

2. Ergebnisse

Teil 1: Vitamin D₃ und Analoga

2.1. Bestimmung der Zytotoxizität von Vitamin D₃-Analoga auf HaCaT-Zellen

Als Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität wird die Membranintegrität über die Freisetzung der zytosolisch lokalisierten Enzyme, alkalische Phosphatase und Laktatdehydrogenase (LDH), gemessen. Der zytotoxische Effekt einer Substanz macht sich bereits innerhalb von wenigen Stunden nach der Behandlung bemerkbar. Zunächst wurde durch Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand die Zytotoxizität von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und den Analoga Calcipotriol, GS 1500, EB 1213 und Tacalcitol bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Nach 5 h Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und den entsprechenden Analoga zeigt sich über die Bestimmung der LDH im Zellkulturüberstand nur bei den Analoga GS 1500 und EB 1213 bei 10 μM eine erhöhte LDH-Aktivität. Sogar nach 24 h der Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und Calcipotriol ist die LDH-Aktivität nicht erhöht; bei Tacalcitol ist nach 24 h ein leichter Anstieg bei 10 μM zu messen. Die Analoga GS 1500 und EB 1213 bewirken nach 24 h eine deutlich gesteigerte LDH-Aktivität im Zellüberstand. Bei 10 μM beträgt die LDH-Aktivität bei GS 1500 etwa 450 % und bei EB 1213 etwa 600 % der Kontrolle. Die Messung der alkalischen Phosphatase erfolgte nach 6 h Behandlung. Das Ergebnis stimmt mit dem LDH-Ergebnis überein und wird deshalb nicht gezeigt. Im Gegensatz zu den Analoga bewirkt 0,01 % Triton X-100, das als Detergenz die Membran permeabilisiert, innerhalb von 10 min. eine drastische Erhöhung der LDH im Zellkulturüberstand. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß lediglich die Analoga EB 1213 und GS 1500 bei einer Konzentration von 10 μM auf HaCaT-Zellen zytotoxisch wirken.

2.2. Wirkung von Vitamin D₃-Analoga auf das Wachstum von HaCaT-Zellen

Es wurde bereits in Voruntersuchungen gezeigt, daß $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, Calcipotriol und Ceramid die Proliferation sowohl von HaCaT-Zellen als auch von primären Keratinozyten hemmen (Geilen et al., 1996). In diesem Versuchsteil wurde die Wirkung von weiteren Vitamin D-Analoga auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Zellen untersucht. In Abb. 10 ist der Proliferationstest mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und den vier verwendeten Analoga dargestellt. Alle

Analoga zeigen bei einer Konzentration von 5 μM eine deutliche Proliferationshemmung, wobei Tacalcitol, GS 1500 und $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bei 5 μM das Wachstum der Zellen vollständig hemmen. Bei 1 μM zeigt lediglich Tacalcitol eine deutliche Hemmung um 80 %. Bei der Bestimmung der Proliferation ist es wichtig, daß die Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung eine bestimmte Konfluenz haben. Je dünner die HaCaT-Zellen ausgesät sind, desto empfindlicher reagieren sie auf die Proliferationshemmung. Bei dichteren Zellen (ca. 40 bis 50 % konfluent) zeigte sich die Proliferationshemmung erst nach längerer Behandlungszeit (72 h). Das Ergebnis des in der Abb. 10 gezeigten Proliferationstest stammt von Zellen, die zum Zeitpunkt der Behandlung ca. 20-30 % dicht waren.

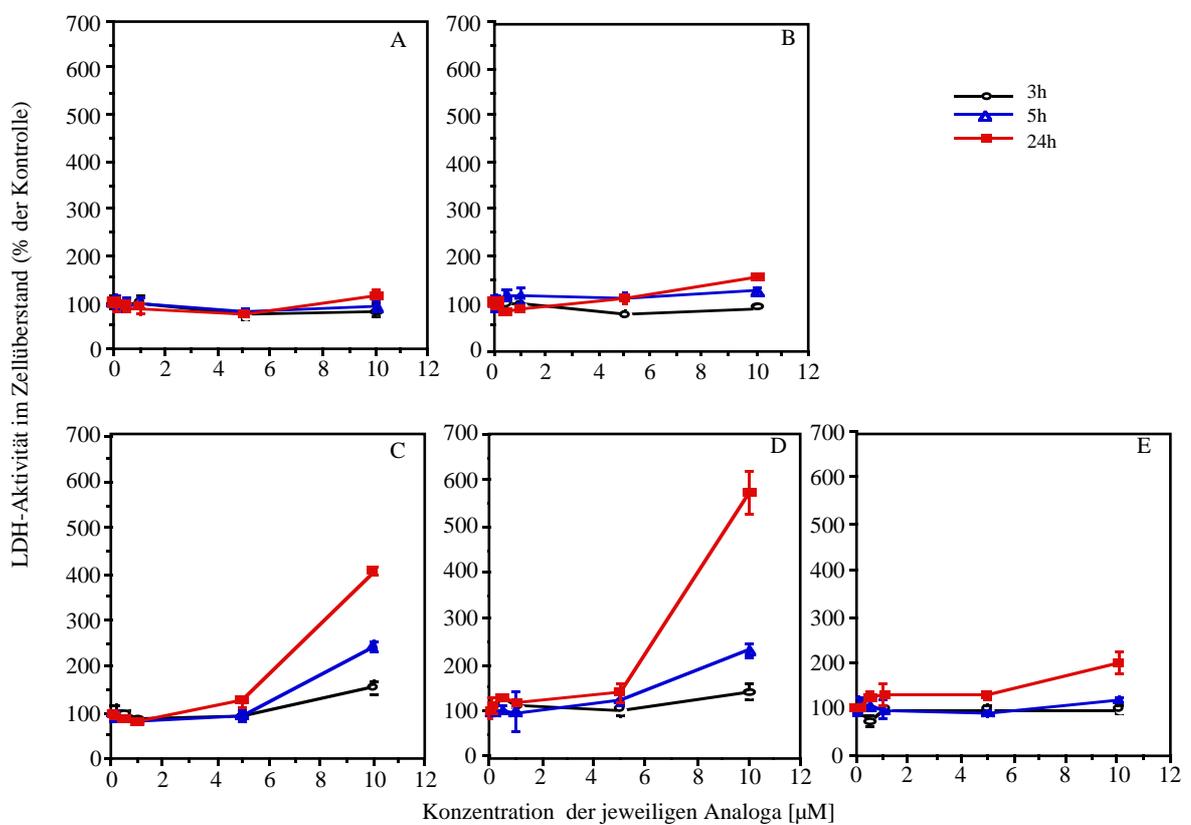


Abb.9. Messung der Zytotoxizität der Vitamin D-Analoga auf HaCaT-Zellen.

Konfluente HaCaT-Zellen werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von (A) $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, (B) Calcipotriol, (C) EB 1213, (D) GS 1500 und (E) Tacalcitol behandelt. Nach 3, 5 und 24 h wird im Zellüberstand die Aktivität der Laktatdehydrogenase gemäß der Anleitung im Methodenteil 6.7.1. gemessen. Die Werte repräsentieren Vierfach-Werte und werden als % der Kontrolle \pm S.D. (n=4) angegeben.

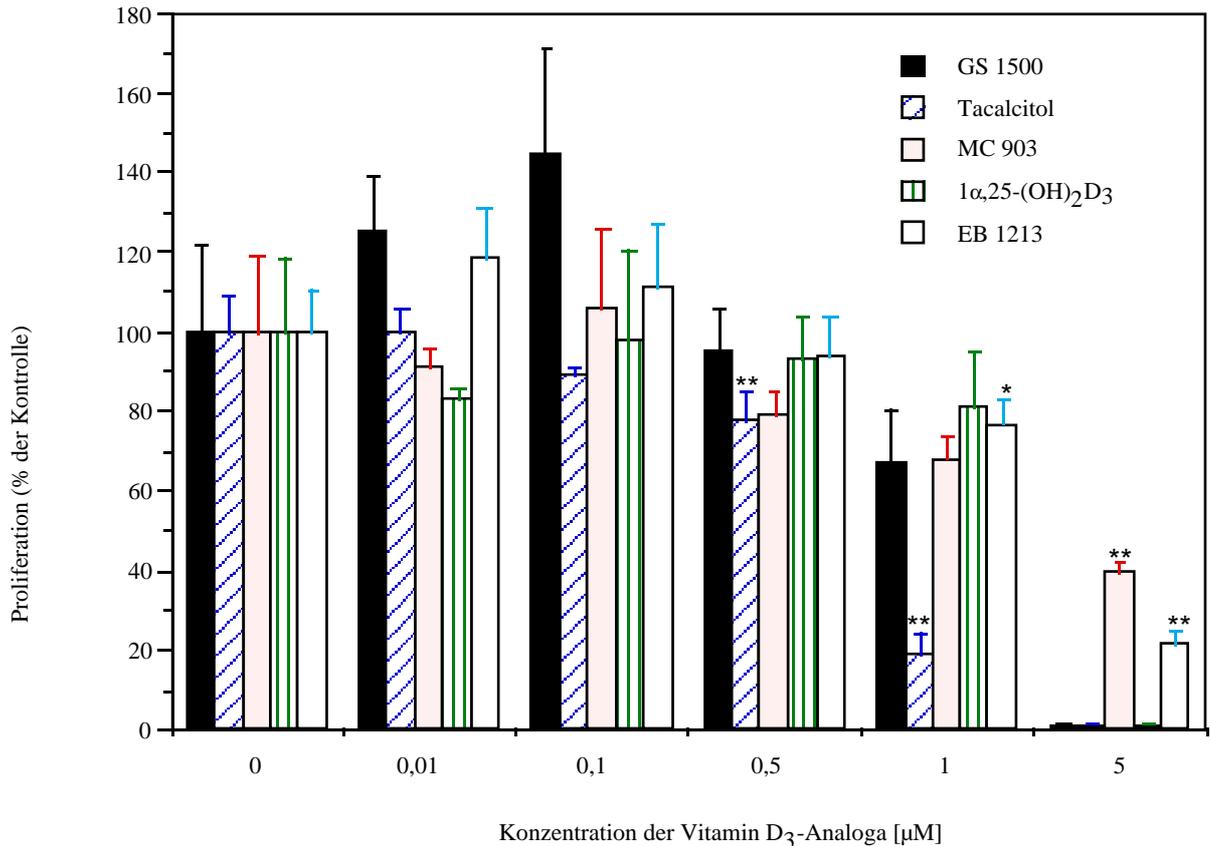


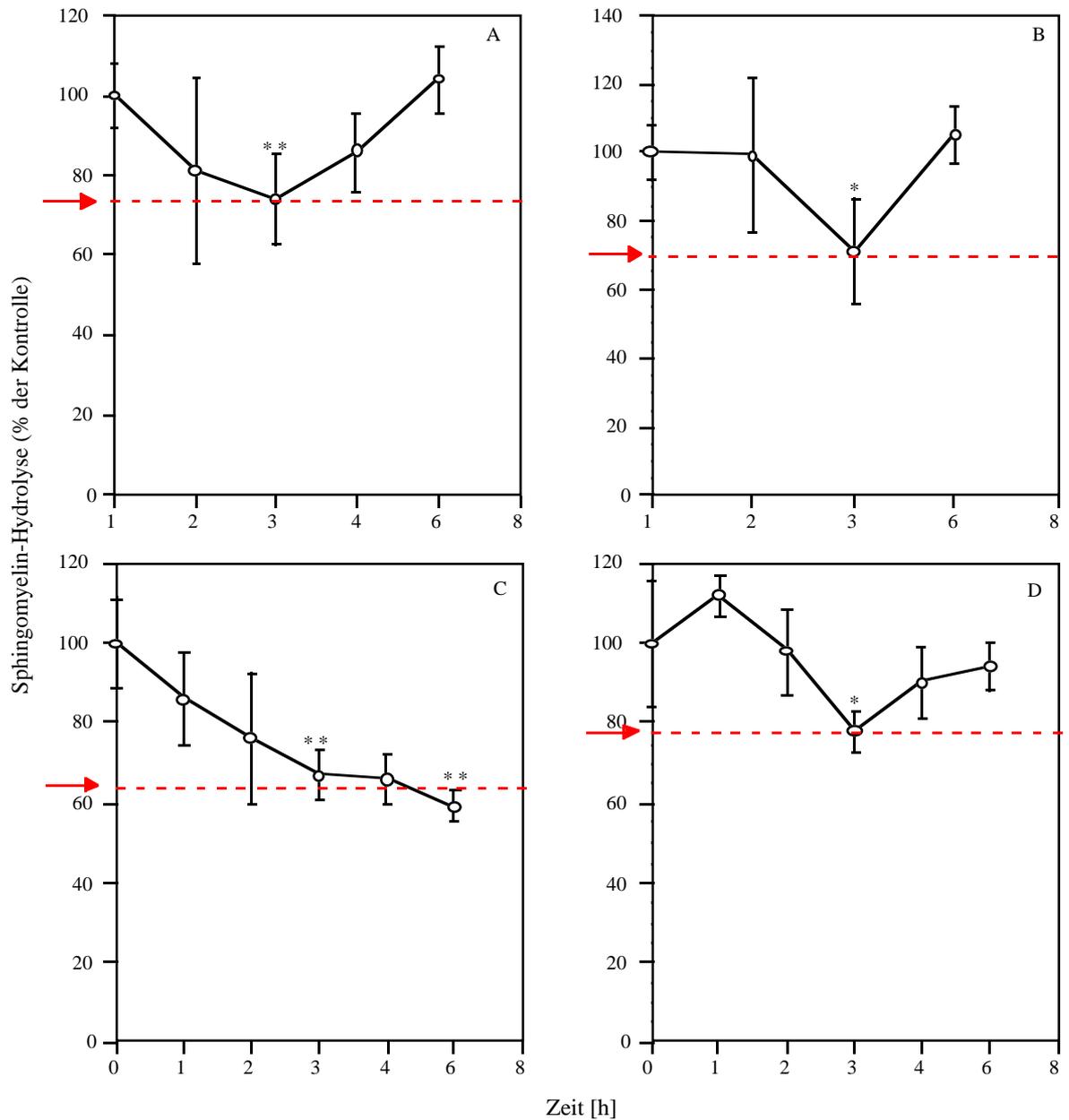
Abb.10. Vitamin D₃-Analoga hemmen das Wachstum der HaCaT-Zellen.

20 bis 30 % konfluente HaCaT-Zellen werden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Analoga behandelt. Nach 48 h wird das Wachstum der Zellen über die Kristallviolett-Methode (siehe 6.8.) bestimmt. Die Werte sind angegeben als % der Kontrolle ± S.D. (n=4). *, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei p < 0,05; **, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei p < 0,02.

2.3. Vitamin D₃-Analoga bewirken die Sphingomyelin-Hydrolyse

1α,25-(OH)₂D₃ und Calcipotriol bewirken eine Abnahme des Sphingomyelin-Gehaltes innerhalb von 3 h der Behandlung bei einer Konzentration von 100 nM (Geilen et al., 1996). Um zu sehen, ob auch andere Vitamin D₃-Analoga die Hydrolyse von Sphingomyelin bewirken, wurden HaCaT-Zellen mit 100 nM des jeweiligen Analogons bzw. Kontrollmedium bis zu 6 h behandelt. Die Ergebnisse werden in Abb. 11 dargestellt. Es zeigt sich, daß alle hier getesteten Substanzen die Sphingomyelin-Hydrolyse einleiten. Interessant ist, daß bei EB 1213 die Wirkung auch bis zu 6 h anhält, während bei den anderen Analoga nach 6 h der Ausgangswert erreicht wird. Nach bereits 1 h ist eine 15-20 %ige Abnahme bei den Substanzen EB 1213, Tacalcitol und 1α,25-(OH)₂D₃ zu sehen. Nach 3 h nimmt der Sphingomyelin-Gehalt weiter ab; bei der Behandlung der Zellen mit EB 1213 um ca 35 %, bei der Behandlung mit Tacalcitol um ca 20 %, bei der Behandlung mit 1α,25-(OH)₂D₃ um ca 15 %, bei der Behandlung mit GS 1500 um ca 10 %.

gefolgt von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ um ca. 25 % und Tacalcitol um ca. 25 % und GS 1500 um ca. 20 %. Die Substanz, die die stärkste Sphingomyelin-Hydrolyse unter den getesteten Analoga bewirkt ist EB 1213. Dabei folgt seine Wirkung jedoch einer anderen Kinetik als die der übrigen Substanzen.



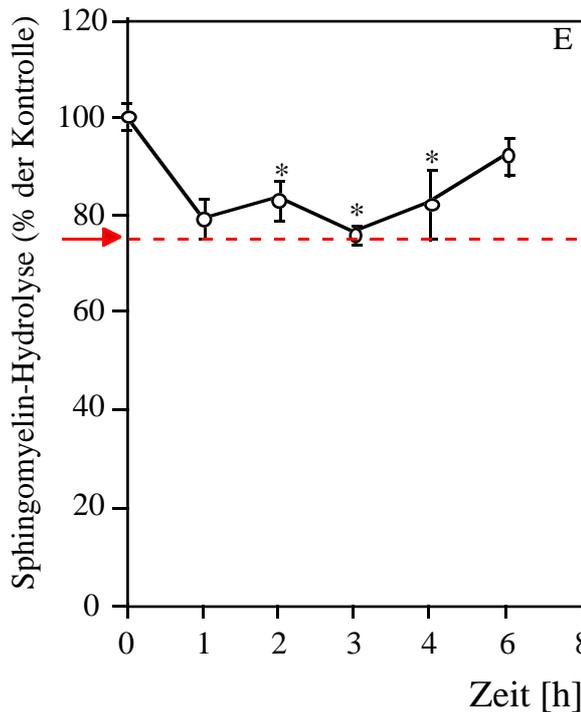


Abb.11. Vitamin D₃-Analoga führen in Keratinozyten zur Sphingomyelin-Hydrolyse.

Konfluente HaCaT-Zellen, die 72 h mit [³H]-Cholin markiert wurden, werden einmal mit PBS gewaschen und mit 100 nM (A) 1 α ,25-(OH)₂D₃, (B) Calcipotriol, (C) EB 1213, (D) GS 1500 und (E) Tacalcitol behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten werden die Zellen gerntet und die Sphingomyelin-Hydrolyse wie im Methodenteil unter 6.4. bereits beschrieben bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen dar und werden als % der Kontrolle \pm S.D. angegeben (n=3). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Abnahme des Sphingomyelin-Gehalts. *, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei p < 0,05; **, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei p < 0,02.

2.4. 1 α ,25-(OH)₂D₃-Vorstufen bewirken keine Sphingomyelin-Hydrolyse

Zusätzlich zu den aktiven Vitamin D₃-Analoga wurden auch Vorstufen von 1 α ,25-(OH)₂D₃ auf ihre Fähigkeit, die Sphingomyelin-Hydrolyse zu bewirken, getestet. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit 100 nM 7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol und 25-Hydroxyvitamin D₃ bis zu 6 h behandelt. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt. Wie zu ersehen ist, konnten weder 7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol noch 25-Hydroxyvitamin D₃ den Sphingomyelin-Gehalt der Zelle signifikant erniedrigen.

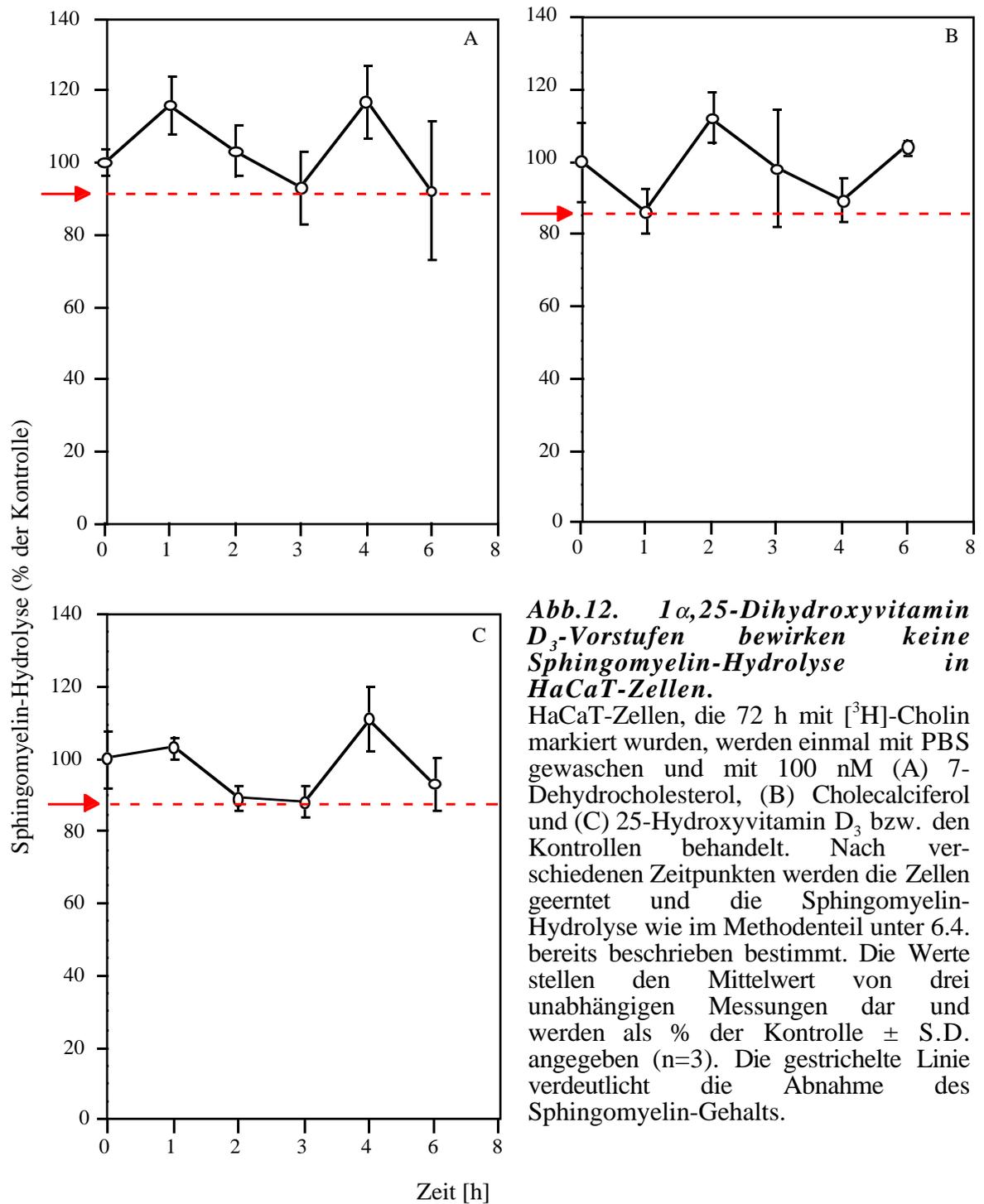
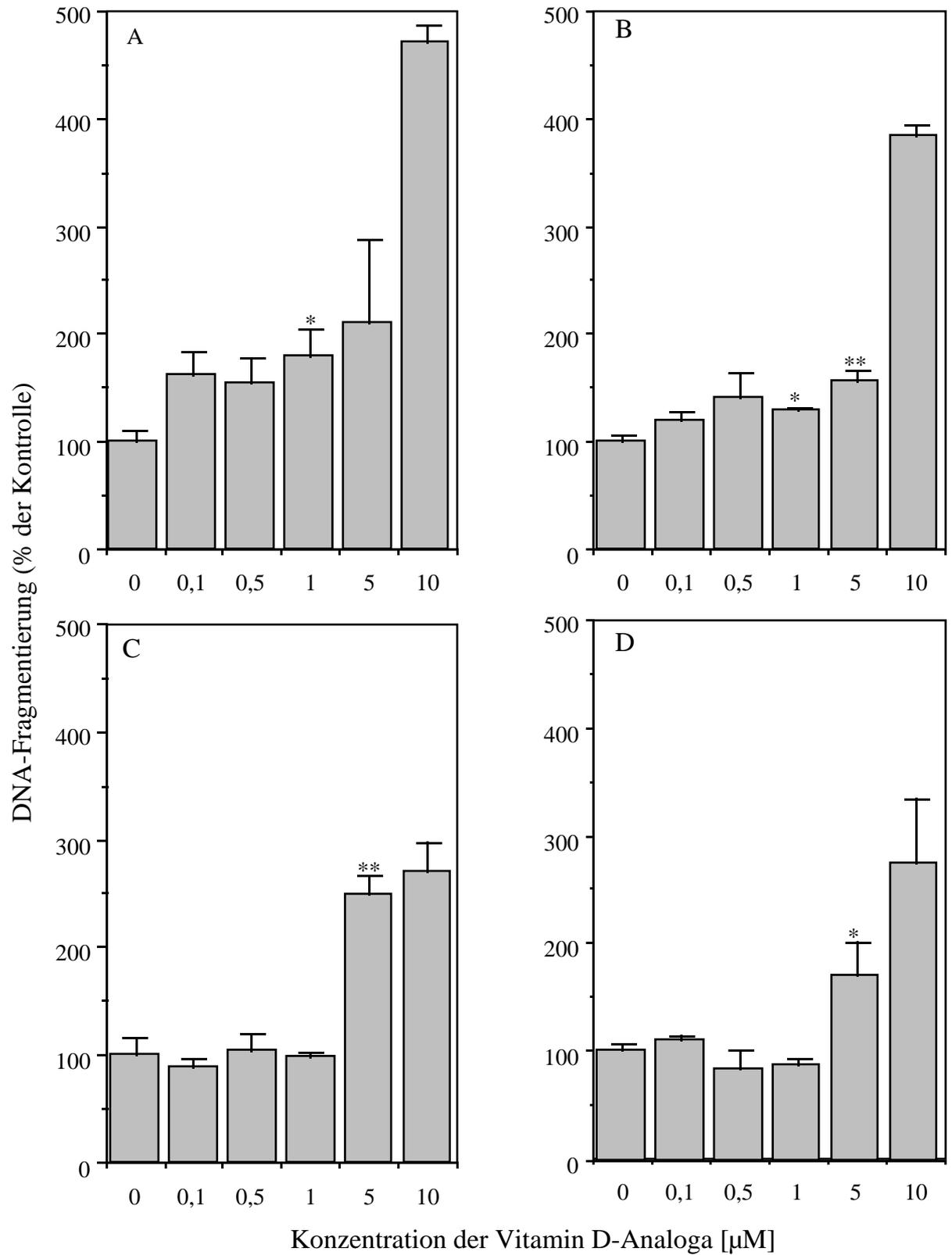


Abb.12. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 -Vorstufen bewirken keine Sphingomyelin-Hydrolyse in HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen, die 72 h mit [3 H]-Cholin markiert wurden, werden einmal mit PBS gewaschen und mit 100 nM (A) 7-Dehydrocholesterol, (B) Cholecalciferol und (C) 25-Hydroxyvitamin D_3 bzw. den Kontrollen behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten werden die Zellen geerntet und die Sphingomyelin-Hydrolyse wie im Methodenteil unter 6.4. bereits beschrieben bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen dar und werden als % der Kontrolle \pm S.D. angegeben (n=3). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Abnahme des Sphingomyelin-Gehalts.

2.5. Vitamin D₃-Analoga lösen Apoptose in HaCaT-Zellen aus

Der apoptotische Zelltod wurde über die Messung der DNA-Fragmentierung mit Hilfe eines sog. Sandwich-ELISAs bestimmt. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit Konzentrationen bis zu 10 µM der zu untersuchenden Substanzen bzw. Kontrollmedien 6 h und 24 h behandelt. Nach 6 h können nur EB 1213 und Calcipotriol Apoptose auslösen (Graphik wird nicht gezeigt). Die Ergebnisse, die nach 24 h Behandlung der Zellen mit 1 α ,25-(OH)₂D₃ und den Analoga Calcipotriol, EB 1213, GS 1500 und Tacalcitol erzielt worden sind, werden in Abb. 13 gezeigt. Wie zu sehen ist, nimmt die Anzahl der apoptotischen Zellen bei allen getesteten Analoga bei einer Konzentration von 5 µM leicht zu, d.h. um 150-250 %, wobei die deutlichste Zunahme bei EB 1213 (C), mit ca. 250 % zu sehen ist. Bei einer Konzentration von 10 µM steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen gegenüber der Kontrolle drastisch an. 1 α ,25-(OH)₂D₃ (A) und Calcipotriol (B) steigern die Rate der apoptotischen Zellen um das 4-fache, EB 1213 (C) und GS 1500 (D) um das 3-fache und Tacalcitol (E) um das 10-fache des Kontrollwertes. Dieser Versuch läßt die Schlußfolgerung zu, daß 1 α ,25-(OH)₂D₃ und die vier Analoga in Keratinozyten Apoptose auslösen können. Es ist zu erwähnen, daß die Höhe der Apoptoserate in HaCaT-Zellen nicht konstant bleibt, sondern abhängig davon ist, wieviel Tage nach dem Aussäen die Zellen behandelt werden. Brauchen die Zellen länger, um konfluent zu werden, ist im allgemeinen die Apoptoserate niedriger. Im Durchschnitt wurden die Versuche drei Tage nach dem Passagieren mit den entsprechenden Substanzen durchgeführt.



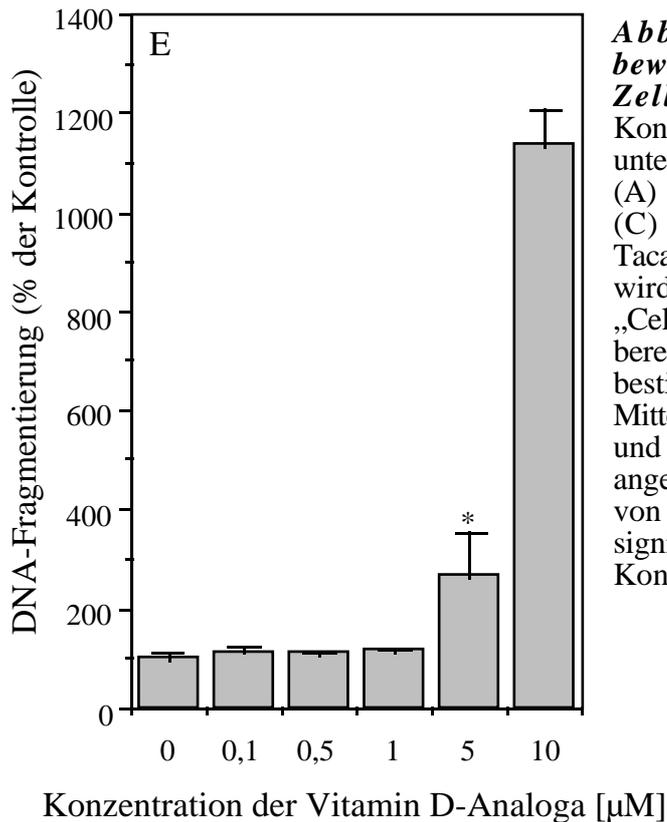


Abb.13. Vitamin D-Analoga bewirken Apoptose in HaCaT-Zellen.

Konfluente HaCaT-Zellen werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von (A) $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, (B) Calcipotriol, (C) EB 1213, (D) GS 1500 und (E) Tacalcitol 24 h behandelt. Anschließend wird die DNA-Fragmentierung mit dem „Cell death detection ELISA“ Kit wie bereits in Kapitel 6.9. beschrieben bestimmt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus Vierfach-Bestimmungen und werden in % der Kontrolle \pm S.D. angegeben. *, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,05$; **, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,02$.

2.6. Expression der Tumornekrosefaktor α -mRNA nach der Behandlung mit Vitamin D_3 -Analoga

Für $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ konnten wir bereits zeigen, daß es die mRNA-Transkription von $\text{TNF}\alpha$ erhöht (Geilen et al., 1997). Ziel dieses Versuches ist es nun, nachzuweisen, ob auch andere Vitamin D_3 -Analoga die Genexpression von $\text{TNF}\alpha$ steigern. Als Methoden wurden Northern Blot und RT-PCR verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Unter den getesteten Analoga ist nur EB 1213 ebenfalls in der Lage deutlich die $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Expression der HaCaT-Zellen zu erhöhen. Gegenüber der Kontrolle (1% Ethanol) steigert EB 1213 die Expression um 280 % nach 1 h und auch nach 2-3 h ist die mRNA von $\text{TNF}\alpha$ über dem Kontrollwert (siehe Abb. 14a. B). GS 1500 bewirkt einen Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -mRNA nach 2 h der Behandlung um ca. 30 % (siehe Abb. 14a. C). Bei Calcipotriol und Tacalcitol ist zu keinem Zeitpunkt eine Steigerung zu detektieren; weder im Northern Blot (nicht gezeigt) noch in der RT-PCR (siehe Abb. 14b. D und E). Da für die PCR parallel drei Versuche angesetzt wurden, können für die Werte im Gegensatz zu den Northern Blot-Werten die Fehlerbalken berechnet werden. Als Ergebnis ist hier festzuhalten, daß nur $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und EB 1213 die $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Expression deutlich erhöhen.

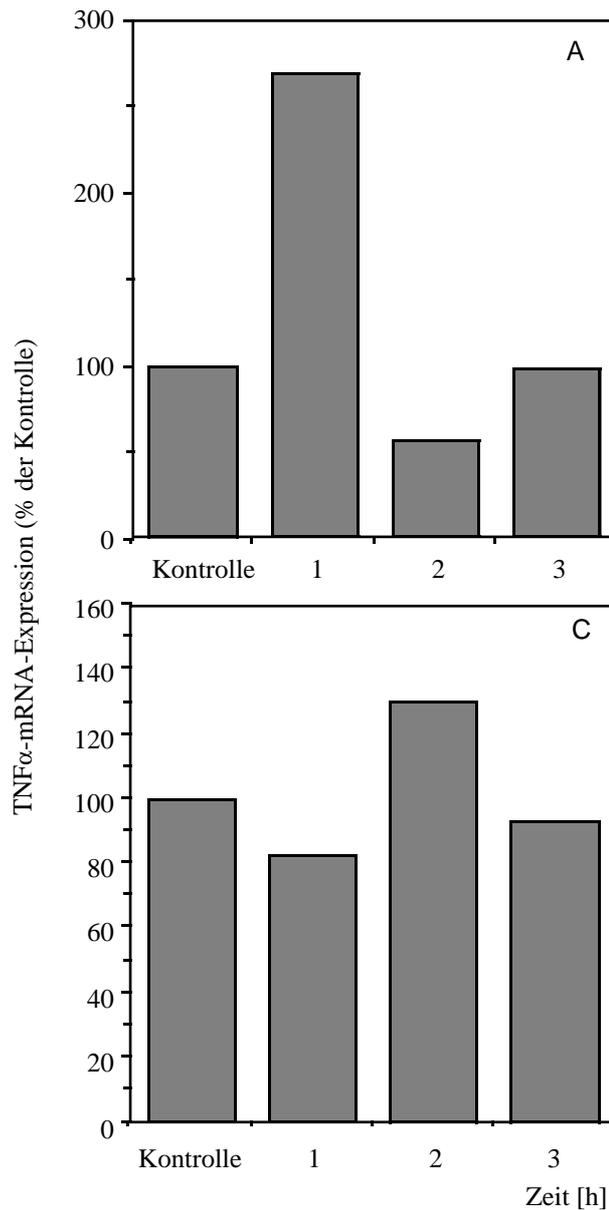


Abb.14a. Einfluß von Vitamin D-Analoga auf die TNF α -Genexpression.

Konfluente HaCaT-Zellen werden mit 100 nM (A) $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, (B) EB 1213 und (C) GS 1500 bzw. den Kontrollen (1% Isopropanol) in KBM behandelt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die mRNA entsprechend dem Protokoll 6.10.1. isoliert und anschließend Northern Blot gemäß 6.11.1. durchgeführt. Kontroll-Gen war β -Aktin. Die Werte für TNF α -Expression wurden auf die Werte der β -Aktin-Expression bezogen und als % der Kontrolle angegeben.

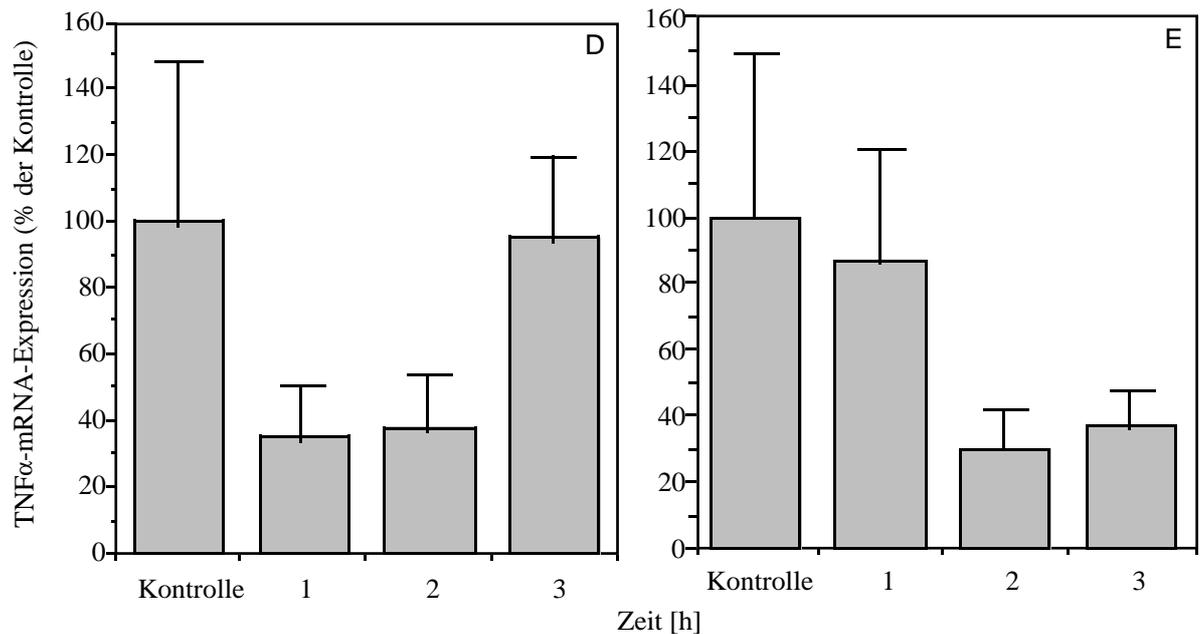


Abb.14b. Einfluß von Vitamin D-Analoga auf die TNF α -Genexpression. Konfluente HaCaT-Zellen wurden mit 100 nM (D) Calcipotriol und (E) Tacalcitol behandelt. Kontrollzellen werden mit Isopropanol bzw. Ethanol behandelt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die RNA nach dem Protokoll 6.10.2. isoliert. Anschließend wird cDNA gemäß Protokoll 6.14. hergestellt und PCR wie unter 6.15. beschrieben durchgeführt. Kontrollgen ist das Gen für das ribosomale Protein S9 (RiboS9). Die Werte der TNF α -Expression werden auf die Werte der RiboS9-Expression bezogen und als % der Kontrolle \pm S.D. (n=3) angegeben.

2.7. TNF α -Proteinexpression nach Behandlung mit 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$

Um sicher die Aussage treffen zu können, daß die TNF α -mRNA in Protein umgesetzt wird, wurden HaCaT-Zellen mit 35 S-Cystein/Methionin markiert und mit 100 nM 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ behandelt. Nach 1, 2 und 3 h wurden die Zellen geerntet und sowohl Zellextrakt als auch der Zellkulturüberstand mit Antikörpern gegen TNF α behandelt und anschließend immunpräzipitiert. Abb. 15 zeigt, daß im Zellextrakt das TNF α -Protein bereits nach 1 h zu detektieren ist und nach 3 h langsam verschwindet. Im Vergleich zur Kontrolle (1 % Ethanol) steigt die Proteinmenge nach 1 h um ca. 250 % und nach 2 h weiter auf 300 % an, wobei nach 3 h die Synthese abnimmt. Im Überstand taucht das Protein erst nach 2 h auf, was darauf hindeutet, daß TNF α erst synthetisiert und dann sezerniert wird.

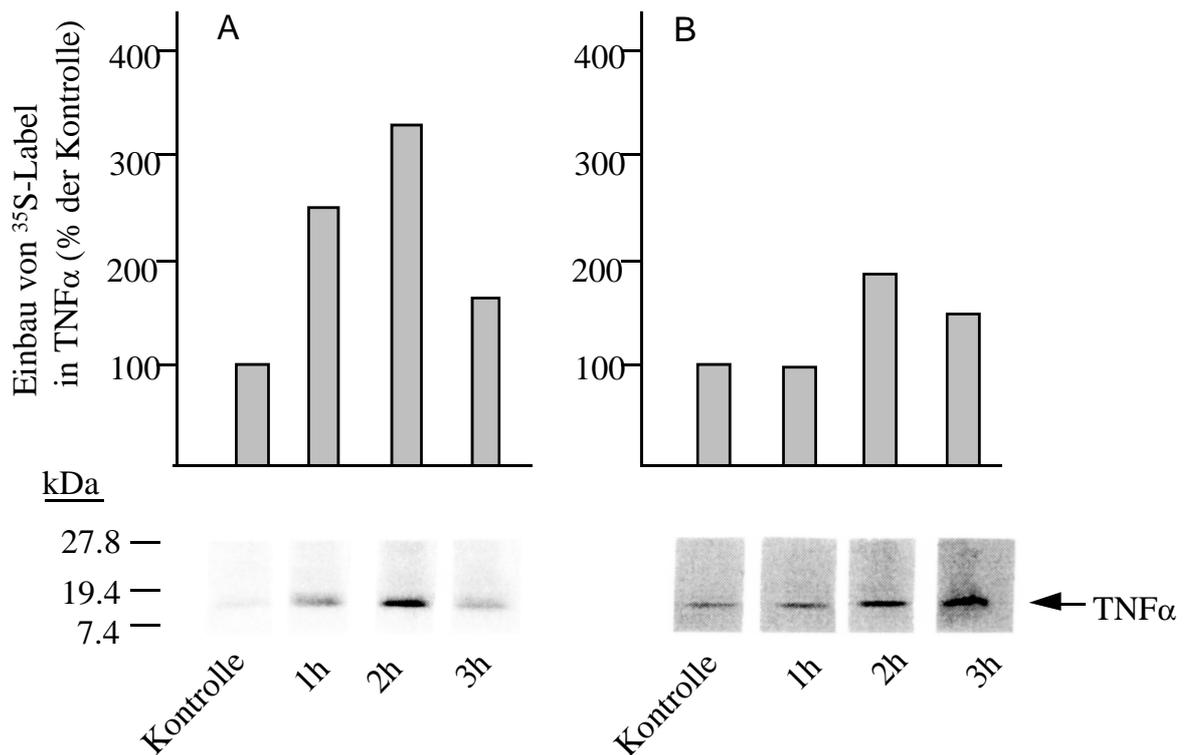


Abb.15. Bestimmung von $\text{TNF}\alpha$ im Zellysat und Überstand von ^{35}S -Cystein/Methionin-markierten HaCaT-Zellen nach Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$.

Konfluente Zellen wurden mit ^{35}S -Cystein/Methionin 2 h markiert und anschließend mit 100 nM $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ behandelt. Kontrollzellen wurden mit 1 % Ethanol behandelt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Zellen (A) und Überstand (B) geerntet. $\text{TNF}\alpha$ wurde wie unter 6.13. beschrieben immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 6.12.). Die Radioaktivität wurde mit einem PhosphorImager detektiert.

2.8. Eine Blockierung des TNF-RI mittels Antikörper wirkt der $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -induzierten Apoptose und Proliferationshemmung entgegen

Eine weitere Bestätigung, daß die von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ eingeleitete Apoptose und Proliferationshemmung zumindest teilweise über $\text{TNF}\alpha$ vermittelt wird, erfolgt durch den Einsatz von Antikörpern gegen den 55 kDa $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor (TNF-RI). Für $\text{TNF}\alpha$ gibt es zwei verschiedene Rezeptoren, 55 kDa (TNF-RI) und 75 kDa (TNF-RII). Die meisten Signale von $\text{TNF}\alpha$, werden über den TNF-RI der Zelle weitergeleitet. Normale humane Keratinozyten exprimieren nur den 55 kDa-Rezeptor (Trefzer et al., 1991). Vor der Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ wird ein Teil der Zellen zwei Stunden mit dem Antikörper vorbehandelt. Nach 24 h

Inkubation zeigte sich, daß die Antikörper die $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -vermittelte Apoptose und Proliferationshemmung zum Teil aufheben. Abb. 16 (A) und 16 (B) stellen die Ergebnisse des Proliferationstestes bzw. des Apoptosetestes dar: Zellen ohne Antikörper-Vorbehandlung werden von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ um etwa 80 % in ihrem Zellwachstum gehemmt; $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ mit Antikörpern bewirkt nur eine 20 %ige Hemmung. Auch bei der Apoptosemessung bewirkt die gleichzeitige Zugabe von Antikörpern gegen den TNF-RI eine signifikante Verringerung der Apoptoserate um ca. 70 %.

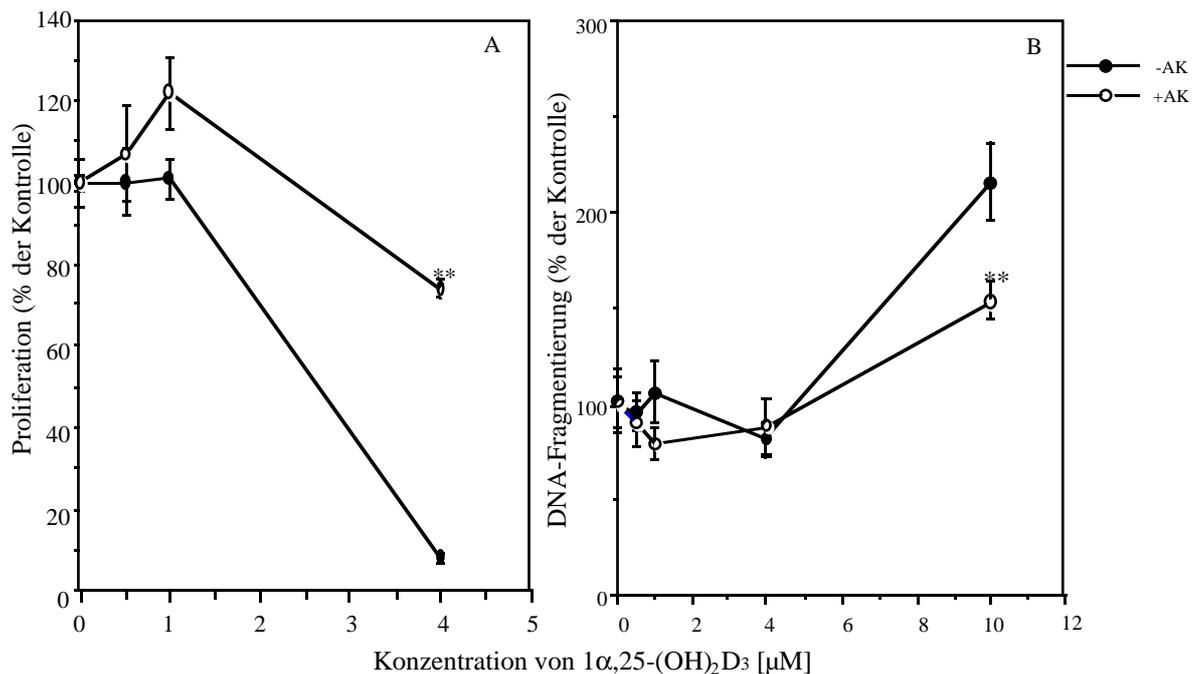


Abb.16. Antikörper gegen den TNF-RI (55 kDa) heben die Wirkung von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ auf die Einleitung der Apoptose und die Proliferationshemmung auf.

20-30 % (A) bzw. konfluente (B) HaCaT-Zellen werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ mit (+AK) oder ohne (-AK) Antikörper 24 h behandelt. Anschließend wird mit der Kristallviolettmethod (siehe 6.8.) die Proliferation (A) und mit „Cell death detection ELISA“ Kit der apoptotische Zelltod (siehe 6.9.) (B) bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert von vier unabhängigen Messungen dar. Sie werden als % der Kontrolle \pm S.D. angegeben (n=4). *, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,05$; **, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,02$.

2.9. Fumonisin B1 blockiert die $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ eingeleitete Apoptose

HaCaT-Zellen wurden 24 h mit 100 μM Fumonisin B1 vorbehandelt und anschließend wurde $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ dazugegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde der apoptotische Zelltod mittels der DNA-Fragmentierung detektiert. Fumonisin B1, ein Pilzgift, hemmt spezifisch die Ceramid-Synthase im *de novo* Biosyntheseweg des Ceramids. Dieses Experiment dient dem Nachweis, daß Ceramid ein *Second Messenger* der $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ausgelösten Apoptose ist. Das Resultat dieses Versuches ist in Abb. 17 graphisch dargestellt. Abb. 17 (B) zeigt, daß in Zellen, die mit Fumonisin B1 24 h vorbehandelt werden, die $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bewirkte Anzahl der apoptotischen Zellen etwa 170 % beträgt und in Zellen, die Fumonisin B1-unbehandelt sind etwa 320 %. Die Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ dauerte 24 h. Die Wirkung von Fumonisin B1 beruht nicht auf unspezifischen zytotoxischen Effekte, da Zytotoxizitätsmessungen nur eine leicht erhöhte LDH-Aktivität im Zellüberstand zeigte (siehe Abb. 17 (A)). Bei 100 μM steigt die LDH-Aktivität gegenüber der Kontrolle (0,7 % Methanol) um etwa 50 %. Hierfür wurden konfluente HaCaT-Zellen mit Fumonisin B1-Konzentrationen bis zu 200 μM zunächst 24 h in RPMI, darauffolgend 24 h in KGM inkubiert. Die Zytotoxizität wurde also nach 48 h Fumonisin B1-Behandlung gemessen. 0,01% Triton bewirkte nach 10 min Inkubation auf HaCaT-Zellen eine LDH-Aktivität von ca. 600 %. Abb. 17 zeigt, daß Fumonisin B1 die durch $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ausgelöste Apoptose deutlich hemmt.

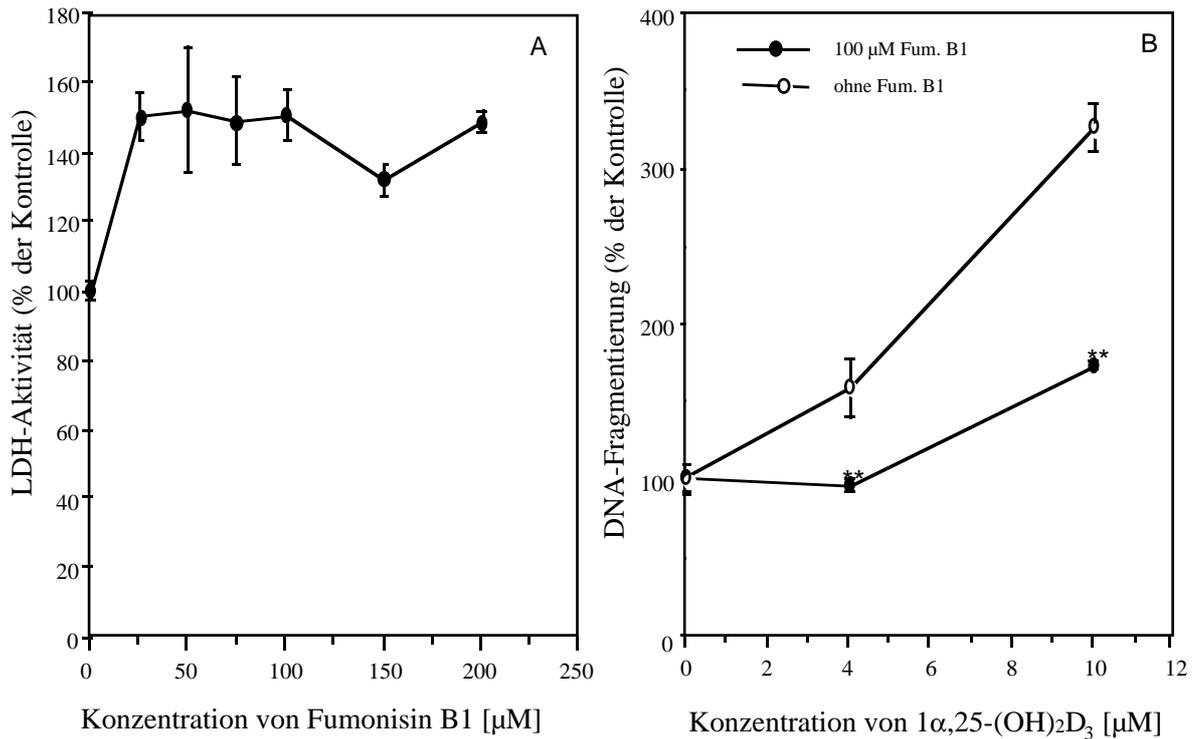


Abb. 17. Fumonisin B1 hebt die $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -eingeleitete Apoptose auf.

(A) Konfluente HaCaT-Zellen werden mit 0-200 μM Fumonisin B1 24 h in RPMI, dann 24 h in KGM inkubiert. Danach wird im Überstand der Zellen LDH-Aktivität wie im Kapitel 6.7.1. beschrieben gemessen. (B) Konfluente HaCaT-Zellen werden 24 h mit 100 μM Fumonisin B1 in RPMI (10 % FCS) inkubiert. Anschließend werden die 24 h Fumonisin B1-vorbehandelten und unbehandelten Zellen mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und 100 μM Fumonisin B1 bzw. nur mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ weitere 24 h in KGM inkubiert. Daraufaufgehend wird die DNA-Fragmentierung (siehe 6.9.) gemessen. Die angegebenen Werte, Mittelwerte von Vierfach-Bestimmungen, werden in % der Kontrolle \pm S.D. (n=4) dargestellt. *, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,05$; **, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,02$.

2.10. Induktion der Apoptose durch Tumornekrosefaktor α

TNF α ist ein potenter Induktor der Apoptose in verschiedenen Zelllinien. In diesem Versuchsteil wurden HaCaT-Zellen mit TNF α 24 h behandelt und die DNA-Fragmentierung gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 18 (B) gezeigt. Schon bei einer Konzentration von 20 nM steigt die Rate der apoptotischen Zellen auf ca. 300 %. Abb. 18 (A) stellt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen dar. Nach 3 und 5 h ist keine signifikante Steigerung der LDH-Aktivität im Zellüberstand zu messen. Erst nach 24 h ist eine erhöhte Aktivität bis zu 200 % gegenüber der Kontrolle festzustellen. Das Ergebnis zeigt, daß TNF α auch in HaCaT-Zellen

im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 50 nM nach 24 h Inkubation signifikant Apoptose bewirkt.

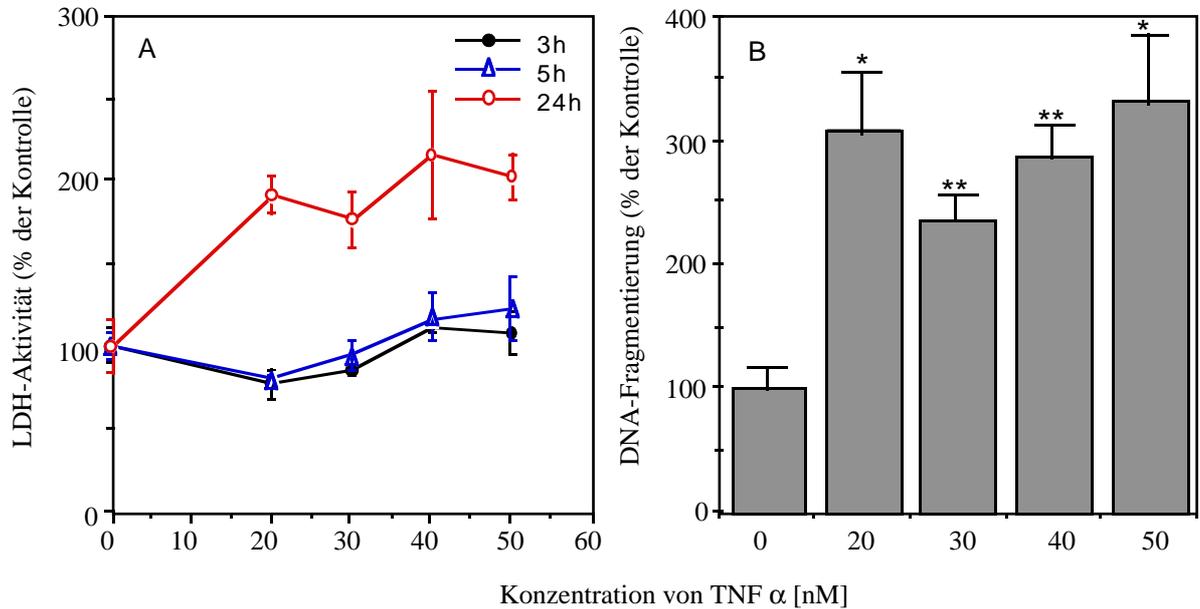


Abb.18. Konzentrationsabhängige Zytotoxizität und Apoptose-Induktion.

Konfluente HaCaT-Zellen werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF α bzw. Kontrollmedium (PBS + 1% BSA) inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wird die LDH-Aktivität im Zellüberstand (A) gemäß Protokoll 6.7.1. und nach 24 h wird die DNA-Fragmentierung (B) gemäß Protokoll 6.9. gemessen. Werte werden in % der Kontrolle \pm S.D (n=4) angegeben. *, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,05$; **, signifikant unterschiedlich von den Kontrollen bei $p < 0,02$.

2.11. Bestimmung der Sphingomyelinase-Aktivität in HaCaT-Zellen unter Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und TNF α

In vielen Zelllinien wird bei Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ besonders die neutrale Sphingomyelinase aktiviert. TNF α hingegen kann je nach Zelltyp sowohl die neutrale als auch die saure Sphingomyelinase stimulieren. Es ist weiterhin bekannt, daß die saure Sphingomyelinase nicht nur stabiler gegenüber Proteasen ist, sondern auch eine ungefähr zehnmal höhere Basalaktivität hat als die neutrale. Über RT-PCR konnte nachgewiesen werden, daß HaCaT-Zellen beide Isoformen exprimieren (siehe Abb. 20), wobei $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die Genexpression bis zu 3 h nicht zu beeinflussen scheint. In HaCaT-Zellen, die mit 100 nM $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und mit 6 nM bzw. 30 nM TNF α behandelt wurden, konnte jedoch keine signifikante Steigerung der Aktivität der neutralen Sphingomyelinase gemessen werden (siehe Abb. 19). Die saure Sphingomyelinase Aktivität zeigte bei Behandlung mit 100 nM

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ keine signifikante Steigerung (nicht gezeigt). Gut zu messen waren die unterschiedlichen Basalaktivitäten der Enzyme. Die saure Sphingomyelinase war, wie bereits oben erwähnt, auch in HaCaT-Zellen viel aktiver als die neutrale Sphingomyelinase.

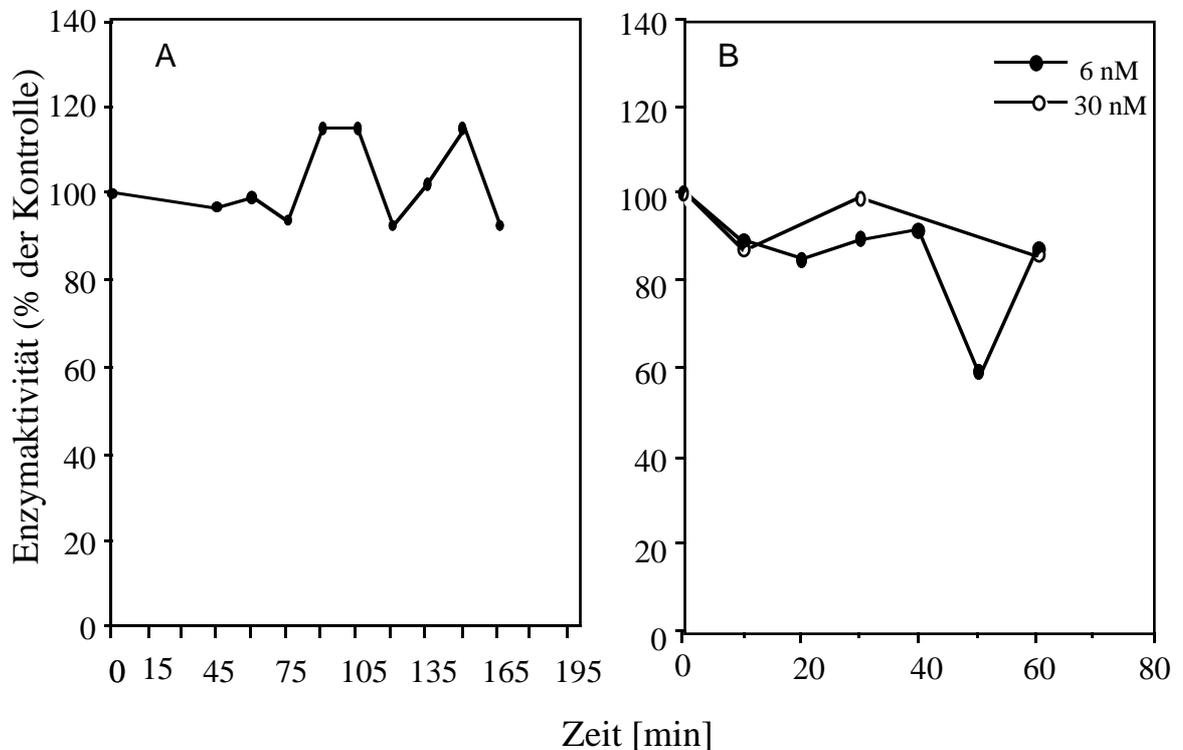


Abb.19. Messung der Aktivität der neutralen Sphingomyelinase unter Einfluß von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und $\text{TNF}\alpha$.

Für den Versuch, nach der in 6.6. beschriebenen Methode durchgeführt, werden konfluente HaCaT-Zellen verwendet. (A) zeigt das Ergebnis der Stimulation mit 100 nM $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und (B) mit 6 nM und 30 nM $\text{TNF}\alpha$.

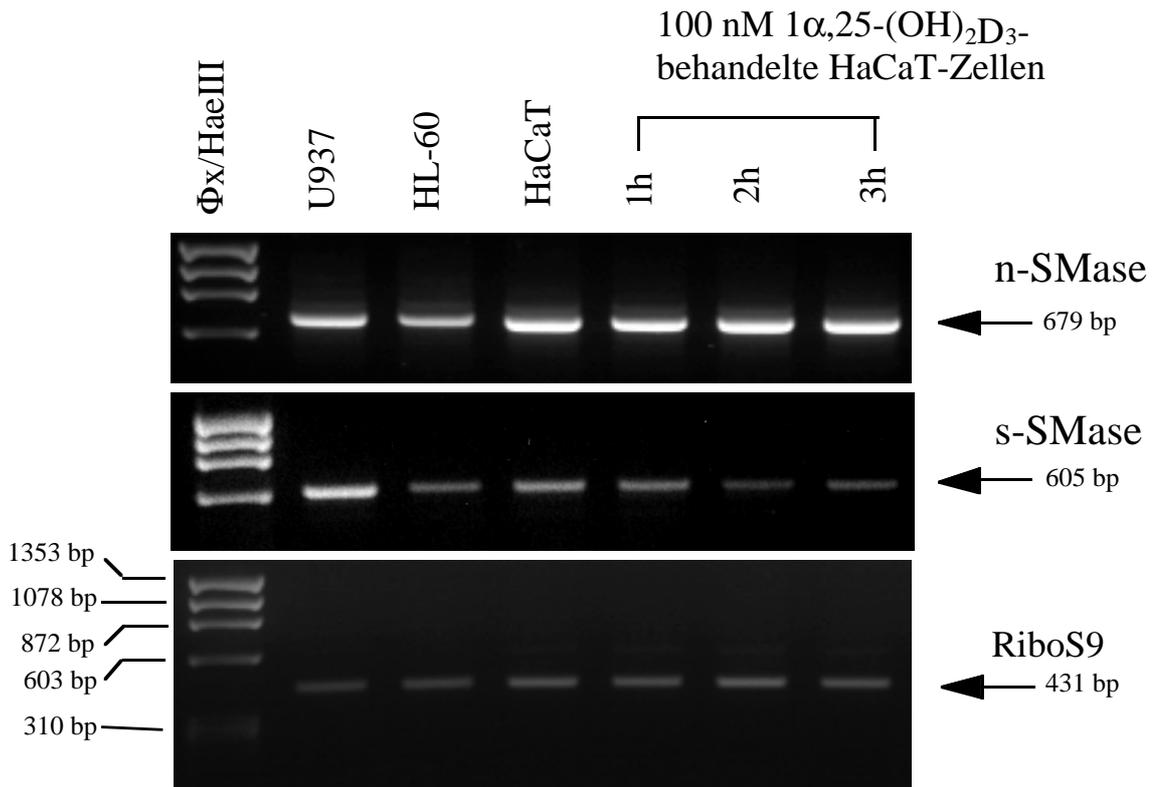


Abb.20. Nachweis der Expression von der neutralen und sauren Sphingomyelinase in HaCaT-Zellen, HL-60 und U937 über RT-PCR. Die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR erfolgten nach der in Kapitel 6.10.2., 6.14. und 6.15. beschriebenen Methoden. Negativkontrollen sind nicht gezeigt.

Teil 2: Ceramid und Ceramidanaloga

2.12. Wirkung von Ceramidanaloga auf das Wachstum von HaCaT-Zellen

In diesem Versuchsteil werden Ceramidanaloga mit unterschiedlichen chemischen Strukturen, die in Abb. 21 dargestellt sind, eingesetzt. Daß natürliches Ceramid und C_2 -Cer=0 (*N*-Acetylspingosin) effektiv die Proliferation der Keratinozyten hemmen, konnte bereits gezeigt werden (Geilen et al., 1996). Das Dihydroceramid, daß sich vom Ceramid nur durch das Fehlen der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 5 des Sphingosinrückgrates unterscheidet, ist biologisch unwirksam (Bielawska et al., 1993). Die chemische Struktur scheint also für eine spezifische Wechselwirkung des Ceramids mit seinen Zielmolekülen verantwortlich zu sein. Wichtig in diesem Zusammenhang ist natürlich die Bestimmung der minimalen effektiven Struktur von Ceramid bzw. seiner Analoga, damit sie

biologisch aktiv sein können. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, unterscheidet sich das C₂-Cer=S von C₂-Cer=O durch die Substitution des Sauerstoffs in der Amid-Bindung durch ein Schwefelatom. FS-5 unterscheidet sich stärker vom C₂-Cer=O. An Stelle der Hydroxylgruppe an der C1-Position hängt eine Ethylgruppe. Das Sphingosinrückgrat ist kürzer und die Doppelbindung zwischen C4 und C5 fehlt. Statt eines Acetylrestes ist eine längere Fettsäure verestert. HaCaT-Zellen wurden mit unterschiedlichen nicht-zytotoxischen Konzentrationen von C₂-Cer=O, C₂-Cer=S und FS-5 in RPMI mit 10 % FCS behandelt. Nach 48 h zeigte sich wie in Abb. 22 dargestellt, daß C₂-Cer=S mit einer halbinhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 10 µg/ml das Analogon mit der stärksten antiproliferativen Wirkung ist. C₂-Cer=O wirkte ebenfalls deutlich antiproliferativ, wobei IC₅₀ 20 µg/ml betrug. FS-5 wirkt schwächer. Jedoch wurde das Zellwachstum bei einer Konzentration von 40 µg/ml um 30 % gehemmt. Zusätzlich wurde die Kinetik der Ceramid-induzierten Proliferationshemmung der HaCaT-Zellen bestimmt. Das Ergebnis in Abb. 23 zeigt, daß die Wachstumshemmung durch die Ceramidanaloga bereits nach 24 h einsetzt.

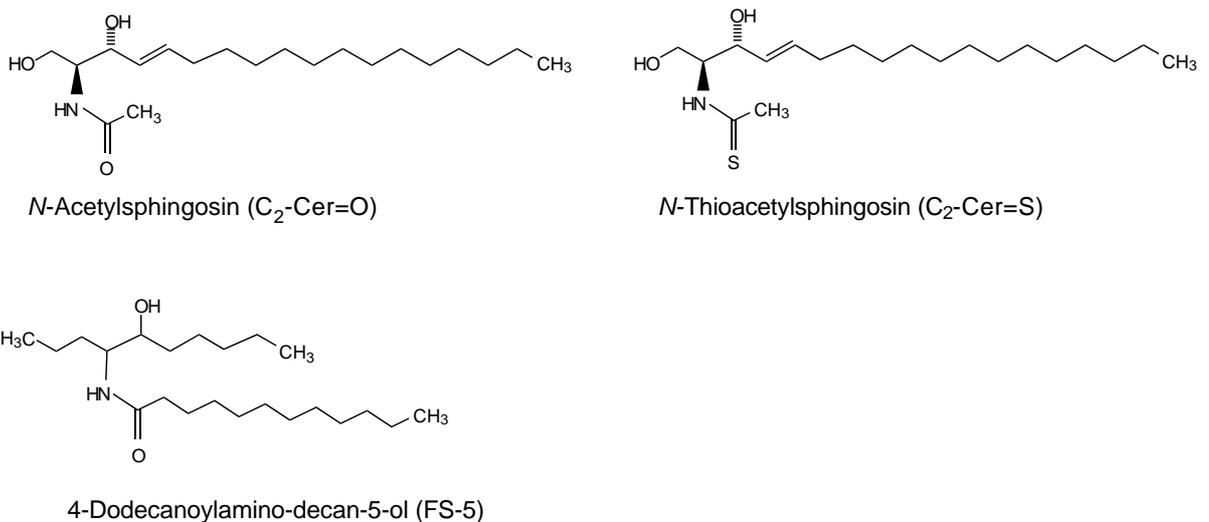
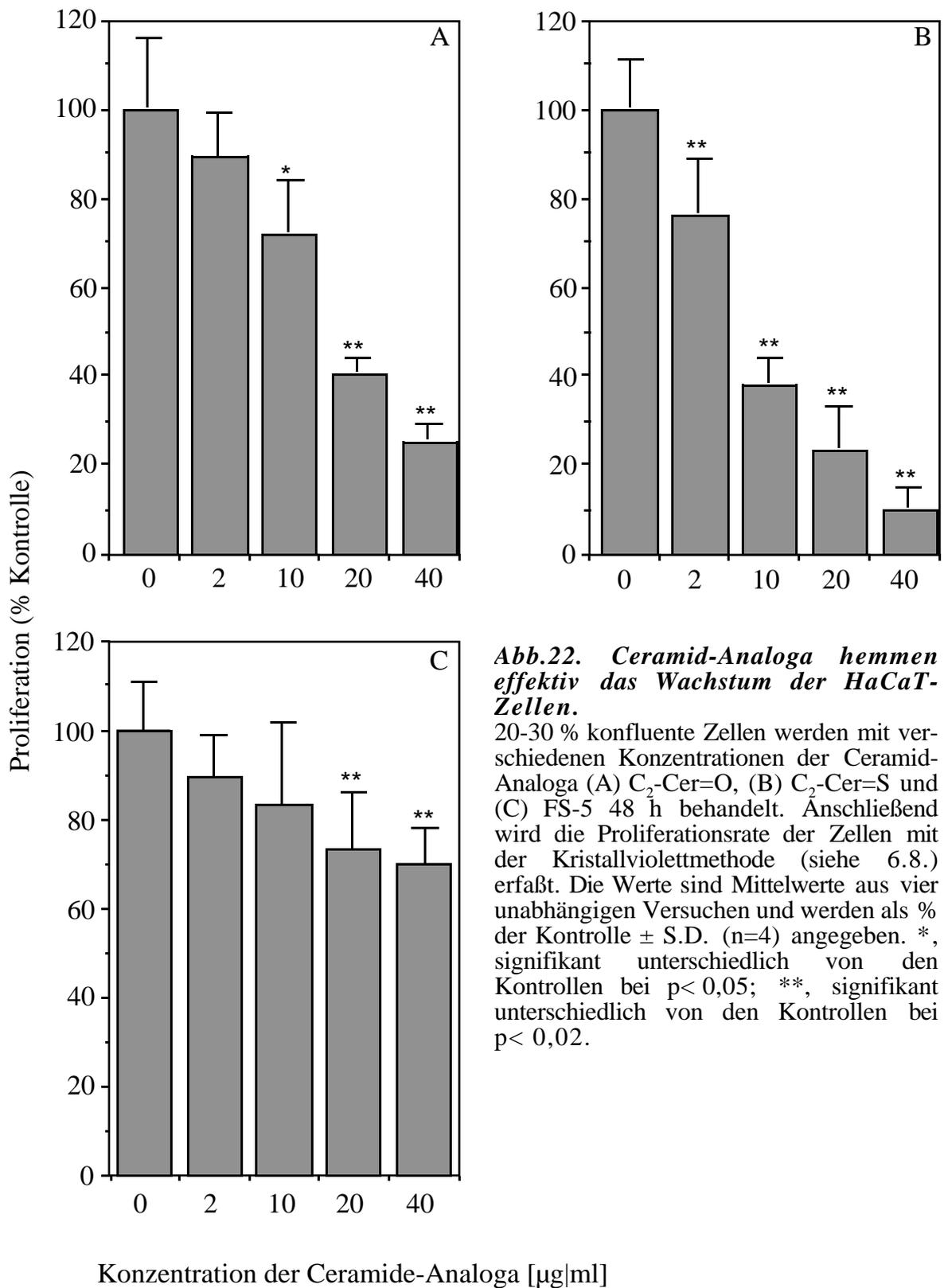


Abb. 21. Chemische Struktur der Ceramid-Analoga.



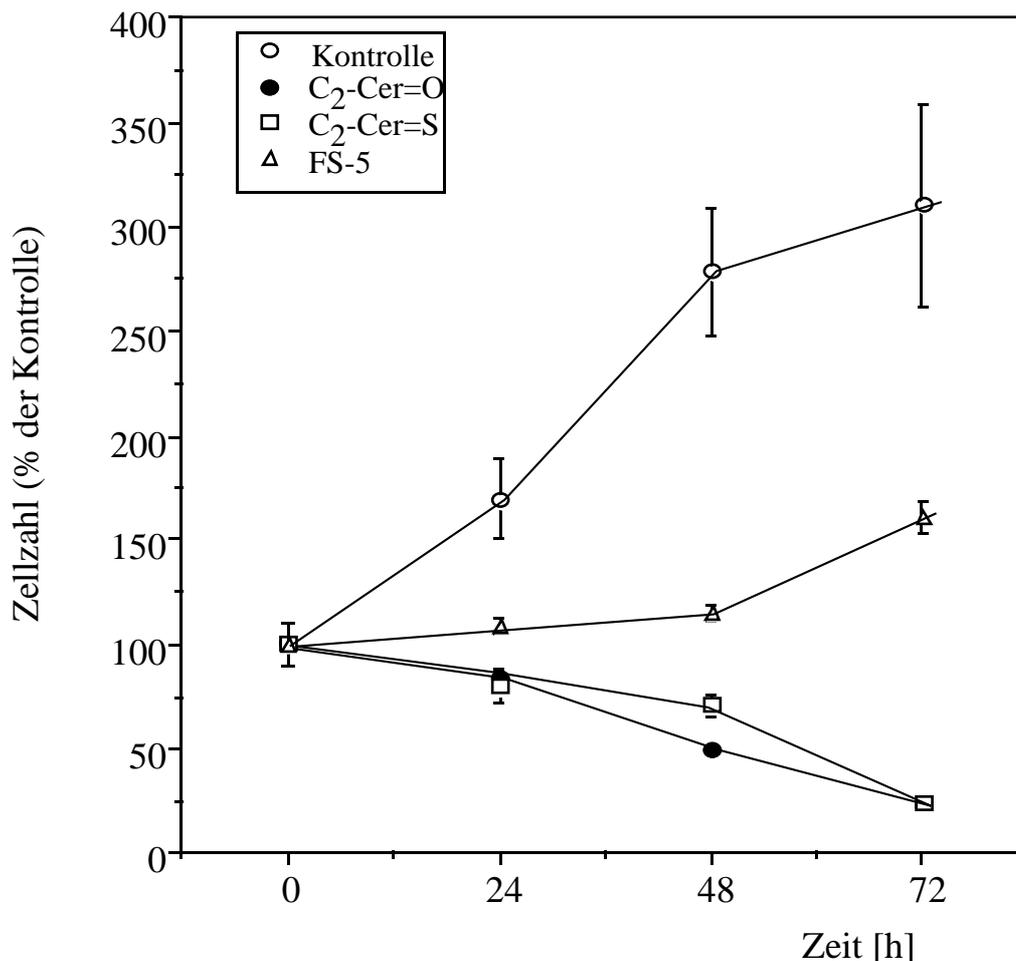


Abb.23. Zeitabhängige Proliferationshemmung durch Ceramidanaloga. 20-30 % konfluente HaCaT-Zellen werden mit 20 µg/ml C₂-Cer=O, C₂-Cer=S und mit 40 µg/ml FS-5 inkubiert. Kontrollzellen werden mit Ethanol und Methanol behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wird die Proliferation mit der Kristallviolettmethode (siehe 6.8.) gemessen. Zellzahlen werden als % der Kontrolle ± S.D. (n=4) angegeben.

2.13. Ceramid-Analoga lösen Apoptose in HaCaT-Zellen aus

Die Ceramid-Analoga wurden auf ihre Fähigkeit, Apoptose in HaCaT-Zellen zu induzieren, untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt. Nach 18 h Behandlung der HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen nicht-zytotoxischen Konzentrationen von den jeweiligen Ceramid-Analoga bzw. mit Kontrollmedium, zeigte sich, daß C₂-Cer=S und C₂-Cer=O die Apoptoserate signifikant steigerte. Bei der Konzentration von 20 bzw. 40 µg/ml C₂-Cer=O bzw. C₂-Cer=S stieg die Apoptoserate auf das Dreifache des Kontrollwertes. FS-5 ist ein schwacher Agonist der Apoptose in HaCaT-Zellen, jedoch ist die gemessene Apoptoserate bei Konzentrationen von 2 bis 40 µg/ml signifikant über dem Kontrollwert. Der Abfall der Apoptoserate bei

40 µg/ml C₂-Cer=O-Behandlung ist auf die sekundäre Nekrose zurückzuführen. Die Zellmembran der apoptotischen Vesikel bleibt im Gegensatz zu nekrotischen Zellen intakt. *In vivo* werden diese apoptotischen Fragmente von Makrophagen oder den benachbarten Zellen phagozytiert. In der terminalen Phase der *in vitro* Apoptose jedoch schwellen die Zellfragmente an und lysieren letztendlich, so daß die Messung verfälscht wird. Als Schlußfolgerung ist festzuhalten, daß alle drei getesteten Ceramidanaloga in HaCaT-Zellen Apoptose auslösen, wobei FS-5 im Gegensatz zu C₂-Cer=O und C₂-Cer=S ein schwacher Agonist ist.

