 1,25(OH)₂D₃ in der Schwangerschaft ein vergrößertes Hirnvolumen, vergrößerte Ventrikel sowie ein Mangel an Nerve Growth Factor (Dusso AS et al 2005). Im Muskelgewebe hat es einen direkten Effekt auf den Kalziumtransport. Ein Mangel an 1,25(OH)₂D₃ durch Erkrankungen wie Rachitis und Nierenerkrankungen gehen mit Muskelschwäche oder –atrophie einher. In Herzmuskelgewebe kontrolliert 1,25(OH)₂D₃ die Synthese und Ausschüttung von atrialem natriuretischem Faktor (ANF). Bei Niereninsuffizienz im Endstadium kann eine Therapie mit 1,25(OH)₂D₃ die Funktion der Muskeln und des Herzens verbessern, wobei die Mechanismen noch ungeklärt sind (Dusso et al 2005). 1,25(OH)₂D₃ fördert die Bildung von Erythrozyten.

Außerdem kann 1,25(OH)₂D₃ die Immunantwort modulieren. Es hat differenzierende Effekte auf Monozyten, Makrophagen, Antigenpräsentierende Zellen, dendritische Zellen und Lymphozyten. Es induziert die Bildung von Protein P21, welches die Reifung von Monozyten zu Makrophagen fördert, sowie die Bildung von C/EBP β , einem Transkriptionsfaktor der für die Funktion von Makrophagen wichtig ist.

1,25(OH)₂D₃ kann malignes Wachstum hemmen. Bei Krebszellen, welche den VDR exprimieren, wurde in vitro und in vivo eine Hemmung der Proliferation durch 1,25(OH)₂D₃ festgestellt (Eisman et al 1987). 1,25(OH)₂D₃ induziert die Transkription von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27. Damit verlangsamt es den Zellzyklus, indem es die Zellen

von der G1-Phase in die G0-Phase und hin zur stärkeren Differenzierung führt. Dies konnte bei Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe beobachtet werden. Bei malignen Erkrankungen, bei der das vermehrte Wachstum durch eine Überexpression des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) – welcher wiederum aktiviert wird durch den Transforming Growth Factor (TGF- α) – getriggert ist, hemmt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den aktivierten EGFR. Der EGFR verursacht in Zellen eine vermehrte Transkription des onkogenen Cyclin-1, welches die Zellproliferation anregt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann Apoptose beeinflussen. Es hat proapoptotische und antiapoptotische Eigenschaften, je nachdem um welche Zellen es sich handelt. Auf der einen Seite kann es normale Gewebe vor Apoptose schützen, wie z.B. Hautzellen, auf der anderen Seite kann es in Tumorgewebe und bei nichtmalignem vermehrten Zellwachstum die Apoptose induzieren.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkt sich auf die Embryonalentwicklung aus. Wie schon erwähnt, ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für die regelrechte Gehirnentwicklung verantwortlich. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel während der Schwangerschaft führt vermehrt zu intrauteriner Wachstumsverzögerung, vorzeitigen Wehen, Bluthochdruck und zu leichtgewichtigen Neugeborenen (Holick MF et al 2005). Auf die Wirkungen aktiver Vitamin D_3 -Metabolite auf Hautzellen wird im Folgenden näher eingegangen.

2.1.4 Die Wirkung von Vitamin D_3 auf Hautzellen und seine Bedeutung in der Dermatologie

Die Haut gilt als eines der Zielorgane für Vitamin D_3 , da der VDR in allen Hautzellen exprimiert werden kann. Dies ist die Voraussetzung für durch aktive Vitamin D_3 -Analoge verursachte genomische Wirkungen auf Zellen. Die Haut ist auch das einzige Organ, das die komplette Enzymausstattung des Vitamin D_3 -Stoffwechsels von 7-Dehydrocholesterol zum aktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt. So konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten, denen man eine ausreichende Menge $25(\text{OH})\text{D}_3$ zugeführt hatte, in vitro eine substantielle Menge an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produzieren konnten (Bikle et al 1986). Inzwischen ist der Nachweis gelungen, dass humane Keratinozyten sowohl in vitro (Schuessler et al 2001), als auch in vivo (Lehmann et al 2003) einen autonomen Vitamin D_3 -Stoffwechsel besitzen. Dieser kann substantielle Mengen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produzieren, da er alle Schritte bis zur vollständigen Aktivierung des Vitamin D_3 zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in sich vereint. Studien haben gezeigt, dass die natürliche Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit einem Plasmaspiegel von 10^{-11} mol/l bis 10^{-10} mol/l, nicht ausreicht, um VDR-vermittelte Effekte in der Haut auszulösen (Matsumoto et al 1991). Man geht aber davon aus, dass in den Keratinozyten selbst produziertes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen autokrinen Effekt auf Keratinozyten und einen parakrinen Effekt auf Nachbarzellen hat. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Konzentrationen höher als 10^{-8} mol/l ein starker Wachstumsinhibitor für humane Keratinozyten in vitro ist.

Auf der anderen Seite haben einige Studien gezeigt, dass niedrige Dosen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die epidermale Proliferation fördern (Lutzow-Holm et al 1993; Bollag et al 1995). Obwohl die proliferativen Effekte des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ noch nicht geklärt wurden, konnten die antiproliferativen Effekte verschiedenen Mechanismen zugeordnet werden. Die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ blockiert den Übergang von Keratinozyten von der G0/G1-Phase in die S-Phase (Sebag et al 1992). Man geht davon aus, dass der Arrest ähnlich wie bei anderen Zellen, wie z.B. Pankreaskarzinomzellen oder Mammakarzinomzellen, auf einer Upregulation der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 beruht. Der p21-Promotor enthält ein VDRE was die Vermutung erhärtet, dass die Regulation zumindest durch den p21-Promotor auf der Transkriptionsebene abläuft. Allerdings erhöht $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch die Wachstumsfaktoren β_1 und β_2 von Keratinozyten, was indirekt die antiproliferativen Effekte verursachen kann. Auch das Kalzium scheint bei der Regulierung der Differenzierung von Keratinozyten eine Rolle zu spielen. So ist eine Erhöhung des intrazellulären freien Kalziums mit einer verstärkten Differenzierung von Keratinozyten verbunden (Pillai et al 1991). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spielt aufgrund seiner antiproliferativen und prodifferenzierenden Wirkung auf Keratinozyten vor allem eine Rolle in der Behandlung hyperproliferativer Krankheiten wie Psoriasis oder Morphaea. Den positiven Effekt des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hat man 1985 entdeckt, als man einen osteoporotischen Patienten, der gleichzeitig an Psoriasis litt, mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelt hat. Man beobachtete unter der Therapie einen starken Rückgang der Psoriasis-Plaques. Weil die therapeutische Breite von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei oraler Gabe gering ist, hat sich die topische Gabe durchgesetzt. Das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sollte primär eine antiproliferative Wirkung haben und möglichst wenig kalzämische Effekte hervorrufen. Hier hat sich das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Derivat Calcipotriol (MC903) durchgesetzt, weil es eine mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identische Bindungsaffinität für den VDR aufweist, aber eine 100- bis 200fach niedrigere kalzämische Potenz hat. Calcipotriol wirkt als Psoriasis-Therapeutikum durch die Hemmung der epidermalen Hyperproliferation und Förderung der Differenzierung der Keratinozyten bei gleichzeitiger Hemmung der Proliferation unreifer Keratinozyten. Außerdem wirkt es auf Zellen des Immunsystems, indem es die Proliferation von T-Lymphozyten sowie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine hemmt. Auch die Migration von infiltrierenden neutrophilen Granulozyten wird gehemmt. Auch für die Morphaea, die lokale Form der Sklerodermie, sind aktive Vitamin D_3 -Derivate wichtiger Bestandteil der Therapie. In Studien wurde gezeigt, dass eine Therapie mit oralem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und topisch appliziertem Calcipotriol die Hautläsionen deutlich und lang anhaltend zurückgehen lässt.

2.2 Sebozyten

2.2.1 Grundlage der Talgdrüse

Talgdrüsen und Sebozyten - Anatomische Grundlagen:

Talgdrüsen kommen am gesamten Körper außer an Fußsohlen und Handflächen vor. Es gibt Haarfollikel-gebundene Talgdrüsen, welche die mit Abstand größere Gruppe darstellen, und freie Talgdrüsen. Die freien Talgdrüsen findet man im Genitalbereich, der Mundschleimhaut und am Augenlid, wo sie Meibomsche Drüsen genannt werden. Talgdrüsen in Verbindung mit einem Haarfollikel bilden zusammen den Talgdrüsenfollikel. Sie kommen fast nur im Gesicht und im oberen Rumpf vor und sind verantwortlich für die Akne vulgaris. Menschliche Talgdrüsen sind vaskularisiert, aber nicht innerviert, d. h. es konnte bisher noch keine Innervation nachgewiesen werden. Talgdrüsen bestehen aus zwei Zellarten, den Sebozyten und den Zellen der Ausführungsgänge. In den Sebozyten findet die Synthese des Sebums statt, welches vor allem aus Lipiden und einem geringen Anteil aus Keratin und zellulären Membranstrukturen besteht. Die Sebozyten entwickeln sich aus der Basalzellschicht der Drüse. Im Laufe der Entwicklung der Zelle wandern sie zum Lumen und es entwickelt sich vor allem durch Lipideinlagerung ein ca. 100- bis 150mal so großer Sebozyt mit zahlreichen Lipidvakuolen. Im weiteren Verlauf wird der Kern pyknotisch und die Zelle setzt ihre Lipide durch holokrine Sekretion, d. h. durch komplettes Rupturieren der Zellmembran, in das Drüsenlumen frei. Die Dauer des Zellzyklus, also die Dauer der Entwicklung von der Basalzelle bis zur Ruptur der Zelle wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Die Zellzyklusdauer wurde mit 2 – 3 Wochen angegeben. Die Hautoberflächenlipide entsprechen nicht den Lipiden der intakten Sebozyten, da die Epidermis eine weitere Lipidquelle darstellt und das Sebum noch im Ausführungsgang Stoffwechselprozessen (z. B. bakterielle Zersetzung) unterworfen ist. Der Hauttalg besteht aus Glyzeriden, Fettsäuren, Squalen und Wachsestern. Die Zellen der Ausführungsgänge haben sowohl Merkmale von Sebozyten, als auch von Keratinozyten, da sie sowohl Lipidtröpfchen bilden, als auch Keratinisierung aufweisen.

Regulation der Talgdrüse in vivo:

Die Aktivität der Talgdrüse ist hauptsächlich hormonell durch Androgene, aber auch durch Gestagene, welche ebenfalls eine androgene Wirksamkeit besitzen, gesteuert. Dabei beeinflusst die androgene Wirkung sowohl die Proliferation der Sebozyten, als auch die Produktion des Sebums. Unter den Androgenen spielt das Testosteron eine wichtige Rolle. Es wird in das wirksame Dihydrotestosteron umgewandelt, welches über die Androgenrezeptoren wirksam wird und eine Volumenzunahme der Sebozyten und eine gesteigerte Lipidsynthese bewirkt. Einen stimulierenden Effekt auf die Talgdrüsenproduktion haben auch die Hypophysenhormone ACTH, TSH und MSH. Östrogene und antiandrogene Substanzen sind in der Lage, die Talgdrüsenaktivität zu mindern. Wendet man Östrogene systemisch an, verringert sich die Größe und Anzahl der Talgdrüsen bei beiden Geschlechtern. Allerdings funktioniert das nur bei Dosen, die den physiologischen Bereich weit überschreiten. Die Talgdrüsenaktivität ist altersabhängig. Bei Neugeborenen ist sie ähnlich wie bei Erwachsenen, im Kleinkindalter fällt sie wieder ab. In der Pubertät ist sie am höchsten. Ob die Nahrungszusammensetzung einen signifikanten Einfluss auf die Sebozyten und ihre Aktivität hat, ist noch nicht eindeutig geklärt. Außerdem wird eine genetische Kontrolle der Sebumproduktion vermutet, da bei Akne vulgaris ein familiärer Zusammenhang besteht.

2.2.2 Funktion der Sebozyten

Schon früh hat man festgestellt, dass Talgdrüsen Sebum produzieren und neben der Fettung vom Haut und Haaren auch verantwortlich sind für Akne vulgaris. Zunächst schien es so, als seien Talgdrüsen ein recht unattraktives Feld für die Forschung. Albert M. Klingman drückte dies 1963 folgendermaßen aus: „Die Talgdrüsenzelle ist ein lebendes Fossil mit einer Vergangenheit, aber keiner Zukunft“ (in Montagna's Advance in Biology of the Skin). In den letzten Jahren jedoch wurden Sebozyten ein wichtiges Forschungsobjekt, da die Rolle der Talgdrüsenzellen in der Haut stark revidiert wurde. Es wurde herausgefunden, dass Sebozyten wichtige Mitarbeiter im Aufrechterhalten der Homöostase der Haut sind. Die Lipide der Sebozyten sind verantwortlich für die dreidimensionale Organisation der Oberflächenlipide der Haut und der Integrität der Hautbarriere. Außerdem transportiert Sebum Antioxidantien an die Hautoberfläche (Thiele et al 1999). Der Platelet-activating factor der Sebozyten, die Acetylhydrolase II, schützt die Haut gegen oxidativen Stress und vor allem schützt er Keratinozyten gegen UVB-induzierte Schäden. Bei einigen Sebum-spezifischen Lipiden hat man eine eigene antimikrobielle Aktivität festgestellt.

Sebozyten produzieren außerdem pro- und antiinflammatorische Substanzen und wirken bei der Regulation von Neuropeptiden mit (Zouboulis et al 2002). Des Weiteren können Sebozyten Cholesterol de novo aus Acetat synthetisieren (Cassidy et al 1986; Thiboutot et al 2003).

Außerdem hat man untersucht, ob Sebozyten in der Lage sind, aus Cholesterol Steroide zu synthetisieren und ist zu dem Ergebnis gekommen, dass alle Enzyme, die dafür gebraucht werden, in Sebozyten vorkommen (Thiboutot et al 1995, 1998, 2003). Sie können selbständig Testosteron und daraus 5α -Dihydrotestosteron herstellen (Thiboutot et al 1995). Daraus erschließt sich, dass die Haut ein eigenes steroidbildendes Gewebe ist.

2.2.3 Erkrankungen der Talgdrüsen

nichtmaligne Erkrankungen:

- Sebostase
- Seborrhoe
- Seborrhoisches Ekzem
- Seborrhoische Psoriasis
- Seborrhoische Warze
- Akne vulgaris
- Rosacea

Neoplasien der Talgdrüsen:

- Talgdrüsenadenom (Adenoma seboparum)
- Talgdrüsenepitheliom
- Talgdrüsenkarzinom (Adenocarcinoma sebaceum) und Muir-Torre-Syndrom

Als Sebostase wird die verminderte Talgdrüsenproduktion bezeichnet. Sie ist vorwiegend genetisch determiniert. So leiden vorwiegend rothaarige und blonde Menschen mit hellem Hauttyp darunter. Andere Ursachen können hormonelle Störungen, übertriebene Hautpflege (häufiger Kontakt mit Wasser und austrocknenden Pflegemitteln) oder häufiges Baden im Chlorwasser sein.

Seborrhoe ist die Überproduktion von Talg durch die Talgdrüsen. Das klassische Erscheinungsbild ist die Seborrhoea oleosa mit fettiger Haut und fettigen Haaren. Meist tritt sie ohne großen Krankheitswert in der Pubertät auf und bildet sich im Verlauf des dritten Lebensjahrzehnts wieder zurück. Die Seborrhoe ist ein Mitverursacher der Akne, was weiter unten erläutert wird.

Das seborrhoische Ekzem, auch Seborrhoische Dermatitis genannt, ist eine Hauterkrankung, die vor allem an der Kopfhaut und im Gesicht auftritt. Eine Form des seborrhoischen Ekzems, die bei Säuglingen auftritt, kennt man im Volksmund unter dem Namen Grind oder

Kopfgneis. Neben der Gruppe der Säuglinge kommt das soborrhische Ekzem hauptsächlich im Alter von 20 – 40 Jahren vor. Die bevorzugten Körperstellen sind die behaarte Kopfhaut und die angrenzenden Bereiche Nase, Kinn, Augenbrauen und Ohren. Seltener sind Rumpf und Extremitäten betroffen. Das seborrhische Ekzem imponiert als Hautauschlag mit trockenen gelblichen Schuppen mit oder ohne Juckreiz.

Akne vulgaris ist die häufigste Hauterkrankung. In westlichen Industrieländern leidet ein Großteil der Bevölkerung meist während der Pubertät an mehr oder weniger stark ausgeprägter Akne vulgaris. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen. Die pubertäre Akne beginnt meist im 10. – 14. Lebensjahr und bildet sich bis zum 25. Lebensjahr zurück. Die Symptome reichen von milden Formen mit einigen Komedonen und gelegentlichen Pusteln bis zu schweren Formen mit abszedierenden Entzündungen im Gesicht und am Oberkörper. Ist die Entzündung sehr ausgeprägt, kann es zu einschmelzenden Vorgängen mit Strukturdefekten der Haut und der Subkutis kommen. Die Akne zeigt eine familiäre Häufung, wobei die verantwortlichen Erbgänge noch nicht völlig geklärt sind. Vermutlich sind mehrere Gene für das Entstehen und die Ausprägung der Akne verantwortlich. Die Pathogenese der Akne lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen. Dazu zählen die Seborrhoe, die folliculäre Hyperkeratose, die mikrobielle Besiedlung und immunologische Prozesse im Sinne einer Entzündungsreaktion. Diese Faktoren beeinflussen sich auch gegenseitig. So schaffen Seborrhoe und folliculäre Hyperkeratose scheinbar gute Bedingungen für das Wachstum der Bakterien. Stoffwechselprodukte der Bakterien scheinen die Entzündung zu begünstigen. Wie bereits bekannt ist, wird die Sebumproduktion stark durch Androgene reguliert. Bei Neugeborenen kommt es vorübergehend zu einer gesteigerten Talgproduktion was mit der Neugeborenenakne (Acne neonatorum) einhergeht. Im Alter von ca. 10 Jahren nehmen zunächst die Nebennieren, später die Gonaden die Androgenproduktion auf. Aufgrund der dadurch bedingten Vergrößerung der Talgdrüsen und der Steigerung der Talgproduktion kommt es zu der bekannten „Teenagerakne“. Meist korreliert die gesteigerte Talgproduktion aber nicht mit erhöhten Serumspiegeln von Androgenen, die Androgenspiegel sind also meistens im Normbereich. Als Ursache wird eine erhöhte Empfindlichkeit der Sebozyten für Androgene vermutet. Dabei hat das Enzym 5 α -Reduktase besondere Bedeutung, da es Testosteron in die wirksame Form Dihydrotestosteron umwandelt.

Es gibt allerdings auch Erkrankungen, die aufgrund eines erhöhten Serumandrogenspiegels Akne verursachen können wie zum Beispiel polyzystische Ovarien, Nebennierenrindendome, ovarielle Tumoren und das adrenogenitale Syndrom. Auch exogen zugeführte Androgene - wie anabole Steroide und Progestine mit androgener Wirkung - sind in der Lage, Akne auszulösen. Bei Akne besteht außerdem eine Differenzierungsstörung der Keratinozyten, die zu einer Hyperkeratose führt. Im Akne-Follikel besteht also eine erhöhte Proliferationsra-

te von Keratinozyten, die nun nicht mehr so leicht nach außen abtransportiert werden können. Das Infundibulum des Follikels verstopft, und der Talg kann nicht mehr an die Hautoberfläche transportiert werden. Äußerlich zeigt sich dies zunächst als Mikrokomedo, schließlich als Komedo. Als Ursache der Hyperkeratose werden verschiedene Ursachen in Betracht gezogen. Das in Haarfollikeln dominierende Bakterium ist *Propionibacterium acnes*. Es gehört zu der normalen Hautflora des Menschen und bevorzugt mikroaerophile oder anaerobe Bedingungen. Die größte Dichte hat es in Regionen mit hoher Talgproduktion. Bei jugendlichen Aknepatienten wurde eine bis zu vier Logstufen erhöhte Bakteriendichte gefunden als bei gleichaltrigen Gesunden. Die anfallenden Stoffwechselprodukte der Bakterien, wie Lipasen, Proteasen, Hyaluronidasen und chemotaktische Faktoren, fördern wiederum die Entzündungsreaktion. Neben den bisher erwähnten pathogenetischen Ursachen gibt es noch andere, seltenere Faktoren, die die Entstehung von Akne verursachen können. Dazu gehört der weibliche Hormonzyklus, verschiedene Medikamente wie zum Beispiel Androgene, Actinomycin D, Progestine mit androgener Aktivität, Glucocorticoide, Isoniazid, Tetrazykline, Psychopharmaka und B-Vitamine (B6 und B12) sowie physikalische Dauerreize (Acne mechanica). Außerdem können Kontaktstoffe wie Kosmetika und Chlor Akne auslösen (Acne venerata). Auch Essgewohnheiten haben Einfluss auf die Entstehung und Ausprägung von Akne. Therapiert wird die Akne mit Substanzen, die die Talgproduktion sowie die folliculäre Hyperkeratose hemmen, die Entzündungsreaktion beeinflussen und die Bakterienbesiedlung eindämmen. Äußerlich angewendet werden Alpha-Hydroxy-Säuren („Fruchtsäuren“), die als 10 – 15%ige Creme komedolytisch wirken. Außerdem wird das antibakterielle und komedolytische Benzolperoxid in der Konzentration 2,5 – 10% als Creme, Gel oder Waschemulsion verwendet. Als komedolytisch wirkende Substanzen werden auch Linolsäure und Retinoide (Tretinoin, Isoretinoin, Adapalen und Tazaroten) angeboten. Systemische Retinoide werden nur bei schweren und sonst therapieresistenten Fällen angeboten, um die Talgproduktion zu hemmen. In schweren Fällen werden auch Antibiotika systemisch verabreicht. Antibiotika können auch mit Zink kombiniert werden, das eine antibakterielle Wirkung hat. Sehr gut wirkt auch Salicylsäure. Als 2%ige Creme hat sie eine oberflächliche Schälwirkung, ab einer Konzentration von 5% wirkt sie komedolytisch. Die Lichttherapie mit UV-Licht ist umstritten, da das UV-Licht zwar antibakteriell wirkt, aber auch das Risiko der Proliferationshyperkeratose und gesteigerten Komedonenbildung mit sich bringt. Ob eine Impfung mit homologen Autovakzinen klinisch wirksam ist, ist bisher noch nicht hinreichend untersucht.

Die Rosazea ist eine der häufigsten Dermatosen bei Erwachsenen, die häufig im 40. bis 50. Lebensjahr auftritt und sich hauptsächlich im Gesicht manifestiert. Die Rosazea verläuft schubweise, kann aber in allen Stadien sistieren. Man unterscheidet ein Vorstadium, drei Hauptstadien und Sonderformen. Das Vorstadium, die Rosazea-Diathese, zeichnet sich

durch flüchtige Erytheme mit flushartigem Charakter aus. Dabei ist die Haut sehr leicht durch mechanische und chemische Reize sowie Sonnenlicht irritierbar. Stufe I, Rosazea erythematos-teleangiectatica, zeichnet sich durch bleibendes Erythem, Teleangiectasien sowie eine leichte Irritierbarkeit der Haut mit Stechen, Brennen und Jucken aus. Das Stadium II, die Rosazea papulopustulosa, ähnelt dem Erscheinungsbild der Akne vulgaris und wird oft mit ihr verwechselt. Es herrschen entzündliche Papeln und Pusteln auf erythematösem Grund vor. Der Unterschied zur Akne besteht darin, dass die Primäreffloreszenzen der Akne, die Komedonen, fehlen und die Erkrankung nur im Gesicht auftritt. Ein Bakterium, das ursächlich für die Entzündungsreaktionen verantwortlich ist, konnte bei der Rosazea nicht gefunden werden. Im Stadium III herrschen entzündliche Knoten und Infiltrationen mit Hyperplasie von Bindegewebe und massiver Talgdrüsenhyperplasie vor. Es kommt zur Entwicklung von Phymen, wobei das Rhinophym am häufigsten vorkommt. Zu den Sonderformen der Rosazea gehören die R. conglobata, R. fulminans, die granulomatöse Rosazea, M. Morbihan, Steroidrosazea und okuläre Rosazea. Therapiert wird die Rosazea zum einen topisch mit Metronidazol und Azelainsäure sowie Schwefelpräparaten (2 – 5%ig). Außerdem erweisen sich manchmal Akneantibiotika (Erythromycin, Clindamycin und Tetrazykline) als hilfreich. Die Wirksamkeit von Retinoiden wird noch untersucht. Bei mittelschweren und schweren Formen wird Metronidazol per os für drei bis vier Wochen gegeben. Bei schwersten Formen kommen kurzzeitig Glucocorticoide zum Einsatz, ansonsten sind sie bei der Rosazea kontraindiziert.

Das Talgdrüsenadenom (Adenoma seboparum) ist ein seltener gutartiger Tumor, der aus ausdifferenzierten Sebozyten besteht. Makroskopisch erkennt man meist einen glatten, derben, runden Knoten, der weniger als ein Zentimeter groß ist, oder eine gelbe Papel.

Das Talgdrüsenepitheliom wird als Zwischenstufe in der Entwicklung vom Adenom zum Karzinom gesehen. Die bevorzugten Körperregionen sind Gesicht und Ohr. Histologisch zeigen sich große gelappte Zellformationen.

Talgdrüsenkarzinome sind sehr selten. In der Literatur sind nur wenige Hundert Fälle beschrieben. Der maligne Tumor manifestiert sich meist im Alter von ca. 70 Jahren. Im Rahmen des Muir-Torre-Syndroms kann er jedoch bereits im Jugendalter vorkommen. Die häufigste Lokalisation ist das Augenlid, wobei die Talgdrüsen des Augenlids, die Zeissdrüsen und die Meibomdrüsen, betroffen sind. Andere seltenere Lokalisationen sind Nase, Augenbrauen, Lippe, Schläfe und Rumpf. Eine Besonderheit ist das Vorkommen der Talgdrüsenkarzinome im Rahmen des Muir-Torre-Syndroms. Es ist eine sehr seltene autosomal-dominant vererbte Erkrankung von der nur knapp über 200 Fälle beschrieben sind. Das Muir-

Torre-Syndrom kann als Manifestation des Lynch-II-Syndroms (Cancer Family Syndrom) angesehen werden. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 53 Jahren. Das Muir-Torre-Syndrom wird definiert als das gemeinsame Auftreten eines Talgdrüsenkarzinoms mit oder ohne Keratoakanthom (23% der Fälle) zusammen mit dem Auftreten einer gastrointestinalen (oft ein kolorektales Karzinom) oder einer anderen viszeralen Neoplasie (beispielsweise Genitaltumoren).

2.2.4 Entwicklung und Charakter von SZ95

Die Differenzierung von Sebozyten ist sehr spezie-spezifisch. Deshalb gab es ein großes Interesse daran, menschliche Sebozyten zu kultivieren. Die ersten Versuche waren jedoch wenig erfolgreich (Kellum 1966). Erst später gelang eine Kultivierung von Talgdrüsenzellen ex vivo und die Kultivierung in vitro (Xia et al 1989; Kealey et al 1986). Die Sebozyten differenzierten sich aber relativ schnell durch Akkumulation von Fetttröpfchen und gingen in der Folge durch holokrine Sekretion zugrunde. Normale Sebozyten konnten im Versuch nur 3 – 6 Passagen lang kultiviert werden, bis die Lyse eintrat. Es war also eine Immortalisation der Sebozyten notwendig. Zouboulis und Mitarbeiter transfizierten menschliche Sebozyten aus der Gesichtshaut einer 87jährigen Frau mit dem Virus-40 Large T-Antigen aus Affen und immortalisierten die Zellen damit (Zouboulis et al 1999). Die Zellreihe wurde SZ95 genannt und hat die Charakteristika von normalen humanen Sebozyten beibehalten. Darunter fallen die Differenzierung mit Erhöhung des Zellvolumens, Erhöhung der Lipidsynthese und folgender Apoptose. Außerdem sind in SZ95 Sebozyten die Expression von charakteristischen herkunfts- und funktionsspezifischen Sebozyten-Proteinen sowie die biologische Antwort auf Androgene und Retinoide erhalten (Zouboulis et al 1999; Wróbel et al 2003). SZ95 exprimieren das oben genannte Simian Virus-40 Large T-Antigen und haben einen hyper-diploid-aneuploiden Karyotyp mit einer mittleren Chromosomenanzahl von 64,5. Die Lipidsynthese findet in SZ95 ähnlich wie in normalen Sebozyten statt. SZ95 zeigen typische Moleküle humaner Sebozyten wie Keratin 7, 13, 19 und mehrere Mucine. Die Synthese der sebozytenspezifischen Lipide wie Squalene und Wachsester sowie Triglyceride und freie Fettsäuren bleibt erhalten, auch noch nach 25 – 40 Passagen. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation beträgt $52,4 \pm 1,6$ h. Unter serumfreien Bedingungen zeigen SZ95 ein reduziertes Wachstum bei bleibender Lipidsynthese. Die Applikation von 5α -DHT stimuliert die Zellproliferation bzw. bringt sie nach Wachstumsstopp wieder in Gang. SZ95 sind außer auf Androgene noch auf verschiedene andere Hormone empfindlich, wie Insulin, Hydrocortison und TSH (Zouboulis et al 1998). Wie normale Sebozyten sind SZ95 empfindlich für Retinoide. Sie besitzen die Retinoidsäurerezeptoren γ und α und den Retinoid-X-Rezeptor α . Retinoide vermindern die Proliferation der Sebozyten. Außerdem hat sich gezeigt, dass ihre Morphologie im Elektro-

nenmikroskop ähnlich der von normalen Sebozyten ist und ihr Phänotyp konstant bleibt (bis Passage 50 getestet) (Zouboulis et al 1999). Die Chromosomenzahl von SZ95 liegt zwischen 60 und 67 (Median 64,5). SZ95 zeigt also die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Charakteristika von normalen humanen Sebozyten.

3 Zielsetzung und eigene Fragestellung

Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen, bei denen Sebozyten eine Rolle spielen, wobei die Akne die Erkrankung mit der größten Prävalenz und dem größten Leidensdruck unter der Bevölkerung darstellt. Viele Erkrankungen gehen nicht nur mit einer Überfunktion der Sebozyten, sondern mit einer vermehrten Proliferation der Sebozyten einher. Darunter fallen nicht nur die neoplastischen Erkrankungen, sondern auch einige nichtmaligne Erkrankungen wie die Akne. Es stellt sich nun die Frage, ob $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, welches bei vielen Zellen - auch bei Hautzellen - antiproliferativ wirkt, auch auf Sebozyten einen Effekt ausübt. In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob Sebozyten einen Rezeptor für aktive Vitamin D_3 -Analoga besitzen und die Enzyme für die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (CYP27B1) und den Vitamin D_3 -Stoffwechsel (CYP24A1) exprimieren. Außerdem war zu untersuchen, ob $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und seine Analoga humane Sebozyten in ihrer Proliferation, in ihrer Zellvitalität und ihrem Verhalten im Zellzyklus beeinflussen. Unter der Annahme, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und seine aktiven Metabolite Proliferationsverhalten, Vitalität und Enzymexpression beeinflussen, wurden folgende Parameter im in vitro System untersucht:

- Analyse der mRNA von VDR, CYP27B1 und CYP24A1 mittels Real-Time PCR (LightCycler® von Roche) mit und ohne Inkubation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.
- Proliferationsverhalten mittels Kristallviolett-Färbung:
Sebozyten wurden über mehrere Tage kultiviert und mit aktiven Vitamin D_3 -Analoga ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, EB1089 und $25(\text{OH})\text{D}_3$) in verschiedenen Konzentrationen stimuliert und mittels Kristallviolett-Assay die Proliferation gemessen.
- Proliferationsverhalten und Vitalitätsprüfung mittels WST-1-Assay:
Mittels Anfärbung vitaler Zellen mit dem WST-1-Reagenz, wurden Proliferation und Vitalität der mit aktiven Vitamin D_3 -Metaboliten ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, EB1089, $25(\text{OH})\text{D}_3$) stimulierten Zellen bestimmt.
- Verhalten im Zellzyklus:
Mit aktiven Vitamin D_3 -Metaboliten stimulierte Zellpopulationen wurden mittels Propidiumiodid-Durchflusszytometrie auf ihr Verhalten im Zellzyklus untersucht.

Da in der Haut viele Zellen Enzyme des Vitamin D_3 -Stoffwechsels besitzen und biologisch aktive Vitamin D_3 -Analoga auch erfolgreich in der Therapie verschiedener Hauterkrankungen angewendet werden, ist es jetzt interessant zu erfahren, ob auch humane Sebozyten potentielle Zielzellen für aktive Vitamin D_3 -Analoga sind, und ob diese in Zukunft auch für die Therapie Sebozyten-assoziiierter Erkrankungen angewendet werden können.

4 Material und Methodik

4.1 Liste der verwendeten Arbeitsmaterialien und Geräte

Beckmann Coulter Electronics

Flowzytometer Epics XL

Biochrom:

Sebomed Basalmedium, Cat.-Nr: F8205

Biozym Diagnostics GmbH

Agarose Seacam LE Agarose

Eppendorf:

Multipette

Pipetten, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl

Greiner Bio One:

10 cm Schalen, Cat.-Nr.: 633 171

6-well Platten, Cat.-Nr.: 657 160

96-well Platten, Cat.-Nr.: 655 128

Falcons 50 ml, Cat.-Nr.: 227 201

Falcons 15 ml, Cat.-Nr.: 188 271

FACS-Röhrchen, Cat.-Nr.: 115 101

Merck:

Kristallviolett (C.I. 42555), Cat.-Nr.: 1.01408.0025

Omniscript:

RT-Kit, Cat.-Nr.: 205111

PAA:

RPMI 1640, Cat.-Nr.: E15-840

FCS, Cat.-Nr.: A15-151

Penicillin-Streptomycin, Cat.-Nr.: P11-010

Trypsin, Cat.-Nr.: L11-004

L-Glutamin, Cat.-Nr.: M11-004

Promega:

DNase, Cat.-Nr.: M60101

Qiagen:

RNeasy Mini Kit, Cat.-Nr.: 74104

Roche Applied Science:

LightCycler® 2.0 System

Cell Proliferation Regent WST-1, Cat.-Nr.: 11644807001

LightCycler® Capillaries 20µl, Cat.-Nr.: 11909339001

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Cat.-Nr.: 03003230001
(3003230)

Roth, Carl:

Steritop Flaschenaufsatzfilter, Cat.-Nr.: X334.1

Seromed:

human EGF, Cat.-Nr.: W0001-500

Sigma Aldrich:

BSA, Cat.-Nr.: A9647

Propidiumiodid, Cat.-Nr.: 81845

Ethidiumbromid, Cat.-Nr.: E1510

TIB MolBiol:

Primer für 25-Hydroxy-Vitamin D₃-1α-Hydroxylase, 25-Hydroxy-Vitamin D₃-24-Hydroxylase
und VDR.

4.2 Zellen und Zellkultur

4.2.1 SZ95

Die Sebozytenzellreihe SZ95 wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Christos C. Zouboulis aus dem Institut für Dermatologie der freien Universität von Berlin.

4.2.2 Mewo

Dies ist eine humane Melanom-Ziellinie, die von der Dr. Fogh's Gruppe, Sloan-Kettering Institute, New York, USA isoliert wurde. Die Zellen haben einen DNA-Index von 1,6 und besitzen ungefähr 68 Chromosomen. Die Mewo-Zellen exprimieren ein mutiertes p53-Protein. Die Mutation ist ein Basenaustausch im Codon 258.

4.2.3 Zellkultur

Zellkultur SZ95:

Die immortalisierten Sebozyten SZ95 wurden in Sebomed® Basalmedium der Firma Biochrom (Berlin, Germany) kultiviert, welches 1% stabiles N-Acetyl-L-Ananyl-L-Glutamin enthält. Dem Medium wurde 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Fetal Calf Serum), 20µg pro Liter Medium epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, Epidermal Growth Factor), sowie 1% Penicillin-Streptomycin hinzugefügt. Für die Behandlung der Zellen mit aktiven Vitamin D₃-Metaboliten wurde 0,1% Bovines Serum-Albumin (BSA) in Pulverform zugegeben und das Nährmedium mit Steritop®-Filtern steril filtriert. Die adhäsiv wachsenden Sebozyten wurden auf sterilen Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert, welche mit Kollagen Typ I beschichtet sind. Sie wurden in einem Zellbrutschrank bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ gehalten. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Splitten der Zellen:

Es hat sich gezeigt, dass die Proliferation der Sebozyten am Günstigsten in semikonfluenter Kultur erfolgt. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage gesplittet. Beim Splittvorgang wurde zunächst das Medium vom Plattenrand aus mit Hilfe einer Saugpumpe und einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Anschließend folgte eine Spülung der Platte mit PBS-Puffer, welcher ebenfalls wieder abgesaugt wurde. Dann wurde 500 µl Trypsin pro Schale auf die Zellen gegeben und durch Kippen der Platte verteilt. Das Trypsin wurde sofort wieder abgesaugt. Da die Sebozyten im Gegensatz zu anderen Zellen, beispielsweise Mewo-Zellen, einige Zeit benötigen, um sich von der Platte abzulösen, wurde die Platte für ca. fünf bis sieben Minuten bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Durch Klopfen am Plattenrand erkannte man das Ablö-

sen der Zellen mit bloßem Auge. Die Zellen wurden mit 5 – 6 ml Nährmedium mit einer Pipette abgespült und in ein 50 ml Falcon überführt.

Zellzählung:

50 µl Zellsuspension werden mit 50 µl Trypanblau gemischt. Die Mischung wurde in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer mit Thoma-Einteilung eingebracht. Ausgezählt wurden vier Quadranten.

Die Zellzahl pro ml errechnete sich folgendermaßen:

Zellzahl pro ml = Gesamtzellzahl aller vier Quadranten : $4 \times VF \times 10^4$

Wobei VF ein Verdünnungsfaktor darstellte (bei unserer Zählung ist $VF = 1$). Der Faktor 10^{-4} errechnete sich dadurch, dass jedes ausgezählte Eckquadrat eine Fläche von 1 mm^2 und eine Höhe von 0,1 mm besitzt. Folglich dessen hat jedes Eckquadrat ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ bzw. 10^{-4} ml .

Ausgesät in 10 cm Schalen wurden pro Schale 1 Mio. – 1,5 Mio. Zellen.

Zum Anwachsen wurden die Zellen 18 bis 24 Stunden im Brutschrank bebrütet.

Zellkultur MeWo:

MeWo werden in RPMI-Nährmedium mit 1% Glutamin kultiviert, welchem $20 \mu\text{g}$ EGF pro Liter Medium sowie 10% hitzeinaktiviertes FCS und 1% Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellkultur der Mewo-Zellen war ähnlich wie die von SZ95-Zellen.

4.3 Versuchsmethoden

4.3.1 LightCycler® (Roche Applied Science)

Der LightCycler® der Firma Roche Applied Science ermöglicht eine schnelle Real-Time PCR (RT-PCR). Amplifiziert und untersucht wurde in unseren Versuchen die RNA der Enzyme des Vitamin D₃-Stoffwechsels sowie der VDR in SZ95 Sebozyten, nämlich die Enzyme für die 1 α -Hydroxylierung (CYP27A1) und die 24-Hydroxylierung (CYP24A1) sowie der VDR mit und ohne Inkubation der Zellen mit aktivem Vitamin D₃.

Das Prinzip der PCR:

Die PCR wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt und ermöglichter eine millionenfache Vervielfältigung einer Zielsequenz in vitro. Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens handeln oder auch um nicht kodierende DNA-Sequenzen. Im Gegensatz zu lebenden Organismen kann der PCR-Prozess nur kurze DNA-Abschnitte bis zu etwa 1 kbp (1.000 Basenpaare) kopieren. In ihren momentanen Anwendungsgebieten benötigt die PCR mehrere grundlegende Komponenten. Diese sind:

- Die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- Zwei Primer, um Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts festzulegen
- DNA-Polymerase, die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, um den festgelegten Abschnitt zu replizieren (kopieren)
- Nukleotide, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen

Die Polymerase-Kettenreaktion findet in einem sogenannten Thermocycler statt. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 30 bis 50 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. In einem Thermocycler (auch PCR-Gerät genannt) wird zunächst die doppelsträngige DNA auf 94 °C bis 96°C erhitzt um die Stränge zu trennen. Dieser Schritt wird als Denaturierung (Melting = Schmelzen) bezeichnet. Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt heißt Primerhybridisierung (primer annealing). Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2 °C bis 3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 °C und 65 °C. Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am angelagerten Primer und folgt dann dem DNA-

Strang. Dieser Schritt heißt Elongation (Verlängerung). Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt ab von der DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll. Sie liegt zwischen 68 und 72 °C.

Die Real time quantitative PCR (RTQ-PCR), auch Real Time Detection PCR (RTD-PCR) genannt), ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name "Real Time") durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (z.B. Kompetitive PCR). Die Fluoreszenz nimmt bei der RT-PCR proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

Methoden der Real-Time PCR:

- Interkalierende Farbstoffe
- FRET-Sonden
- LightCycler®-Sonden
- TaqMan®-Sonden
- Molecular Beacons
- Skorpions-Sonden
- Lux®-Primer

FRET-Sonden und LightCycler-Sonden:

Hier wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ausgenutzt. Ein Donor-Fluorochrom (Reporter), das durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Nimmt der Abstand der Fluorochrome zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, bietet aber die Vorteile der hohen Spezifität des Assays. Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET zur Quantifizierung von Nukleinsäuren besteht in der Verwendung von LightCycler®-Sonden. Zwei verschiedene, jeweils mit einem FRET-Donor bzw. FRET-Akzeptor markierte Oligonukleotide, die nebeneinander an die Ziel-Sequenz binden und damit die Fluorochrome in eine für den FRET ausreichende Nähe bringen, können als Sonden für die Quantifizierung der PCR-Produkte eingesetzt werden.

LightCycler®:

Die Firma Roche hat den LightCycler® entwickelt, ein schneller Thermocycler mit online PCR Überwachung basierend auf Fluoreszenz-Detektion. Seine hohen Heiz- und Kühlraten ermöglichen die Durchführung von 30 Zyklen in 20 Minuten. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen von DNA-bindenden Fluorochromen bei der generellen Detektion von doppelsträngiger DNA oder mit Hybridisierungs sonden bei der spezifischen Quantifizierung einer Zielsequenz. Die Hauptvorteile der online PCR-Detektion sind die direkte Quantifizierung und die Herabsetzung der "carry-over" Kontamination mit PCR-Produkten durch das Wegfallen der Post-PCR Manipulationen. Die Fluorophore wie das von uns verwendete SYBR Green I werden mit einer Blaulicht emittierenden Diode (470 nm) beleuchtet. SYBR Green I interkaliert in die Doppelhelix (zwischen die Basen) und wird durch die lichtemittierende Diode spezifisch angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 521 nm, welches im Kanal F1 gemessen werden kann. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende einer Elongationsphase gemessen, wenn in jedem Zyklus die maximale Menge an amplifizierter DNA vorhanden ist. Bei der Denaturierung löst sich SYBR Green I wieder aus der DNA. Die freien Farbmoleküle verursachen eine leichte Hintergrundstrahlung, die vom gewünschten Signal subtrahiert werden kann. Trotz der hohen Spezifität und der geringen Kontamination durch optimierte Bedingungen und Kits für die PCR, muss die Produktspezifität getestet werden. Dies übernimmt der Lightcycler nach jeder PCR durch eine Schmelztemperaturanalyse. Dabei wird die amplifizierte DNA durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. Die Schmelztemperatur hängt dabei von der Länge, der Basensequenz und dem CG-Gehalt der DNA ab. Die Schmelztemperaturkurve zeigt im optimalen Fall nur eine Spitze. Sind es mehrere Gipfel, meist mit geringerer Schmelztemperatur als das Zielgen, wurden unspezifische Sequenzen und Primer-Dimere amplifiziert. Andererseits kann das angeregte Fluorescein über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer benachbarte Fluorophore wie LC-Red 640 oder LC Red 705 anregen. Deren Emissionsfluoreszenz wird dann im zweiten (640 nm) oder respektiven dritten (705 nm) Kanal gemessen.

Material:

- Zellen: SZ95 und Mewo
- Platten: Transparente sterile 10 cm-Kulturschalen, mit Kollagen Typ I beschichtet
- Medium: Medium: Sebomed Basalmedium versetzt mit 10% FCS und 10 µL EGF pro Liter, 0,1% BSA sowie 1% Penicillin-Streptomycin
- Vitamin D₃-Stammlösungen von 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ und EB 1089
- Pipetten: Pasteur-Pipette und Saugpumpe, Pipette 1000µl (Eppendorf), Multipette (Eppendorf)
- Spülpuffer: PBS (phosphate buffered saline), gekühlt auf 4 °C

- Gel: Agarose, Ethidiumbromid, Bromphenolblau
- RT-Kit (Omniscript)
- DNase (Promega)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Primer für 25-Hydroxy-Vitamin D₃-1 α -Hydroxylase, 25-Hydroxy-Vitamin D₃-24-Hydroxylase und VDR (TibMolBiol)
- LightCycler® 2.0 System (Roche Applied Science)
- LightCycler® Capillaries 20 μ l (Roche Applied Science)
- LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science)

Probenbereitung und Versuchsdurchführung:

Die Real Time PCR mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I war das von uns verwendete Detektionsformat. Zunächst wurden in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser jeweils ca. 500000 – 1000000 Zellen und über Nacht für 16 – 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Vitamin D₃-Analoge (1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁷ mol/l, EB1089 10⁻⁷ mol/l und 25(OH)D₃ 10⁻⁷ mol/l) inkubiert und alle 24 Stunden das Medium bzw. Medium und Vitamin D₃-Metabolite gewechselt. Als Kontrolle wurden eine Medium- und eine Ethanolkontrolle mitbestimmt, bei denen ebenfalls alle 24 Stunden das Medium mit oder ohne Ethanol gewechselt wurde. Der Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das überstehende Medium mit der Saugpumpe abgesaugt und die Zellen auf der Platte mit PBS-Puffer gewaschen, welcher ebenfalls wieder abgesaugt wurde. Dann wurden die Zellen mit einem Gummischauber von der Schale abgelöst und in Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei ca. 400 g 10 min lang zentrifugiert, der Überstand entfernt, und das Pellet bei - 20°C eingefroren bis zur Durchführung der RNA-Isolierung.

Für die Isolierung der RNA aus den zuvor behandelten und geernteten Sebozyten wurde der RNeasy Mini-Kit® der Firma Qiagen benutzt. Die Durchführung erfolgte mittels des Spin-Protokolls des Kits. Außerdem werden Filter-Spitzen für die Eppendorf-Pipetten benutzt. Die verwendeten Zellpellets sollten die Größe von ca. 1 x 10⁷ Zellen haben. Die RNA wurde gemäß der beiliegenden Anleitung des Kits isoliert. Die eluierte RNA wurde bei - 80 °C aufbewahrt.

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese konnte überprüft werden, ob genügend RNA für die anschließende PCR isoliert werden konnte. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. 2 g Agarose wurden mit 100 ml Wasser vermischt und erhitzt bis die Agarose sich aufgelöst hatte. Dem Gelansatz wurden 10 μ l Ethidiumbromid zugesetzt. Der Ansatz wurde in einen Gelträger gegossen. In die Taschen des ausgekühlten Gels wurde ein Mix aus 1 μ l RNA, 9 μ l

Wasser und 3 µl Bromphenolblau-Puffer pipettiert. Eine Kontroll-RNA-Leiter mit Bromphenolblau wurde zur Abschätzung der RNA-Menge mitlaufen lassen.

Der nächste Schritt war die Umschreibung der isolierten RNA in eine cDNA. Dies erfolgte mit dem RT-Kit der Firma Omniscript laut beiliegender Anleitung. Die Ansätze für die Untersuchung der Proben im LightCycler® wurden mit dem LightCycler®-FastStart DNA Master SYBR Green I - Kit entsprechend dem Protokoll hergestellt. Nach dem Befüllen der 20µl fassenden LightCycler®-Kapillaren wurde das LightCycler® Probenkarussell in einer speziellen Zentrifuge zentrifugiert, wodurch die Proben luftbasenfrei in die Kapillaren gedrückt wurden. Danach wurde das Probenkarussell in den LightCycler® gestellt und nach Einstellung der Software die PCR gestartet.

4.3.2 Kristallviolett Assay (Crystal Violet Assay)

Der chemische Name von Kristallviolett ist Hexamethylen-*p*-rosanilinchlorid, Gentianaviolett, oder Methylviolett 10B, die Summenformel lautet $C_{25}H_{30}ClN_3$. Kristallviolett färbt vitale Zellen kräftig violett an. Mit einem Photometer bestimmt man die Konzentration des von den Zellen aufgenommenen Kristallviolett. Der Kristallviolett-Assay ist somit eine einfache und aussagekräftige Methode zur Beurteilung der Proliferation von Zellen. Das Absorptionsmaximum von Lichtwellen liegt bei einer Wellenlänge von 593 nm. Zur Herstellung der Stammlösung wurde Kristallviolettpulver in reinen Ethanol 20%ig im Verhältnis 1:100 gemischt. Die Arbeitslösung war eine 1:10 Verdünnung dieser Stammlösung mit reinem Ethanol 20%ig.

Material:

- Zellen: SZ95 und Mewo
- Platten: Transparente sterile 96-well-Platten, mit Kollagen Typ I beschichtet
- Medium: Medium: Sebomed Basalmedium versetzt mit 10% FCS und 10 µL EGF pro Liter, 0,1% BSA sowie 1% Penicillin-Streptomycin
- Vitamin D₃-Stammlösungen von 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ und EB 1089
- Ethanol 100%
- Farbstoff: Kristallviolett
Der wasserlösliche Farbstoff lag in der Arbeitslösung in Ethanol 20% gelöst in einer Konzentration von 0,5% vor
- Pipetten: Pasteur-Pipette und Saugpumpe, Pipette 1000µl (Eppendorf), Multipette (Eppendorf)
- Spülpuffer: PBS (phosphate buffered saline), gekühlt auf 4 °C

- Fixierung: Ethanol (rein) 70%
- Schüttelbank
- Photometer: Ein ELISA-Plate-Reader hat die relativen Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 550 nm in Bezug auf einen vorher bestimmten Referenzpunkt, d. h. ein nur mit PBS gefülltes Well einer 96-well Platte, gemessen.

Probenbereitung und Versuchsdurchführung:

Es wurden 3000 – 5000 Zellen pro Well einer 96-well-Platte ausgesät. Die Zellen erhielten pro Well 100 µl Sebomed-Basalmedium mit EGF versetzt. Die Zellen wurden während der 18 – 24stündigen Anwachszeit, in der sie am Plattenboden anwuchsen, im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre bebrütet.

Inkubiert wurden die Zellen anschließend mit folgenden Substanzen:

- 1,25(OH)₂D₃ in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁷ mol/L und 10⁻¹⁰ mol/L
- 25(OH)D₃ in der Konzentration 10⁻⁷ mol/L
- EB1089 in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁷ mol/L und 10⁻¹⁰ mol/L.

Das Medium, mit oder ohne Vitamin D₃-Metabolite, wurde alle 24 Stunden erneuert.

Zur Herstellung der Vitamin D₃-Lösungen wurden die Stammlösungen der Vitamin D₃-Metaboliten, welche in der Konzentration von 4 mmol/l (4 x 10⁻³ mol/l) vorlagen, mit 100%igem reinem Ethanol auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Dabei wurde eine 1:1000 Verdünnung konsequent beibehalten, dem Medium wurde also 1/1000 der Vitamin D₃-Lösungen zugegeben. Als Kontrollen wurde eine Ethanolkontrolle mit 1/1000 Ethanol pro Volumeneinheit Medium und eine reine Mediumkontrolle durchgeführt. Untersucht wurden die Wachstumsraten nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden.

Die Belegung der 96-well Platte beruhte auf empirischen Erfahrungen. Die Triplets gleicher Farbe sollten die Stellen der Platte zusammenfassen, auf denen die Zellen gleiche Wachstumsbedingungen haben. Die freien Wells wurden - ebenfalls auf dem Hintergrund empirischer Erfahrungen - mit PBS-Puffer ausgefüllt, um eine konstantes Zellwachstum zu gewährleisten.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|-----------|--------|--------|--------|--------|------------|------------|--------|--------|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | Blue | Yellow | Yellow | Orange | Orange | Red | Red | Purple | Purple | | |
| C | | Blue | Blue | Yellow | Orange | | Red | | Purple | | | |
| D | | Dark Blue | | | | | | | | | | |
| E | | Dark Blue | | Green | Green | | | | | | | |
| F | | Dark Blue | | Green | Teal | Teal | Dark Green | Dark Green | | | | |
| G | | | | | Teal | | Dark Green | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| | |
|------------|--------------------|
| Blue | Mediumkontrolle |
| Dark Blue | Ethanolkontrolle |
| Yellow | 1,25(OH)2D3 10-6M |
| Orange | 1,25(OH)2D3 10-7M |
| Red | 1,25(OH)2D3 10-10M |
| Green | EB1089 10-6M |
| Teal | EB1089 10-7M |
| Dark Green | EB1089 10-10M |
| Purple | 25(OH)D3 10-7M |

Abbildung 4: Belegung der 96-well Platte für den Kristallviolett Assay

Die einzelnen Wells wurden jeweils mit 200 μ L der Zellsuspension bzw. mit PBS-Puffer aufgefüllt. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung untersucht, es wurden also jeweils drei Wells gleich behandelt.

Waren die Wachstumszeiten der Zellen erreicht, konnten die Platten für die Kristallviolett-Färbung vorbereitet werden. Zuerst wurde das Medium aus den mit Zellen bewachsenen Wells mittels einer Pasteur-Pipette und einer Saugpumpe abgesaugt. Dann wurden die Zellen zweimal mit 200 μ L 4 °C kaltem PBS-Puffer pro well gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 150 μ L 70%igem Ethanol pro well. Die Platten wurden bei 4 °C für ca. 12 Stunden gelagert. Dann wurde die Flüssigkeit aus den Wells verworfen und auf die fixierten Zellen 100 μ L Kristallviolett-Arbeitslösung pro Well gegeben. Damit der Farbstoff in die Zellen eindringen konnte, wurden die Platten 30 Minuten auf die Schüttelbank gestellt. Dann wurde der überschüssige Farbstoff mit Aqua dest. mehrmals ausgewaschen. Die Platten wurden mindestens 24 Stunden lang bei Raumtemperatur getrocknet bis sie vollständig frei von Wasser waren. Zur Messung der Konzentration des aufgenommenen Kristallviolett wurde 200 μ L 70 %iges reines Ethanol in jedes Well gegeben und die Platte 30 Minuten lang auf der Schüttelbank geschüttelt um den Farbstoff zu lösen. Die Konzentration des Farbstoffs in jedem Well wurde in einem Elisa-Plate-Reader bei 550 nm Wellenlänge bestimmt.

4.3.3 WST-1 Assay

Der WST-1-Assay ist ein Färbetest, der die Zellproliferation und Zellvitalität quantifiziert. Das Zellproliferations-Reagenz WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate) ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, das von stoffwechselaktiven Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan gespalten wird. Diese Reaktion hängt stark von der Produktion von NAD(P)H in lebenden Zellen ab. Der Gehalt an gebildetem Formazan gibt also direkte Hinweise auf die Anzahl vitaler Zellen einer Zellkultur. WST-1 ist ein blass-rosa Farbstoff dessen Farbe bei der Entstehung von Formazan nach dunkel gelb-orange umschlägt. Je mehr vitale Zellen in der Kultur sind und je länger die Zeit ist, in der die Zellen WST-1 verstoffwechseln können, desto dunkler wird die Farbe.

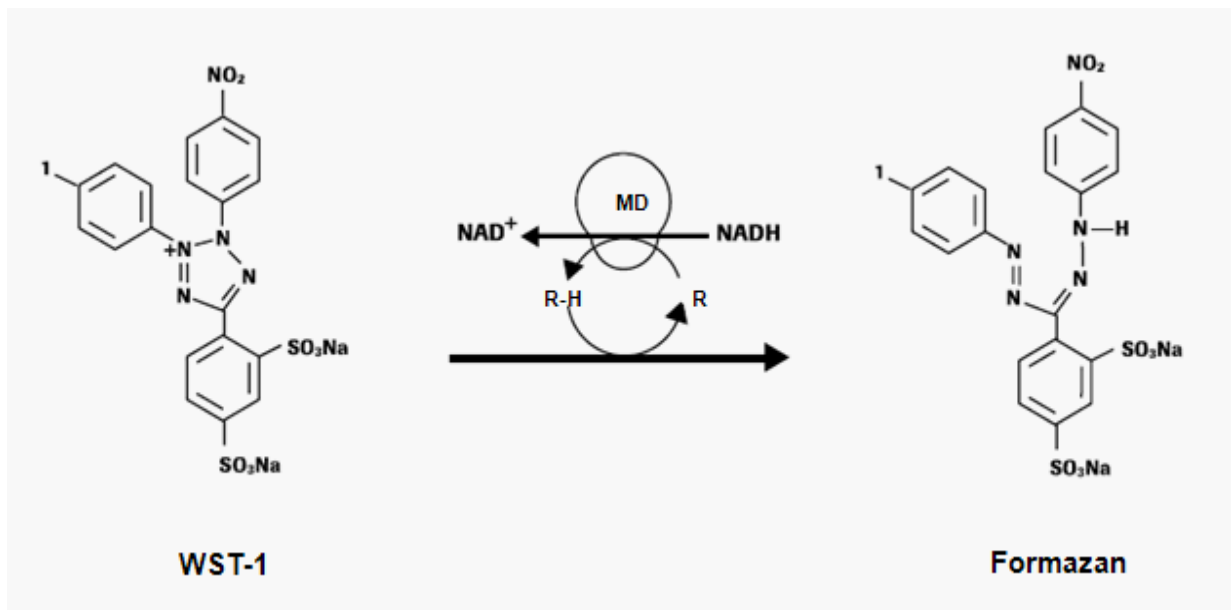


Abbildung 5: Spaltung von WST-1 zu Formazan (MD = mitochondriale Dehydrogenasen, R = elektronenübertragendes Reagenz)

Die Konzentration des verstoffwechselten WST-1-Reagenzes kann mit Hilfe eines ELISA-Plate-Readers bei 450 nm Wellenlänge gemessen werden. Der Vorteil von WST-1 ist, dass es direkt zum Zellkulturmedium gegeben werden kann und nicht radioaktiv ist. Für unsere Versuche wurde es bei -18°C aufbewahrt und für den Versuch im Wasserbad bei ca. 35°C aufgetaut.

Material:

- Zellen: SZ95
- Medium: Sebomed Basalmedium versetzt mit 10% FCS und 10 µL EGF pro Liter, 0,1% BSA sowie 1% Penicillin-Streptomycin

- Platten: Transparente sterile 96-well-Platten, mit Kollagen Typ I beschichtet
- Vitamin D₃-Stammlösungen von 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ und EB 1089
- Ethanol 100%
- Pipetten: Pasteur-Pipette und Saugpumpe, Pipette 1000µl (Eppendorf), Multipipette (Eppendorf)
- Farbstoff: WST-1 Reagenz, bei – 18 °C gelagert, zur Versuchsdurchführung aufgetaut

Probenbereitung und Versuchsdurchführung:

Das Aussähen der Zellen erfolgte unter gleichen Bedingungen wie beim Kristallviolett-Assay.

Behandelt wurden die Zellen auf die gleiche Weise wie beim Kristallviolett-Assay. Auch hier wurde eine Mediumkontrolle und eine 1:1000 Ethanolkontrolle durchgeführt. Zusätzlich ist beim WST-1-Assay eine Negativ-Kontrolle erforderlich. Dafür wurde bei drei der Wells, die nicht mit Zellen bewachsen waren, der PBS-Puffer abgezogen und 100 µL Medium und WST-1-Reagenz dazugegeben. Untersucht wurden die Stundenwerte 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden.

Folgende Abbildung zeigt die Belegung der 96-well-Platte für den WST-1-Assay.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|-----------|--------|--------|--------|--------|------------|------------|--------|--------|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | Blue | Yellow | Yellow | Orange | Orange | Red | Red | Purple | Purple | | |
| C | | Blue | Blue | Yellow | Orange | | Red | | Purple | | | |
| D | | Dark Blue | | | | | | | | | | |
| E | | Dark Blue | | Green | Green | | | | | | | |
| F | | Dark Blue | | Green | Teal | Teal | Dark Green | Dark Green | | | | |
| G | | | | | Teal | | Dark Green | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| | |
|------------|---|
| Blue | Mediumkontrolle |
| Dark Blue | Ethanolkontrolle |
| Yellow | 1,25(OH) ₂ D ₃ 10-6M |
| Orange | 1,25(OH) ₂ D ₃ 10-7M |
| Red | 1,25(OH) ₂ D ₃ 10-10M |
| Green | EB1089 10-6M |
| Teal | EB1089 10-7M |
| Dark Green | EB1089 10-10M |
| Purple | 25(OH)D ₃ 10-7M |
| Grey | Negativkontrolle (PBS + WST-1) |

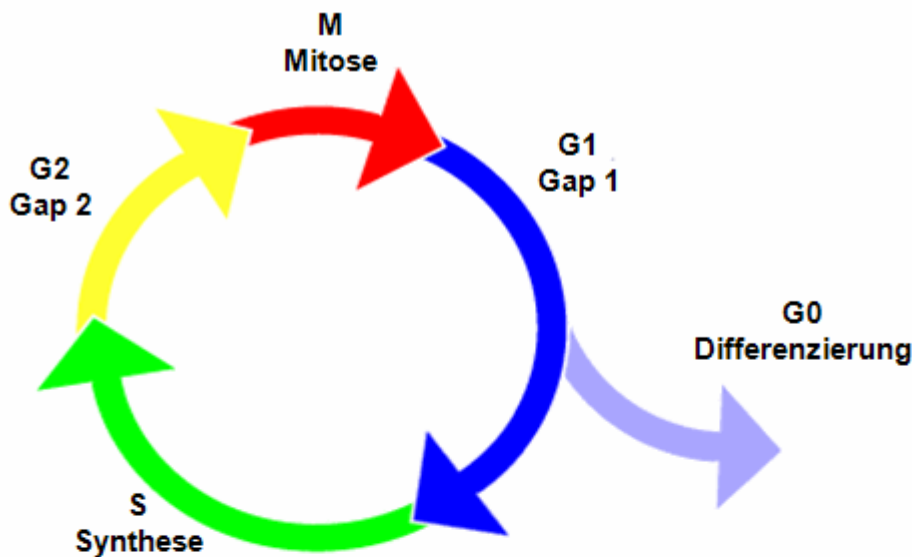
Abbildung 6: Belegung der 96-well Platte für den WST-1 Assay

Hatten die Zellen die gewünschte Wachstumszeit erreicht, wurde für die Negativ-Kontrolle in drei Wells PBS abgezogen und 100 μ L Medium mit 10 μ L WST-1-Reagenz zugegeben. Zu jedem der mit Zellen bewachsenen Wells wurde ebenfalls 10 μ L WST-1-Reagenz mit Hilfe einer Multipette (Eppendorf) zugegeben. Das Reagenz konnte direkt ins Medium gegeben werden. Sofort nach Zugabe des WST-1-Reagenz wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h die Konzentration mit einem ELISA-Plate-Reader bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Die Platte wurde danach wieder im Brutschrank bebrütet und jede Stunde bis zum Zeitpunkt $t = 4$ h erneut die Konzentration gemessen. Im Laufe der Zeit wird das WST-1-Reagenz farbintensiver, was höhere Fotometerwerte zur Folge hat. Bei der Auswertung wählt man einen Stundenwert aus, dessen Daten man verwenden möchte. Am Günstigsten haben sich die Stundenwerte drei Stunden und vier Stunden erwiesen. Nach der Messung kann die Platte verworfen werden.

4.3.4 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter)

Grundlagen:

Der Zellzyklus ist der zyklische Ablauf einer eukaryotischen Zelle von einer Zellteilung zur nächsten. Er gliedert sich in die Interphase und die Mitosephase. Die Interphase besteht aus den Phasen G1, S und G2. In der Mitosephase findet die Verdopplung des Chromatins statt. Die folgende Abbildung erläutert die Grundlagen der einzelnen Phasen des Zellzyklus.



| Phase | Charakteristika |
|-------|---|
| G0 | Ruhephase: ausdifferenzierte Zellen verbleiben in der G ₁ -Phase, die dann als G ₀ -Phase bezeichnet wird DNA-Gehalt: 2n |
| G1 | postmitotische Phase oder Präsynthesephase: im Anschluss an die Mitose beginnt die Zelle wieder zu wachsen, Zellbestandteile werden ergänzt. Die nachfolgende Synthesephase wird vorbereitet. DNA-Gehalt: 2n |
| S | Synthesephase: Replikation der DNA. DNA-Gehalt: 2n – 4n |
| G2 | prämitotische Phase oder Postsynthesephase, die Zelle bereitet sich auf die Mitose vor DNA-Gehalt: 4n |
| M | Mitosephase: Hier findet die Teilung der Chromosomen, des Zellkerns (Karyokinese) und der Zelle (Zytokinese) statt. Die Mitose ist in die Phasen Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, und Telophase unterteilt. |

Abbildung 7: Phasen des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle

Prinzip der Durchflusszytometrie (Flow Cytometrie):

Bei der Durchflusszytometrie untersucht man die Fluoreszenzeigenschaften von Zellen, die hintereinander durch ein Messgerät fließen. Zellen in Suspension werden in einem dünnen Strahl fokussiert und passieren einzeln einen Messbereich, in dem es zur Streuung von Licht und zur Fluoreszenzemission kommt. Streulicht und Fluoreszenz werden gemessen und geben Auskunft über bestimmte Eigenschaften der Zellen, welche nach den gewünschten Eigenschaften sortiert werden können. Die Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff erfolgt je nach gewünschtem Untersuchungsinhalt. In unserem Fall wurde untersucht, welcher Anteil der Zellen einer Zellpopulation sich in Teilung befindet. Die RNA in den Zellen wurde durch eine RNAase abgebaut und die Zellen permeabilisiert. Durch Anfärben der DNA in den Zellkernen mit Propidiumiodid, welches mit der DNA interkaliert, konnten wir herausfinden, ob sich Zellen in der G0/G1-Phase, in der S-Phase oder in der G2/M-Phase des Zellzyklus befinden. Die Menge an diploider DNA ist direkt proportional zur Fluoreszenz des Propidiumiodids (im Kanal FL2 oder FL3 des Gerätes zu messen). Die Propidiumiodid-Färbung kann auch den Anteil der Zellen erfassen, die sich in Apoptose befinden.

Zur korrekten Beurteilung einer Zellreihe musste das FACS-Gerät auf die jeweilige Zellreihe eingestellt werden. Die Messergebnisse wurden in dem Programm Cylchred dargestellt und mit Hilfe von Microsoft Excel und SPSS 15.0 für Windows ausgewertet. Anhand der bestimmten DNA-Menge der einzelnen Zellen, konnte man auf die Zugehörigkeit zu den einzelnen Phasen des Zellzyklus schließen.

Die folgende Abbildung zeigt einen typischen Graphen einer FACS-Analyse von SZ95 mit dazugehörigem DNA-Gehalt. Die darauf folgende Abbildung zeigt denselben Graphen mit den dazugehörigen Zellzyklusphasen, in denen sich die Zellen zum Messzeitpunkt befinden.

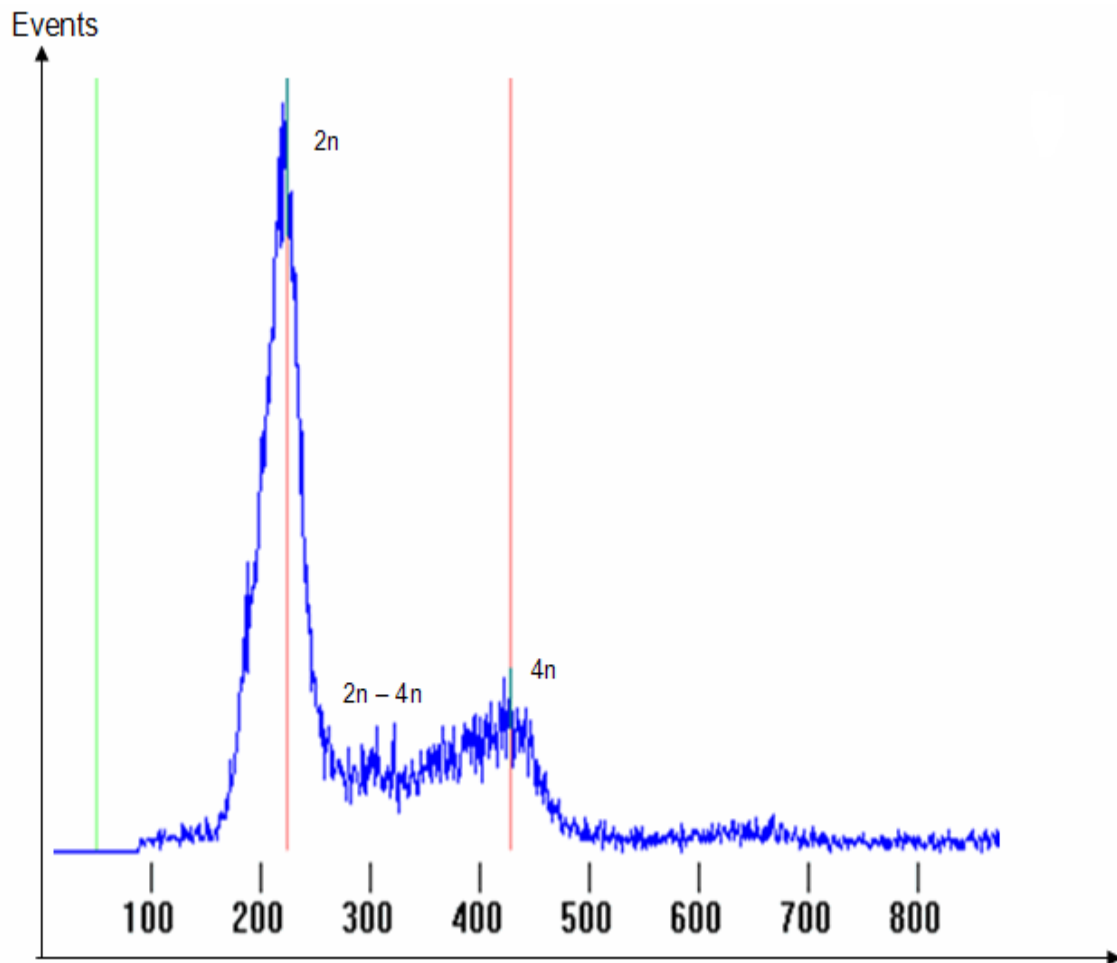


Abbildung 8: DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphasen als Vielfaches des haploiden DNA-Gehaltes (n)

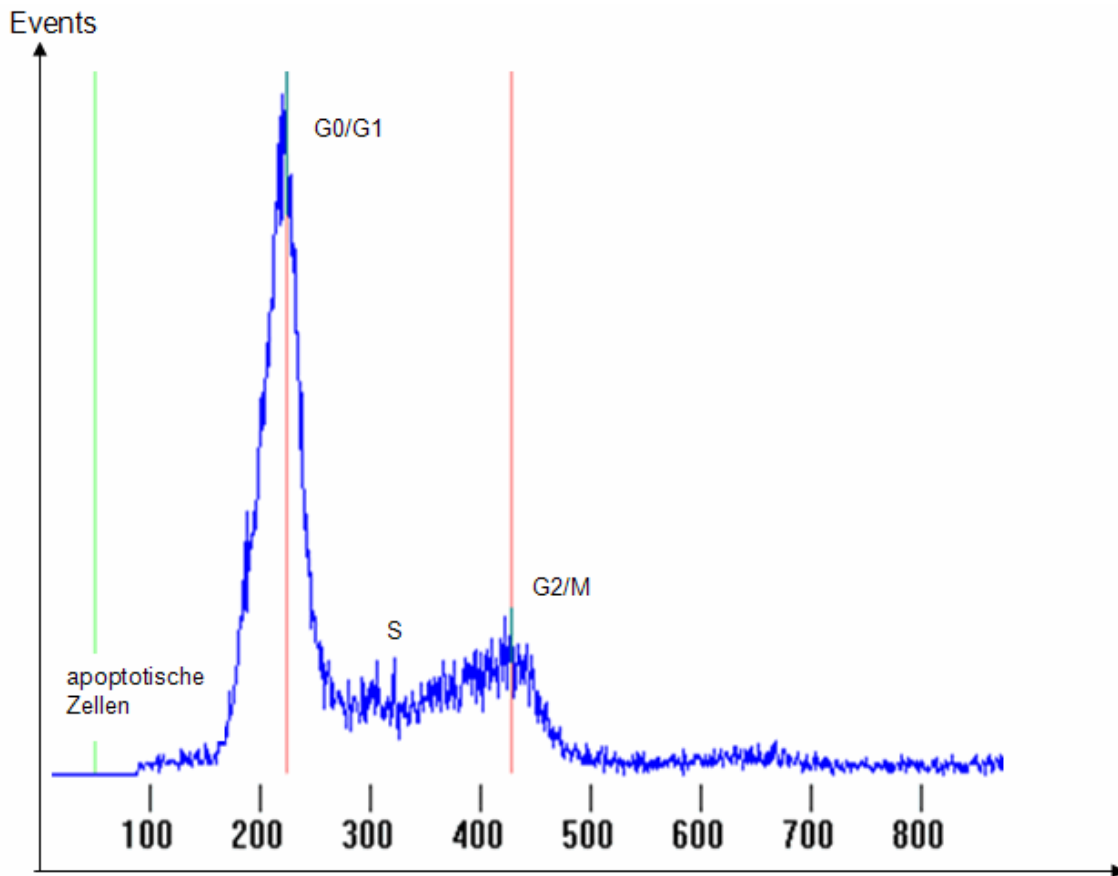


Abbildung 9: Zellzyklusphasen, wie sie sich bei der Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie darstellen

Material:

- Zellen: SZ95, Mewo
- Medium: Sebomed Basalmedium versetzt mit 10% FCS und 10 µL EGF pro Liter, Sebomed Basalmedium versetzt mit 10% FCS, 10 µL EGF pro Liter und 0,1% BSA, RPMI-Medium versetzt mit 20 µL EGF pro Liter und 10% FCS
- Platten: Sterile 6-well-Platten, mit Kollagen Typ I beschichtet
- PBS-Puffer, Trypsin
- Pipetten: Pasteur-Pipette und Saugpumpe, Eppendorf-Pipetten (Volumen 100 µL, 1000 µL)
- Reagenz-Gefäße: 15 ml Falcons, FACS-Röhrchen
- Vortex
- Zentrifuge
- Wasserbad
- 70% Methanol in PBS (gelagert bei - 20 °C)
- Propidiumiodid (gelagert bei 4 °C), Stammlösung 1 mg/mL, Endkonzentration 50 µg/ml
- RNAase (gelagert bei - 20 °C), Endkonzentration 50 µg/mL

Probenbereitung und Versuchsdurchführung:

Die Zellen wurden in sterile 6well-Platten ausgesät. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zellen zum einen für die niedrigen Stundenwerte dicht genug waren, um in semi-konfluenten Kultur zu wachsen, zum anderen für die hohen Stundenwerte nicht so dicht wurden, dass sie vom Wellboden abschwammen. Deshalb wurden für die verschiedenen Stundenwerte verschiedene Zellzahlen ausgesät. Für den 24h-Wert 300 000 Zellen pro Well, für den 48h-Wert 200 000 Zellen pro Well, für den 72h-Wert 100 000 Zellen pro Well und für den 96- und 120h-Wert jeweils 75 000 Zellen pro Well.

Die Behandlung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung, d. h. es wurden für jede Behandlung zwei Wells mit Zellen ausgesät.

Alle 24 Stunden wurden die Zellen mit folgenden Substanzen behandelt:

- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-6} mol/L
- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-7} mol/L
- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-10} mol/L
- EB 1089 10^{-6} mol/L
- EB 1089 10^{-7} mol/L
- EB 1089 10^{-10} mol/L
- $25(\text{OH})\text{D}_3$ 10^{-7} mol/L

Als Kontrollen wurde eine Mediumkontrolle und eine 1: 1000 Ethanolkontrolle mitbestimmt. Für die Behandlung wurde das Medium mit der Pasteur-Pipette abgesaugt. Es wurden pro Well 2 ml Medium vorgelegt und jeweils 2 μL der Stammlösung der zu testenden aktiven Vitamin D_3 -Analoga zugegeben, entsprechend der gewünschten Konzentration. Somit konnte eine 1:1000 Verdünnung beibehalten werden.

Das überstehende Medium wurde von den Zellen mit der Pasteur-Pipette abgesaugt und verworfen. Dann wurden die Zellen mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen, welcher ebenfalls wieder abgesaugt wurde. Zum Ablösen der Zellen vom Well-Boden wurde in jedes Well 200 μL Trypsin gegeben, durch Bewegen der Platte verteilt und wieder abgesaugt. Da Sebozyten sich nicht sofort von der Platte lösen, wurden die Platten für einige Minuten in den Brutschrank gestellt. Sobald sich die Zellen vom Boden lösten, wurden die Zellen mit 2 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und die Zellen bei 400g zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet sollte ca. 1×10^6 Zellen groß sein.

Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem Methanol (-20°C) resuspendiert und im Vortex vermischt. Zur Fixierung der Zellen wurden sie im Methanol 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert.

Für die Färbung wurde eine Färbelösung hergestellt, die pro Probe 800 μL PBS, 100 μL RNAase und 100 μL Propidiumiodid enthielt. Nach der Fixierung wurden die Zellen nochmals bei 400 g zehn Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen zum Auswaschen des Methanols nochmals in 1 ml PBS pro Pellet gewaschen, nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden danach in 1 ml Färbelösung resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Bei 37 °C wurden die Röhrchen 30 Minuten im Wasserbad inkubiert.

Für jede Zellreihe musste im FACS-Gerät zunächst ein Protokoll erarbeitet werden, in dem die Zielzellpopulation ermittelt wurde. Das Gerät musste also auf jede neue Zellreihe eingestellt werden. Dann konnte man mit den vorher erarbeiteten Einstellungen die Zellen verschiedener Behandlungen vergleichen. Die Daten wurden vom FACS-Gerät zu einem PC transferiert und mittels des Programms Cylchred ausgewertet. Als Ergebnisse erhielt man die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus, wobei die G1/G0-Phase am interessantesten für unsere Auswertung war, da wir vermuteten, dass die Zellen, die mit aktiven Vitamin D₃-Analoga behandelt wurden, durch einen Arrest in der G1/G0-Phase in ihrer Proliferation gehindert wurden.

4.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

4.4.1 Datenverarbeitung

Die im Laufe der Versuche erzielten Daten wurden auf einem Notebook der Firma Hewlett Packard (Intel Celeron Prozessor, 1,5 GHz, Betriebssystem Windows XP) mit den Programmen MS Office Excel 2003 und SPSS 15.0 für Windows analysiert. Der Text wurde mit MS Office Word 2003 und Adobe PDF Creator geschrieben. Die vorhandenen Bilder wurden mit MS Paint und Printkey bearbeitet.

4.4.2 Signifikanzberechnung

Für die Signifikanzberechnung mit SPSS wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Er vergleicht als nichtparametrischer, also verteilungsfreier Test, zwei unabhängige Stichproben miteinander, deren Daten unverbunden sind. Die Nullhypothese besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Stichproben - in unseren Versuchen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen - gibt. Zur Widerlegung der Nullhypothese ist ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt worden. Verglichen wurden jeweils die Werte der behandelten Zellen mit denen der Ethanolkontrolle zu einem bestimmten Zeitpunkt.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche

5.1.1 Optimierung der Zellzahl für die 96-well-Platte

Fragestellung und Versuchsdurchführung:

Zunächst musste geklärt werden, bei welcher ausgesäten Zellzahl pro Well einer 96well-Platte die Zellen optimal wuchsen, d.h. bei welcher Zellzahl die Ethanol-Kontrolle annähernd exponentiell anstieg. Dazu wurden verschiedene 96well-Platten mit verschiedenen Zellzahlen pro well angelegt. Alle 24 Stunden wurde mittels Kristallviolett-Assay die Proliferation gemessen. Untersucht wurden Zellzahlen von 500, 1000, 2000, 3000, 5000 und 10000 Zellen pro well.

Ergebnis:

Die folgende Graphik zeigt die Wachstumskurven von SZ95-Populationen bei verschiedenen Ausgangszellzahlen pro well einer 96-Well Platte.

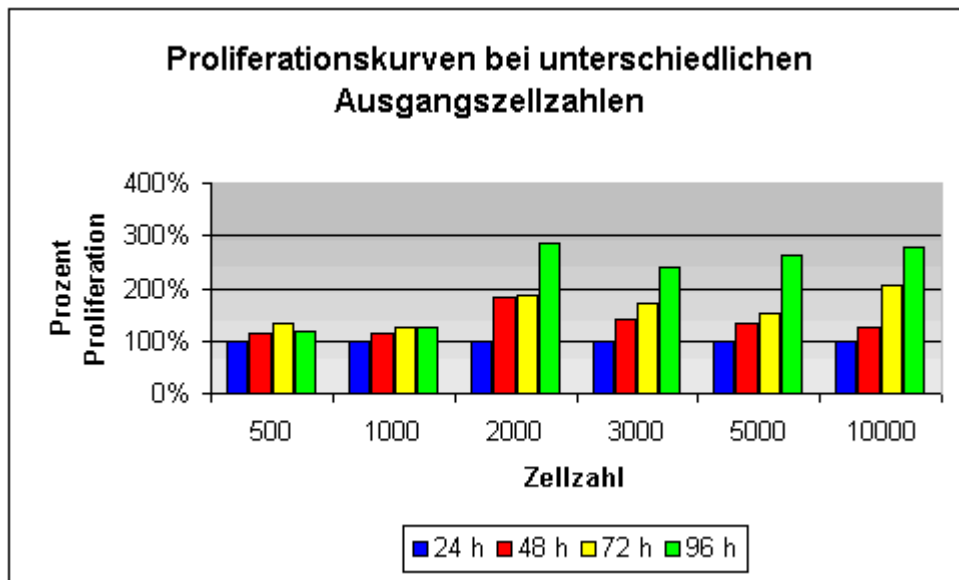


Abbildung 10: Proliferationskurven von SZ95 bei verschiedenen Zellzahlen pro Well einer 96-well-Platte

Wie man sehen kann, fand bei 500 und 1000 Zellen pro well fast keine Proliferation statt. Erst ab einer Zellzahl von 2000 Zellen war ein deutliches Wachstum zu erkennen. Bei 3000 Zellen schien das Wachstum noch ziemlich linear. Bei 5000 und 10000 Zellen pro well konnte man ein annähernd exponentielles Wachstum vermuten.

5.1.2 Ermittlung der Toxizität von Ethanol auf SZ95

Fragestellung und Versuchsdurchführung:

Die verwendeten aktiven Vitamin D₃-Metabolite lagen gelöst in 100%igem Ethanol vor. Bei den Behandlungen wurde eine 1:1000 Verdünnung des Ethanols konsequent beibehalten. Bei jedem Versuch wurde eine Ethanolkontrolle mit einem Anteil von 1:1000 Ethanol im Medium und eine reine Mediumkontrolle mitbestimmt. Es stellte sich die Frage, ob Ethanol – was bekanntlich ein Zellgift ist – in der Konzentration von 1:1000 im Medium die Zellproliferation oder die Vitalität der Zellen beeinträchtigt. Wir haben den Kristallviolett-Assay und den WST-1-Assay verwendet, um die Proliferation von SZ95 mit und ohne Inkubation mit Ethanol in der Verdünnung 1:1000 zu untersuchen. Die Versuchsanordnung und die Durchführung des Kristallviolett-Assays und des WST-1-Assays sind bereits beschrieben worden. In drei Versuchswiederholungen wurden jeweils drei Wells für die Ethanolkontrolle und die Mediumkontrolle angelegt.

Die Mediumgruppe erhielt Sebomed Basalmedium mit EGF. Die Ethanolgruppe erhielt dasselbe Medium mit EGF, zusätzlich noch mit einem Anteil von 1:1000 Ethanol. Aus den drei Versuchen wurden die Mittelwerte bestimmt und graphisch dargestellt.

Ergebnisse:

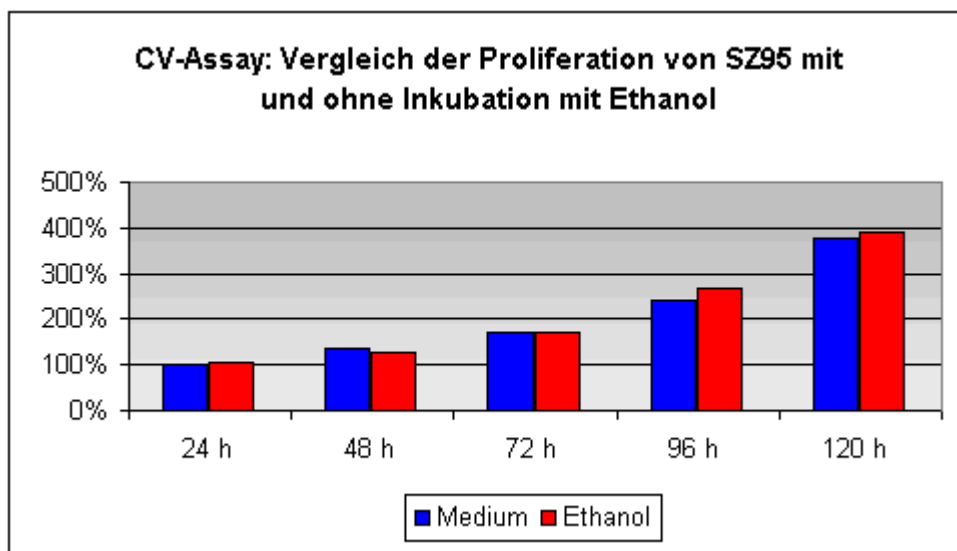


Abbildung 11: Wachstum von nicht behandelten und mit Ethanol behandelten Zellen im Kristallviolett-Assay

Wie man sehen kann, verlief die Proliferation der Ethanolkontrolle und der Mediumkontrolle annähernd gleich. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied bei der Berechnung mit SPSS festgestellt werden. Ethanol scheint in der Konzentration 1:1000 keine Auswirkungen auf SZ95 zu haben.

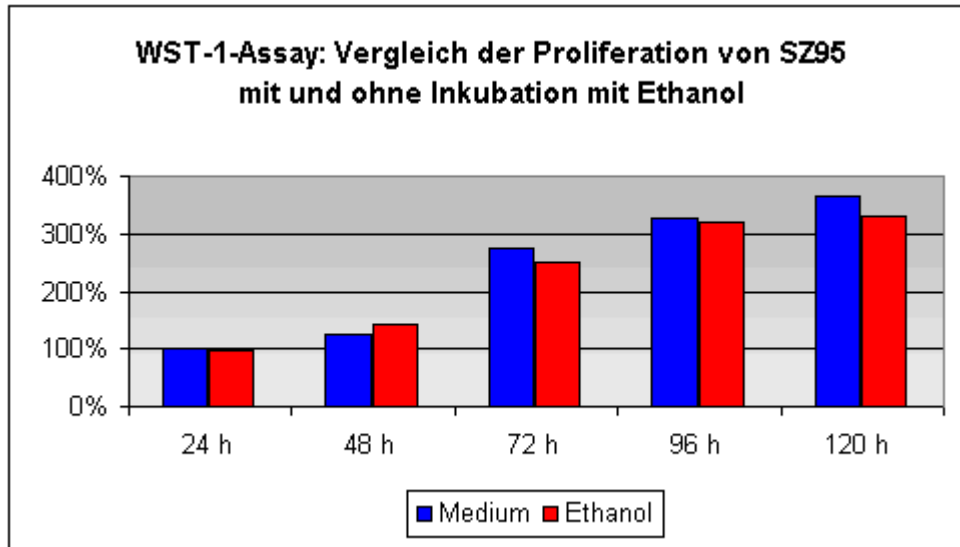


Abbildung 12: Wachstum von nicht behandelten und mit Ethanol behandelten Zellen im WST-1-Assay

Im WST-1-Assay war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Mediumgruppe und der Ethanolgruppe feststellbar, was die Auswertung mit SPSS ergeben hat. Auch bei diesem Vergleich konnten wir den Schluss ziehen, dass Ethanol in der von uns gewählten Konzentration die Zellen nicht in ihrer Proliferation beeinträchtigt.

5.1.3 Untersuchung der BSA-Konzentration auf die Lebensfähigkeit und Proliferation von SZ95

Fragestellung und Versuchsdurchführung:

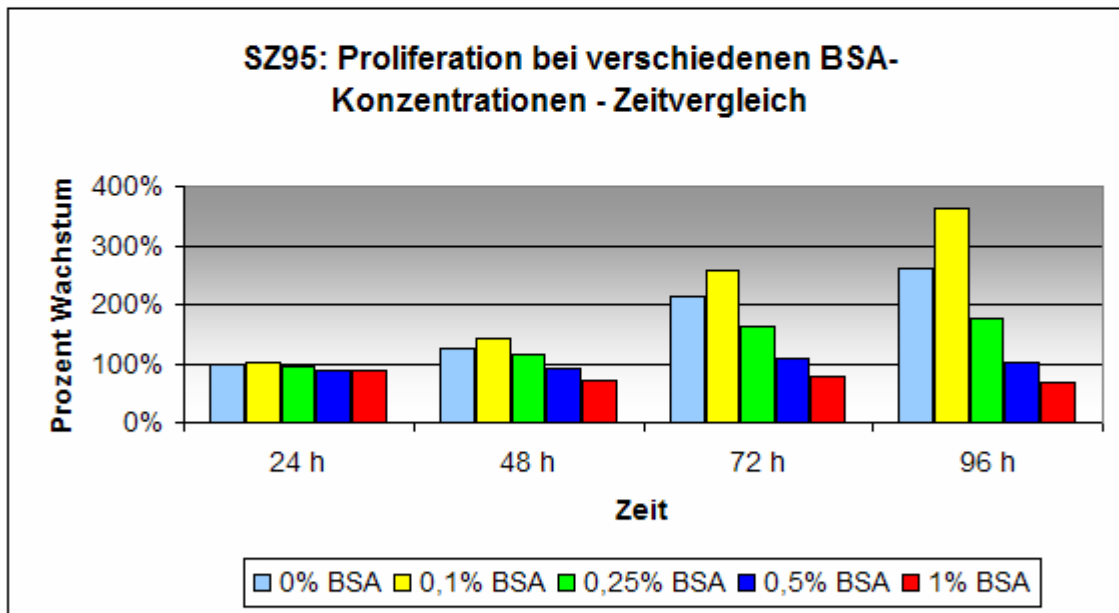
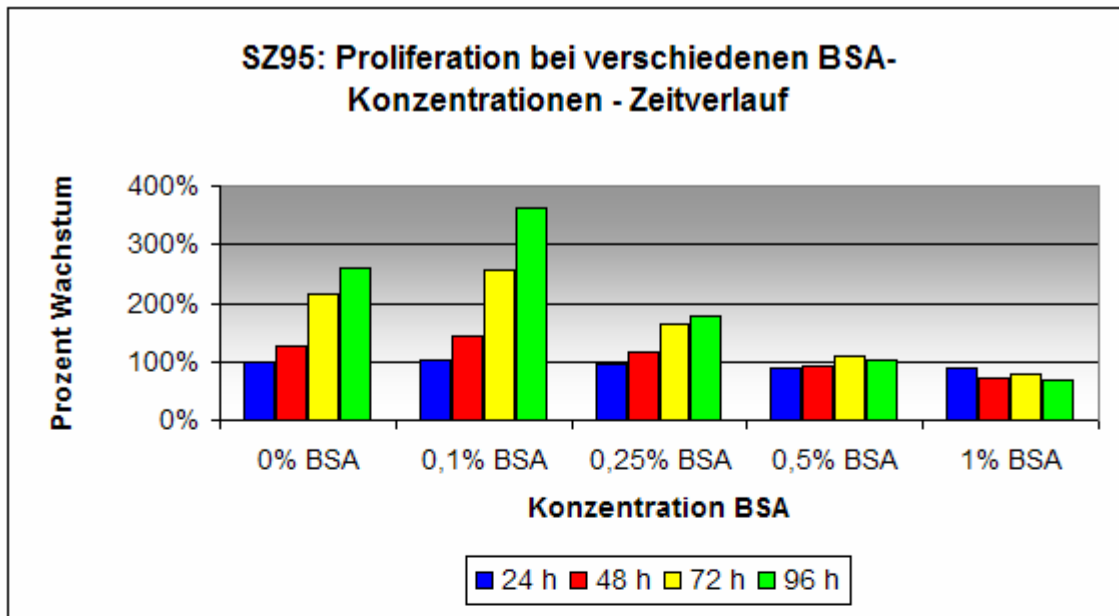
Bei der Arbeit mit SZ95 ist aufgefallen, dass die Zellen in Sebomed-Medium, das für die Versuche zunächst, wie bei anderen Zellen üblich, mit einer Konzentration von 1% BSA versetzt wurde, die Proliferation einstellten und sogar abstarben. Deshalb untersuchten wir die Toxizität von BSA auf Sebozyten. In zwei Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser wurde die gleiche Zahl Sebozyten ausgesät. Eine Schale erhielt normales Nährmedium, die andere Schale erhielt Nährmedium mit 1% BSA. Nach 48 Stunden wurde die Zellmorphologie mit dem Lichtmikroskop beobachtet. Die Zellen, welche normales Medium erhielten, sahen morphologisch intakt aus und proliferierten gut. Die Zellmorphologie der BSA-Gruppe war deutlich verändert. Ein Großteil der Zellen war abgestorben, viele Zelltrümmer waren erkennbar und es fand keine sichtbare Proliferation statt. Daher untersuchten wir, in welcher Konzentration BSA dem Medium zugesetzt werden kann, um die Zellen in ihrer Lebensfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Deshalb wurde die Toxizität von BSA in verschiedenen Konzentrationen auf SZ95 und zum Vergleich dazu auf Mewo mittels des Kristallviolett-Assays untersucht. In 96-well-Platten wurden ca. 3000 Zellen pro Well mit Sebomed Basalmedium (versetzt mit 10%

FCS und 20 µl EGF pro Liter) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bebrütet. In Dreifachbestimmung wurden die Zellen mit folgenden BSA-Konzentrationen inkubiert: 0% (Mediumkontrolle), 0,25%, 0,5%, 1% BSA.

Das Medium mit dem entsprechenden BSA-Anteil wurde täglich gewechselt und nach 24, 48, 72 und 96 Stunden, gemäß der Vorgehensweise des Kristallviolett-Assays, die Proliferation gemessen.

Ergebnis:

Die Folgende Abbildung zeigt das Wachstum von SZ95 bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium.

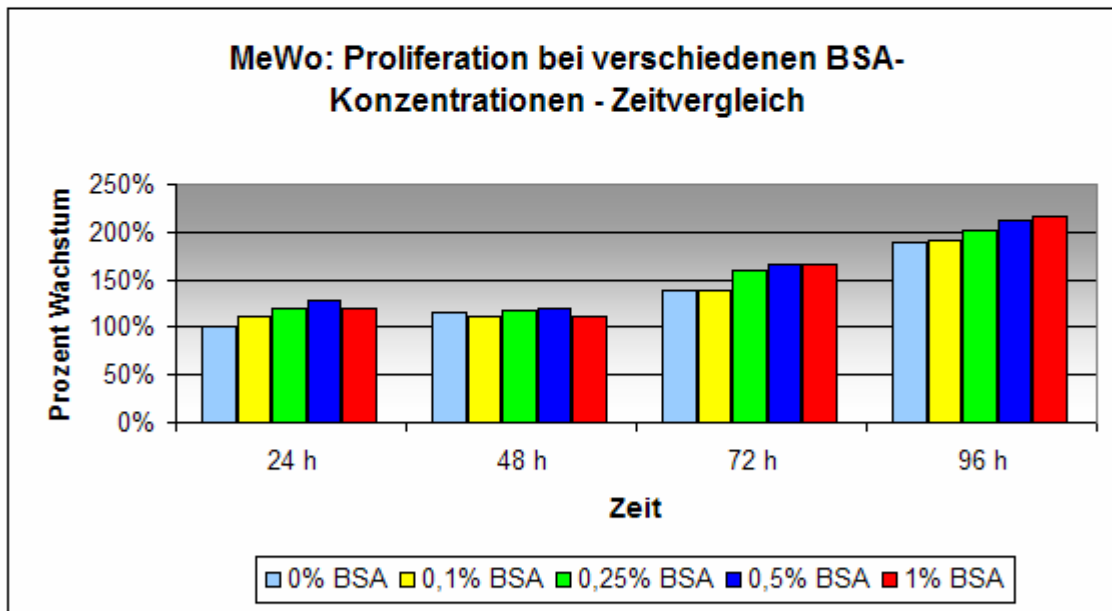
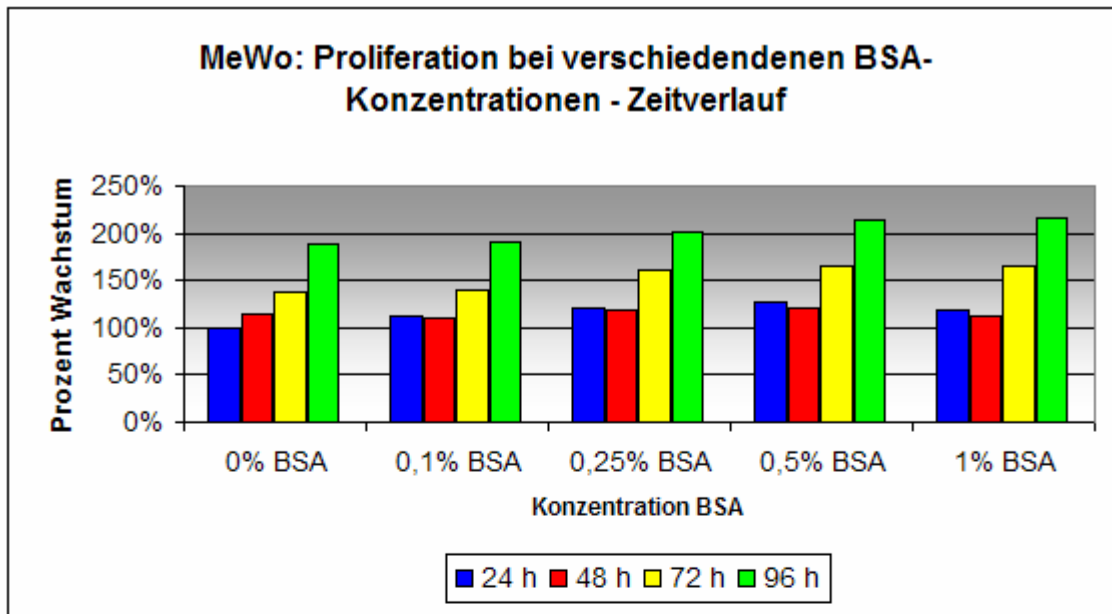


| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| 0% BSA | 100,00% | 126,98% | 214,03% | 259,54% |
| 0,1% BSA | 101,23% | 143,60% | 256,81% | 362,53% |
| 0,25% BSA | 94,28% | 114,71% | 164,31% | 177,66% |
| 0,5% BSA | 87,19% | 92,64% | 108,72% | 101,63% |
| 1% BSA | 88,83% | 72,34% | 79,16% | 68,94% |

Abbildung 13: Wachstum von SZ95 bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium

Wir kamen zu dem Ergebnis, dass bei 0% BSA und etwas deutlicher noch bei 0,1% BSA, eine annähernd exponentielle Wachstumskurve vorliegt. Ab einer Konzentration von 0,25% BSA war dies nicht mehr der Fall. Bei 0,25% BSA war das Wachstum noch annähernd linear, jedoch ab 0,5% BSA fand praktisch keine Proliferation statt. Die Zellen starben sogar ab, vor allem bei einer Konzentration von 1% BSA.

Zum Vergleich wurde mit demselben Verfahren die BSA-Wirkung auf Mewo untersucht. Dazu wurden in Doppelbestimmung für 24, 48, 72 und 96 Stunden je eine 96well-Platte mit 3000 Zellen pro Well angelegt. Als Nährlösung wurde das übliche für Mewo verwendete Medium gewählt, dem verschiedene BSA-Konzentrationen zugegeben wurden.



| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| 0% BSA | 100,00% | 114,74% | 138,32% | 188,44% |
| 0,1% BSA | 112,24% | 110,66% | 139,46% | 191,38% |
| 0,25% BSA | 120,63% | 118,59% | 160,54% | 200,91% |
| 0,5% BSA | 127,44% | 119,95% | 165,08% | 212,93% |
| 1% BSA | 119,50% | 111,56% | 165,76% | 216,33% |

Abbildung 14: Wachstum von Mewo bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium

Anhand der in etwa gleichen Wachstumskurven und konstanten Wachstumswerten im Zeitvergleich konnten wir man davon ausgehen, dass Mewo nicht empfindlich gegenüber BSA-Werten von bis zu 1% sind.

5.1.4 Ermittlung der optimalen BSA-Konzentration im Medium für eine optimale Vitamin D₃-Wirkung

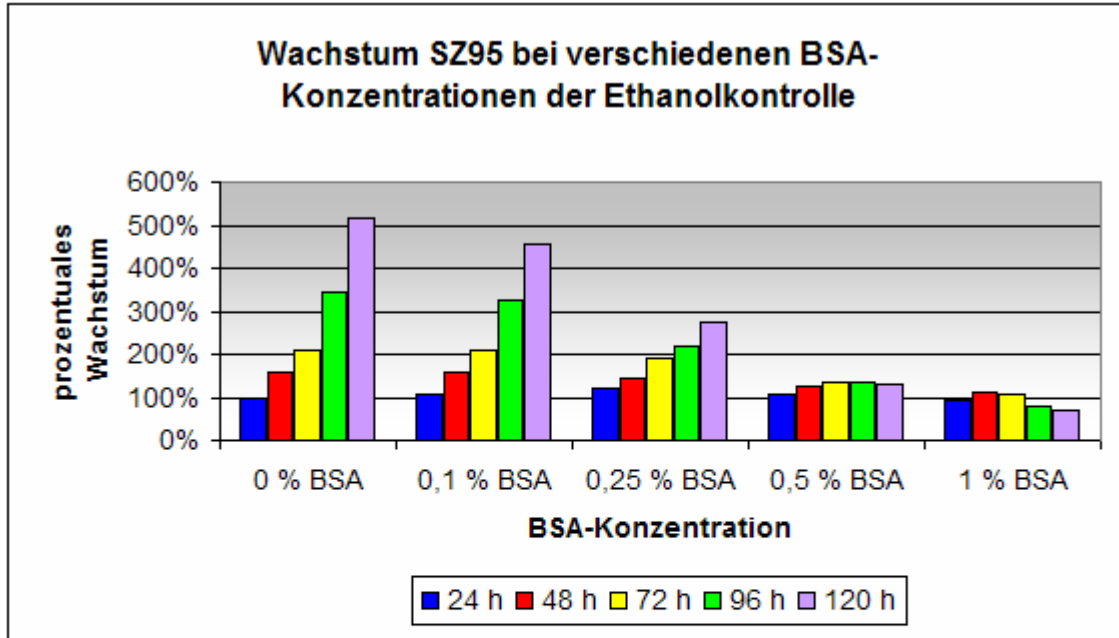
Wie bereits festgestellt, wirkt BSA in bestimmten Konzentrationen toxisch auf SZ95. Es ist aber als Trägerprotein für lipophile Stoffe wie Vitamin D₃ von Bedeutung, da es dieses in die Zellen transportiert. Es stellte sich daher die Frage, wie viel BSA kann man zum Medium dazugeben um kein Absterben der Zellen und keine Proliferationshemmung zu provozieren und trotzdem eine genügende Vitamin D₃-Wirkung zu erreichen. Dazu wurde in Doppelbestimmung folgender Versuch durchgeführt. In 96-well-Platten wurden 3500 Zellen pro Well ausgesät und 18 bis 24 Stunden lang bebrütet. Dann wurden jeweils drei Wells mit folgenden Substanzen behandelt:

- Medium + 0 % BSA
- Medium + 0,1% BSA
- Medium + 0,25% BSA
- Medium + 0,5% BSA
- Medium + 1% BSA
- Medium + Ethanol + 0% BSA
- Medium + Ethanol + 1% BSA
- Medium + Ethanol + 0,25% BSA
- Medium + Ethanol + 0,5% BSA
- Medium + Ethanol + 1% BSA
- Medium + 1,25(OH)₂D₃ (Konzentration 10⁻⁶ mol/L) + 0% BSA
- Medium + 1,25(OH)₂D₃ (Konzentration 10⁻⁶ mol/L) + 0,1% BSA
- Medium + 1,25(OH)₂D₃ (Konzentration 10⁻⁶ mol/L) + 0,25% BSA
- Medium + 1,25(OH)₂D₃ (Konzentration 10⁻⁶ mol/L) + 0,5% BSA
- Medium + 1,25(OH)₂D₃ (Konzentration 10⁻⁶ mol/L) + 1% BSA

Alle 24 Stunden wurde das Medium, Medium + Ethanol und Medium + 1,25(OH)₂D₃ gewechselt und alle 24 Stunden wurde das Wachstum mittels Kristallviolett-Assay gemessen. Im ersten Teil des Versuches untersuchten wir das Wachstum der Zellen bei verschiedenen BSA-Konzentrationen in normalem Medium und in der Ethanolkontrolle analog zum vorhergehenden Versuch. Im zweiten Teil wurde beurteilt, bei welcher BSA-Konzentration 1,25(OH)₂D₃ in optimaler Menge die Zellen erreicht, ohne dass das BSA eine Proliferationshemmung oder eine Zellschädigung auslöst.

Ergebnisse Wachstum:

Die folgende Graphik und Tabelle zeigen, wie sich die Proliferation von SZ95 bei verschiedenen BSA-Konzentrationen in der Ethanolkontrolle verhielt.



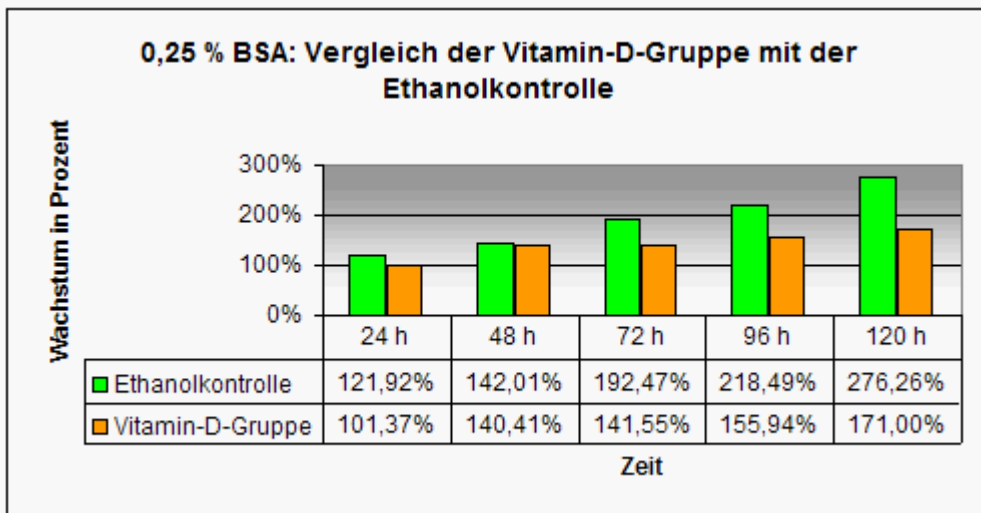
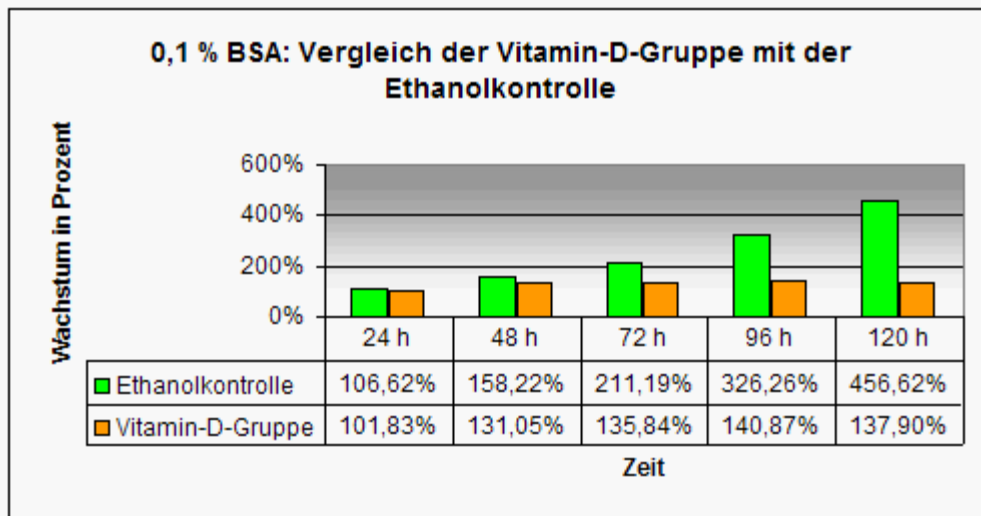
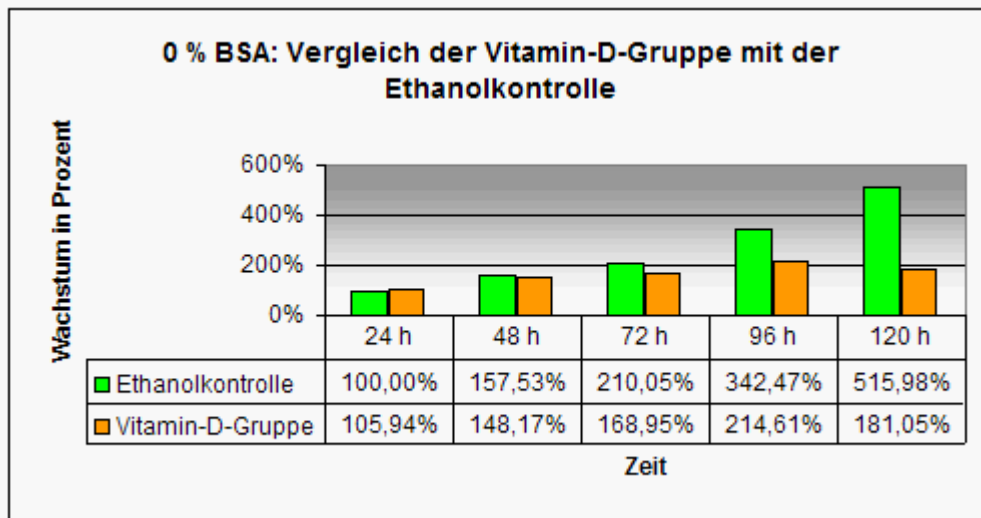
| Prozentuales Wachstum bezogen auf den 24h Ethanolwert 0 % BSA | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
| 0% BSA + ETOH | 100,00% | 157,53% | 210,05% | 342,47% | 515,98% |
| 0,1 % BSA + ETOH | 106,62% | 158,22% | 211,19% | 326,26% | 456,62% |
| 0,25 % BSA + ETOH | 121,92% | 142,01% | 192,47% | 218,49% | 276,26% |
| 0,5 % BSA + ETOH | 108,45% | 126,71% | 133,56% | 132,88% | 129,22% |
| 1 % BSA + ETOH | 94,98% | 113,47% | 106,62% | 81,05% | 70,78% |

Abbildung 15: Wachstum von SZ95 bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium

Die Ergebnisse dieser Auswertung bestätigten die Ergebnisse des vorhergehenden Versuches mit SZ95. Exponentielles Wachstum fanden wir bei 0% BSA und 0,1% BSA im Medium. Bei 0,25% BSA war das Wachstum noch linear. Konzentrationen darüber hinaus bewirkten einen Proliferationsstopp bzw. ein Absterben der Zellen.

Ergebnisse Vitamin D₃-Wirkung:

Vorhergehende Ergebnisse haben gezeigt, dass man eine Konzentration von 0% oder 0,1% BSA wählen müsste, um eine exponentielle Proliferation zu erreichen. Wie viel BSA braucht aber das 1,25(OH)₂D₃, um eine optimale Wirkung zu entfalten? Dazu wurde das prozentuale Wachstum der Zellpopulation bei verschiedenen BSA-Konzentrationen bezogen auf den Wert der 24h-Ethanol-Kontrolle berechnet.



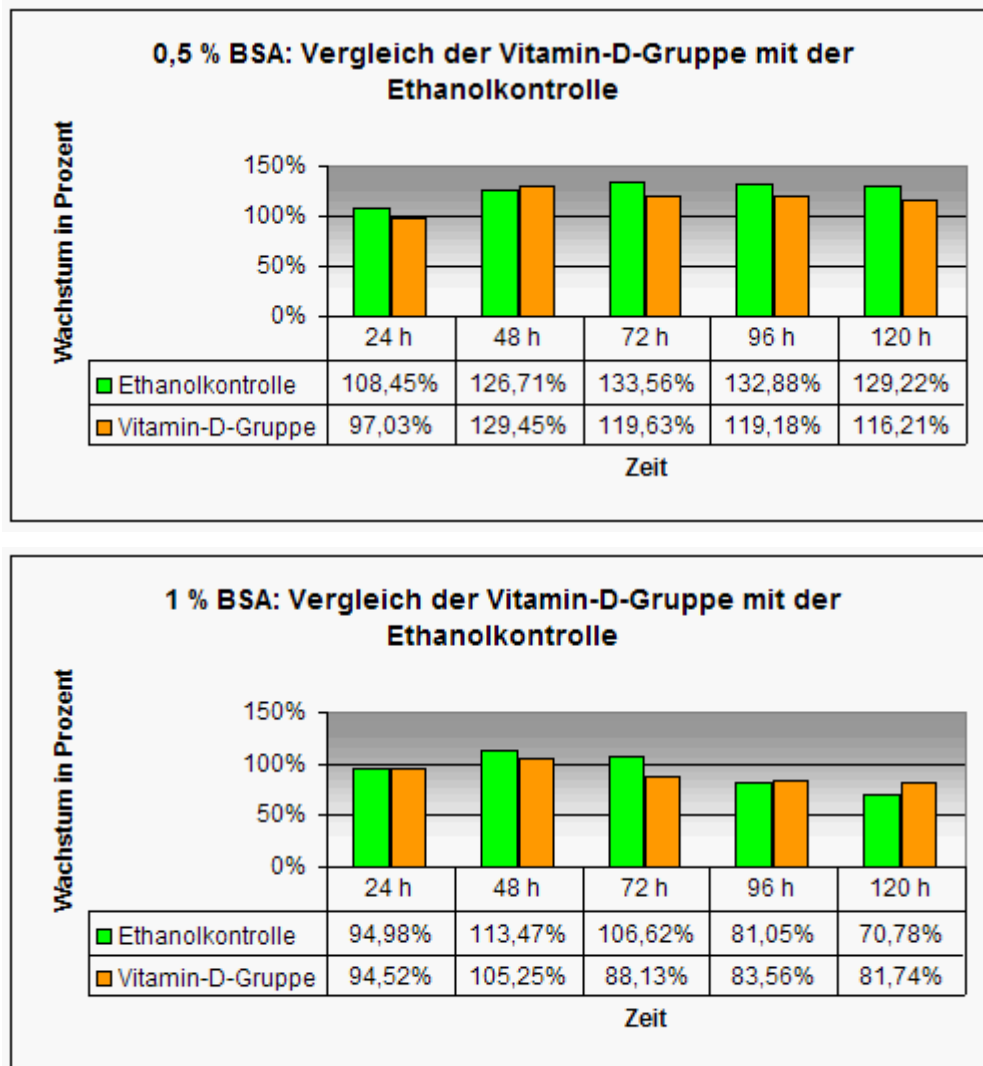


Abbildung 16: Wirkung des 1,25(OH)₂D₃ bei verschiedenen BSA-Konzentrationen

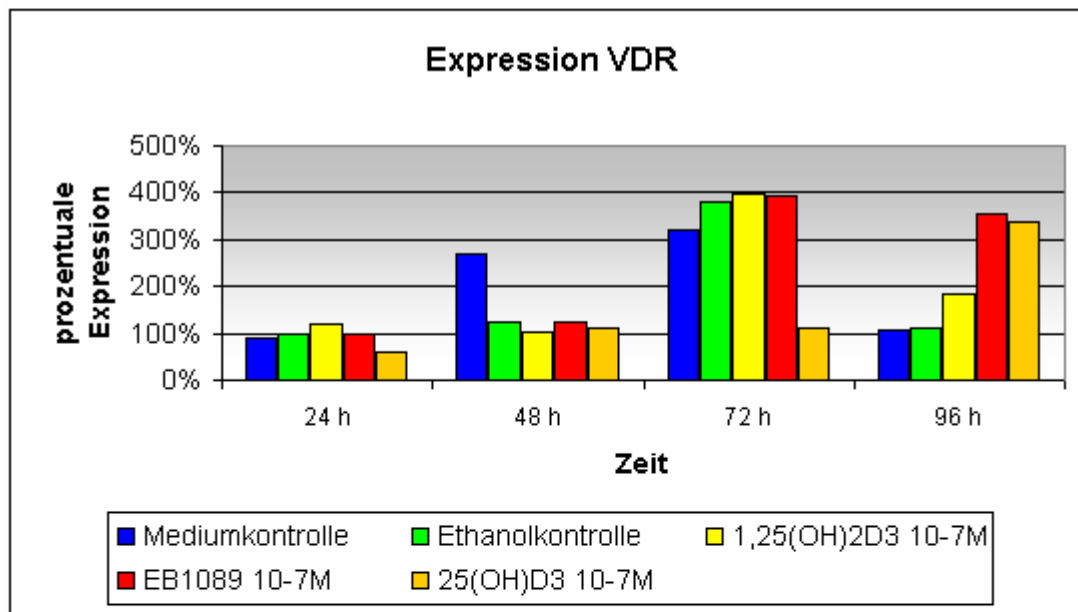
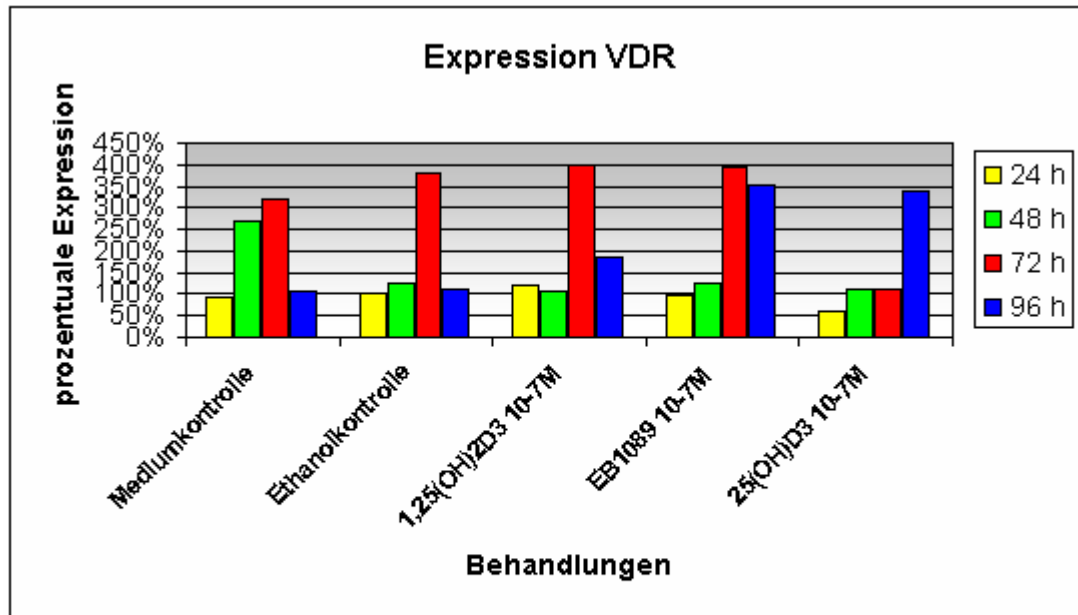
Da wir davon ausgingen, dass aktive Vitamin D₃-Metabolite - wie bereits in anderen Studien gezeigt - eine proliferationshemmende Wirkung haben, betrachteten wir die Differenz zwischen der Proliferation der Ethanolgruppe und der Vitamin D₃-Gruppe. Am deutlichsten war sie bei 0% und bei 0,1% BSA ausgeprägt, was nach 48h zu sehen war. Bei höheren BSA-Konzentrationen war die Differenz geringer. Da bei 0,5% und 1% BSA keine Proliferation mehr stattfand, konnte hier auch keine Vitamin D₃-Wirkung bewertet werden.

Ein optimales Wachstum der Zellpopulation und eine optimale Wirkung aktiver Vitamin D₃-Metabolite lag also bei einem Anteil von 0% und 0,1% BSA im Medium. Wir haben uns für unsere Versuche auf eine Konzentration von 0,1% BSA im Medium festgelegt. Die in den Versuchen ermittelte optimale BSA-Konzentration gilt nur für SZ95-Sebozyten.

5.2 Bestimmung der mRNA des VDR und der Enzyme CYP27B1 und CYP24A1 mittels der Real Time PCR (Lightcycler von Roche®)

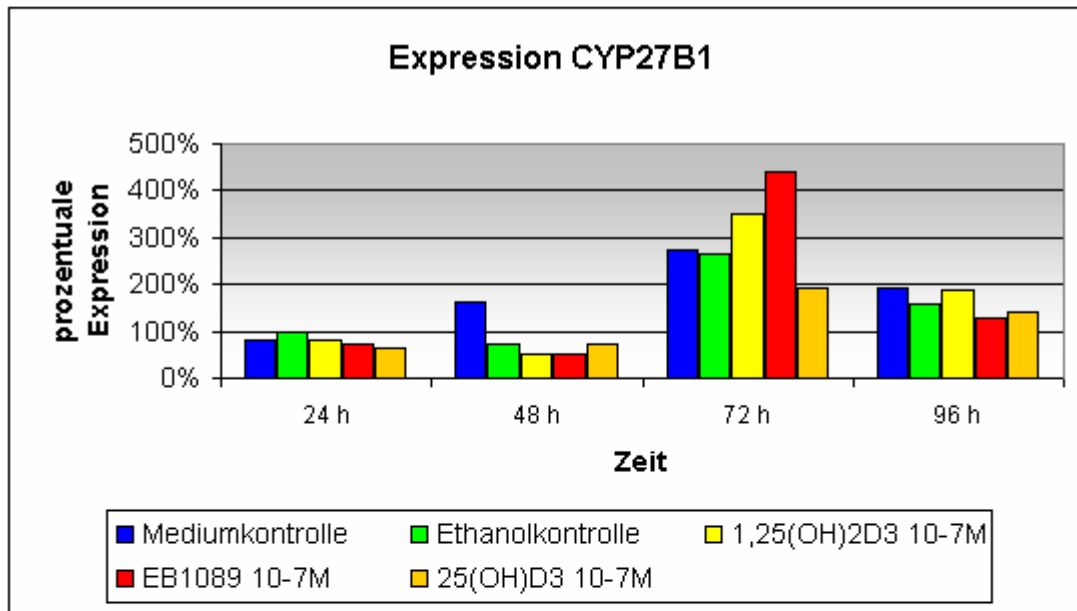
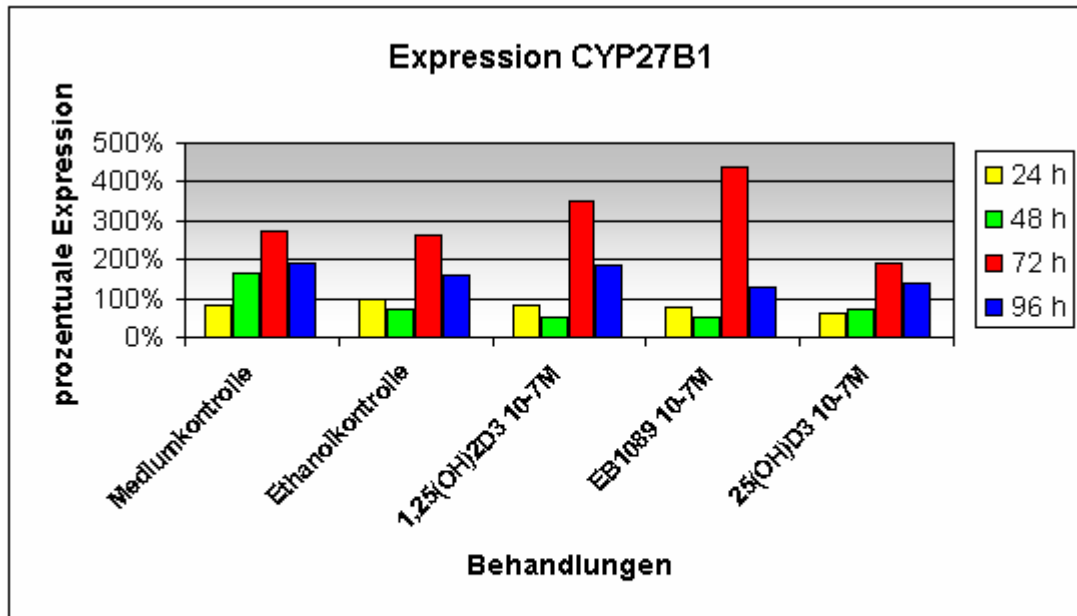
5.2.1 Graphische Darstellung und Erörterung

Zunächst haben wir uns die Frage gestellt, ob SZ95 Sebozyten den Vitamin D₃-Rezeptor (VDR) exprimieren und somit potentielle Zielzellen für die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ sind. Außerdem haben wir untersucht ob SZ95 über die enzymatische Ausstattung zur Synthese (25-Hydroxyvitamin D₃-1α-Hydroxylase [CYP27B1]) und zum Metabolismus (1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase [CYP24A1]) von 1,25(OH)₂D₃, dem biologisch aktiven Vitamin D₃-Metaboliten, verfügen. Die folgenden Graphiken und Tabellen zeigen die prozentuale Expression des VDR, der CYP27B1 und der CYP24A1 mit und ohne Inkubation der Zellen mit 1,25(OH)₂D₃, EB1089 und 25(OH)D₃.



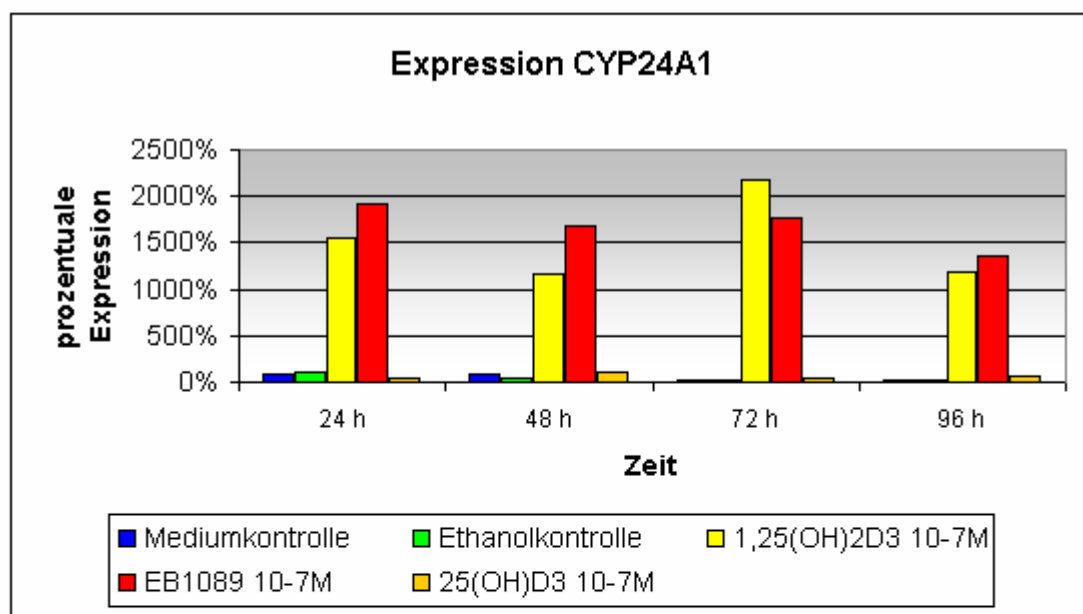
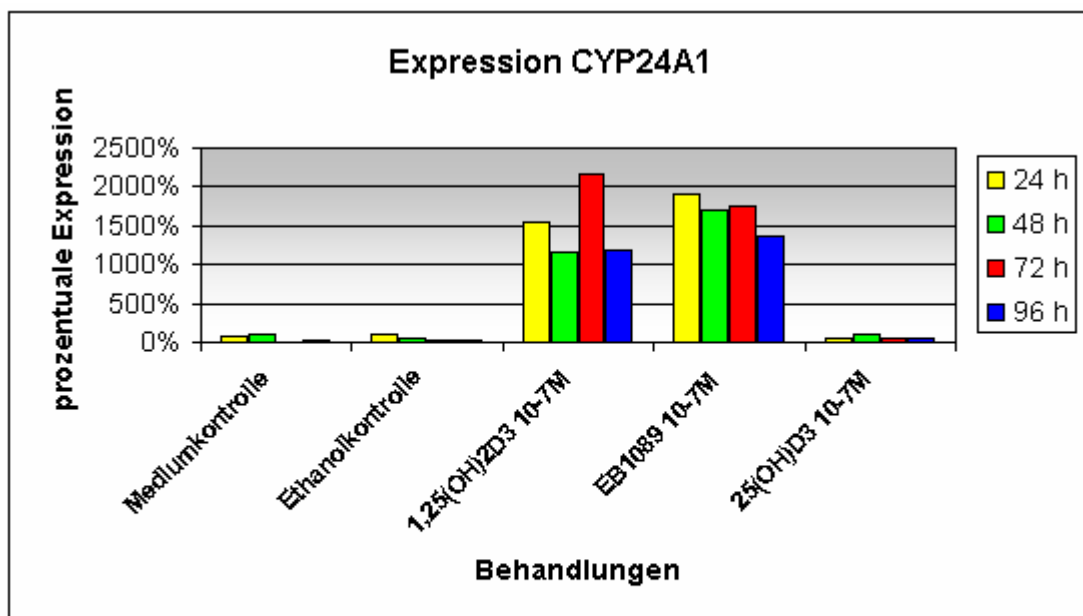
| prozentuale Expression VDR | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| Mediumkontrolle | 91,68% | 267,98% | 318,76% | 106,21% |
| Ethanolkontrolle | 100,00% | 123,41% | 379,41% | 109,17% |
| 1,25(OH)2D3 10-7M | 118,62% | 104,65% | 399,15% | 184,77% |
| EB1089 10-7M | 96,61% | 123,70% | 392,10% | 352,61% |
| 25(OH)D3 10-7M | 61,92% | 109,17% | 109,87% | 338,50% |

Abbildung 17: Lightcyler; Expression des VDR



| prozentuale Expression CYP27B1 | | | | |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| Mediumkontrolle | 80,81% | 162,42% | 272,48% | 193,29% |
| Ethanolkontrolle | 100,00% | 73,42% | 264,43% | 159,73% |
| 1,25(OH)2D3 10-7M | 82,28% | 51,68% | 350,34% | 187,92% |
| EB1089 10-7M | 74,77% | 53,15% | 440,27% | 129,93% |
| 25(OH)D3 10-7M | 63,76% | 70,87% | 191,95% | 139,60% |

Abbildung 18: Lightcyler; Expression der CYP27B1



| prozentuale Expression CYP24A1 | | | | |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| Mediumkontrolle | 88,33% | 96,47% | 12,31% | 22,06% |
| Ethanolkontrolle | 100,00% | 50,54% | 14,13% | 22,06% |
| 1,25(OH)2D3 10-7M | 1553,21% | 1168,63% | 2169,27% | 1190,04% |
| EB1089 10-7M | 1914,24% | 1689,08% | 1762,96% | 1361,35% |
| 25(OH)D3 10-7M | 43,47% | 114,99% | 45,40% | 63,92% |

Abbildung 19: Lightcyler; Expression der CYP24A1

Wir konnten zeigen, dass der VDR in SZ95 Sebozyten exprimiert wird. Eine deutliche, durch aktive Vitamin D₃-Metabolite verursachte Veränderung im Sinne einer Expressionserhöhung ließ sich nicht erkennen.

Die CYP27B1 schien nach 24 und 48 Stunden leicht abzufallen im Vergleich mit Medium- und Ethanolkontrolle. Nach 72 Stunden stieg ihre Expression in allen Gruppen stark an, wobei 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 die höchsten Werte erreichten. Nach 120 Stunden fiel die Expression in allen Gruppen wieder ab. Die Expression der CYP24A1 war in den mit 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 behandelten Gruppen schon nach 24 Stunden stark angestiegen. 25(OH)D₃ schien auf die Expression der CYP24A1 keinen Einfluss zu haben.

5.3 Einfluss von aktiven Vitamin D₃-Metaboliten auf die Proliferation von SZ95 (Kristallviolett-Assay)

5.3.1 Graphische Darstellung und Erörterung der einzelnen Versuche

Der Versuch wurde dreimal unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Im Folgenden sind die Werte der Ergebnisse der einzelnen Versuche tabellarisch dargestellt. Es handelt sich um das prozentuale Wachstum bezogen auf den Wert der 24h-Ethanolkontrolle des jeweiligen Versuchs.

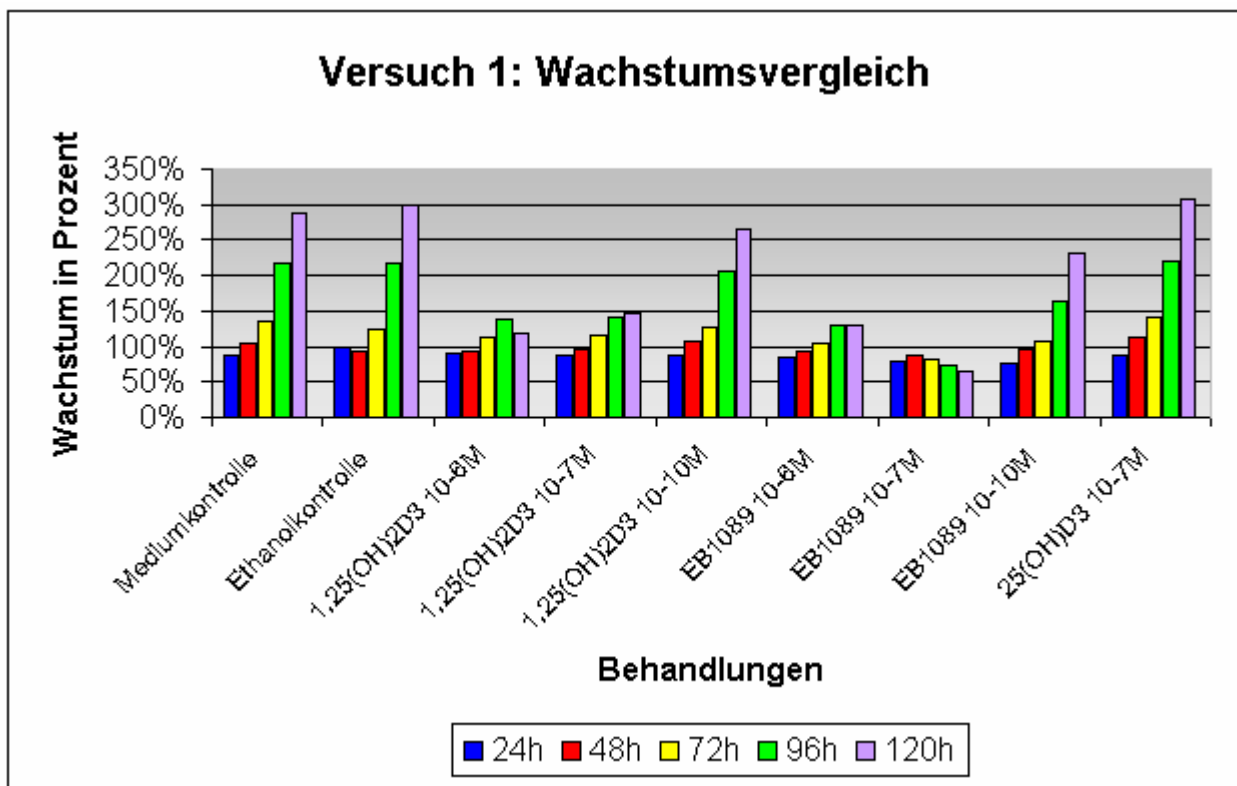


Abbildung 20: Kristallviolett-Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 1)

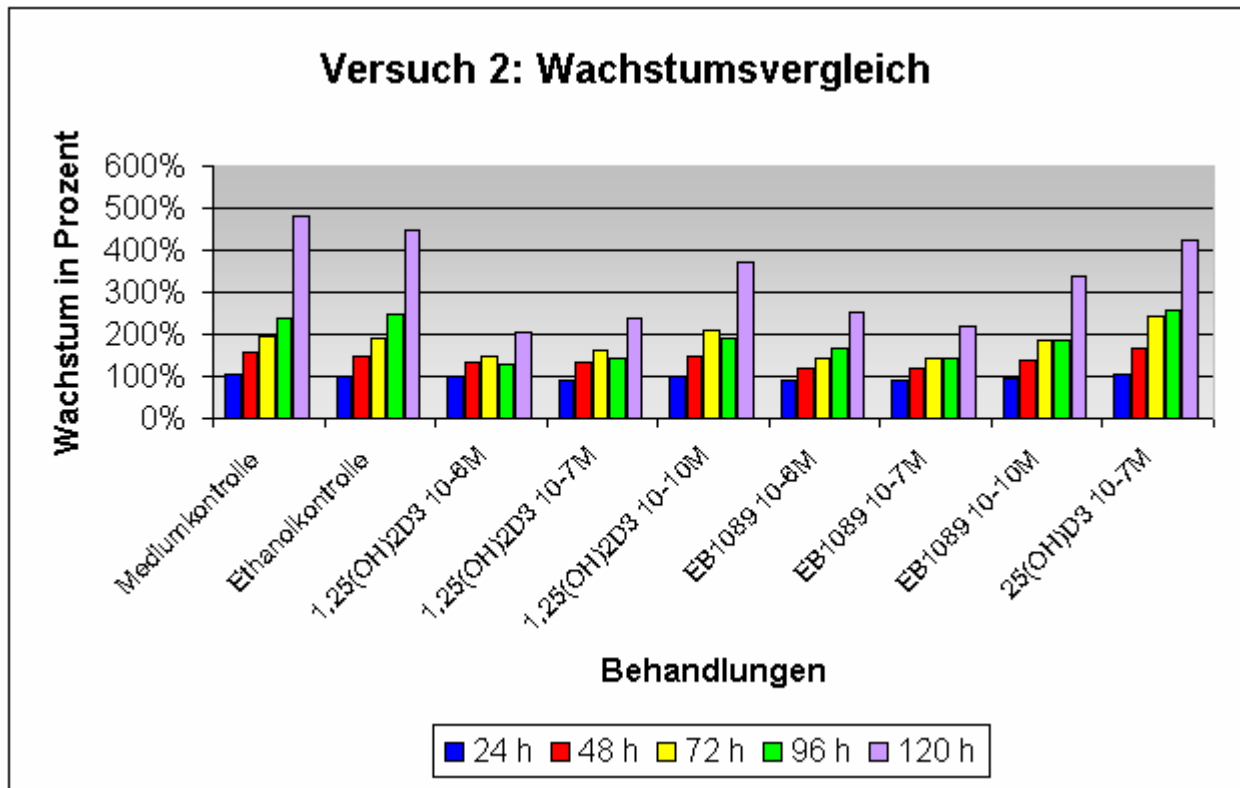


Abbildung 21: Kristallviolett-Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 2)

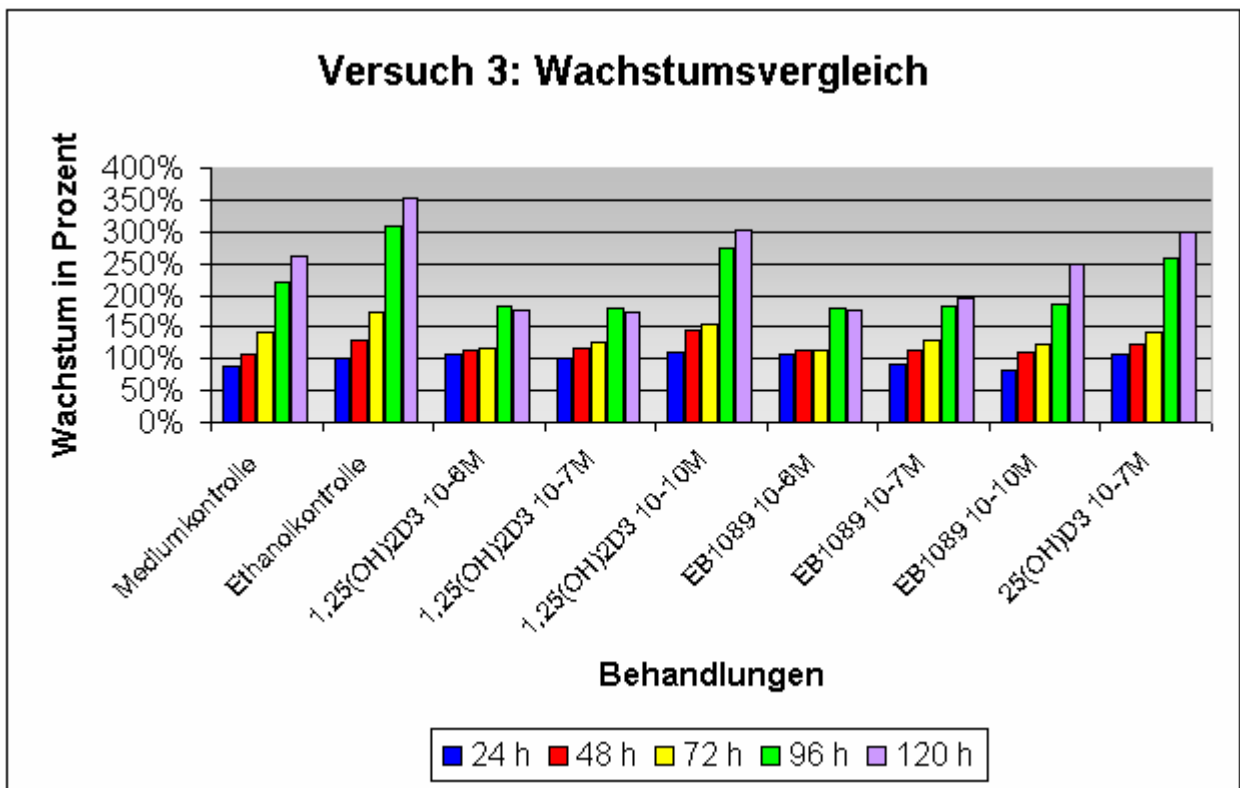
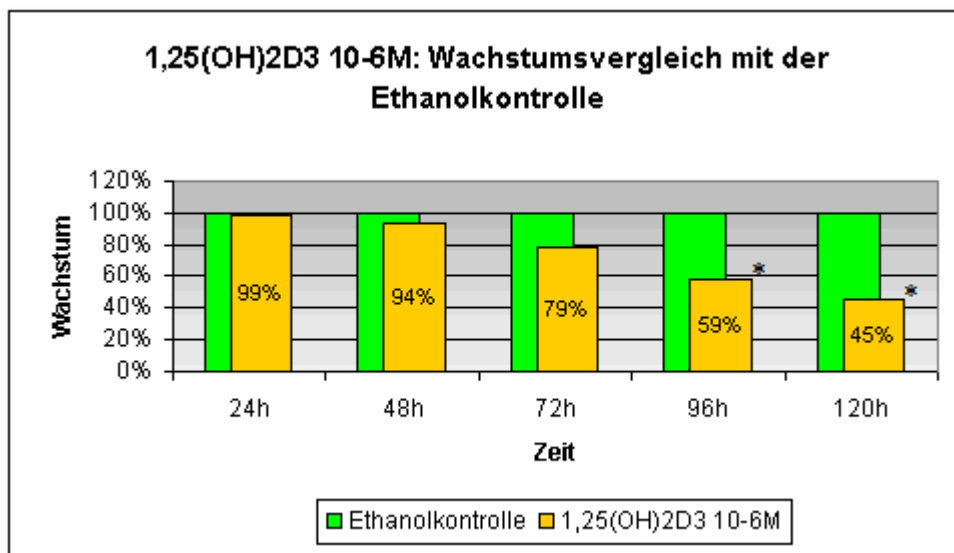


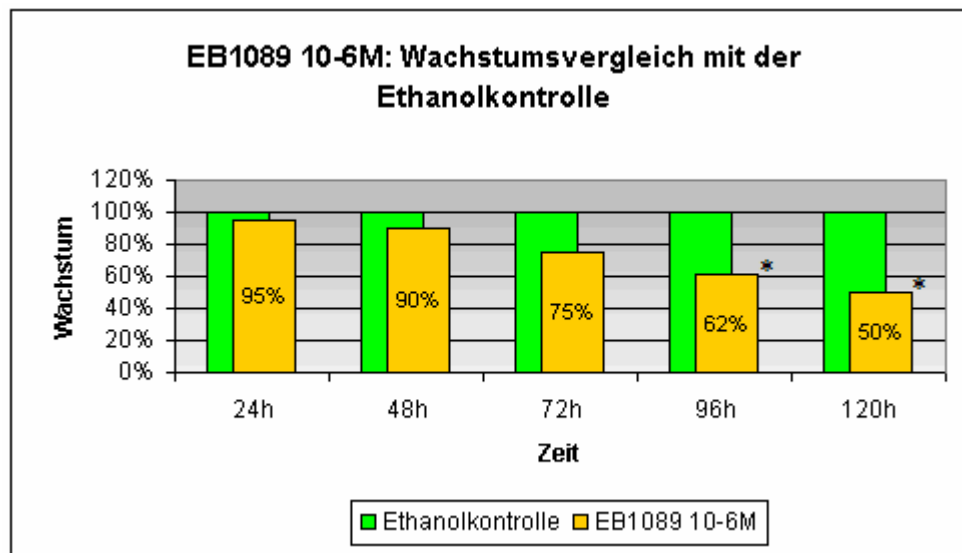
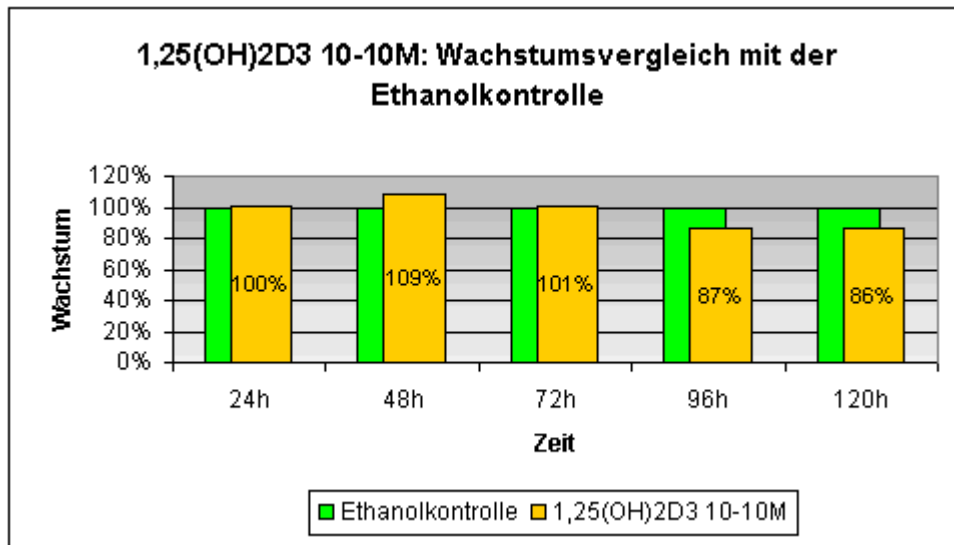
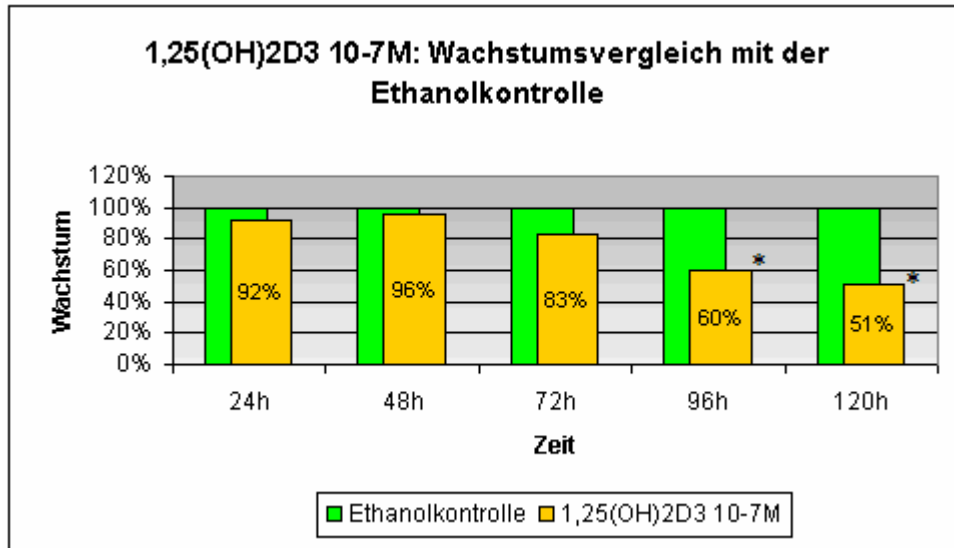
Abbildung 22: Kristallviolett-Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 3)

Bei der Untersuchung der Wachstumsverläufe der Zellpopulationen erkannten wir einen annähernd exponentiellen Wachstumsverlauf der Medium- und Ethanolkontrolle. Auch der Wachstumsverlauf der mit 25(OH)D₃ behandelten Gruppe schien nicht sehr stark beeinflusst zu sein. Bei den mit 1,25(OH)₂D₃ und mit EB1089 behandelten Gruppen waren die Wachstumskurven in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l stark verändert. So kam es nur noch zu einer geringen Proliferation innerhalb von 120 Stunden, in manchen Fällen fiel die Wachstumskurve sogar ab, was ein Absterben der Zellen vermuten ließ. In der Konzentration 10⁻¹⁰ mol/l schienen weder 1,25(OH)₂D₃ noch EB1089 einen starken Effekt auf die Zellen zu haben.

5.3.2 Zusammenfassung der Versuche und durchschnittliche Wachstumsänderungen

Die folgende Abbildung zeigt die mittlere Wachstumshemmung, zusammengefasst aus den drei Versuchen, die die verschiedenen aktiven Vitamin D₃-Metaboliten in unterschiedlichen Konzentrationen verursachten. Signifikante Wachstumshemmungen wurden gekennzeichnet.





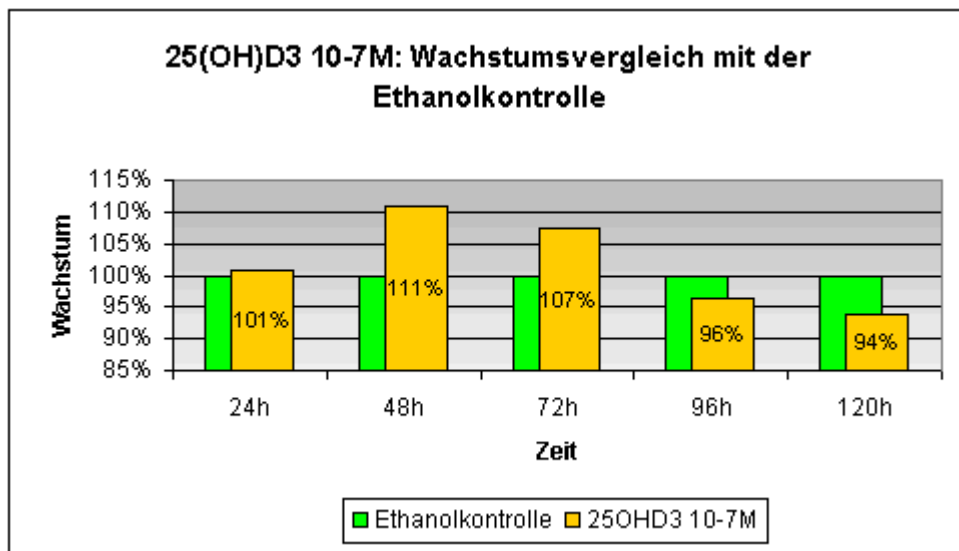
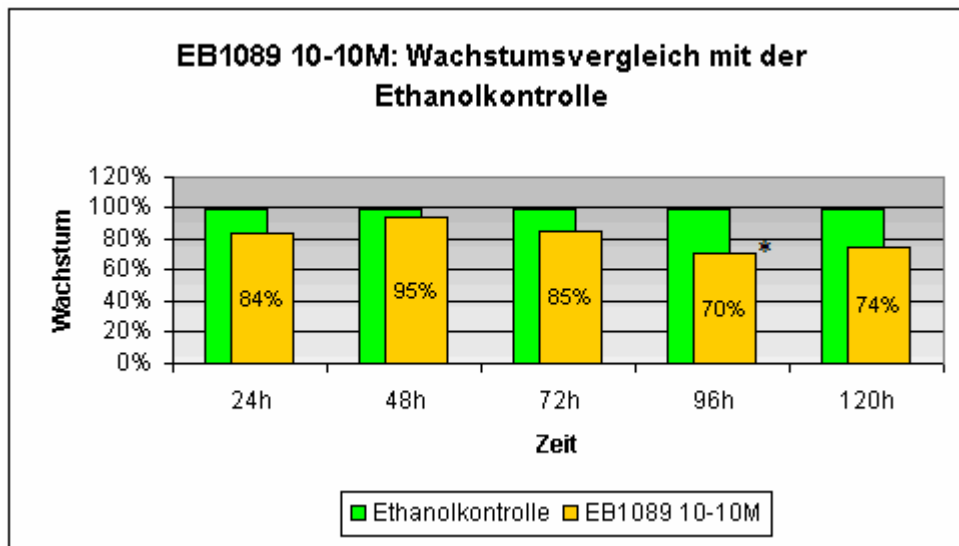
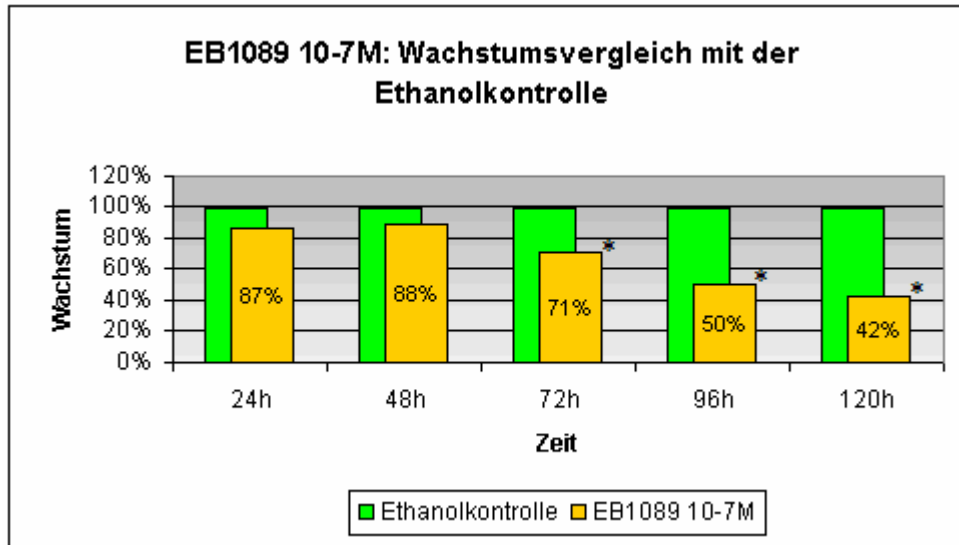


Abbildung 23: Kristallviolett Assay; mittlere Wachstumshemmung von SZ95 durch verschiedene aktive Vitamin-D₃-Metabolite in unterschiedlichen Konzentrationen, Vergleich mit der Ethanolkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine signifikante Wachstumshemmung ist mit * gekennzeichnet (p = 0,05)

Es wurde jede Behandlungsgruppe mit der Ethanolgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt verglichen. Betrachteten wir die mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelte Gruppe, wurde eine starke Wachstumshemmung in den Konzentrationen 10^{-6} mol/l und 10^{-7} mol/l vor allem nach 72 Stunden gegenüber der Ethanolkontrolle deutlich. So war das Wachstum nach 72 Stunden auf 79% bzw. auf 83% abgefallen und nach 96 Stunden auf 59% bzw. 60%. Nach 120 Stunden erreichte das Wachstum der Zellen nur noch 45% bzw. 51% im Vergleich zur Ethanolkontrolle. In der Konzentration 10^{-10} mol/l hemmte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nach 96 und 120 Stunden die Proliferation nur noch um 13 – 14%.

Bei der mit EB1089 behandelten Gruppe war die Wachstumshemmung ähnlich stark ausgeprägt. Auch hier war die Wachstumshemmung in den Konzentrationen 10^{-6} mol/l und 10^{-7} mol/l ab einer Zeit von 72 Stunden stark ausgeprägt. Nach 72 Stunden erreichte das Wachstum noch 75% bzw. 71%, nach 96 Stunden noch 62% bzw. 50% und nach 120 Stunden nur noch 50% bzw. 42% im Vergleich zum Wachstum der Ethanolkontrolle. Bei einer Konzentration von 10^{-10} mol/l fiel die Wachstumshemmung deutlich geringer aus. Nach 96 bzw. 120 Stunden erreichte die Proliferation 70% bzw. 74% der Proliferation der entsprechenden Ethanolkontrolle.

5.3.3 Statistische Interpretation

Zur statistischen Auswertung wurden jeweils die einzelnen, mit den verschiedenen aktiven Vitamin D_3 -Metaboliten behandelten Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der jeweiligen Ethanolkontrolle verglichen. Dazu wurden die Ergebnisse, die bei den Versuchen erzielt wurden, mit SPSS mittels des Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Folgende Signifikanzwerte hat die Auswertung ergeben:

| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1,25(OH)2D3 10-6M | 0,863 | 0,387 | 0,258 | 0,000 | 0,000 |
| 1,25(OH)2D3 10-7M | 0,340 | 0,863 | 0,297 | 0,000 | 0,004 |
| 1,25(OH)2D3 10-10M | 0,730 | 0,605 | 1,000 | 0,094 | 0,436 |
| EB1089 10-6M | 0,222 | 0,387 | 0,136 | 0,000 | 0,004 |
| EB1089 10-7M | 0,063 | 0,258 | 0,011 | 0,000 | 0,002 |
| EB1089 10-10M | 0,730 | 0,730 | 0,546 | 0,011 | 0,136 |
| 25(OH)D3 10-7M | 1,000 | 0,605 | 0,931 | 1,000 | 0,730 |

Tabelle 3: CV-Assay; Signifikanzwerte (SPSS, Mann-Whitney-U-Test) des Vergleichs der einzelnen Behandlungen zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der jeweiligen Ethanolkontrolle

Eine signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zur Ethanolgruppe lag bei den Gruppen 1,25(OH)₂D₃ in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l ab einer Zeit von 96 Stunden vor. Bei der EB1089-Gruppe war das Ergebnis in der Konzentration 10⁻⁶ mol/l ebenfalls ab 96 Stunden signifikant, in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l bereits nach 72 Stunden. Für die Konzentration 10⁻¹⁰ mol/l wurde Signifikanz bei einem Stundenwert von 96 Stunden erreicht, was sich jedoch nach 120 Stunden nicht mehr bestätigen ließ. 25(OH)D₃ zeigte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Wachstumshemmung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl 1,25(OH)₂D₃ als auch EB1089 in den hohen Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l und in den hohen Stundenwerten ab 72 Stunden das Wachstum von SZ95 signifikant hemmen konnten.

5.4 Prüfung der Proliferation und Zellvitalität mittels WST-1-Assay

5.4.1 Graphische Darstellung und Erörterung der einzelnen Versuche

Das Experiment wurde mehrmals durchgeführt um optimale und vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Wenn die Population der Ethanolkontrolle annähernd exponentiell wuchs, konnte man davon ausgehen, dass die äußeren Bedingungen sowie die ausgesäte Zellzahl optimal waren. Schließlich haben wir drei Versuchsergebnisse erzielt, welche unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden und vergleichbare Ergebnisse ergaben.

Der WST-1-Assay ist ein dynamischer Test, dessen Farbstoff sich im Versuchsverlauf verändert. Wir haben jede Stunde den Wert gemessen und anhand der Werte und Graphen diejenigen Stundenwerte ausgewählt, die den besten Wachstumsverlauf der Ethanolkontrolle lieferten. Das ist für den Versuch 1 der 2-Stunden-Wert und für den Versuch 2 und 3 der 4-Stunden-Wert. Im Folgenden sind die Werte der Ergebnisse der einzelnen Versuche tabellarisch dargestellt. Es handelt sich um das prozentuale Wachstum bezogen auf den Wert der 24h-Ethanolkontrolle des jeweiligen Versuchs.

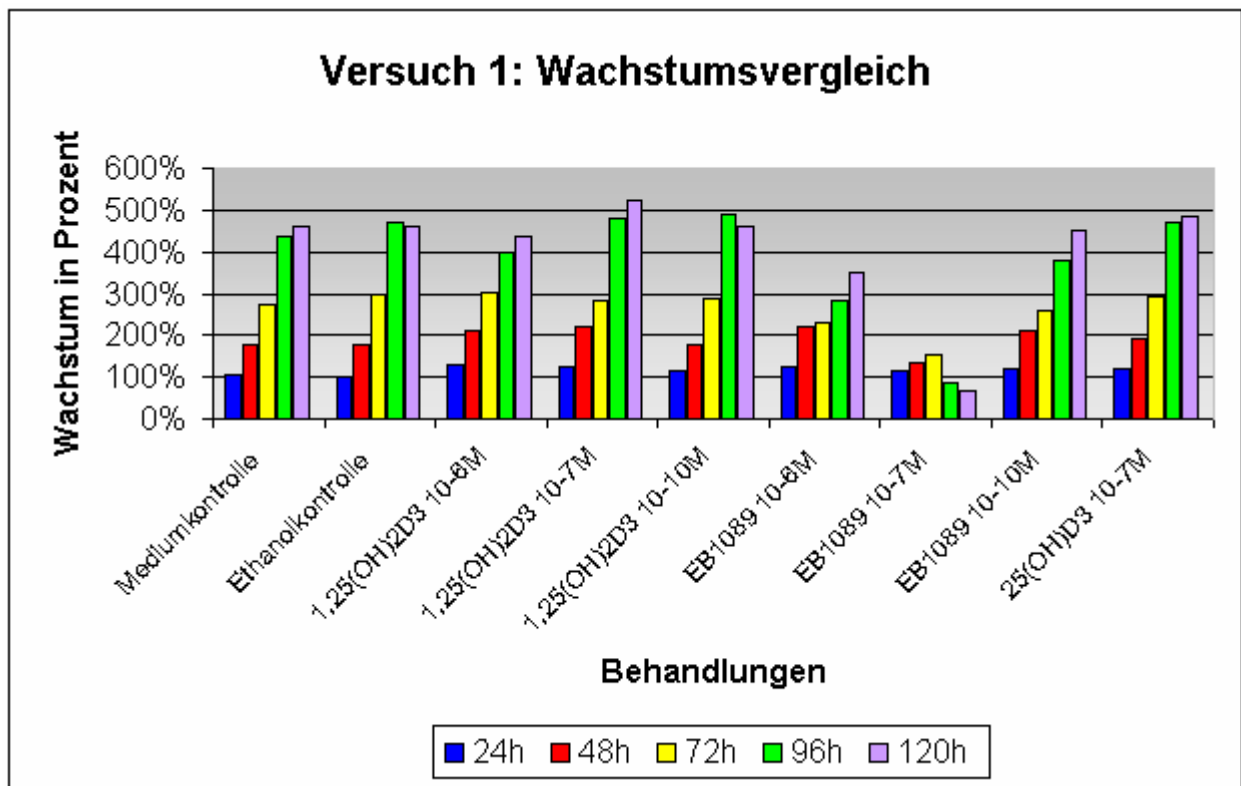


Abbildung 24: WST-1 Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 1)

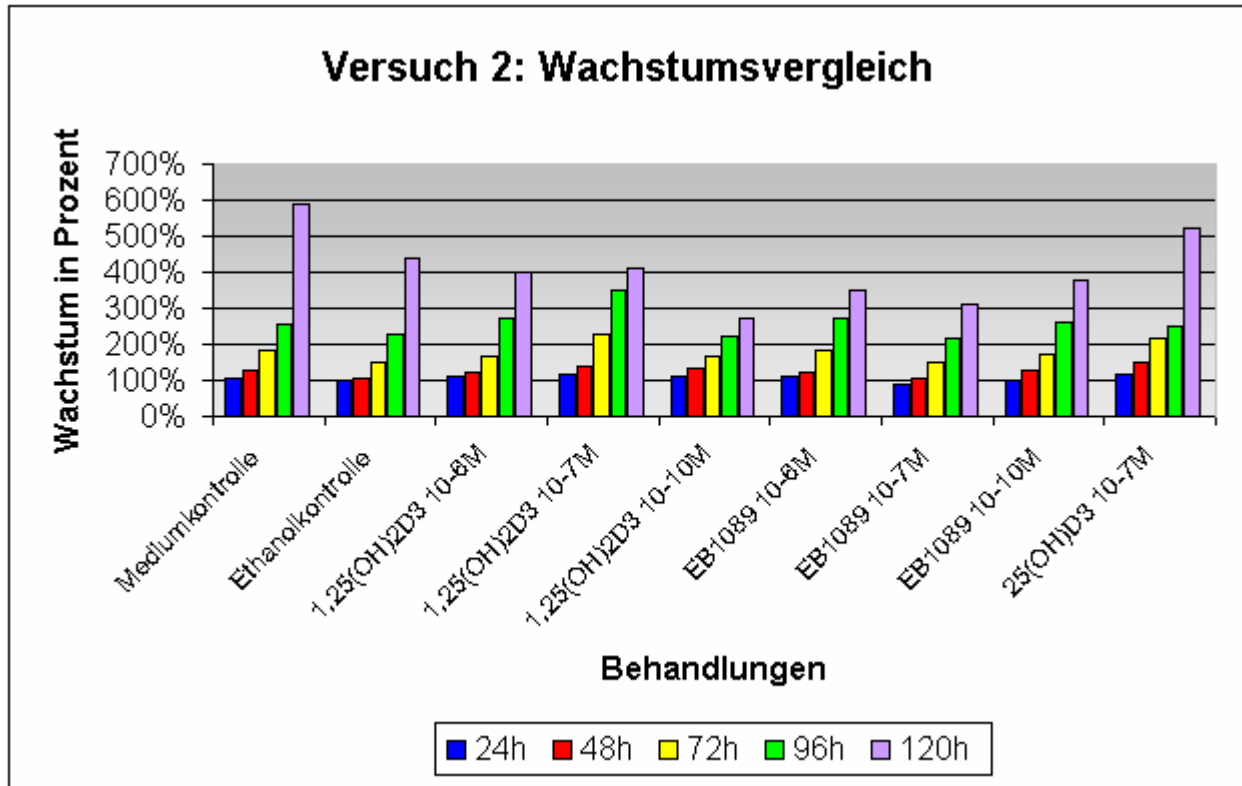


Abbildung 25: WST-1 Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 2)

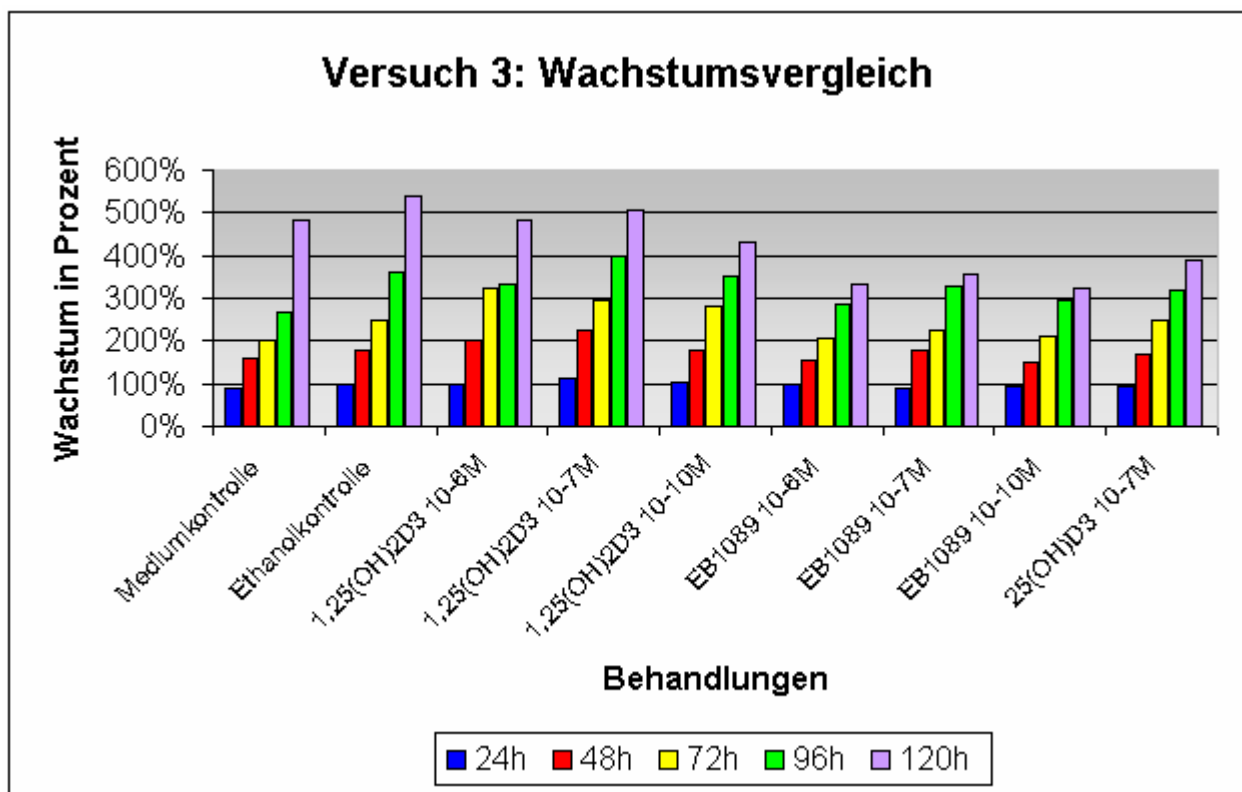
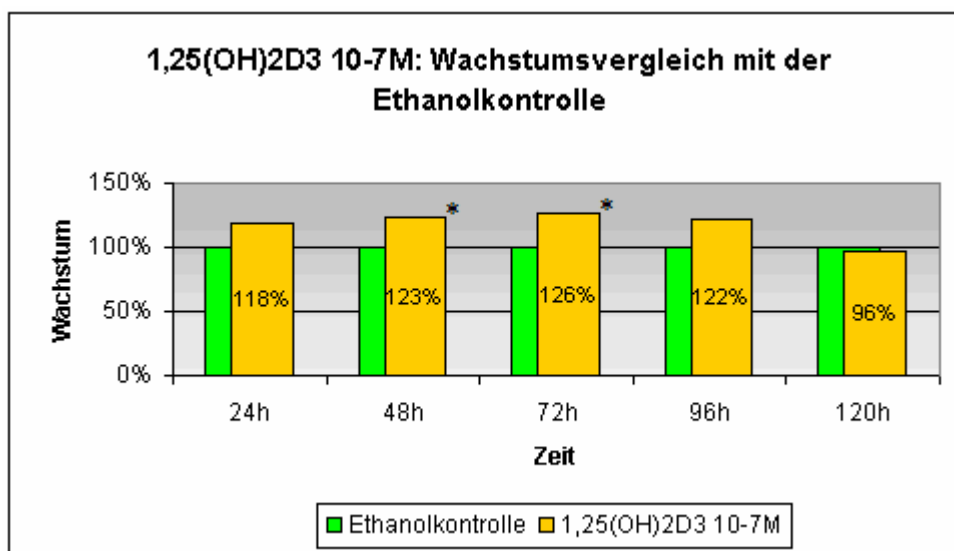
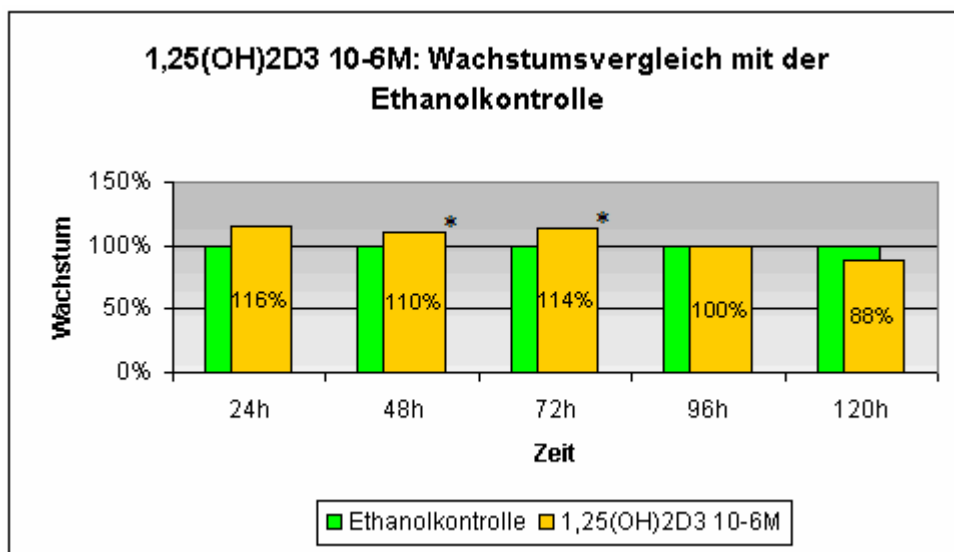


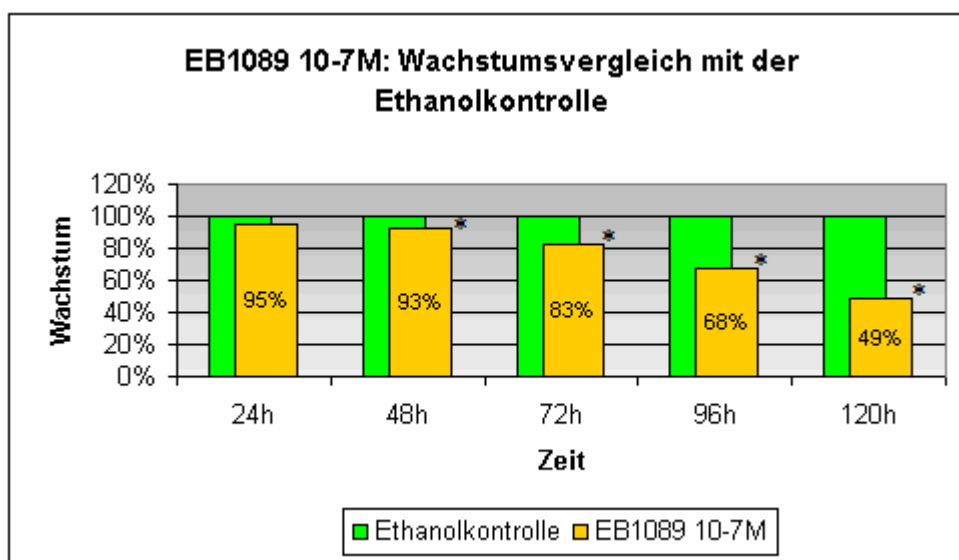
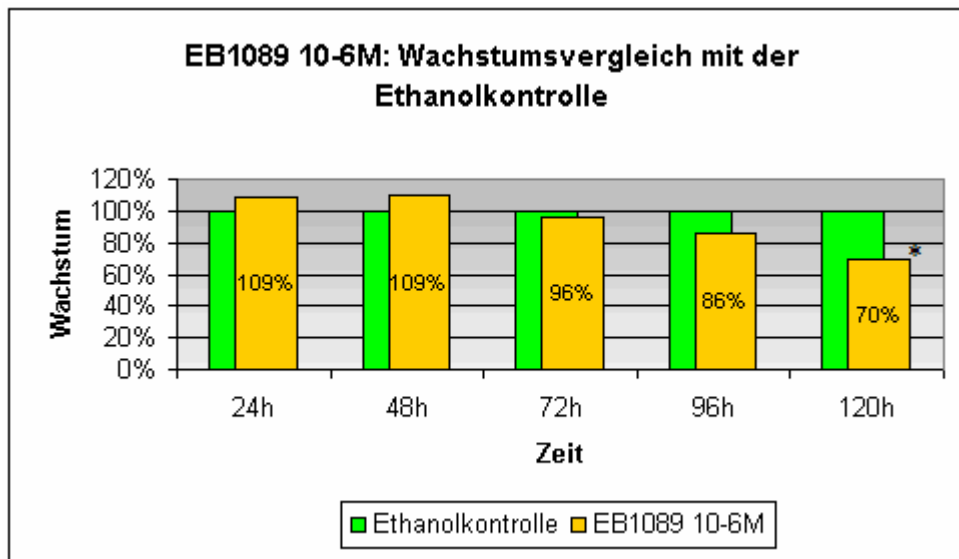
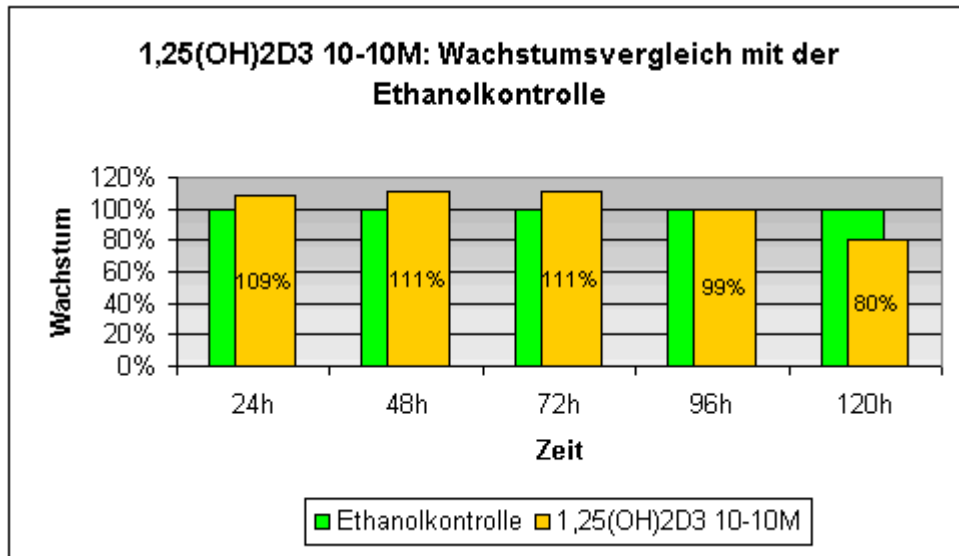
Abbildung 26: WST-1 Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 3)

Bei der Betrachtung der Wachstumsvergleiche schien im Versuch 1 nur EB1089 in den Konzentrationen 10^{-6} und 10^{-7} mol/l eine deutliche Wachstumshemmung zu verursachen. Im zweiten Versuch konnten wir eine deutliche Hemmung nur bei den hohen Stundenwerten von 120 Stunden erkennen. Hier schien EB1089 in den Konzentrationen 10^{-6} mol/l und 10^{-7} mol/l und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Konzentration 10^{-10} mol/l am stärksten zu hemmen. Im dritten Versuch hat EB1089 seine Wachstumshemmung in allen Konzentrationen bestätigt, die jedoch ebenfalls eher bei den hohen Stundenwerten zu sehen war.

5.4.2 Zusammenfassung der Versuche und durchschnittliche Wachstumshemmung

Die folgende Abbildung zeigt die aus den drei Versuchen zusammengefasste mittlere Wachstumshemmung, die die verschiedenen aktiven Vitamin D₃-Metaboliten in unterschiedlichen Konzentrationen verursachten.





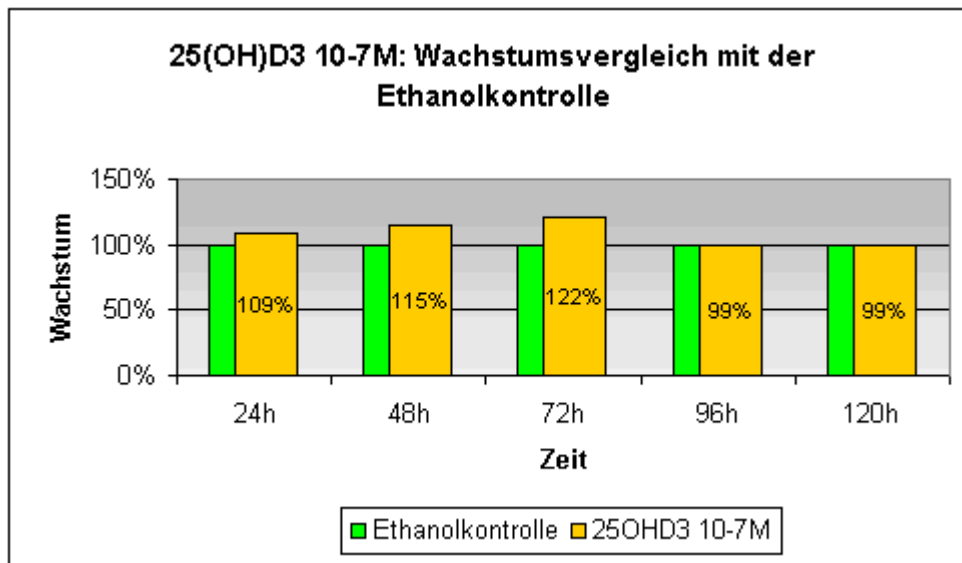
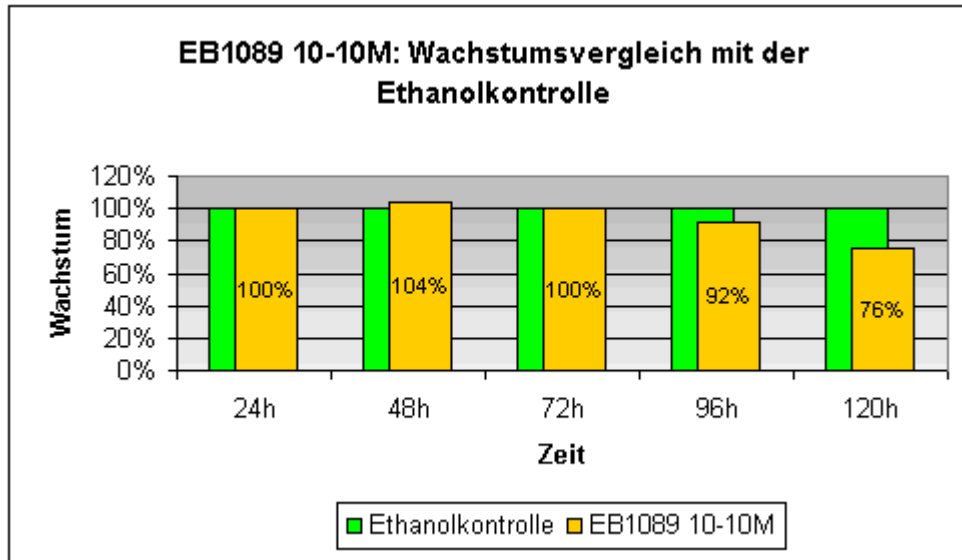


Abbildung 27: WST-1 Assay; mittlere Wachstumshemmung von SZ95 durch verschiedene aktive Vitamin-D₃-Metabolite in unterschiedlichen Konzentrationen, Vergleich mit der Ethanolkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine signifikante Wachstumshemmung ist mit * gekennzeichnet (p = 0,05)

Betrachtet man die mittlere Abweichung des Wachstums im Vergleich mit der Ethanolkontrolle, wird bestätigt, dass 1,25(OH)₂D₃ in allen Konzentrationen einen minimalen Effekt auf die Zellen zu haben scheint. Nur nach 120 Stunden war das Wachstum der mit 1,25(OH)₂D₃ behandelten Populationen zurückgegangen. EB1089 bewirkte vor allem in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l eine stärkere und frühere Wachstumshemmung als 1,25(OH)₂D₃. In beiden Konzentrationen erkannte man schon nach 72 Stunden eine Wachstumshemmung, die für die Konzentration 10⁻⁶ mol/L 4% und für die Konzentration 10⁻⁷ mol/l 17% betrug. Nach 96 Stunden war das Wachstum weiter um 14% bzw. 32% abgefallen, nach 120 Stunden um 30% bzw. 51%. 25(OH)D₃ hatte keinen Einfluss auf die Zellen.

5.4.3 Statistische Interpretation

Zur statistischen Interpretation wurden jeweils die Werte der drei Versuche in einer Gruppe zusammengefasst und mit der Ethanolgruppe des jeweiligen Stundenwertes verglichen. Wir haben für die Signifikanzberechnung die Messwerte nach vierstündiger Einwirkung des WST-1-Reagenzes auf die Zellen verwendet.

| Signifikanz WST 4 h | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
| 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁶M | 0,436 | 0,040 | 0,050 | 1,000 | 0,258 |
| 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁷M | 0,222 | 0,002 | 0,024 | 0,489 | 0,796 |
| 1,25(OH)₂D₃ 10⁻¹⁰M | 0,297 | 0,546 | 0,546 | 0,931 | 0,796 |
| EB1089 10⁻⁶M | 0,387 | 0,387 | 0,796 | 0,340 | 0,019 |
| EB1089 10⁻⁷M | 0,931 | 0,014 | 0,006 | 0,006 | 0,008 |
| EB1089 10⁻¹⁰M | 0,546 | 0,730 | 0,436 | 0,796 | 0,222 |
| 25(OH)D₃ 10⁻⁷M | 0,436 | 0,190 | 0,094 | 0,931 | 0,931 |

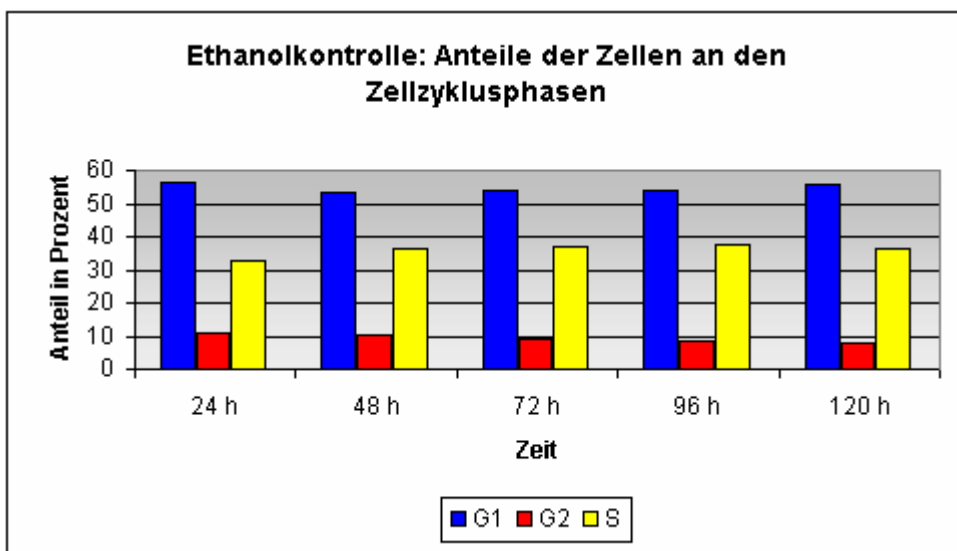
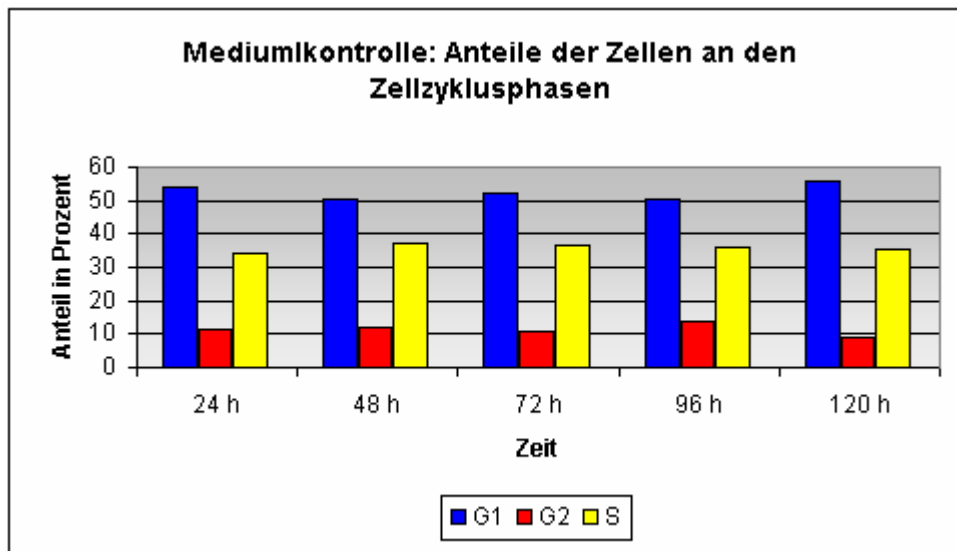
Tabelle 4: WST-1-Assay; Signifikanzwerte (SPSS, Mann-Whitney-U-Test) des Vergleichs der einzelnen Behandlungen zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der jeweiligen Ethanolkontrolle

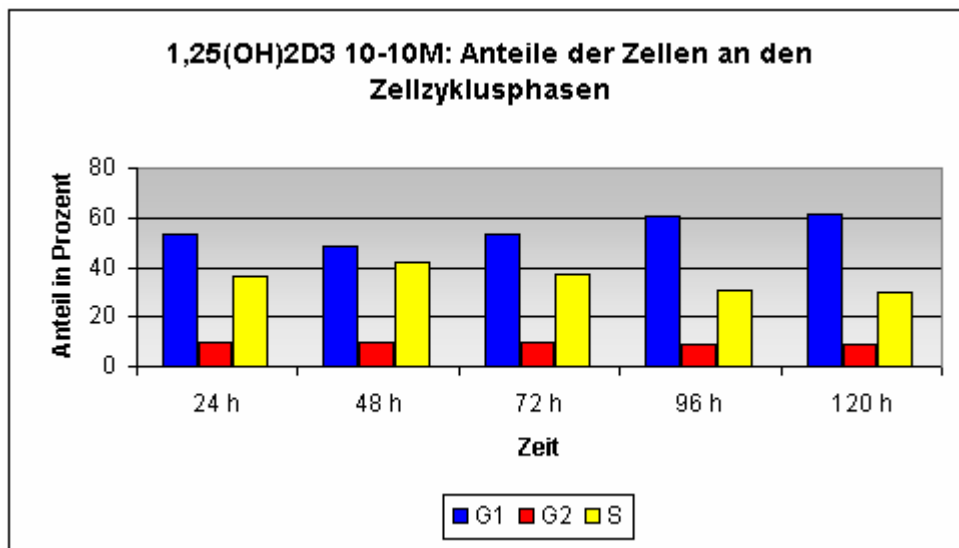
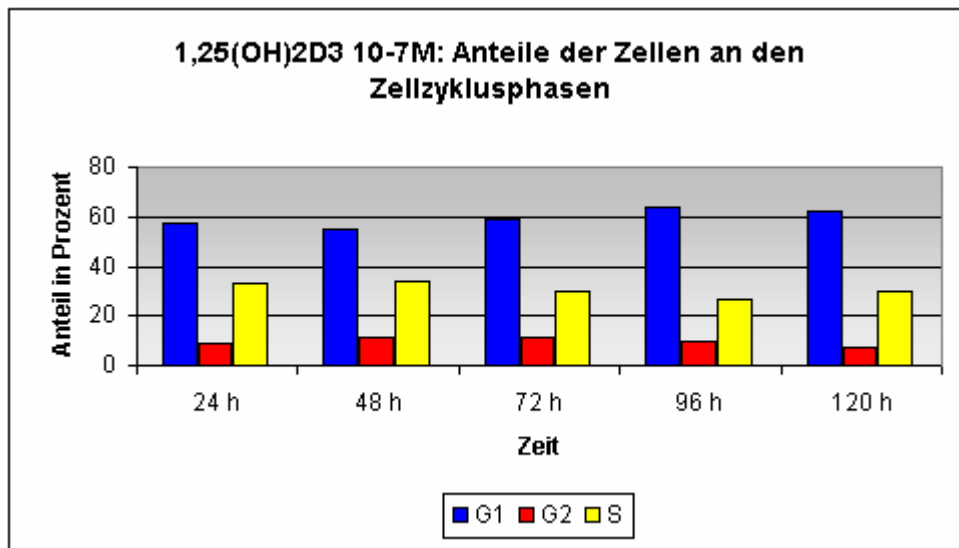
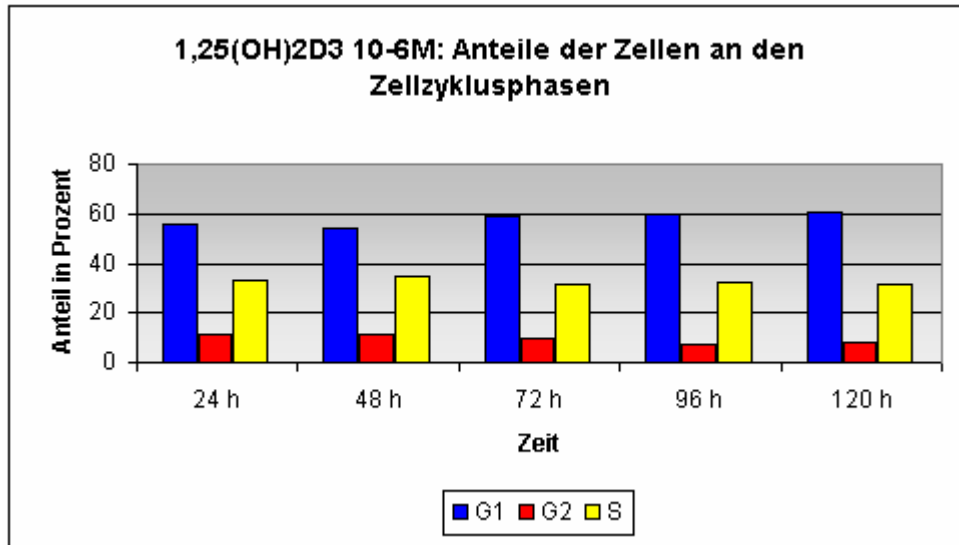
Signifikante Wachstumshemmungen erhielten wir für 1,25(OH)₂D₃ in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l eher für die niedrigeren Stundenwerte von 48 und 72 Stunden. EB1089 hemmte die Proliferation in der Konzentration 10⁻⁶ mol/l nur nach 120 Stunden signifikant. Die niedrigere Konzentration von 10⁻⁷ mol/l hemmte hingegen schon ab 48 Stunden signifikant.

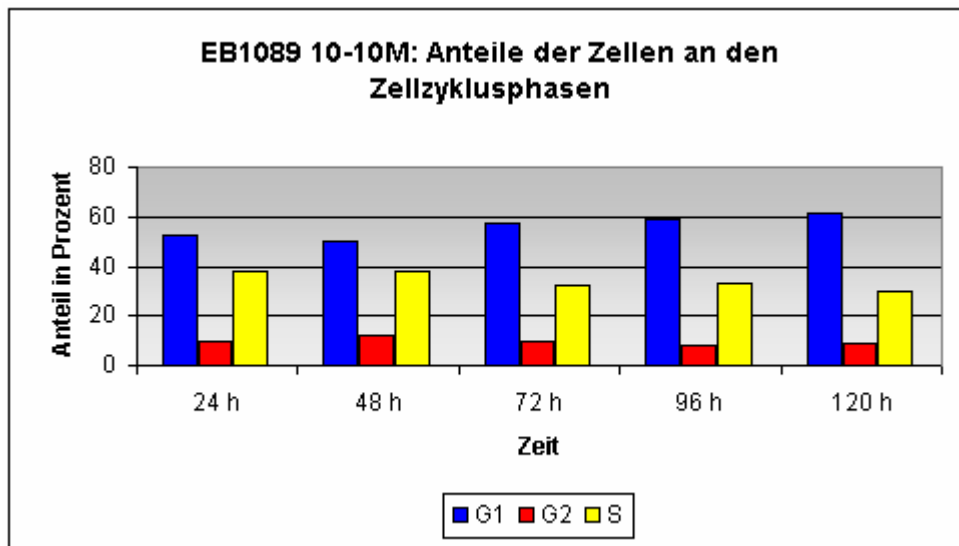
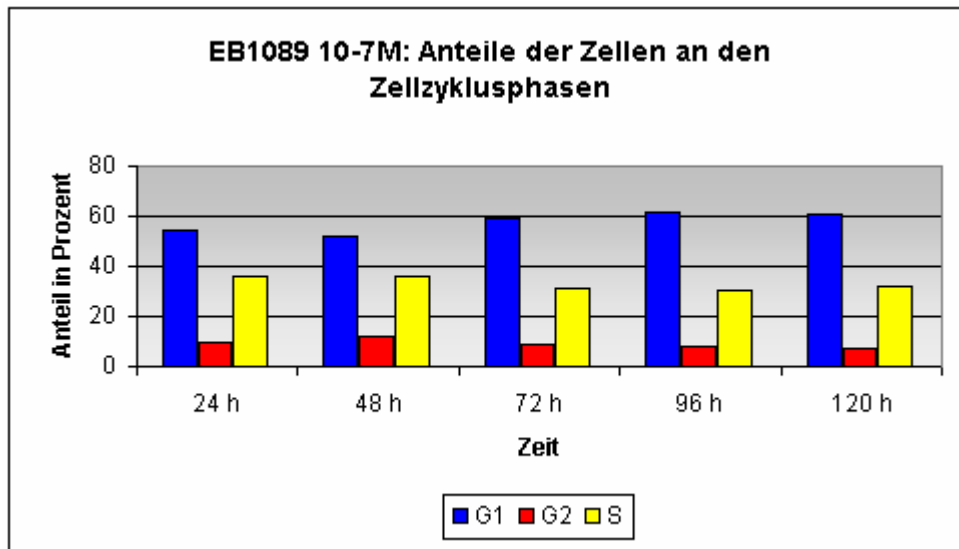
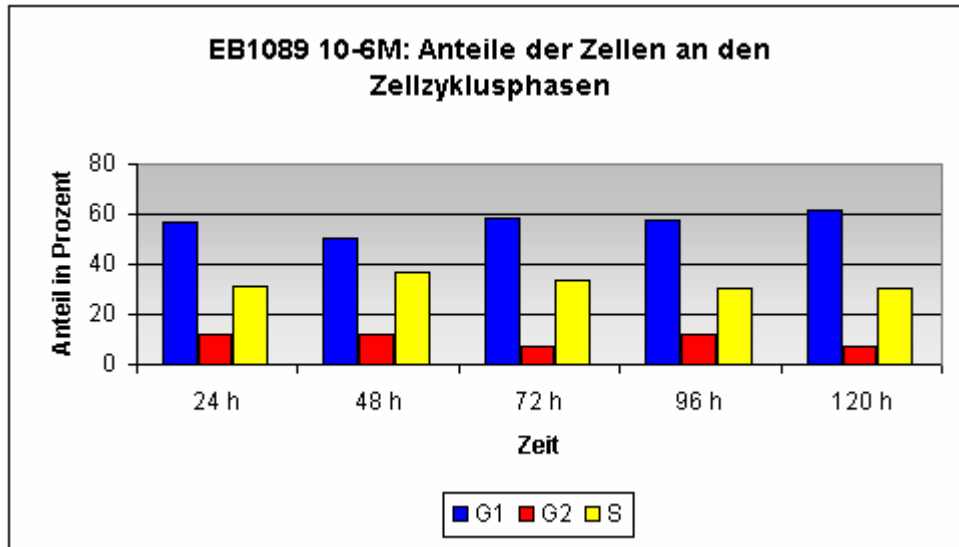
5.5 Zellzyklusbestimmung mit FACS

5.5.1 Graphische Darstellung und Erörterung der einzelnen Versuche

Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen mittels des FACS wurden die Versuche so oft wiederholt bis sich zwei repräsentative unter gleichen Bedingungen durchgeführte Testergebnisse herausstellten. Im Folgenden ist die Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Zellzyklusphasen zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.







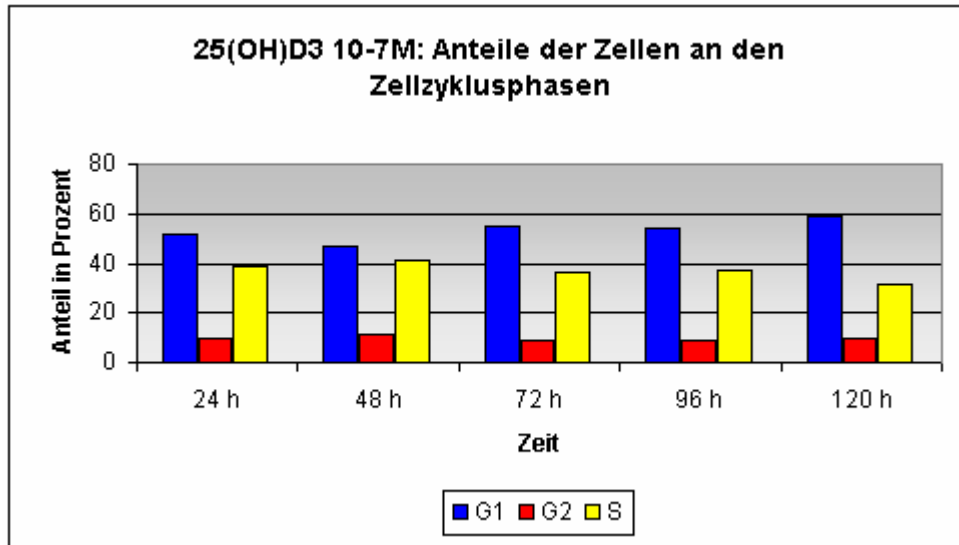
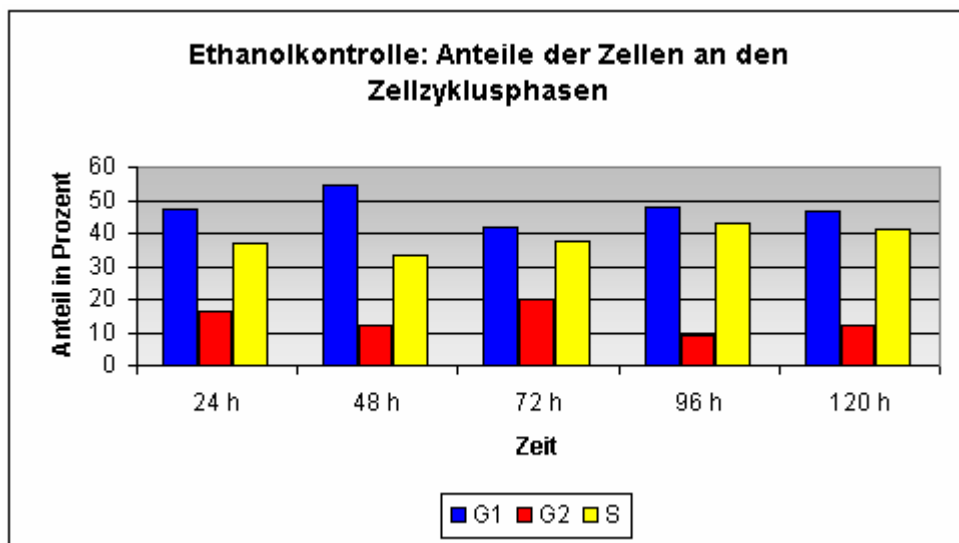
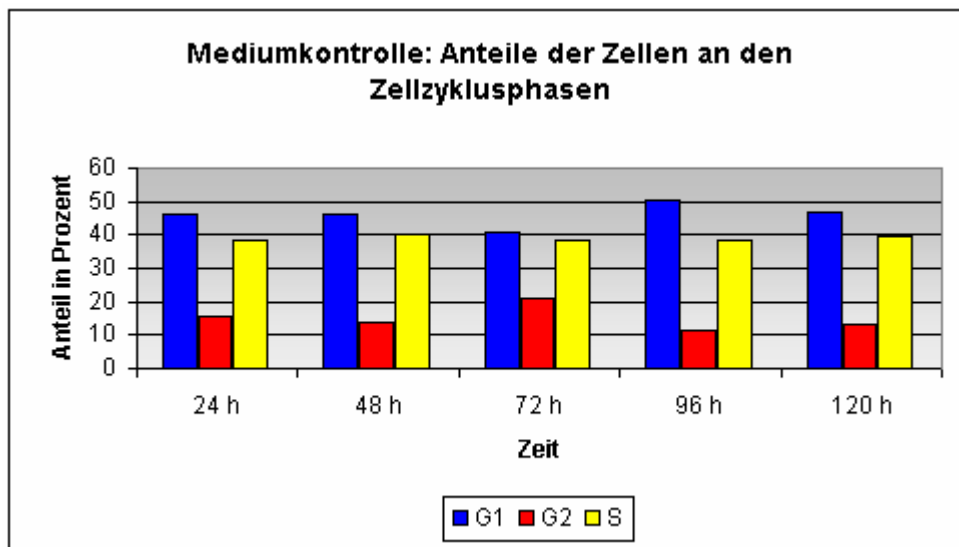
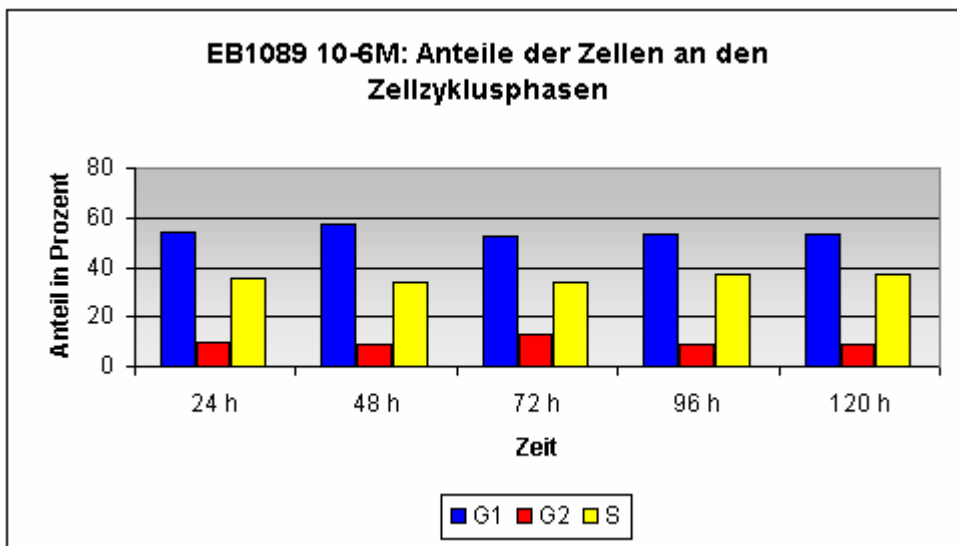
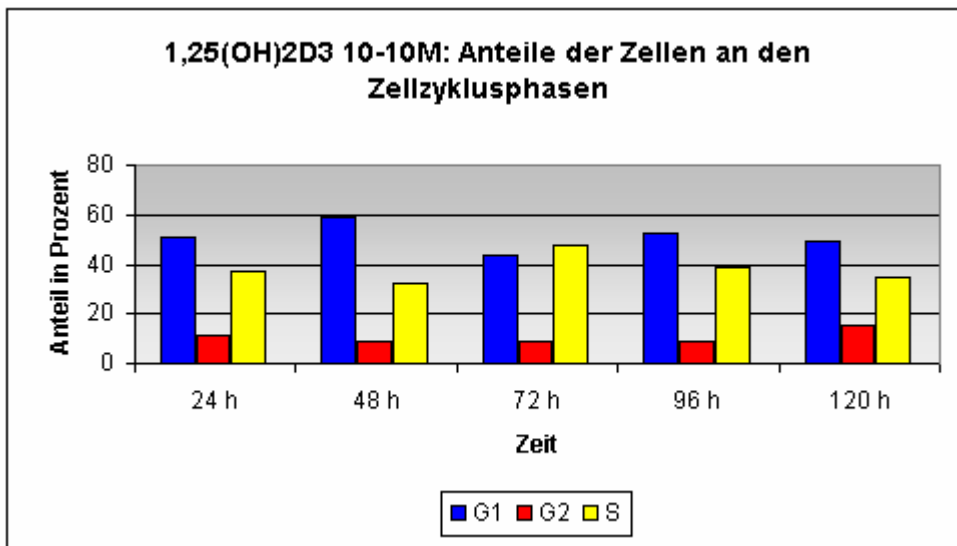
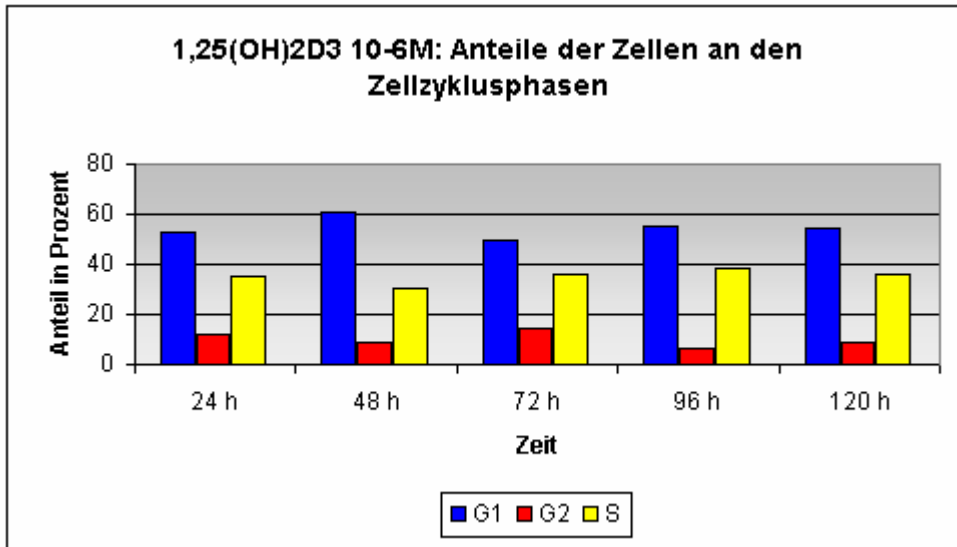


Abbildung 28: FACS, Anteile von SZ95-Sebozyten an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlungen mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten (Versuch 1)





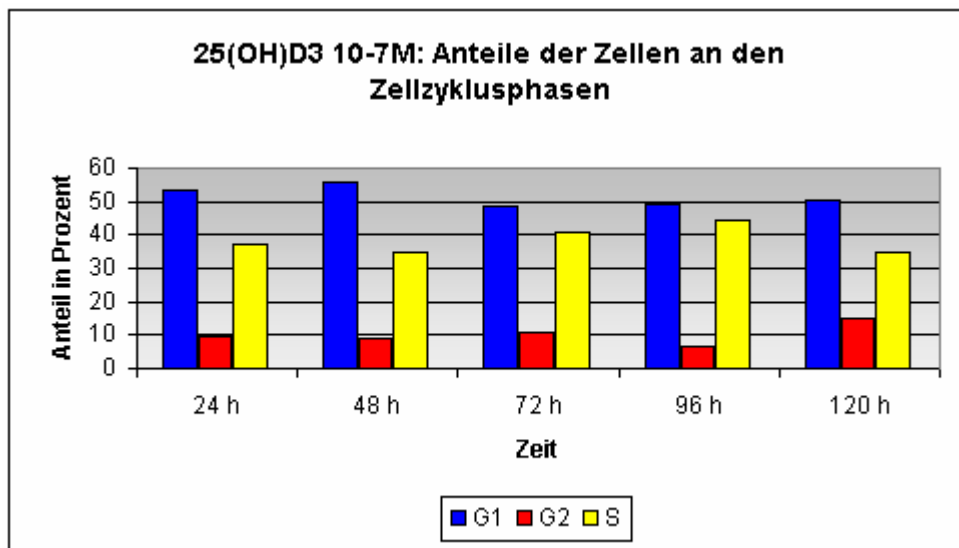
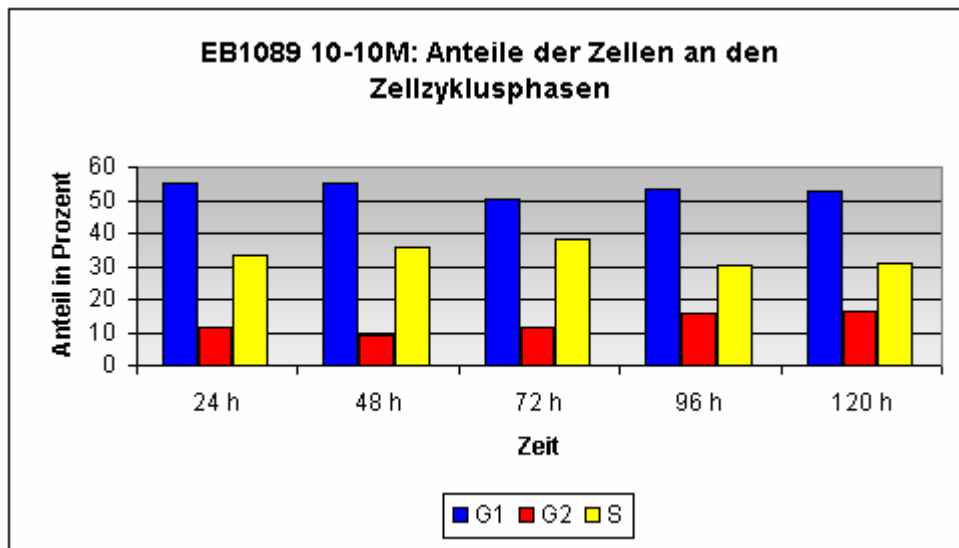
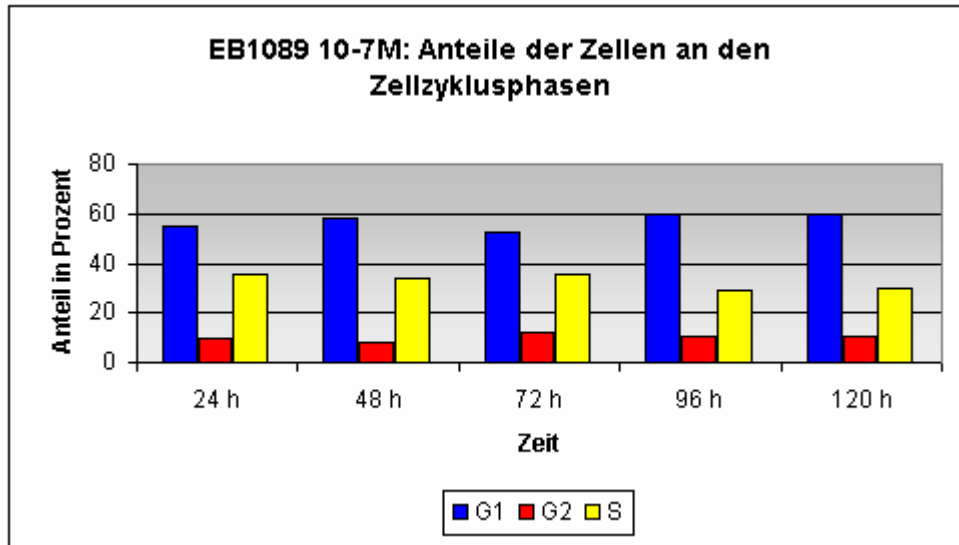
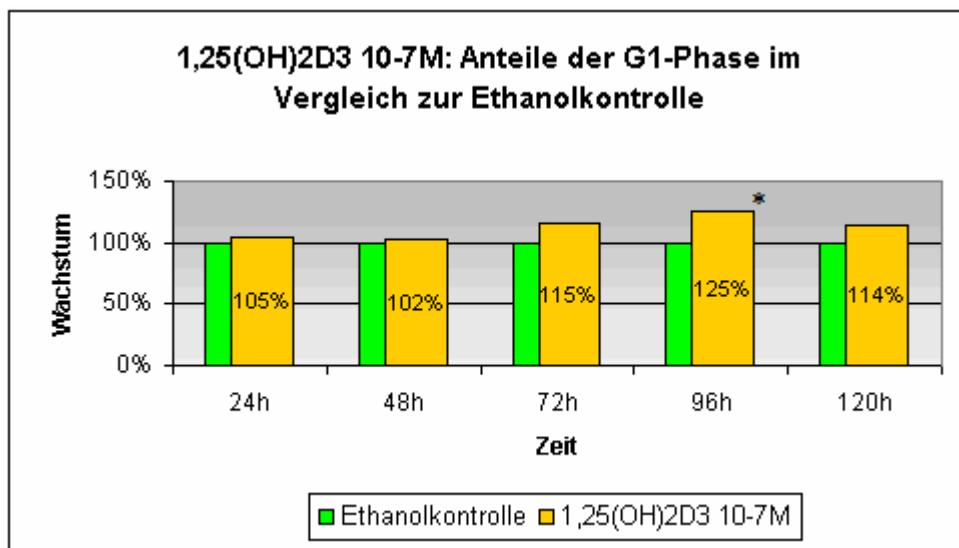
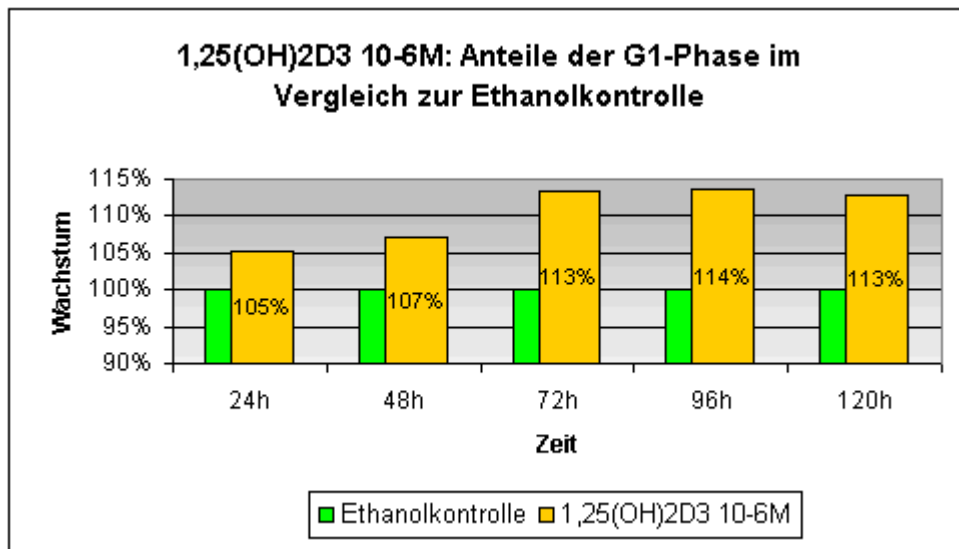
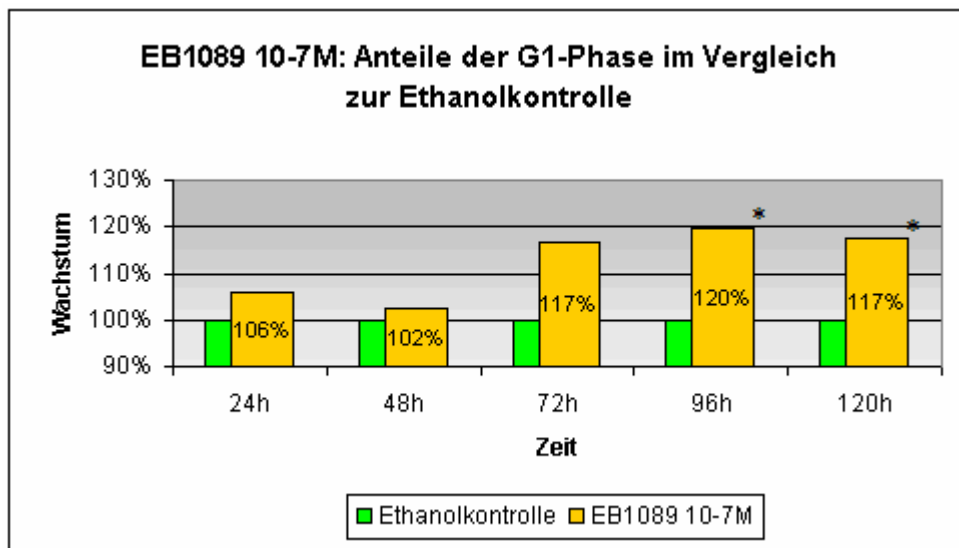
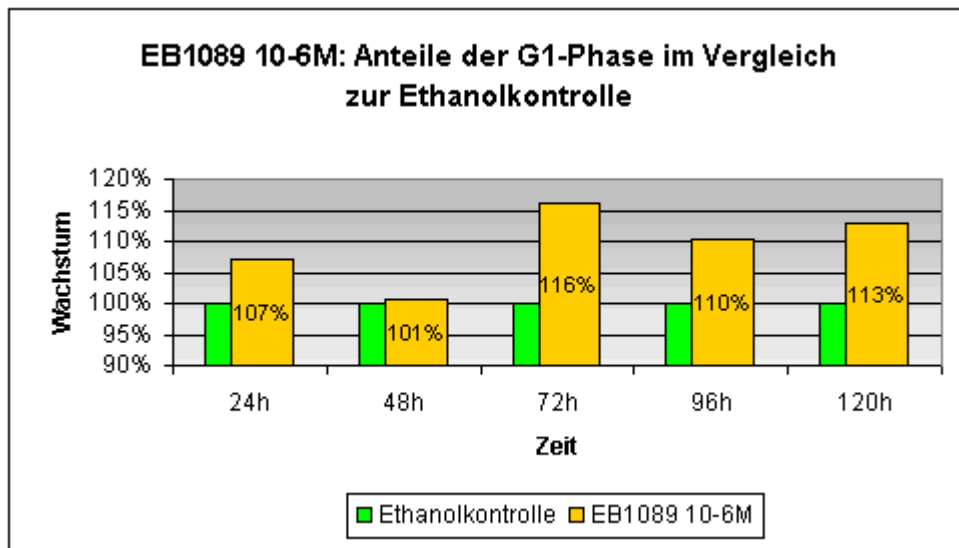
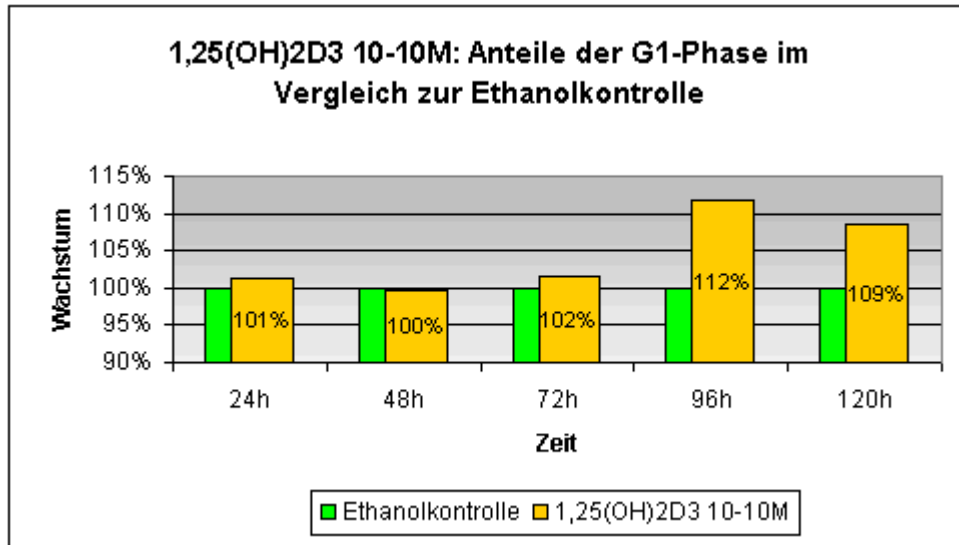


Abbildung 29: FACS, Anteile von SZ95-Sebozyten an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlungen mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten (Versuch 2)

Abbildung 28 und 29 zeigt die Verteilung der einzelnen Zellen zu den Phasen des Zellzyklus. Im ersten Versuch scheint der Anteil der G1/G0-Phase bei den mit aktiven Vitamin D₃-Derivaten behandelten Populationen ab 72 Stunden auf Kosten der S-Phase zugenommen zu haben. Im zweiten Versuch ist dieser Effekt jedoch nicht so deutlich zu sehen.

5.5.2 Zusammenfassung der Versuche mit SZ95 und mittlere Änderung des G1-Anteils





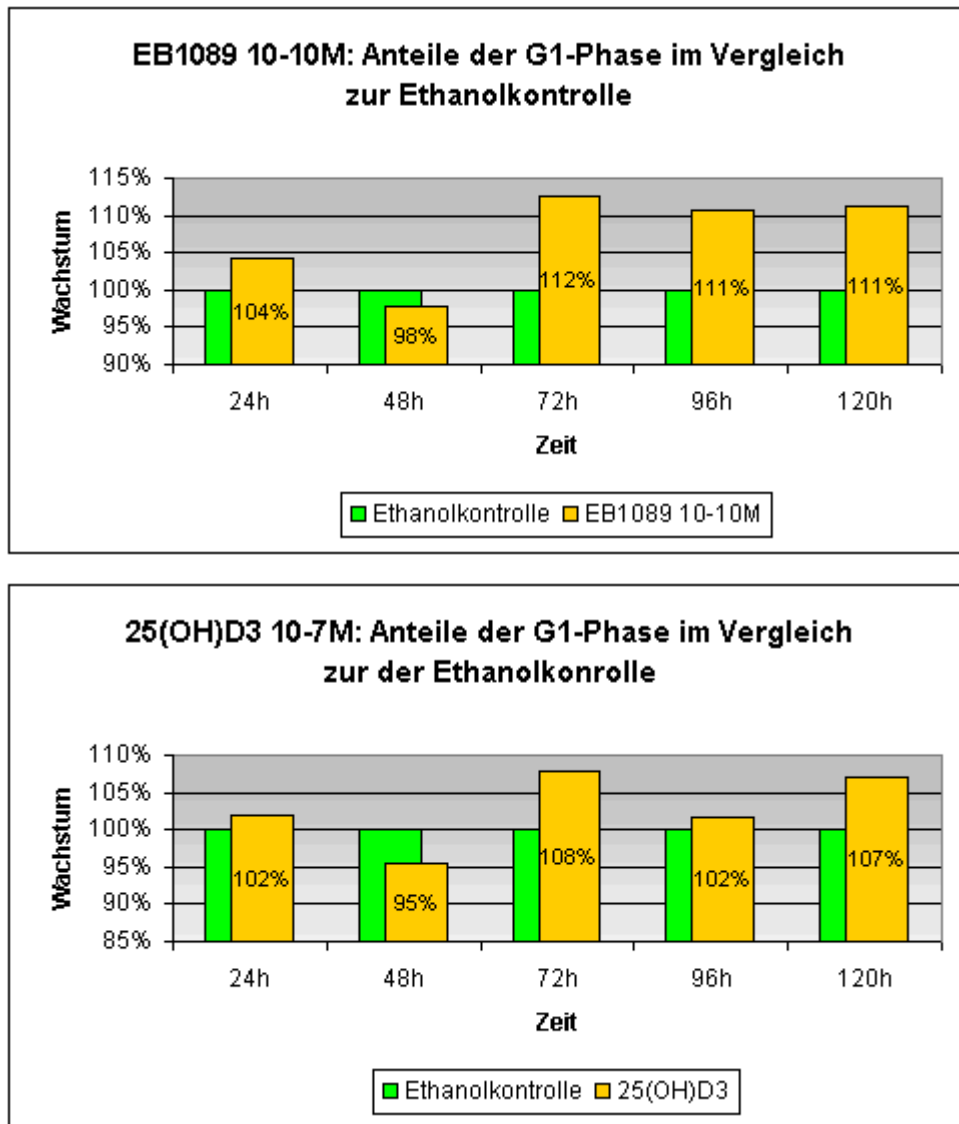


Abbildung 30: FACS; Differenz des Anteils der G1-Phase behandelter SZ95 Sebozyten im Vergleich zur Ethanolkontrolle

Wir konnten feststellen, dass aktive Vitamin D₃-Metabolite den Anteil der G1-Phase des Zellzyklus bei humanen Sebozyten in vitro erhöhen. 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 zeigten in gleichen Konzentrationen ähnlich starke Wirkungen. Vor allem ab 72 Stunden stieg der Anteil der G1-Phase deutlich an. 1,25(OH)₂D₃ zeigte in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/L und 10⁻⁷ mol/L eine Erhöhung des G1-Anteils um 2 bis 25%. In der Konzentration 10⁻¹⁰ mol/L war es noch 0 - 12%. Für EB1089 in den hohen Konzentrationen 10⁻⁶ mol/L und 10⁻⁷ mol/L lagen die Werte bei 1 - 20%. In der Konzentration von 10⁻¹⁰ mol/L zeigte sich eine Erhöhung im G1-Anteil von -2 - 12%. Auch 25(OH)D₃ scheint den Anteil der G1-Phase leicht zu erhöhen. Nach 48 Stunden zeigte sich zwar ein niedrigerer Wert, nach 72 – 120 Stunden jedoch eine Erhöhung von 2 - 8%.

5.5.3 Statistische Interpretation der SZ95-Ergebnisse

Mittels des Mann-Whitney-U-Tests wurde untersucht, ob die Veränderung des Anteils der G1-Phase bei den behandelten Gruppen im Vergleich zur Ethanolkontrolle statistisch signifikant ist. Die einzelnen Werte der beiden Versuche mit SZ95 wurden zu Gruppen zusammengefasst und die behandelten Gruppen mit der Gruppe der Ethanolkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen. Die folgende Tabelle zeigt die Irrtumswahrscheinlichkeiten der Vergleiche. Das Signifikanzniveau wurde wieder auf 5% festgelegt.

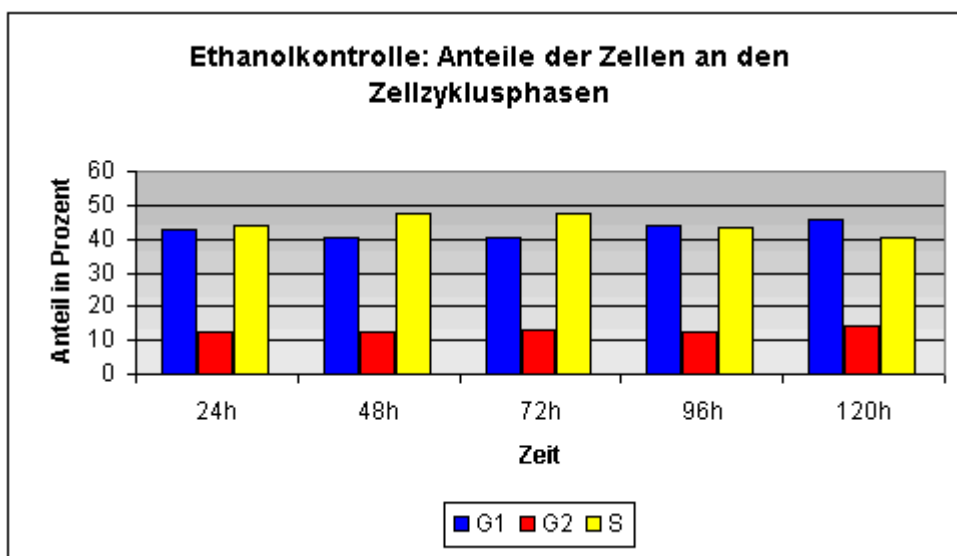
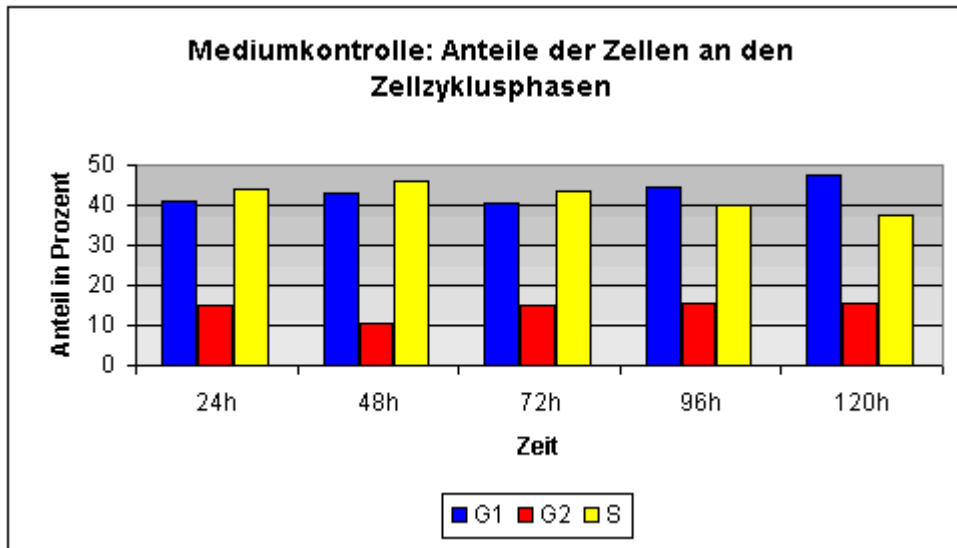
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1,25(OH)₂D₃ 10-6M | 0,686 | 0,200 | 0,343 | 0,057 | 0,114 |
| 1,25(OH)₂D₃ 10-7M | 0,486 | 0,486 | 0,114 | 0,029 | 0,200 |
| 1,25(OH)₂D₃ 10-10M | 0,886 | 1,000 | 1,000 | 0,114 | 0,343 |
| EB1089 10-6M | 0,343 | 0,886 | 0,114 | 0,114 | 0,200 |
| EB1089 10-7M | 0,886 | 1,000 | 0,343 | 0,029 | 0,029 |
| EB1089 10-10M | 0,686 | 0,686 | 0,343 | 0,114 | 0,343 |
| 25(OH)D₃ 10-7M | 0,886 | 0,686 | 0,686 | 0,886 | 0,486 |

Abbildung 31: FACS; Irrtumswahrscheinlichkeiten der Zellzyklusbestimmung von behandelten SZ95-Populationen. Ist das Signifikanzniveau von 0,05 erreicht oder unterschritten, ist der entsprechende Wert unterlegt.

Eine statistisch signifikante Erhöhung der G1/G0-Phase wurde für 1,25(OH)₂D₃ sowie für EB1089 in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l festgestellt. Die erste Gruppe hat bei 96 Stunden, die andere Gruppe nach 96 und 120 Stunden einen signifikant höheren Anteil an der G1/G0-Phase als die entsprechende Ethanolkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

5.5.4 Mewo

Als Vergleich zu SZ95-Sebozyten wurden Mewo-Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Konzentrationen 10^{-6} mol/l, 10^{-7} mol/l und 10^{-10} mol/l im Nährmedium behandelt und die Anteile der Zellzyklusphasen bestimmt. Im Folgenden sind die verschieden behandelten Zellpopulationen mit ihren Anteilen der einzelnen Zellzyklusphasen dargestellt.



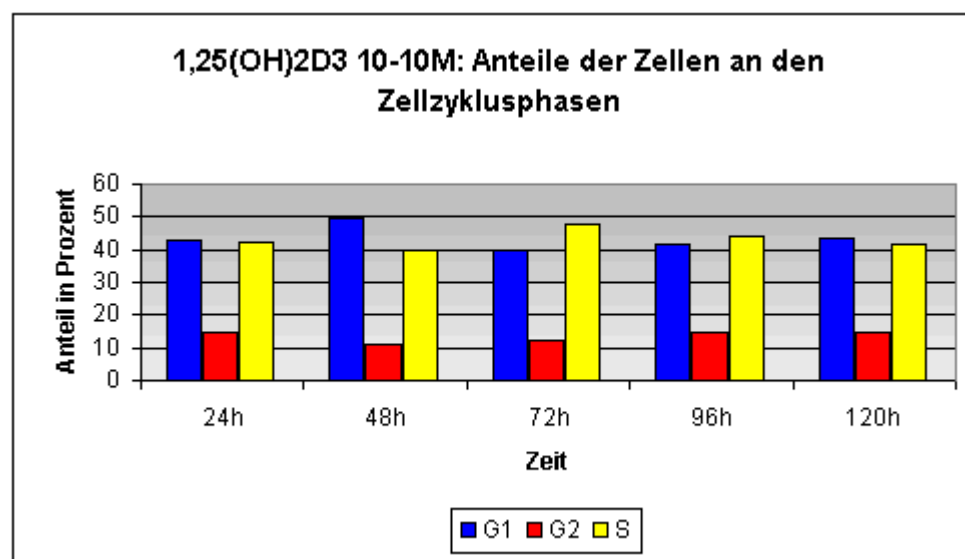
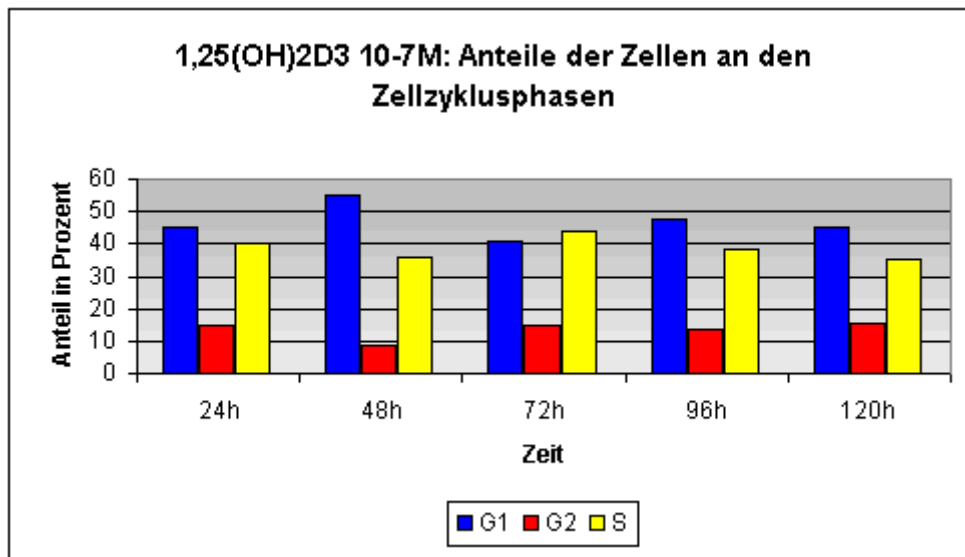
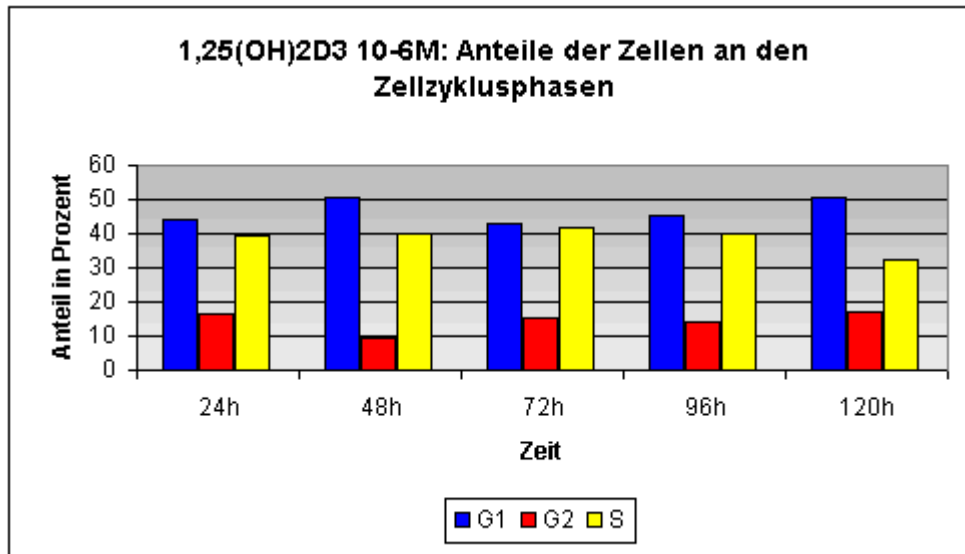


Abbildung 32: FACS, Anteile von Mewo an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlungen mit 1,25(OH)₂D₃

Im Folgenden wurden die mittleren Änderungen des G1-Anteils berechnet und dargestellt.

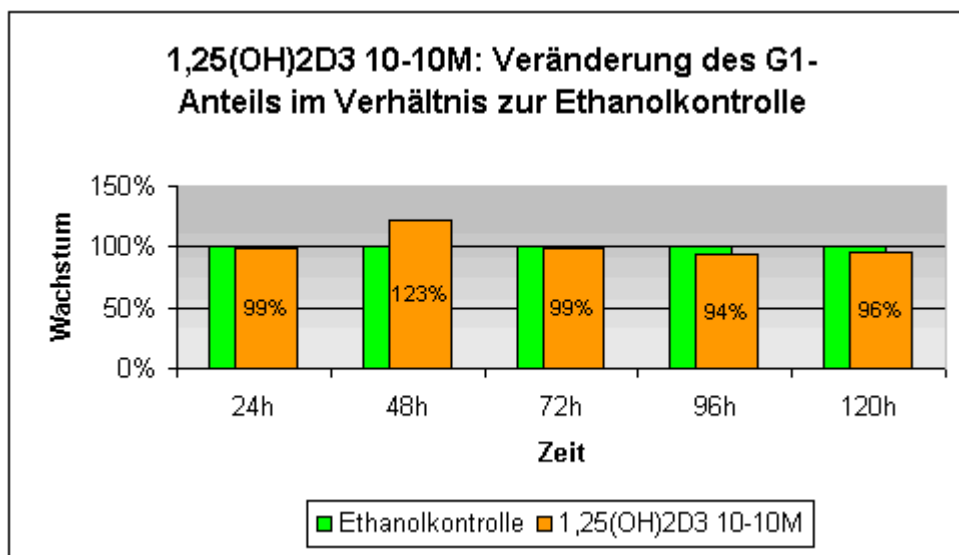
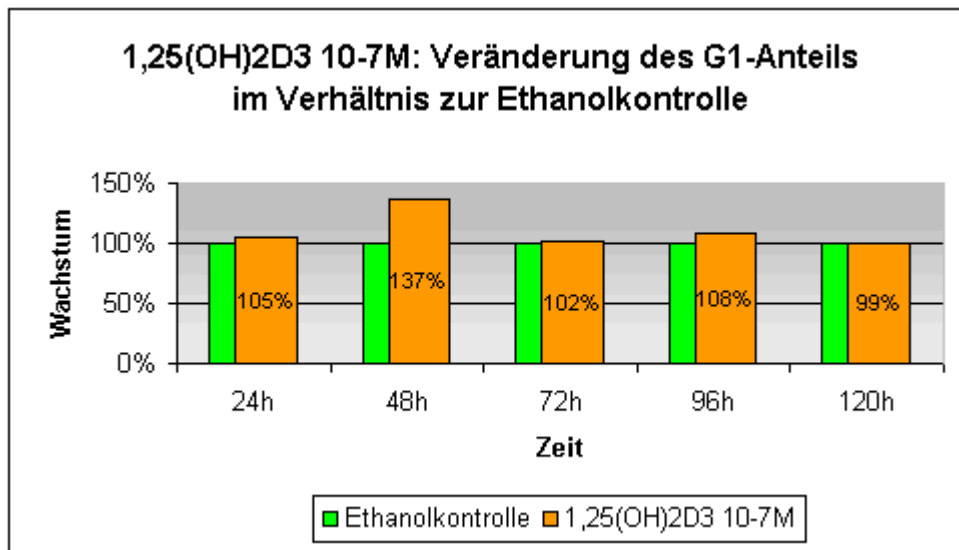
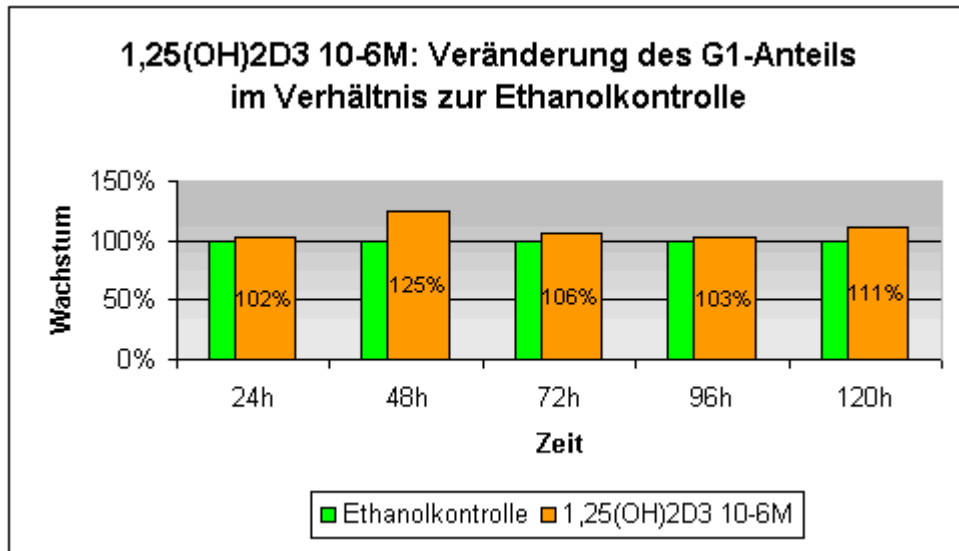


Abbildung 33: FACS; Differenz des Anteils der G1-Phase behandelter Mewo im Vergleich zur Ethanolkontrolle

1,25(OH)₂D₃ scheint den Anteil der G1/G0-Phase nur in den Konzentrationen 10⁻⁶ und 10⁻⁷ mol/l leicht erhöht zu haben.. In der Konzentration 10⁻¹⁰ mol/l ging der Anteil jedoch eher zurück.

6 Diskussion

6.1 Vorversuche

Vor der Durchführung der eigentlichen Experimente führten wir einige Vorversuche durch, um eventuelle methodische Fehler zu vermeiden. Zunächst musste die optimale Anfangskonzentration der Zellen zur Kultivierung in einer 96-well-Platte bestimmt werden. Dazu wurden 96-well-Platten mit verschiedenen Zellzahlen angesetzt und vier Tage lang bei täglichem Wechsel des Nährmediums bebrütet. Bei zu wenigen Zellen, in unserem Versuch 500 und 1000 Zellen pro well, fand keine oder eine nur geringfügige Proliferation statt. Dies ließ sich damit begründen, dass SZ95 Sebozyten am Besten in semikonfluenter Kultur proliferieren. Zu wenig Konfluenz ließ die Zellen nicht absterben, aber veranlasste sie auch nicht zu proliferieren. Bei höheren Zellzahlen von 1000 und 2000 pro well verlief die Proliferationskurve zunächst annähernd linear, bei noch höheren Zellzahlen (5000 und 10000 Zellen pro well) exponentiell. Während der weiteren Arbeit mit SZ95 stellte sich jedoch heraus, dass SZ95 einige Passagen höher, schneller und konstanter proliferierten. Die ermittelten Zellzahlen waren zu hoch. Man konnte beobachten, dass die Zellen sich bei zu hoher Konfluenz zunehmend abrundeten, vom Wellboden ablösten und frei im Medium schwammen. Dieses Phänomen hat sich vor allem bei den hohen Stundenwerten von 96 und 120 Stunden gezeigt. Ursache des Abschwimmens vom Wellboden war die durch Platzmangel bedingte Unfähigkeit der Zellen, sich am Kollagen des Wellbodens zu verankern. Die Zell-Zell-Kontakte und die Zell-Kollagen-Kontakte lösten sich auf, die Zellen schwammen frei im Medium und waren für die quantitative Bestimmung mittels des Kristallviolett-Assays und des WST-1-Assays nicht mehr verfügbar. Außerdem haben Substratmangel und Stoffwechselprodukte ein Absterben der Zellen verursacht. Um für jeden Versuch die Zellzahl so optimal wie möglich zu wählen, wurde bei jedem Versuch die ausgesäte Zellzahl der beobachteten aktuellen Wachstumsgeschwindigkeit angepasst. Außerdem wurde jeder Versuch mit verschiedenen Zellzahlen angesetzt und der Versuchsansatz mit der optimalen Proliferationskurve der Ethanolkontrolle ausgewählt.

Als nächstes war von Interesse, ob Ethanol, das als Lösungsmittel für die verwendeten Vitamin D₃-Metabolite dient, einen Effekt auf die Proliferation von SZ95 hat. Bei der Herstellung der Verdünnungsreihen der gewünschten Konzentrationen von 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ und EB1089 wurde jeweils eine 1:1000 Verdünnung beibehalten um in allen Konzentrationen einen Volumenanteil von 1:1000 Ethanol zu erhalten. Somit genügte in allen Versuchen eine 1:1000 Ethanolkontrolle. Es zeigten sich im Kristallviolett-Assay und im WST-1-Assay keine zytotoxischen Effekte von Ethanol bei einer Konzentration von 1:1000.

Außerdem haben wir die Toxizität von BSA auf SZ95 Sebozyten untersucht. BSA wird von der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) als Rezeptormedien-substanz zur Verbesserung der Löslichkeit von hochlipophilen Substanzen in Versuchen zur perkutanen Absorption empfohlen. In unserem Labor wurde BSA dann dem Nährmedium von Zellen zugesetzt, wenn ihm aktive Vitamin D₃-Metabolite zugegeben wurden. In der Regel wurde in unserem Labor eine Konzentration von 1% im Medium gewählt. Außerdem wurden die Pipettenspitzen, welche mit Vitamin D₃-Metaboliten in Berührung kamen, mit BSA gespült, weil sonst das lipophile Vitamin D₃ von der Kunststoffoberfläche der Pipettenspitzen adsorbiert würde. In einigen Studien wurde jedoch herausgefunden, dass BSA bei bestimmten Zellen eine Nekrose hervorruft, die durch eine verstärkte Expression des Tumornekrosefaktor- α bedingt ist. (Zheng et al 1995). Dies schien auch für Sebozyten eine Rolle zu spielen, da in der Konzentration von 1% BSA im Medium ein Zelluntergang beobachtet werden konnte. Es musste also ermittelt werden, welche BSA-Konzentration SZ95 Sebozyten tolerieren und wie viel BSA benötigt wird, damit genügend Vitamin D₃ in die Zellen gelangt, um eine optimale Vitamin D₃-Antwort zu erreichen. Da es wenig Literatur zum Thema SZ95 und Vitamin D₃ zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung gab, musste die optimale BSA-Konzentration in Versuchen ermittelt werden. Wir kamen zu dem Ergebnis, dass ab einer Konzentration von 0,25% BSA ein antiproliferativer, sogar zytotoxischer Effekt eintrat. BSA-Konzentrationen von 0% und 0,1% im Medium hatten keinen negativen Effekt auf Proliferation und Vitalität der Sebozyten. Jetzt stellte sich die Frage, ob in diesen niedrigen Konzentrationen auch genügend 1,25(OH)₂D₃ in die Zellen gelangt, um eine antiproliferative Wirkung zu zeigen. Unsere Versuche ergaben, dass die antiproliferative Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ ohne BSA und mit 0,1% BSA im Medium deutlich zu sehen ist. Deswegen konnte man davon ausgehen, dass bei diesen Konzentrationen genügend 1,25(OH)₂D₃ in die Zellen aufgenommen wurde. Wir haben uns bei unseren Versuchen für eine Konzentration von 0,1% BSA im Medium entschieden.

6.2 Wirkung von 1,25(OH)₂D₃, EB1089 und 25(OH)D₃ auf SZ95

Zuerst haben wir untersucht, ob der VDR sowie die Schlüsselenzyme des Vitamin D₃-Stoffwechsels - CYP27B1 und CYP24A1 - auf mRNA-Ebene in SZ95 exprimiert werden und eventuell durch die Gabe aktiver Vitamin D₃-Analoga in ihrer Expression beeinflussbar sind. Wir konnten in unseren Versuchen den VDR nachweisen, die Ergebnisse lieferten jedoch nur annähernd Hinweise auf eine durch Vitamin D₃-Metabolite hervorgerufene Veränderung der Expression. Die Stundenwerte 24 bis 72 Stunden liefern keinen Hinweis auf eine durch aktive Vitamin D₃-Analoga verursachte Up-Regulation der mRNA des VDR. Nach 96 Stunden ist die mRNA des VDR bei der mit 1,25(OH)₂D₃ behandelten Gruppe um 85% angestiegen, bei

der mit EB1089 stimulierten Gruppe um ca. 250% und bei der mit 25(OH)D₃ stimulierten Population um ca. 240%. Die Regulierung der Expression des VDR hängt unmittelbar mit der Hormonwirkung aktiver Vitamin D₃-Analoga zusammen. Man hat herausgefunden, dass der VDR je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert wird und durch eine Reihe von physiologischen Faktoren und Hormonen reguliert wird (Ross et al 1994). Es ist bewiesen, dass 1,25(OH)₂D₃ die VDR-Expression in der Niere und in der Glandula parathyroidea stimulieren kann, jedoch wenig Effekt auf die VDR-Expression intestinaler Zellen hat (Costa et al 1986, Goff et al 1990, Russel et al 1993; Brown et al 1995). Li und Mitarbeiter haben die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ auf die Regulation des VDR in humaner Haut in vivo und in kultivierten humanen Keratinozyten untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die topische Applikation von 1,25(OH)₂D₃ auf humane Haut einen zweifachen Anstieg des VDR-Protein-Levels verursachte, jedoch keinen Einfluss auf die mRNA des VDR hatte. Folglich muss 1,25(OH)₂D₃ entweder die Synthese des VDR-Proteins erhöhen und/oder den Abbau der VDRs inhibieren. Die Studien zeigten, dass 1,25(OH)₂D₃ den durch Ubiquitin (Ubiquitin wird an Proteine angehängt und nimmt eine Schlüsselposition beim Abbau von Proteinen ein) und Proteasom (Proteasomen sind wie die Lysosomen Ort des Proteinabbaus) bedingten Abbau der VDRs hemmen. Dieselben Mechanismen könnten auch bei Sebozyten zugrunde liegen, wobei die Beeinflussung des VDR-Proteinlevels durch 1,25(OH)₂D₃ noch untersucht werden muss.

Die mRNA des 1 α -hydroxylierenden Enzyms CYP27B1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, die erwartete Expressionshemmung durch 1,25(OH)₂D₃ sowie EB1089 und die Expressionssteigerung durch 25(OH)D₃ hat aber nicht bestätigt werden können. Wir stellten eine allgemeine unspezifische Expressionserhöhung nach 72 Stunden fest, die nach 96 Stunden wieder abfiel. Auch hier kann man vermuten, dass ähnlich wie bei der Expression der mRNA des VDR, der mRNA-Level der CYP27B1 keine unmittelbaren Aussagen über die Menge des gebildeten Proteins oder der Regulation des Abbaus der CYP27B1 machen kann.

Die mRNA des Enzyms CYP24A1 war ebenfalls in SZ95 nachweisbar und zeigte durch 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 eine starke Expressionssteigerung schon nach 24 Stunden. Die Erhöhung des mRNA-Levels durch die Stimulierung mit 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 liegt bei über 1000% bis 2000% des Referenzwertes (Ethanolkontrolle 24 h). 25(OH)D₃ hatte keinen Einfluss auf den mRNA-Level der CYP24A1 gezeigt. Die Vitamin D₃-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) hat wahrscheinlich die Vorstufe 25(OH)D₃ nur geringfügig in das aktive 1,25(OH)₂D₃ überführen können. Hätte die 1 α -Hydroxylierung gut funktioniert, hätte dies zu einem Anstieg der Vitamin D₃-24-Hydroxylase führen müssen.

Durch diese Arbeit konnte also gezeigt werden, dass durch das Vorhandensein der mRNA des VDR und der Schlüsselenzyme des Vitamin D₃-Stoffwechsels, Vitamin D₃ für Sebozyten auch in vivo für die natürliche Stoffwechselphysiologie von Relevanz ist. Wie viel Enzympro-

tein jedoch tatsächlich von SZ95-Sebozyten produziert wird, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Weiterhin haben wir uns die Frage gestellt, ob Sebozyten ähnlich auf Vitamin D₃ reagieren wie es bereits andere Hautzellen gezeigt haben. Daher haben wir das Proliferationsverhalten von SZ95 nach Stimulierung mit 1,25(OH)₂D₃, EB1089 und 25(OH)D₃ im Kristallviolett-Assay untersucht. Der Kristallviolett-Assay ist ein sehr konstanter Test mit geringer Fehleranfälligkeit. Er gibt Auskunft über die Quantität der Zellen in der Kulturschale, indem der Farbstoff Proteine der Zellen anfärbt. Da nur lebensfähige Zellen Farbstoff aufnehmen, macht der Assay Aussagen zur Vitalität einer Zellkultur. Die Ergebnisse der drei Versuche waren sehr gut reproduzierbar. Die Versuchsauswertung zeigte, dass 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/L und 10⁻⁷ mol/L das Wachstum von SZ95 bei einer Einwirkzeit von 96 und 120 Stunden signifikant hemmten. 1,25(OH)₂D₃ in Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l verringerten die Proliferationsrate um 40 – 55% im Vergleich zur Ethanolkontrolle des jeweiligen Messzeitpunktes. Bei EB1089 in denselben Konzentrationen lag die Hemmung bei 38 - 50%. EB1089 hatte in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l sogar nach 72 Stunden eine signifikante Proliferationshemmung (29%) verursacht. 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 in der Konzentration 10⁻¹⁰ mol/l hatten einen geringeren Effekt. Allein EB1089 in der Konzentration 10⁻¹⁰ mol/l hemmte die Proliferation nach 96 Stunden signifikant. Bei den übrigen Populationen hatten 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 zwar eine Proliferationshemmung verursacht, die sich aber als nicht signifikant herausgestellt hatte. 25(OH)D₃ in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l hatte keinen signifikanten Effekt auf SZ95 im Kristallviolett-Assay gezeigt.

Als nächstes wurde die Zellproliferation und Zellvitalität mittels des WST-1-Assays bestimmt. Kristallviolett-Assay und WST-1-Assay sind beides Zelltod-Assays, die im ersten Fall den Zelltod direkt über die Anzahl überlebender Zellen, im zweiten Fall indirekt über die Stoffwechselaktivität nachweisen. Der WST-1-Assay ist im Gegensatz zum Kristallviolett-Assay ein dynamischer Test, deren fortschreitende Farbänderung nach 1, 2, 3 und 4 Stunden gemessen wurde. Die Ergebnisse ließen sich trotz gleicher Bedingungen und Versuchsdurchführungen nicht so gut reproduzieren wie die des Kristallviolett-Assays. Die Vitalitätskurven der mit aktiven Vitamin D₃-Metaboliten stimulierten Populationen unterschieden sich nicht so deutlich von denen der Medium- und Ethanolkontrolle wie das beim Kristallviolett-Assay der Fall war. Beide bestätigten jedoch die Vermutung, dass 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 in der Konzentration 10⁻¹⁰ mol/L sowie 25(OH)D₃ in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l keinen Einfluss auf Zellzahl und Aktivität von SZ95 haben. Genauso wurde die signifikante Vitalitätshemmung von EB1089 in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l ab einer Wirkdauer von 96 Stunden bestätigt, für die Konzentration 10⁻⁷ mol/l war die Wirkung schon nach 48 Stunden sichtbar. 1,25(OH)₂D₃ in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l hatten sogar bei den niedrigen Stundenwerten von 48 und 72 Stunden eine signifikante Vitalitätserhöhung von

10 - 26% gezeigt. Es gibt also eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des Kristallviolett-Assays und des WST-1-Assays. Die Erklärung könnte im Messprinzip der verschiedenen Tests liegen. Der Kristallviolett-Assay färbt intakte Zellen an und sagt direkt etwas über die Zellzahl aus. Der WST-1-Assay ist stark abhängig vom Gehalt an NADH in den Zellen und der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen aktiver Zellen. Wie im Kristallviolett-Assay gesehen wurde, hemmen aktive Vitamin D₃-Metabolite die Proliferation, was sich in einer erniedrigten Zellzahl im Vergleich zur Ethanolkontrolle niederschlägt, ohne dass die Ausgangszellzahl unterschritten wird. Die Stoffwechselaktivität der Mitochondrien scheint aber nicht in demselben Ausmaß zu stagnieren wie die Zellzahl, das bedeutet, dass bei den mit aktiven Vitamin D₃-Metabolite stimulierten Populationen weniger Zellen – hauptsächlich bei den mit 1,25(OH)₂D₃ behandelten Zellen zu sehen - annähernd gleiche oder sogar erhöhte Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Ethanolkontrolle besitzen und daher ebensoviel oder mehr WST-1 verstoffwechseln wie die Zellen der Ethanolkontrolle. Der Kristallviolett-Assay und der WST-1-Assay haben die Vermutung bestätigt, dass aktive Vitamin D₃-Analoga, ähnlich wie bei anderen Hautzellen bereits beschrieben, starke Wachstumsinhibitoren für SZ95 Sebozyten sind. Sebag und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass 1,25(OH)₂D₃ bei humanen Keratinozyten die beobachtete Wachstumshemmung unter anderem durch Blockierung des Übergangs der Zellen von der G0/G1-Phase in die S-Phase bedingt (Sebag et al 1992). Ob dies auch auf humane SZ95 Sebozyten zutrifft, haben wir mittels der FACS-Analyse untersucht. 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁷ mol/l erhöhten den G1-Anteil vor allem ab 72 Stunden um 13 – 25% (1,25(OH)₂D₃) bzw. um 10 - 20% (EB1089). Beide Substanzen in der Konzentration von 10⁻¹⁰ mol/l konnten den G0/G1-Anteil nur um -2 - 12% erhöhen. Die Inkubation der Zellen mit der Vorstufe 25(OH)D₃ ergab eine G0/G1-Erhöhung von -5 - 8%. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse jedoch nur für 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l bei einer Einwirkzeit von 96 bzw. 120 Stunden. Wahrscheinlich gibt es noch andere Mechanismen, die die durch aktive Vitamin D₃-Metabolite verursachte Proliferationshemmung bei Sebozyten bedingen.

Diese Arbeit hat also erstmals gezeigt, dass zum einen humane Sebozyten Zielzellen für aktive Vitamin D₃-Analoga sind und sie die Enzyme zum Aufbau (CYP27A1) und zur Verstoffwechslung (CYP24A1) von 1,25(OH)₂D₃ und seiner Analoga besitzen. 1,25(OH)₂D₃ und seine Analoga sind in der Lage, humane Sebozyten in vitro in ihrem Wachstum nachhaltig zu hemmen.

Aufgrund unserer Ergebnisse kann man die Verwendung von 1,25(OH)₂D₃ und seinen aktiven Analoga als Therapeutika für sebozytenassoziierte Hauterkrankungen in Betracht ziehen.

Betrachten wir die Akne als eine der häufigsten Hauterkrankungen. Mehrere sich gegenseitig beeinflussende Faktoren führen zum Erscheinungsbild der Akne mit Komedonen, Pusteln und Abszessen. Zum einen sind das Seborrhoe und folliculäre Hyperkeratose, zum anderen mikrobielle Besiedlung und Entzündungsprozesse. Seborrhoe und folliculäre Hyperkeratose scheinen ein Milieu zu produzieren, das den zur Standortflora zählenden Propionibakterien ein exzessives Wachstum erlaubt. Außerdem besteht schon initial eine perifolliculäre Entzündungsbereitschaft, die die folliculäre Hyperkeratose begünstigt. Zusätzlich wirken bakterielle Stoffwechselprodukte chemotaktisch auf Leukozyten und initiieren die Entzündung. Für die Seborrhoe sind vor allem Androgene verantwortlich. Sie bewirken eine gesteigerte Proliferation von Sebozyten und eine gesteigerte Talgproduktion. Auch die Keratinozyten der Haarfollikel sind bei der Akne betroffen. Es besteht eine Differenzierungsstörung und eine Hyperproliferation, die zu folliculärer Hyperkeratose und folglich zu einer Abflussstörung des Talges führt. Äußerlich imponiert dies als Mikrokomedo, schließlich als Komedo.

Vitamin D₃ und seine Metabolite könnten an mehreren Stellen in die Pathophysiologie der Akne eingreifen. Wir haben gesehen, dass humane Sebozyten den VDR und das Enzym für die Bildung des aktiven Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ (CYP27B1) und das Enzym für die Initiierung des Abbaus (CYP24A1) besitzen. Weiterhin haben wir gezeigt, dass Sebozyten durch aktive Vitamin D₃-Metabolite in ihrem Proliferationsverhalten stark beeinträchtigt werden. Es wäre zum einen aufgrund des Vorhandenseins der CYP27B1 möglich, dass Vorstufen aktiver Vitamin D₃-Metabolite lokal in Form von Salben wirksam wären. Bessere Proliferationshemmung haben wir allerdings bei der Inkubation der Zellen mit den aktiven Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ und EB1089 gesehen. Sie könnten als topisch wirkende Therapeutika Sebozyten in ihrem hyperproliferativen Verhalten beeinflussen und somit evtl. die Seborrhoe als entscheidenden Auslöser der Akne reduzieren. Wie wir festgestellt haben, wird die 24-Hydroxylierung (CYP24A1) des Vitamin D₃-Stoffwechsels in Sebozyten durch aktive Vitamin D₃-Metabolite stark induziert. Die 1 α -Hydroxylierung scheint hingegen bei der Inkubation mit der Vorstufe 25(OH)D₃ kaum induziert zu werden. Es wäre also möglich, einen Hemmer der Hydroxylasen zuzugeben. Therapeutisch verwendet wird z. B. Ketokonazol. Dieses könnte vor allem die CYP24A1 und somit den Abbau der aktiven Vitamin D₃-Metabolite hemmen und so zu einer lokalen Erhöhung der Vitamin D₃-Konzentration sowie zu einer Wirkverlängerung führen.

Zusätzlich zu den Effekten auf Sebozyten würden Keratinozyten durch aktive Vitamin D₃-Metabolite beeinflusst. Ihre prodifferenzierende und antiproliferative Wirkung auf Keratinozyten ist schon länger bekannt. Die folliculäre Hyperkeratose würde also ebenfalls in das Wirkschema aktiver Vitamin D₃-Metabolite fallen. Neueste Studien haben sogar ergeben, dass Cholecalciferol einen stärkeren antiproliferativen Effekt auf Keratinozyten hat als die bisher bei der Aknetherapie verwendeten, als komedolytisch geltenden Retinoide (Popadic et al

2008). Des Weiteren kann Vitamin D₃ Entzündungsreaktionen und die Immunantwort in der Haut beeinflussen. Die Haut produziert eine Reihe von antimikrobiellen Peptiden (AMPs). Cathelicidin ist eines der ersten AMPs, die in der Haut entdeckt wurden. Zum einen hat es direkte antimikrobielle Wirkung, zum anderen löst es eine Reihe von zellulären Antworten aus, die zu Zytokinfreisetzung, Entzündung und Angiogenese führen. Eine Störung des Cathelicidin-Stoffwechsels spielt beispielsweise eine Rolle bei Hauterkrankungen wie atopische Dermatitis, Rosazea und Psoriasis. Studien von Schaubert et al haben gezeigt, dass Vitamin D₃ eine große Rolle in der Regulation der Cathelicidin-Expression spielt (Schauber, Gallo; 2008 und Schaubert, Büchau; 2008). Therapien mit Vitamin D₃ oder Substanzen, die den Vitamin D₃-Stoffwechsel der Haut beeinflussen, können in nächster Zeit eine große Rolle bei der Behandlung von infektiösen und inflammatorischen Hauterkrankungen spielen, zu der auch die Akne gehört.

Eine weitere Hauterkrankung, die von der Therapie mit Vitamin D₃ profitieren könnte, wäre die Rosazea, die unter Erwachsenen häufigste Hauterkrankung. Hier wäre zum einen die schon erwähnte Beeinflussung des gestörten Cathelicidin-Systems durch Vitamin D₃ zu nennen. Des Weiteren kommt es im Stadium III der Rosazea, der glandulär-hyperplastischen Rosazea, zu einer massiven Talgdrüsenhyperplasie, die ebenfalls ein möglicher Angriffspunkt für die Wirkung von Vitamin D₃ darstellen könnte.

Im Handel gibt es bereits mehrere Präparate zur topischen Behandlung mit Vitamin D₃-Analoge. Wirksubstanzen sind Calcipotriol und Tacalcitol, aber auch Calcitriol. Diese Substanzen werden hauptsächlich zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt und erzielen gute Therapieerfolge. Im Handel sind unter anderem Calcitriol in einer Dosis von 3µg/g Salbe (Silkis®), Calcipotriol in einer Dosis von 50 µg/g Salbe (Daivonex®, Psorcutan®) und Tacalcitol (Curatoderm®) in einer Konzentration von Tacalcitol-H₂O von 4,17 µg/g Salbe. Wegen seinen unerwünschten kalzämischen Wirkungen sowie seiner schlechteren Wirksamkeit, wird 1,25(OH)₂D₃ weniger gerne verwendet und eher auf die Analoga Calcipotriol und Tacalcitol zurückgegriffen.

Auf der Basis unserer Erkenntnisse kann in weiterführenden Studien die Wirkung von Vitamin D₃-Analoge bei den verschiedenen sebozytenassoziierten Hauterkrankungen untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Axén E, Bergman T, Wikval K (1994) Microsomal 25-hydroxylation of vitamin D₂ and vitamin D₃ in pig liver. *L Steroid Biochem Mol Biol.* 51:97-106
2. Barsony J, Pike JW, DeLuca HF, Marx SJ (1990) Immunocytology of microwave-fixed fibroblasts shows 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors. *J Cell Biol* 111:2385-95
3. Barsony J, Renyi I, McKoy W (1997) Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. *J Biol Chem* 272:5774-82
4. Baxter LA, DeLuca HF (1976) Stimulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase by phosphate depletion. *J Biol Chem* 251:3158-61
5. Bell NH(1998) Renal and nonrenal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylases and their clinical significance. *J Bone Miner Res* 13:350-3
6. Bikle DD, Nemanic MK, Gee E, Elias P (1986) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ production by human keratinocytes. Kinetics and regulation. *J Clin Invest* 78:557-66
7. Bollag WB, Ducote J, Harmon CS (1995) Biphasic effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on primary mouse epidermal keratinocyte proliferation. *J Cell Physiol* 163:248-256
8. Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG (1994) Two vitamin D₃-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II. Effect of CaBP 9K. *Kidney Int* 45:469-74
9. Boyce RW, Weisbrode SE, Kindig O(1985) Ultrastructural development of hyperostoidosis in 1,25(OH)₂D₃-treated rats fed high levels of dietary calcium. *Bone* 6:165-72
10. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, Slatopolsky E(1995) The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology* 136:1419-1425
11. Cadranel J, Garabedian M, Milleron B, Guillozo H, Akoun G, Hance AJ(1990) 1,25(OH)₂D₂ production by T lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcemic patients with tuberculosis; *J Clin Invest* 85:1588-93
12. Capiati D, Benassati S, Boland RL (2002) 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin of the vitamin D receptor (VDR) in to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *J Cell Biochem* 86:128-35
13. Cassidy DM, Lee CM, Laker MF, Kealey T (1986) Lipogenesis in isolated human sebaceous glands. *FEBS Lett* 200:173-6
14. Charhon SA, Chapuy MC, Delvin EE, Meunier PJ(1985) Parathyroid function and vitamin D status in patients with bone metastases of prostatic origin. *Miner Electrolyte Metab* 11:117-22
15. Costa EM, Feldman D (1986) Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ receptor in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 137:742-7
16. DeLuca HF, Schnoes HK (1983) Vitamin D: recent advances. *Annu Rev Biochem* 52:411-39. Review.
17. Dusso AS, Finch J, Brown A, Ritter C, Delmez J, Schreiner G, Slatopolsky E (1991) Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans. *J Clin Endocrinol Metab* 72:157-64

18. Dusso AS, Brown AJ, Skatopolski E (2005): Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiology* 289:F8-F28
19. Eisman JA, Barkla DH, Tutton PJ (1987) Suppression of in vivo growth of human cancer solid tumor xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res* 47:21-5
20. Erben RG, Scutt AM, Miao D, Kollenkirchen U, Haberey M (1997) Short-term treatment of rats with high dose 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. *Endocrinology* 138:4629-35
21. Erben RG, Soegiarto W, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller G (2002) Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* 16:1524-37
22. Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF (1978) Vitamin D₃ from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light, *Arch Biochem Biophys* 188:282-6
23. Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-95
24. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM (1989) A polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res* 17: 2150
25. Friedman PA, Gesek FA (1995) Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 75:429-71
26. Goff JP, Reinhardt TA, Beckman MJ, Horst RL (1990) Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)₂D] versus endogenous 1,25-(OH)₂D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. *Endocrinology* 126:1031-1035
27. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J (1993) Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 91:2552-5
28. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM (2000) 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol* 25:141-8
29. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P (1980) Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210:203-5
30. Hollick, M.F (1995) Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications; *Bone* 17:107S-111S Supplement
31. Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T, Takahashi N, Suda T (1995) Mouse primary osteoblasts express vitamin D₃ 25-hydroxylase mRNA and convert 1 α -hydroxyvitamin D₃ into 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Bone* 16:129-35
32. Jones G, Ramshaw H, Zhang A, Cook R, Byford V, White J, Petkovich M (1999) Expression and activity of vitamin D-metabolizing cytochrome P450s (CYP1 α and CYP24) in human nonsmall cell lung carcinomas. *Endocrinology* 140:3303-10
33. Kealey T, Lee CM, Thody AJ, Coaker T (1986) The isolation of human sebaceous glands and apocrine sweat glands by shearing. *Br J Dermatol* 114:181-8
34. Kellum RE (1966) Isolation of human sebaceous glands. *Arch Dermatol* 93:610-2
35. Lehmann B; Meurer M (2003) Extrarenal sites of calcitriol synthesis: the particular role of the skin. *Recent Results Cancer Res* 164:135-4
36. Li XY, Boudjelal M, Xiao JH, Peng ZH, Asuru A, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ (1999) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases nuclear vitamin D₃ receptors by blo-

- cking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. *Mol Endocrinol* 13:1686-94
37. Lutzow-Holm D, De Angelis P, Grosvik H, Clausen OP (1993) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and the Vitamin D analogue KH1060 induce hyperproliferation in normal mouse epidermis. *Dermatol* 2: 113-120
 38. Matsumoto K, Azuma Y, Kiyoki M, Okumura H, Hashimoto K, Yoshikawa K (1991) Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in the growth and differentiation of human keratinocytes. *Biochim Biophys Acta* 1092:311-8
 39. Matsumoto T, Fontaine O, Rasmussen H (1981) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on phospholipid metabolism in chick duodenal mucosal cell. Relationship to its mechanism of action. *J Biol Chem* 256:3354-60
 40. Matsumoto K, Azuma Y, Kiyoki M, Okumura H, Hashimoto K, Yoshikawa K (1991) Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in the growth and differentiation of human keratinocytes. *Biochim Biophys Acta* 1092:311-8
 41. Montagna William, Richard A. Ellis, and Silver Alene F (1963) *Advances in Biology of Skin Vol. 4: The Sebaceous Glands*
 42. McCollum EV, Simmonds N, Parsons HT, Shipley PG, Park EA (1921) Studies of experimental Rickets I. The production of rachitis and similar diseases in the rat by deficient diets. *J Biol Chem* 45:333-342
 43. Narbaitz R, Stumpf WE, Sar M, Huang S, DeLuca HF (1983) Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int* 35:177-82
 44. Nemere I, Szego DM (1981) Early actions of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine: II. analyses of additivity, contribution of calcium, and modulatory influence of indomethacin. *Endocrinology* 109:2180-7
 45. Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW (1984) Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 115:1476-83
 46. Nemere I, Norman AW (1987) Rapid action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium transport in perfused chick duodenum: effects of inhibitors. *J Bone Miner Res* 2:99-107
 47. Nemere I, Norman AW: Steroid hormone actions at the plasma membrane (1991) induced calcium uptake and exocytotic events. *Mol Cell Endocrinol* 80:C165-9
 48. Nemere I (1996) Apparent nonnuclear regulation of intestinal phosphate transport: effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D3, 24,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 137:2254-61
 49. Nemere I (2005) The 1,25-D3-MARRAS protein: contribution to steroid stimulated calcium uptake in chicks and rats. *Steroids* 70:455-7
 50. Okano T, Tsugawa N, Morishita A, Kato S (2004) Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:335-8
 51. Pike JW, Haussler MR (1983) Association of 1,25-dihydroxy vitamin D3 receptors with cultured 3T6 mouse fibroblasts. Cellular uptake and receptor mediated migration to the nucleus. *J Biol Chem* 358: 8554-60
 52. Pillai S, Bikle DD (1991) Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes: differences in the mode of action of extracellular calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Physiol* 146:94-100

53. Popadic S, Ramic Z, Medenica L, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V, Popadic D (2008) Antiproliferative effect of vitamin A and D analogues on adult human keratinocytes in vitro. *Skin Pharmacol Physiol* 21:227-34
54. Postlind H, Axén E, Bergman T, Wikvall K (1997) Cloning, structure, and expression of a cDNA encoding vitamin D3 25-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 241:491-7
55. Reichel H, Norman AW (1989) Systemic effects of vitamin D. *Annu Rev Med* 40:71-8
56. Ross TK, Darwish HM, DeLuca HF (1994) Molecular biology of vitamin D action. *Vitam Horm* 49:281-326
57. Russell J, Bar A, Sherwood LM, Hurwitz S (1993) Interaction between calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the regulation of preproparathyroid hormone and vitamin D receptor messenger ribonucleic acid in avian parathyroids. *Endocrinology* 132:2639-2644
58. Schaubert J, Büchau AS, Gallo RL (2008) 1,25-dihydroxy vitamin D3 regulates cutaneous innate immune function. *Exp Dermatol* 17:629-30
59. Schaubert J, Gallo RL (2008) The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp Dermatol* 17:633-9
60. Schuessler M, Astecker N, Herzig G, Vorisek G, Schuster I (2001) Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids* 66:399-408
61. Schwarz U, Amann K, Orth SR, Simonaviciene A, Wessels S, Ritz E (1998) Effect of 1,25 (OH)₂ vitamin D3 on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats. *Kidney Int* 53:1696-705
62. Sebag M, Henderson J, Rhim J, Kremer R (1992) Relative resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in a keratinocyte model of tumor progression. *J Biol Chem* 267:12162-12167
63. Sher E, Eisman JA, Meseley JM, Martin TJ (1981) Whole-cell uptake and nuclear localization of 1,25-dihydroxycholecalciferol by breast cancer cells (T47 D) in culture. *Biochem J* 200:315-20
64. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF (1979) Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 206:1188-90
65. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ (1991) The Sp 1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 11:168-73
66. Thiboutot D, Harris G, Iles V, Cimis G, Gilliland K, Hagari S (1995) Activity of the type 1 5 alpha-reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol* 105:209-14
67. Thiboutot D, Martin P, Volikos L, Gilliland K (1998) Oxidative activity of the type 2 isozyme of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) predominates in human sebaceous glands. *J Invest Dermatol* 111:390-5
68. Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G (2003) Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol* 120:905-14

69. Thiele JJ, Weber SU, Packer L (1999) Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol* 113:1006-10
70. Walters MR, Hunziker W, Norman AW (1982) Factors affecting the stability and distribution of unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. *J Rec Res* 2:331-46
71. Walters SN, Reinhardt TA, Dominick MA, Horst RL, Littledike ET (1986) Intracellular location of unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors: A nuclear-cytoplasmatic equilibrium. *Arch Biochem Biophys* 246: 366-73
72. Walters MR, Kollenkirchen U, Fox J (1992) What is vitamin D deficiency? *Proc Soc Exp Biol Med* 199:385-93
73. Weinstein RS, Underwood JL, Hutson MS, DeLuca HF (1984) Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus *Am J Physiol* 246:E499-505
74. Wikvall K (1984) Hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a cytochrom P450 from rabbit liver mitochondria catalysing 26-hydroxylation of C27-steroids. *J Biol Chem* 259:3800-3804
75. Wrobel A, Seltmann H, Fimmel S, Muller-Decker K, Tsukada M, Bogdanoff B, Mandt N, Blume-Peytavi U, Orfanos CE, Zouboulis CC (2003) Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol* 120:175-81
76. Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ (1996) Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol* 271:F203-8
77. Xia LQ, Zouboulis C, Detmar M, Mayer-da-Silva A, Stadler R, Orfanos CE (1989) Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland-derived cells as an in vitro model; *J Invest Dermatol* 93:315-21
78. Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E (1984) Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 74:507-13
79. Zhao B, Nemere I (2002) 1,25(OH)₂D₃-mediated phosphate uptake in isolated chick intestinal cells: effect of 24,25(OH)₂D₃, signal transduction activators, and age. *J Cell Biochem* 86:497-508
80. Zheng ZM, Specter SC, Lancz G (1995) Bovine serum albumin preparations enhance in vitro production of tumor necrosis factor alpha by murine macrophages. *Immunol Invest* 24:737-56
81. Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF (1994) Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:900-2
82. Zouboulis CC, Xia L, Akamatsu H, Seltmann H, Fritsch M, Hornemann S, Ruhl R, Chen W, Nau H, Orfanos CE (1998) The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne. *Dermatology* 196:21-31
83. Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 113:1011-20
84. Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N, Chen W, Young M, Oeff M, Scherbaum WA, Orfanos CE, McCann SM, Bornstein SR (2002) Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7148-5

8 Publikationen und Danksagung

8.1 Publikationen

Investigation of the vitamin D endocrine system in human sebocytes in vitro

Author(s): Reichrath, J; Kramer, C; Seltmann, H, et al.

Source: EXPERIMENTAL DERMATOLOGY Volume: 17 Pages: 284-284 Published: 2008

The vitamin D endocrine system of human sebocytes

Author(s): Reichrath, J; Schuler, CH; Seifert, M, et al.

Conference Information: 5th Meeting of the Endocrine-Dermatology-Group of the Arbeitsgemeinschaft-Dermatologische-Forschung, Date: MAR 22, 2006 Univ Hop Aachen Aachen GERMANY

Source: EXPERIMENTAL DERMATOLOGY Volume: 15 Issue: 8 Pages: 643-643 Published: 2006

geplante Publikation:

Characterization of the vitamin D endocrine system in human sebocytes in vitro.

Authors: Christina Krämer; Holger Seltmann; Markus Seifert; Wolfgang Tilgen; Christos Zouboulis; Jörg Reichrath

Source: The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

Ref: SBMB-D-07-00035R1

8.2 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg Reichrath für die Bereitstellung des Themas, für die Unterstützung und Motivation während der Durchführung der Arbeit und besonders für die stets angenehme und nette Zusammenarbeit.

Herrn Markus Seifert möchte ich für die Betreuung und die Förderung selbständigen wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens sowie für zahlreiche Anregungen und Ratschläge danken.

Besonders danke ich Frau Heike Palm und Frau Anett Weinhold für die kompetente Einarbeitung in die Arbeiten im Labor und die Anleitung und Hilfe zur Durchführung der Versuche. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Christos C. Zouboulis aus dem Institut für Dermatologie der freien Universität von Berlin möchte ich für die freundliche Bereitstellung der humanen Sebozyten-Zelllinie SZ95 danken.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 1,24,25(OH) ₃ D ₃ | 1,24,25-Trihydroxy-Vitamin D ₃ |
| 1,25(OH) ₂ D ₃ | 1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃ |
| 1,25-D ₃ -MARRS-Rezeptor | 1,25-D ₃ Membrane Associated Rapid Response Steroid Binding Receptor |
| 24,25(OH) ₂ D ₃ | 24,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃ |
| 25(OH)D ₃ | 25-Hydroxy-Vitamin D ₃ |
| 5α-DHT | 5α-Dihydrotestosteron |
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| AMP | Antimikrobielles Peptid |
| ANF | Atrialer Natriuretischer Faktor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CG-Gehalt | Cytosin-Guanosin-Gehalt der DNA |
| CoA | Co-Aktivator |
| CoR | Co-Repressor |
| CYP24A1 | Cytochrom P450-24A1; 25-Hydroxy-Vitamin D ₃ -24-Hydroxylase |
| CYP27A1 | Cytochrom P450-27A1; Vitamin D ₃ -25-Hydroxylase |
| CYP27B1 | Cytochrom P450-27B1; 25-Hydroxy-Vitamin D ₃ -1α-Hydroxylase |
| DBD | DNA bindende Domäne |
| DBP | Vitamin D ₃ bindende Proteine |
| EB1089 | ein aktives Vitamin D ₃ -Analogon |
| EGF | Epithelial Growth Factor |
| EGFR | Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| HDAC | Histonacetylase |
| I. E. | Internationale Einheit |
| KH1060 | aktives Vitamin D ₃ -Analogon |
| LBD | Ligand bindende Domäne |
| M | mol/l (mol / Liter) |
| MC903 | aktives Vitamin D ₃ -Analogon |
| mRNA | Messenger Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure) |
| MSH | Monozyten stimulierendes Hormon |
| NADPH | Nicotinamidadeninukleotidphosphat |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten-Reaktion) |
| PMCA | Plasmamembran Kalziumpumpe |
| PTH | Parathormon |
| RXR | Retinoid-X-Rezeptor |
| SZ95 | humane Sebozytenzelllinie, entwickelt von Prof. Christos C. Zouboulis |
| TGF-α | Transforming Growth Factor |
| TRP | Transient Receptor Potential – Kanäle |
| TSH | Thyroidea stimulierendes Hormon |
| VDR | Vitamin D ₃ -Rezeptor |
| VDRE | Vitamin D ₃ responsive Element |
| VDR-RXT | Vitamin D ₃ -Rezeptor-Retinoid-X-Rezeptor-Komplex |

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Strukturformeln für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und EB1089
- Abb. 2 Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- Abb. 3 Vitamin D – Rezeptor (VDR)
- Abb. 4 Belegung der 96-well Platte für den Kristallviolett Assay
- Abb. 5 Spaltung von WST-1 zu Formazan (MD = Mitochondriale Dehydrogenasen, R = elektronenübertragendes Reagenz)
- Abb. 6 Belegung der 96-well Platte für den WST-1 Assay
- Abb. 7 Phasen des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle
- Abb. 8 DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphasen als Vielfaches des haploiden DNA-Gehaltes (n)
- Abb. 9 Zellzyklusphasen, wie sie sich bei der Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie darstellen
- Abb. 10 Proliferationskurven von SZ95 bei verschiedenen Zellzahlen pro Well einer 96-well-Platte
- Abb. 11 Wachstum von nicht behandelten und mit Ethanol behandelten Zellen im Kristallviolett-Assay
- Abb. 12 Wachstum von nicht behandelten und mit Ethanol behandelten Zellen im WST-1-Assay
- Abb. 13 Wachstum von SZ95 bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium
- Abb. 14 Wachstum von Mewo bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium
- Abb. 15 Wachstum von SZ95 bei verschiedenen BSA-Konzentrationen im Medium
- Abb. 16 Wirkung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei verschiedenen BSA-Konzentrationen
- Abb. 17 Lightcycler; Expression des VDR
- Abb. 18 Lightcycler; Expression der CYP27B1
- Abb. 19 Lightcycler; Expression der CYP24A1
- Abb. 20 Kristallviolett-Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 1)
- Abb. 21 Kristallviolett-Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 2)
- Abb. 22 Kristallviolett-Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 3)
- Abb. 23 Kristallviolett Assay; mittlere Wachstumshemmung von SZ95 durch verschiedene aktive Vitamin-D₃-Metabolite in unterschiedlichen Konzentrationen, Vergleich mit der Ethanolkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine Signifikante Wachstumshemmung ist mit * gekennzeichnet ($p = 0,05$)
- Abb. 24 WST-1 Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 1)
- Abb. 25 WST-1 Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 2)
- Abb. 26 WST-1 Assay; Wachstum von SZ95 unter Behandlung mit aktiven Vitamin-D₃-Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen (Versuch 3)
- Abb. 27 WST-1-Assay; mittlere Wachstumshemmung von SZ95 durch verschiedene aktive Vitamin-D₃-Metabolite in unterschiedlichen Konzentrationen, Vergleich mit der Ethanolkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

| | |
|---------|--|
| | Eine Signifikante Wachstumshemmung ist mit * gekennzeichnet ($p = 0,05$) |
| Abb. 28 | FACS, Anteile von SZ95-Sebozyten an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlungen mit aktiven Vitamin-D ₃ -Metaboliten (Versuch 1) |
| Abb. 29 | FACS, Anteile von SZ95-Sebozyten an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlungen mit aktiven Vitamin-D ₃ -Metaboliten (Versuch 2) |
| Abb. 30 | FACS; Differenz des Anteils der G1-Phase behandelter SZ95 Sebozyten im Vergleich zur Ethanolkontrolle |
| Abb. 31 | FACS; Irrtumswahrscheinlichkeiten der Zellzyklusbestimmung von behandelten SZ95-Populationen. Ist das Signifikanzniveau von 0,05 erreicht oder unterschritten, ist der entsprechende Wert unterlegt. |
| Abb. 32 | FACS, Anteile von Mewo an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlungen mit 1,25(OH) ₂ D ₃ |
| Abb. 33 | FACS; Differenz des Anteils der G1-Phase behandelter Mewo im Vergleich zur Ethanolkontrolle |

9.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| Tabelle 1 | Substanzen, die die Enzyme CYP27B1 (25-Hydroxy-Vitamin-D ₃ -1 α -Hydroxylase) und CYP24A1 (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D ₃ -24-Hydroxylase) in der Niere fördern (+) und hemmen (-) |
| Tabelle 2 | Substanzen, die die Enzyme CYP27B1 (25-Hydroxy-Vitamin-D ₃ -1 α -Hydroxylase) und CYP24A1 (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D ₃ -24-Hydroxylase) in extrarenalen Geweben fördern (+) und hemmen (-) |
| Tabelle 3 | CV-Assay; Signifikanzwerte (SPSS, Mann-Whitney-U-Test) des Vergleichs der einzelnen Behandlungen zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der jeweiligen Ethanolkontrolle |
| Tabelle 4 | WST-1-Assay; Signifikanzwerte (SPSS, Mann-Whitney-U-Test) des Vergleichs der einzelnen Behandlungen zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der jeweiligen Ethanolkontrolle |

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christina Krämer, geb. Schuler
Anschrift: Grübchenstraße 49
66839 Schmelz
Telefon 06887 304878
Geburtsdatum: 11.09.1978
Geburtsort: Illingen
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn (17.11.2006)

Schulische Ausbildung:

1985 – 1989 Grundschule Merchweiler
1989 – 1998 Illtalgymnasium Illingen
Abschluss Abitur

Studium:

1998 – 1999 Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i.
Br.
ohne Abschluss
1999 - 2007 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes

Beruflicher Werdegang:

ab 2008 Assistenzärztin in der Abteilung Anästhesie und Intensivtherapie des
Städtischen Klinikums Neunkirchen / Saar