

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Regulation des Fettsäuremetabolismus in den SZ95-Sebozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Frau Silvia Angres
aus Frankfurt/Oder

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. C. Zouboulis
2. Prof. Dr. med. A. Pfeiffer
3. Prof. Dr. med. S. R. Bornstein

Datum der Promotion: 19. März 2010

Abstract

In this work is examined, whether there are substances which can regulate the sebum production and affects the inflammatory process in SZ-95-sebocytes. For this the fatty acid synthesis enzymes SCD, FADS2, and TLR2 as a receptor, were involved in the inflammatory process tested with RT-PCR and Western Blot.

To verify the effects on the inflammatory process the synthesis of the pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8), and of the neuroendocrine hormone CRH, were tested by using ELISA.

Treatment of the SZ95-sebocytes with the ω -6-fatty acids linoleic acid (LA) and arachidonic acid (AA) led to an increased IL-6 release and an increased transcription and translation of the SCD gene. Furthermore, linoleic acid up-regulated the expression of the FADS2 in SZ-95 sebocytes and is therefore able to promote their own metabolism to arachidonic acid, the precursor for prostaglandins and leukotrienes. Treatment of arachidonic acid led to a reduction of the FADS2 expression by a negative-feedback mechanism. It seems that arachidonic acid as an end product in the fatty acid metabolism can inhibit its own synthesis enzyme.

This data shows that ω -6 fatty acids influence their own metabolism. Furthermore, they influence the inflammatory process indirectly by their metabolites (prostaglandins and leukotrienes) and directly by production of pro-inflammatory cytokines. Altogether it is shown, that treatment with ω -6 fatty acids stimulates the inflammation pathways in SZ95-sebocytes.

Treatment with the SCD-inhibitor NVP-LCF369 reduced the LA/testosterone up-regulated or MALP up-regulated SCD and FADS mRNA levels. To what extent a systemic or topical use of NVP-LCF369 can be used as a treatment for diseases associated with seborrhoea (e.g. acne) should be examined in further studies.

Dexamethasone, a glucocorticoid, used as a control, did not show the expected anti-inflammatory effects. It reduced the IL-6 and IL-8 production

significantly, but did not have the expected suppressive effect on the SCD-FADS2- and TLR2-expression. The clinical symptoms of long-term use of steroids (e.g. skin atrophy, decelerated wound healing) are probably caused by a lack of antibacterial monounsaturated fatty acids (MUFA). This should be realized by suppression of the SCD-gene. This effect could not be shown in this work after 24 hour treatment with dexamethasone. It seems necessary that long-term effects are examined by long-term in vitro studies.

CRH-synthesis in SZ95-sebocytes was stimulated by MALP-2 (a selective TLR2-agonist) and CRH itself. CRH treatment influenced the lipid and inflammatory signalling pathway in terms of a changed SCD-, FADS2- and TLR2-expression. This data shows that CRH as a neuroendocrine mediator affects the lipid metabolism directly by affecting the expression of lipogenic enzymes. This supports the model of a peripheral stress axis, which shows that CRH is not only able to act in the CNS, but in the peripheral tissue as well. By using this model it is possible to explain pathomechanisms of skin diseases.

The data shows that CRH affects the sebum production of the SZ95-sebocytes by affecting the lipid metabolism and intensifies the inflammatory response. This strengthens the concept of a peripheral stress mechanism.

„Für Andy“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1	Die Toll-like Rezeptoren (TLR)	1
1.2	Das adaptive Immunsystem	4
1.3	Der Toll-like Rezeptor: Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität	4
1.4	Zytokine	5
1.4.1	Interleukin-6	7
1.4.2	Interleukin-8	7
1.5	Erläuterungen zu den experimentell genutzten Testsubstanzen	8
1.5.1	Corticotropin-releasing Hormon (CRH)	8
1.5.2	Dexamethason	11
1.5.3	PMA	12
1.5.4	ω -6-Fettsäuren	12
1.5.5	MALP-2	13
1.5.6	NVP-LCF 369	14
1.6	Die Kernfaktoren SREBP, PPAR, NF- κ B und C/EBP	14
1.6.1	SREBP	14
1.6.2	PPAR	15
1.6.3	NF- κ B	17
1.6.4	C/EBP	18
1.7	Desaturasen	19
1.7.1	Δ -9 Desaturase / Stearoyl-CoA Desaturase	20
1.7.2	Δ -6 Desaturase / Fatty-acid Desaturase 2 (FADS2)	22

2	Fragestellung	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Zellkultur	27
3.1.1	Zellkulturbedingungen	28
3.1.2	Passagierung	28
3.1.3	Das Umsetzen der Zellen in 6-Well-Platten	29
3.2	Behandlung der SZ95-Sebozyten	29
3.3	Zytotoxizitätstest (LDH-Assay)	30
3.4	Total-RNA Isolation	32
3.5	Messung der RNA-Menge	33
3.6	Reverse Transkription	34
3.7	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction (PCR))	36
3.8	Agarose Gel Elektrophorese	38
3.9	IL-6-ELISA und IL-8-ELISA	39
3.10	CRH-ELISA (Corticotropin releasing Hormon - ELISA)	42
3.11	Proteinextraktion aus den SZ95-Sebozyten	43
3.12	Quantitative Proteinbestimmung	43
3.13	Western Blot	45
3.13.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.13.2	Transfer	47
3.13.3	Detektion der Antigene	48
3.14	Statistische Methoden	51
4	Ergebnisse	53
4.1	LDH-Assay	53
4.2	IL-6 / IL-8 Elisa	55
4.2.1	PMA	56
4.2.2	Dexamethason	56
4.2.3	CRH	56
4.2.4	Linolsäure	58
4.2.5	Arachidonsäure	59
4.2.6	MALP-2	60

4.2.7	NVP-LCF369	61
4.3	CRH-ELISA	64
4.3.1	CRH	65
4.3.2	MALP-2	65
4.4	PCR und Western Blot	66
4.4.1	PMA	66
4.4.2	Dexamethason	71
4.4.3	CRH	75
4.4.4	Linolsäure	79
4.4.5	Arachidonsäure	84
4.4.6	MALP-2	88
4.4.7	NVP-LCF369	93
5	Diskussion	97
5.1	Die Haut - ein immunologisches Organ	97
5.2	Bedeutung von Fettsäuren in der Haut	98
5.3	Der Effekt von den ω -6-Fettsäuren: Linolsäure und Arachidonsäure auf den Fettsäuremetabolismus in den SZ95-Sebozyten	99
5.3.1	Effekt von Linolsäure auf die SCD und FADS2 auf SZ95-Sebozyten	100
5.3.2	Der Effekt von Arachidonsäure auf die SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten	103
5.4	Der Effekt von MALP-2, PMA und CRH auf den Entzündungsstatus der SZ95-Sebozyten	105
5.5	Der Effekt von Linolsäure und Arachidonsäure auf den Entzündungsstatus der SZ95-Sebozyten	109
5.6	Der Effekt von Dexamethason auf die SZ95-Sebozyten	112
6	Zusammenfassung	115
	Literaturverzeichnis	125
	Abbildungsverzeichnis	137

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem von Säugern besteht aus zwei Systemen, der angeborenen und der erworbenen bzw. adaptiven Immunität. Das unterscheidet sie von den restlichen Spezies, die alle nur die angeborene Immunität besitzen.

Das angeborene Immunsystem ist unspezifisch und agiert als erste Abwehrlinie. Dieser Teil des Immunsystems besteht, wie auch das adaptive Immunsystem, aus zellulären und humoralen Komponenten. Zu den zellulären Anteilen zählen spezielle antigenpräsentierende Zellen (APZ) und natürliche Killerzellen (NK). Die Aufgabe dieser Zellen ist die Phagozytose von Pathogenen verschiedener Klassen – Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren. Lange Zeit war unbekannt, wie diese Zellen Körperfremdes überhaupt erkennen. Man fand aber bei *Drosophila melanogaster* ein Rezeptor, den Toll-Rezeptor, der den Wirt vor Pilzinfektionen schützte [34]. Zum Toll-Rezeptor wurde wenig später ein menschliches Homolog entdeckt und als Toll-like Rezeptor (TLR) bezeichnet [39]. Der humorale Anteil der angeborenen Immunität wird von Zytokinen und Chemokinen gebildet.

1.1.1 Die Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die Toll-like Rezeptoren gehören zu den pattern recognition receptors (PRRs). Sie erkennen bestimmte molekulare Muster von Pathogenen (PAMPs; Pathogen-

Associated Molecular Patterns). Die PAMPs sind konservierte mikrobiologische Strukturen oder Stoffwechselprodukte von Mikroben. Die Mustererkennung hat sich bewährt, denn sie ist evolutionär sehr alt. Beim Menschen wurden bis heute 10 unterschiedliche TLRs entdeckt.

Die Toll-like Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine und unterscheiden sich in ihrem Vermögen unterschiedliche Strukturen zu erkennen.

TLR2

TLR2 erkennt eine große Vielzahl von mikrobiellen Komponenten. Lipoproteine/Lipopeptide von verschiedenen Pathogenen bewirken eine Aktivierung [2], ebenso Bestandteile von Gram-positiven Bakterien, wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäure [56]. Von Gram-negativen (nicht Entero-) Bakterien erkennt der TLR2 atypische Lipopolysachharide (LPS) [21, 61, 66]. So führt z. B. das LPS von *Helicobacter pylori* über TLR2 zu einer NF- κ B- oder AP-1 Aktivierung und zu einer Expression von Chemokinen (IL-8, MIP-3 α , GRO α). Zu den Liganden für den TLR2 zählen außerdem das Zymosan aus Pilzen [65], Porine von Neisserien [38] und körpereigene Hitze-Schock-Proteine [4].

Der TLR2 erkennt eine so große Anzahl von Liganden, weil er Heterodimere mit anderen TLRs bildet. So erkennt das Heterodimer TLR1/TLR2 Triacyllipopeptide und TLR2/TLR6 Diacyllipopeptide.

Die Signalkaskade

Am Ende der Signaltransduktion nach Aktivierung des TLR2 steht die Aktivierung von NF- κ B. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der sich normalerweise in einer inaktiven Form im Zytoplasma befindet. In dieser inaktiven Form wird NF- κ B durch inhibitorische Proteine (I κ B) gehalten. Erst die Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins durch die IKK und die anschließende Proteolyse durch das Proteasom, bewirkt die Freisetzung von NF- κ B, das dann in den Zellkern wandert. Dort induziert es die Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen.

NF- κ B wird nicht nur vom Toll-like Rezeptor-Signalweg als Transkripti-

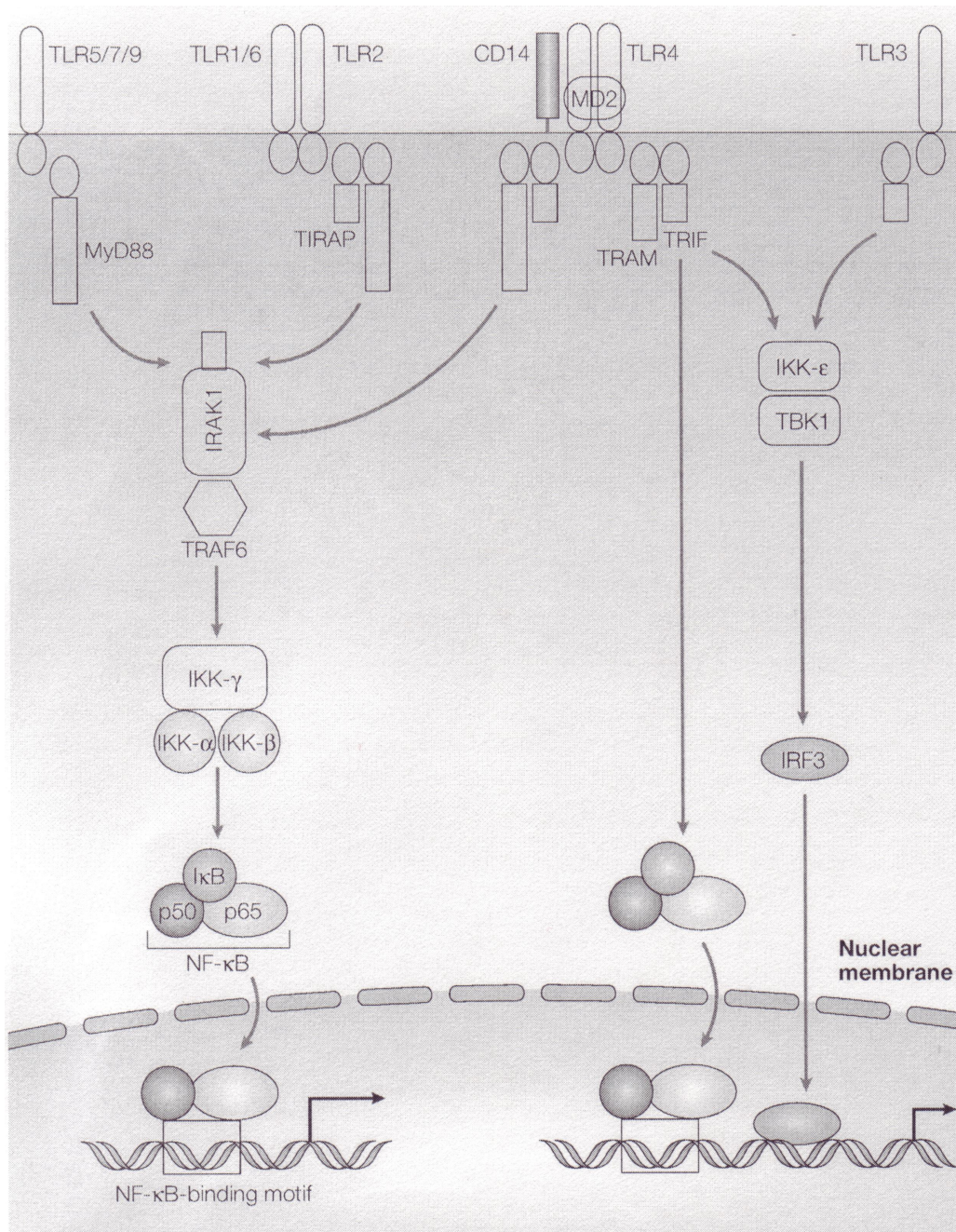


Abbildung 1.1: Signalweg der TLR (aus Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signaling. Nature Reviews Immunology. 2004;4:499-511)

onsfaktor benutzt, sondern er befindet sich auch im Signalweg des T-Zell-Rezeptors. Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$, führen ebenfalls zur Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Der Punkt, an dem die Signalwege konvergieren ist die IKK [35].

1.2 Das adaptive Immunsystem

Zum adaptiven Immunsystem zählen B- und T-Lymphozyten. Der wesentliche Unterschied zu den Zellen der angeborenen Immunität ist, dass die B- und T-Lymphozyten durch somatisches Rearrangement (und genetische Rekombination) eine hohe Vielfalt von Antigenrezeptoren bilden können. Mit diesen Antigenrezeptoren, können sie auch eine Vielzahl von Antigenen sehr spezifisch erkennen. Im Gegensatz dazu, erkennen die Rezeptoren der Zellen der angeborenen Immunität, die Toll-like Rezeptoren (TLR), nur bestimmte molekulare Muster.

1.3 Der Toll-like Rezeptor: Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Die T- und B-Lymphozyten sind erst unreif und nicht aktiv. Damit eine unreife T-Zelle reifen kann, benötigt sie drei Signale, die gleichzeitig auftreten müssen.

Diese Signale liefern Zellen der angeborenen Immunabwehr. Solche Zellen sind z.B. dendritische Zellen (DC), die zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) zählen. Die DC ist zuerst selbst eine unreife Zelle. Sie befindet sich in der Peripherie und scannt ihre Umgebung nach Pathogenen ab. Auf ihrer Oberfläche sind nur wenig MHC und CD-Rezeptoren exprimiert. Dafür besitzt sie Toll-like Rezeptoren. Wenn die TLRs durch ein Pathogen aktiviert werden reifen sie. In diesem Reifungsprozess werden verstärkt MHC und CD80/CD86 auf der Oberfläche exprimiert. Die DC phagozytieren das Pathogen, zerlegen es im Proteasom, einem Enzymkomplex, in kleine Pepti-

de und präsentieren diese Peptide auf die nun reichlich vorhandenen MHC. Die auf der Oberfläche der DC vorhandenen CD80 und CD86 gelten als co-stimulatorische Moleküle, bei der Aktivierung der T-Zellen. Erkennt jetzt eine T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) die fremden Peptide auf der Oberfläche der DC, dann verbindet sich der TZR mit dem MHC. Zusätzlich muss sich das CD80/CD86 der DC mit einem CD28 der T-Zelle verbinden. Aber auch das reicht nicht für eine Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle aus. Es müssen außerdem über einen TLR und dessen Signalweg Zytokine produziert werden, die die Stimulation der T-Zelle komplett machen. So lässt das IL-12 die unreife T-Zelle in eine T-Helferzelle 1 (T_{h1}) reifen. Ebenso wird IL-6 von der DC abgegeben, damit sich die nun reifende T-Zelle gegen die T-Suppressor-Zellen (T_{supp}) wehren kann.

Bei den B-Lymphozyten verhält es sich etwas anders. Abgesehen von den B-Zell-Rezeptoren (BCR), die, den T-Lymphozyten ähnlich, eine hohe Diversität aufweisen, besitzen sie auf ihrer Oberfläche auch viele Toll-like Rezeptoren. Wird ein TLR zusammen mit einem BCR durch ein Pathogen aktiviert, dann führt das zu einer B-Zell-Proliferation. Es entstehen Plasmazellen, die Antikörper (AK) gegen das Pathogen synthetisieren und sezernieren. Die abgegebenen AK können an das Pathogen binden und markieren es dadurch für Makrophagen.

1.4 Zytokine

Der Begriff „Zytokine“ ist eine Sammelbezeichnung für eine Gruppe von strukturell und funktionell unterschiedlichen Proteinen und Peptiden. Es sind hormonähnliche Signalstoffe, von denen bisher mehr als 15 verschiedene Gruppen bekannt sind. Sie spielen als Mediator eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen, insbesondere bei der Immunmodulation und -regulation, der Entzündung und der Hämatopoese. Zytokine werden je nach ihrer Herkunft benannt: Interleukine, Monokine und Lymphokine. Sie sind an Prozessen der Zellaktivierung, -differenzierung, -proliferation und interzelluläre Interaktionen beteiligt und beeinflussen sich gegenseitig in einem Netzwerk aus Inhibition und Induktion. Sie wirken para-, auto- und endokrin.

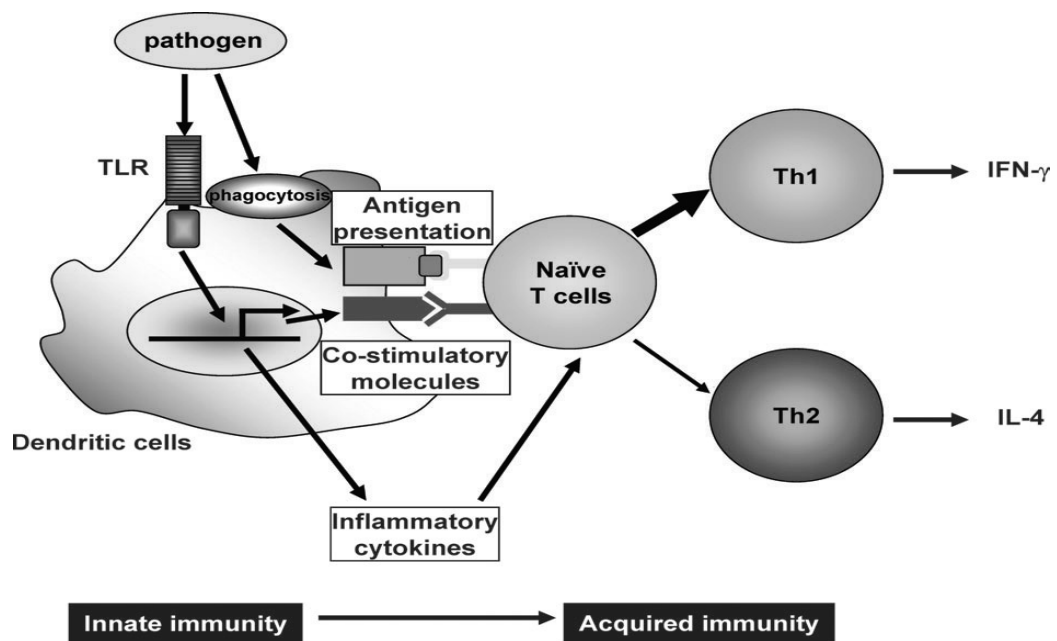


Abbildung 1.2: Angeborene und adaptive Immunität. Zellen der angeborenen Immunität, wie dendritische Zellen und Makrophagen phagozytieren Pathogene und präsentieren den naiven T-Zellen Bruchstücke der Pathogene auf ihren Oberflächen. Zusätzlich werden durch die Aktivierung über den Toll-like-Rezeptor Gene aktiviert, die für co-stimulatorische Moleküle und inflammatorische Zytokine codieren. Die Phagozytose vermittelte Antigenpräsentation, zusammen mit der TLR vermittelten Expression von co-stimulatorischen Molekülen, bewirkt die Entwicklung von antigenspezifischer Immunität (aus Takeda, K. Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunology* 2005;17:1-14).

Die Expression der Zytokine ist streng reguliert. Sie werden hauptsächlich bei Bedarf und als Antwort auf einen physiologischen Stimulus synthetisiert. Einige Zytokine wirken dabei autoregulatorisch auf ihre eigene Produktion, indem sie z.B. die Produktion entsprechender Rezeptoren oder die Produktion anderer Zytokine modulieren.

1.4.1 Interleukin-6

Das Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotrop wirksames Zytokin. Es kann verschiedene Effekte an unterschiedlichen Zielzellen gleichzeitig hervorrufen. Der IL-6 Rezeptor wird von aktivierten B-Zellen, peripheren Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen, Gliazellen, Keratinozyten, Sebozyten und einigen Tumorzellen exprimiert [3]. IL-6 wird bei der antigenspezifischen Immunantwort, inflammatorischen Reaktionen und Gewebeverletzungen gebildet.

Die wichtigsten Funktionen von IL-6 sind:

- Induktion der Akut-Phase Proteine in Hepatozyten
- Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten
- Aktivierung von unreifen T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen
- Angiogenesefaktor

Als physiologische Stimuli für die Freisetzung von IL-6 gelten: IL-1, $\text{TNF}\alpha$, Phorbolster und bakterielle Endotoxine, wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS). IL-6 wirkt ebenso wie IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ durch das aus dem Hypothalamus kommende Corticotropin-releasing-hormon (CRH) und über Adrenocorticotropin ACTH auf die Glucokortikoidsynthese.

1.4.2 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) wird vor allem von aktivierten Makrophagen in Reaktion auf bakterielle Produkte und Bestandteile von Bakterien gebildet. IL-8 kann

aber auch von anderen Zelltypen gebildet werden: Keratinozyten, Monozyten, Hepatozyten, Sebozyten und Endothelzellen [3]. Stimuliert werden kann die Synthese von IL-8 durch $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, während die Synthese durch Glucokortikoide gehemmt wird. IL-8 wirkt chemotaktisch auf Granulozyten und einige T-Zellen.

1.5 Erläuterungen zu den experimentell genutzten Testsubstanzen

Bei den Experimenten wurde ein *in vitro* System aus SZ95-Sebozyten benutzt. Die Zellen wurden verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Anschließend wurde der Entzündungsstatus und die Menge an Fettsäuresyntheseenzymen der SZ95-Sebozyten kontrolliert. Hierbei werden die Sebozyten auf gebildete Zytokine, CRH, Toll-like Rezeptor (TLR) 2 und Enzyme der Fettsäuresynthese: Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) und Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2) untersucht.

Die hierfür verwendeten Testsubstanzen sind Corticotropin-releasing Hormone (CRH), Dexamethason, PMA, MALP-2 und die ω -6 Fettsäuren: Linolsäure, Arachidonsäure und NVP-LCF 369.

1.5.1 Corticotropin-releasing Hormon (CRH)

Das CRH-Gen besteht aus 2 Exons und einem dazwischen liegenden Intron. Vor dem Gen liegt die Promotorregion, die verschiedene regulatorische Elemente enthält. Hierzu zählen das cAMP-responsive Element (CRE), das Phorbol-Ester responsive Element (TRE), das Glucokortikoid responsive Element (GRE), das Östrogen responsive Element (ERE) und die TATA-Box, die durch cAMP, TPA und Glucokortikoide reguliert werden kann. Das fertige CRH ist ein Peptidhormon, bestehend aus 41 Aminosäuren.

CRH im Zentralen Nervensystem

Das Corticotropin-releasing Hormon wird im ZNS im Hypothalamus, im dortigen Nucleus paraventricularis, gebildet. Die Produktion von CRH wird zum einen durch verschiedene Neuropeptide und Neurotransmitter stimuliert. Zu ihnen zählen Serotonin, Acetylcholin, Histamin, Noradrenalin, Adrenalin, Vasopressin, Neuropeptide und Leptin. Des Weiteren zählen die Zytokine (IL-1, IL-6, TNF α), die von immunkompetenten Zellen der angeborenen Immunität abgegeben werden, zu den Stimulatoren der CRH-Freisetzung im Hypothalamus. Und schließlich wird die CRH-Expression kontrolliert durch cAMP und DAG-abhängige Signalwege. Nach Sekretion erreicht das CRH über portale Venen die Hypophyse. In der Hypophyse wird das Proopiomelanocortin (POMC) gebildet. Dieses große Vorläufermolekül beinhaltet mehrere Peptidhormone: das adrenocorticotrophe Hormon (ACTH), das Melanin stimulierende Hormon (MSH) und das β -Endorphin. Nach Stimulation der Hypophyse durch CRH, wird ACTH gebildet und freigesetzt. Über die Blutbahn gelangt es zu den Nebennieren. Dort bewirkt das ACTH eine Freisetzung von Glucokortikoiden aus der Nebennierenrinde. Der Name dieses Signalwegs, der letztendlich zur Glucokortikoidfreisetzung führt, leitet sich von den Namen der anatomischen Strukturen ab, den er durchläuft: Hypothalamus-Hypophysen-adrenale Achse (HPA-Achse).

CRH in der Haut

CRH und CRH-Rezeptoren (CRH-R) werden nicht nur im ZNS, sondern auch in vielen peripheren Geweben und Organen gebildet. Dazu zählen Pankreas, Leber, Gastrointestinaltrakt, Skelettmuskulatur, endokrine Organe und die Haut.

Der Organismus ist verschiedenster Umweltnoxen ausgesetzt, wie z.B. UV-Strahlung, biologische und chemische Pathogene. Diese Noxen erreichen primär nicht das ZNS, sondern das Organ, das der Umwelt unmittelbar ausgesetzt ist: die Haut.

Die Haut ist ein peripheres neuroendokrines Organ. Beim Menschen wurden u.a. in Keratinozyten, Melanozyten und Sebozyten CRH und

CRH-Rezeptoren (CRH-R) nachgewiesen [60, 81]. Es wurden auch POMC-entstammende Peptide, wie z.B. ACTH, gefunden. Damit präsentiert sich die Haut als ein Analogon zur HPA-Achse.

Hautzellen und ansässige Immunzellen bilden proinflammatorische Zytokine und CRH. Auch das in der Peripherie gebildete CRH hat, anders als im ZNS, proinflammatorische Wirkung und führt dort zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Im Sebozyten bewirkt CRH eine IL-6 und IL-8 Ausschüttung und eine vermehrte Produktion von Neutralfetten [31].

CRH wirkt dabei über einen CRH-Rezeptor, von dem es Subtypen (CRH-R1 und CRH-R2) gibt. Auf die Aktivierung dieses Rezeptors können drei verschiedenen Signalwege folgen: Erstens kommt es zu einer nachfolgenden Aktivierung der Adenylatcyclase (AC). Dieses Enzym katalysiert die Bildung von zyklischem AMP (cAMP). Das cAMP phosphoryliert die Proteinkinase A (PKA). Die PKA phosphoryliert vermutlich das I κ B und bewirkt sekundär die Transduktion des nun freien NF- κ B in den Zellkern [73]. Dort kommt es zu einer Transkription von Genen, die am Entzündungsprozess beteiligt sind. Zweitens bewirkt eine CRH-R Aktivierung die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die PLC spaltet das in der Zellmembran vorhandene Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) in das Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). Die DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und das IP₃ zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Spiegel.

Als dritte Möglichkeit wird eine direkte Interaktion der CRH-R mit Ca-Kanälen angegeben [59].

Die CRH-Produktion in Hautzellen (speziell Melanozyten und Melanomzellen) wird durch UV-B-Strahlung hochreguliert und durch Dexamethason herunterreguliert. Diese Regulation ist vermutlich das Ergebnis einer posttranskriptionalen Modifizierung [59].

Es scheint, dass sowohl am Ende des Toll-like Rezeptor- und des CRH-Signalwegs eine Zytokinproduktion steht. Die abgegebenen Zytokine haben primär eine proinflammatorische Wirkung, führen aber sekundär zu einer Aktivierung der HPA-Achse. Das führt wiederum zu einer Produktion und Ausschüttung von Glucokortikoiden, die eine in der Haut entstandene Entzündung eingrenzen kann und das lokale Gleichgewicht wiederherstellt.

1.5.2 Dexamethason

9-Fluor-16 α -methylprednisolon (kurz: Dexamethason) ist ein Glucokortikoid (GC) und zählt zu den Kortisol-Derivaten. Dexamethason hat antiphlogistische, antiallergische und immunsuppressive Wirkungen.

Der molekulare Wirkmechanismus beginnt mit der Anlagerung des Glucokortikoids an einen zytosolischen Rezeptor. Dieser Ligand-Rezeptorkomplex transloziert in den Zellkern und kann mit der DNA interagieren, sofern sie ein Glucocorticoid-responsive element (GRE) enthält. Als Folge werden antiinflammatorische Proteine gebildet, dazu zählen Lipocortin und das I- κ B. Der Ligand-Rezeptorkomplex, kann sich aber auch an Transkriptionsfaktoren, wie das AP-1 oder das NF- κ B anlagern und sie somit inaktivieren. Die Expression zahlreicher Gene, die durch diese Transkriptionsfaktoren stimuliert werden, wird damit verhindert. Proinflammatorische Proteine wie z.B. die Phospholipase A2, die 5-Lipoxygenase, die Cyclooxygenase (COX), IL-2 und der IL-2 Rezeptor werden vermindert gebildet.

Ein anderer möglicher Wirkmechanismus ist über die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration, durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) und einer Hemmung der Phosphodiesterase [5].

Dexamethason wird in der dermatologischen Therapie z.B. bei Patienten mit Psoriasis und atopischer Dermatitis angewandt. Generell werden sie dort zu Behandlung von entzündlichen, aber nicht infektiösen Hauterkrankungen eingesetzt.

Eine Therapie mit Dexamethason hat, abgesehen vom gewollten immunsuppressiven Effekt, auch negative Effekte. So unterdrückt das Dexamethason die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, was sekundär zu einer erhöhten Kolonisierung der Haut mit *S. aureus* führt und das Risiko von Infektionen erhöht [20]. Die zu beobachtende Atrophie der Haut durch GC, wird durch die Suppression von Genen der Hyaluronsäure-Synthese-Enzyme und des Elastins in Fibroblasten verursacht [76, 26]. In Sebozyten senken Glucokortikoide die Lipidsynthese nach 7 Tagen [9].

1.5.3 PMA

Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), auch bekannt unter dem Namen 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat (TPA) erhöht die intrazelluläre DAG, aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und daher auch das NF- κ B. Ebenso aktiviert es Gene, die TPA-responsive elements (TRE) enthalten. Da z.B. die Promotorregion des CRH-Gens ein TRE enthält, kann TPA die CRH-Produktion erhöhen. Gene, die durch NF- κ B aktiviert werden, sind am Entzündungs-geschehen beteiligt. Hierzu zählen z.B. COX2, Zytokine, NO-Synthase, MMP und Chemokine. Abgesehen von den typischen NF- κ B Aktivatoren (IL-1, TNF α , LPS, dsRNA, TPA), gibt es auch atypische Aktivatoren. So wird NF- κ B z.B. durch Hypoxie und durch UV-Strahlung aktiviert. Diese verschiedenen Aktivierungswege konvergieren an der IKK α .

1.5.4 ω -6-Fettsäuren

ω -6-Fettsäuren sind ungesättigte Fettsäuren (FS). Dabei bedeutet ω -6, dass sich am sechstletzten C-Atom, ausgehend vom Carboxylende der Kohlenstoffkette, die letzte Doppelbindung befindet. Bekannte ω -6-Fettsäuren sind die PUFAs Arachidonsäure (20:4) und die Linolsäure (18:2).

Arachidonsäure wird in vielen Geweben und Zelltypen in die Phospholipide von Zellmembranen eingebaut und ist dort das Ausgangssubstrat für den Eicosanoid-Signalweg. Die veresterte Arachidonsäure in den Phospholipiden ist eine Speicherform [77]. Unter Stimulation oder bei Zellschäden, wird die Arachidonsäure mittels Phospholipase aus den Phospholipiden herausgelöst werden und wird dann durch die COX und Lipooxygenase in Eicosanoide umgewandelt. Eicosanoide wirken als autokrine und parakrine Hormone und vermitteln eine Vielzahl von lokalen Reaktionen, wie z. B. Entzündung [17].

PUFAs bewirken je nach Zelltyp unterschiedliche Effekte. So kann die Arachidonsäure (AA), oder deren Metabolite in Promonozyten den NF- κ B aktivieren, während eine Behandlung mit Eicosapentaensäure (EPA), einer ω -3-FS, keinen Effekt verursachte [8]. In dendritischen Zellen (DC), die eine essentielle Rolle, in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems spielen, wurde beobachtet, dass eine Gabe von ω -3- und ω -6-Fettsäuren zu einer

Hemmung in der Reifung dieser Zellen führt. Die Fettsäuren hemmen die Aktivierung der DC durch LPS, das wird aber, im Gegensatz zu den Promonozyten, nicht durch Beeinflussung des NF- κ B. verursacht. Ebenso verändern die Fettsäuren die Prostaglandin Produktion. Hemmt man aber die für Prostaglandin-Synthese notwendigen Enzyme, so wird der Effekt, der ω -3-FS und ω -6-FS, dennoch nicht abgeschafft. So kann man davon ausgehen, dass der Effekt auf dendritische Zellen nicht NF- κ B- oder Eicosanoid-abhängig ist [74]. Es gibt demnach unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des molekularen Wirkmechanismus.

Die direkte Bindung von Fettsäuren oder deren Metabolite ist dokumentiert für die Kernfaktoren PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors), LXR α (Liver X Receptors), HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor-4), RXR α und RAR. Indirekte Effekte von Fettsäuren wurden auf folgende Kernfaktoren beobachtet: SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) und NF- κ B [24].

Die Behandlung von SZ95-Sebozyten mit den PUFAs Arachidonsäure und Linolsäure steigert die Lipogenese und führt zu einer größeren Anzahl der Fetttröpfchen im Zytoplasma [9, 69].

1.5.5 MALP-2

MALP-2 (Macrophage-activating lipopeptide-2) ist ein spezifischer Ligand für den Toll-like Rezeptor (TLR) 2/4 und führt damit zu einer Aktivierung von Makrophagen und anderen Zellen der angeborenen Immunität. Makrophagen und dendritische Zellen (DC) reagieren auf den Stimulus MALP-2 mit einer Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF α . In T-Helferzellen bewirkt MALP-2 eine verstärkte Expression von Oberflächenantigenen (CD40, CD80, CD83, CD86), die als co-stimulatorische Moleküle das adaptive Immunsystem aktivieren können.

MALP-2 führt hauptsächlich zu einer Aktivierung von NF- κ B, allerdings wurde auch gezeigt, dass es über andere Kinasen die Transkriptionsfaktoren CREB, c-fos, c-jun und PPAR γ aktivieren kann.

1.5.6 NVP-LCF 369

NVP-LCF 369 ist eine Testsubstanz von Novartis, welche selektiv die Stearoyl-CoA Desaturase hemmen soll.

1.6 Die Kernfaktoren SREBP, PPAR, NF- κ B und C/EBP

Fettsäuren sind ubiquitär vorkommende Moleküle. Sie sind als Membranbestandteile, als Signalmoleküle (z.B. Ceramide, Diacylglyceride und Eicosanoide) und als Energielieferant wichtig für den gesamten Organismus. Die meisten Zivilisationskrankheiten wie Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen, Hyperlipidämie und Adipositas sind mit einer Dysbalance der verschiedenen Fettsäuren und deren Metabolite assoziiert. Es erscheint deshalb sinnvoll, dass es im Organismus Sensoren gibt, die Veränderungen der Fettsäuren und deren Metabolite erfassen und darauf reagieren können.

Als die wichtigsten Sensoren im Fettsäuremetabolismus werden nachfolgend die Kernfaktoren SREBP, PPAR, C/EBP und NF- κ B näher betrachtet.

1.6.1 SREBP

Die SREBP (sterol regulatory element binding protein) sind Kernfaktoren, die an das SRE (sterol regulatory element) binden und damit den Promoter aktivieren können, was wiederum zu einer erhöhten Transkription von Genen führt. Der Grad der Aktivierung des Promoters ist dabei abhängig von der Konzentration der SREBPs. Je mehr SREBP in einem Zellkern vorhanden ist, desto höher ist die Promotoraktivität [6]. Die durch SREBPs aktivierten Gene sind z.B. für die Cholesterinbiosynthese verantwortlich.

SREBPs sind Proteine, die in vielen Geweben vorkommen und dort als unreifes Protein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums fixiert sind. Wenn diese Zellen einen Mangel an Cholesterin haben, kommt es zur Reifung und einer proteolytischen Abspaltung der SREBPs von den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Die SREBPs können dann in den Zellkern

gelangen und dort zu einer Aktivierung von Genen führen, die in die Synthese von Cholesterin, Triglyceride und Fettsäuren involviert sind [6].

Im Genom der Säugetiere werden drei Subtypen des SREBP codiert: SREBP-1a, 1c und 2. SREBP-1a ist ein potenter Aktivator von Genen, die für die Synthese von Cholesterin, Triglyceriden und Fettsäuren verantwortlich sind. SREBP-1c verstärkt vorzugsweise die Transkription von Genen für die Fettsäuresynthese in der Leber, inklusive der Stearoyl CoA-Desaturase. SREBP-2 aktiviert Gene, die in der Cholesterinbiosynthese involviert sind [47]. Fehlen die SREBPs kommt die Cholesterinbiosynthese fast vollständig zum Erliegen, während die Fettsäuresynthese um nur 30 % reduziert wird [47]. Die Cholesterinbiosynthese hängt fast völlig von den SREBPs ab, wohingegen die Fettsäuresynthese nur teilweise von den SREBPs abhängig ist.

1.6.2 PPAR

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) enthalten eine zentrale DNA-Bindungsstelle, mit der sie zusammen mit dem Retinoid X Rezeptor ein Heterodimer bilden und ihre Bindungsstelle im Promotor (PPREs; peroxisome proliferator-activated receptor response element) ihrer Zielgene erkennen können.

PPARs werden in verschiedene Subtypen unterteilt: PPAR α , PPAR γ 1 und γ 2 und PPAR β/δ . Alle diese Kernfaktoren sind im Säugetier nachgewiesen worden [9].

PPAR α ist hauptsächlich in metabolisch aktiven Geweben zu finden, wie Leber, Niere und Herz. Eine Aktivierung von PPAR α führt zu einer Proliferation von Peroxisomen und zu einer erhöhten Transkription von Genen der β -Oxidation in Peroxisomen, Mitochondrien und anderen Zellkompartimenten [30]. Ein natürlicher Ligand des PPAR α ist z.B. die Linolsäure; zu den synthetischen Liganden zählen die Fibrate. Fibrate werden auch als Medikamente eingesetzt, um den Triglyceridspiegel im Serum zu senken, indem sie die β -Oxidation von Fetten aktivieren. Obwohl durch die Aktivierung von PPAR α eher ein Abbau der Fette induziert wird, so wurde dennoch nach-

gewiesen, das Clofibrat, ein PPAR α -Agonist, in der Leber von Ratten zu erhöhten Stearoyl-CoA Desaturase Level führte und damit lipogen wirkte [28, 40]. PPAR α besitzt eine Vielzahl von Liganden, eine Eigenschaft, die selten unter den Kernrezeptoren ist. Das bedeutet, dass dieser Kernfaktor, durch viele Liganden aktivierbar, schnell auf die unterschiedlichsten Veränderungen im Fettsäuremetabolismus reagieren kann. Da im Organismus der Metabolismus von Zelle zu Zelle variieren kann, wird durch diese große Breite an Liganden gewährleistet, dass der PPAR α in vielen Zellen aktiviert werden kann.

PPAR γ 1 und γ 2 dagegen ist vor allem im braunen und weißen Fettgewebe zu finden, wo es für die Zelldifferenzierung und die Lipidspeicherung verantwortlich ist. Dabei ist das Prostaglandin J2 ein natürlicher Ligand und führt über die Aktivierung von PPAR γ zu einer Differenzierung der Präadipozyten zu reifen, Triglycerid-speichernden Adipozyten. Glitazone sind synthetische Liganden des PPAR γ . PUFAs, wie Arachidonsäure, Linolsäure und Linolessäure und deren Metabolite gelten als direkte Liganden für die PPARs ([30, 16],siehe Abb. 1.1).

PPAR β , beim Menschen auch als PPAR δ bekannt, kommt nahezu ubiquitär vor. Lange war nicht bekannt, welche Rolle dieser PPAR Subtyp hat. Es zeigte sich aber, dass PPAR δ in die Pathogenese des metabolischen Syndroms involviert ist. Eine Behandlung mit dem selektiven PPAR δ -Agonisten GW501516 führte zu veränderten HDL-, Triglycerid und LDL-Cholesterinkonzentrationen [46]. Die Aktivierung von Genen über PPAR δ führt zu einer verminderten Triglyceridanreicherung im braunen Fettgewebe und in der Leber. Weiterhin führte sie zu einer verstärkten β -Oxidation im 3T3-L1 Adipozyten [46].

PPARs sind nicht nur Kernrezeptoren im Lipidmetabolismus, sondern sie intervenieren auch im Entzündungsgeschehen. Es sind verschiedene Wirkungsweisen beschrieben worden. Zum einen werden durch Fibrate die PPAR α aktiviert, das führt zur Transkription des I κ B-Gens und nachfolgend zur

Inhibition des NF- κ B [24]. Aktiviertes PPAR γ führt dagegen sowohl zur Inhibition von NF- κ B, als auch von AP-1. Zum anderen kommt es durch Eicosanoid-abhängige Aktivierung des PPAR α zu einer Transkription von Genen der β -Oxidation und dadurch zum Abbau dieser Eicosanoide. Die Entzündungsreaktion wird dadurch begrenzt [10].

Können auf der anderen Seite die PPARs oder die SREBPs gehemmt werden? Es wurde an Skelettmuskelzellen gezeigt, dass nach Zugabe von Palmitinsäure (wahrscheinlich über Aktivierung der TLRs) die NF- κ B-Aktivität ansteigt. Gleichzeitig lagerte sich die p65 Untereinheit von NF- κ B an den PPAR β/δ an. Gene, die normalerweise durch PPAR δ verstärkt transkribiert werden, wurden nicht transkribiert und die mRNA-Level dieser Gene sanken. Nach Zugabe von PPAR δ -Agonisten wurde diese Hemmung durch p65 aufgehoben.

1.6.3 NF- κ B

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an einer Vielzahl von Genen binden kann, die in der Synthese von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen involviert sind. NF- κ B kommt ubiquitär vor. Es spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Gentranskriptionen, die ebenfalls durch Fettsäuren und ihre Metabolite beeinflusst werden können. Im späten Entzündungsstadium wird das aus der Arachidonsäure gebildete proinflammatorische Prostaglandin PGE2 durch das Prostaglandin PGA1 ersetzt. Das PGA1 wirkt direkt inhibitorisch auf die IKK. Das führt zu einer verminderten Phosphorylierung der IK β , sodass NF- κ B nicht in den Zellkern gelangen kann. Die NF- κ B abhängige Aktivierung von Genen wird dadurch gehemmt [54]. Fibrate sind PPAR α Liganden, wie die PUFAs und führen zu einer verminderten IL β -stimulierten CRP Genexpression indem sie die Komplexbildung von p50-NF κ B reduzieren [29].

	PPARα	PPARγ	PPARβ
Wirkung der Zielgene	<ul style="list-style-type: none"> •Proliferation der Peroxisomen •β-Oxidation \uparrow •Cytochrom P450 \uparrow •SCD \uparrow •Phospholipid-biosynthese \uparrow 	<ul style="list-style-type: none"> •Fettsäurespeicherung \uparrow •Zelldifferenzierung in Adipozyten 	<ul style="list-style-type: none"> •Lipoproteinsynthese •Fettsäuretransport •β-Oxidation \uparrow
Natürliche Liganden	<ul style="list-style-type: none"> •Ölsäure •Linolsäure •Linolensäure •Arachidonsäure (?) •Docosahexaensäure •Eicosapentaensäure •8S-HETE •8-HEPE •LTB4 	<ul style="list-style-type: none"> •Ölsäure •Prostaglandin J2 •Linolsäure •Linolensäure •Arachidonsäure 	<ul style="list-style-type: none"> •C16-C18 Fettsäuren •Prostaglandin A1 •Iloprost •Carbaprostacyclin
Synthetische Liganden	<ul style="list-style-type: none"> •Fibrate z.B. Gemfibrozil •GW2331 •WY14643 	<ul style="list-style-type: none"> •Glitazone z.B. Rosiglitazone •GW2331 	<ul style="list-style-type: none"> •GW501516 (lipophile Carboxylsäuren)

Abbildung 1.3: Wirkung der PPARs und entsprechende Liganden der Subtypen: Die Eicosanoide zeigten eine größere PPAR-Subtyp Selektivität, als ihre Fettsäure-Vorläufermoleküle und waren die potenteren Aktivatoren der PPARs.

1.6.4 C/EBP

Das CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der zur Superfamilie der bZIP Proteine gehört und zu der auch die Transkriptionsfaktoren: c-jun, c-fos (AP-1) und das cAMP responsive element binding protein (CREBP) gehören. Zu den C/EBPs gehören wiederum eine Vielzahl von Subtypen: C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- γ und C/EBP- δ . Das Vorhandensein des C/EBP ist auf ausdifferenzierte Zellen begrenzt. C/EBP stimuliert die Transkription von Genen, die das Differenzierungsstadium markieren.

Die C/EBP Subtypen sind gewebespezifisch verteilt.

C/EBP- α wird in der Plazenta, Leber, Lunge, Skelettmuskel, Pankreas, Darm, Adipozyten und Leukozyten und Sebozyten gefunden. C/EBP- α wird auch

in der Differenzierung von Adipozyten benötigt [37].

C/EBP- β und C/EBP- δ sind vor allem in der Leber zu finden und sind dort in der ersten Phase der Immunantwort involviert. Die Akut-Phase-Antwort ist ein Prozess, der ausgelöst wird durch eine Infektion und/oder einen Gewebeschaden. Die Akut-Phase-Antwort resultiert in einer veränderten Proteinsynthese hauptsächlich in der Leber. Die veränderte Synthese der Akut-Phase-Proteine wird reguliert durch Zytokine (IL-1, IL-6, TNF α) und/oder LPS. Einige dieser Akut-Phase-Protein Gene haben Bindungsstellen für C/EBP- β und/oder C/EBP- δ z.B. das Gen für Faktor VIII, Angiotensinogen und das LPS Bindungsprotein.

Die Expression der C/EBP- γ ist ubiquitär und ein Negativregulator für die Transkription von C/EBP- α und - β [12].

C/EBPs können mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. So können die Subtypen C/EBP- α , C/EBP- β und C/EBP- δ mit NF- κ B über Protein/Protein-Interaktionen synergistisch funktionieren [62]. Aus dieser Interaktion resultiert eine Hemmung von Genpromotoren, die κ B abhängig sind und eine Aktivierung von Promotoren, die C/EBP Bindungsstellen enthalten.

Im Sebozyten wurden auf mRNA Ebene alle Subtypen von C/EBP gefunden, während auf Proteinebene vor allem C/EBP- α und - β nachgewiesen wurden [9].

1.7 Desaturasen

Desaturasen sind Enzyme im Fettstoffwechsel, die zum Einfügen einer Doppelbindung in die Kohlenstoffkette führen. Die Anzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren beeinflusst die physiologischen Eigenschaften von biologischen Membranen und Speicherfetten. Zusätzlich werden Metabolite von ungesättigten Fettsäuren als Signalmoleküle genutzt. Im Menschen gibt es die Δ -5, Δ -6 und Δ -9 Desaturase.

1.7.1 Δ -9 Desaturase / Stearoyl-CoA Desaturase

Die Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) ist ein Enzym, das im endoplasmatischen Retikulum (ER) membrangebunden vorliegt. Es fügt eine Doppelbindung zwischen dem 9 und 10 C-Atom ein. Das Enzym heißt deshalb auch Δ -9 Desaturase (D9D). Ausgangssubstrate für die SCD sind gesättigten Fettsäuren, z.B. Stearinsäure (18:0) und Palmitinsäure (16:0). Nach Einfügen einer Doppelbindung durch die SCD entstehen die einfach ungesättigte Fettsäuren Ölsäure (18:1) und Palmitoleinsäure (16:1). Diese einfach ungesättigten Fettsäuren (engl. Monounsaturated fatty acid, MUFA) wiederum werden als Substrate verwendet für die Synthese von verschiedenen Lipiden, einschließlich Triglyceride, Wachsester, Cholesterolester und Phospholipide. Das Verhältnis von Palmitinsäure zu Ölsäure, also von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren, in den Phospholipiden beeinflusst die Stabilität und Fluidität von Membranen und hat Einfluss auf die Signal Transduktion. Die Expression der SCD und deren Regulation beeinflusst damit die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Membranphospholipiden, Triglyceriden und Cholesterolestern und bewirkt damit eine Änderung der Membranfluidität und des Fettstoffwechsels.

Als Bestandteil des Sebums in der Talgdrüse wirken die MUFAs antibakteriell. Ein Mangel an MUFAs führt zu einer verzögerten Wundheilung und zu einem vermehrten Wachstum von grampositiven Bakterien auf der Haut [69]. Eine veränderte Expression der SCD ist assoziiert mit verschiedenen Erkrankungen wie Krebs [64], Diabetes [67, 58], Fettleibigkeit [58] und Alterung.

Während Mäuse vier Isoformen der SCD besitzen, hat der Mensch nur zwei SCD Gene, wobei nur ein funktionstüchtiges SCD Gen auf dem 10. Chromosom [64] lokalisiert ist und das andere SCD Gen als nicht funktionelles Pseudogen auf dem 17. Chromosom liegt. In der Promotorregion des menschlichen SCD Gens liegen verschiedene regulatorische Gensequenzen, die als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren dienen. Hierzu zählt das PUFA-RE (polyunsaturated fatty acid response element), in welchem das SRE (sterol regulatory element), CCAAT-Box (NF-Y) und NF-1 enthalten sind [6] und dienen damit als Bindungsstelle für folgende Kernfaktoren:

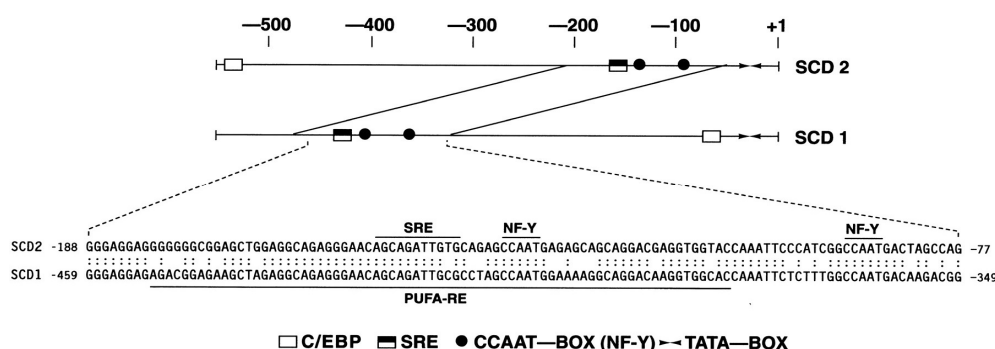


Abbildung 1.4: Promotorregion des SCD 1 und SCD2 Gens der Maus (aus Ntambi, JM. J Lipid Res. 1999;40:1549-58)

NF- κ B, AP-1, AP-2, CREB und die für den Lipidmetabolismus wichtigen C/EBP, PPAR und SREBP [75].

In hepatischen HepG2 Zellen und reifen 3T3-L1 Adipozyten unterdrücken PUFAs wie Arachidonsäure, Docosahexaensäure, Linolsäure und Linolensäure die Promotoraktivität des SCD Gens. Ein gleicher Effekt wurde durch Cholesterin erreicht. Dagegen hatten MUFAs und gesättigte Fettsäuren keinen Effekt auf die Transkription des SCD Gens [6, 57].

Die PUFAs erzielen diesen Effekt, indem sie die Reifung der SREBPs und damit die Translokation des Kernfaktors in den Zellkern verhindern. Daraus resultiert eine verminderte Promotoraktivität und Transkription des SCD Gens. Unter allen PUFAs hatte die Arachidonsäure den größten Effekt. Die Möglichkeit, dass dieser Effekt durch Metabolite der Arachidonsäure, die Eicosanoide, vermittelt wird, konnte nicht bestätigt werden. Eine gleichzeitige Gabe von Arachidonsäure und COX- und LOX-Hemmern führte weiterhin zu einer Hemmung der SCD Transkription.

Die SCD kommt auch in der Haut vor. SCD1^{-/-} Mäusen weisen einen Mangel an Triglyceriden, Wachsestern und Cholesterolestern auf, während das freie Cholesterin erhöht ist [41]. Das freie Cholesterin führt zum Zelltod. Es wird daher spekuliert, ob die atrophierten Talg- und Meibom-Drüsen in den SCD1^{-/-} Mäusen nicht eher auf das freie Cholesterin, als auf die reduzier-

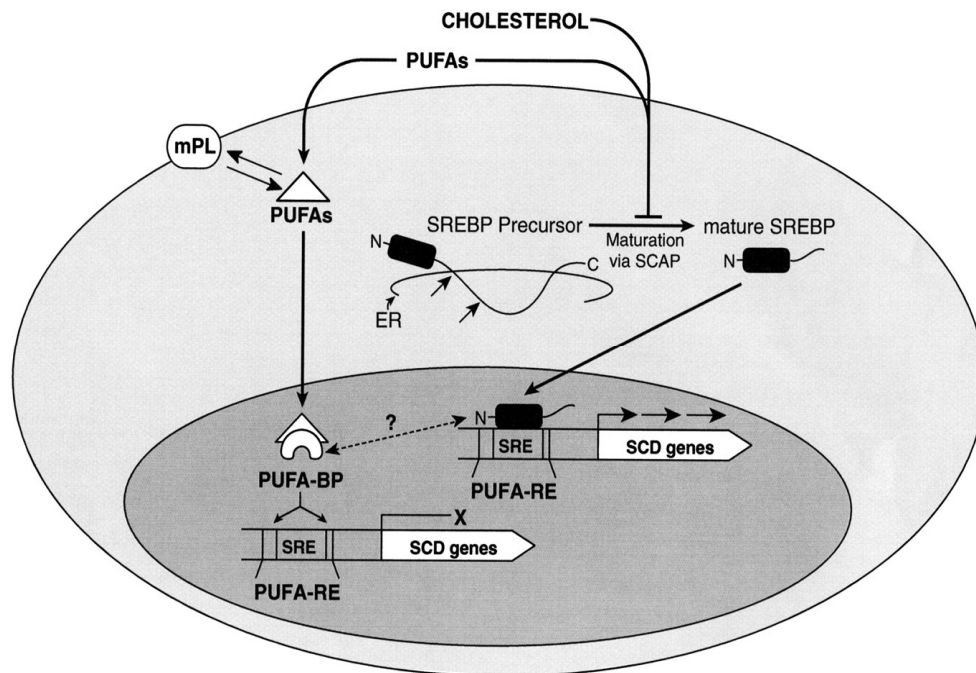


Abbildung 1.5: Unterdrückung der Transkription des SCD Gens durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) (aus Ntambi, JM. J Lipid Res. 1999;40:1549-58)

ten Sebum- und Meibummengen zurückzuführen sind. In gesunden Mäusen würden diese hohen Spiegel an freiem Cholesterin zu einer Aktivierung des SCD-Gens führen und damit zu einer erhöhten Umwandlung von freiem Cholesterin zu Cholesterinestern [72].

1.7.2 Δ -6 Desaturase / Fatty-acid Desaturase 2 (FADS2)

PUFAs, wie Arachidonsäure und Docosahexaensäure werden für eine Vielzahl von physiologischen Funktionen benötigt. Im Gegensatz zu Pflanzen sind Säugetiere unfähig PUFAs selbst zu synthetisieren, da ihnen sowohl die ω -3 Desaturase, als auch die Δ -12 Desaturase fehlt. Deshalb müssen die PUFAs: Linolsäure (18:2 n-6) und α -Linolensäure (18:3 n-3) über die Nahrung substituiert werden und werden deshalb auch essentielle Fettsäuren genannt. Säugetiere sind in der Lage, in die über die Nahrung zugeführten essentiellen Fettsäuren weitere Doppelbindungen einzubauen. Dafür werden die Δ -6-

Desaturase (FADS2) und Δ -5-Desaturase benötigt. Sie benutzen als Substrat die über die Nahrung zugeführten essentiellen Fettsäuren und synthetisieren aus ihnen unter anderem die Arachidonsäure (20:4 n-6), die Docosahexaensäure (22:6 n-3) und die Eicosapentaensäure (20:5 n-3). Diese hoch ungesättigten Fettsäuren (HUFAs) werden hauptsächlich in die Phospholipide eingebaut und kaum in Triglyceride.

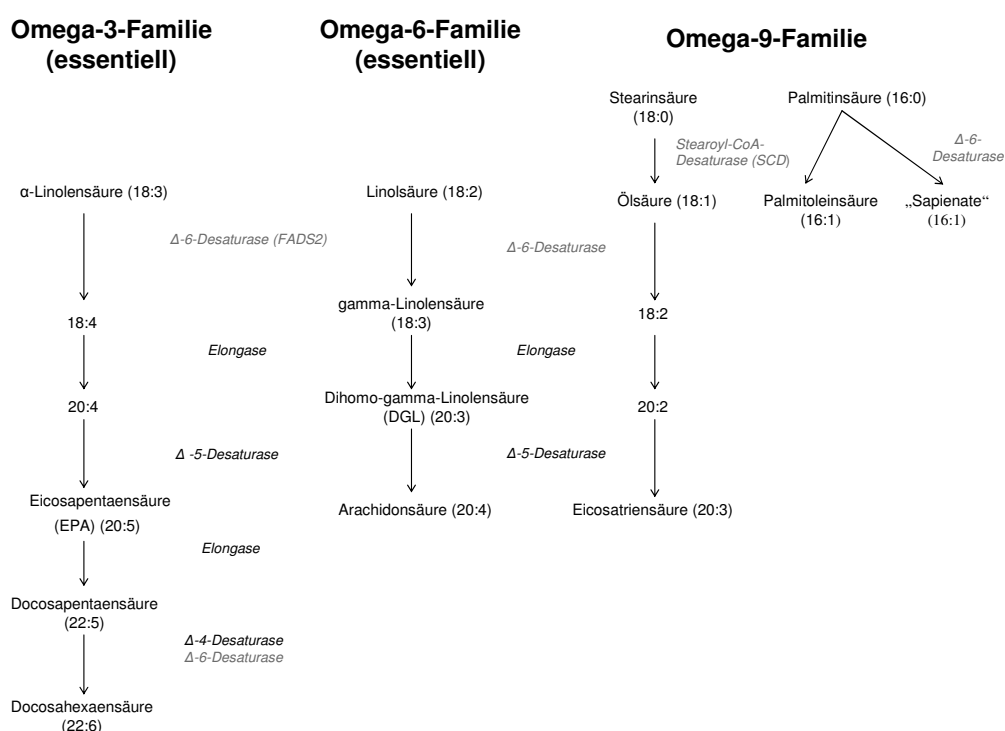


Abbildung 1.6: Fettsäuremetabolismus

Die Bedeutung im Organismus zeigt sich, wenn zu wenig PUFAs zur Verfügung stehen. Geringe Spiegel an PUFAs sind unter anderem assoziiert mit Demenz [42], Alkoholismus [44] und Diabetes [52, 22].

Bisher ist bekannt, dass die FADS2 hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert wird und diese Regulation vor allem durch die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und PPAR α passiert.

Eine Aktivierung von PPAR α und SREBP-1c führt in Mäusen zu einer erhöhten Transkription des FADS2 Gens [6]. Ebenso führt Insulin zu einer erhöhten FADS2 Transkription.

Wenn das Produkt, der von der FADS2 katalysierten Reaktion, die PUFAs, reichlich vorhanden ist, kommt es zu einer verminderten Transkription des FADS2-Gens, im Sinne eines Negativ-Feedbacks.

Die enzymatische Aktivität von FADS2 ist in den meisten Geweben niedrig. Eine Ausnahme bildet die Leber, die Hauptproduktionsstätte der mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist.

In Geweben, wie den Talgdrüsen besteht ebenfalls eine hohe Expression der FADS2. Obwohl gesättigte Fettsäuren normalerweise nicht zu den Substraten der FADS2 zählen, kann sie in der Talgdrüse dennoch eine Doppelbindung einbauen. Es entsteht aus Palmitinsäure die einfach ungesättigte Fettsäure „Sapienat“, ein Isomer der Palmitoleinsäure. Im Menschen kommt „Sapienat“, in großen Mengen im Sebum vor [19].

Kapitel 2

Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, Substanzen zu untersuchen, die in der Lage sind den Fettsäuremetabolismus in SZ95-Sebozyten zu regulieren und Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in SZ95-Sebozyten zu nehmen.

Es wurden die Effekte von ω -6-Fettsäuren (Linolsäure, Arachidonsäure) und anderen individuellen Substanzen (CRH und MALP-2) auf die SZ95-Sebozyten untersucht. Zusätzlich wurden die Wirkungen von PMA und Dexamethason untersucht, welche als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienen sollten.

Es wurden direkte (IL-6- und IL-8- Freisetzung) und indirekte Parameter untersucht. Die indirekten Parameter sind die Transkription und Translation der SCD-, FADS2- und TLR2-Gene. Grundlage für diese Überlegung war es, dass MUFAs als Produkte der SCD antibakteriell wirken und Arachidonsäure als FADS2-Produkt, ein Vorläufer der Prostaglandine und Leukotriene ist. Der TLR2 wurde deshalb untersucht, weil er ein Rezeptor der angeborenen Immunität ist und weil seine Aktivierung zu einer vermehrten IL-6- und IL-8-Produktion führt.

Die Untersuchung der CRH-Freisetzung sollte zeigen, ob periphere Zellen, wie die SZ95-Sebozyten in der Lage sind, auf eine Behandlung mit ver-

meintlich pro- und antiinflammatorischen Substanzen, mit der Bildung dieses Stresshormons zu reagieren. Den Sebozyten käme dadurch eine zentrale Rolle in einem von unserer Arbeitsgruppe postulierten peripheren Stressmechanismus der Haut zu.

Eine Behandlung mit CRH sollte zeigen, inwieweit dieses Stresshormon, welches sowohl zentral im Hypothalamus, als auch topisch in der Haut gebildet wird, in der Lage ist, Einfluss auf den Lipidmetabolismus und damit indirekt auf den Entzündungsstatus der SZ95-Sebozyten zu nehmen.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Material

- Sebomed™ Basal Medium, Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- Fetales Rinderserum (FCS), Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- 5 ng/ml Human Recombinant Epidermal Growth Factor (EGF), Sigma (München, Deutschland)
- Penicillin 10000 U/ml - Streptomycin, 10000 µg/ml (P/S) (Biochrom, Deutschland)
- 1 mM CaCl₂, Sigma (München, Deutschland)
- Trypsin 0.05% - EDTA 0.02%, Biochrom AG, (Berlin, Deutschland)
- PBS Dulbecco Instamed (1x) w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- Zellkulturflaschen, 75 cm², Nunc (Wiesbaden, Deutschland)
- Zellkultur – Testplatte 6, TPP (Trasadingen, Schweiz)
- Brutschrank BB16, HERAEUS (Hanau, Deutschland)

- Serologische Pipetten, Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (NJ, USA)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml, Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (NJ, USA)
- Trypanblau, 0,5 % (w/v) in physiologischer Kochsalzlösung, Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- Zählkammer, Neubauer improved, BRAND (Wertheim, Deutschland)
- Zentrifuge, HERAEUS Christ Minifuge 2 (Hanau, Deutschland)
- Antair BSK, Sterilbank

3.1.1 Zellkulturbedingungen

Die hier verwendeten Zellen sind die SZ95-Sebozyten, eine humane immortalisierte Zelllinie, die aus menschlichen Talgdrüsen stammt. Alle Arbeiten mit den lebenden Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Die SZ95-Sebozyten wurden in Sebomed™ Medium kultiviert, welches mit FCS (Endkonzentration: 10%), EGF (5 ng/ml), CaCl₂ (Endkonzentration: 1mM) und Penicillin/Streptomycin angereichert wurde. Für ein optimales Wachstum wurden die Sebozyten im Brutschrank bei 37° C und einem CO₂-Gehalt von 5% in der befeuchteten Luft kultiviert. Das Sebomed™ Medium wurde alle 2-3 Tage durch frisches Medium ersetzt.

3.1.2 Passagierung

Die SZ95-Sebozyten sind adhärente Zellen, die bei Erreichen einer nahezu vollständigen Konfluenz passagiert wurden: Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen 2-mal mit 10 ml 1xPBS gewaschen. Um die Sebozyten von ihrer Oberfläche zu lösen, wurden 3 ml Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben und diese für etwa 10 min in den Brutschrank gestellt.. Um die Trypsinierung zu stoppen, wurde in die Zellkulturflasche 7 ml frisches

Sebomed™ Medium gegeben. Diese Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und dieses für 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Flüssigkeit über dem Zellpellet abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium so aufgefüllt, dass sich ein Gesamtvolumen von 12 ml in jeder Zellkulturflasche befand. Jedes Umsetzen der Zellen entspricht einer Erhöhung der Passagenzahl um eine Passage. Die hier durchgeführten Experimente fanden alle in den Passagen 25-35 statt.

3.1.3 Das Umsetzen der Zellen in 6-Well-Platten

Für die Behandlung der SZ95-Sebozyten mit den Testsubstanzen wurden die Zellen in 6-Well Platten umgesetzt.

Vorher wurde die Zellzahl in der Zellsuspension bestimmt: Trypanblau und ein kleines Aliquot der Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 vermischt (z.B. 50 μ l + 50 μ l). Die Zellen färbten sich blau an und waren lichtmikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung gut sichtbar und konnten mit einer Zellkammer ausgezählt werden. Die damit berechnete Zellzahl wurde benutzt, um eine Zellsuspension mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen / ml Medium herzustellen. In jedes Well der 6-Well Platten wurde 1 ml der Zellsuspension pipettiert, sodass sich in jedem Well $2 \cdot 10^5$ Zellen befanden. Die 6-Well Platten wurden nach dem Aussäen in den Brutschrank gestellt und blieben dort, bis die Zellen eine Konfluenz von etwa 60 % hatten.

3.2 Behandlung der SZ95-Sebozyten

Material

Prozedur

Die Behandlung der Sebozyten erfolgte in 6-Well Platten. In jedes Well wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen gesetzt. Dort durften die Zellen bis zur eigentlichen Behandlung in Sebomed™ Medium wachsen, bis sie Konfluenz von etwa 60 %

Substanz	Quelle	1. Konzentration (c1)	2. Konzentration (c2)
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma, Deutschland	1 ng / ml	10 ng / ml
Dexamethason	Sigma, Deutschland	10^{-5} Mol/l	10^{-6} Mol/l
Linolsäure (LA)	Sigma, Deutschland	10^{-4} Mol/l	10^{-5} Mol/l
Arachidonsäure (AA)	Sigma, Deutschland	10^{-5} Mol/l	10^{-6} Mol/l
CRH (Corticotropin-releasing hormone)	Calbiochem, Deutschland	10^{-7} Mol/l	10^{-8} Mol/l
MALP-2 (Macrophage-activating Lipopeptide-2)	Axxora, Deutschland	10 ng/ml	50 ng/ml
NVP-LCF369	Novartis, Österreich	10^{-6} Mol/l	10^{-7} Mol/l

Tabelle 3.1: Testsubstanzen

erreicht haben. Anschließend wurden die Zellen mit den Testsubstanzen in den oben genannten Konzentration behandelt.

3.3 Zytotoxizitätstest (LDH–Assay)

Mit dem Zytotoxizitätsassay konnte evaluiert werden, ob die eingesetzten Testsubstanzen toxisch auf die SZ95-Sebozyten wirken. Der Test basiert auf die Aktivitätsmessung der Lactatdehydrogenase (LDH), die sich in vitalen Zellen im Zytoplasma der Zellen befinden. Wenn eine Zelle geschädigt wird, kommt es zum Verlust der Membranintegrität und zum Austreten der LDH in den Zellüberstand. Die LDH-Menge kann indirekt durch einen enzymatischen Aktivitätstest bestimmt werden: Im ersten Schritt wird Lactat zu Pyruvat umgewandelt. Dadurch wird NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten Schritt werden durch einen Katalysator die H/H^+ - Ionen auf Iodotetraazoliumchlorid (INT) übertragen und es entsteht Formazan. Diese Reaktion ist durch den Farbumschlag von hellem Gelb (INT) zu Rot (Formazan) gekennzeichnet. Formazon zeigt ein Absorptionsmaximum bei 500 nm, so dass die Absorption mit einem Photometer gemessen werden konnte.

Material

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
- Triton X-100, Sigma (München, Deutschland)
- Automated Microplate Reader, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland
- Software KC Junior, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland

Lösungen

- *Reaktionsmix* (pro 96-Well-Platte)
- Katalyselösung (gebrauchsfertig) 0,25 ml
- Färbelösung (gebrauchsfertig) 11,25 ml

Prozedur

SZ95-Sebozyten wurden in 96-Well-Platten ausgesät (20000 Zellen /Well) und in den Brutschrank gestellt. 48 Stunden später wurden die 96-Well-Platten mit PBS gewaschen und anschließend mit den zu untersuchenden Testsubstanzen behandelt. Nach 24 Stunden Behandlung wurden aus jedem Well 100 μ l des Überstandes in ein Well einer neuen 96-Well-Platte überführt und 100 μ l des *Reaktionsmix* zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption mit dem *Automated Microplate Reader* bei 492 nm gemessen.

Als Negativkontrolle diente der Überstand von unbehandelten Zellen und als Positivkontrolle der Überstand von Zellen, die mit 2 % Triton X-100 behandelt wurden.

3.4 Total-RNA Isolation

Für die Isolation der total RNA wurde der Aurum™ Total RNA Mini Kit benutzt. Das Prinzip dieser Isolierung beruht auf die Bindung der RNA an eine Kiesegelmembran, nachfolgenden Waschschrinen und der Elution der total RNA in Wasser. In einem Zwischenschritt wird die genomische DNA durch eine DNase – haltige Lösung entfernt und damit die Kontamination der Probe mit nicht gewünschten Nukleinsäuren verhindert.

Material

- Der Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Deutschland) enthält
 - RNA Bindungssäulen
 - DNase I (lyophilisiert; vor Gebrauch durch Zugabe von 10mM Tris, pH 7,5 in Lösung bringen)
 - Lysislösung (vor Gebrauch: Zugabe von β -Mercaptoethanol; Endkonzentration 1%)
 - Niedrig konzentrierte Waschlösung (5-fach Konzentrat; vor Gebrauch verdünnen mit 99,9% Ethanol)
 - Hoch konzentrierte Waschlösung
 - Elutionslösung
 - DNase Verdünnungslösung
- Zentrifuge S417C, Eppendorf, Deutschland
- Thermomixer compact, Eppendorf, Deutschland
- Aqua ad injectabilia, Braun, Deutschland
- Ethanol (70%), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Safe Seal Tips, Biozym, Oldendorf, Deutschland

Prozedur

Da es sich bei den SZ95-Sebozyten um adhärenzte Zellen handelte, die in einem Wachstumsgefäß eine einzelne Schicht bildeten (sogenannte Monolayer-Kultur), konnte das Medium aus den Wells abgesaugt werden. Die Wells wurden einmal mit PBS gewaschen. In jedes Well wurden 350 μl Lysislösung pipettiert. Um die Zellen gut zu lysieren, wurde mindestens 12x auf- und abpipettiert.

Es wurden 350 μl des 70%-igen Ethanol in jedes Well pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Lösungen so gemischt, dass keine Schichten in dem Gemisch mehr sichtbar waren. Das Gemisch konnte dann in die Säule pipettiert werden. Die Säule wurde zentrifugiert (30 Sekunden) und das Filtrat im Auffangbehälter verworfen. Anschließend wurden 700 μl der niedrig konzentrierten Waschlösung auf die Säule pipettiert, für 30 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Anschließend wurde die RNase-freie DNase I mit der DNase Verdünnungslösung nach Vorschrift verdünnt. 80 μl dieser Verdünnung wurden in jede Säule pipettiert. Nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 15 Minuten wurden die Säulen erneut für 30 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Danach wurden 700 μl der hoch konzentrierten Waschlösung in die Säule pipettiert, für 30 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat wiederum verworfen. Dieser Schritt wird mit der niedrig konzentrierten Waschlösung wiederholt. Die Säule musste anschließend 2 Minuten zentrifugiert werden, das Filtrat und der Auffangbehälter wurden verworfen. Anschließend wurde die Säule in ein neues Tube gestellt. 25 μl von 70 °C warmen, RNase-freiem Wasser (Elutionslösung) wurden in jede Säule pipettiert. Nach 1 Minute Inkubationszeit wurde die Säule für 2 Minuten zentrifugiert. Die im Wasser eluierte total RNA befand sich nun im Tube und konnte bei -20°C gelagert werden.

3.5 Messung der RNA-Menge

Um die total RNA für die Reverse Transkription zu benutzen, musste vorher die Konzentration und Reinheit der RNA mittels einer photometrischen

Messung ermittelt werden.

Material

- Gene Quant II Photometer, Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences, UK
- ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA
- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- Aqua ad injectabilia, Braun, Deutschland
- Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Prozedur

Zu Beginn der Probenmessung musste ein Leerwert mit bidest. Wasser bestimmt werden. Jede nachfolgende Messung bezog sich auf das Wasser.

Jede Probe wurde 1:100 mit bidest. Wasser verdünnt. Das Photometer maß bei 260 nm die RNA-Menge und bei 280 nm die Protein-Menge in der Probenverdünnung.

Zu einem späteren Zeitpunkt der experimentellen Arbeit wurde die RNA Menge mit dem NanoDrop ND-1000 vermessen und die Qualität der isolierten RNA mit dem Agilent Bioanalyzer.

Bei Verwendung des NanoDrop wurde 1 μl der unverdünnten total RNA verwendet. Die Messung der Nucleinsäure Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$ basiert auf die Absorptionsmessung bei 260 nm. Es wurde eine 2-fach Bestimmung durchgeführt.

3.6 Reverse Transkription

Retroviren, wie das HI-Virus, sind RNA Viren, die im Laufe eines Vermehrungszyklus ihre RNA in DNA umschreiben können. Ein Enzym, die reverse

Transkriptase, befähigt sie zu diesem Schritt.

Dieses Prinzip wird ausgenutzt, um aus der isolierten total RNA aus den Sebozyten cDNA (complementary DNA) herzustellen.

Bei der reversen Transkription wurden spezifische Primer verwendet. Mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) wurde bei 45°C vom 3'-Ende der RNA die cDNA synthetisiert. Nach der cDNA Synthese wurde die RNA durch eine RNase abgebaut. Die cDNA bildete den Ausgangsstoff für die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Um die Qualität und Quantität der gewonnenen cDNA zu überprüfen, wurde für jede Probe ein „Kontroll-PCR“ gemacht, bei der GAPDH-Primer benutzt wurden.

Material

- iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Deutschland). Dieses Kit enthält:
- 5x iScript Reaction Mix
- Nuclease-freies Wasser
- iScript Reverse Transkriptase
- RNA (je Probe 1µg RNA)

Prozedur

Für jede Probe musste ein Reaktionsmix mit folgenden Komponenten und Volumina pipettiert werden:

Komponente	Volumen für jede Reaktion
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease-freies Wasser	x µl
RNA (1 µg)	x µl
<hr/>	
Gesamt Volumen	Σ 20 µl

Der Reaktionsmix wurde 5 min bei 25°C, dann 30 min bei 42°C und anschließend 5 min bei 85°C inkubiert. Die cDNA wurde bei 4°C gelagert.

3.7 Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction (PCR))

Die PCR gehört seit Mitte der 80-er Jahre zu den wichtigsten Methoden der Molekularbiologie. Mit ihrer Hilfe können Fragmente von DNA gezielt amplifiziert werden. Voraussetzung ist die Kenntnis der Basensequenz des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Durch spezifische Primer wird das zu amplifizierende DNA-Fragment eingerahmt. Das Prinzip der PCR besteht aus drei verschiedenen Schritten. Die doppelsträngige cDNA wird bei 94°C denaturiert. Dann erfolgt bei angemessener Temperatur die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge (=Annealing). Die optimale Annealing-Temperatur ist individuell für jedes Primerpaar. Anschließend kann die Taq-Polymerase ausgehend von den Primern die Fragmente verlängern. Dieser Schritt erfolgt bei 72°C. Da die Komplementierung der Template-DNA an beiden Strängen gleichzeitig abläuft, wird das cDNA-Fragment innerhalb eines Zyklus verdoppelt. Dieser Zyklus wiederholt sich je nach gewünschtem PCR-Produkt 25-30 mal. Der letzte Annealing-Schritt dauert 10 min bevor alle Reaktionen abgebrochen werden.

Material

- Ampli-Taq DNA Polymerase, 5 U/ μ l, Perkin-Elmer, Roche, USA
- RT-PCR Buffer (10x); dieser enthält 15 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, Perkin-Elmer, Roche, USA
- dNTPs, Mix enthält je 10 mM eines Nucleotids
- Aqua ad injectabilia, Braun, Deutschland
- Primer, 100 μ M, TIB Molbiol, Deutschland

	Primersequenzen	PCR-Produkt in Basenpaaren (Bp)
FADS2 (NM_004265)	f 5'-ACTTTGGCAATGGCTGGATTCCCTACCCTC-3' r 5'-ACATCGGGATCCTTGTGGAAGATGTTAGG-3'	241
SCD (NM_005063)	f 5'-TTCAGAAACACATGCTGATCCTCATAATTCCC-3' r 5'-ATTAAGCACACAGCATATCGCAAGAAAGTGG-3'	289
TLR2 (NM_003264)	f 5'-GCCAAAGTCTTGATTGATTGG-3' r 5'-TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG-3'	347
GAPDH (NM_002045)	f 5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3' r 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT3'	319

- Mastercycler Gradient®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Reaktionsgefäße 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Prozedur

Es wurde ein Mastermix hergestellt, der je nach Probenanzahl, das x-fache der folgenden Komponenten enthielt:

5,00 μ l	RT-PCR buffer
1,00 μ l	dNTP Mix
2,50 μ l	forward primer
2,50 μ l	reverse primer
36,75 μ l	Aqua ad injectabilia
0,25 μ l	Als letztes wurden 0,25 μ l Taq-Polymerase hinzugefügt
Σ 48,00 μ l	

Der sorgfältig und vorsichtig gemixte Mastermix wurde schließlich in PCR-Reaktionsgefäße verteilt und in jedes Gefäß 2 μ l Probe (einsträngige cDNA) pipettiert, sodass das Endvolumen jedes PCR-Gefäßes 50 μ l war. Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR anstelle der Probe 2 μ l Aqua ad injectabilia benutzt.

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler gestellt.

Es galten folgende Bedingungen:

	Annealing-Temperatur (° C)	Anzahl der Zyklen
FADS2	63	25
SCD	62	25
TLR2	56	25
GAPDH	62	30

Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

3.8 Agarose Gel Elektrophorese

Bei der Agarose Gelelektrophorese wandern die PCR-Produkte aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld und werden dabei nach ihrer Größe aufgetrennt.

Material

- MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use, MBI Fermentas Loading Buffer, Bromphenolblau
- Agarose, Electrophoresis grade, Invitrogen, Deutschland
- Ethidiumbromid, 10 mg/ml (Sigma, Deutschland)
- Glycerol Gel Loading Dye (5x) Ultra pure grade, AMRESCO
- DNA Typing Grade TAE Puffer (50x), (Gibco-BRL,USA)
- Wide-Mini-Sub Cell (Elektrophoresekammer), BIO-RAD, Deutschland
- Power Supply, Gibco-BRL

Lösungen

TAE Puffer (1x) 20 ml TAE Puffer (50x) + bidest. Wasser ad 1000 ml

Prozedur

Es wurde eine 1,5 %-ige Agarose Lösung mit TAE Puffer (1x) hergestellt, in der Mikrowelle erhitzt und anschließend Ethidiumbromid (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelträger gegossen. Nach dem Erkalten und Erstarren des Gels wurde der Gelträger in eine Elektrophorese Kammer überführt und diese mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt.

Von jeder Probe und der Negativkontrolle wurden 10 μl mit 2 μl Glycerol Gel Loading Dye gemischt. Der DNA Molekulargewichtsmarker (10 μl) wurde nativ benutzt.

Die Proben, die Negativkontrollen und der DNA Marker wurden in unterschiedliche Slots des Gels pipettiert.

Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V durchgeführt für etwa 45 min. Nach der Elektrophorese wurden Photos des Gels unter UV-Licht aufgenommen.

3.9 IL-6-ELISA und IL-8-ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren. Mit einem ELISA können bestimmte Proteine nachgewiesen werden. Man macht sich hierbei die Eigenschaft von Antikörpern (AK) zu Nutze, spezifisch an ein Antigen (AG) zu binden.

Der hier verwendete ELISA ist ein nicht-kompetitiver ELISA. Bei diesem Verfahren werden Antikörper (Capture-Antikörper) bis zur Sättigung an Mikrotiterplatten gebunden. Anschließend werden die Proben in die Vertiefungen pipettiert. Nach der Immunreaktion wird das nicht gebundene Probenmaterial entfernt und ein markierter Antikörper (Detektions- Antikörper) zugegeben. Dieser bindet an die freien Epitope des nun gebundenen Antigens. Nach Zugabe eines geeigneten Substrates, lässt sich aus der gemessenen Farbintensität durch Vergleich mit einer gleich behandelten Eichkurve die Antigenkonzentration der Probe bestimmen. Dieses Verfahren wird auch als „Sandwich“-ELISA bezeichnet.

Material

- h-IL-6, DuoSet ELISA Developing Kit, R & D, Deutschland
- h-IL-8, DuoSet ELISA Developing Kit, R&D, Deutschland
- 96 Well Platte, NUNC™, Dänemark
- Automated Microplate Reader, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland
- Software: KC junior, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland
- Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma, Deutschland
- Tween 20, SIGMA, Deutschland
- PBS Dulbecco Instamed, Biochrom AG, Deutschland
- Substrate Reagent Pack, R&D Systems, Deutschland
- Schwefelsäure (H₂SO₄), Roth, Deutschland

Lösungen für IL-6 und IL8

- Waschlösung: 0,05 % Tween 20 in 1x PBS
- Substrat Lösung: 1:1 Mix der Farblösung 1 (H₂O₂) und Farblösung 2 (Tetramethylbenzidin)
- Streptavidin-HRP Lösung
- Stopplösung: 2 N H₂SO₄

Lösungen nur für IL-6

- Reagenz Verdünnungslösung und Blockpuffer: 1 % BSA in 1 x PBS

Lösungen nur für IL-8

- Reagenz Verdünnungslösung: 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20 in TRIS gepufferter NaCl-Lösung
- Blockpuffer: 1 % BSA in 1 x PBS

Prozedur

Der Capture-Antikörper wurde in PBS gelöst (Endkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und von dieser Antikörper Verdünnung wurden jeweils 100 μl in jedes Well der 96 Well Platte pipettiert. Die Inkubation mit dem Capture-Antikörper erfolgte über Nacht. Alle Schritte des ELISAs erfolgen bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Lösung in den Wells verworfen und mit 3 x 300 μl Waschlösung gewaschen.

Anschließend wurde in jedes Well 300 μl des Blockpuffers pipettiert. Geblockt wurde für 1 Stunde. In der Zwischenzeit wurden die Probenverdünnungen hergestellt und die Standardreihe pipettiert. Für beides wurde die Reagenz Verdünnungslösung benutzt.

Die Standardreihe für IL-6 war: 600; 300; 150; 75; 37,5; 18,75 und 9,375 pg/ml .

Die Standardreihe für IL-8 war: 800; 400; 200; 100; 50; 25 und 12,5 pg/ml .

Nach dem Blockieren wurden die Wells wieder mit 3x 300 μl Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 100 μl einer Probe oder einer Standardlösung pipettiert und für 2 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Waschen der Wells mit 3x 300 μl Waschpuffer wiederholt. In jedes Well wurden nun 100 μl der Detektions -Antikörperlösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde der Inhalt der Wells verworfen und der Waschschritt wiederholt. Im nächsten Schritt wurden 100 μl der Streptavidin-HRP-Lösung in jedes Well pipettiert und für 20 Minuten abgedeckt inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Inhalt der Wells wieder verworfen und der Waschschritt wiederholt. Dann wurde in jedes Well 100 μl der Substratlösung pipettiert und im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren 20 Minuten wurde die Reaktion in den Wells durch Zugabe von 50 μl Stopplösung pro Well gestoppt.

Die Absorption wurde mit dem Photometer (BIO-TEK®) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.10 CRH-ELISA (Corticotropin releasing Hormon - ELISA)

Dieser ELISA ist ein kompetitiver ELISA.

Bei dieser Methode wird eine bestimmte Menge spezifischer Antikörper an die Oberfläche einer Festphase fixiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des Antigens und eines Enzym-Antigen-Konjugats. Beide Antigene konkurrieren um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nach der Bindung der Antigene wird mit einem Enzymsubstrat inkubiert. Der dadurch entstehende Farbumschlag wird mit dem Photometer gemessen.

Material

- CRH Peptide Enzyme Immunoassay (EIA), Peninsula Laboratories, USA
- Automated Microplate Reader, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland
- Software KC Junior, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland

Prozedur

Es wurde eine 6-Punkt-Standardreihe mit Assaypuffer hergestellt. Die Konzentrationen der Standardreihe waren 25; 5; 1; 0,2; 0,04 und 0 ng/ml CRH. Von den Standards oder den Proben wurden 50 μ l in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. In jedes Well wurde 25 μ l der CRH-Antikörperlösung gegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden zusätzlich 25 μ l des biotinylierten CRH hinzu gegeben.

Nun konkurrierten das CRH (Corticotropin releasing hormone) der Probe oder des Standards mit biotinyliertem CRH um die freien Bindungsstellen der CRH-Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden

die nicht gebundenen freien und biotinylierten CRH-Peptide durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wurde das Streptavidin-konjugierte Horseradish Peroxidase (SA-HRP) zugegeben und konnte an die Antikörper / biotinyliertes CRH – Komplexe binden. Ein anschließend zugegebenes Substrat (TMB) konnte an das SA-HRP binden. Der dadurch entstehende Farbumschlag konnte mittels Photometer gemessen werden.

Bei diesem kompetitiven ELISA galt, dass die Farbintensität von der Menge des biotinyliertem CRH abhang. Je mehr CRH in der Probe oder im Standard vorhanden war, desto mehr wurden die biotinylierten CRH-Peptides von den limitierten Antikörperbindungsstellen verdrängt und der Farbumschlag war weniger intensiv.

3.11 Proteinextraktion aus den SZ95-Sebozyten

Material

M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, PIERCE, USA

Prozedur

Nach Stoppen der Experimente wurde das Medium in den Wells abgesaugt und die adhärenen Zellen 3 x mit 1x PBS gewaschen. Bis zur Proteinextraktion wurden die Zellen bei -20° C gelagert.

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen aufgetaut und in jedes Well 50 μ l der Extraktionslösung pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig von der Oberfläche der Wells gelöst und dabei mit der Extraktionslösung vermischt. Das Proteingemisch wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert.

3.12 Quantitative Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Gesamtprotein Gehalts im Proteingemisch wurde der Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit benutzt. Hierbei wurden die Coomassie Färbelösung und das Proteingemisch in einem bestimmten Verhältnis

miteinander vermischt. Die Färbelösung war braun und verfärbte sich sofort zu einem Blau, wenn sie an Proteine bindet. Das ging mit einem Umschlag des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm einher. Mit Hilfe eines Spektrometers wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Indem man eine Standardreihe mit Albumin pipettierte und die Absorptionen bei ebenfalls 595 nm maß, konnte eine Standardkurve erstellt werden, bei der die Absorption auf die Proteinkonzentration abgetragen wurde. Wurde eine unbekannte Probe gemessen, konnte anhand dessen Absorption auf die Konzentration an Proteinen in der Probe geschlossen werden.

Material

- Coomassie Protein Assay Reagent, PIERCE, Rockfield, USA
- Albumin Standard, 2 mg/ml, PIERCE, Rockfield, USA
- 96 well Platte, NUNC™, Dänemark
- Automated Microplate Reader, BIO-TEK®, Bad Friedrichshall, Deutschland
- Software: KC Junior, BIO-TEK® instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
- Aqua ad injectabilia, Braun, Deutschland

Prozedur

Es wurde eine Standardreihe pipettiert (20; 10; 5 und 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Von jeder Probe wurde eine 1:150 Verdünnung mit Aqua ad injectabilia hergestellt. Anschließend wurden sowohl von den Standardlösungen, als auch von den Probenverdünnungen jeweils 150 μl in ein Well einer 96 Well Platte pipettiert. In jedes dieser Wells wurden nun 150 μl des Coomassie Protein Assay Reagent pipettiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der Software KC Jr. Win konnte die Proteinmenge jeder Probe berechnet werden.

3.13 Western Blot

3.13.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine aufgetrennt werden. Dabei wandert das zu untersuchende Proteingemisch in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, die durch Acrylamid gebildet wird.

SDS (Natrium Dodecylsulfat) ist ein Detergens, das sich an die Proteine anlagert und diese denaturiert. Die resultierenden Komplexe aus Protein und SDS erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist damit nur noch von der Größe des Moleküls abhängig.

Material

- NuPAGE™ 12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, Deutschland
- NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x), Invitrogen, Deutschland
- NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x), Invitrogen, Deutschland
- NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) Invitrogen, Deutschland
- NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen, Deutschland
- XCell II™, NOVEX, Deutschland (SDS)
- Full Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences, UK
- Power Supply, Gibco-BRL
- Thermomixer compact, Eppendorf, Deutschland

Lösungen

Laufpuffer A (1 Liter) 50 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)
für die äußere Gelkammer + 9950 ml bidest. Wasser

Laufpuffer B (250 ml) 500 μ l NuPAGE® Antioxidant
für die innere Gelkammer + 250 ml des Laufpuffer B

Prozedur

Probenvorbereitung: Durch die vorher berechnete Proteinmenge in jeder Probe, war es nun möglich, 40 μ g Protein von jeder Probe zu nehmen und mit Oxidationsschutz und Loadingbuffer zu versetzen. Diese Mischung wurde anschließend für 10 Minuten bei 70 ° C erhitzt.

x	μ l	Proteingemisch (40 μ g Protein)
+ 1	μ l	NuPAGE ® Sample Reducing Agent
+ 6	μ l	NuPAGE ® LDS Sample Buffer
+ x	μ l	Aqua ad injectabilia, Braun
Σ 25	μ l	Gesamtvolumen der Probe

Die Gele, die für die Elektrophorese benutzt worden sind, waren gebrauchsfertige Gele. Vor Verwendung mussten die Kämme gezogen werden. In die dadurch entstandenen Slots wurden später die Proben pipettiert. Wenn die Gele in die Gelkammer (XCell II™, NOVEX, Deutschland) gestellt werden, entstanden innerhalb dieser Kammer zwei getrennte Räume. In dem äußeren Raum wird der Laufpuffer A gefüllt und in den inneren Raum, in dem sich dann auch die Gele befanden, wurde der Laufpuffer B gefüllt. Mit einer Pipette werden anschließend je 25 μ l der Probe in je ein Slots pipettiert. Als Marker wurden 10 μ l des Full Range Rainbow Molecular Weight Marker benutzt.

Laufbedingungen: 150 V, 1 Stunde

3.13.2 Transfer

Hierbei werden die elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Nitrocellulosemembran gebunden, sind aber nun verschiedenen Nachweismethoden, wie z.B. der Detektion durch Antikörper zugänglich.

Für den Transfer gibt es zwei verschiedene Systeme: das Semidry-Blot-System und das hier verwendete Tank-Blot-System.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran müssen zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst die Antikörper auch an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Das Blockieren erfolgt mit Milchpulver, einem Protein, das durch die Antikörper nicht erkannt werden kann.

Material

- Power Supply, Gibco-BRL, Invitrogen, USA
- Hybond ECL, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Non-fat milk powder, Biorad, München, Deutschland

Lösungen

Transferpuffer	5,82 g TRIS (Base) 2,18 g Glycin 0,37 g SDS 200 ml Methanol (abs.) bidest. Wasser ad 1000 ml
Waschpuffer (1x PBS / 0,1 % Tween-20)	19,1 g PBS 2 ml Tween-20 bidest. Wasser ad 2000 ml
Blocking Puffer (10 % Milchpulver)	100 ml Waschpuffer 10 g non-fat dry milk
Abwaschlösung (Stripping Solution)	0,2 N NaOH

Prozedur

Vor dem Zusammensetzen des Blots wurden die Nitrocellulosemembran und die SDS-Gele für 10 min bei Raumtemperatur mit dem Transferpuffer äquilibriert.

Es wurde ein Blot-Sandwich bestehend aus dem SDS-Gel und der Nitrocellulosemembran hergestellt und anschließend in den Tank gestellt, wobei die Nitrocellulose zur Anode und das SDS-Gel zur Kathode gerichtet war. Der Transfer erfolgte bei 110 V für 90 min unter gekühlten Bedingungen im Eisbad.

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blocking Puffer geschwenkt.

3.13.3 Detektion der Antigene

Nach dem Proteintransfer aus den SDS-Gelen auf die Nitrocellulosemembran wurden die zu untersuchenden Proteine immunologisch durch die Verwendung von spezifischen Primärantikörpern markiert. Die Primärantikörper, die eine Bindung mit den auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Antigenen eingegangen sind, wurden dann in einem 2. Schritt durch spezie-spezifische Sekundärantikörper erkannt. An diese Sekundärantikörper war

das Enzym Horseradish Peroxidase (POD) kovalent gebunden. Durch Inkubation mit Luminolreagenz kann dieses Enzym und somit der gesamte Immunkomplex visualisiert werden. Diese sehr sensitive Luminolreagenz zeigt bei der katalytischen Umsetzung durch die POD eine Chemolumineszenz, mit der Röntgenfilme belichtet werden können.

Material

Primärantikörper	Quelle
Anti – Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) <i>Monoklonal, Spezies: Maus</i>	Abcam, Cambridge, UK
Anti – Fatty-Acid-Desaturase 2 (FADS2) Serum 1 (S1); Serum 2 (S2) <i>Polyklonal, Spezies: Kaninchen</i>	Dr. Philipp Legrand, Rennes cedex, Frankreich
Anti – β -Actin <i>Monoklonal, Spezies: Maus</i>	Sigma, München, Deutschland
Sekundärantikörper	
Peroxidase (POD)-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper <i>Fab-Fragment</i>	Dianova, Hamburg, Deutschland
Peroxidase (POD)-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper <i>Fab-Fragment</i>	Dianova, Hamburg, Deutschland

- Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
- Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
- Software: TINA 2.09, raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland

Lösungen

	Primärantikörper- verdünnung	Sekundärantikörper- verdünnung
SCD	1:1000	1:3000
FADS2	1:2000 von Serum 1 + 1:2000 von Serum 2	1:3000
β-Actin	1:10000	1:5000

Alle Antikörperlösungen wurden mit Blocking Puffer (10% Milchpuffer) verdünnt.

Prozedur

Nach dem Blotten wurden die Nitrocellulosemembranen mit Blocking Puffer mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern, wobei die Inkubationszeit je nach Antikörper variierte: anti-SCD und anti-FADS2 wurden über Nacht bei 4° C inkubiert und anti- β -Actin bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Danach wurden die Membranen 3 mal 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden die Sekundärantikörper zugegeben und die Membranen darin für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Membranen 3 mal 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen, bevor sie für 1 Minute in der *Amersham ECLTM Western Blotting Detection Reagenz* gelegt wurden. Danach wurden die Membranen zügig in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer erfolgte das Auflegen des *Amersham Hyperfilm ECL* und die anschließende Entwicklung des Films mit dem Entwickler.

Um auf einer Membran alle gesuchten Antigene nachzuweisen, wurden nach jeder Antikörperdetektion, alle gebundenen Antikörper durch die Abwaschlösung (Stripping Lösung) entfernt. Dazu wurde die Membran 5 Minuten in 0,2 N NaOH und 3 mal 5 Minuten mit Waschlösung bei Raumtemperatur gewaschen. Um anschließend die freien Bindungsstellen für die nächste Antikörperdetektion abzusättigen, wurde die Membran wiederum mindestens 1 Stunde mit dem Blocking Puffer inkubiert. Danach konnte die nächste Pri-

märantikörperlösung benutzt werden.

3.14 Statistische Methoden

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde für alle Messwerte, soweit eine Mehrfachbestimmung vorgenommen wurde, der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Um abzuschätzen, ob sich die Mittelwerte zweier Versuchsreihen (in vorliegendem Fall: unbehandelte und behandelte Zellen) signifikant unterscheiden, wurde im Falle einer Mehrfachbestimmung der Student's T-Test angewandt. Hierzu wurde mit Hilfe des Microsoft Excel die Irrtumswahrscheinlichkeit p berechnet. Hierbei galt: wenn $p < 0,05$, wurde das Ergebnis als signifikant eingestuft.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 LDH-Assay

Alle benutzten Testsubstanzen, mit Ausnahme des von Novartis gelieferten NVP-LCF369, wurden in vorherigen Experimenten von den Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Zouboulis / Dr. Fimmel mit Hilfe des LDH-Assays auf ihre Zytotoxizität hin überprüft. Eine Wiederholung fand im Rahmen dieser Arbeit deshalb nicht statt. Die Zytotoxizität der Substanz NVP-LCF369 und der Kombination aus Linolsäure und Testosteron, sowie einer Konzentration MALP-2 (50 ng/ml) wurden in Rahmen eines anderen Forschungsprojektes auf ihre Zytotoxizität hin überprüft.

Die unbehandelten Zellen entsprechen hierbei der Negativkontrolle und wurden mit 0% Zytotoxizität gleichgesetzt.

Die mit Triton X-100 behandelten Zellen entsprechen hier der Positivkontrolle und wurden mit 100% Zytotoxizität gleichgesetzt.

Die Substanz NVP-LCF369 zeigte nach 24-h Behandlung im Vergleich zu Positivkontrolle nur sehr geringe zytotoxische Effekte auf die SZ95-Sebozyten. In der Konzentration von 100 nM fiel der Wert der Zytotoxizität sogar unter das Niveau der Negativkontrolle ab (Abb. 4.2).

Ebenfalls sehr niedrige Werte zeigten sich bei der Behandlung mit MALP-2 und MALP 2 / NVP-LCF369. In allen Behandlungsvarianten lag die Zyto-

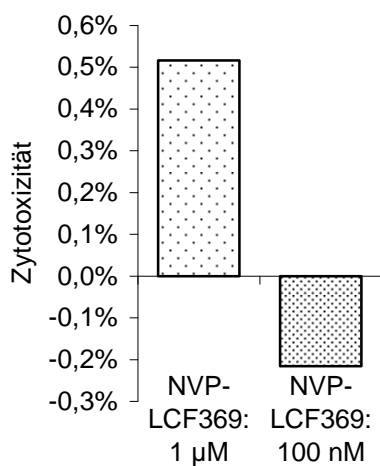


Abbildung 4.1: Zytotoxizität der SZ95-Sebozyten nach 24h-Behandlung mit NVP-LCF369. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen von NVP-LCF369 getestet (1 µM und 100 nM). Die Werte sind Einfachbestimmungen (n=1).

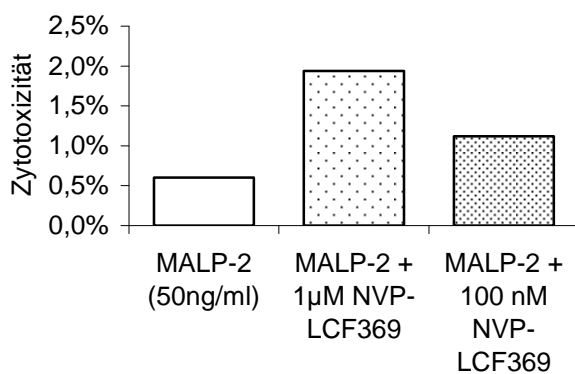


Abbildung 4.2: Zytotoxizität der SZ95-Sebozyten nach 24h-Behandlung mit MALP-2 (50 ng/ml) und mit MALP-2 (50 ng/ml) und LCF-NVP369 in verschiedenen Konzentrationen (1 µM und 100 nM). Die Werte sind Einfachbestimmungen (n=1).

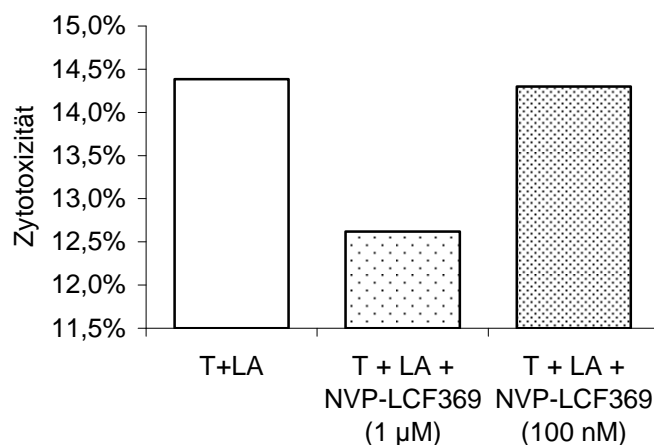


Abbildung 4.3: Zytotoxizität der SZ95-Sebozyten nach 24h-Behandlung mit Testosteron (T) 20nM und Linolsäure (LA) 100µM als Kombination und zusätzlich mit LCF-NVP369 in verschiedenen Konzentrationen (1µM und 100 nM). Die Werte sind Einfachbestimmungen (n=1).

toxizität < 2 % im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 4.2).

Lediglich die Behandlungen mit der Kombination aus Testosteron / Linolsäure und Testosteron / Linolsäure / NVP-LCF369 führten zu Zytotoxizitätswerten von 12,5 - 14,5% (Abb. 4.3).

4.2 IL-6 / IL-8 Elisa

Die SZ95-Sebozyten wurden mit verschiedenen Testsubstanzen in 2 unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Nach 24 h-Inkubationszeit wurde der Überstand gesammelt und mittels ELISA auf die Konzentration von IL-6 und IL-8 hin untersucht.

Der Überstand der unbehandelten Zellen galt als Kontrolle. Die ermittelten IL-6- und IL-8-Konzentrationen in den Überständen der behandelten Zellen wurden im Verhältnis zu den Kontrollen betrachtet.

Die Mittelwerte sind aus 3-fach Bestimmungen.

4.2.1 PMA

Die Behandlung mit PMA führte konzentrationsabhängig zu einer erhöhten IL-6- [+64% bzw. +101%] und einer erhöhten IL-8-Produktion [+207% bzw. +350%] (Abb. 4.4).

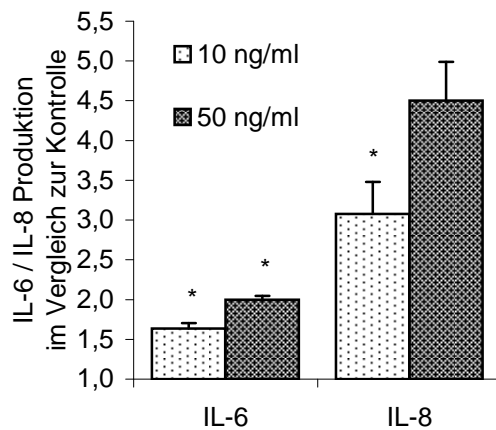


Abbildung 4.4: IL-6 und IL-8 Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit PMA in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.2.2 Dexamethason

Dexamethason führte in den beiden hier getesteten Konzentrationen zu einer sehr starken Reduktion der IL-6- [-92% bzw. -93%] und IL-8- [-99% bzw. -93%] Produktion (Abb. 4.5).

4.2.3 CRH

Die Behandlung mit CRH führte zu keiner deutlichen Änderung der IL-6-Produktion.

Nur die Behandlung mit 10^{-8} Mol/l CRH führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Steigerung der IL-8-Produktion um 18% (Abb. 4.6).

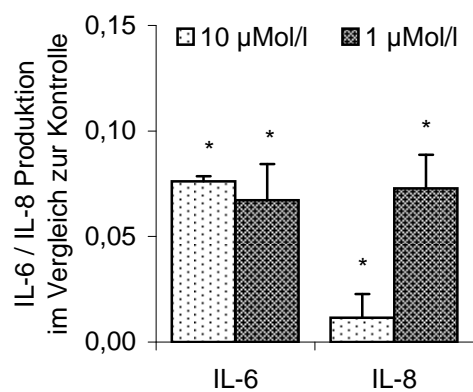


Abbildung 4.5: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

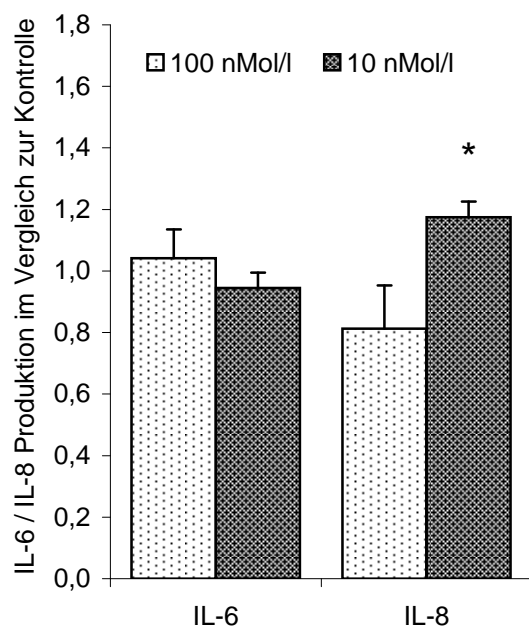


Abbildung 4.6: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit CRH in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.2.4 Linolsäure

Die Behandlung mit Linolsäure führte abhängig von der Konzentration der Linolsäure zu einer Erhöhung der IL-6-Produktion [+50% bzw. +10%] und einer Reduktion der IL-8-Produktion [-19% bzw. -20%] (Abb. 4.7).

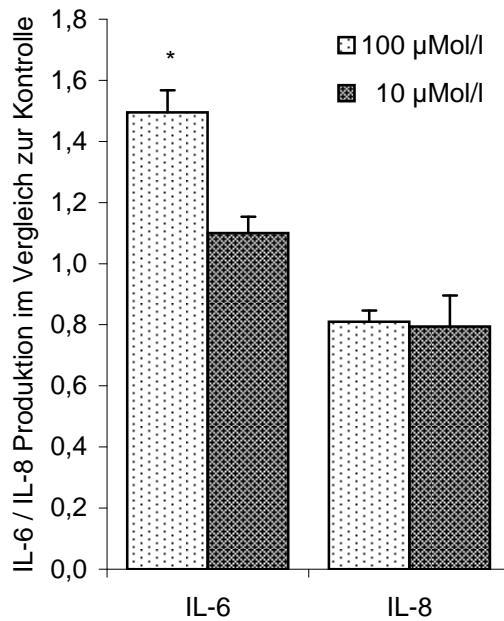


Abbildung 4.7: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit Linolsäure in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.2.5 Arachidonsäure

Ebenfalls konzentrationsabhängig war die erhöhte IL-6-Produktion unter der Behandlung mit Arachidonsäure [+26% bzw. +15%]. Im Gegensatz zur Linsäure, führte eine Behandlung mit Arachidonsäure zu einem Anstieg der IL-8-Produktion [+15% bzw. +4%] (Abb. 4.8).

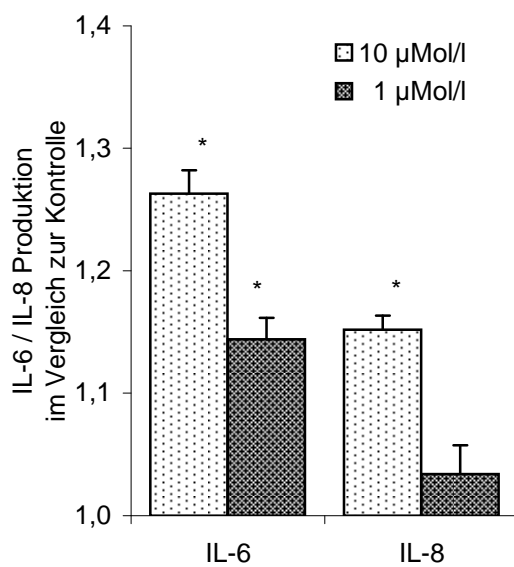


Abbildung 4.8: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit Arachidonsäure in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.2.6 MALP-2

Eine Behandlung mit MALP-2 führte zu einer erhöhten IL-6-Produktion [+28% bzw. +110%]. Die IL-8-Produktion wurde ebenfalls erhöht [+47% bzw. +335%] (Abb. 4.9).

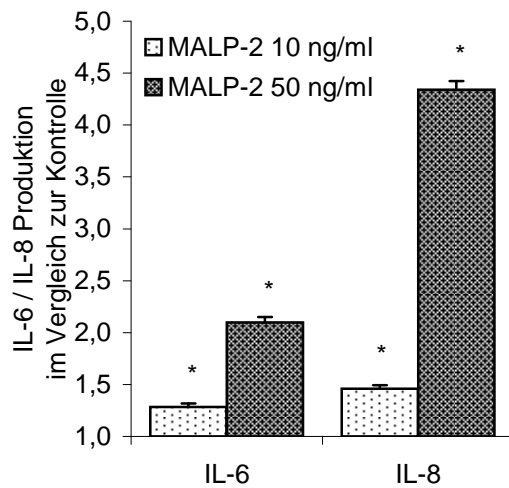


Abbildung 4.9: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit MALP-2 in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.2.7 NVP-LCF369

Die Behandlung der SZ95-Sebozyten mit NVP-LCF369 allein, führte in beiden hier verwendeten Konzentrationen zu keiner deutlichen Änderung in der IL-6-Produktion (Abb. 4.10). Die IL-8-Produktionen dagegen wurden um 30% bzw. 10% gesenkt.

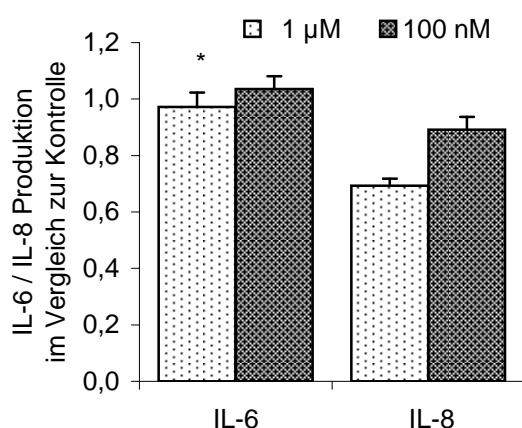


Abbildung 4.10: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit NVP-LCF369 in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Wurde aber die IL-6-Produktion durch die Behandlung mit MALP-2 (50 ng/ml) oder die Kombination aus Testosteron ($2 \cdot 10^{-8}$ Mol/l) und Linolsäure (10^{-4} Mol/l) stimuliert, führte die gleichzeitige Gabe von NVP-LCF369 zu einer Reduktion der IL-6-Produktion, jedoch nie unter das Niveau der Kontrolle (Abb. 4.11, 4.12). Die Behandlung mit MALP-2 und NVP LCF369 führte zu einem Rückgang von IL-6 um 6% bzw. 3%, verglichen mit der Behandlung mit MALP-2 allein (Abb. 4.11). Die Behandlung mit Testosteron / Linolsäure und NVP-LCF369 führte zu einem Rückgang um 12% bzw. 5%, verglichen mit der Behandlung mit Testosteron / Linolsäure allein (Abb. 4.12).

Die Behandlung mit der Kombination aus MALP-2 und dem NVP-LCF369

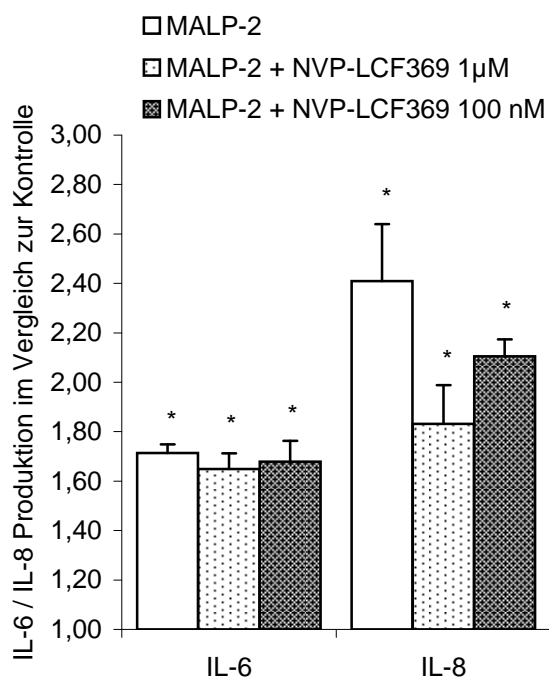


Abbildung 4.11: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit MALP-2 (50 ng/ml). Des Weiteren erfolgte die gleichzeitige Behandlung mit MALP-2 (50 ng/ml) und NVP-LCF369 in verschiedenen Konzentrationen, ebenfalls für 24 h. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Kontrolle = unbehandelte Zellen $\hat{=}$ 1,0

führte zu einer Reduktion der IL-8-Werte um 58% bzw. 30%, im Vergleich zur Behandlung mit MALP-2 allein. Die IL-6-Werte dagegen, wurden kaum beeinflusst.

Eine Behandlung der SZ95-Sebozyten mit der Kombination aus Testosteron und Linolsäure führte zu einem Anstieg der IL-6-Produktion [+32%] und einer Reduktion der IL-8-Produktion [-42%].

Wurden die Zellen mit Testosteron / Linolsäure und NVP-LCF369 behandelt, zeigte sich im Vergleich zur Testosteron / Linolsäure Behandlung allein, keine deutliche Regulation der IL 6-Werte.

Eine zusätzliche Behandlung mit NVP-LCF369 führte dagegen zu einer weiteren Reduktion der IL-8-Produktion, um weitere -24% bzw. -19% (Abb. 4.12).

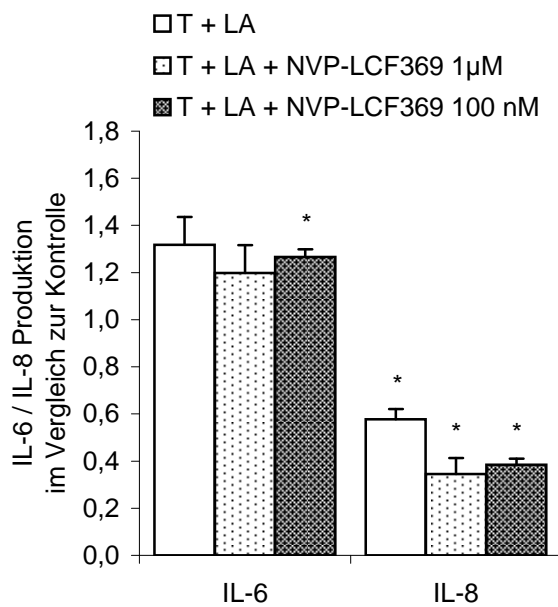


Abbildung 4.12: IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h-Behandlung mit Testosteron (T) 20 nM und Linolsäure (LA) 100 μ M. Des Weiteren erfolgte die gleichzeitige Behandlung mit der Kombination aus T/LA und NVP-LCF369 in verschiedenen Konzentrationen, ebenfalls für 24 h. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.3 CRH-ELISA

Bei diesem ELISA wurde das intrazelluläre Corticotropin-releasing Hormon (CRH) gemessen, da der Überstand der SZ95-Sebozyten abgenommen und die Zellen anschließend 3 Mal mit 1x PBS gewaschen worden sind, bevor das Zelllysate auf den CRH-Gehalt hin untersucht wurde.

Gemessen wurden die intrazellulären CRH-Konzentrationen nach einer bestimmten Behandlungsdauer (1,5; 12 oder 24 h). Zu jedem Zeitpunkt wurde eine unbehandelte Kontrolle ebenfalls auf den intrazellulären CRH-Gehalt hin überprüft. Alle hier angegebenen Werte geben das Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle des untersuchten Zeitpunktes an.

Die hier angegebenen Werte sind resultieren aus 3-fach Bestimmungen.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit den Testsubstanzen: PMA, Dexamethason, Linolsäure und Arachidonsäure keinen Effekt auf die intrazelluläre CRH-Konzentration haben.

Lediglich die Testsubstanzen MALP-2 und CRH zeigten einen Einfluss auf die CRH-Produktion.

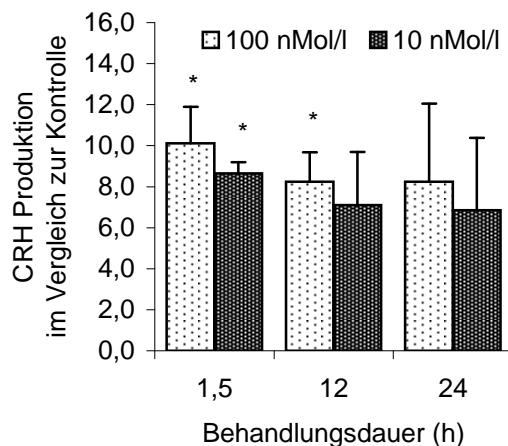


Abbildung 4.13: Intrazelluläre CRH-Produktion nach Behandlung der SZ95-Sebozyten mit CRH (10^{-7} Mol/l und 10^{-8} Mol/l). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.3.1 CRH

Das CRH in den hier verwandten Konzentrationen führte zu einem Anstieg des intrazellulären CRH-Gehaltes. Bereits 1,5 Stunden nach Behandlungsbeginn stieg der intrazelluläre CRH-Gehalt auf das 10,1-fache bzw. das 8,6-fache. Anschließend fiel die CRH-Konzentration ab. Nach 12 Stunden fanden sich 8,5-fach bzw. 7,1-fach erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24 Stunden wurden noch 7,9-fach bzw. 6,6-fach erhöhte CRH-Konzentrationen gemessen (Abb. 4.13).

4.3.2 MALP-2

Bei der Behandlung mit MALP-2 kommt es initial zu einem Absinken der intrazellulären CRH-Konzentration. Dann steigt der CRH-Gehalt an und erreicht nach 12 h Behandlung Werte von +27% bzw. +44% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.14).

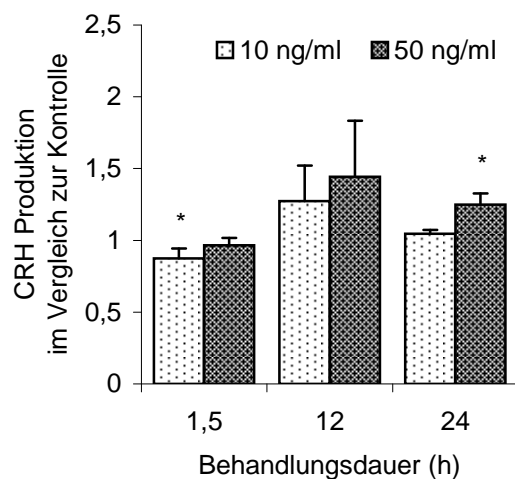


Abbildung 4.14: Intrazelluläre CRH-Produktion nach Behandlung der SZ95-Sebozyten mit MALP-2 (10 ng/ml und 50 ng/ml). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.4 PCR und Western Blot

Jede Testsubstanz wurde auf ihre Wirkung auf mRNA und Proteinebene untersucht.

Auf RNA-Ebene konnten sowohl FADS2, SCD und TLR2 überprüft werden. Ein TLR2-Western Blot konnte nicht etabliert werden, weshalb sich die Proteinbestimmung nur auf FADS2 und SCD beschränkt.

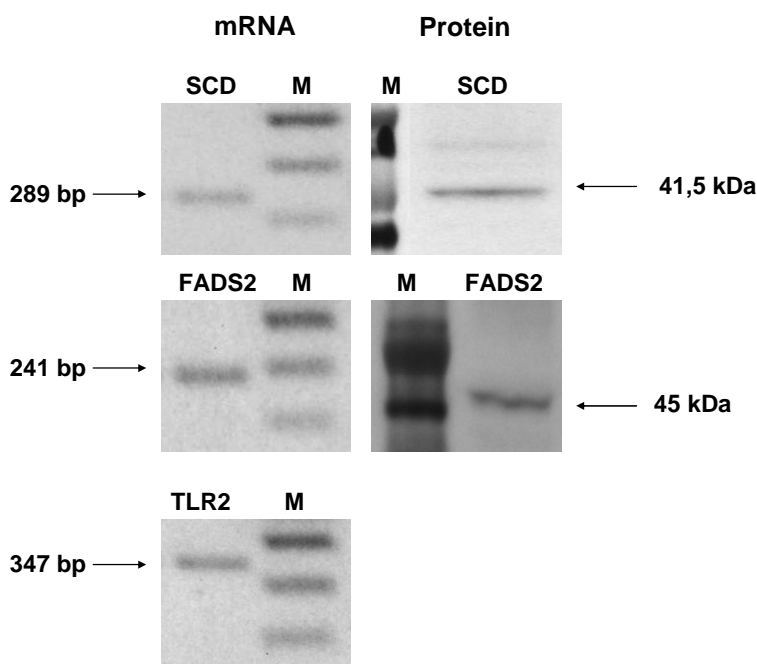


Abbildung 4.15: Expression der SCD, FADS2 und TLR2 auf mRNA und Proteinebene in SZ95-Sebozyten. (M = Marker)

4.4.1 PMA

Die Behandlung mit PMA führt nach 1,5 h Behandlungsdauer zu einem Anstieg der SCD mRNA-Werte [+17% bzw. +25%]. Anschließend sind die SCD mRNA-Werte in den Zellen ab [6 h Behandlungsdauer: +12% bzw. ±0%]. Nach 24 h Behandlung mit 50 ng/ml PMA sinkt die SCD mRNA-Menge unter das Kontrollniveau [-19%] (Abb. 4.17).

Gemäß dem Anstieg der bereits auf mRNA-Ebene erkennbar war, steigt auch die SCD Proteingehalt in den Sebozyten nach 1,5 h Behandlungsdauer an [+15% bzw. +55%] und erreichen ihre höchsten Werte nach 6 h Behandlungsdauer [+21% bzw. +71%]. Anschließend fällt der SCD Proteingehalt ab und liegt nach 12 h unter dem Kontrollniveau [-24% bzw. -13%]. Nach 24 h Behandlung sind die SCD-Mengen in den behandelten Sebozyten wieder angestiegen und liegen über dem Kontrollniveau [+32% bzw. +43%] (Abb. 4.18).

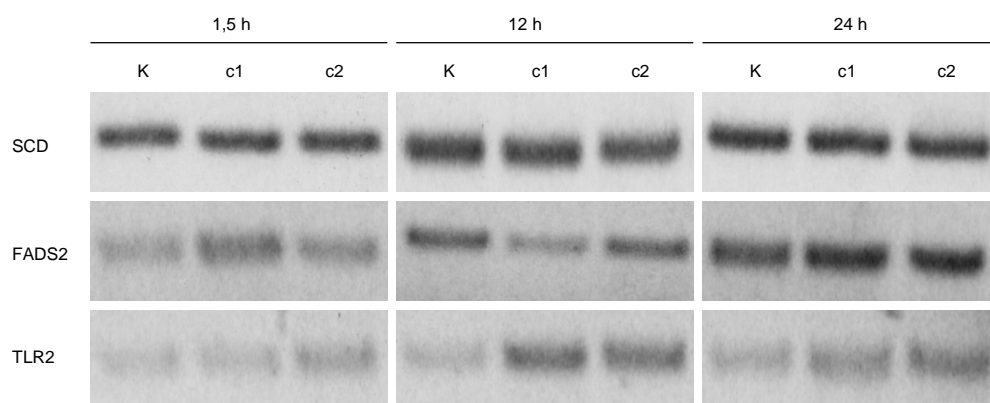


Abbildung 4.16: RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 auf mRNA-Ebene in SZ95-Sebozyten nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit PMA. K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10 ng/ml PMA. c2= 50 ng/ml PMA

SCD

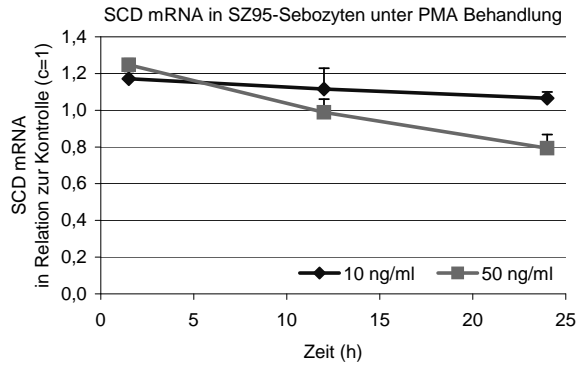


Abbildung 4.17: SCD mRNA in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung. Gemessen wurde die SCD mRNA nach 1,5; 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml PMA. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

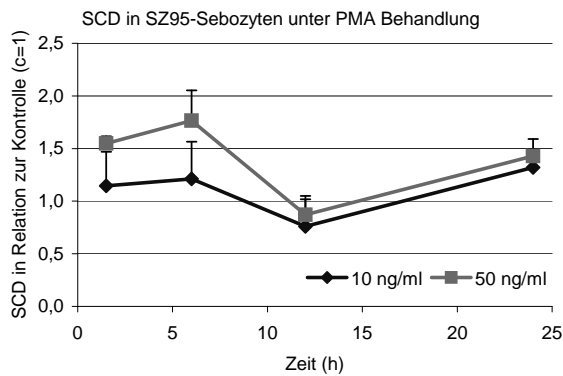


Abbildung 4.18: SCD in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung. Gemessen wurde die SCD nach 1,5; 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml PMA. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

FADS2

Unter PMA Behandlung kam es initial 1,5 h nach Behandlungsbeginn zu einem Anstieg der FADS2 mRNA-Menge in den Sebozyten [+47% bzw. +37%], gefolgt von einem Abfall nach 6 h Behandlungsdauer unter das Kontrollniveau [-32% bzw. -16%]. Nach 24 h Behandlungsdauer ist die FADS2 mRNA wiederum angestiegen [+40% bzw. +35%] (Abb. 4.19).

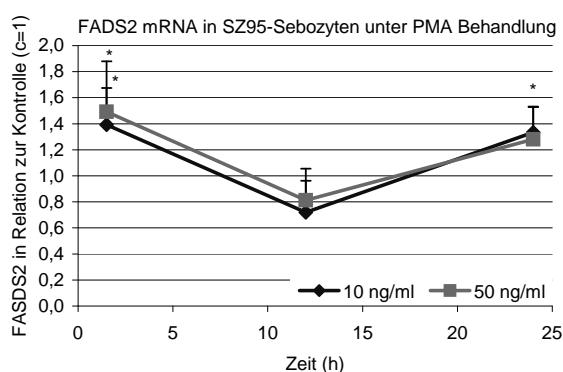


Abbildung 4.19: FADS2 mRNA in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung. Gemessen wurde die FADS2 mRNA-Konzentration nach 1,5; 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml PMA. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Auf Proteinebene ist ebenfalls 1,5 h nach Behandlungsbeginn ein Anstieg der FADS2 Menge erkennbar [+10% bzw. +32%]. Wie bereits auf mRNA-Ebene erkennbar, kommt es auch auf Proteinebene zu einem Abfall der FADS2-Menge in den Zellen [24 h Behandlungsdauer: -3% bzw. -20%] (Abb. 4.20).

TLR2

Unter der PMA-Behandlung der SZ95-Sebozyten kommt es zu einem Anstieg der TLR2 mRNA-Menge. Dabei lagen die Werte zu jedem untersuchten Zeitpunkt oberhalb des Kontrollniveaus mit einem Maximum nach 12 h Behandlungsdauer [+226% bzw. +208%] (Abb. 4.21).

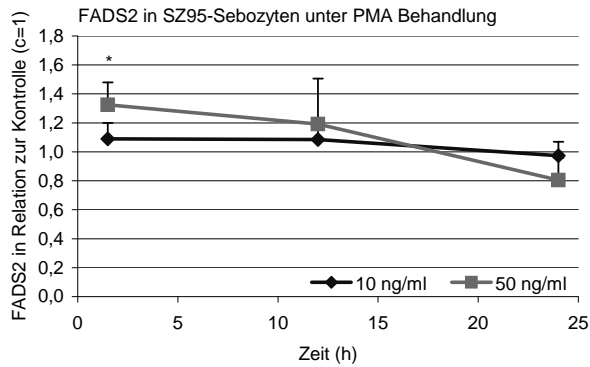


Abbildung 4.20: FADS2 in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung. Gemessen wurde die FADS2 nach 1.5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml PMA. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

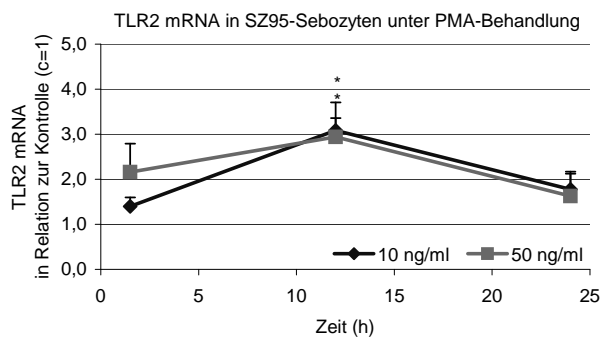


Abbildung 4.21: TLR2 mRNA in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung. Gemessen wurde nach 1.5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml PMA. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.4.2 Dexamethason

SCD

Unter der Behandlung mit Dexamethason kam es nach 1,5 h Behandlungsdauer zunächst zu einer Erhöhung der SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten [+15% bzw. +45%]. Anschließend wurde eine Abnahme der SCD mRNA Menge gesehen, die nach 24 h unterhalb der Kontrollen lag [-15% bzw. -18%] (Abb. 4.22).

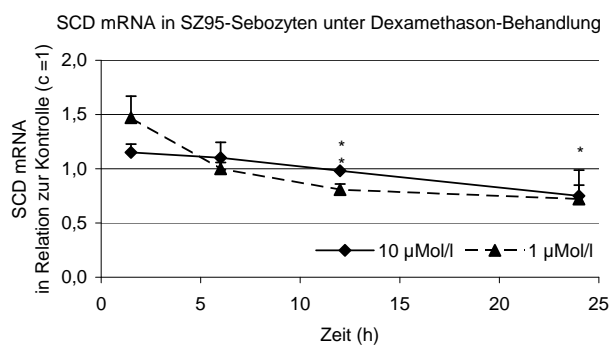


Abbildung 4.22: SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Die Menge an SCD Protein war nach 1,5 h Behandlungsdauer bereits erhöht [+147% bzw. +87%]. Gemäß dem Trend, der sich bereits auf mRNA Ebene erkennen ließ, fiel auch die Proteinmenge an SCD auf das Kontrollniveau ab (Abb. 4.23).

FADS2

Die FADS2 mRNA-Menge stieg unter Behandlung mit Dexamethason (10^{-5} Mol/l) an [+38%], fiel anschließend ab und lag nach 24 h unter dem Kontrollniveau [-44%]. Bei einer Behandlung mit 10^{-6} Mol/l Dexamethason lagen die

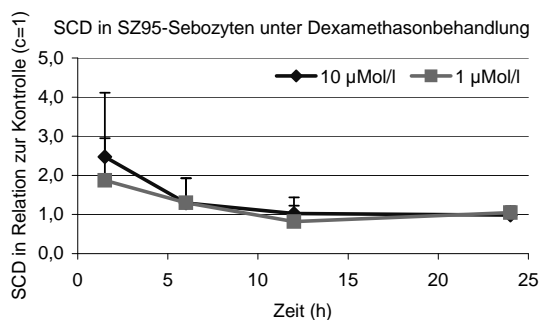


Abbildung 4.23: SCD in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5; 6; 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit 2 verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Werte zu jeder Zeit unterhalb der Kontrolle (Abb. 4.24).

Die FADS2-Menge steigt nach 6 h Behandlung an [+21% bzw. +16%]. Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten lagen die Werte unterhalb der unbehandelten Kontrolle [1,5 h Behandlungsdauer: -10% bzw. -14%], [12 h Behandlungsdauer: -15 % bzw. -31%], [24 h Behandlungsdauer: -10% bzw. -27%] (Abb. 4.25).

Unter der Dexamethason-Behandlung kam es zu einem Anstieg der TLR2 mRNA-Menge in den Zellen. Nach 1,5 h [+73% bzw. +131%] und nach 24 h [+75 % bzw. +115 %] konnten die höchsten Werte gemessen werden. In den Zwischenzeiten fiel der TLR2 mRNA-Level wieder ab, lag aber nie unter den Kontrollen (Abb. 4.26).

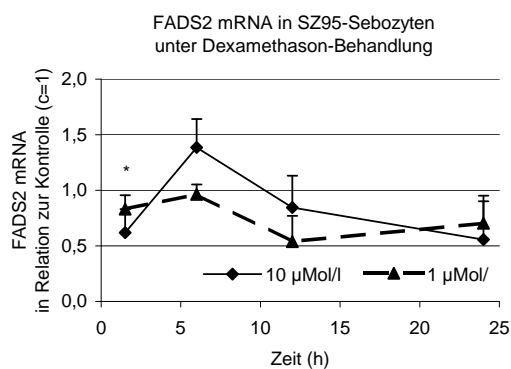


Abbildung 4.24: FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

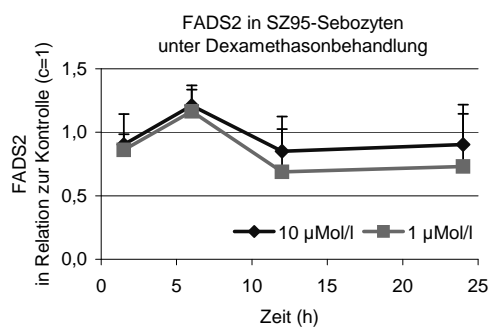


Abbildung 4.25: FADS2 in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5; 6; 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit 2 verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l.

TLR2

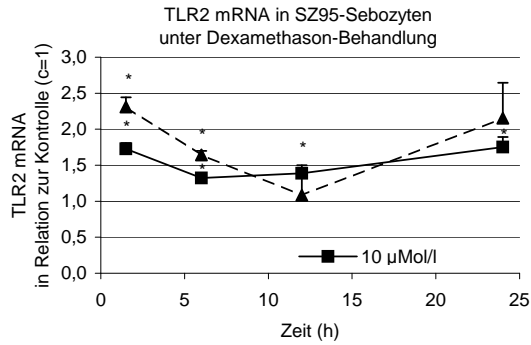


Abbildung 4.26: TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Dexamethasonbehandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

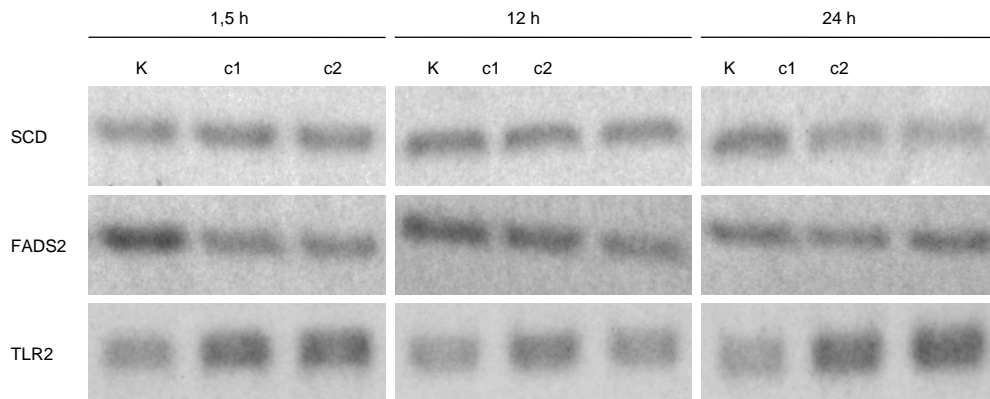


Abbildung 4.27: RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 in SZ95-Sebozyten nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit Dexamethason. K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10^{-5} Mol/l Dexamethason. c2= 10^{-6} Mol/l Dexamethason.

4.4.3 CRH

SCD

Unter der Behandlung mit CRH kommt es in beiden hier getesteten Konzentrationen zu einem Abfall der SCD mRNA-Menge nach 1,5 h Behandlung [-15% bzw. -11%]. Nach 6 h Behandlung sind die mRNA-Werte angestiegen [+37% bzw. +37%]. Nach 24 h sind die mRNA-Werte wieder abgefallen und erreichen wieder Werte, die unterhalb der Kontrollen liegen [-4% bzw. -34%] (Abb. 4.28).

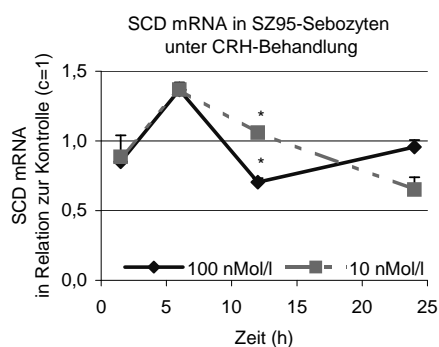


Abbildung 4.28: SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-7} Mol/l und 10^{-8} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Auf Proteinebene kommt es nach 6 h Behandlung ebenfalls zu einem Anstieg der SCD [+22% bzw. +32%]. Danach fallen die Werte wieder ab und erreichen ähnlich dem mRNA-Level Werte unterhalb der Kontrolle [-13% bzw. -23%] (Abb. 4.29).

FADS2

Nach 1,5 h Behandlung mit CRH liegen die FADS2 mRNA-Werte unterhalb der Kontrollen [-40% bzw. -7%]. Anschließend steigen die FADS2 mRNA-Werte und liegen nach 6 h Behandlung oberhalb des Kontrollniveaus [+85%

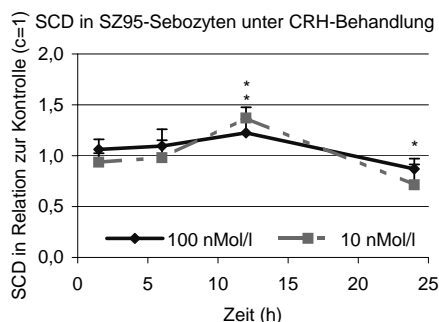


Abbildung 4.29: SCD in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-7} Mol/l und 10^{-8} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

bzw. +30%]. Nach 24 h sind die mRNA-Level abgefallen und liegen nun zum Teil wieder unter den Kontrollwerten [-8% bzw. +6%] (Abb. 4.30).

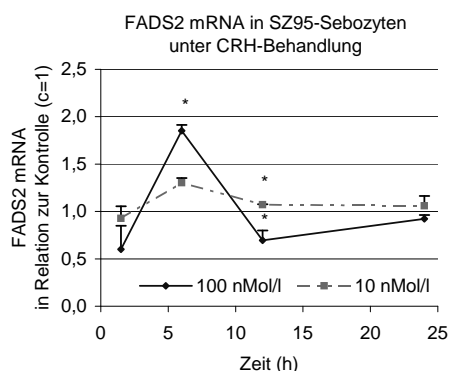


Abbildung 4.30: FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-7} Mol/l und 10^{-8} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Auf Proteinebene liegt die FADS2 nach 1,5 h Behandlung, wie auf mRNA-Ebene gesehen, unterhalb der Kontrollen [-2% bzw. -6%]. Unter der Behandlung mit 10^{-7} mol/l CRH kommt es nach 6 h Behandlung zu einem weiteren Abfall [-13%]. Nach 12 h Behandlung sind die mRNA Werte angestiegen [+18% bzw. +24%]. Ähnlich dem Abfall der FADS2 mRNA-Menge nach 24

h Behandlung, fallen auch die FADS2 Proteinmengen ab [-19% bzw. -6%] (Abb. 4.31).

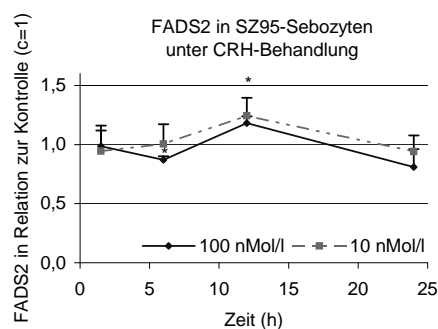


Abbildung 4.31: FADS2 in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-7} Mol/l und 10^{-8} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

TLR2

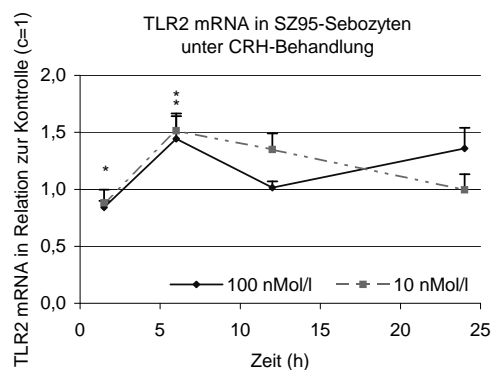


Abbildung 4.32: TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-7} Mol/l und 10^{-8} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Unter CRH-Behandlung sinkt die TLR2 mRNA-Menge nach 1,5 h unter das Kontrollniveau [-16% bzw. -12%], steigt nach 6 h Behandlung aber

wieder an [+44% bzw. +51%] und bleibt auf oder über dem Kontrollniveau [12 h Behandlungsdauer: + 2% bzw. +35 %; 24 h Behandlungsdauer: +36% bzw. $\pm 0\%$] (Abb. 4.32).

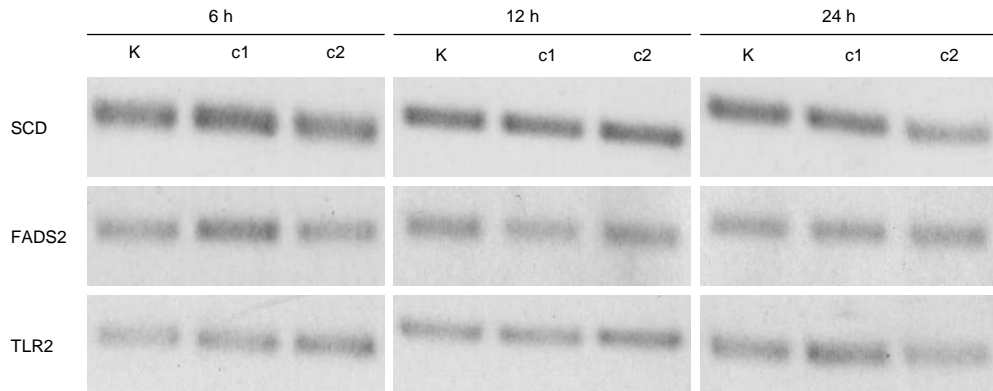


Abbildung 4.33: RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 in SZ95-Sebozyten nach 6, 12 und 24 h Behandlung mit CRH. K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10^{-7} Mol/l CRH. c2= 10^{-8} Mol/l CRH.

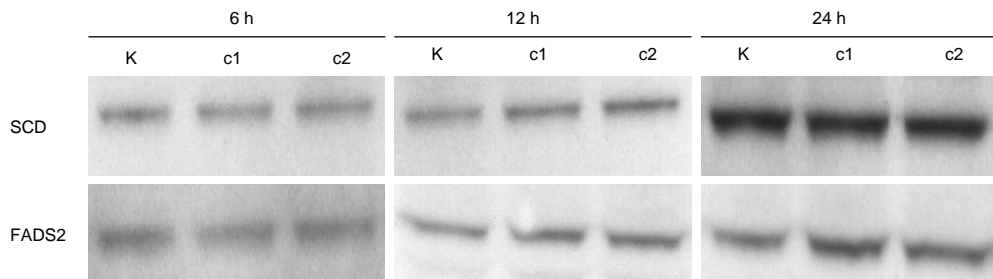


Abbildung 4.34: Western Blot: Expression der SCD und FADS2 nach 6, 12 und 24 h Behandlung der SZ95-Sebozyten mit CRH. K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10^{-7} Mol/l CRH. c2= 10^{-8} Mol/l CRH.

4.4.4 Linolsäure

SCD

Eine Behandlung mit Linolsäure führt nach 1,5 h zu einem Anstieg der SCD mRNA-Menge [+46% bzw. +96%]. Anschließend fallen die Werte ab und liegen nach 24 h Behandlung unter dem Kontrollniveau [-23% bzw. -39%] (Abb. 4.35).

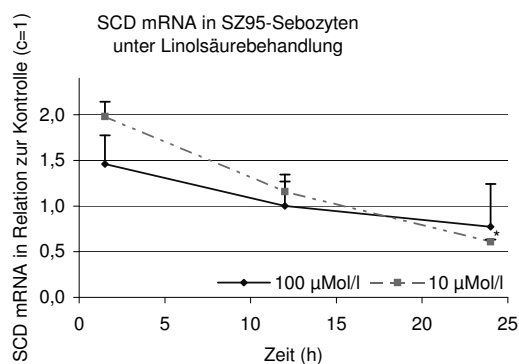


Abbildung 4.35: SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Auf Proteinebene wird ein Anstieg von SCD nach 6 h Behandlung gesehen [+19% bzw. +56%]. Danach fielen die Werte ab und lagen nach 24 h unterhalb des Kontrollniveaus [-56% bzw. -36%] (Abb. 4.36).

FADS2

Unter einer Behandlung mit Linolsäure (10^{-4} Mol/l) kommt es zu geringen Erhöhung der FADS2 mRNA-Menge [+14%] nach 1,5 h. Anschließend fallen die Werte ab und sind bereits nach 12 h deutlich unter dem Kontrollniveau der unbehandelten Zellen [-42% bzw. -29%] (Abb. 4.37).

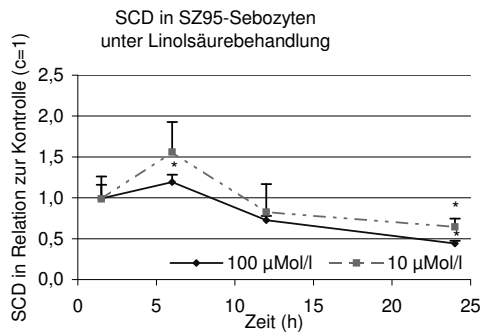


Abbildung 4.36: SCD in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

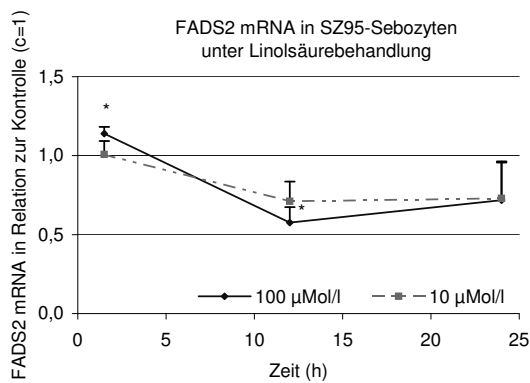


Abbildung 4.37: FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Die FADS2-Menge liegt nach 1,5 h unterhalb der Kontrolle [-15% bzw. -16%], steigt dann an und liegt nach 6 h Behandlungszeit deutlich über der Kontrolle [+18% bzw. +36%] (Abb. 4.38).

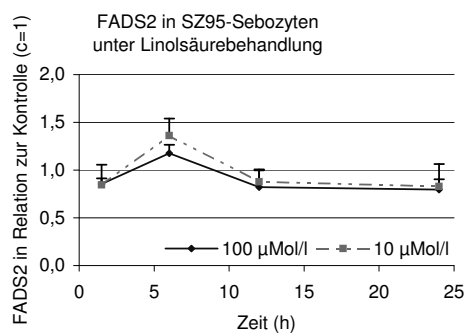


Abbildung 4.38: FADS2 in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

TLR2

Eine Behandlung mit Linolsäure führte nach 1,5 h zu einer Reduktion der TLR2 mRNA-Menge [-30% bzw. -20%], gefolgt von einem Anstieg der TLR2 mRNA-Menge nach 12 h [+84% bzw. +119%] (Abb. 4.39).

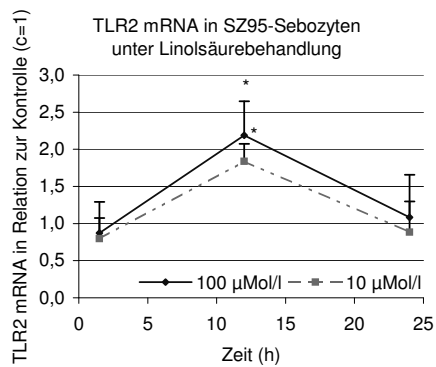


Abbildung 4.39: TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

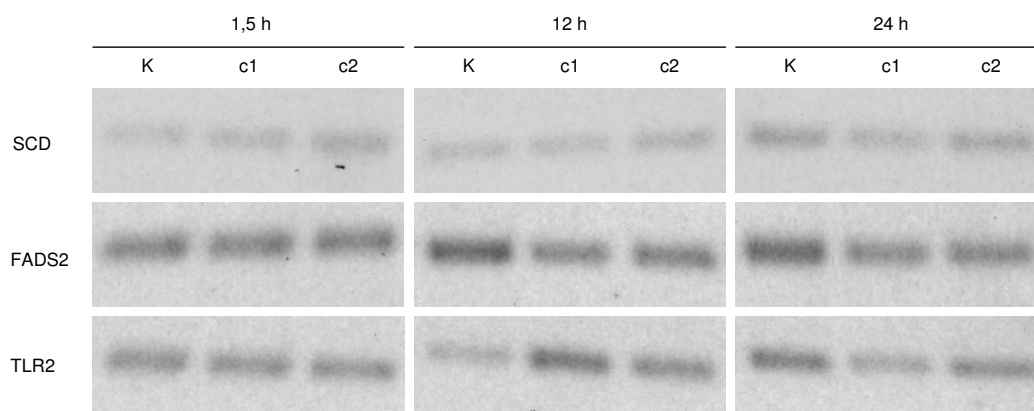


Abbildung 4.40: RT-PCR: Expression der SCD, FADS2 und TLR2 in SZ95-Sebozyten auf mRNA-Ebene (K= unbehandelte Kontrolle; c1= 10^{-4} Mol/l; c2= 10^{-5} Mol/l) nach 1,5 h; 12 h und 24 h Behandlungsdauer mit Linolsäure.

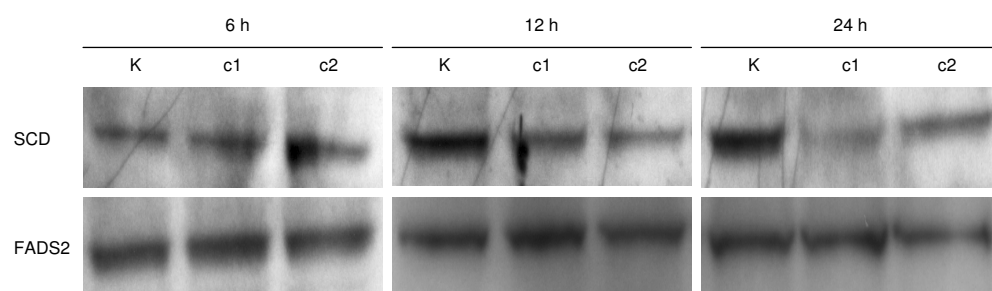


Abbildung 4.41: Western Blot: Expression der SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten nach 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer mit Linolsäure. K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10^{-4} Mol/l LA; c2= 10^{-5} Mol/l LA.

4.4.5 Arachidonsäure

SCD

Unter Behandlung mit Arachidonsäure steigt die SCD mRNA-Menge nach 1,5 h Behandlungsdauer an [+69% bzw. +12%]. Anschließend fällt der mRNA Level ab und ist nach 6 h unterhalb des Kontrollniveaus [-26% bzw. -33%] (Abb. 4.42).

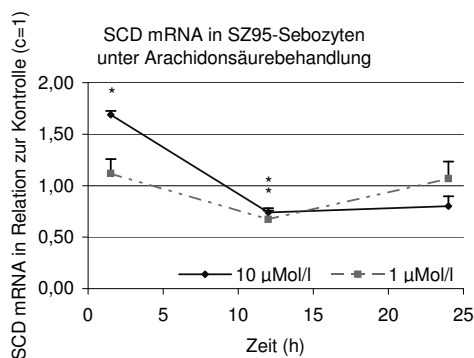


Abbildung 4.42: SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Die Menge an SCD im SZ95-Sebozyten ist nach 1,5 h Behandlungsdauer angestiegen [+23% bzw. +77%]. Nach 6 h Behandlungsdauer fallen die Werte ab [+23% bzw. +38%] und liegen nach 12 h [10^{-5} Mol/l: -26%] bzw. 24 h [10^{-6} Mol/l: -40%] unter dem Kontrollniveau (Abb. 4.43).

FADS2

Unter der Arachidonsäurebehandlung sind die FADS2 mRNA-Level nach 1,5 h Behandlungsdauer unter das Kontrollniveau gefallen [-28% bzw. -16%]. Die FADS2 mRNA-Level stiegen nicht an und liegen auch nach 24 h unter dem Kontrollniveau [-26% bzw. -44%] (Abb. 4.44).

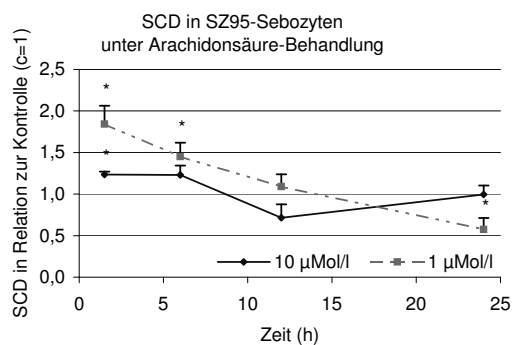


Abbildung 4.43: SCD in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1.5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

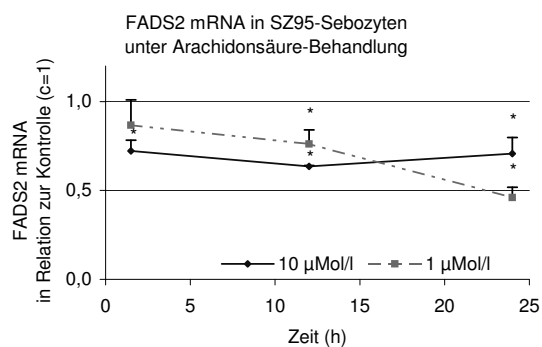


Abbildung 4.44: FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1.5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Wie bereits auf der mRNA-Ebene erkennbar war, lag die FADS2 Proteinmenge während der gesamten Behandlungsdauer unter dem Kontrollniveau. Die Behandlung mit 10^{-6} Mol/l Arachidonsäure hatte nach 6 h [-38%] und 24 h [-29%] den stärksten Effekt (Abb. 4.45).

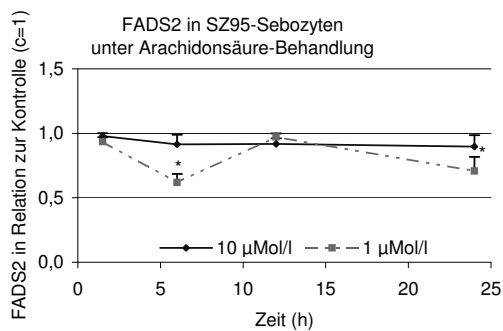


Abbildung 4.45: FADS2 in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

TLR2

Eine Behandlung mit 10^{-5} Mol/l Arachidonsäure führte zu einem Anstieg der TLR2 mRNA-Menge mit einem Maximum nach 12 h Behandlungsdauer [+35%].

Währenddessen führte eine Behandlung mit 10^{-6} Mol/l Arachidonsäure zunächst zu einem Abfall der TLR2 mRNA-Menge [1,5 h Behandlungsdauer: -14% bzw. 12 h Behandlungsdauer: -9%] und anschließend zu einem Anstieg nach 24 h Behandlungsdauer [+72%] (Abb. 4.46).

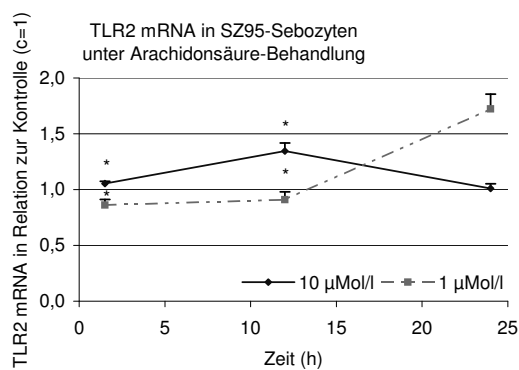


Abbildung 4.46: TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10^{-5} Mol/l und 10^{-6} Mol/l. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

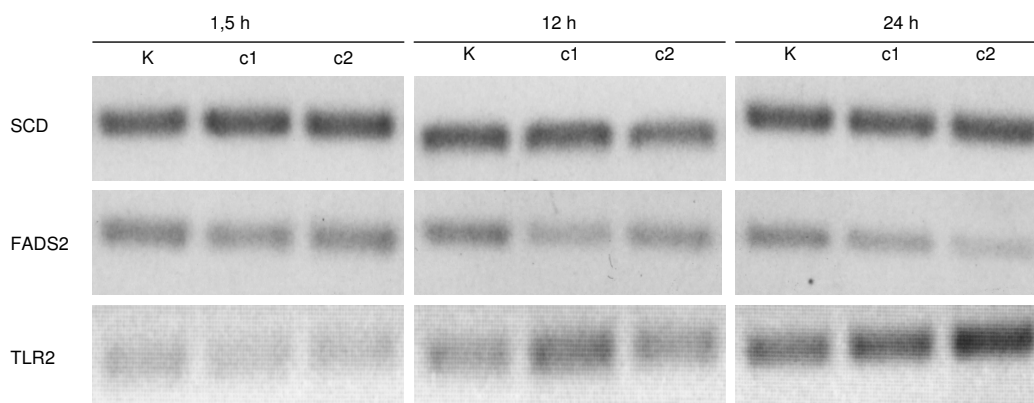


Abbildung 4.47: RT-PCR: Expression der SCD, FADS2 und des TLR2 auf mRNA-Ebene nach 1,5 h; 12 h und 24 h Behandlung mit Arachidonsäure. (K= unbehandelte Kontrolle; c1= 10^{-5} Mol/l AA; c2= 10^{-6} Mol/l AA)

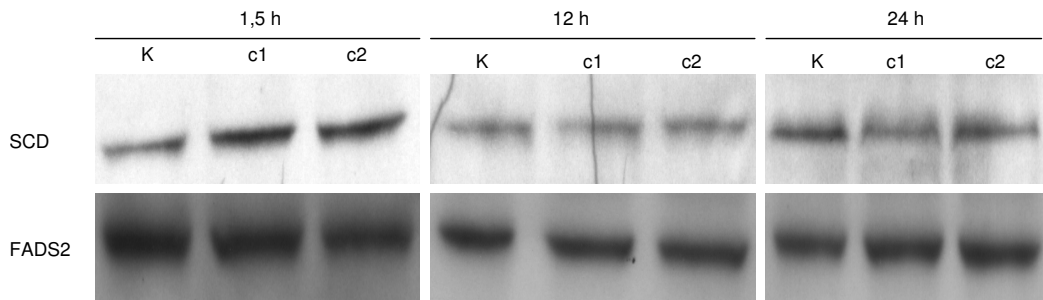


Abbildung 4.48: Western Blot: Expression der SCD und FADS2 nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit Arachidonsäure. (K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10^{-5} Mol/l AA. c2= 10^{-6} Mol/l AA)

4.4.6 MALP-2

SCD

Die SCD mRNA-Menge liegt nach 1,5 h Behandlungsdauer und bei einer MALP-2 Konzentration von 10 ng/ml unter der Kontrolle [-20%] und bei 50 ng/ml MALP-2 oberhalb der Kontrolle [+21%]. Nach 12 h ist eine Hochregulation bei beiden eingesetzten Konzentrationen zu sehen [+21% bzw. +25%]. Anschließend fallen die SCD mRNA Werte ab und liegen nach 24 h Behandlungsdauer unter dem Kontrollniveau [-24% bzw. -15%] (Abb. 4.49).

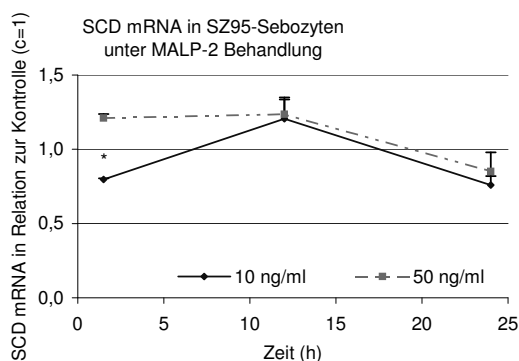


Abbildung 4.49: SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml und 50 ng/ml. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Nach 1,5 h Behandlungsdauer bei einer MALP-2 Konzentration von 10 ng/ml liegen die SCD-Menge unter der Kontrolle [-5%] und bei 50 ng/ml MALP-2 oberhalb der Kontrolle [+14%]. Nach 6 h steigen die SCD-Mengen in den Zellen an [+48% bzw. +45%] und erreichen nach 12 h Behandlungsdauer ihre Höchstwerte [+63% bzw. +31%]. Nach 24 h Behandlungsdauer fallen die Werte unter das Kontrollniveau [-19% bzw. -24%] (Abb. 4.50).

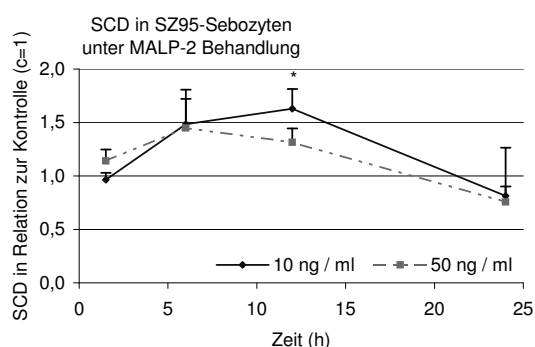


Abbildung 4.50: SCD in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml und 50 ng/ml. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

FADS2

Die FADS2 mRNA-Menge liegt nach 1,5 h Behandlung mit MALP-2 unter dem Kontrollniveau [-45% bzw. -43%]. Dann steigt die FADS2 mRNA-Menge an und erreicht nach 24 h Werte über dem Kontrollniveau [+3% bzw. +49%] (Abb. 4.51).

Auf Proteinebene ist die FADS2 Menge nach 1,5 h Behandlung bereits angestiegen [+11% bzw. +12%]. Unter der Behandlung mit 10 ng/ml MALP-2 steigen die Werte an [6 h Behandlungsdauer: +33% bzw. 12 h Behandlungsdauer: +42%] und fallen nach 24 h unter das Kontrollniveau [-3%] (Abb. 4.52).

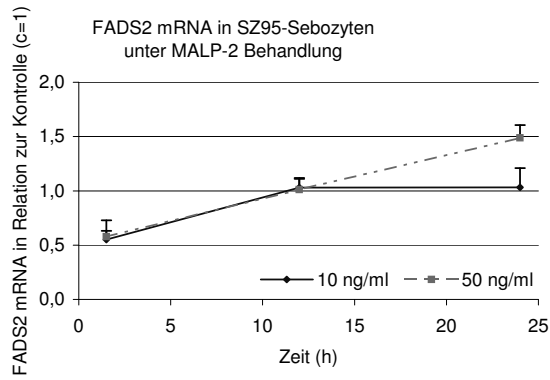


Abbildung 4.51: FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung. Gemessen wurde nach 1.5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml und 50 ng/ml. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

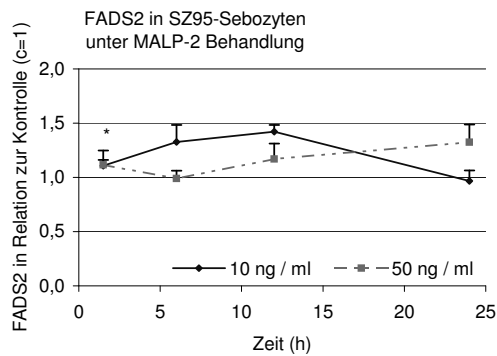


Abbildung 4.52: FADS2 in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung. Gemessen wurde nach 1.5, 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml und 50 ng/ml. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Eine Behandlung mit 50 ng/ml MALP-2 führt zunächst zu einem Abfall der FADS2 Proteinmenge auf das Kontrollniveau. Dann steigen die Werte wieder an [12 h Behandlungsdauer: +17%; 24 h Behandlungsdauer: +33%] (Abb. 4.52).

TLR2

Nach 1,5 h Behandlungsdauer lag die TLR2 mRNA-Menge immer noch auf dem Kontrollniveau. Der darauf folgende Anstieg der TLR2 mRNA-Menge ist abhängig von den MALP-2 Konzentrationen die eingesetzt wurde. Nach 12 h und 24 h Behandlung liegen die Werte über den Kontrollen [12 h Behandlungsdauer: +31% bzw. +118%; 24 h Behandlungsdauer: +24 % bzw. +128 %] (Abb. 4.53).

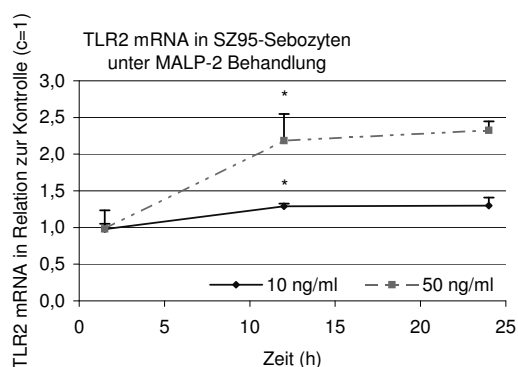


Abbildung 4.53: TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung. Gemessen wurde nach 1,5, 12 und 24 h Behandlungsdauer. Die Behandlung erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen: 10 ng/ml und 50 ng/ml. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

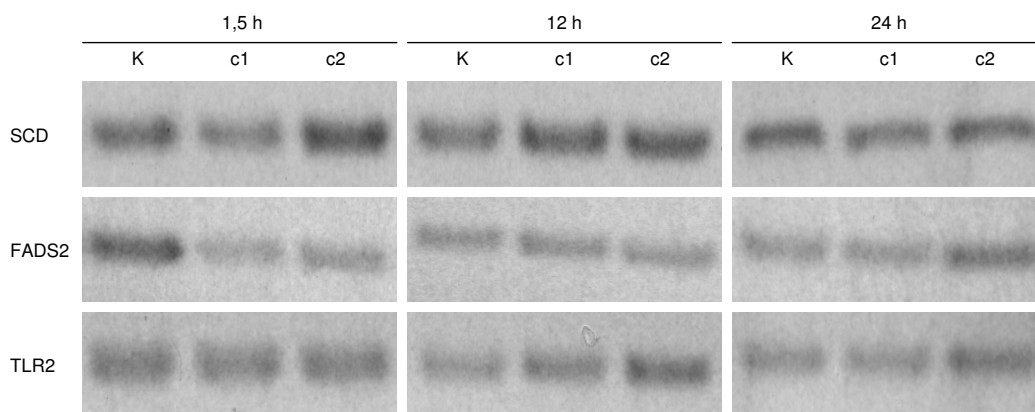


Abbildung 4.54: RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 in SZ95-Sebozyten nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit MALP-2. (K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10 ng/ml MALP-2. c2= 50 ng/ml MALP-2)

4.4.7 NVP-LCF369

NVP-LCF369

Eine Behandlung mit NVP-LCF369 in zwei Konzentrationen (1 μ M und 100 nM) führte nach 12 h zu einer erhöhten SCD mRNA [+23% bzw. +26%] und zu einer verminderten FADS2 mRNA-Menge [-72% bzw. -55%] in den Zellen (Abb. 4.55).

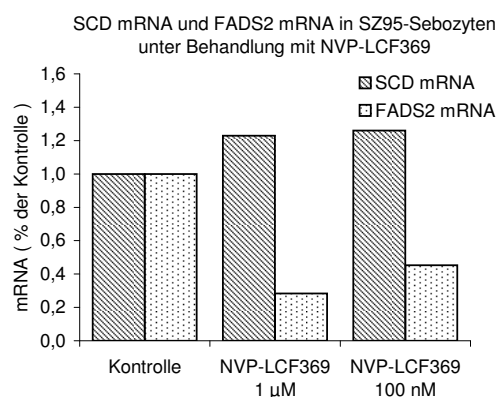


Abbildung 4.55: SCD mRNA- und FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Behandlung mit NVP-LCF369. Die Behandlungsdauer war 12 h. Die Werte repräsentieren Doppelbestimmungen.

NVP-LCF369 und MALP-2

Eine alleinige Behandlung mit 50 ng/ml MALP-2 führte zu einer Erhöhung der SCD mRNA-Menge [+39%] und einer Reduktion der FADS2 mRNA-Menge [-27%].

Wurden die Sebozyten gleichzeitig mit 50 ng/ml MALP-2 und 1 μ M NVP-LCF369 behandelt, kam es zu Reduktion sowohl der SCD mRNA, als auch der FADS2 mRNA. Ein Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen erbringt eine Reduktion der SCD mRNA um -6% und der FADS2 mRNA -24%. Ein Vergleich mit den MALP-2 behandelten Zellen erbringt eine Reduktion der SCD mRNA um -45%, während die FADS2 mRNA Menge um +2% ansteigt. Eine Behandlung der Sebozyten mit 50 ng/ml MALP-2 und 100 nM NVP-LCF369 führte zu einer Reduktion der SCD mRNA und der FADS2 mRNA.

Ein Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen erbringt eine Reduktion der SCD mRNA um -4 % und der FADS2 mRNA um -83%. Ein Vergleich mit den MALP-2 behandelten Zellen erbringt eine Reduktion der SCD mRNA-Menge um -43% und der FADS2 mRNA-Menge um -56% (Abb. 4.56).

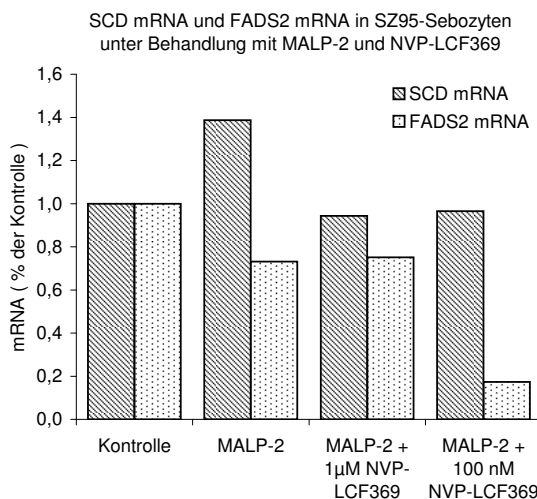


Abbildung 4.56: SCD mRNA- und FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Behandlung mit NVP-LCF369 in zwei verschiedenen Konzentrationen und MALP-2 (50 ng/ml). Gemessen wurde nach 12 h Behandlung. Die Werte repräsentieren Doppelbestimmungen.

NVP-LCF369, Linolsäure und Testosteron

Eine alleinige Behandlung mit Testosteron ($2 \cdot 10^{-8}$ Mol/l) und Linolsäure (10^{-4} Mol/l) führte zu einer Erhöhung der SCD mRNA-Menge [+66%] und einer Reduktion der FADS2 mRNA-Menge [-22%].

Wurden die Sebozyten gleichzeitig mit und 1 μ M NVP-LCF369 behandelt, kam im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einer Erhöhung der SCD mRNA [+5%] und einer Reduktion der FADS2 mRNA [-61%]. Ein Vergleich mit den Testosteron und Linolsäure behandelten Zellen erbringt eine Reduktion der SCD mRNA um -60% und FADS2 mRNA-Menge um -36%. Eine Behandlung der Sebozyten mit Testosteron, Linolsäure und 100 nM NVP-LCF369 führte zu einer Reduktion der SCD mRNA-Menge und der FADS2 mRNA-Menge. Ein Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen er-

bringt eine Reduktion der SCD mRNA um -9% und der FADS2 mRNA um -62%. Ein Vergleich mit den Testosteron und Linolsäure behandelten Zellen erbringt eine Reduktion der SCD mRNA-Menge um -75% und der FADS2 mRNA-Menge um -37% (Abb. 4.57).

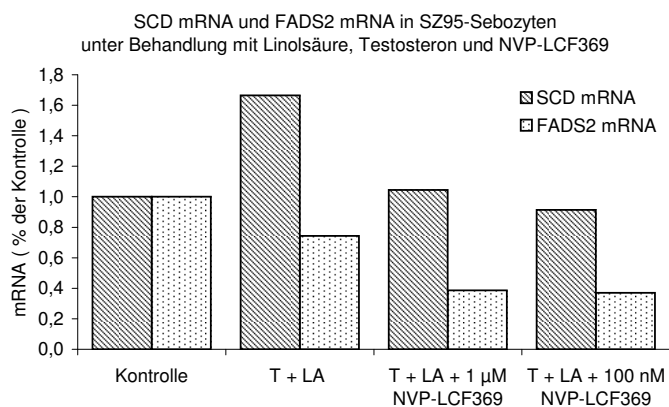


Abbildung 4.57: SCD mRNA- und FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Behandlung mit NVP-LCF369 in zwei verschiedenen Konzentrationen und Testosteron (T: $2 \cdot 10^{-8}$ Mol/l) und Linolsäure (LA: 10^{-4} Mol/l). Gemessen wurde nach 12 h Behandlung. Die Werte repräsentieren Doppelbestimmungen.

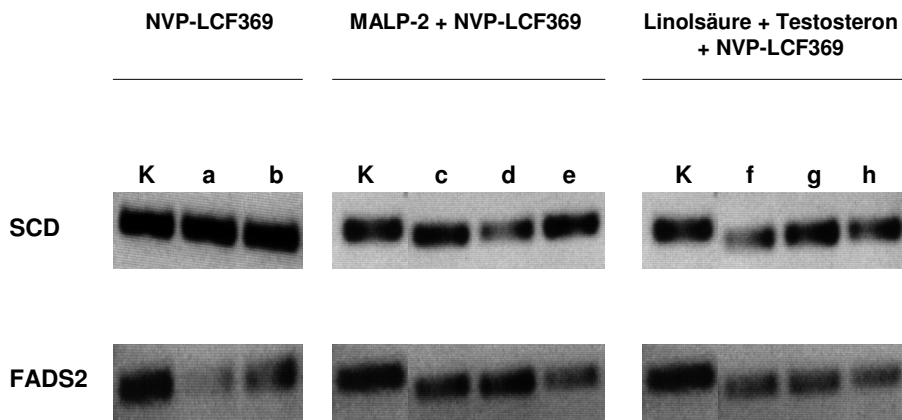


Abbildung 4.58: RT-PCR: Expression der mRNA der SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten nach 12 h Behandlung mit verschiedenen Kombinationen aus NVP-LCF368 und MALP-2 bzw. NVP-LCF369 und Linolsäure/Testosteron. K = unbehandelte Kontrolle; a= 1 μ M NVP-LCF369; b= 100 nM NVP-LCF369; c= 50 ng/ml MALP-2; d= 50 ng/ml MALP-2 und 1 μ M NVP-LCF369; e= 50 ng/ml MALP-2 und 100 nM NVP-LCF369; f= 2 \cdot 10 $^{-8}$ Mol/l Testosteron und 10 $^{-4}$ Mol/l Linolsäure; g= 2 \cdot 10 $^{-8}$ Mol/l Testosteron und 10 $^{-4}$ Mol/l Linolsäure und 1 μ M NVP-LCF369; h= 2 \cdot 10 $^{-8}$ Mol/l Testosteron und 10 $^{-4}$ Mol/l Linolsäure und 100 nM NVP-LCF369.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Die Haut - ein immunologisches Organ

Die Haut ist die erste Abwehrlinie im Kampf gegen pathogene Mikroorganismen. Sie bildet eine mechanische, chemische und eine immunologische Barriere.

Die immunologische Barriere wird durch Zellen gebildet, die ein Bestandteil der angeborenen und erworbenen Immunität sind. Die angeborene Immunität spielt eine zentrale Rolle in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, denn sie ist dafür verantwortlich, dass ein Mikroorganismus als pathogen erkannt werden kann. Es aktiviert außerdem das adaptive Immunsystem und initiiert eine entzündliche Reaktion, bevor das adaptive Immunsystem eingreift, welches erst nach einer Latenzzeit von einigen Tagen andauern kann, eingreift.

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind wichtige Rezeptoren der angeborenen Immunität. Sie sind in die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen involviert, indem sie bestimmte biochemische Muster von Bakterien, Viren oder Pilzen erkennen. Die Aktivierung der TLRs führt zu einer erhöhten Produktion von Zytokinen, Chemokinen, antimikrobiellen Peptiden und costimulatorischen Molekülen. TLRs wurden in vielen Hautzellen gefunden, so z.B. in Keratinozyten [32], Langerhanszellen [51], Sebozyten [18, 45], T- und

B-Lymphozyten [25, 70] und Mastzellen [63].

Als Folge der Aktivierung durch die TLRs werden z.B. bakterizide Fettsäuren und Proteine gebildet. Keratinozyten bilden beispielsweise Cathelicidine und Defensine [7]. Sebozyten bilden darüber hinaus die antibakteriell wirkenden MUFAs: Palmitinsäure und Ölsäure [18, 43, 33].

Des Weiteren wird in Keratinozyten, Melanozyten [60] und Sebozyten [81] das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) und deren Rezeptor (CRH-R) gebildet. Dabei gilt das peripher gebildete CRH als Bindeglied zwischen zentraler Stressachse (Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere-Achse; HPA-Achse) und dem Immunsystem. Dem peripher gebildeten CRH werden proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben [27]. Auch im Sebozyten bewirkt CRH eine erhöhte Synthese von Neutralfetten [18]. Da die Neutralfette vor allem aus Triglyceriden bestehen und diese wiederum hauptsächlich aus antibakteriell wirkenden MUFAs, kann angenommen werden, dass CRH im Sebozyten ebenfalls proinflammatorisch wirkt.

In der HPA-Achse steht am Ende der Signalkaskade die Produktion von Glucokortikoiden in der Nebennierenrinde, deren ubiquitäre Wirkung darin bestehen kann, Entzündungsreaktionen zu begrenzen.

5.2 Bedeutung von Fettsäuren in der Haut

Fettsäuren besitzen aufgrund ihrer komplexen Beteiligung an der Ausbildung von Struktur- und Funktionsmerkmalen eine zentrale Bedeutung unter den epidermalen Lipiden [55].

Fettsäuren sind Bestandteil von Zellmembranen. Die Länge der Fettsäuren und die Anzahl der in ihnen enthaltenen Doppelbindungen, sowie der Anteil an Cholesterin sind entscheidend für die Fluidität von Membranen. Fettsäuren sind ein wichtiger Bestandteil von polaren Lipiden (Cholesterin, Ceramiden) und sind damit ein wichtiger Bestandteil des Lipidfilms auf der Haut. Sie füllen die Interzellularspalten in der obersten Hautschicht (*Stratum corneum*) aus [15, 23] und verhindern somit ein Eindringen von pathogenen Mikroorganismen und Flüssigkeiten, sowie den transepidermalen Verlust an Wasser.

Wie wichtig diese Barriere ist, zeigt sich bei großen Hautverbrennungen und bei Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht. Fettsäuren kommen damit wichtige strukturbestimmende Merkmale, sowie Schutzfunktionen zu. Daneben fungieren die Fettsäuren als endogener Mediator für die Differenzierung und Proliferation von Zellen über die Aktivierung verschiedener Kernfaktoren (PPARs, C/EBPs). Sie sind außerdem das Vorläufermolekül der Eicosanoide und greifen damit in immunologische und entzündliche Prozesse ein.

Die Haut ist ein Organ, das einen hoch aktiven Metabolismus von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) zeigt [78]. Ein Mangel an essentiellen Fettsäuren, wie der Linolsäure führt zu einer abnormen Hautfunktion [50], die durch einen erhöhten transdermalen Wasserverlust, Bildung von schuppiger Haut und Alopezie gekennzeichnet ist [71, 14]. Ein veränderter Fettsäuremetabolismus in der Haut ist assoziiert mit Erkrankungen, wie z.B. der Akne oder der atopischen Dermatitis.

5.3 Der Effekt von den ω -6-Fettsäuren: Linolsäure und Arachidonsäure auf den Fettsäuremetabolismus in den SZ95-Sebozyten

Die Synthese des Sebums und die damit verbundene Lipogenese im Sebozyten, repräsentieren einen Hauptentwicklungsschritt in der Differenzierung von Talgdrüsenzellen. Talg besteht hauptsächlich aus Triglyceriden, freien Fettsäuren, Wachsen, Squalenen und Cholesterinen.

In zuvor durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass die Behandlung der Sebozyten mit Linolsäure und Arachidonsäure zu einer Akkumulation von Lipiden führt, durch eine Erhöhung der Anzahl und Größe der Lipidtropfen im Sebozyten [9, 69].

Bis jetzt war unklar, auf welchem Weg Linolsäure und Arachidonsäure als mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) die Lipogenese fördern kann.

PUFAs sind natürliche Liganden für Kernrezeptoren. In der Regulation der Fettsäuresynthese und deren Enzyme sind aber vor allem die SREBPs und

PPARs von Bedeutung.

Die in dieser Arbeit betrachteten Enzyme sind die Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) und die Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2). Die SCD fügt eine Doppelbindung in gesättigte Fettsäuren ein und ist damit für die Synthese von einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFAs) verantwortlich. Die FADS2 dagegen fügt in einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine weitere Doppelbindung ein und führt damit zu einer erhöhten Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Sowohl die SCD, als auch die FADS2 konnten auf mRNA und Proteinebene untersucht werden.

5.3.1 Effekt von Linolsäure auf die SCD und FADS2 auf SZ95-Sebozyten

Bisher wurde beschrieben, dass PUFAs in HepG2-Zellen und in 3T3-L1 Adipozyten die Promotoraktivität der Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) und Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2) senken, indem sie die Reifung der SREBPs und die damit verbundene Translokation der SREBPs in den Zellkern verhindern [68]. Daraus resultierte eine verminderte Transkription des SCD- und FADS2-Gens und hatte erniedrigte Konzentrationen von MUFAs und PUFAs zur Folge.

In dieser Arbeit wird aber gezeigt, dass es unter der Behandlung mit Linolsäure zu einer erhöhten Transkription des SCD und FADS2-Gens kommt, was durch eine kurzzeitige Erhöhung der SCD und FADS2 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Nach dieser kurzzeitigen Erhöhung kam es spätestens nach weiteren 6 h zu einem Abfall auf das Kontrollniveau oder darunter.

Chen *et al.* und Alestas *et al.* haben gezeigt, dass in Talgdrüsenzellen alle Subtypen der PPARs auf mRNA- und Proteinebene vorliegen [9, 1].

Eine Aktivierung von PPAR γ führt zu einer Differenzierung von Adipozyten und zu einer erhöhten Fettsäurespeicherung. Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor C/EBP fähig, das SCD- und FADS2-Gen zu aktivieren [11].

Es wird daher angenommen, dass Linolsäure die Reifung der SREBPs verhindert, sodass es zu keiner Aktivierung der Gene durch die SREBPs kommt. Stattdessen gibt es drei mögliche Wege, wie Linolsäure zu einer erhöhten Transkription des SCD- und FADS2-Genes führen kann:

- Zum einen ist es möglich, dass Linolsäure als PPAR γ -Ligand zu einer Aktivierung des SCD- und FADS2-Promotors und damit zu einer erhöhten Transkription der beiden Gene führt. Das ist komplementär zu den Daten von Rosenfield *et al.*, der zeigte, dass eine Behandlung mit PPAR γ -Liganden zu einer Lipidakkumulation in Vorhäuten von Mäusen führt [53]. So konnten auch Trivedi *et al.* zeigen, dass die systemische Gabe des PPAR γ -Liganden Troglitazon zu einer erhöhten Lipogenese führt. Auch wenn eine Behandlung mit dem synthetischen PPAR γ -Agonisten Ciglitazon zu keiner Lipidakkumulation in SZ95-Sebozyten führte [9], konnte eine erhöhte Lipogenese bei Patienten mit Diabetes, die den PPAR γ -Liganden Troglitazon systemisch erhielten, nachgewiesen werden.

- Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass in den Sebozyten Linolsäure als Ligand für das C/EBP funktionieren kann und es hierüber zu einer Aktivierung der beiden Gene kommt. Die Lipidsynthese und Lipidakkumulation sind wichtige Schritte in der Differenzierung des Sebozyten. Es ist bekannt, dass C/EBP als Transkriptionsfaktor Gene reguliert, die das Differenzierungsstadium markieren [37]. Es ist daher anzunehmen, dass Linolsäure eine Steigerung der Lipidsynthese dadurch bewirkt, indem es den Transkriptionsfaktor C/EBP aktiviert.

Alesta *et al.* konnte zeigen, dass alle PPAR-Subtypen in SZ95-Sebozyten und in Zellen des *Ductus seboglandularis* nachweisbar sind, vergleicht man aber die quantitative Verteilung von PPAR γ und C/EBP α bzw. C/EBP β miteinander, so zeigt sich, dass C/EBPs eine höhere Expression in SZ95-Sebozyten aufweisen [9]. Auch dies könnte für eine Regulation der SCD und FADS2 vorrangig über das C/EBP sprechen.

- Es ist weiterhin eine Aktivierung des SCD- und FADS2- Gens über

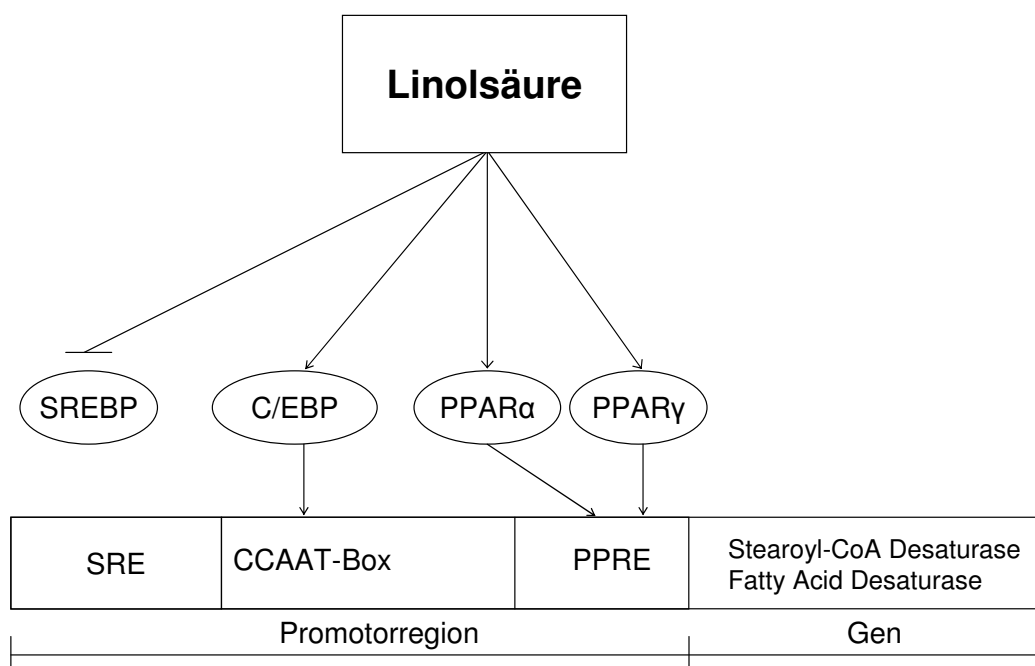


Abbildung 5.1: Mögliche Effekte von Linolsäure auf die Transkription des SCD- und FADS2-Gens.

PPAR α möglich, da PPAR α nicht nur eine Aktivierung von Genen der β -Oxidation bewirkt, sondern auch die Peroxisomen-Proliferation fördert. Da Peroxisomen Zellorganellen sind und von einer biologischen Membran begrenzt sind, wird bei einer Proliferation der Peroxisomen auch eine größere biologische Membran benötigt [36]. Biologische Membranen bestehen aus polaren Lipiden, also auch aus ungesättigten Fettsäuren, die für eine Peroxisomen-Proliferation in größerer Menge zur Verfügung stehen müssen, sodass die hierfür nötigen Enzyme aktiviert werden müssen: die SCD und FADS2.

Alle diese Möglichkeiten von Linolsäure über unterschiedliche Kernrezeptoren Einfluss auf die Transkription von Genen zu nehmen, zeigt ihre Bedeutung als essentielle Fettsäure. Des Weiteren dient sie als Vorläufermolekül für Arachidonsäure, die wiederum ebenfalls in die Lipidsynthese eingreift. Linolsäure ist in der Lage über unterschiedliche Wege die Lipidsynthese zu steuern und ihr kommt damit eine wichtige Funktion als pleiotropes Molekül

zu.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob beide hier betrachteten Fettsäureenzyme durch NVP-LCF369 gehemmt werden konnten.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zeigte sich unter der Behandlung mit NVP-LCF369 nach 12 h eine geringe Steigerung der SCD mRNA. Wurde hingegen die SCD mRNA-Synthese durch eine Linolsäurebehandlung stimuliert und gleichzeitig mit NVP-LCF369 behandelt, sanken die SCD mRNA-Konzentrationen in den Zellen deutlich ab und lagen unter den Werten der unbehandelten Kontrollen.

Unter der alleinigen Behandlung der SZ95-Sebozyten mit NVP-LCF369 zeigte sich eine deutliche Reduktion der FADS2 mRNA-Menge, die weit unter dem Kontrollniveau lag (-72%). Eine Behandlung mit Testosteron und Linolsäure führte ebenfalls zu einer Reduktion der FADS2 mRNA-Menge weit unter dem Kontrollniveau (-22%). Wurden zum Testosteron und der Linolsäure zusätzlich das NVP-LCF369 gegeben, sanken der mRNA Level der FADS2 noch weiter ab (-37%).

Es zeigte sich, dass NVP-LCF369 ein potenter Inhibitor der SCD mRNA-Transkription ist, wenn sie zuvor durch Linolsäure/Testosteron stimuliert wurde (-60%). NVP-LCF369 inhibiert ebenfalls die FADS2 mRNA-Transkription, unabhängig davon, ob sie bereits vorher schon durch Linolsäure/Testosteron gehemmt wurde (-62%).

Inwieweit eine systemische oder topische Anwendung von NVP-LCF369 für die Therapie von Erkrankungen, die mit Seborrhoe assoziiert sind (z.B. Akne), verwendet werden kann, bleibt abzuwarten.

5.3.2 Der Effekt von Arachidonsäure auf die SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der SZ95-Sebozyten mit Arachidonsäure zu einer erhöhten Transkription und Translation des SCD-Gens führt. Hierbei kam es zu einer Steigerung der SCD mRNA bzw. des SCD Proteins von bis zu 77 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-

len. Anschließend fielen die Werte ab und lagen zum Teil unter den Kontrollen. Der Abfall der SCD mRNA-Menge kann durch die herabgesetzte Halbwertszeit der SCD mRNA von 25 h auf 8,5 h im Rahmen der Arachidonsäurebehandlung erklärt werden. Es ist anzunehmen, dass Arachidonsäure im Sebozyten zum Einen die Transkription des SCD-Gens steigert, und zum Anderen die Stabilität der SCD mRNA mindert. Das führt nur zu einer kurzzeitigen Steigerung der Transkription und Translation des SCD-Gens, gefolgt von einem rasch einsetzenden Abfall auf das Normalniveau. Diese Dynamik der SCD mRNA und des SCD Proteins ließ sich bereits unter der Linolsäurebehandlung erkennen. Es ist deshalb anzunehmen, dass die SCD, sowohl auf RNA-Ebene, als auch auf Proteinebene, zwar reguliert wird, aber dass diese Regulation in sehr engen Grenzen erfolgt. Denn auch eine kurzzeitige Erhöhung der Transkription und Translation des SCD-Gens führt zu einer erhöhten Lipidsynthese, was durch eine Lipidakkumulation in den Sebozyten in vorherigen Experimenten gezeigt wurde.

Da eine veränderte Expression der SCD mit Erkrankungen, wie Adipositas, Diabetes, Krebs und Alterung assoziiert ist, scheint es deshalb sinnvoll, dass die Regulation der SCD auf mRNA- und Proteinebene in sehr engen Grenzen geschehen muss.

Es ist weiterhin anzunehmen, dass Arachidonsäure, wie auch die Linolsäure, die Aktivierung des SCD-Gens ebenfalls über die Transkriptionsfaktoren C/EBP, PPAR α und PPAR γ vornimmt.

Aber im Gegensatz zur Linolsäure kommt es unter der Arachidonsäurebehandlung zu keiner vermehrten Transkription und Translation des FADS2-Gens. Die FADS2 Konzentrationen waren zu jedem Zeitpunkt unterhalb der unbehandelten Kontrollen.

Das bedeutet, dass es unter der Linolsäurebehandlung zu einer Steigerung von Neutralfetten und polaren Lipiden kommen muss, während es unter einer Arachidonsäurebehandlung lediglich zu einer Steigerung der Neutralfette kommt, und die polaren Lipide möglicherweise sogar abnehmen. Diese

Annahmen sind komplementär zu den Ergebnissen von Alestas *et al.*, und Wróbel *et al.*, die gezeigt haben, dass Arachidonsäure die Neutralfette in den Sebozyten erhöht [1, 69].

5.4 Der Effekt von MALP-2, PMA und CRH auf den Entzündungsstatus der SZ95-Sebozyten

Die SZ95-Sebozyten sind Zellen der angeborenen Immunität. Sie exprimieren Toll-like Rezeptoren (TLRs) an ihrer Oberfläche, synthetisieren Interleukine und produzieren Fettsäuren, wie z.B. MUFAs, die eine antimikrobielle Wirkung besitzen. Wenn diese Fettsäuren fehlen, kommt es zu einer vermehrten Besiedlung der Haut mit Bakterien und einer verlängerten Wundheilungsdauer. Um MUFAs bilden zu können, benötigen die Sebozyten die Stearoyl-CoA Desaturase und die Fatty Acid Desaturase 2. Diese Enzyme werden über viele Wege reguliert. Ein Weg ist die Aktivierung über die TLRs. Ein homozygoter Mangel an TLR2 führte in Ratten zu einem Mangel an MUFAs, einer verzögerten Wundheilung und einer vermehrten Besiedlung mit grampositiven Bakterien [18].

CRH ist ein Neuropeptid, das als Stresshormon vor allem im zentralen Nervensystem gebildet wird. Dort ist es Bestandteil einer zentralen Stressachse (Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde) an deren Ende die Produktion von Glucokortikoiden steht. Zouboulis *et al.* konnte aber zeigen, dass auch periphere Zellen, wie die SZ95-Sebozyten, in der Lage sind, CRH selbst zu synthetisieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SZ95-Sebozyten auf ihrer Oberfläche CRH-Rezeptoren exprimieren. Sie sind damit in der Lage, sowohl auf zentral, als auch auf topisch gebildetes CRH zu reagieren [81]. Krause *et al.* konnte zeigen, dass CRH die IL-6- und IL-8-Freisetzung der SZ95-Sebozyten erhöht und eine Erhöhung der Neutralfette bewirkt [31]. Die Behandlung mit CRH führte in dieser Arbeit zu einer stark erhöhten CRH-Produktion, sowie zu Aktivierung des TLR2-, SCD- und FADS2-Gens.

Die hier gezeigten Daten zeigen, dass CRH direkt auf den Lipidstoffwechsel wirkt, indem es auf molekularer Ebene die Synthese von lipogenen Enzymen beeinflusst. Da diese Enzyme die Bildung von MUFAs und PUFAs katalysieren, welche wiederum im Entzündungsgeschehen involviert sind, konnte auch gezeigt werden, dass CRH den Entzündungsstatus von Sebozyten beeinflusst.

Diese Daten stützen das Modell einer peripheren Stressachse. Zentral gebildetes CRH könnte demnach nicht nur im zentralen Nervensystem wirken, sondern auch auf periphere Gewebe, wie z.B. die Haut. Durch dieses Modell ist man in der Lage, andere, bisher unverstandene Pathomechanismen von Hauterkrankungen zu beleuchten. So war bisher z.B. der genaue Zusammenhang von Stress (z.B. emotionaler Stress) und der Pathogenese der Akne unklar. Diese Arbeit zeigt einen möglichen Mechanismus, bei dem CRH, als neuroendokriner Mediator, den Fettsäuremetabolismus beeinflusst und damit einen möglichen Pathomechanismus der Akne erklärt.

MALP-2 ein spezifischer Ligand für den TLR2 führte zu einer erhöhten Transkription des TLR2-Gens und zu einer erhöhten Transkription und Translation des SCD- und FADS2-Gens. Weiterhin kam es unter der Behandlung der SZ95-Sebozyten mit MALP-2 zu einer Erhöhung der IL-6-Produktion und eine um das 4-fache gesteigerte IL-8-Produktion. MALP-2 bewirkt ebenfalls eine erhöhte CRH-Produktion der SZ95-Sebozyten. Ein Vergleich mit den Effekten der CRH-Behandlung zeigt, dass die durch die MALP-2-Behandlung ausgelöste CRH-Produktion, die Entzündungsantwort auf bakterielle Antigene verstärkt. Auch hier zeigt sich, dass CRH als topischer autokriner Mediator wirken kann und direkt auf die Entzündungskaskade wirkt.

Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA) ist ein Aktivator des NF- κ B und aktiviert damit Gene, die in ihrer Promotorregion ein PMA responsive element (PRE) enthalten. Das sind Gene, deren Produkte im Entzündungsgeschehen einer Zelle involviert sind, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α . Eine Behandlung mit PMA führte abhängig von der eingesetzten Konzen-

tration zu einer erhöhten IL-6- und einer vielfach erhöhten IL-8-Produktion, wohingegen der intrazelluläre CRH-Gehalt nicht verändert wird.

PMA führte ebenfalls zu einer erhöhten Transkription des TLR2-Gens und einer erhöhten Transkription und Translation des SCD- und FADS2-Gens.

Dabei hat PMA ähnliche Effekte, wie MALP-2, wobei MALP-2 als direkter TLR2 Agonist wirkt, während PMA den in der TLR2-Signalkaskade abwärts liegenden Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Es ist bekannt, dass das SCD-Gen in seiner Promotorregion eine NF- κ B Bindungsstelle enthält. PMA und MALP-2 haben auf die Transkription des SCD-Gens den gleichen Effekt, wie auf die Transkription des FADS2-Gens. Es kann daher angenommen werden, dass in der Promotorregion des FADS2 ebenso eine NF- κ B Bindungsstelle vorhanden ist.

Unklar ist dennoch, weshalb PMA und MALP-2 nicht den gleichen Effekt auf die intrazelluläre CRH-Produktion besitzen. Beide benutzen den TLR2 und/oder die TLR2 Signalkaskade und damit das NF- κ B, und trotzdem hat PMA keinen erkennbaren Effekt auf die CRH-Produktion, wohingegen eine Behandlung der Sebozyten mit MALP-2 einen leichten Anstieg des CRH verursacht.

Das steht im Gegensatz zu der Annahme, dass in der Promotorregion des CRH-Gens ein Phorbolster responsive element (PRE) vorhanden ist, sodass es bei der Behandlung mit PMA zu einer vermehrten Transkription des CRH-Gens kommen müsste.

Die Behandlung der Sebozyten mit PMA, MALP-2 und CRH hatte den gleichen proinflammatorische Effekt, was durch die erhöhte Transkription von Genen, die in die Inflammation involviert sind, gezeigt wurde.

Die SZ95-Sebozyten wurden in einem weiteren Experiment 12 h mit MALP-2 und NVP-LCF369 behandelt. Hier konnte gesehen werden, dass die durch MALP-2 verursachte verstärkte SCD Transkription durch die gleichzeitige Gabe von NVP-LCF369 deutlich reduziert wurde, sodass die SCD mRNA-Level teilweise unter den Werten der unbehandelten Kontrollen lag (-45%). Der FADS2 mRNA-Level lag bei der alleinigen Behandlung mit MALP-2 bereits unter dem Level der unbehandelten Kontrolle. Eine zusätz-

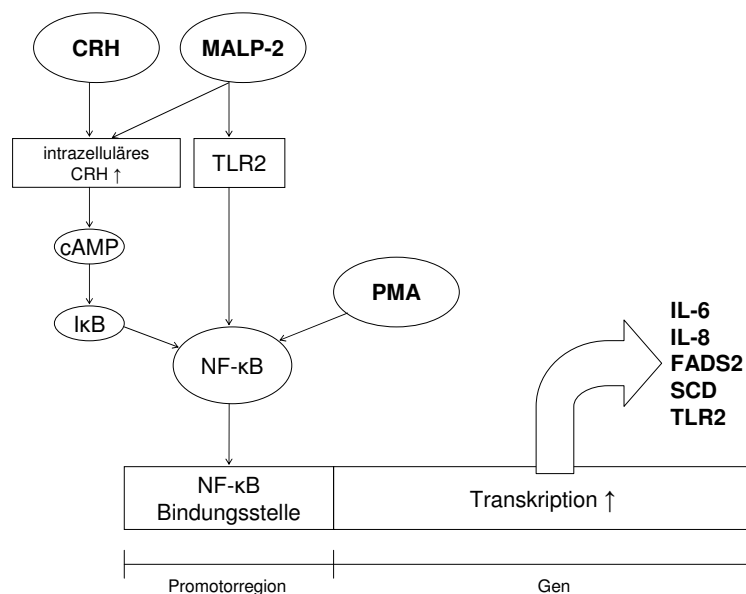


Abbildung 5.2: Effekte von MALP-2, CRH und PMA und ihre mögliche Signalkaskade. MALP-2, PMA und CRH haben dieselben Effekte auf Gene, die NF- κ B Bindungsstellen enthalten, aber unterschiedliche Effekte auf die intrazelluläre CRH-Produktion.

liche Behandlung mit NVP-LCF369 führte zu einer Reduktion der FADS2 mRNA-Menge um weitere 56%.

Es kann deshalb angenommen werden, dass der proinflammatorische Effekt von MALP-2 durch NVP-LCF369 inhibiert werden kann. Das ist komplementär zu den ELISA-Daten, die gezeigt haben, dass die durch MALP-2 verstärkte IL-8-Produktion durch die gleichzeitige Behandlung mit NVP-LCF369 um bis zu 58 % reduziert wurde.

5.5 Der Effekt von Linolsäure und Arachidonsäure auf den Entzündungsstatus der SZ95-Sebozyten

Linolsäure ist, wie die Arachidonsäure, eine ω -6-Fettsäure und ist in dieser Eigenschaft ein bekanntes proinflammatorisches Molekül. Linolsäure kann mit Hilfe der FADS2 zu Arachidonsäure metabolisiert werden. Die Arachidonsäure wird in biologische Membranen eingebaut. Dort wird sie gespeichert und bei Bedarf mithilfe der Phospholipase A₂ wieder aus der Membran herausgelöst, um als Vorläufermolekül für Prostaglandine und Leukotriene zu dienen. Um Arachidonsäure in seine Metabolite umzuwandeln, bedarf es der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) und der Lipooxygenase (LOX). Beide Enzymklassen werden in SZ95-Sebozyten gebildet. Die der Arachidonsäure entstammenden Metabolite sind die Prostaglandine der 2-Serie (z.B. PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGJ₂) und die Leukotriene der 4-Serie (z.B. LTB₄). Sie wirken beide proinflammatorisch [49].

Alesta *et al.* hat gezeigt, dass eine Behandlung mit Arachidonsäure zu einer vermehrten LTB₄-Menge und einer IL-6- und IL-8-Erhöhung in den SZ95-Sebozyten führt. Es ist bekannt, dass LTB₄ zu einer erhöhten IL-8-Menge in Makrophagen führt [49]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Arachidonsäure, als Vorläufermolekül von LTB₄, eine Erhöhung der IL-6- und IL-8-Menge bewirkt.

Eine Behandlung der SZ95-Sebozyten mit Arachidonsäure zeigte in dieser Arbeit eine Erhöhung der SCD. Es ist nicht eindeutig, ob dieser Effekt direkt durch Arachidonsäure oder durch einen seiner Metabolite entsteht, denn Zouboulis *et al.* hat ebenfalls gezeigt, dass Zileuton, ein 5-Lipooxygenaseinhibitor, die Sebumproduktion reduzieren kann [80].

Wird die COX durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) gehemmt, kommt es zu einer Verringerung der PGF_{2 α} - und PGE₂-Produktion, aber zu einer erhöhten PGJ₂ und Triacylglycerin-Produktion [1]. Dabei gilt PGJ₂ als PPAR γ -Ligand, der die Lipidakkumulation fördert [53]. Es scheint daher, dass eine bestehende Entzündung in der Haut, die mit NSAID behan-

delt wird, durch die NSAID vermindert wird, aber dass es zu einer PPAR γ -vermittelten verstärkten Lipidsynthese kommt [79].

Eine Applikation von Linolsäure auf Hautwunden führte bei Ratten zu einer beschleunigten Wundheilung, die von Pereira *et al.* auf die proinflammatorischen Eigenschaften der Linolsäure zurückgeführt wurden [48].

Wenn vermehrt ω -3-Fettsäuren konsumiert werden, werden diese stattdessen in biologische Membranen eingebaut, wo sie ebenfalls gespeichert werden. Die Metabolite der ω -3-Fettsäuren sind die Prostaglandine der 3-Serie (z.B. PGE₃) und die Leukotriene der 5-Serie (LTB₅). Im Gegensatz zu den Metaboliten der Arachidonsäure wirken die Metabolite von ω -3-Fettsäuren antiinflammatorisch.

Im Sebozyten führte eine Behandlung mit Linolsäure zu einer erhöhten IL-6-Produktion und einer verminderten IL-8-Produktion. Die SCD, die FADS2 und der TLR2 wurden unter Linolsäure ebenfalls hoch reguliert.

Da die SCD vermehrt exprimiert wird, kommt es unter Linolsäurebehandlung zu einer erhöhten Produktion von MUFAs, die eine bakterizide Wirkung besitzen [18]. Zum anderen kommt es zu einer vermehrten Expression der FADS2, wodurch möglicherweise die eigene Metabolisierung von Linolsäure zu Arachidonsäure ermöglicht wird. Die Arachidonsäure und ihre Metabolite sind ebenfalls proinflammatorisch. Zusätzlich kam unter Linolsäurebehandlung zu einer erhöhten TLR2 mRNA-Produktion. Es ist anzunehmen, dass auch eine größere Menge an TLR2-Proteinen gebildet wurde. Die TLR2 können grampositive Bakterien erkennen und über eine Aktivierung des NF- κ B-Gene aktivieren, deren Produkte proinflammatorische Eigenschaften besitzen, z.B. das IL-6-Gen.

Im SZ95-Sebozyten führte eine Behandlung mit Arachidonsäure zu einer erhöhten IL-6- und IL-8-Produktion. Die SCD und der TLR2 wurden hoch reguliert, während die FADS2-Menge reduziert wurde.

Wie auch schon unter der Linolsäurebehandlung gezeigt, führte die vermehrte Expression der SCD zu einer erhöhten Synthese von MUFAs. Im Gegensatz

zur Linolsäure wird die FADS2-Menge im Sebozyten nicht erhöht, sondern reduziert. Möglicherweise deshalb, weil die Arachidonsäure ein Endprodukt im Fettsäuremetabolismus ist und die FADS2 nicht mehr benötigt wird. Es kommt möglicherweise zu einem Negativ-Feedback-Mechanismus, bei dem das für die Arachidonsäuresynthese benötigte Fettsäureenzym, die FADS2, runterreguliert wird, wenn die Arachidonsäure in ausreichender Menge vorhanden ist. Weiterhin kommt es unter der Behandlung mit Arachidonsäure zu einer erhöhten TLR2 mRNA-Produktion. Wie bei der Linolsäurebehandlung konnten dadurch vermehrt Gene exprimiert werden, die proinflammatorische Eigenschaften besitzen, z.B. IL-6 und IL-8.

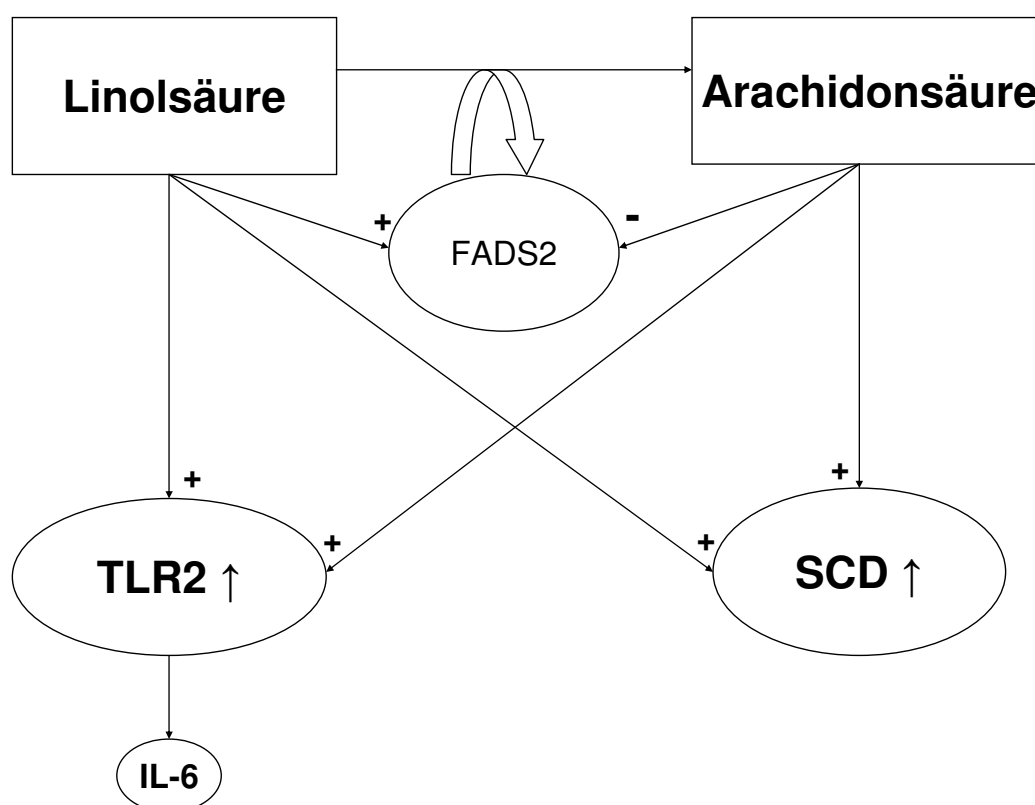


Abbildung 5.3: Effekt der ω -6 Fettsäuren: Linolsäure und Arachidonsäure auf die Fettsäureenzyme SCD und FADS2, sowie auf den TLR2

5.6 Der Effekt von Dexamethason auf die SZ95-Sebozyten

Dexamethason ist ein künstliches, langwirksames Glucokortikoid, welches stark entzündungshemmend wirkt. Dexamethason kann sowohl systemisch, als auch lokal appliziert werden. Bekannte Langzeiteffekte von systemisch applizierten Glucokortikoiden sind Hautatrophie und Wundheilungsstörungen.

Dexamethason bindet an einen zytosolischen Glucokortikoidrezeptor (GR) und kann dann als Ligand-Rezeptorkomplex an das Glucocorticoid-responsive element (GRE) binden, die sich in der Promotorregion von Genen befinden. So besitzt z.B. das Gen, das für das $I\kappa B$ codiert, in seiner Promotorregion ein GRE. Es kommt dadurch zu einer verstärkten Transkription und Translation des inhibitorisch wirkenden $I\kappa B$ und verhindert somit die Aktivität von $NF-\kappa B$ [13].

Bisher konnte unter der Behandlung mit Dexamethason in SZ95-Sebozyten kein Effekt auf die mRNA und Protein Expression der PPARs und C/EBPs gesehen werden. Ebenso führte eine 48 h-Dexamethasonbehandlung zu keiner Proliferation und erhöhten Lipidsynthese in den SZ95-Sebozyten [9]. Stattdessen ist beschrieben worden, dass unter Dexamethasonbehandlung nach 7 Tagen auch eine Reduktion der Lipidsynthese in den SZ95-Sebozyten gesehen wurde [9].

Unter der Behandlung mit Dexamethason kam es zu einer sehr starken Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 auf bis zu - 99 %. Auf die CRH-Produktion hat Dexamethason nach 24 h-Behandlungsdauer keine Wirkung gezeigt. Die SCD-Transkription und -Translation wurde unter Dexamethason kurzzeitig gesteigert, lag aber bereits nach 24 h-Behandlungsdauer auf dem Kontrollniveau. Ebenso zeigte sich ein kurzzeitiger Anstieg von FADS2. Nach nur 12 h-Behandlungsdauer lagen die FADS2 mRNA und Protein-Level wieder auf dem Kontrollniveau. Die TLR2 mRNA-Expression dagegen wurden lang anhaltend hoch reguliert.

Dass die SCD, die FADS2 und der TLR2 vermehrt gebildet werden, spricht

eher dafür, dass der Entzündungsstatus in den SZ95-Sebozyten unter Dexamethason für kurze Zeit angehoben wird.

Möglicherweise werden die SCD und FADS2 nur dann durch Dexamethason inhibiert, wenn die Gene vorher über den NF- κ B-Signalweg (und damit z.B. über MALP-2 und PMA) hoch reguliert wurden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Organismus eine kompensatorische Gegenregulation versucht, bevor sie nach längerer Behandlungsdauer nachlässt. Diese Annahme passt zu den Ergebnissen, dass die Lipidsynthese in den SZ95-Sebozyten erst nach 7 Tagen Dexamethasonbehandlung reduziert wurde [9].

Kapitel 6

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es Substanzen gibt, die die Sebum-Produktion regulieren und die Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in den SZ95-Sebozyten nehmen. Dazu wurde die Expression der Fettsäuresyntheseenzyme: SCD und FADS2, sowie des in der Entzündungskaskade involvierten TLR2 durch RT-PCR und Western Blot untersucht.

Um die Effekte auf die Entzündungskaskade weiter zu verifizieren, wurde die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6 und IL-8), sowie des neuroendokrinen Stresshormons CRH mittels ELISA untersucht.

Eine Behandlung der SZ95-Sebozyten mit den ω -6-Fettsäuren Linolsäure und Arachidonsäure führte zu einer erhöhten IL-6-Freisetzung und einer vermehrten Transkription und Translation des SCD-Gens. Linolsäure ist zusätzlich in der Lage die FADS2-Expression in den SZ95-Sebozyten zu erhöhen, wodurch es seine eigene Metabolisierung in Arachidonsäure begünstigt und damit die Ausgangssubstanz für Prostaglandine und Leukotriene liefert. Die Behandlung mit Arachidonsäure führte hingegen über einen Negativ-Feedback-Mechanismus zu einer Reduktion der FADS2-Expression. Es scheint, dass Arachidonsäure als Endprodukt im Fettsäuremetabolismus ihr eigenes Syntheseenzym hemmt, wenn sie in ausreichender Menge vorhanden ist.

Diese Daten zeigen, dass die hier untersuchten ω -6-Fettsäuren Einfluss auf ihren eigenen Stoffwechsel nehmen. Zusätzlich sind sie in der Lage indirekt über ihre Metabolite (Prostaglandine und Leukotriene), sowie direkt über

die Produktion proinflammatorischer Zytokine und der verstärkten TLR2-Expression das Entzündungsgeschehen in SZ95-Sebozyten zu beeinflussen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit ω -6-Fettsäuren die Entzündungssignalwege in den SZ95-Sebozyten stimuliert.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass NVP-LCF368, ein SCD-Expressionshemmer, eine vorher durch MALP-2 oder Testosteron/Linolsäure stimulierte SCD- und FADS2-Transkription deutlich reduzieren kann. Inwieweit eine systemische oder topische Anwendung von NVP-LCF369 für die Therapie von Erkrankungen, die mit Seborrhoe assoziiert sind (z.B. Akne), verwendet werden kann, sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden. Dexamethason, ein Glucokortikoid, wurde als Kontrolle eingesetzt, zeigte aber nicht die erwarteten, antiinflammatorischen Effekte. Es reduzierte zwar deutlich die IL-6 und IL-8 Produktion der SZ95-Sebozyten, hatte aber nicht den erwarteten hemmenden Effekt auf die Expression des SCD-, FADS2- und des TLR2-Gens. Die klinisch gesehenen Symptome einer Langzeittherapie mit Steroiden (Atrophie der Haut, verzögerte Wundheilung) sind möglicherweise durch einen Mangel an antibakteriellen MUFAs verursacht. Die dafür als ursächlich anzusehende Suppression des SCD-Gens konnte nach 24 h Behandlungsdauer nicht gesehen werden. Es erscheint daher sinnvoll, die Langzeiteffekte unter Steroidbehandlung auch in *in vitro*-Langzeitstudien zu untersuchen.

Die CRH-Synthese der SZ95-Sebozyten konnte durch MALP-2, einem selektiven TLR2-Rezeptor-Agonisten, und CRH stimuliert werden. Die CRH-Behandlung zeigte Einfluss auf die Lipid- und Entzündungssignalkaskade, im Sinne einer vermehrten SCD-, FADS2- und TLR2-Expression. Die hier gezeigten Daten zeigen, dass CRH, als neuroendokriner Mediator, in der Lage ist, direkt auf den Lipidstoffwechsel zu wirken, indem es die Expression von lipogenen Enzymen beeinflusst. Diese Daten stützen das Modell einer peripheren Stressachse, das zeigt, dass zentral gebildetes CRH nicht nur im ZNS wirken kann, sondern auch in peripheren Geweben. Durch dieses Stressmodell, ist man in der Lage, bisher unverstandene Pathomechanismen von Hauterkrankungen zu erklären. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CRH die Sebum-Produktion der SZ95-Sebozyten verändern kann, indem es

direkt auf den Lipidmetabolismus der Zellen wirkt und die durch bakterielle Antigene ausgelöste Entzündungsantwort verstärkt. Damit konnte das Konzept eines peripheren Stressmechanismus verstärkt werden.

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
AA	Arachidonic acid (Arachidonsäure)
AP-1	activator protein 1
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CRH-R	Corticotropin-releasing Hormon - Rezeptor
DC	dendritische Zellen
FADS2	Fatty-acid Desaturase 2
I κ B	Inhibitor der κ B
IL	Interleukin
LA	Linoleic acid (Linolsäure)
LOX	Lipoxygenase
MALP-2	Macrophage-activating lipopeptide-2
MUFA	monounsaturated fatty acid (einfach ungesättigte Fettsäure)
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptors
PUFA	polyunsaturated fatty acid (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
SREBP	sterol regulatory element binding protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christos Zouboulis, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen. Ich danke ihm insbesondere für seine unendliche Geduld und für die große Freiheit, die er mir während der Anfertigung dieser Arbeit gewährte.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Sabine Fimmel, Herr Dipl. Biol. Holger Seltmann, Anke Hermann und Evelyn Glass für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Ich danke Herrn Dr. Philippe Legrand (Rennes, Frankreich) für die freundliche Überlassung der SCD - Antikörper.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden für ihre Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt insbesondere Andreas Deutsch, der immer an mich geglaubt hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Literaturverzeichnis

- [1] ALESTAS, T ; GANCEVICIENE, R ; FIMMEL, S ; MÜLLER-DECKER, K ; ZOUBOULIS, C C.: Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. In: *J Mol Med* 84 (2006), Jan, Nr. 1, 75-87. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-005-0715-8>. – DOI 10.1007/s00109-005-0715-8
- [2] ALIPRANTIS, A O. ; YANG, R B. ; MARK, M R. u. a.: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. In: *Science* 285 (1999), Jul, Nr. 5428, 736-739
- [3] ANSEL, J ; PERRY, P ; BROWN, J u. a.: Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. In: *J Invest Dermatol* 94 (1990), Jun, Nr. 6 Suppl, -107
- [4] ASEA, A ; REHLI, M ; KABINGU, E u. a.: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Apr, Nr. 17, 15028-15034. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200497200>. – DOI 10.1074/jbc.M200497200
- [5] BAUS, E ; VAN LAETHEM, F ; ANDRIS, F ; ROLIN, S ; URBAIN, J ; LEO, O: Dexamethasone increases intracellular cyclic AMP concentration in murine T lymphocyte cell lines. In: *Steroids* 66 (2001), Jan, Nr. 1, 39-47
- [6] BENÉ, H ; LASKY, D ; NTAMBI, J M.: Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression

- by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. In: *Biochem Biophys Res Commun* 284 (2001), Jun, Nr. 5, 1194-1198. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5102>. – DOI 10.1006/bbrc.2001.5102
- [7] BRAFF, M H. ; BARDAN, A ; NIZET, V ; GALLO, R L.: Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. In: *J Invest Dermatol* 125 (2005), Jul, Nr. 1, 9-13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23587.x>. – DOI 10.1111/j.0022-202X.2004.23587.x
- [8] CAMANDOLA, S ; LEONARDUZZI, G ; MUSSO, T u. a.: Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. In: *Biochem Biophys Res Commun* 229 (1996), Dec, Nr. 2, 643-647. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.1857>. – DOI 10.1006/bbrc.1996.1857
- [9] CHEN, W ; YANG, C C. ; SHEU, H M. ; SELTMANN, H ; ZOUBOULIS, C C.: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor and CCAAT/enhancer binding protein transcription factors in cultured human sebocytes. In: *J Invest Dermatol* 121 (2003), Sep, Nr. 3, 441-447. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12411.x>. – DOI 10.1046/j.1523-1747.2003.12411.x
- [10] CHINETTI, G ; FRUCHART, J C. ; STAELS, B: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. In: *Inflamm Res* 49 (2000), Oct, Nr. 10, 497-505
- [11] CHRISTY, R J. ; YANG, V W. ; NTAMBI, J M. u. a.: Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. In: *Genes Dev* 3 (1989), Sep, Nr. 9, 1323-1335
- [12] COOPER, C ; HENDERSON, A ; ARTANDI, S ; AVITAHN, N ; CALAME, K: Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. In: *Nucleic Acids Res* 23 (1995), Nov, Nr. 21, 4371-4377

- [13] DELHALLE, S ; BLASIUS, R ; DICATO, M ; DIEDERICH, M: A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. In: *Ann N Y Acad Sci* 1030 (2004), Dec, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1329.002>. – DOI 10.1196/annals.1329.002
- [14] ELIAS, P M. ; BROWN, B E.: The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function is essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. In: *Lab Invest* 39 (1978), Dec, Nr. 6, 574-583
- [15] ELIAS, P M. ; FRIEND, D S.: The permeability barrier in mammalian epidermis. In: *J Cell Biol* 65 (1975), Apr, Nr. 1, 180-191
- [16] FORMAN, B M. ; CHEN, J ; EVANS, R M.: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Apr, Nr. 9, 4312-4317
- [17] FUNK, C D.: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. In: *Science* 294 (2001), Nov, Nr. 5548, 1871-1875. <http://dx.doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>. – DOI 10.1126/science.294.5548.1871
- [18] GEORGEL, P ; CROZAT, K ; LAUTH, X u.a.: A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with gram-positive bacteria. In: *Infect Immun* 73 (2005), Aug, Nr. 8, 4512-4521. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.8.4512-4521.2005>. – DOI 10.1128/IAI.73.8.4512-4521.2005
- [19] GUILLOU, H ; D'ANDREA, S ; RIOUX, V ; JAN, S ; LEGRAND, P: The surprising diversity of Delta6-desaturase substrates. In: *Biochem Soc Trans* 32 (2004), Feb, Nr. Pt 1, 86-87. <http://dx.doi.org/10.1042/>. – DOI 10.1042/
- [20] HASHIMOTO, Y ; KANEDA, Y ; AKASHI, T ; ARAI, I ; NAKAIKE, S: Persistence of *Staphylococcus aureus* colonization on the skin

- of NC/Nga mice. In: *J Dermatol Sci* 35 (2004), Aug, Nr. 2, 143-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.04.003>. – DOI 10.1016/j.jdermsci.2004.04.003
- [21] HIRSCHFELD, M ; WEIS, J J. ; TOSHCHAKOV, V u.a.: Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. In: *Infect Immun* 69 (2001), Mar, Nr. 3, 1477-1482. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.3.1477-1482.2001>. – DOI 10.1128/IAI.69.3.1477-1482.2001
- [22] HOLMAN, R T. ; JOHNSON, S B. ; GERRARD, J M. ; MAUER, S M. ; KUPCHO-SANDBERG, S ; BROWN, D M.: Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983), Apr, Nr. 8, 2375-2379
- [23] JACKSON, S M. ; WILLIAMS, M L. ; FEINGOLD, K R. ; ELIAS, P M.: Pathobiology of the stratum corneum. In: *West J Med* 158 (1993), Mar, Nr. 3, 279-285
- [24] JUMP, D B.: Fatty acid regulation of gene transcription. In: *Crit Rev Clin Lab Sci* 41 (2004), Nr. 1, 41-78. <http://dx.doi.org/10.1080/10408360490278341>. – DOI 10.1080/10408360490278341
- [25] KABELITZ, D: Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. In: *Curr Opin Immunol* 19 (2007), Feb, Nr. 1, 39-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2006.11.007>. – DOI 10.1016/j.coi.2006.11.007
- [26] KÄHÄRI, V M.: Dexamethasone suppresses elastin gene expression in human skin fibroblasts in culture. In: *Biochem Biophys Res Commun* 201 (1994), Jun, Nr. 3, 1189-1196. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1994.1831>. – DOI 10.1006/bbrc.1994.1831
- [27] KARALIS, K ; MUGLIA, L J. ; BAE, D ; HILDERBRAND, H ; MAJZOUB, J A.: CRH and the immune system. In: *J Neuroimmunol* 72 (1997), Feb, Nr. 2, 131-136

- [28] KAWASHIMA, Y ; HANIOKA, N ; MATSUMURA, M ; KOZUKA, H: Induction of microsomal stearyl-CoA desaturation by the administration of various peroxisome proliferators. In: *Biochim Biophys Acta* 752 (1983), Jul, Nr. 2, 259-264
- [29] KLEEMANN, R ; GERVOIS, P P. ; VERSCHUREN, L ; STAELS, B ; PRINCEN, H M. ; KOOISTRA, T: Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. In: *Blood* 101 (2003), Jan, Nr. 2, 545-551. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-06-1762>. – DOI 10.1182/blood-2002-06-1762
- [30] KLIEWER, S A. ; SUNDSETH, S S. ; JONES, S A. u. a.: Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Apr, Nr. 9, 4318-4323
- [31] KRAUSE, K ; SCHNITGER, A ; FIMMEL, S ; GLASS, E ; ZOUBOULIS, C C.: Corticotropin-releasing hormone skin signaling is receptor-mediated and is predominant in the sebaceous glands. In: *Horm Metab Res* 39 (2007), Feb, Nr. 2, 166-170. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-961811>. – DOI 10.1055/s-2007-961811
- [32] LEBRE, M C. ; AAR, A M. d. ; BAARSEN, L van u. a.: Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. In: *J Invest Dermatol* 127 (2007), Feb, Nr. 2, 331-341. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>. – DOI 10.1038/sj.jid.5700530
- [33] LEE, D Y. ; YAMASAKI, K ; RUDSIL, J u. a.: Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill propionibacterium acnes. In: *J Invest Dermatol* 128 (2008), Jul, Nr. 7, 1863-1866. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701235>. – DOI 10.1038/sj.jid.5701235
- [34] LEMAITRE, B ; NICOLAS, E ; MICHAUT, L ; REICHHART, J M. ; HOFFMANN, J A.: The dorsoventral regulatory gene cassette spätz-

- le/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. In: *Cell* 86 (1996), Sep, Nr. 6, 973-983
- [35] LI, Q ; VERMA, I M.: NF-kappaB regulation in the immune system. In: *Nat Rev Immunol* 2 (2002), Oct, Nr. 10, 725-734. <http://dx.doi.org/10.1038/nri910>. – DOI 10.1038/nri910
- [36] LI, Y ; NARA, T Y. ; NAKAMURA, M T.: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is required for feedback regulation of highly unsaturated fatty acid synthesis. In: *J Lipid Res* 46 (2005), Nov, Nr. 11, 2432-2440. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M500237>–JLR200. – DOI 10.1194/jlr.M500237–JLR200
- [37] MANDRUP, S ; LANE, M D.: Regulating adipogenesis. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Feb, Nr. 9, 5367-5370
- [38] MASSARI, P ; HENNEKE, P ; HO, Y ; LATZ, E ; GOLENBOCK, D T. ; WETZLER, L M.: Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. In: *J Immunol* 168 (2002), Feb, Nr. 4, 1533-1537
- [39] MEDZHITOV, R ; PRESTON-HURLBURT, P ; JANEWAY, C A.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. In: *Nature* 388 (1997), Jul, Nr. 6640, 394-397. <http://dx.doi.org/10.1038/41131>. – DOI 10.1038/41131
- [40] MILLER, C W. ; NTAMBI, J M.: Peroxisome proliferators induce mouse liver stearyl-CoA desaturase 1 gene expression. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Sep, Nr. 18, 9443-9448
- [41] MIYAZAKI, M ; MAN, W C. ; NTAMBI, J M.: Targeted disruption of stearyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. In: *J Nutr* 131 (2001), Sep, Nr. 9, 2260-2268
- [42] MORRIS, M C. ; EVANS, D A. ; BIENIAS, J L. u. a.: Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. In: *Arch*

- Neurol* 60 (2003), Jul, Nr. 7, 940-946. <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.60.7.940>. – DOI 10.1001/archneur.60.7.940
- [43] NAGY, I ; PIVARCSI, A ; KIS, K u. a.: Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. In: *Microbes Infect* 8 (2006), Jul, Nr. 8, 2195-2205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.001>. – DOI 10.1016/j.micinf.2006.04.001
- [44] NAKAMURA, M T. ; TANG, A B. ; VILLANUEVA, J ; HALSTED, C H. ; PHINNEY, S D.: Selective reduction of delta 6 and delta 5 desaturase activities but not delta 9 desaturase in micropigs chronically fed ethanol. In: *J Clin Invest* 93 (1994), Jan, Nr. 1, 450-454. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI116981>. – DOI 10.1172/JCI116981
- [45] OEFF, M K. ; SELTMANN, H ; HIROI, N u. a.: Differential regulation of Toll-like receptor and CD14 pathways by retinoids and corticosteroids in human sebocytes. In: *Dermatology* 213 (2006), Nr. 3, 266-266. <http://dx.doi.org/10.1159/000095056>. – DOI 10.1159/000095056
- [46] OLIVER, W R. ; SHENK, J L. ; SNAITH, M R. u. a.: A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), Apr, Nr. 9, 5306-5311. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.091021198>. – DOI 10.1073/pnas.091021198
- [47] PAI, J T. ; GURYEV, O ; BROWN, M S. ; GOLDSTEIN, J L.: Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Oct, Nr. 40, 26138-26148
- [48] PEREIRA, L M. ; HATANAKA, E ; MARTINS, E F. u. a.: Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. In: *Cell Biochem Funct* 26 (2008), Mar-Apr, Nr. 2, 197-204. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1432>. – DOI 10.1002/cbf.1432

- [49] PLAT, J ; MENSINK, R P.: Food components and immune function. In: *Curr Opin Lipidol* 16 (2005), Feb, Nr. 1, 31-37
- [50] PROTTEY, C: Essential fatty acids and the skin. In: *Br J Dermatol* 94 (1976), May, Nr. 5, 579-585
- [51] RENN, C N. ; SANCHEZ, D J. ; OCHOA, M T. u. a.: TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. In: *J Immunol* 177 (2006), Jul, Nr. 1, 298-305
- [52] RIMOLDI, O J. ; FINARELLI, G S. ; BRENNER, R R.: Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. In: *Biochem Biophys Res Commun* 283 (2001), May, Nr. 2, 323-326. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4785>. – DOI 10.1006/bbrc.2001.4785
- [53] ROSENFELD, R L. ; DEPLEWSKI, D ; KENTSI, A ; CILETTI, N: Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation. In: *Dermatology* 196 (1998), Nr. 1, 43-46
- [54] ROSSI, A ; KAPAHI, P ; NATOLI, G u. a.: Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. In: *Nature* 403 (2000), Jan, Nr. 6765, 103-108. <http://dx.doi.org/10.1038/47520>. – DOI 10.1038/47520
- [55] SCHNEIDER, I M. ; WOHLRAB, W ; NEUBERT, R: [Fatty acids and the epidermis]. In: *Hautarzt* 48 (1997), May, Nr. 5, 303-310
- [56] SCHWANDNER, R ; DZIARSKI, R ; WESCHE, H ; ROTHE, M ; KIRSCHNING, C J.: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Jun, Nr. 25, 17406-17409
- [57] SESSLER, A M. ; KAUR, N ; PALTA, J P. ; NTAMBI, J M.: Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nov, Nr. 47, 29854-29858

- [58] SHIMOMURA, I ; BASHMAKOV, Y ; HORTON, J D.: Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Oct, Nr. 42, 30028-30032
- [59] SLOMINSKI, A ; WORTSMAN, J ; LUGER, T ; PAUS, R ; SOLOMON, S: Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. In: *Physiol Rev* 80 (2000), Jul, Nr. 3, 979-1020
- [60] SLOMINSKI, A ; WORTSMAN, J ; PISARCHIK, A u. a.: Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. In: *FASEB J* 15 (2001), Aug, Nr. 10, 1678-1693
- [61] SMITH, M F. ; MITCHELL, A ; LI, G u. a.: Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Aug, Nr. 35, 32552-32560. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305536200>. – DOI 10.1074/jbc.M305536200
- [62] STEIN, B ; BALDWIN, A S.: Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. In: *Mol Cell Biol* 13 (1993), Nov, Nr. 11, 7191-7198
- [63] STELEKATI, E ; ORINSKA, Z ; BULFONE-PAUS, S: Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. In: *Immunobiology* 212 (2007), Nr. 6, 505-519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2007.03.012>. – DOI 10.1016/j.imbio.2007.03.012
- [64] THAI, S F. ; ALLEN, J W. ; DEANGELO, A B. ; GEORGE, M H. ; FUSCOE, J C.: Detection of early gene expression changes by differential display in the livers of mice exposed to dichloroacetic acid. In: *Carcinogenesis* 22 (2001), Aug, Nr. 8, 1317-1322
- [65] UNDERHILL, D M. ; OZINSKY, A ; HAJJAR, A M. u. a.: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. In: *Nature* 401 (1999), Oct, Nr. 6755, 811-815. <http://dx.doi.org/10.1038/44605>. – DOI 10.1038/44605

- [66] WERTS, C ; TAPPING, R I. ; MATHISON, J C. u. a.: Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. In: *Nat Immunol* 2 (2001), Apr, Nr. 4, 346-352. <http://dx.doi.org/10.1038/86354>. – DOI 10.1038/86354
- [67] WORCESTER, N A. ; BRUCKDORFER, K R. ; HALLINAN, T ; WILKINS, A J. ; MANN, J A. ; YUDKINS, J: The influence of diet and diabetes on stearyl Conenzyme A desaturase (EC 1.14.99.5) activity and fatty acid composition in rat tissues. In: *Br J Nutr* 41 (1979), Mar, Nr. 2, 239-252
- [68] WORGALL, T S. ; STURLEY, S L. ; SEO, T ; OSBORNE, T F. ; DECKELBAUM, R J.: Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Oct, Nr. 40, 25537-25540
- [69] WRÓBEL, A ; SELTMANN, H ; FIMMEL, S u. a.: Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. In: *J Invest Dermatol* 120 (2003), Feb, Nr. 2, 175-181. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12029.x>. – DOI 10.1046/j.1523-1747.2003.12029.x
- [70] XU, D ; KOMAI-KOMA, M ; LIEW, F Y.: Expression and function of Toll-like receptor on T cells. In: *Cell Immunol* 233 (2005), Feb, Nr. 2, 85-89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.019>. – DOI 10.1016/j.cellimm.2005.04.019
- [71] YAMANAKA, W K. ; CLEMANS, G W. ; HUTCHINSON, M L.: Essential fatty acids deficiency in humans. In: *Prog Lipid Res* 19 (1980), Nr. 3-4, 187-215
- [72] YAO, P M. ; TABAS, I: Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Aug, Nr. 31, 23807-23813. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M002087200>. – DOI 10.1074/jbc.M002087200

- [73] ZBYTEK, B ; PFEFFER, L M. ; SLOMINSKI, A T.: Corticotropin-releasing hormone stimulates NF-kappaB in human epidermal keratinocytes. In: *J Endocrinol* 181 (2004), Jun, Nr. 3, 1-7
- [74] ZEYDA, M ; SÄEMANN, M D. ; STUHLMEIER, K M. u. a.: Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF-kappaB activation. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Apr, Nr. 14, 14293-14301. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M410000200>. – DOI 10.1074/jbc.M410000200
- [75] ZHANG, L ; GE, L ; PARIMOO, S ; STENN, K ; PROUTY, S M.: Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. In: *Biochem J* 340 (Pt 1) (1999), May, 255-264
- [76] ZHANG, W ; WATSON, C E. ; LIU, C ; WILLIAMS, K J. ; WERTH, V P.: Glucocorticoids induce a near-total suppression of hyaluronan synthase mRNA in dermal fibroblasts and in osteoblasts: a molecular mechanism contributing to organ atrophy. In: *Biochem J* 349 (2000), Jul, Nr. Pt 1, 91-97
- [77] ZHOU, L ; NILSSON, A: Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. In: *J Lipid Res* 42 (2001), Oct, Nr. 10, 1521-1542
- [78] ZIBOH, V A. ; CHAPKIN, R S.: Metabolism and function of skin lipids. In: *Prog Lipid Res* 27 (1988), Nr. 2, 81-105
- [79] ZOUBOULIS, C C.: Sebaceous glands and the prostaglandin pathway—key stones of an exciting mosaic. In: *J Invest Dermatol* 125 (2005), Nov, Nr. 5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23922.x>. – DOI 10.1111/j.0022-202X.2005.23922.x
- [80] ZOUBOULIS, C C. ; NESTORIS, S ; ADLER, Y D. u. a.: A new concept for acne therapy: a pilot study with zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor. In: *Arch Dermatol* 139 (2003), May, Nr. 5, 668-670. <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.139.5.668>. – DOI 10.1001/archderm.139.5.668

- [81] ZOUBOULIS, C C. ; SELTMANN, H ; HIROI, N u. a.: Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), May, Nr. 10, 7148-7153. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.102180999>. – DOI 10.1073/pnas.102180999

Abbildungsverzeichnis

1.1	Signalweg der TLR	3
1.2	Angeborene und adaptive Immunität	6
1.3	Wirkung der PPARs und entsprechende Liganden der Subtypen	18
1.4	Promotorregion des SCD 1 und SCD2 Gens der Maus	21
1.5	Unterdrückung der Transkription des SCD Gens durch mehr- fach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)	22
1.6	Fettsäuremetabolismus	23
4.1	Zytotoxizität der SZ95-Sebozyten nach 24h-Behandlung mit NVP-LCF369	54
4.2	Zytotoxizität der SZ95-Sebozyten nach 24h-Behandlung mit MALP-2 (50 ng/ml) und mit MALP-2 (50 ng/ml) und LCF- NVP369	54
4.3	Zytotoxizität der SZ95-Sebozyten nach 24h-Behandlung mit Testosteron (T) 20nM und Linolsäure (LA) 100 μ M als Kom- bination und zusätzlich mit LCF-NVP369 in verschiedenen Konzentrationen (1 μ M und 100 nM)	55
4.4	IL-6 und IL-8 Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit PMA	56
4.5	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit Dexamethason	57
4.6	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit CRH	57
4.7	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit Linolsäure	58

4.8	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit Arachidonsäure	59
4.9	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit MALP-2	60
4.10	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit NVP-LCF369	61
4.11	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit MALP-2	62
4.12	IL-6- und IL-8-Produktion von SZ95-Sebozyten nach 24 h- Behandlung mit Testosteron und Linolsäure	63
4.13	Intrazelluläre CRH-Produktion nach Behandlung der SZ95- Sebozyten mit CRH	64
4.14	Intrazelluläre CRH-Produktion nach Behandlung der SZ95- Sebozyten mit MALP-2	65
4.15	Expression der SCD, FADS2 und TLR2 auf mRNA und Pro- teinebene in SZ95-Sebozyten	66
4.16	RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 auf mRNA-Ebene in SZ95-Sebozyten nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit PMA	67
4.17	SCD mRNA in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung . . .	68
4.18	SCD in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung	68
4.19	FADS2 mRNA in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung . .	69
4.20	FADS2 in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung	70
4.21	TLR2 mRNA in SZ95-Sebozyten unter PMA-Behandlung . . .	70
4.22	SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason- Behandlung	71
4.23	SCD in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason-Behandlung . .	72
4.24	FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason- Behandlung	73
4.25	FADS2 in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason-Behandlung .	73
4.26	TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Dexamethason- behandlung	74

4.27 RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 in SZ95-Sebozyten nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit Dexamethason	74
4.28 SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung	75
4.29 SCD in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung	76
4.30 FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung	76
4.31 FADS2 in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung	77
4.32 TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter CRH-Behandlung	77
4.33 RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 in SZ95-Sebozyten nach Behandlung mit CRH	78
4.34 Western Blot: Expression der SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten nach Behandlung mit CRH	78
4.35 SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung	79
4.36 SCD in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung	80
4.37 FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung	80
4.38 FADS2 in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung . . .	81
4.39 TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Linolsäure-Behandlung	82
4.40 RT-PCR: Expression der SCD, FADS2 und TLR2 in SZ95-Sebozyten auf mRNA-Ebene (K= unbehandelte Kontrolle; c1= 10^{-4} Mol/l; c2= 10^{-5} Mol/l) nach 1,5 h; 12 h und 24 h Behandlungsdauer mit Linolsäure.	83
4.41 Western Blot: Expression der SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten nach 6, 12 und 24 h Behandlungsdauer mit Linolsäure	83
4.42 SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung	84
4.43 SCD in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung . .	85
4.44 FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung	85
4.45 FADS2 in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung .	86
4.46 TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Arachidonsäure-Behandlung	87

4.47	RT-PCR: Expression der SCD, FADS2 und des TLR2 auf mRNA-Ebene nach 1,5 h; 12 h und 24 h Behandlung mit Arachidonsäure. (K= unbehandelte Kontrolle; c1= 10^{-5} Mol/l AA; c2= 10^{-6} Mol/l AA)	87
4.48	Western Blot: Expression der SCD und FADS2 nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit Arachidonsäure. (K= unbehandelte Kontrolle. c1= 10^{-5} Mol/l AA. c2= 10^{-6} Mol/l AA)	88
4.49	SCD mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung	88
4.50	SCD in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung	89
4.51	FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung	90
4.52	FADS2 in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung	90
4.53	TLR2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter MALP-2-Behandlung	91
4.54	RT-PCR: Expression der mRNA der SCD, FADS2 und des TLR2 in SZ95-Sebozyten nach 1,5; 12 und 24 h Behandlung mit MALP-2	92
4.55	SCD mRNA- und FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Behandlung mit NVP-LCF369	93
4.56	SCD mRNA- und FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Behandlung mit NVP-LCF369 in zwei verschiedenen Konzentrationen und MALP-2 (50 ng/ml)	94
4.57	SCD mRNA- und FADS2 mRNA-Menge in SZ95-Sebozyten unter Behandlung mit NVP-LCF369 in zwei verschiedenen Konzentrationen und Testosteron (T: $2 \cdot 10^{-8}$ Mol/l) und Linolsäure (LA: 10^{-4} Mol/l)	95
4.58	RT-PCR: Expression der mRNA der SCD und FADS2 in SZ95-Sebozyten nach 12 h Behandlung mit verschiedenen Kombinationen aus NVP-LCF368 und MALP-2 bzw. NVP-LCF369 und Linolsäure/Testosteron	96
5.1	Mögliche Effekte von Linolsäure auf die Transkription des SCD- und FADS2-Gens.	102
5.2	Effekte von MALP-2, CRH und PMA und ihre mögliche Signalkaskade	108

- 5.3 Effekt der ω -6 Fettsäuren: Linolsäure und Arachidonsäure auf die Fettsäureenzyme SCD und FADS2, sowie auf den TLR2 . 111

Selbständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Silvia Angres, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Die Regulation des Fettsäuremetabolismus in den SZ95-Sebozyten* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift