

### 3. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Vitamin D<sub>3</sub>-eingleiteten Signaltransduktion über den sog. Sphingomyelin-Zyklus in der immortalisierten humanen Keratinozyten Zelllinie HaCaT zu charakterisieren. Der Sphingomyelin-Zyklus wurde überwiegend für hämatopoetische Zellen beschrieben (Okazaki et al., 1989). Die Existenz dieses Signaltransduktionsweges in Keratinozyten wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Geilen et al., 1996). Dabei wurden sowohl primäre Keratinozyten als auch die Keratinozyten Zelllinie HaCaT mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und seinem Analogon Calcipotriol behandelt. Es zeigte sich, daß nach 3 h der Sphingomyelin-Gehalt der Zellen abnimmt und Ceramid ansteigt. Es ist mittlerweile sicher belegt, daß Ceramid in dem genannten Signaltransduktionsweg ein *Second Messenger* ist, der u.a. folgende biologische Antworten in der Zelle verursacht: Zellwachstumshemmung, Apoptose und Zelldifferenzierung (Hannun, 1994; Hannun und Obeid, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden neben 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> auch weitere Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga wie Calcipotriol, Tacalcitol, GS 1500 und EB 1213 untersucht. Ein Teil der Ergebnisse ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Die Arbeitshypothese war, daß die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in Keratinozyten über die Steigerung der Genexpression eines Proteins läuft, das als Mediator die Effekte von 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in das Zellinnere weiterleitet. Diese Annahme wurde auf unterschiedlichen zellulären Ebenen untersucht. Als Mediator wurde Tumornekrosefaktor  $\alpha$  gefunden. Die Agonisten des Sphingomyelin-Zyklus werden in frühe und späte Agonisten eingeteilt. „Früh“ und „spät“ bezieht sich auf den Zeitpunkt der meßbaren Hydrolyse des membranständigen Sphingomyelins. Neben dem späten Agonisten 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> leiten IFN  $\gamma$  und Dexamethason die Sphingomyelin-Hydrolyse nach frühestens einer Stunde ein (Hannun, 1994). TNF $\alpha$ , nerve growth factor (NGF) und Interleukin (IL)-1 $\beta$  dagegen leiten die Hydrolyse des Sphingomyelins innerhalb von Sekunden bis Minuten ein (Kolesnick und Golde, 1994; Wiegmann et al., 1994). Für 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ist es bekannt, daß sein intrazellulärer Rezeptor ein ligandengesteuertes Transkriptionsfaktor ist und somit die Expression von verschiedenen Genen modulieren kann (Carlberg und Polly, 1998). Wu und Mitarbeiter konnten zeigen, daß 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Expression von IL-1 herunter- und von NGF hochreguliert (Wu, et al., 1996). NGF bewirkt in HaCaT-Zellen keine Sphingomyelin-Hydrolyse (Geilen et al., 1997). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß TNF $\alpha$  die Sphingomyelin-Hydrolyse in HaCaT-Zellen nach 20 min. einleitet (nicht gezeigt).

In meiner Diplomarbeit konnte ich bereits mit Hilfe des Northern Blots und RT-PCR zeigen, daß 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die mRNA für TNF $\alpha$  schon nach 1 h erhöht. Daß das TNF $\alpha$ -Gen von Vitamin D<sub>3</sub> moduliert werden kann, wird zusätzlich von den Ergebnissen von Carlberg und Mitarbeitern unterstützt, die zeigen konnten, daß das TNF $\alpha$ -Gen ein komplexes *Vitamin D<sub>3</sub> response element* (VDRE) enthält (C. Carlberg, persönliche Mitteilung). Um zu sehen, ob die

mRNA in Protein umgewandelt wird, wurden die Zellen mit  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde das TNF $\alpha$ -Protein immunpräzipitiert. Auf der Proteinebene stieg das TNF $\alpha$ -Protein nach 2 h an. Nach 3 h war es im Zellüberstand zu detektieren, was darauf hinweist, daß das Protein sezerniert wird und autokrin auf die Zelle wirkt. Der zeitliche Verlauf der  $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ -Wirkung wäre folgendermaßen: Nach 1 h Behandlung steigt die mRNA von TNF $\alpha$ , die gleich in Protein umgesetzt wird, so daß nach 2 h das Maximum erreicht wird. Gleichzeitig wird das Protein sezerniert. Autokrin bewirkt es dann nach 3 h die maximale Sphingomyelin-Hydrolyse von ca. 25 %. Es wurde weiterhin mit Hilfe von Antikörpern gegen den TNF $\alpha$ -Rezeptor (55 kDa) (da in Keratinozyten nur der 55 kDa TNF $\alpha$ -Rezeptor exprimiert wird (Kristensen et al., 1993)) untersucht, ob wirklich das sezernierte TNF $\alpha$  für die Effekte von  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  verantwortlich ist. Wird der Rezeptor blockiert, nehmen die  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -vermittelten Effekte wie Zellproliferationshemmung und Apoptose ab. Auf der anderen Seite kann die intrazelluläre Konzentration von Ceramid, das als Folge der Sphingomyelin-Hydrolyse entsteht, moduliert werden. Fumonisin B1, ein Pilzgift, hemmt spezifisch die Sphinganin-*N*-Acyltransferase (Ceramid-Synthase). Die Vorbehandlung der Zellen für 24 h mit 100  $\mu\text{M}$  dieser Substanz erniedrigt die basale Ceramidkonzentration der Zelle, wodurch auch der Sphingomyelin-Gehalt der Zelle abnimmt. Behandelt man nun die Zellen mit Vitamin D $_3$ , so reicht die über die Sphingomyelin-Hydrolyse entstehende Menge an Ceramid nicht aus, um die Apoptose einzuleiten. Das heißt, daß die von  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -eingeleitete Apoptose zumindest teilweise von Ceramid vermittelt wird.

Die Sphingomyelin-Hydrolyse wird eingeleitet von einem Phospholipase C-ähnlichen Enzym, die Sphingomyelinase, von der mehrere Isoformen existieren. Jedoch gibt es bisher nur Hinweise dafür, daß die saure bzw. die neutrale Sphingomyelinase in Signaltransduktionsprozessen involviert sind. In den meisten untersuchten Zelltypen aktiviert  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  die neutrale Sphingomyelinase, wobei TNF  $\alpha$  beide Isoformen, je nach Zelltyp, stimulieren kann. In HaCaT-Zellen, in denen beide Isoformen exprimiert werden, konnte weder die Steigerung der Aktivität der neutralen noch der sauren Sphingomyelinase gemessen werden. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, daß die Aktivierung ein schneller aber kurzer Vorgang ist und beim Durchführen des Enzymassays das Zeitfenster deshalb nicht erfaßt wurde. Die neutrale Sphingomyelinase ist im Vergleich zur sauren Isoform sehr instabil gegenüber Proteasen, so daß sie während der Durchführung der hier angewendeten Meßmethode, die relativ aufwendig ist, an Aktivität einbüßt. Auch wird einer veröffentlichten Studie zufolge die Rolle der neutralen Sphingomyelinase, die kürzlich kloniert wurde, in der Sphingolipid-vermittelten Signaltransduktion in Zweifel gezogen (Tomiuk et al., 1998). Die neutrale Sphingomyelinase wird in U937-Zellen mit der Aktivierung der JNK und PARP-Spaltung nach TNF $\alpha$ -Stimulation in Verbindung gebracht. Jedoch zeigten die neutrale Sphingomyelinase überexprimierende U937-Zellen keinen Unterschied zu Kontrollvektor transfizierten U937-Zellen, wenn sie mit TNF $\alpha$  behandelt wurden. Auch die entstehende Ceramidkonzentration war in beiden Zelllinien ähnlich. Hier kommt die Frage auf, ob das klonierte Protein nicht vielleicht nur eine

Untereinheit der neutralen Sphingomyelinase ist. Als Extremfall könnte auch sein, daß ein ganz anderes Protein kloniert wurde.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß  $\text{TNF}\alpha$  im Konzentrationsbereich von 20-50 nM die Apoptoserate in HaCaT-Zellen nach 24 h um ca. 300 % gegenüber der Kontrolle erhöht. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe um Henseleit, die beschreiben, daß  $\text{TNF}\alpha$  in HaCaT-Zellen keine Apoptose auslöst (Henseleit et al., 1996). Eine weitere Studie besagt, daß  $\text{TNF}\alpha$  in HaCaT-Zellen nur in Gegenwart von Cycloheximid, einem Proteinsynthese-Inhibitor, Apoptose auslösen kann (Reinartz et al., 1996). Beide Arbeitsgruppen haben jedoch  $\text{TNF}\alpha$  in sehr niedrigen Konzentrationen eingesetzt (bis 20 ng/ml = 1,14 nM) und die Zellen 24 h damit behandelt. Die nach 24 h gemessene erhöhte LDH-Aktivität nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  im Zellkulturüberstand ist auf die sog. sekundäre Nekrose zurückzuführen. Die während des Vorgangs der Apoptose abgeschnürten Zellfragmente bzw. *apoptotic bodies* können *in vitro* nicht entfernt werden. Sie schwellen nach einiger Zeit an und werden lysiert. Folglich gelangt u. a. LDH in den Zellkulturüberstand und kann erfaßt werden.

Wie bereits oben erwähnt, wurden auch weitere synthetische Vitamin D-Abkömmlinge (Calcipotriol, Tacalcitol, EB 1213 und GS 1500) in HaCaT-Zellen untersucht. Während Calcipotriol und Tacalcitol für die topische Behandlung der Psoriasis vulgaris eingesetzt werden, sind EB 1213 und GS 1500 noch in der vorklinischen Testphase. Interessant war die Frage zu untersuchen, ob diese Analoga ebenfalls über den Sphingomyelin-Zyklus wirken.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse.**

n.d.: not determined (nicht bestimmt); B: deutlicher Effekt; BB: starker Effekt ; — : kein Effekt; ↑: wird hochreguliert.

Substanz	Zytotoxizität	Proliferation		Apoptose		SM-Hydrolyse	$\text{TNF}\alpha$ -mRNA	$\text{TNF}\alpha$ -Protein
		1µM	5µM	5µM	10µM			
$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	—	—	BB	B	BB	B	↑	↑
Calcipotriol	—	—	B	B	B	B	—	n. d.
EB 1213	10 µM, 24 h	—	B	B	B	B	↑	n. d.
GS 1500	10 µM, 24 h	—	BB	B	B	B	—	n. d.
Tacalcitol	—	B	BB	B	BBB	B	—	n. d.
Vitamin D-Vorläufer	n. d.	n. d.		n. d.		—	n. d.	n. d.
$\text{C}_2\text{-Cer=O}$	—	BB		BB				
$\text{C}_2\text{-Cer=S}$	—	BB		BB				
FS-5	—	B		B				

Wie in Tabelle 4 übersichtlich dargestellt, leiten alle vier Analoga die Hydrolyse ein, wobei nur EB 1213 aus der Reihe fällt. Die Wirkung von EB 1213 hält auch nach 6 h an. Neben den oben

genannten Analoga wurden HaCaT-Zellen auch mit 100 nM Vitamin-D-Vorläufer (7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol und 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) bis zu 6 h behandelt und die Sphingomyelin-Hydrolyse untersucht. Keine der drei Substanzen war in der Lage die Hydrolyse signifikant gegenüber der Kontrolle einzuleiten. Das deutet darauf hin, daß die von 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und seinen Analoga eingeleitete Sphingomyelin-Hydrolyse spezifisch ist. Bei 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, dem direkten Vorläufer von 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wäre theoretisch ein Effekt zu erwarten gewesen, da 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in HaCaT-Zellen bereits nach einer Stunde in 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> umgewandelt wird (Lehmann, 1997). Höchstwahrscheinlich war die entstandene Menge zu gering, um seine Wirkung auf die Sphingomyelin-Hydrolyse bemerkbar zu machen.

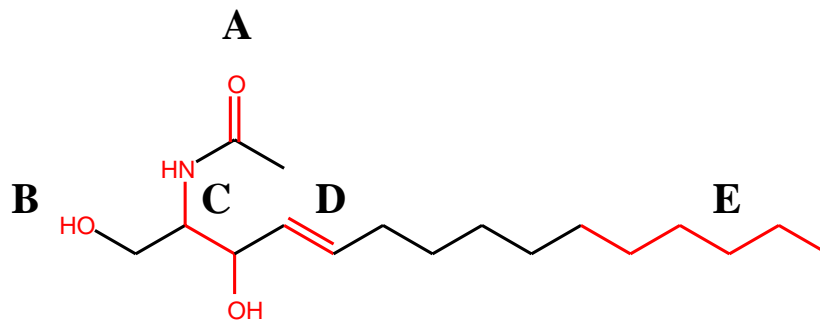
Weiterhin hemmen alle hier getesteten Analoga (Calcipotriol, Tacalcitol, EB 1213 und GS 1500) das Wachstum der HaCaT-Zellen und leiten die Apoptose ein. Die Proliferation wurde nach 48 h der Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und den Analoga gemessen. Bei der Konzentration von 1  $\mu$ M bewirkt nur Tacalcitol eine deutliche Hemmung. Bei 5  $\mu$ M hemmen Tacalcitol, 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und GS 1500 vollständig das Zellwachstum. Weiterhin wurde untersucht, ob die Analoga in Keratinozyten Apoptose auslösen können. Alle Analoga sind in der Lage in Keratinozyten Apoptose auszulösen. Calcipotriol und EB 1213 lösen bereits nach 6 h die Apoptose aus. Nach 24 h ist Tacalcitol das Analogon mit der stärksten Wirkung. Es steigert die Apoptoserate auf das 10-fache des Kontrollwertes. Die nach 24 h Behandlung mit EB 1213 und GS 1500 gemessene Steigerung der LDH-Aktivität, die auf eine nicht mehr intakte Zellmembran hinweist, ist auch hier auf die sekundäre Nekrose zurückzuführen. Anders wäre es, wenn EB 1213 und GS 1500 keine Apoptose auslösen würden. Dann würden die Ergebnisse des Apoptose- und Zytotoxizitäts-Tests zusammen betrachtet deutlich darauf hinweisen, daß die Substanzen bei der eingesetzten Konzentration zytotoxisch sind. Es ist wichtig, mit welcher Zelldichte die Proliferations- und Apoptosemessungen durchgeführt werden. Im allgemeinen sind dünnere HaCaT-Zellkulturen empfindlicher gegenüber diesen Substanzen als dichtere und die gemessenen Effekte deshalb größer. Daß die gemessene Apoptoserate in HaCaT-Zellen abhängig von der Zelldichte ist, hat auch die Arbeitsgruppe um Iwasaki-Bessho beschrieben (Iwasaki-Bessho et al., 1998). Wir haben Apoptosemessungen bei 80-90 % Konfluenz der Zellen durchgeführt.

Unter den getesteten vier Analoga ist nur EB 1213 in der Lage wie 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die mRNA von TNF $\alpha$  zu steigern, was zu der Annahme führt, daß seine Wirkungsweise ähnlich dem von Vitamin D<sub>3</sub> ist. Die Messung der mRNA von TNF $\alpha$  erwies sich zum Teil als sehr schwierig, da die basale Genexpression von TNF $\alpha$  u. a. abhängig von der Dichte der HaCaT-Zellen ist und somit stark variiert. Werden HaCaT-Zellen dünn gehalten, so ist die TNF $\alpha$  mRNA-Expression viel höher als bei dichten Zellen. Die Analoga werden aufgrund ihrer Kinetik den späten Agonisten des Sphingomyelin-Zyklus zugeordnet und Calcipotriol, Tacalcitol und GS 1500 wirken höchstwahrscheinlich ebenfalls wie 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> über einen Mediator, der nicht TNF $\alpha$  ist. Aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen wäre es möglich, daß die Analoga durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor diesen so verändern, daß er selektiv andere

VDRE-Typen erkennt, als mit Vitamin D<sub>3</sub> (Carlberg, 1996; Danielsson et al., 1997). Von anderen Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga ist es bekannt, daß sie abhängig von ihrer chemischen Struktur unterschiedliche VDRE-Typen erkennen (Quack et al., 1998).

Neben den Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga wurde die Wirkung neuartiger synthetischer Ceramid-Analoga in HaCaT-Zellen auf das Zellwachstum und Auslösen der Apoptose überprüft. Von C<sub>2</sub>-Cer=O (*N*-Acetylsphingosin) ist die biologische Wirkung wie Proliferationshemmung und Apoptose auf unterschiedliche Zellpopulationen bekannt. C<sub>2</sub>-Cer=O und natürliches Ceramid wirken auch in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen wachstumshemmend (Geilen et al., 1996). Abbildung 25 zeigt die Struktur von *N*-Acetylsphingosin, wobei die funktionell wichtigen Bindungen rot gekennzeichnet sind. Die Überlegung bei der Synthese neuer Ceramid-Analoga war, herauszufinden, welche Bindungen essentiell für die effektive Wirksamkeit von Ceramid sind. Das wäre vor dem Hintergrund, unterschiedliche Analoga in der Zukunft gezielt in der Dermatologie für die Therapie hyperproliferativer Hautkrankheiten einzusetzen, sehr wichtig. In dieser Arbeit werden zwei neusynthetisierte Analoga vorgestellt. C<sub>2</sub>-Cer=S unterscheidet sich von C<sub>2</sub>-Cer=O nur durch die Substitution des Sauerstoffatoms in der Amidbindung (Abb.25 A) von einem Schwefelatom. Diese Substitution scheint keinen tiefgreifenden Einfluß auf die biologische Wirksamkeit von C<sub>2</sub>-Cer=O zu haben. Sowohl C<sub>2</sub>-Cer=O als auch C<sub>2</sub>-Cer=S hemmen effektiv das Wachstum von HaCaT-Zellen, wobei IC<sub>50</sub> von C<sub>2</sub>-Cer=O bei 20 µg/ml und bei C<sub>2</sub>-Cer=S bei 10 µg/ml liegt. Die Struktur von FS-5 (siehe Abb.21) weicht stärker von C<sub>2</sub>-Cer=O ab. Neben der fehlenden Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C 4 und C5 (Abb.25 D) des Sphingosinrückgrates ist die primäre Hydroxylgruppe an C-Atom 1 (Abb.25 B) durch eine Ethylgruppe ersetzt. Außerdem ist statt der Acetylgruppe eine langkettige Fettsäure an die Amidgruppe angehängt. Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß die Doppelbindung zwischen C4 und C5 essentiell für die biologische Wirksamkeit von Ceramid ist (Bielawska et al., 1993). Deshalb wird, wenn die Wirkung von Ceramid auf einen bestimmten Zelltyp untersucht wird, Dihydroceramid meistens als Negativkontrolle neben Ceramid eingesetzt. FS-5 ist in der Tat ein schwächerer Agonist der Proliferationshemmung. Bei einer Konzentration von 40 µg/ml hemmt es die Proliferation nur um ca. 30 %. Auch beim Auslösen der Apoptose ist es im Gegensatz zu den beiden anderen Analoga schwächer. Trotzdem war die gemessene Apoptoserate signifikant über dem Kontrollwert. Ein weiterer Grund für die niedrige Wirksamkeit von FS-5 könnte die im Gegensatz zu einer OH-Gruppe voluminöse Ethylgruppe an C1 sein. Sie könnte die effektive Wechselwirkung von FS-5 mit den Zielmolekülen von Ceramid behindern. Eine mögliche Erklärung für die trotzdem meßbare Wirksamkeit von FS-5 wäre, daß FS-5 in der Zelle weiter metabolisiert und eine Doppelbindung eingeführt wird. Um herauszufinden, ob nur die fehlende Doppelbindung oder die veränderte Hydroxylgruppe für die geringere Wirksamkeit von FS-5 gegenüber C<sub>2</sub>-Cer=O verantwortlich ist, könnte man FS-5 mit einer Doppelbindung synthetisieren und in Keratinozyten untersuchen. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß verschiedene Dihydroosphingolipide wie C<sub>6</sub>-NBD-Dihydroceramid und Dihydroosphingomyelin Substrate für die Desaturase(n) sind, die die Doppelbindung zwischen

C4 und C5 einführt (Kok et al., 1997; Michel et al., 1997). Auch C<sub>2</sub>-Dihydroceramid (*N*-Acetyldihydrosphingosin) ist in HaCaT-Zellen nicht völlig unwirksam. Es leitet ebenfalls die Apoptose und die Proliferationshemmung ein, jedoch im Vergleich zu C<sub>2</sub>-Cer=O in einem geringeren Ausmaß (A. Stooss, persönliche Mitteilung). Aus diesen Ergebnissen ist anzunehmen, daß die minimale effektive Struktur für Ceramid-ähnliche Substanzen eine Amidgebundene Fettsäure und die sekundäre Alkoholgruppe ist .



**Abb.25. Struktur von *N*-Acetylsphingosin.**

1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und seine Analoga stellen eine Gruppe potentieller Therapieformen für hyperproliferative Erkrankungen dar, da sie nicht nur in Keratinozyten Wachstumshemmung und Apoptose auslösen, sondern auch in Brustkrebs- bzw. anderen Krebszelllinien (Fioravanti et al., 1998; Fife et al., 1997). In der Dermatologie werden Tacalcitol (Curatoderm®) und Calcipotriol (Psorcutan®) für die Behandlung der hyperproliferativen Hautkrankheit Psoriasis vulgaris eingesetzt. Psoriasis ist eine unheilbare chronisch-rezidivierende, entzündliche Erkrankung der Haut, von der ca. 2 % der europäischen Bevölkerung betroffen ist (Stern, 1997). Es gibt verschiedene Formen der Psoriasis, die sich im Grad und Ausprägung der Erkrankung unterscheiden. Die Psoriasis ist charakterisiert durch eine dermale Entzündungsreaktion, eine epidermale Hyperproliferation und eine gestörte Differenzierung der Epidermis. Die Haut ist gerötet, plaqueartig verdickt und es finden sich silbrig glänzende Schuppen. Die normale Entwicklung einer Basalzelle zu einer Hornzelle dauert etwa 28 Tage. In der psoriatischen Haut ist dieser Prozeß auf 3 bis 5 Tage verkürzt, so daß die basale Zelle schneller an die Hautoberfläche gelangt und die Umwandlung zur Hornzelle nicht ganz abgeschlossen ist. Das heißt auch, daß eine große Population von Keratinozyten sich in der Proliferationsphase befindet und die Keratinozyten nicht genügend ausdifferenziert sind. Es gibt viele Therapieformen wie UV-Strahlentherapie, Kortikosteroide, Anthralin, Retinoide und Cyclosporin A, die jedoch bei Langzeit-Therapien von Nebenwirkungen begleitet werden. Vitamin D-Analoga (Calcipotriol und Tacalcitol) alleine werden meistens in leichteren Psoriasis-Fällen und bei schweren Fällen in Kombinationstherapie verabreicht und haben bis auf Hautirritationen relativ geringe Nebeneffekte. Obwohl deren Einfluß auf den Calcium-metabolismus im Vergleich zu 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> geringer ist, begrenzen trotzdem die Nebeneffekte wie Hypercalcämie und Hypercalcurie die Therapie. Deswegen besteht das

Interesse darin neue hochantiproliferativ wirksame Vitamin D-Analoga zu finden, deren Effekte auf die Proliferation und Differenzierung abgekoppelt von den Effekten auf die Calcium-Homöostase ist. Die sich noch in der vorklinischen Testphase befindenden Analoga GS 1500 und EB 1213 müssen noch auf ihre Effekte auf den Calcium-Haushalt getestet werden. Sie stellen vielversprechende Kandidaten für neue Medikamente dar, da sie nicht nur das Wachstum der Keratinozyten deutlich hemmen, sondern auch Apoptose auslösen können. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist zu vermuten, daß die Sphingomyelin-Hydrolyse, die höchstwahrscheinlich in den Sphingomyelin-Zyklus mündet, einen wichtigen Signaltransduktionsweg in humanen Keratinozyten darstellt, über den  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  und seine Analoga zumindest einen Teil ihrer Wirkungen entfalten. Um den genauen Ablauf des Sphingomyelin-Zyklus verstehen zu können, müßten auch in Keratinozyten die direkten Zielmoleküle von Ceramid entdeckt werden. Für Calcipotriol ist es beschrieben, daß es das Retinoblastomgenprodukt (Rb) dephosphorylieren kann, welches dann zum Zellzyklusarrest führt (Kobayashi et al., 1995). Die Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase (CAPP), als ein direktes Zielmolekül von Ceramid beschrieben, wird mit Apoptose und Zellwachstumshemmung in Verbindung gebracht (Wolff et al., 1994). Wahrscheinlich werden die Effekte von Ceramid in Keratinozyten eher von CAPP vermittelt als von Ceramid-aktivierte Proteinkinase (CAPK), die öfters in Zusammenhang mit mitogenen Prozessen genannt wird (Zhang et al., 1997).

Apoptose ist höchstwahrscheinlich eine der Mechanismen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielt. Psoriatische Keratinozyten sind resistenter gegenüber apoptotischen Signalen als normale Keratinozyten. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß die psoriatischen Keratinozyten das anti-apoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren und daher vor Apoptose geschützt sind (Wrone-Smith et al., 1997). Proteine der Bcl-2-Familie werden auch mit der terminalen Differenzierung in Verbindung gebracht. Mitra und Mitarbeiter vermuten, daß basale Keratinozyten durch Expression von Bcl-x<sub>L</sub> vor Apoptose geschützt sind und auf dem Weg der Differenzierung dieses Protein herunter- und das pro-apoptotische Protein Bax hochreguliert wird (Mitra et al., 1997).

Wir konnten zeigen, daß TNF $\alpha$  Apoptose in Keratinozyten auslösen kann. TNF $\alpha$  fördert auch die Differenzierung der Keratinozyten. Die Arbeitsgruppe um Bikle hat gezeigt, daß TNF $\alpha$  die  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  Produktion in humanen Keratinozyten reguliert (Bikle et al., 1991). Von  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  ist es bekannt, daß seine Produktion in Keratinozyten mit deren Differenzierungsgrad sich verändert. In proliferativen Zellschichten bzw. in präkonfluenten Keratinozytenkulturen steigt die Produktion an, die maximal ist in Zellen, die kurz vor der Bildung der verhornten Proteinhülle (*cornified envelopes*) sind bzw. in konfluenten Keratinozytenkulturen. Danach sinkt die Produktion. Das stimmt mit der Fähigkeit von TNF $\alpha$  überein die initiale und terminale Differenzierung zu beschleunigen, in dem es die Produktion von  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  zuerst hochreguliert und nach der terminalen Differenzierung inhibiert. Dies entspricht auch unseren Ergebnissen, mit denen wir zeigten, daß die TNF $\alpha$ -Produktion der

Keratinocyten von der Konfluenz der Keratinocytenkultur abhängig ist. Mit zunehmender Dichte der Keratinocytenkultur nimmt die  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA ab. In postkonfluenten Kulturen stimuliert es neben der Hemmung der  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -Produktion die Transglutaminase-Aktivität und die Bildung der verhornten Proteinhülle. Wir wiederum konnten zeigen, daß  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  die Expression von  $\text{TNF}\alpha$  steigert. Vermutlich wird die terminale Differenzierung effektiv durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus von  $\text{TNF}\alpha$ - und  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -Produktion eingeleitet und gefördert. Ein ähnlicher autokriner Mechanismus wurde in Keratinocyten auch für  $\text{TGF}\alpha$  (*transforming growth factor*) beschrieben.  $\text{TGF}\alpha$  bewirkt Wachstum und Proliferation von Keratinocyten über die Bindung an den Rezeptor für EGF (Massagué, 1990). Der EGF-Rezeptor kommt in der Epidermis hauptsächlich in der basalen Keratinocyten-schicht vor. Die Expression von  $\text{TGF}\alpha$  wird von  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  moduliert (Wu et al., 1996).  $\text{TGF}\alpha$  könnte das zelluläre Gegenstück zu  $\text{TNF}\alpha$  bilden, da  $\text{TGF}\alpha$  die von  $\text{TNF}\alpha$  ausgelöste Apoptose verhindert (Reinartz et al., 1996). In der psoriatischen Epidermis wurde die Überexpression von  $\text{TGF}\alpha$  nachgewiesen. Auch war der EGF-Rezeptor in allen Keratinocyten-schichten exprimiert (Nickoloff et al., 1989). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Takematsu und Mitarbeitern, die beschreiben, daß  $\text{TNF}\alpha$  bei der systemischen Behandlung von schweren Psoriasisformen zum Teil sehr erfolgreich war (Takematsu et al., 1991). Es stellt sich natürlich die Frage, wie Vitamin  $\text{D}_3$  die Genexpression von proliferations- und apoptosefördernden Proteinen modulieren bzw. koordinieren kann. Man könnte die Beeinflussung unterschiedlicher biologischer Effekte von Vitamin  $\text{D}_3$  auf die komplexe Natur der Transkriptionsaktivität des Vitamin D-Rezeptors zurückführen. Es erkennt nicht nur verschiedene VDRE-Typen (*vitamin D<sub>3</sub> response element*), sondern kann sich neben dem Rezeptor für Retinsäure (RXR) auch mit anderen Transkriptionsfaktoren heterodimerisieren, was wiederum zu einer Vielfalt von möglichen Erkennungssequenzen führt. Es wurde bereits in der Einleitung erwähnt, daß für Vitamin  $\text{D}_3$  einfache und komplexe VDREs gibt. Komplexe VDREs bestehen aus mehreren Erkennungssequenzen, von denen einige mit den Erkennungssequenzen anderer Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel AP-1 überlappen (Carlberg und Polly, 1998). Die Rolle von AP-1 bei der Regulation der epidermalen Genexpression wird diskutiert (Eckert und Welter, 1996). Das könnte heißen, daß der Zugang zu diesen komplexen VDREs in bestimmten Zellstadien durch andere Transkriptionsfaktoren blockiert ist oder auch umgekehrt, andere Transkriptionsfaktoren könnten den Rezeptor von Vitamin  $\text{D}_3$  blockieren. Damit könnte man auch begründen, daß Vitamin  $\text{D}_3$  in anderen Zellpopulationen wie zum Beispiel in HL-60, die Zelle eher vor Apoptose schützt als sie einzuleiten (Kleuser et al., 1998). Obwohl Vitamin  $\text{D}_3$  in HL-60 die Sphingomyelin-Hydrolyse und den anschließenden Ceramidanstieg bewirkt, löst das entstehende Ceramid keine Apoptose aus, da Vitamin  $\text{D}_3$  gleichzeitig die Sphingosin-Kinase aktiviert. Sphingosin-Kinase führt zur Bildung von Sphingosin-1-Phosphat, das bekanntlich die gegenteiligen Effekte von Ceramid verursacht.

Es ist weiterhin bekannt, daß  $\text{TNF}\alpha$  die Ceramidkonzentration durch Hydrolyse von Sphingomyelin steigert. Wir und andere Arbeitsgruppen konnten die potentielle Rolle von



Ceramid bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten zeigen (Geilen et al., 1996; Jung et al., 1998). Vieles deutet darauf hin, daß die Sphingomyelin-Hydrolyse ein physiologisch wichtiger Signaltransduktionsweg bei der Regulation des Wachstums und Differenzierung von Keratinozyten darstellt.

Eine neue Wirkstoffgruppe gegen hyperproliferative Hautkrankheiten könnten Ceramid-Analoga bilden, mit denen man die Nebeneffekte von Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga auf den Calciummetabolismus umgehen würde. Mit den in der vorliegenden Arbeit getesteten neuartigen synthetischen Analoga hätte man zwei Klassen von Substanzen, die sich in der Stärke ihrer Wirkung auf Wachstum und Apoptose unterscheiden.