

1. Einleitung

1.1. Vitamin D₃

Die aktive Form von Vitamin D₃ spielt eine große Rolle bei der Regulation des Calcium- und Phosphat-Haushaltes, bei der Knochenbildung, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Apoptose und der Immunsuppression. Die Produktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) wird reguliert über einen Rückkopplungsmechanismus von 1,25-(OH)₂D₃ selbst, dem Parathyroidhormon (PTH), Calcium und Zytokinen wie Interferon (IFN) und Tumornekrosefaktor (TNF). PTH stimuliert die renale 1-Hydroxylase (Bikle et al., 1986a). Lange Zeit wurde angenommen, daß nur die Niere in der Lage ist 25-Hydroxyvitamin D₃ in die aktive Form 1,25-(OH)₂D₃ zu verwandeln. Studien an Zellen und nephrektomierten Patienten zeigten, daß die Haut ein alternativer Synthesort für 1,25-(OH)₂D₃ ist. Die Synthese in der Haut gewinnt besonders dann an Bedeutung, wenn die Niere nicht mehr in der Lage ist, die Serumkonzentration aufrechtzuerhalten. Weiterhin dient die 1,25-(OH)₂D₃-Synthese den lokalen Anforderungen der epidermalen Funktionen wie Differenzierung und Keratinsynthese (Bikle et al., 1986a). Die 1,25-(OH)₂D₃-Synthese durch Keratinozyten verändert sich mit dem Differenzierungsgrad dieser Zellen (Lehmann, 1997). Sie wird weiterhin reguliert über die Verfügbarkeit des Substrates 25-Hydroxyvitamin D₃. Auch in Keratinozyten ist als das Schlüsselenzym der Regulation der 1,25-(OH)₂D₃-Synthese, die 1-Hydroxylase nachweisbar, die eine kurze Halbwertszeit besitzt. Exogen zugegebenes 25-Hydroxyvitamin D₃ wird metabolisiert zu 1,25-(OH)₂D₃ und anderen hydroxylierten Vitamin D₃-Metaboliten wie 24,25-Dihydroxyvitamin D₃, 1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃, wobei die bekannte aktivste Form von Vitamin D₃ 1,25-(OH)₂D₃ ist (Okuda et al., 1995). Unter normalen physiologischen Umständen inhibiert die freie Serumkonzentration von 1,25-(OH)₂D₃ in erster Linie die Produktion von 1,25-(OH)₂D₃ durch epidermale Zellen. Das gleiche gilt für den Katabolismus, der durch 1,25-(OH)₂D₃ zuerst in epidermalen Zellen stimuliert wird. Einige weitere Studien weisen darauf hin, daß neben Keratinozyten auch andere Zellen und Gewebe wie humane Osteozyten (in Kultur), Melanomzellen und Plazenta in der Lage sind, 1,25-(OH)₂D₃ zu synthetisieren (Bikle et al., 1986b).

1.1.1. Vitamin D₃-Metabolismus

Die Vorläufersubstanz für die aktive Form des Vitamin D₃, Cholecalciferol, wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder aus 7-Dehydrocholesterol (Provitamin D₃) (siehe Abb.1) synthetisiert. In der Haut, dessen Provitamin D₃-Speicher zu 50 % in der Epidermis und zu 50 % in der Dermis liegt (Holick et al., 1987), wird dieses Provitamin D₃ durch ultraviolettes Licht zu Prävitamin D₃ umgewandelt, indem die Bindung zwischen C9 und C10 des B-Ringes

photolytisch gespalten wird. Da die Epidermis das meiste Sonnenlicht absorbiert, entstehen mehr als 80 % des Prävitamin D₃ in der Epidermis. Die Haut wird nach dem 20. Lebensjahr zunehmend dünner, so daß die Prävitamin D₃-Produktion in der Haut von älteren Menschen (77-82 Jahren) um den Faktor 2-3 geringer ist, d.h. unter anderem, daß sie länger im Sonnenlicht sein müssen, um ausreichende Menge zu synthetisieren (Holick et al., 1987).

Prävitamin D₃ isomerisiert weiterhin spontan zu Vitamin D₃. Bei längerer Sonnenbestrahlung wird Prävitamin D₃ ebenfalls über UV-Licht in die inaktiven Produkte Lumisterol und Tachysterol konvertiert. Dadurch wird verhindert, daß Prävitamin D₃ eine toxische Konzentration erreicht. Die Konversion zu Lumisterol ist reversibel, so daß bei kurzer Sonnenbestrahlung die akkumulierte Menge an Lumisterol wieder zu Prävitamin D₃ umgewandelt wird (Bikle und Pillai, 1993). Über die Blutbahn gelangt Vitamin D₃ in die Leber und in die Niere. Vitamin D₃ kann aber weiterhin Licht absorbieren und zu 5,6-Transcholecalciferol, Suprasterol 1 und Suprasterol 2 isomerisieren (Holick et al., 1987). In der Leber fügt die Cholecalciferol-25-Hydroxylase eine Hydroxylgruppe an die C25-Position des Vitamin D₃. Eine weitere Hydroxylierung an der C1-Position über die 25-Hydroxycholecalciferol-1-Hydroxylase in der Niere führt zur Entstehung des aktiven Hormons 1,25-(OH)₂D₃. Der Syntheseweg für Vitamin D₃ ist in Abbildung 2 dargestellt. In der Blutbahn ist 1,25-(OH)₂D₃ an ein Bindungsprotein, einem in der Leber produzierten -Globulin, gebunden. 1,25-(OH)₂D₃ ist lipophil, so daß es über Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle und weiter in den Zellkern gelangt und dort mit hoher Affinität an seinen Rezeptor (VDR) bindet. VDR gehört zu der Familie der ligandengesteuerten Transkriptionsfaktoren. Nach Aktivierung moduliert VDR die Transkription solcher Genabschnitte, die ein dem Rezeptor zugeordnetes DNA-Element tragen, die sogenannten *hormone response elements* (HRE).

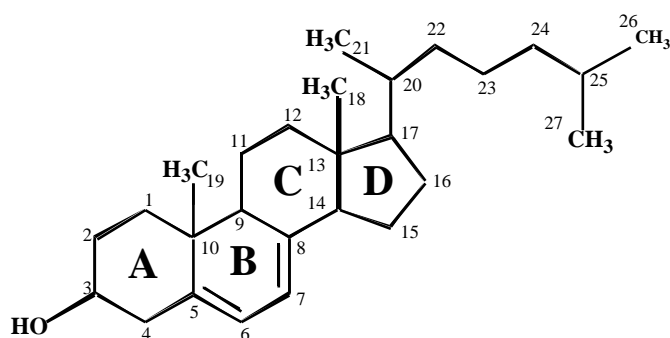


Abb.1. Struktur von 7-Dehydrocholesterol mit der Bezeichnung der Kohlenstoffatome.

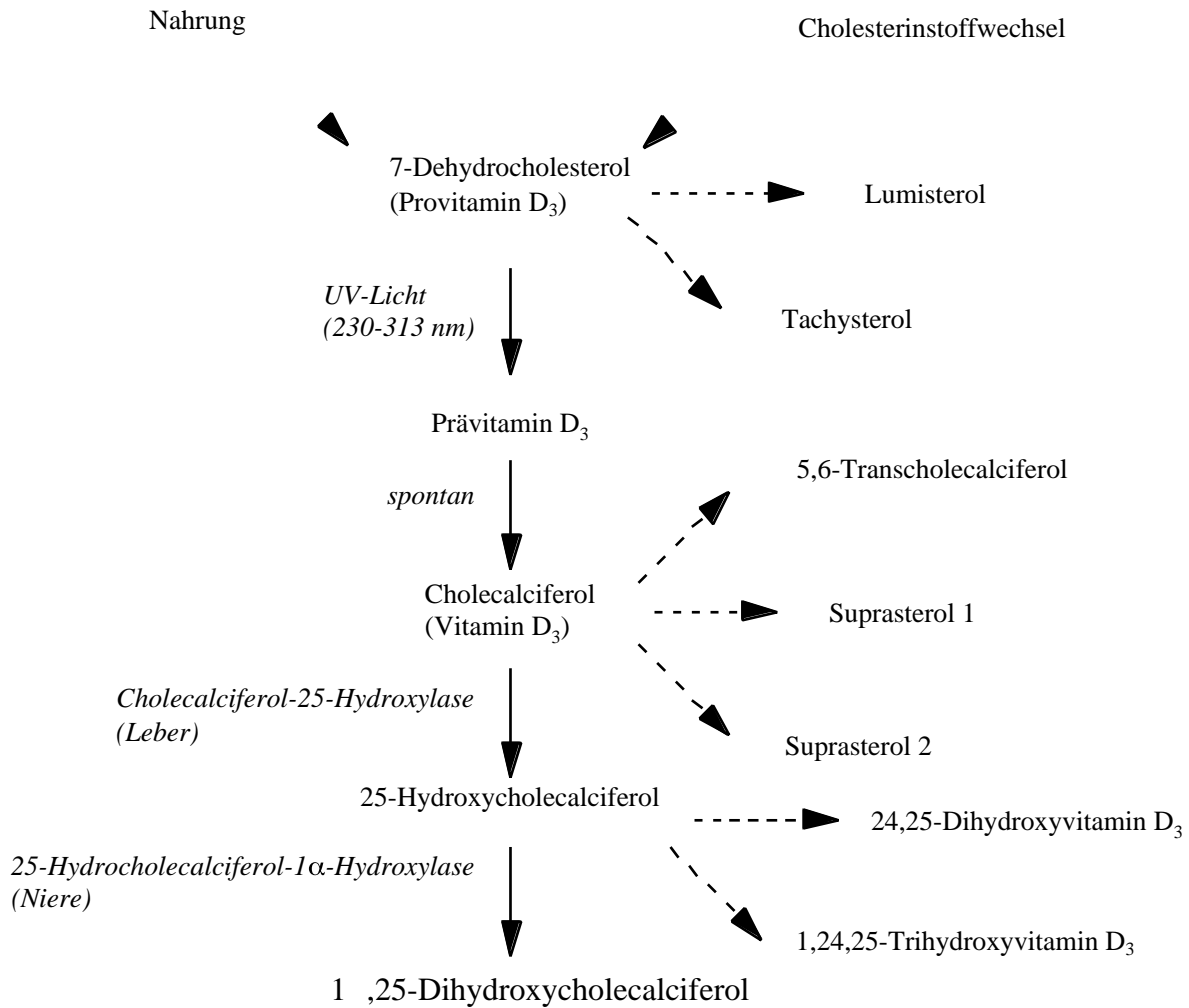


Abb.2. Biosynthese von $1\alpha,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Die gestrichelten Linien weisen auf die möglichen Nebenprodukte hin (siehe Text).

1.1.2. Nukleäre Rezeptoren

Die nukleären Rezeptoren werden grob in zwei Klassen geteilt (Mangelsdorf et al., 1995). Die eine Klasse beinhaltet die zuerst beschriebenen klassischen nukleären Rezeptoren für die Steroid-Hormone Östrogen, Progesteron, Glucocorticoide, Mineralcorticoide und Androgene (Krauss, 1997). Die andere enthält die Rezeptoren des Thyroidhormons 3,5,3'-Triiodthyronin (T_3R), all-trans-Retinsäure (RAR) und $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VDR) (Carlberg und Polly, 1998). Später wurden weitere Rezeptoren mit Hilfe von Screening-Verfahren, bei denen Gensonden bereits bekannter Rezeptoren verwendet wurden, gefunden. Da zur Zeit ihrer Entdeckung, und bei einigen auch heute noch, deren Funktion und die zugehörigen Liganden bzw. Hormone nicht bekannt waren bzw. sind, nennt man sie „Waisen-Rezeptoren“ (*orphan receptors*) (Krauss, 1997). Zu dieser Klasse gehörte ursprünglich auch der Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (RXR). Die Mehrheit dieser nukleären Rezeptoren liegen als Dimere vor. Bei den Waisen-Rezeptoren sind auch Monomere bekannt. Die Primärstrukturen der nukleären Rezeptoren

zeigen deutliche Homologiebereiche, was von ihrer ähnlichen Funktionsweise herrührt. Man unterscheidet folgende Domänen (siehe Abb. 3):



Abb.3. Primärstruktur der nukleären Rezeptoren.

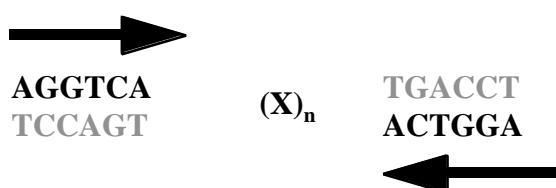
A. DNA-Bindungsdomäne, die hochkonserviert ist, B. Ligandenbindungs- und Dimerisierungsdomäne, C. N-terminale variable Region, D. C-terminale variable Region, E. nukleäres Lokalisationssignal.

Die Domänen, die die Transaktivierung und die Protein-Protein-Wechselwirkung bewirken, befinden sich in den variablen Regionen. Die DNA-Bindungsdomäne enthält zwei Zinkfinger-Motive (Zn_2Cys_4), die die Erkennungshelix in die große Grube der DNA positionieren.

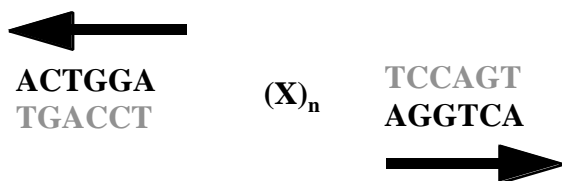
1.1.2.1. Die DNA-Erkennungssequenz der nukleären Rezeptoren

Die HREs der zugehörigen Rezeptoren der Hormone Triiodthyronin, Vitamin D_3 , all-trans-Retinsäure und 9-cis-Retinsäure zeigen einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen häufig aus zwei Kopien einer Hexamersequenz, die auch DNA-Halbseiten genannt werden (Mangelsdorf und Evans, 1995). Das klassische Modell, das die Anordnung der Hexamersequenzen zueinander beschreibt, wurde 1991 von Umesono und Mitarbeitern aufgestellt und die „3-4-5-Regel“ genannt. Demnach binden Klasse II nukleäre Rezeptoren bevorzugt an direkt angeordnete DNA-Halbseiten (*direct repeat*, siehe unten c)), die im Fall von VDR durch drei Nukleotide, bei T_3R durch vier und durch fünf Nukleotide bei RAR getrennt werden. Ein Schwachpunkt dieses Modells ist die nicht ausreichende Erklärung der vielfältigen Wirkungsweise der nukleären Rezeptoren. Auch wurden später weitere DNA-Erkennungssequenzen gefunden, die dieser Regel nicht unterlagen. Das von Carlberg aufgestellte Modell ist dynamischer und läßt verschiedene DNA-Protein-Komplexe zu. Die DNA-Erkennungssequenzen werden nach dem letzteren Modell über ihre Sequenz (als Beispiel wurde AGGTCA gewählt), Polarität („Pfeilrichtung“, siehe unten) und den Abstand (X_n) der Hexameren charakterisiert. Es werden drei verschiedene Polaritätsanordnungen unterschieden (Carlberg, 1995):

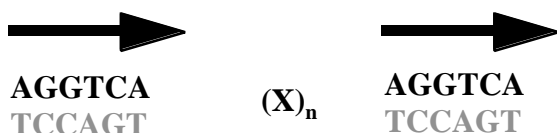
a) „Inverted Repeat“ (IR)



b) „Everted Repeat“ (ER)



c) „Direct Repeat“ (DR)



Die Rezeptoren binden sich an die HREs meistens als Dimere, vor allem als Heterodimere. Ein Heterodimer-Partner ist häufig RXR, der meistens an die 5'-gelegenen Halbseite der DNA-Erkennungssequenz bindet und somit den anderen Partner an die 3'-Halbseite dirigiert. In einigen Dimer-Konstellationen kann RXR durch 9-cis-Retinsäure aktiviert werden (z.B. mit T₃R, RAR) und in anderen ist es nur ein „stiller“ Partner und somit seinem Liganden nicht zugänglich (Mangelsdorf und Evans, 1995). In einigen Fällen müssen beide Liganden an das Dimer binden, um es voll zu aktivieren. Die Art der Dimerbildung hängt von vielen Faktoren ab, unter anderem von dem Abstand zwischen den beiden Erkennungssequenzen und von der Konzentration der verschiedenen Rezeptoren in dem betreffenden Zelltyp. Für die Vitamin D₃ *response elements* (VDRE) existieren mehrere Konstellationen, die man in komplexe und einfache VDREs einteilt. Komplexe VDREs bestehen aus mehreren Erkennungssequenzen, die manchmal mit den Erkennungssequenzen anderer Transkriptionsfaktoren überlappen. Es gibt viele Gene, die VDREs enthalten und somit potentiell von 1,25-(OH)₂D₃ moduliert werden könnten. Sie sind in Tabelle 1 mit den zugehörigen HREs-Typen aufgelistet (Carlberg, 1995).

Tabelle 1. Liste der Gene, die VDREs enthalten.

Gen	Spezies	Typ	Referenz
Osteocalcin	Ratte	DR3	(Demay et al., 1990)
Osteocalcin	Mensch	DR3/DR6	(Morrison et al., 1989)
Atrial natriuretic factor	Ratte	DR3	(Kahlen und Carlberg, 1994)
Osteopontin	Maus	DR3	(Noda et al., 1990)
Osteopontin	Schwein	DR3	(Zhang et al., 1992)
Calbindin D _{9k}	Ratte	DR3	(Darwish und DeLuca, 1992)
Calbindin D _{28k}	Maus	DR4	(Gill und Christakos, 1993)

5'-Lipoxygenase	Mensch	DR3	(C. C. persönliche Mitteilung)
Parathyroid Hormone	Mensch	DR3	(Demay et al., 1992)
24-Hydroxylase	Ratte	DR3	(Zierold et al., 1994)
24-Hydroxylase	Ratte	DR6	(Kahlen und Carlberg, 1994)
24-Hydroxylase	Ratte	DR3/DR3	(C. C., persönliche Mitteilung)
24-Hydroxylase	Mensch	IP9/DR3/DR3	(C. C., persönliche Mitteilung)
Carboanhydrase II	Huhn	DR3	(Quélo et al., 1994)
Pit-1	Maus	DR3	(Rhodes et al., 1993)
α 3-Integrin	Huhn	DR3	(Cao et al., 1993)
Osteocalcin	Mensch	DR6	(Kerner et al., 1989)
Fibronectin	Maus	DR6	(Polly et al., 1996)
Fibronectin	Mensch	DR6	(C. C., persönliche Mitteilung)
Calbindin D9K	Mensch	IP9	(Schräder et al., 1995)
Osteocalcin	Ratte	IP9	(Schräder et al., 1995)
c-fos	Maus	IP9/DR7/DR7	(Schräder et al., 1997)
Parathyroid hormone-related peptide	Ratte	DR3	(Falzon, 1996)
p21 ^{WAF1CIP1} (Cdk-Inhibitor)	Mensch (U937)	DR3	(Liu et al., 1996)
p21 ^{WAF1CIP1}	Mensch	IP9	(C. C., persönliche Mitteilung)
p21 ^{WAF1CIP1}	Maus	IP9	(C.C., persönliche Mitteilung)
Bone Sialoprotein	Ratte	DR3	(C. C., persönliche Mitteilung)
Tumor Nekrose Faktor	Mensch	IP12/DR7	(C. C., persönliche Mitteilung)

Durch die unterschiedliche Polaritätsanordnungen, Abstand zwischen der Hexamersequenz und die Anordnung der Heterodimere zueinander sind verschiedene Protein-DNA-Komplexe möglich, was wiederum die vielfältige Wirkung von $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ erklären könnte. Da in den verschiedenen Protein-DNA-Komplexen der VDR eine geringfügig variierende Konformation einnehmen kann, werden VD und seine Analoga unterschiedlich erkannt, worauf die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Analoga zurückzuführen sind. Einige Vitamin D_3 Analoga aktivieren selektiv nur bestimmte VDRE-Typen. Die Wirkung der Analoga ist weiterhin vor allem von ihrer metabolischen Stabilität und der Bindungsaffinität zum Vitamin D-Bindungsprotein im Serum abhängig. Je niedriger ihre Affinität, desto schneller wird es ausgeschieden (Carlberg, 1995).

1.1.3. Wirkung von Vitamin D_3 auf die Haut

Es ist schon lange bekannt, daß $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ effektiv die Proliferation von Keratinozyten hemmt und gleichzeitig deren Differenzierung anregt (Smith et al., 1986).

Die Epidermis besteht aus vier Schichten (Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum), die sowohl $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ in unterschiedlichen Mengen synthetisieren als auch differenziert darauf reagieren. Die beiden proliferativen unteren Schichten, Stratum basale und spinosum, besitzen die höchste Konzentration an 7-Dehydrocholesterol und produzieren bei Sonnenbestrahlung das meiste Prävitamin D_3 . Diese Schichten sind der Dermis am nächsten und können bei Bedarf Vitamin D_3 auf einer kürzeren Strecke an das Blut abgeben. Die basalen Keratinozyten sind die primären Ziele von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ in der Epidermis. Intrazellulär produziertes $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ trägt unter normalen Bedingungen kaum zur zirkulierenden Konzentration an $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bei (Bikle und Pillai, 1993). Es ist vielmehr wichtig für die Wirkung auf lokaler Ebene und verantwortlich für die Modulation von Proliferation und Differenzierung von den Keratinozyten selbst. Die intrazelluläre Biosynthese verändert sich innerhalb der Epidermisschichten, d. h. also mit dem Differenzierungsgrad. In proliferierenden Zellen ist die Produktion gering, die in den frühen Stufen der Differenzierung zu- und bei terminaler Differenzierung wieder abnimmt. Die Expression des VDR verhält sich dazu proportional, worüber die Ansprechbarkeit der Zellen auf $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ reguliert wird (Solvsten et al., 1997). Bis heute wurden in den Genen von Keratinozyten, die wichtig für die Differenzierung sind, keine VDREs gefunden, obwohl die Regulation dieser Gene durch $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ nachgewiesen worden ist (siehe Tabelle 2). Es ist bekannt, daß $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die Genexpression von dem Rezeptor für EGF (*epidermal growth factor*) supprimiert und von TGF (*transforming growth factor*), Inhibitor des Plasminogenaktivators, Involucrin und Transglutaminase aktiviert und die *cornified envelope*-Bildung steigert (Bikle und Pillai, 1993). $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ unterdrückt weiterhin seine eigene Synthese über die Hemmung der 1-Hydroxylase und erhöht über die Stimulation von der 24-Hydroxylase seinen Abbau (Wu et al., 1996). Es wirkt somit seiner Akkumulation in den Zellen entgegen. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ wirkt oft synergistisch mit exogen zugegebenem Calcium. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und exogenes Calcium entfalten ihre Wirkung durch Veränderung der freien intrazellulären Calciumkonzentration (Su et al., 1994). Bei der $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -vermittelten Signaltransduktion wird zwischen einer genomischen und einer nicht-genomischen Antwort unterschieden. Das Letztere macht sich bemerkbar durch einen schnellen intrazellulären Calciumanstieg innerhalb von Sekunden bis Minuten.

Ein neuartiger Signalweg in Keratinozyten ist die Induktion der Sphingomyelin-Hydrolyse durch $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und seinem Analogon Calcipotriol (Geilen et al., 1996). Sowohl in primären Keratinozyten als auch in der immortalisierten humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT konnte durch Behandlung der Zellen mit $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und Calcipotriol eine Abnahme des Sphingomyelin-Gehaltes bei gleichzeitigem Ceramidanstieg gemessen werden. Der Sphingomyelin-Zyklus spielt höchstwahrscheinlich nicht nur bei der Modulierung des Zellwachstums eine Rolle, sondern auch bei der Zelldifferenzierung. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ wirkt dabei indirekt über die Expression eines Mediators. Wir konnten zeigen, daß dieser Mediator TNF ist. Durch die Blockierung des TNF-Proteins bleibt der Effekt auf die Sphingomyelin-Hydrolyse aus (Geilen et al., 1997).

Tabelle 2. Beispiele für $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -regulierte Genexpression in Keratinozyten (Wu et al., 1996).

Reguliertes Gen	Aktivierung (↑), Suppression (↓)
c-myc	↓
c-fos	↓
p53	↑
HLA-DR	↓
IL-1 , IL-1 , IL-6, IL-8	↓
parathormon-like peptide	↓
TGF-	↑
TNF	↑
NGF	↑
VDR	↑
Involucrin	↑
Transglutaminase	↑

1.1.4. Regulationsmechanismen der Keratinozytendifferenzierung durch $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3

Es ist bekannt, daß ein Teil der Funktion von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bei der epidermalen Differenzierung darin besteht, die Calcium-Antwort der Keratinozyten zu regulieren. Ein sehr früher Effekt von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ist die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, die innerhalb von Sekunden abläuft. Zusätzlich konnte eine erhöhte Diacylglycerin (DAG)-Konzentration beobachtet werden, die in Zusammenhang mit der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) gebracht werden konnte. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bewirkt die Translokation der PKC vom Zytosol zur Membran, was einer Aktivierung entspricht. Bei Hemmung der PKC wird die Genexpression der Calcium-abhängigen Transglutaminase blockiert und die Differenzierung der Keratinozyten bleibt aus (Dlugosz und Yuspa, 1994; Yada et al., 1993). Der initiale Anstieg von intrazellulärem Calcium wird wahrscheinlich durch die schnelle Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat verursacht (MacLaughlin et al., 1990). Denn parallel zum Calciumanstieg, ist ebenfalls ein Anstieg von IP_3 (Inositoltrisphosphat) und DAG zu messen. Auf der anderen Seite kann die aktivierte PKC, deren Genexpression durch $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ stimuliert wird, wiederum VDR hochregulieren. Sphingosin, ein mitogenes Sphingolipid, wirkt dem entgegen (van de Kerkhof, 1995). Bei niedriger extrazellulärer Calcium-Konzentration kann die Differenzierung durch $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ausbleiben. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß in der Epidermis ein Calciumgradient existiert, wobei die höchste Konzentration in der äußersten Schicht ist. Es konnte gezeigt werden, daß $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die mRNA für den Calcium-Rezeptor erhöht (Bikle, 1997). Viele Prozesse, die

während der Differenzierung ablaufen, sind nachweisbar Calcium-abhängig. Die membrangebundene Transglutaminase Typ I, die für die Bildung des *cornified envelopes* zuständig ist, ist strikt Calcium-abhängig (Pillai et al., 1990; Su et al., 1994). In der Endphase der Differenzierung vernetzt sie kovalent Proteine wie Loricrin, Keratine und Involucrin unterhalb der Plasmamembran miteinander; die dabei gebildeten ϵ -(-Glutamyl)-Lysin-Isopeptidbindungen sind resistent gegenüber reduzierenden Agenzien und Detergenzien wie β -Mercaptoethanol und SDS. In den Genen von Keratin 1 und Involucrin, die ebenfalls von Calcium reguliert werden, konnten sog. Calcium-responsive Bereiche identifiziert werden (Bikle et al., 1997). Ein weiterer Calcium-abhängiger Prozeß ist die Bildung von Filaggrin aus Profilaggrin, welches ebenfalls charakteristisch für die terminale Differenzierung ist. $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ verstärkt die Effekte, die von Calcium vermittelt werden. Umgekehrt gilt das gleiche, d.h. daß sowohl Calcium als auch $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ wichtig für die epidermale Differenzierung sind und größtenteils synergistisch wirken.

1.1.5. Regulationsmechanismen der Keratinozytenproliferation durch $1,25$ -Dihydroxyvitamin D $_3$

In normalen humanen Keratinozyten inhibiert $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ die Zellproliferation. Es inhibiert die Transkription des *c-myc*-Gens und des Gens für den EGF-Rezeptor und erhöht die Expression von TGF- β (Bikle, 1997). Der Effekt auf *c-myc* ist bereits nach ca. 3 h zu detektieren und auf den EGF-Rezeptor nach längeren Zeitintervallen. Es ist anzumerken, daß der EGF-Rezeptor von TGF- β moduliert werden kann (Matsumoto et al., 1990). In Keratinozyten konnte gezeigt werden, daß sowohl $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ als auch Calcipotriol die Phosphorylierung des Tumorsuppressors Rb (Retinoblastom) verhindert (Kobayashi et al., 1995), was wiederum die Expression von Genen beeinflusst, die für die DNA-Synthese wichtig sind. Dephosphoryliertes Rb stoppt den Zellzyklus in der G1/G0-Phase. Dieser Effekt von $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ auf Rb-Phosphorylierung wird von TGF- β vermittelt. *C-myc* ist eines der Gene, die von Rb beeinflusst werden und dessen Genprodukt mit Zellproliferation in Verbindung gebracht wird. Es ist wichtig für den Übergang der Zelle in die S-Phase. EGF verstärkt den antiproliferativen Effekt von $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ ohne dabei Einfluß auf die mRNA von VDR zu haben. Die Hypothese hierfür ist, daß VDR an einem Tyrosinrest phosphoryliert und daß diese Reaktion von einer EGF-spezifischen Proteintyrosinkinase katalysiert wird (Brown und DeLuca, 1990). Die Phosphorylierung erhöht wahrscheinlich entweder die Stabilität des Rezeptors oder sie verstärkt die Aktivierung des VDRs (Chen et al., 1995). Daß VDR phosphoryliert werden kann, konnte *in vitro* von der Arbeitsgruppe um Brown bereits gezeigt werden (Brown und DeLuca, 1990).

Unter bestimmten Kulturbedingungen kann $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ aber auch die Proliferation von normalen humanen Keratinozyten auslösen. Gniadecki zeigte, daß wenn konfluente Zellen, die sich in Medium mit hoher Calciumkonzentration befinden, mit niedrigen $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ -

Konzentrationen (10 pM-1 nM) behandelt werden, diese proliferieren (Gniadecki, 1996). Er konnte weiterhin zeigen, daß dies mit der Aktivierung des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Weges einhergeht. Demnach stimuliert $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ eine Tyrosinkinase, die die Bildung eines Shc/Grb2/mSos-Komplexes ermöglicht und zur Aktivierung der Raf-Kinase führt. Die Raf-Kinase aktiviert MEK und diese dann wiederum die MAPK, was schließlich zur DNA-Synthese führt. Die Aktivierung der MAPK ist dabei unabhängig von der Proteinsynthese und Transkription, weil deren Blockierung diesen Prozeß nicht beeinflusst.

1.2. Apoptose

Der Vorgang der Apoptose ist ein Prozeß, bei dem einzelne Zellen selektiv ohne Auswirkung auf ihre Umgebung entfernt werden. Dabei durchlaufen sie charakteristische morphologische und auch biochemische Veränderungen, die klar abgrenzbar sind zur Nekrose. Während der Nekrose, die immer pathologisch ist, kommt es zu einer veränderten Membranpermeabilität. Infolgedessen schwellen die Zelle und die Organellen an und platzen, so daß der Zellinhalt in den Interzellularraum geschüttet wird, was Entzündungserscheinungen auslöst. Während der Apoptose kommt es zur Chromatinkondensation entlang der nukleären Membran. Die Zellmembran, aber auch die Membran der Organellen, bleiben während des ganzen Prozesses intakt. Die DNA wird im Gegensatz zur Nekrose spezifisch internukleosomal geschnitten. Letztendlich löst sich die Zelle in membranumhüllte Fragmente (*apoptotic bodies*) auf, die von Makrophagen und den umgebenden Zellen phagozytiert werden (Binder und Wörmann, 1996). Das Wort Apoptose, vom griechischen „herabfallen“ (herbstlicher Laubabwurf) (Binder und Wörmann, 1996), wird in der Literatur oft synonym mit dem Begriff „programmierter Zelltod“ gebraucht (PCD=*Programmed cell death*). PCD ist eine Form der Apoptose, der in der Embryonalentwicklung zu einem genetisch festgelegten Zeitpunkt auftritt und zwar ohne äußere Einflüsse (Gerschenson und Rotello, 1992). Sie tritt auch in Erscheinung, wenn pathologische oder „alte“ Zellen entfernt werden sollen. Die Bezeichnung PCD wird für jede Form des Zelltodes, der ein genetisches Programm durchläuft, benutzt, unabhängig vom Auslösersignal. Apoptose ist der ablaufende Prozeß an sich, der jederzeit durch externe Stimuli eingeleitet werden kann und bezieht sich in erster Linie auf die Morphologie der untergehenden Zelle (Jacobson et al., 1997). Die Natur der Stimuli ist dabei Zelltyp-abhängig. In der vorliegenden Arbeit werde ich ebenfalls keine Unterscheidung zwischen den beiden Begriffen machen, sondern sie synonym verwenden.

Aufmerksam auf diese Form des Zelltodes wurden Kerr und Mitarbeiter 1972 (Kerr et al., 1972), als sie die charakteristische Morphologie der „sterbenden“ Zelle unter dem Mikroskop beobachteten. Erst später wurde das Ausmaß dieser Form des Zelltodes deutlich, als man sie in Verbindung zu verschiedenen Krankheiten bringen konnte (Carson und Ribeiro, 1993). Heutzutage macht man sich die Erkenntnisse auf diesem Gebiet zunutze, um Therapieformen für

Krankheiten zu entwickeln, bei denen die Regulation des Zelltodes außer Kontrolle geraten ist. Obwohl gegenwärtig sehr viele Arbeiten zum Thema Apoptose veröffentlicht werden, stellen sie im weitesten Sinne Fragmente dar, die noch zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden müssen. Jedoch kann man ein theoretisches Gerüst aufstellen, das für den apoptotischen Prozeß in vielen Zellen Allgemeingültigkeit besitzt, auf das in diesem Kapitel eingegangen wird.

Die ersten Hinweise zum Ablauf der Apoptose wurden aus Studien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* erhalten. Während seiner Entwicklung sterben von 1090 somatischen Zellen eine genau definierte Anzahl von Zellen, nämlich 131 Zellen, was darauf hindeutet, daß der Zelltod gut kontrolliert werden muß (Hale et al., 1996). In diesem Zusammenhang wurden drei Gene entdeckt, die entscheidend sind für den geregelten Ablauf des programmierten Zelltodes in dieser Wurmart. Hierzu zählen die Gene *ced* (*cell death gene*)-3, *ced-4* und *ced-9*. *Ced-3* und *ced-4* wirken pro- und *ced-9* antiapoptotisch (Fesus, 1993). Screening-Verfahren führten zu der Entdeckung von humanen homologen Genen, die im menschlichen Organismus ebenfalls eine wichtige Rolle in der Apoptose spielen. Die zunächst entdeckten ICE (*Interleukin 1 β -converting enzyme*)-ähnlichen Proteasen (Yuan et al., 1993; Alnemri, 1997) wurden später einfachheitshalber umbenannt in Caspasen (Alnemri et al., 1996). Auch die Bcl-2-Familie wurde, obwohl bereits im Zusammenhang mit folliculären Lymphomen bekannt, auf diesem Weg dem apoptotischen Prozeß zugeordnet. Schematisch kann die Apoptose eingeteilt werden in die Initiationsphase, Effektorphase und die Exekutionsphase (Kroemer et al., 1997). In jeder dieser Phasen werden ganz bestimmte Proteine aktiviert bzw. deaktiviert. Wird ein bestimmter Punkt der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle überschritten, ist die Apoptose nicht mehr rückgängig zu machen. Dieser liegt, obwohl bis zu einem gewissen Grad zelltypisch, meistens in der Effektorphase. Innerhalb der unterschiedlichen Zellen ist die Initiationsphase, auch *private pathway* genannt, die variabelste Phase, gefolgt von der Effektorphase. Die Exekutionsphase läuft am Zelltyp-unabhängigsten ab. Im folgenden werden die wichtigsten Gene und Proteine besprochen, die in dem apoptotischen Prozeß eine Rolle spielen.

1.2.1. Todesrezeptoren

Ein relativ gut beschriebener Signalweg ist der, der über das Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor I/Fas-System eingeleitet wird (Nagata, 1997). Fas und TNF-Rezeptor I werden auch Todesrezeptoren genannt, weil sie einen direkten Zugang zur Apoptose-Maschinerie haben (Ashkenazi und Dixit, 1998). Diese Rezeptoren gehören mit einigen weiteren Rezeptoren (auf die hier nicht eingegangen wird) zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie, die über ihre Cysteinreiche extrazelluläre Domäne und die homologe zytoplasmatischen Domäne, die auch „Todesdomäne“ (*death domain*) genannt wird, definiert werden (Fraser und Evan, 1996). Sie heißt deswegen Todesdomäne, weil ihre Deletion zum Verlust der Induktion der Apoptose

führt. Die oben genannten Rezeptoren werden nach Aktivierung durch ihre homotrimeren Liganden TNF bzw. Fas Liganden oligomerisiert.

1.2.1.1. TNF α -RI-System

An dem oligomerisierten Rezeptor können auf der zytoplasmatischen Seite verschiedene Proteine binden, die dann den sogenannten *death inducing signalling complex* (DISC) bilden. Unmittelbar an die zytoplasmatische Todesdomäne des Rezeptors bindet sich das Adapterprotein TRADD (*TNF receptor associated protein with death domain*) ebenfalls über seine Todesdomäne. Als nächstes assoziiert FADD (*Fas associated protein with death domain*), oder aber auch RAIDD (*RIP-associated ICH-1/ced-3 homologous protein with death domain*) an TRADD, die dann die Caspase-2 aktiviert und so letztendlich zur Apoptose führt (Villa et al., 1997; Wallach, 1997). Höchstwahrscheinlich spalten und stimulieren die aktivierten Caspasen die zytosolische Phospholipase A₂, die verantwortlich für die Umsetzung des apoptotischen Signals ist; der Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Wissing et al., 1997). Je nach Zellsystem kann sich auch TRAF 2 (*TNF receptor associated factor*) an TRADD binden. In diesem Fall führt der Weg über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor B*) und AP-1 (*activator protein*) zur Expression von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Genen, die der Apoptose entgegenwirken. In diesem Fall können Proteinsynthese-Blocker die Apoptose einleiten. Ein alternativer Signalweg führt über FAN (*factor associated with neutral sphingomyelinase*) zur Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase), die Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin spaltet. Das entstandene Ceramid führt in dem Fall zur Entzündungsreaktion. Das über die saure Sphingomyelinase (A-SMase)-Aktivität entstandene Ceramid hingegen leitet die Apoptose ein. Die unterschiedlichen Signalwege über TNF-RI, wie sie sich zur Zeit darstellen, sind in Abb. 4 dargestellt. Eine endgültige Bestätigung steht noch aus.

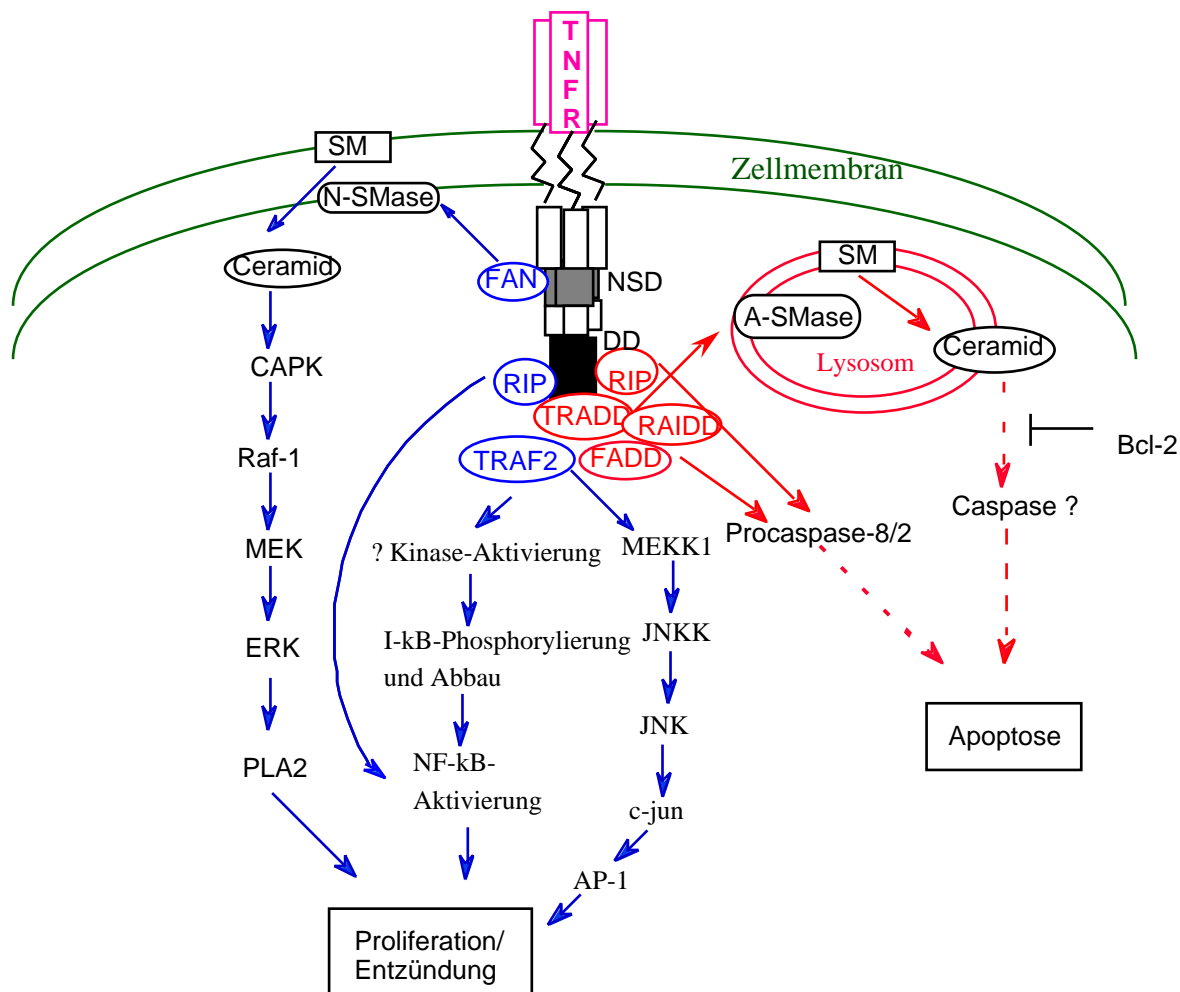


Abb.4. Die möglichen Signaltransduktionswege, die über den 55 kDa TNF-Rezeptor vermittelt werden können.

Die Sphingomyelinase-Isoformen werden über unterschiedliche TNF-R-Domänen aktiviert, was zu divergierenden biologischen Antworten führt. Die gestrichelten Linien weisen daraufhin, daß der genaue Ablauf unbekannt ist.

1.2.1.2. Fas-System

Die Aktivierung von Fas (Apo-1/CD95) führt fast immer effektiv zur Apoptose (Green und Ware, 1997). Das System ist wichtig für die (i) Deletion von aktivierten T-Zellen nach einer Immunantwort, (ii) Eliminierung von virusinfizierten Zellen und Krebszellen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen und (iii) Tötung von inflammatorischen Zellen an immunprivilegiertem Gewebe wie beispielsweise im Auge (Ashkenazi und Dixit, 1998). Auch hier erfolgt nach Oligomerisierung die Bildung von DISC im Zytoplasma (Medema et al., 1997). An den sog. *death effector domain* (DED) des FADD wird meistens die Procaspase-8 rekrutiert, die über ihre DED an FADD assoziiert. Caspase-8 initiiert im weiteren Verlauf die Caspasenkaskade, was zur Apoptose führt. Das Signal kann auf unterschiedlichen Wegen weitergeleitet werden, die in der Abb. 5 gezeigt wird. Lange Zeit wurde angenommen, daß auch

in der Fas-vermittelten Apoptose Ceramid ein wichtiger Mediator ist (Cifone et al., 1993). Die Beweise verdichten sich zunehmend, daß das entstehende Ceramid eher ein Nebenprodukt darstellt, als daß es in dem Signalweg ein wichtiger *Second Messenger* ist (Nagata, 1997; Hsu et al., 1998; Sillence und Allen, 1997).

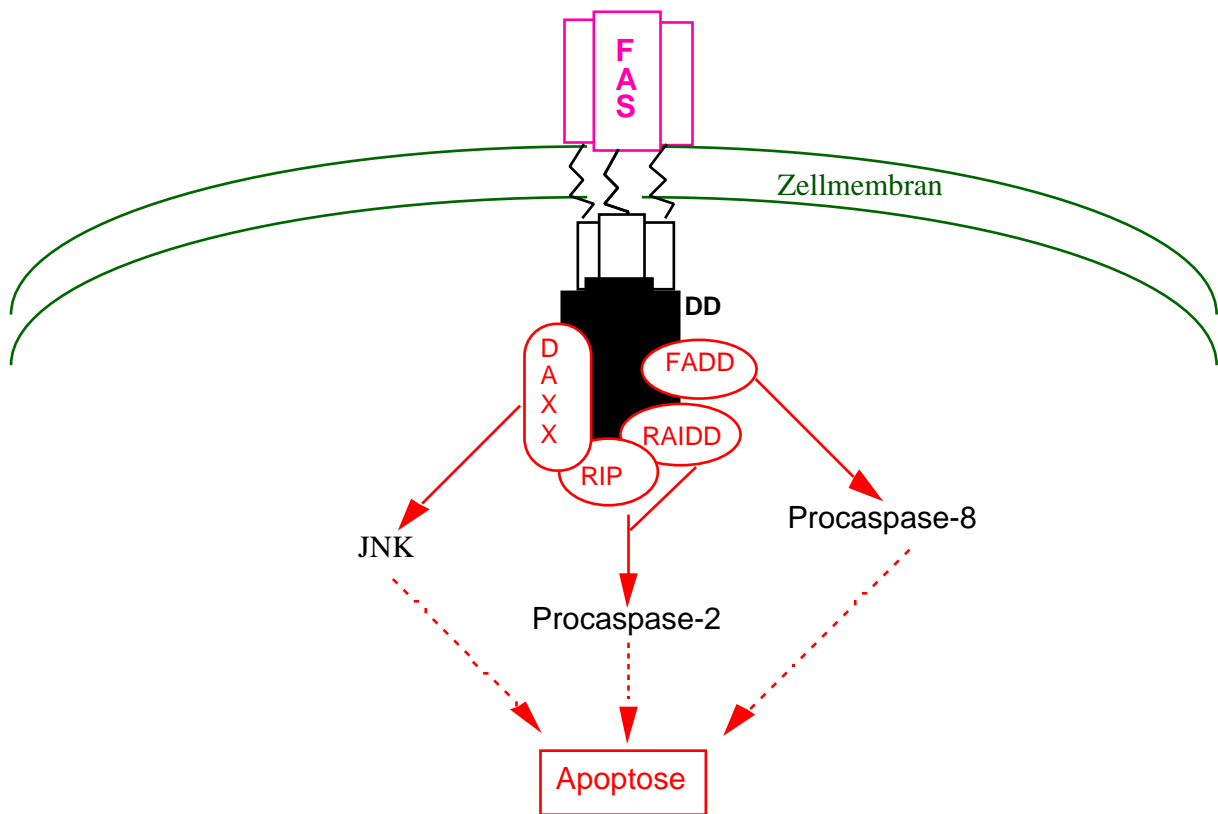


Abb.5. Fas-vermittelter Signalweg.

Die gestrichelten Linien weisen daraufhin, daß der genaue Ablauf unbekannt ist.

1.2.3. Bcl-2-Familie

Das bcl-2-Gen wurde als Onkogen 1985 durch genetische Analysen der chromosomalen Translokation, die charakteristisch für humane folliculäre Lymphome ist, entdeckt und ein Jahr später kloniert (Cleary et al., 1986). Das Besondere an diesem Onkogen ist, daß seine Fehlregulation nicht zu einem gesteigerten Zellwachstum führt, sondern es unterdrückt den Zelltod und fördert somit das Überleben der Zelle (Yang und Korsmeyer, 1996). Innerhalb der Zelle ist Bcl-2 an der zytosolischen Seite der äußeren mitochondrialen Membran, am endoplasmatischen Retikulum und an der Kernmembran lokalisiert. Wahrscheinlich ist es für die Membranintegrität durch Modulation des Ein- und Austritts von kleinen Molekülen und Proteinen verantwortlich (Yang und Korsmeyer, 1996). Später wurden viele Gene bzw. Proteine gefunden, die große Ähnlichkeiten zu Bcl-2 zeigen. Man faßte sie als Bcl-2-Familie

zusammen. Zur Zeit gibt es mindestens 15 Mitglieder, die in humanen Zellen identifiziert wurden und mehrere virale. Sie sind in Tabelle 3 aufgelistet (Adams und Cory, 1998). Die strukturelle Gemeinsamkeit besteht darin, daß alle Mitglieder mindestens eine der vier konservierten Motive, die unter dem Namen Bcl-2 Homologie-Domäne (BH1, BH2, BH3 und BH4) bekannt sind, besitzen. Im Zusammenhang mit der Apoptose werden die Proteine in zwei Untergruppen eingeteilt. Eine Gruppe fördert die Apoptose, wobei die andere dieser entgegenwirkt. Allgemein kann man sagen, daß die anti-apoptotisch wirkenden Proteine mindestens die BH1 und BH2 Domäne besitzen. Die BH3 Domäne ist unerlässlich für die Funktion der pro-apoptotischen Proteine. Die Proteine gehen bevorzugt Dimere ein, deren Bildung über die Domänen BH1-BH3 geschieht (Kroemer, 1997). Es können sowohl Homo- als auch Heterodimere untereinander gebildet werden, wobei die Gewichtung auf dem Letzteren liegt und die Art der Dimerbildung über ihre letztendliche Funktion entscheidet. Ein favorisiertes Modell, das die Funktion der Heterodimeren voraussagt, ist das Gleichgewichts-(Rheostat)-Modell (Yang und Korsmeyer, 1996). Hierbei ist das Verhältnis von Apoptose-Promotoren und Inhibitoren in einer Zelllinie entscheidend für die Art der Umsetzung des an die Zelle kommenden Signals. Liegen in der gegebenen Zelle zum Beispiel mehr Bcl-2-Proteine (anti-apoptotisch) als Bax-Proteine (pro-apoptotisch) vor, so werden Heterodimere zwischen Bcl-2 und Bax gebildet und der Zelltod wird unterdrückt. Umgekehrt, wenn mehr Bax vorhanden ist, werden Bax Homodimere gebildet, die die Zelle empfänglich machen für apoptotische Stimuli (Gajewski und Thompson, 1996). Ein weiteres Modell besagt, daß Bcl-2/Bcl-x_L Heterodimere Apoptose inhibieren, weil sie die Assoziation von Apaf-1 mit Procaspase-9 oder Procaspase-3, Cytochrom c und ATP verhindern und so die Aktivierung der jeweiligen Procaspase blockieren (Zou et al., 1997). Verschiedene Studien haben gezeigt, daß in Gegenwart von Bcl-2 kein Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt wird (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997). Dieses Modell wurde aufgestellt, nachdem kürzlich die dreidimensionale Struktur von Bcl-x_L aufgeklärt wurde (Minn et al., 1997). Die Struktur besitzt große Ähnlichkeit zu bakteriellen Toxinen wie Diphtherietoxin und Colicine, die bekanntermaßen Poren in Membrane formen können. Tatsächlich konnte in *in vitro* Experimenten die Fähigkeit von Bcl-2, Bcl-x_L und Bax Poren in artifiziiellen Lipid-Doppelschichten zu bilden, gezeigt werden (Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997). Es wird oft beschrieben, daß es während der Apoptose zum Abfall der mitochondrialen Membranspannung kommt und daß dadurch die äußere Mitochondrienmembran porös und durchlässig für Proteine wird (Kroemer et al., 1997; Petit et al., 1996). Darausfolgernd kann man sagen, daß Bcl-2 wahrscheinlich als eine Art Kanal/Pore den Ein- und Ausstrom von Ionen oder kleinen Molekülen so reguliert, daß die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran erhalten bleibt und Cytochrom c nicht austreten kann (Yang et al., 1997). Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Proteine der Bcl-2-Familie ist die posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung, die für Bcl-2 und Bad bekannt ist, aber nur für Bad gut beschrieben ist (Gajewski und Thompson, 1996).

Bcl-2 kann die Zelle vor dem Zelltod schützen, der durch unterschiedliche Stimuli wie TNF , ROS (*reaktive oxygen species*), -/UV-Strahlung, Hitzeschock, p53, c-myc, Calcium und Chemotherapeutika induziert wird. Die Frage bleibt zu beantworten, was der gemeinsame Nenner dieser unterschiedlichen Signale ist. Für viele der aufgezählten Stimuli ist bekannt, daß sie den Sphingomyelin-Zyklus aktivieren. In einigen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, daß der über Ceramid-vermittelte Zelltod durch Bcl-2 blockiert wird (Zhang et al., 1996; Wieder et al., 1997). Die Bildung bzw. Akkumulation von Ceramid wird dabei nicht verhindert, d.h. Bcl-2 fungiert in der Signalkaskade unterhalb von Ceramid.

Tabelle 3. Bcl-2 Familie

Pro-apoptotisch	Anti-apoptotisch
Bax	Bcl-2
Bik	Bcl-x _L
Bak	Bcl-w
Bad	Mcl-1
Bcl-X _S	BHRF (Ebstein-Barr-Virus Genprodukt)
Bid	E1B-19kDa (Adenovirus Protein)
Ced-3 (<i>C. elegans</i>)	A1
Bok	ASFV-5HL (viral)
Bim _L	NR13 (Huhn)
Blk	LMW5-HL (viral)
BNIP3	ORF16 (viral)
Hrk	Ced-9 (<i>C. elegans</i>)

1.2.4. Caspasen

Caspasen sind hauptsächlich in der Exekutionsphase aktiv. Sie sind auch unter dem Namen ICE-ähnliche Proteasen bekannt (Miller et al., 1997). Sie sind Cystein-Proteasen, da sie einen Cystein-Rest in ihrem aktiven Zentrum enthalten, und schneiden spezifisch hinter einem Aspartat-Rest. Daher leitet sich der Name Caspase von „C“- für Cystein-Protease, „-asp“, da sie nach einem Aspartat-Rest spalten, und „-ase“ weist auf ihre Enzymfunktion hin (Alnemri et al., 1996). Mittlerweile gibt es mindestens 13 verschiedene Mitglieder, die durchnummeriert werden, je nach dem Zeitpunkt ihrer Erstbeschreibung. Entdeckt wurden diese Proteasen aufgrund von Homologiestudien zu ced-3, der Protease, die in *C. elegans* eine wichtige Rolle spielt. Die erste Protease, die entdeckt wurde, ist das Interleukin 1 -konvertierende Enzym, die Prointerleukin 1 in seine aktive Form spaltet. Deswegen wird es Caspase-1 genannt (Thornberry und Lazebnik, 1998). Sie spielt jedoch bei der Apoptose nur eine untergeordnete Rolle.

Alle Caspasen haben eine große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität (Cohen, 1997; Salvesen und Dixit, 1997; Villa et al., 1997). Sie werden als Proenzyme (30 bis 50 kDa) gebildet, die die Domänen NH₂-terminale Domäne, kleine (10 kDa)

und große (20 kDa) Untereinheit besitzen. Während ihrer Aktivierung wird die Prodomäne entfernt und zwischen der kleinen und großen Untereinheit geschnitten (Nicholson und Thornberry, 1997). Diese lagern sich dann aneinander und bilden ein Heterodimer, wobei darauffolgend zwei Heterodimere ein Tetramer formen. Man unterscheidet zwischen Initiator- und Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen sind in der Lage sich selbst zu spalten. Procaspase-8, die insbesondere im Fas-System aktiviert wird, besitzt eine niedrige Protease-Aktivität. Nach Oligomerisierung von Fas werden mehrere Procaspase-8 Moleküle rekrutiert, so daß lokal eine hohe Konzentration entsteht, die ausreicht, damit die Procaspasen sich gegenseitig spalten können. Dieses Modell wird durch die Beobachtung bestätigt, daß die Überexpression von Procaspase-8 ausreicht, um die Zelle in die Apoptose zu treiben (Hengartner, 1998). Eine weitere Initiatorcaspase ist die Caspase-9. Die autokatalytisch aktivierten Caspasen spalten im weiteren Verlauf des apoptotischen Prozesses die Effektorcaspasen in ihre aktive Form. Die wichtigsten Effektorcaspasen sind die Caspasen 3, 6 und 7.

1.2.4.1. Substrate der Caspasen

Im Verlauf der Apoptose werden verschiedene Proteine gespalten, die dazu beitragen, daß die sterbende Zelle die typische apoptotische Morphologie zeigt. Das Zytoskelett wird reorganisiert, die DNA-Replikation als auch die Reparatur fällt aus, die nukleäre Struktur wird zerstört, mRNA-Splicing wird unterbrochen und die Zelle schließlich für Phagozyten markiert. Von den unzähligen Substraten werden unten nur einige wichtige erwähnt. Alle bekannten Substrate können jedoch das Auflösen der Zelle noch nicht gut erklären.

Ein wichtiges Substrat für die Caspasen ist der *Inhibitor der Caspasen-aktivierten-Desoxyribonuklease* (ICAD) (Sakahira et al., 1998), der nach seiner Spaltung durch Caspase-3 die Caspasen-aktivierte-Desoxyribonuklease (CAD) (Enari et al., 1998) freisetzt. CAD schneidet die DNA internukleosomal in 200 bp-Fragmente. Der ICAD/CAD-Komplex ist zytosolisch lokalisiert und wurde bisher aus Mauszellen isoliert. ICAD besitzt eine große Homologie zu dem humanen Protein DFF (*DNA fragmentation factor*), der aus zwei Untereinheiten besteht (45 und 40 kDa), wobei die 45 kDa-Untereinheit (Liu et al., 1997b) eine Caspase-3-spezifische Spaltsequenz besitzt und nach seiner Spaltung zur Aktivierung der Endonuklease (40 kDa-Untereinheit) führt (Wyllie, 1998). Der genaue Mechanismus ist hier noch nicht vollständig geklärt.

Bcl-2 Proteine sind ebenfalls Substrate für Caspasen. Durch Spaltung verlieren sie nicht nur ihre antiapoptotische Funktion, sondern fördern sogar die Apoptose durch ihr Spaltprodukt (Thornberry und Lazebnik, 1998). Eines der typischen Merkmale der Apoptose ist die Auflösung des Kerns und die Chromatinkondensation. Das Letztere wird durch die Spaltung von *Lamin* erreicht, das eine rigide Polymerstruktur unterhalb der nukleären Membran bildet und für die Chromatinorganisation verantwortlich ist.

Ein gut beschriebenes Substrat ist die *Poly(ADP)ribose-Polymerase* (PARP), das in DNA-Reparaturprozesse involviert ist (Cohen, 1997) und während der Apoptose von der Caspase-3 gespalten wird. Die Detektion des Spaltproduktes über Westernblot wird oft angewandt, um Apoptose nachzuweisen. Weiterhin werden mehrere Proteine gespalten, die das Zytoskelet regulieren. Dazu gehören die Proteine *Gelsolin* (reguliert die Aktinfilamente) (Kothakota et al., 1997), *focal adhesion kinase* (FAK; veranlaßt die Zelle sich von ihrer Umgebung zu lösen) und *p21-activated-kinase* (PAK2).

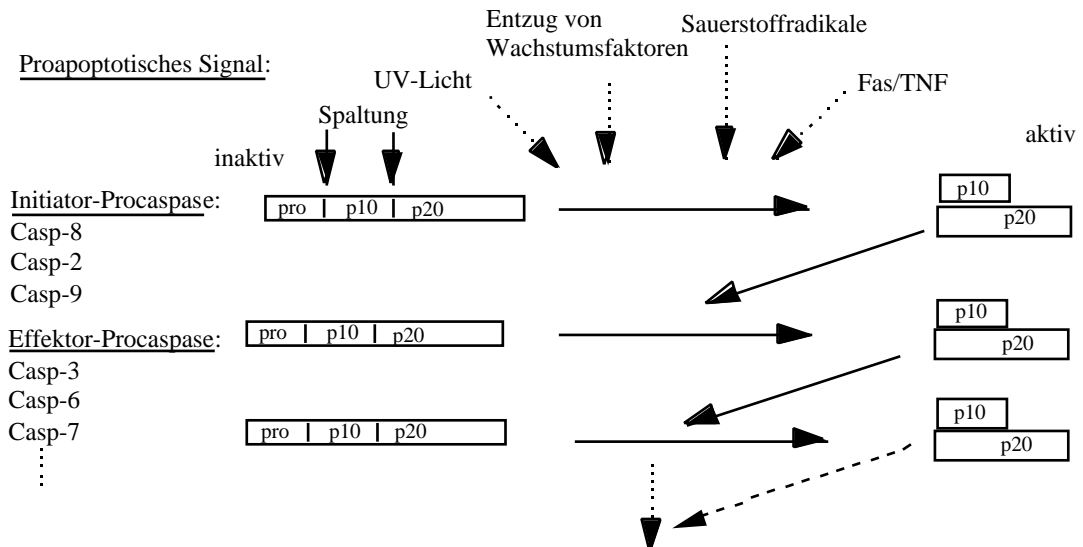
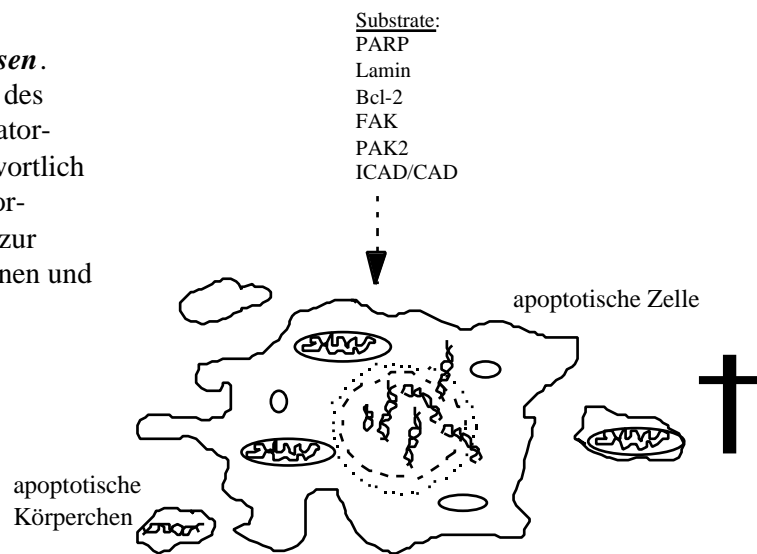


Abb.6. Aktivierung der Caspasen.

Zuerst werden nach Eintreffen des apoptotischen Signals die Initiator-Caspasen aktiviert, die verantwortlich für die Aktivierung der Effektor-Caspasen sind, die schließlich zur Spaltung von Enzymen, Proteinen und DNA führen.



1.2.5. Apoptose in Keratinozyten

Es gibt verschiedene Hautkrankheiten, wie Lichen ruber planus, systemischer Lupus erythematodes (SLE), Alopecia areata und Psoriasis vulgaris, die ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellwachstum aufweisen. In der Epidermis tritt Apoptose histopathologisch in Form von sog. *Civatte bodies*, *dark cells*, *sunburn cells* und *colloid bodies* auf (Haake und Polakowska, 1993). Die deskriptiven Begriffe wurden benutzt, bevor man diese Erscheinungen mit der Apoptose in Verbindung bringen konnte. *Civatte bodies* wurden eosinophile, basale Keratinozyten genannt, die ein geschrumpftes Aussehen haben, die charakteristisch für Lichen ruber planus sind. Sonnenbrandzellen sind meistens basale oder suprabasale Keratinozyten, die, verursacht durch UV-Licht, apoptotisch sind. *Colloid bodies*, auch *keratin bodies* genannt, sind apoptotische, von der Basalmembran umgebene Zellfragmente, die aufgrund ihrer rigiden Membranstruktur nicht phagozytiert werden konnten. Ein basaler Keratinozyt braucht normalerweise ca. vier Wochen bis es die oberste Schicht erreicht. Die letzte Keratinozytenschicht, die Hornschicht, wird durch Schuppung abgetragen, so daß ständig neue Zellen nachkommen können. Die Hornschicht besitzt keine Zellkerne mehr. Die Zellen verlieren auf ihrem Weg in die letzte Schicht, in Stratum granulosum, ihre Zellkerne. Hierbei sind die Zellen terminal ausdifferenziert. Lange Zeit konnte man sich nicht einigen, ob Keratinozyten Apoptose eingehen. Gegenwärtig wird allgemein angenommen, daß die Keratinozyten auf dem Weg der terminalen Differenzierung eine Form der Apoptose durchlaufen, was aber nicht heißt, daß für die Einleitung der Apoptose in Keratinozyten die Differenzierung eine Bedingung ist (Mitra et al., 1997). Die Keratinozyten sind also programmiert, zu einer bestimmten Zeit zu sterben. Sie sterben entweder schnell durch Apoptose oder langsam durch die terminale Differenzierung. Die Zellen besitzen nur eine geringe für die Apoptose typische Morphologie. Sie bilden viel weniger die sog. *apoptotic bodies*, höchstwahrscheinlich deswegen, weil durch die verhornte Proteinhülle (*cornified envelope*) ihre Membranstruktur starrer ist (Raskin, 1997). McCall und Cohen konnten jedoch an primären Mäusekeratinozyten zeigen, daß die ausgestoßenen Kerne bzw. die Zellen im Stratum granulosum deutliche DNA-Fragmentierungen zeigen, die in Stratum basale nicht zu detektieren sind (McCall und Cohen, 1991). Nur in den basalen Keratinozyten der normalen humanen Epidermis, die eine Art Stammzellen darstellen, wird das antiapoptotische Bcl-2 Protein exprimiert (Bianchi et al., 1994). Während der terminalen Differenzierung geht die bcl-2 Expression verloren, d.h., die Zelle wird empfänglicher für apoptotische Signale. Ein weiterer Hinweis dafür, daß die terminale Differenzierung der Keratinozyten eine Art Apoptose ist, ist die Expression und Aktivierung der Transglutaminase, die Proteine zum *cornified envelope* vernetzt. Es konnte gezeigt werden, daß allein die Überexpression dieses Enzyms die Zellen dazu veranlaßt eine apoptotische Morphologie zu zeigen [Fesus, 1993 #69].

1.2.6. Ceramidvermittelter Signalweg

Der Ceramidvermittelte Signalweg ist ein relativ junges Forschungsfeld. In der Zelle entsteht Ceramid (*N*-Acylsphingosin) entweder über die *de novo* Biosynthese, auf die später eingegangen wird, oder über die Hydrolyse des Sphingolipids Sphingomyelin. Sphingomyelin befindet sich in der eukaryotischen Zellmembran und macht ca. 2-5 % der Membranlipide aus. Daß Sphingomyelin nicht nur ein Strukturbestandteil der Membran ist, sondern in einen neuartigen Signaltransduktionsmechanismus involviert ist, wurde angenommen, als 1986 die Arbeitsgruppe von Hannun zeigte, daß Sphingolipide die Proteinkinase C (PKC) hemmen können (Hannun et al., 1986; Merrill et al., 1986). Intensive Forschung auf dem Gebiet führten zu folgendem Modell: Agonisten wie z. B. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, TNF, IFN aktivieren eine Sphingomyelinase, die in der Lage ist, Sphingomyelin an der Phosphocholinkopfgruppe zu hydrolysieren und somit Ceramid freizusetzen. Ceramid moduliert die Aktivität von spezifischen Proteasen und Phosphatasen, die schließlich die typische biologische Antwort einer Zelle bestimmen. Zu diesen gehören die Hemmung des Zellwachstums, Förderung der Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellalterung (Venable et al., 1995). Daß Ceramid in diesem Sphingomyelin-Zyklus als *Second Messenger* (Hannun, 1994; Hannun und Obeid, 1995) agiert, konnte in verschiedenen Studien mit Hilfe von Ceramidanaloga wie *N*-Acetyl- und *N*-Hexanoylsphingosin, die kurze Fettsäureketten besitzen, gut demonstriert werden. Die kurzkettigen Ceramidanaloga sind löslicher und dadurch zellpermeabel im Gegensatz zu langkettigen Ceramiden. Dieses exogen zugegebene Ceramid bewirkte vergleichbare Effekte wie das über die Agonisten-stimulierte Sphingomyelin-Hydrolyse entstandene Ceramid. Bisher wurden als direkte Angriffziele von Ceramid folgende Moleküle identifiziert:

a) Die Ceramid-aktivierte-Proteinphosphatase (CAPP), erstmalig beschrieben von der Arbeitsgruppe um Hannun (Dobrowsky und Hannun, 1992), gehört zur Familie der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A (PP2A). Sie wird spezifisch von Ceramid stimuliert. Andere Sphingolipid-Abkömmlinge bewirken keine Veränderung der Enzymaktivität (Dobrowsky et al., 1993). Die CAPP ist meistens in die biologische Antwort, die zur Hemmung des Zellwachstums und zur Apoptose führt, involviert. Die Hemmung des Zellwachstums geschieht über die Suppression des *c-myc*-Gens (Wolff et al., 1994).

b) Die Ceramid-aktivierbare Proteinkinase (CAPK) gehört zu den Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Proteinkinasen. Sie ist ein strikt membrangebundenens 97-kDa Protein (Liu et al., 1994; Joseph et al., 1993) und unterscheidet sich dadurch von den MAP-Kinasen, die eine ähnliche Konsensussequenz haben, aber zytosolisch lokalisiert sind (Davis, 1993). Kürzlich veröffentlichten Untersuchungen zufolge ist CAPK, Kinase-Suppressor von Ras (*KSR=kinase suppressor of Ras*) (Zhang et al., 1997). Gut beschrieben ist ihre Aktivierung durch TNF, IL-1, bakterielle Sphingomyelinasen und durch Ceramid-Analoga. CAPK leitet den Signalweg über TNF weiter, der zu Proliferation und Entzündung führt.

Der TNF – Rezeptor I besitzt auf der zytoplasmatischen Seite neben der DD eine Domäne (NSD=*N-SMase activating domain*), die in Zusammenhang mit der Aktivierung der N-SMase steht (Adam et al., 1996). An NSD ist das von Adam-Klages und Mitarbeitern entdeckte Protein FAN (Adam-Klages et al., 1996) assoziiert, das die N-SMase an den TNF-RI koppelt. Die Signalkaskade nach Aktivierung von TNF-RI wird wie folgt angenommen (siehe Abb.4): Über FAN wird die N-SMase stimuliert, die zur Entstehung von Ceramid führt. Ceramid aktiviert die CAPK/KSR, die wiederum Raf-1 aktiviert. Raf-1 phosphoryliert MEK-1, die ERK phosphoryliert. ERK aktiviert dann die Phospholipase A₂, die aus Phosphatidylcholin Arachidonsäure freisetzt und zu Entzündungsreaktionen führt (Zhang et al., 1997).

c) Die Phospholipase D wird durch Ceramid gehemmt (Jones und Murray, 1995). Es wird angenommen, daß PLD wichtig für den Vesikeltransport ist (Cockcroft, 1996; Nickel und Wieland, 1997). Es ist auch bekannt, daß Ceramid den Vesikeltransport unterbindet (Hannun, 1997) und möglicherweise dies unter anderem über die Hemmung der PLD geschieht. In HaCaT-Zellen wurde gezeigt, daß die Ceramid-induzierte Apoptose mit einer erniedrigten Phospholipase D-Aktivität einhergeht (Iwasaki-Bessho et al., 1998).

d) Auch die Proteinkinasen C werden von Ceramid moduliert. Proteinkinase C (zeta) wird durch Ceramid zur Autophosphorylierung stimuliert (Müller et al., 1995). Im weiteren Verlauf führt PKC zur Aktivierung von NF- B, wobei der genaue Ablauf der Reaktion noch unbekannt ist. Proteinkinase , und werden von Ceramid von der Membran zum Zytosol transloziert und dadurch inaktiviert. Diese Inaktivierung ist wichtig für die Einleitung der Apoptose durch Ceramid. Bei Hemmung dieser Translokation wird die Apoptose blockiert (Sawai et al., 1997; Chmura et al., 1996).

Weitere indirekte Zielmoleküle von Ceramid sind Retinoblastom-Genprodukt (Rb), c-myc und NF- B (Ballou et al., 1996).

1.2.6.1. Regulation des Stoffwechsels von Ceramid

Alle Sphingolipide leiten sich vom Ceramid ab. Sie unterscheiden sich durch die Substituenten an der 1-OH-Gruppe. Die ersten Schritte der Biosynthese von Sphingolipiden finden bis zur Ceramidbildung im Endoplasmatischen Retikulum statt (van Echten und Sandhoff, 1993) Die Kondensation von Palmitoyl-Coenzym A und Serin zu 3-Dehydrosphingamin, die von der Serin-Palmitoyltransferase katalysiert wird, ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion. Darauf folgend wird es durch Reduktion zu *D-erythro*-Sphingamin umgewandelt (3-Dehydrosphingamin-Reduktase). Das Enzym Sphingamin-*N*-Acyltransferase (auch Ceramid-Synthase genannt) überträgt eine langkettige Fettsäure auf die Aminogruppe, was zur Bildung von *D-erythro*-Dihydroceramid führt (Mandon et al., 1992). Eine Desaturase führt eine trans-Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 5 ein, woraus schließlich Ceramid resultiert, von dem sich dann die weiteren Sphingolipide ableiten (Rother et al., 1992). Die

Desaturase, dessen subzelluläre Lokalisation nicht bekannt ist, scheint eine entscheidende Rolle zu spielen, da Dihydroceramid im Vergleich zu Ceramid biologisch inaktiv ist (Bielawska et al., 1993). Die Ceramid-Synthase ist ein extern regulierbares Enzym. Bose und Mitarbeiter konnten zeigen, daß, wenn sie Zellen mit Daunorubicin (ein Anthrazyklin, das in der Therapie von Krebs-Erkrankungen eingesetzt wird) behandeln, die Ceramidsynthase stimuliert wird. Als Folge davon kommt es zum intrazellulären Ceramidanstieg, der zur Apoptose führt (Bose und Verheij, 1995). Alternativ dazu können durch Hemmung der Ceramid-Synthase über das Pilzgift Fumonisin B1 die Effekte von Ceramid unterbunden werden (Merrill et al., 1996). Fumonisin B1 ist ein wichtiges Hilfsmittel, um zu bestimmen, ob Ceramid in einem gegebenen Signalweg eine Rolle spielt. Weiterhin kann Ceramid über die Ceramid-Kinase zu Ceramid-1-Phosphat umgewandelt werden, welches, im Gegensatz zu Ceramid, proliferationsanregend ist (Gomez-Munoz et al., 1997).

Ceramid kann ferner durch Übertragung von Glukose oder Galaktose an die OH-Gruppe zu Cerebrosiden metabolisiert werden. Bei weiterer Übertragung von Zuckermolekülen entstehen die komplexen Ganglioside, die mindestens einen sauren Zuckeranteil, die *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) enthalten. Als Überträger von Zuckermolekülen dienen Uridindiphosphat (UDP)-aktivierte Zucker bzw. Cytidinmonophosphat (CMP)-aktivierte Sialinsäure. Die Glykosylierungsschritte finden im Golgi-Apparat statt (Futerman et al., 1990). Mittels Membranvesikel gelangen die Sphingolipide dann an die Zelloberfläche.

Ceramid wird durch die Ceramidase (*N*-Acylsphingosin-Deacylase) zu Sphingosin abgebaut, indem die Fettsäure vom Sphingosinrückgrat entfernt wird (Bernardo et al., 1995). Die Ceramidase ist ebenfalls ein regulierbares Enzym. Wird die Aktivität zum Beispiel durch PDGF (*platelet derived growth factor*) gesteigert, so nimmt die Ceramidkonzentration ab (Spiegel und Milstien, 1995). Das Gegenteil wird erreicht durch Hemmung mit *D-erythro*-Myristoylamino-phenylpropanol (D-MAPP) (Bielawska et al., 1996). Sphingosin wird über die Sphingosin-Kinase zu Sphingosin-1-Phosphat umgewandelt, was das zelluläre Gegenstück zu Ceramid bildet. Sphingosin-1-Phosphat ist ein potentes anti-apoptotisches und proliferationsförderndes Molekül (Spiegel, 1993; Cuvillier et al., 1996). Sphingosin dagegen kann abhängig vom Zelltyp proliferationsfördernd oder -hemmend sein (Pyne et al., 1997). In einer darauffolgenden Reaktion katalysiert die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase die Spaltung des Sphingosin-1-Phosphats zu Palmitaldehyd und Ethanolaminphosphat (Merrill und Jones, 1990). In der Abbildung 7 sind die wichtigsten Wege dargestellt, über die die Ceramidkonzentrationen moduliert werden können.

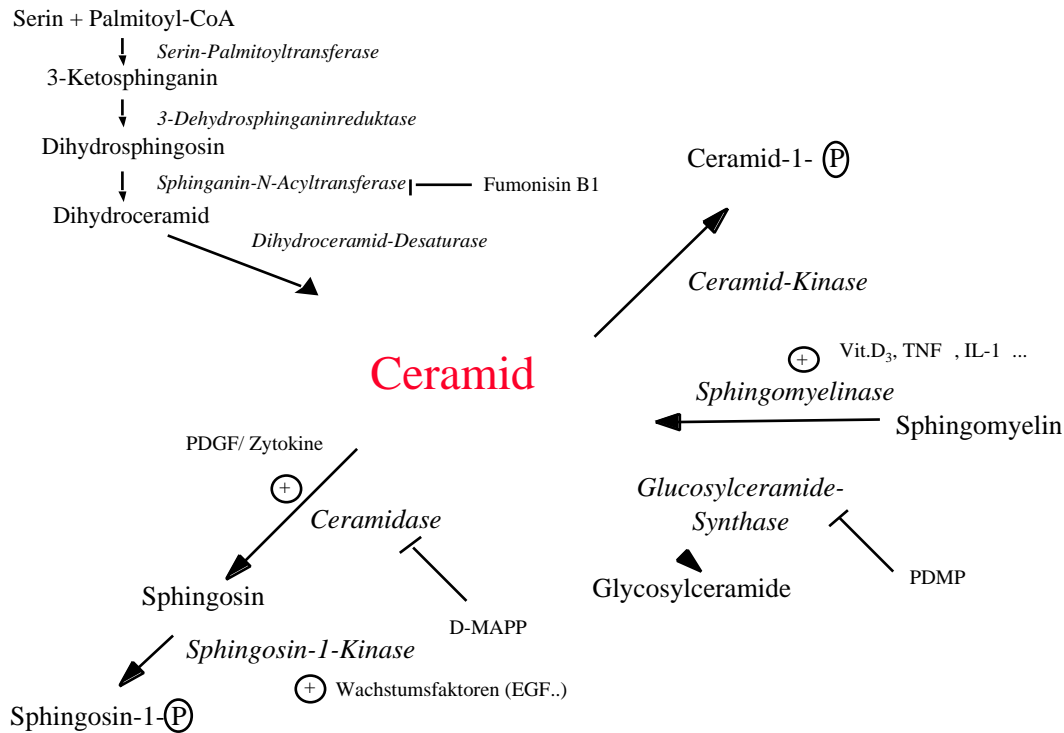


Abb.7. Signalwege, die die intrazelluläre Ceramidkonzentration über Modulation von bestimmten Enzymen beeinflussen können.

D-MAPP: D-erythro-Myristoylamino-phenylpropanol, PDMP: 1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, (P):Phosphatrest, PDGF: Platelet derived growth factor, EGF: Epidermal growth factor

1.2.6.2. Biosynthese und Abbau von Sphingomyelin

Im Golgi-Apparat findet auch die Sphingomyelin (*N*-Acyl-*D*-erythro-sphingosin-1-phosphocholin)-Synthese statt (Futerman et al., 1990). Das Vorläufermolekül ist ebenfalls das Ceramid. Man unterscheidet zwei Synthesewege, über die der Transfer des Phosphocholins auf Ceramid erfolgen kann: Die erste Möglichkeit ist die Übertragung der Phosphocholin-Gruppe vom Phosphatidylcholin durch die Phosphatidylcholin-Ceramid-Cholinphosphat-Transferase (Sphingomyelin-Synthase) auf die OH-Gruppe des Ceramids. Dabei entsteht Diacylglycerol (DAG); das heißt auch, daß das zuletztgenannte Enzym sowohl den Ceramid- als auch den DAG-Spiegel reguliert (Diringer et al., 1972). DAG spielt eine dem Ceramid vergleichbare Rolle als *Second Messenger* in dem Phosphatidylinositolbisphosphat-Signalweg (Berridge, 1993). Als zweites kann die Phosphocholin-Gruppe vom Cytidindiphosphat (CDP)-Cholin stammen. Sphingomyelin wird zum größten Teil über den ersten Syntheseweg gebildet. Nur ca. 2 % des Sphingomyelins wird über den zweiten Weg produziert (Merrill und Jones, 1990). Die Sphingomyelin-Synthese wird durch das Vorhandensein der Vorläufermoleküle Serin und Palmitinsäure und der relativen Enzymaktivitäten der Synthesewege beeinflusst.

Prinzipiell unterscheidet man den Abbau des Sphingomyelins in den Lysosomen von der agonisteninduzierten Hydrolyse des Sphingomyelins. Die saure lysosomale Sphingomyelinase entfernt die Kopfgruppe, wobei Ceramid entsteht, das, wie oben bereits beschrieben, weiter abgebaut wird.

Bei den Sphingomyelinasen (Spence, 1993; Liu et al., 1997a) unterscheidet man zwei Klassen. Die saure Sphingomyelinase (A-SMase) ist in Lysosomen lokalisiert und besitzt ein pH-Optimum von 4,5-5. Sie ist bereits kloniert und gut charakterisiert (Lansmann et al., 1996). Daneben gibt es eine saure Zink-abhängige Sphingomyelinase, die zuerst im fötalen Rinderserum entdeckt wurde (Spence et al., 1989). Die neutrale Sphingomyelinase (pH-Optimum von 7,4) existiert in zwei Isoformen. Die Mg^{2+} -abhängige ist membranständig, wobei die Kationen-unabhängige zytosolisch lokalisiert ist. Die N-SMasen scheinen aber im Gegensatz zu der sauren sehr instabil gegenüber Proteasen zu sein. Die neutrale Mg^{2+} -abhängige SMase ist kürzlich ebenfalls kloniert worden (Tomiuk et al., 1998). Ihre funktionelle Charakterisierung von der Arbeitsgruppe um Tomiuk führt zu Zweifeln über die Rolle der neutralen Sphingomyelinase im Sphingomyelin-Zyklus. Ihre Überexpression in U937-Zellen bewirkte im Vergleich zu zellpermeablen Ceramid-Analoga oder der Zugabe von bakterieller Sphingomyelinase auf Zellen keine erfaßbaren biologischen Effekte.

In einer Zelllinie werden die saure und die neutrale SMase unterschiedlichen Signalwegen zugeordnet, d.h., daß verschiedene Stimuli ihre Wirkung entweder über die saure oder die neutrale Sphingomyelinase entfalten (Wiegmann et al., 1994). Die saure Sphingomyelinase wird hauptsächlich mit der Apoptose in Verbindung gebracht. An A-SMase-defekten Zellen bzw. an *knock-out* Mäusen wurde gezeigt, daß die Apoptoserate durch u.a. UV-Strahlen, ROS (*reactive oxygen species*) und Hitzeschock vermindert ist (Santana et al., 1996).

1.2.6.3. Rolle von Ceramid in der Haut

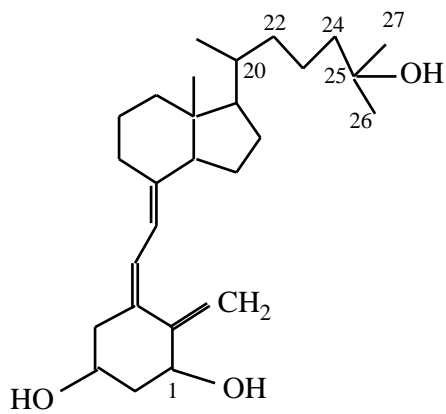
In der Epidermis kommt Ceramid in großen Mengen im Extrazellularraum vor. Natürliches Ceramid ist wasserabweisend, so daß seine Rolle in der Haut darin besteht, Feuchtigkeit zu speichern und die Permeabilitätsbarriere aufrechtzuerhalten, was wichtig für den Schutz gegenüber der Außenwelt ist. Hierfür sprechen auch die Untersuchungen von Holleran und Mitarbeitern, die zeigten, daß die Aktivität des Schlüsselenzyms der Sphingolipid-Biosynthese, die Serin-Palmitoyltransferase in der Epidermis viel höher ist als in anderen Geweben (Holleran et al., 1991a). Nach Störung der epidermalen Permeabilitätsbarriere steigt die Synthese der Sphingolipide (Holleran et al., 1991b). Ceramid ist in mehreren Schichten zwischen den Korneozyten eingelagert. Auf dem Weg der terminalen Differenzierung wird Ceramid in Massen produziert und in den *Odland bodies* nach außen geschüttet. Seit der Beschreibung des Sphingomyelin-Zyklus, in dem Ceramid ein *Second Messenger* ist, wird die Rolle des Ceramids in der Epidermis neben der Permeabilitätsbarriere auch als Signalmolekül, das Einfluß

auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge hat, in Betracht gezogen. Es wurde bereits gezeigt, daß sowohl *N*-Acetylsphingosin als auch langkettiges exogen zugegebenes Ceramid das Zellwachstum von humanen Keratinozyten hemmt (Geilen et al., 1996) und deren Differenzierung fördert (Pillai et al., 1996; Wakita et al., 1994). In höheren Konzentrationen kann es die Apoptose auslösen (Bektas et al., 1998).

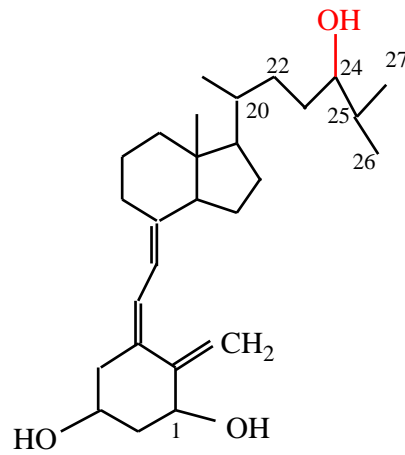
1.3. Ziel der Arbeit

In Voruntersuchungen an primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen wurde die Existenz des erst kürzlich beschriebenen Sphingomyelin-Zyklus nachgewiesen, wobei die Zellen mit $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und seinem Analogon Calcipotriol behandelt wurden (Geilen et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, daß unter der Behandlung von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die mRNA für TNF ansteigt, der dann als Mediator die Hydrolyse von Sphingomyelin autokrin über seinen Rezeptor auslöst und zum Anstieg von Ceramid führt (Geilen et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit soll der Mechanismus der eingeleiteten Sphingomyelin-Hydrolyse genauer untersucht werden. So soll der Anstieg von TNF auch auf der Proteinebene bestimmt werden. Weiterhin soll mit Hilfe von Antikörpern gegen den TNF-Rezeptor versucht werden, die Effekte von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ auf HaCaT-Zellen zu blockieren.

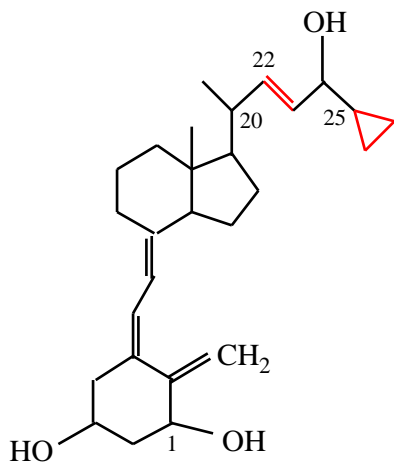
Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, den Einfluß der zum Teil neuen Vitamin D_3 -Analoga (Tacalcitol, GS 1500 und EB 1213), deren chemische Strukturen unten (Abb. 8) abgebildet sind, auf das Zellwachstum und die Sphingomyelin-Hydrolyse der HaCaT-Zellen zu testen. Tacalcitol (Handelsname Curatoderm®) wird wie Calcipotriol (Handelsname Psorcutan®) aufgrund seiner Wachstumshemmung und Differenzierungsanregung der Keratinozyten gegenwärtig erfolgreich in der topischen Therapie der Schuppenflechte eingesetzt (Peters und Balfour, 1997; van de Kerkhof et al., 1996; Binderup und Bramm, 1988), wobei die genaue Wirkungsweise ungeklärt ist. Die Analoga EB 1213 und GS 1500 sind noch in der vorklinischen Testphase. Ein wichtiger Punkt wird es auch sein zu testen, welche Vitamin D_3 -Analoga Apoptose in HaCaT-Zellen auslösen können. Zusätzlich dazu sollen neuartige Ceramidanaloga, im Hinblick auf ihre Fähigkeit Apoptose in Keratinozyten auszulösen, untersucht werden.



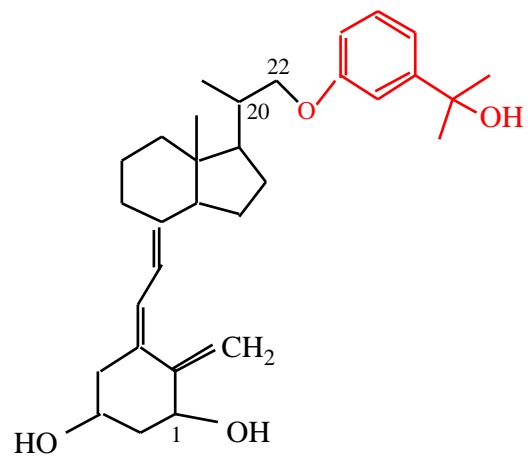
1,25-Dihydroxyvitamin D₃



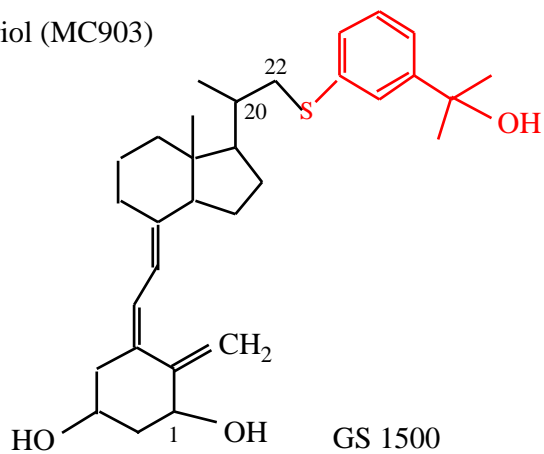
Tacalcitol (1,24-Dihydroxyvitamin D₃)



Calcipotriol (MC903)



EB 1213



GS 1500

Abb.8. Chemische Struktur von Vitamin D₃ und seinen Analoga.