

Frau PD Dr. med. P. Welker Aus dem Centrum für Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Regulation der Freisetzung von SCF aus proliferierenden versus
differenzierenden Keratinozyten/HaCaT**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Kors

aus Düren

Gutachter: 1. Frau PD Dr. med. P. Welker

2. Frau PD Dr. med. K. Hartmann

3. Herr PD Dr. med. B. Gibbs

Datum der Promotion: 05.07.2006.....

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AhR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
AMV	Affen-Myeloblastosis-Virus
BCC	Basalzellkarzinom
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
CSF	Colony Stimulating Factor
CYP26	Cytochrom P 26
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dT	Desoxy Thymidin
DT	Desoxy-Thymidin
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	Epidermal Growth Factor
F _c	Fragment crystallizable
FCS	Fötales Kälberserum
Fc _ε RI	Fc-Rezeptor für IgG
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GCR / GR	Glukokortikoidrezeptoren
GCSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Colony Stimulating Factor
GRE	Glucocorticoid-response elements
HaCaT	Humane adulte Haut-Keratinozyten, niedriges

	Kalziummilieu, erhöhte Temperatur
HLGF	Hemolymphopoietic Growth Factor
HPV	Humane Papilloma Viren
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Keratin
kDa	Kilo-Dalton
KGf	Keratinocyte Growth Factor
KL	Kit-Ligand
LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Anti-Leukotrien D4
MC	Mastzellen
MGF	Mast Cell Growth Factor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mSCF	membrane-bound Stem Cell Factor
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NGF	Nerve Growth Factor
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion/Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PGE	Prostaglandin
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptoren (all-trans)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RXR	Retinsäurerezeptoren (cis-trans)
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCF	Stem Cell Factor / Stammzellfaktor
SCGF	Stem Cell Growth Factor
SLF	Steel Factor
sSCF	soluble Stem Cell Factor

SV40	Simian Virus 40
Taq	Thermophilus aquaticus
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TP53	Tumor Suppressor Gen 53
UV	Ultra-Violett
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor
VPF	Vascular permeability factor

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	3
Publikationen	9
1. Einleitung	10
1.1 Keratinozyten	10
1.1.1 Vorkommen von Keratinozyten	10
1.1.2 Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten	10
1.1.3 Zytokine / Zelltypen und deren Funktion	11
1.2 HaCaT-Zellen	12
1.2.1 Herkunft und Wachstum der HaCaT-Zelllinie	12
1.2.2 Eigenschaften der HaCaT-Zellen	13
1.2.3 HaCaT-Zellen und Retinoide	14
1.2.4 HaCaT-Zellen und Glukokortikoide	14
1.3 Differenzierungsmarker Keratin 5 (K5)	15
1.4 Involukrin	15
1.4.1 Vorkommen und Eigenschaften	15
1.4.2 Wirkung auf Keratinozyten	16
1.5 Stem Cell Factor (SCF)	18
1.5.1 SCF und seine Herkunft	18
1.5.2 Wirkung und Funktion von SCF	19
1.5.3 SCF und Pathologie	19
1.6 Die Mastzelle	20
1.6.1 Herkunft und Heterogenität	20
1.6.2 Reifung, Adhäsion, Aktivierung und Mediatorfreisetzung der Mastzelle	21
1.6.3 Mediatoren und biologische Funktionen der Mastzelle	21
1.6.4 Pathophysiologie der Mastzelle	22
1.6.5 SCF und Mastzellen	24
1.7 Der Melanozyt	25
1.8 Glukokortikoide	25
1.8.1 Physiologie und Pathophysiologie von Glukokortikoiden (Dexamethason)	26
1.8.2 Rezeptoren von Glukokortikoiden	26
1.9 Retinoide / All-Trans-Retinsäure (RA)	27
1.9.1 Vorkommen von Retinoiden	27

1.9.2	Rezeptoren der Retinoide	27
1.9.3	Physiologie / Pathophysiologie der Retinoide	28
1.10	Zielsetzung der Untersuchungen.....	29
2.	Methoden	31
2.1	Chemikalien- und Geräteliste	31
2.1.1	Chemikalien-/Geräteliste und Zubehör der Zellkultur	31
2.1.2	Geräteliste und Zubehör des verwendeten ELISA	33
2.1.3	Chemikalien- und Geräteliste der Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	33
2.2	Zellkultivierung	35
2.2.1	Kultivierung der Zelllinie HaCaT	35
2.2.2	ELISA	36
2.2.3	Messenger Ribonukleinsäure / Copy Desoxyribonukleinsäure	37
2.2.4	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion	37
2.3	Statistik.....	39
3.	Resultate	41
3.1	Zellkultur der HaCaT-Zellen	41
3.1.1	Zellwachstum der HaCaT-Zellen (Charakterisierung der Differenzierung durch Keratin 5 und Involukrin).....	41
3.2	Inkubation der HaCaT-Zellen mit All-Trans-Retinsäure (RA)	42
3.2.1	Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA für 24 Stunden	42
3.2.1.1	Zellwachstum der HaCaT-Zellen	42
3.2.1.2	SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)	44
3.2.1.3	SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf mRNA-Ebene (PCR).....	45
3.2.2	Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA für 11 Tage	45
3.2.2.1	Zellwachstum der HaCaT-Zellen	45
3.2.2.2	Gesamt-SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf mRNA-Ebene (PCR)	47
3.3	Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason.....	48
3.3.1	Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason für 24 Stunden	48
3.3.1.1	Zellwachstum der HaCaT-Zellen	48
3.3.1.2	SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)	49
3.3.1.3	SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf mRNA-Ebene (PCR).....	50
3.3.2	Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason für 11 Tage	51

3.3.2.1	Zellwachstum der HaCaT-Zellen	51
3.3.2.2	SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)	52
3.4	Bestimmung des Differenzierungsmarkers Keratin 5 (K5) auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR	54
3.4.1	Differenzierungsmarker Keratin 5 (K5)	54
3.5	Auftrennung in Gesamt-SCF und SCF-Splicevarianten	55
3.5.1	Gesamt-SCF (SCF 3'5')	55
3.5.2	sSCF/mSCF	56
3.5.2.1	Produktion von sSCF/mSCF nach Inkubation mit RA über 11 Tage	56
3.5.2.2	Produktion von sSCF/mSCF nach Inkubation mit Dexamethason über 24 h	56
3.6	All-Trans-Retinsäure Rezeptoren (RAR)	57
3.6.1	RAR- α	57
3.6.2	RAR- β	58
3.6.3	RAR- γ	59
3.7	Glukokortikoid-Rezeptoren (GR)	60
3.7.1	GR- α	60
3.7.2	GR- β	61
4.	Diskussion	63
4.1	Zellwachstum der HaCaT-Zellen	63
4.1.1	Charakterisierung der Differenzierung der HaCaT-Zellen durch K5	65
4.2	Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA.....	65
4.3	Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason.....	67
4.4	Produktion von sSCF/mSCF	68
4.5	Expression von RAR-Rezeptoren.....	69
4.6	Expression von GR-Rezeptoren.....	71
4.7	Fazit	71
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Danksagung	82
8.	Erklärung	83

Publikationen

J. Grabbe, C. Kors, et al.:

Regulation of SCF expression in human keratinocytes by retinoic acid and dexamethasone. *Archives of Dermatological Research*, 403, Vol. 290 Nr. 1/2 (1998)

U. Trefzer, C. Kors, et al.:

Preliminary Results of a Phase I Trial of Intralesional Injection of CpG DNA in Basal Cell Carcinoma and Melanoma. 2001, *Meeting Coley Pharmaceutical GmbH*

C. Kors, A. Milling, et al.:

Interferon- α 2b Induced Grand-mal Seizure. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, accepted, IF 1.368

U. Trefzer, C. Kors, et al.:

Unmasking of Mixed Connective Tissue Disease by Adjuvant IFN alpha Therapy for Melanoma. *Int J Dermatol*, accepted, IF 0.736

A. Milling, M. Hofmann, C. Kors, C. Voit, W. Sterry, U. Trefzer:

Palliative Cisplatin/Carboplatin Chemotherapie bei Melanompatienten im Stadium IV. *Poster/Abstract 75. Tagung Norddeutsche Dermatologische Gesellschaft, 06.-08.09.2002*

1. Einleitung

Da sich die folgende Arbeit mit der Beeinflussung der Stammzellefaktor (SCF)-Produktion aus Keratinozyten durch Vitamin A Derivate (Retinoide) und Glukokortikoide beschäftigt, soll der Leser zunächst mit Grundlagen der Keratinozytenbiologie und Pathologie vertraut gemacht werden. Ferner sollen die zwei in der Haut residierenden und aufgrund ihrer selektiven Rezeptorbestückung wesentlich durch SCF regulierten Zelltypen, Melanozyten und Mastzellen, kurz vorgestellt werden. Schließlich soll auf für die vorliegenden Untersuchungen relevanten Aspekte der Biologie von Retinoiden und Glukokortikosteroiden eingegangen werden.

1.1 Keratinozyten

1.1.1 Vorkommen von Keratinozyten

Die menschliche Haut ist aus 3 Schichten aufgebaut: Die Epidermis, die Dermis und die Subkutis. Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, die restlichen 10% der Zellen sind mit den Keratinozyten physiologisch eng verbunden, so z. B. Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen (*Fritsch 2004*). Die verschiedenen Zelltypen weisen ein unterschiedliches Verteilungsmuster in den einzelnen Schichten der Epidermis auf. Im Falle der Keratinozyten ist dies mit einem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der einzelnen Zellen assoziiert.

1.1.2 Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten

Keratinozyten durchlaufen auf ihrem Weg von der Basalschicht zum Stratum corneum der Epidermis an der Hautoberfläche verschiedene Differenzierungsstufen, die mit einer Änderung ihrer Morphologie und ihrer Physiologie einhergehen. Die komplette Differenzierung dauert bei humanen Keratinozyten ca. 28 Tage. Es kommt dabei zu einer Größenzunahme und zu einer Abflachung der Keratinozyten, sowie zu einer Änderung ihres Metabolismus. Weiterhin werden zu Beginn der Differenzierung neue Zellorganellen eingefügt und diese teils neu angeordnet. Bei der weiteren Differenzierung der Keratinozyten kommt es in einer späten Phase zum Übergang von granulierten zu verhornenden Zellen, zum Verlust sämtlicher Organellen bei

gleichzeitiger Akkumulation von Keratinen innerhalb der Zelle, so dass die komplett keratinisierte Zelle nur noch 45 bis 86% des ursprünglichen Trockengewichtes hat.

Im Stratum basale finden intensive Interaktionen der Keratinozyten mit dem Mesenchym statt, das für die Zufuhr von lebenswichtigen Stoffen sorgt und zugleich für die Kontrolle von Wachstum und Funktion der epidermalen Zellen (*Olsen et al., 1995*). Dabei spielen eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokine eine Rolle, die sowohl von Basalzellen als auch von Zellen des Mesenchyms (Dermis) gebildet werden.

Wichtigste Produkte der Keratinozyten im Laufe ihrer Differenzierung sind Keratine (oder auch Keratinfilamente), darunter die Keratine I und II, die in saure (Keratin I) und basisch-neutrale Keratine (Keratin II) unterteilt werden. Man unterscheidet Keratine in Abhängigkeit von ihrer elektrischen Ladung, ihrer Immunreaktivität und ihren Sequenzhomologien mit den Wollkeratinen I und II. Keratinfilamente (=Zytokeratine) sind analoge Polypeptide. Die oben erwähnten Untergruppen I und II sind Dimere, die sich zu Tetrameren zusammenlagern. Durch Elongation dieser Tetramere entstehen dann die eigentlichen Keratinfilamente (*Fritsch 2004*). Die Keratine 5 und 14 (K5 und K14) sind wichtige Differenzierungsmarker der Basalzellschicht bzw. des Stratum spinosum der Epidermis (s.u.).

1.1.3 Zytokine / Zelltypen und deren Funktion

Keratinozyten produzieren diverse Zytokine, die sowohl proinflammatorische, immunmodulierende und wachstumsfördernde Funktionen haben (Tab. 1). Der Transforming Growth Factor α (TGF- α), der auch von Keratinozyten produziert wird, fördert ebenso wie der von Fibroblasten produzierte Epidermal Growth Factor (EGF) die Proliferation der Keratinozyten. TGF- β hingegen fördert primär die Differenzierung und kann selbst durch Kalzium stimuliert werden.

Tabelle 1: Einige wichtige entzündungsfördernde, immunmodulatorische und wachstumsmodulierende Zytokine, produziert durch Keratinozyten (*Chu AC, Morris JF: The Keratinocyte. In: Skin Immune System (SIS), Bos JD ed., CRC Press, Boca Raton, New York, 2nd ed., 1997, pp. 43-57*)

IL-1 α	TNF- α
IL-1 β	GM-SCF
IL-6	TGF- α
IL-7	TGF- β
IL-8	FGF
IL-10	PDGF
IL-12	SCF
IL-1ra	NGF
α -MSH	VEGF

1.2 HaCaT-Zellen

1.2.1 Herkunft und Wachstum der HaCaT-Zelllinie

Die HaCaT-Zelllinie entstammt gesunder Haut eines männlichen Patienten. Bei dem Patienten wurde aufgrund eines Melanoms eine Nachoperation („Sicherheitsabstand“) durchgeführt. Aus diesem Präparat wurde nach histologisch gesicherter Benignität die HaCaT-Zelllinie etabliert (*Boukamp P 1988*). Die aus humanen, nicht malignen Keratinozyten (= Normalhaut) gewonnene Zelllinie HaCaT (spontan immortalisiert) unterliegt einem festen Wachstumszyklus (*Wanner et al., 1999*). Dabei wird eine konstante Zellteilung nach 7 Tagen erreicht. Dies bestätigte sich in unseren Nachweisen (s. Abb. 1).

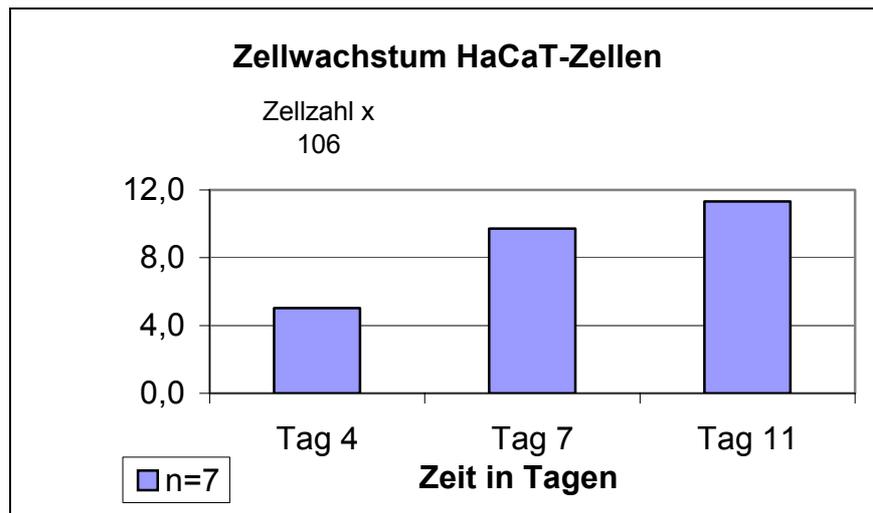


Abb. 1: Wachstumskurve von HaCaT-Zellen (eigene Ergebnisse)

HaCaT-Zellen dienen als gutes Modell für humane Keratinozyten (*Boukamp P 1988*) (*Ryle CM 1989*). Im Gegensatz zu normalen Keratinozyten wachsen die HaCaT-Zellen in konventioneller Kultur, d. h. ohne organotypische Co-Kulturbedingungen mit z. B. Fibroblasten.

1.2.2 Eigenschaften der HaCaT-Zellen

Besonders die stark erhaltene Fähigkeit zur Differenzierung bietet die HaCaT-Zelllinie für Untersuchungen des Einflusses von z. B. Zytokinen auf die Differenzierung an (*Schoop VM 1999*). HaCaT-Zellen weisen im wesentlichen die Eigenschaften von basalen epidermalen Keratinozyten auf (*Boukamp P 1988*). Phänotypisch verhalten sich HaCaT-Zellen wie normale Keratinozyten (in Kultur), was Wachstum und Differenzierung anbelangt (*Boukamp P 1988*). Bei Transplantation auf Nacktmäuse oder bei Kultur mit humanen Fibroblasten bilden HaCaT-Zellen eine nahezu normale Epidermis, deren Architektur der von adulten humanen Keratinozyten gleich ist (*Schoop VM 1999*). Im Unterschied zu humanen Keratinozyten beträgt die Bildung einer solchen Epidermis *in vitro* aber nicht 6 Tage, sondern dauert zwischen 2 und 3 Wochen. HaCaT-Zellen sind frei von Simian Virus 40 (SV 40) und frei von onkogenen Typen der Humanen Papillom-Viren (HPV). Diese sind normalerweise bei Immortalisierung von Zellen nachzuweisen. Weiterhin tragen HaCaT-Zellen typischerweise durch UV-Licht induzierte Mutationen auf beiden Allelen von TP53 (*Lehman, Modali et al. 1993*), wie sie

bei vielen Formen von Hautkarzinomen (z. B. Basalzellkarzinomen (BCC) und Plattenepithelkarzinomen (SCC)) und prämaligen Hautveränderungen (z.B. aktinische Keratosen) gefunden werden (*Ziegler, Leffell et al. 1993*) (*Ziegler, Jonason et al. 1994*). Boukamp et al. konnten zeigen, dass HaCaT-Zellen selbst bei sehr hohen Passagezahlen (>300) zwar zahlreiche Translokationen und Deletionen aufweisen (*Boukamp, Popp et al. 1997*), dass aber keine maligne Transformation zu beobachten ist (in vitro und in vivo).

Eine Rolle bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung bei HaCaT-Zellen spielt u. a. das alpha-5-Integrin ($\alpha 5$ -Integrin) (*Pivarcsi, Szell et al. 2001*). Die Keratine K4 und K13 korrelieren mit der Stratifizierung der HaCaT-Zellen, während für K1 und K10 diesbezüglich keine Korrelation gezeigt werden konnte (*Breitkreutz, Stark et al. 1993*).

1.2.3 HaCaT-Zellen und Retinoide

HaCaT-Zellen besitzen verschiedene Retinsäure(RA)-Rezeptoren, so werden RAR-alpha, -beta, -gamma und RXR-alpha exprimiert. Im Gegensatz dazu werden von humanen Keratinozyten die Rezeptoren RAR-alpha, -gamma und RXR-alpha exprimiert (*Törmä H 1999*). Über diese Rezeptoren sind HaCaT-Zellen dazu befähigt, Retinsäure zu metabolisieren; so ist die Aufnahme und Metabolisierung radioaktiven Retinols zu 3,4-Didehydro-Retinol, Retinsäure (RA) und Didehydro-Retinsäure möglich (*Törmä H 1999*).

Die Differenzierungsmarker K1 und K10 werden unter physiologischen Retinsäurekonzentrationen von HaCaT-Zellen weiterhin unverändert produziert (*Törma et al., 1999*).

1.2.4 HaCaT-Zellen und Glukokortikoide

Serres et al. konnten zeigen, dass die Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) von der Mehrheit frisch isolierter humaner epidermaler Zellen exprimiert werden. Dabei lag die Expressionsrate in basalen Keratinozyten bei mehr als 90%, suprabasale Keratinozyten waren ebenfalls positiv für GR. HaCaT Zellen exprimierten GR in ähnlicher Höhe wie frisch isolierte basale Keratinozyten. Mit zunehmender Differenzierung (Str. granulosum) der Zellen konnte GR allerdings kaum noch nachgewiesen werden (*Serres*

et al., 1996). Diese vermehrte Expression von GR in proliferierenden versus differenzierenden Zellen konnte auch in vivo mittels Gefrierbiopsien von normaler humaner Haut bestätigt werden.

1.3 Differenzierungsmarker Keratin 5 (K5)

Keratine sind Gewebe- und Zelltyp-spezifische Bestandteile von epithelialen Intermediärfilamenten (*Wanner et al., 1993*). Im humanen Organismus sind mehr als 20 verschiedene Keratine bekannt (*Moll, Franke et al. 1982*) (*Fuchs 1988*). Man unterscheidet die sog. sauren Typ-I Keratine (K9 – K19) von den neutral-basischen Typ-II Keratinen (K1 – K8).

Keratin 5 ist ein basisches Keratin der basalen Epidermis und weist ein Molekulargewicht von 60 kDa auf. Es dient als Differenzierungsmarker u.a. für humane Keratinozyten. Mit zunehmender Differenzierung nimmt der Gehalt an K5 ab. Dies ist u.a. auf den Ersatz des Keratinpaares K5 / K14 durch das Paar K1 / K10 mit fortschreitender Differenzierung zurückzuführen (*Steinert et al., 1993*). K5 konnte in HaCaT-Zellen deutlich nachgewiesen werden (*Boukamp P 1988*). Wir haben in unseren Untersuchungen deswegen Keratin 5 unter den verschiedenen Bedingungen (Inkubation von HaCaT-Zellen mit RA und Dexamethason für jeweils 24 Stunden bzw. 12 Tage) auf mRNA-Ebene bestimmt.

1.4 Involukrin

1.4.1 Vorkommen und Eigenschaften

Involukrin ist ein zystinreiches unlösliches Protein (*Fritsch 2004*) mit einem Molekulargewicht von ca. 70 bis 80 kDa. Kodiert wird es, wie auch die Keratine, auf dem Chromosom I. Das zentrale Segment der kodierenden Region enthält 39 Wiederholungen einer aus 30 Nukleotiden bestehenden Sequenz (*Eckert and Green 1986*). Diese Sequenz wird durch 10 Aminosäuren kodiert, davon 3 Glutamine und 2 Glutaminsäuren. Zusammen mit den Keratinen (und u.a. Profilaggrin, Loricrin) bildet es die Struktur der Hornzellen.

Involukrin ist nicht spezifisch für die Epidermis und kommt generell in mehrschichtigem Epithel und verhornten bzw. verhornenden Zellen vor. Es wird im Zytoplasma der

Stachelzellen (Str. spinosum) produziert. Basalzellen der Epidermis produzieren sehr geringe Mengen an Involukrin. Während des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten und damit dem „Wandern“ in höhere Schichten erfolgt eine immer stärkere Expression von Involukrin auf Proteinebene (*Younus J 1992*).

1.4.2 Wirkung auf Keratinozyten

Involukrin spielt eine bedeutende Rolle für den Differenzierungsprozess der Keratinozyten. Nach Freisetzung aus dem Zytoplasma der Stachelzellen lagert sich das Involukrin am Übergang des Str. granulosum zum Str. corneum an die Innenseite der Zellmembran an und wird dort durch eine kalziumabhängige membrangebundene Transglutaminase (spezifisch für Keratinozyten) quervernetzt. Diese Quervernetzung führt zu hoher Rigidität der Hornzellen mit Ausbildung eines unlöslichen Zellverbandes, der resistent ist gegen Denaturierung und den Einfluss von Chemikalien.

Kalzium selbst erhöht die Involukrin Promoter Aktivität und die endogene Involukrin Gen-Expression (*Deucher, Efimova et al. 2002*).

Laut Watt und Green (*Watt and Green 1981*) korreliert die Involukrinsynthese mit der Zellgrösse von Keratinozyten in vitro und in vivo. Bei in Kultur befindlichen Keratinozyten konnten sie zeigen, dass erst ab einer durchschnittlichen Grösse der Keratinozyten von etwa 14 Mikrometer Involukrin nachweisbar ist. Ab dieser Grösse beginnt in Keratinozyten die für Involukrin spezifische mRNA zu akkumulieren und die entsprechende Proteinsynthese. Involukrin wird mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten vermehrt exprimiert (s. Abb. 2, eigene Daten).

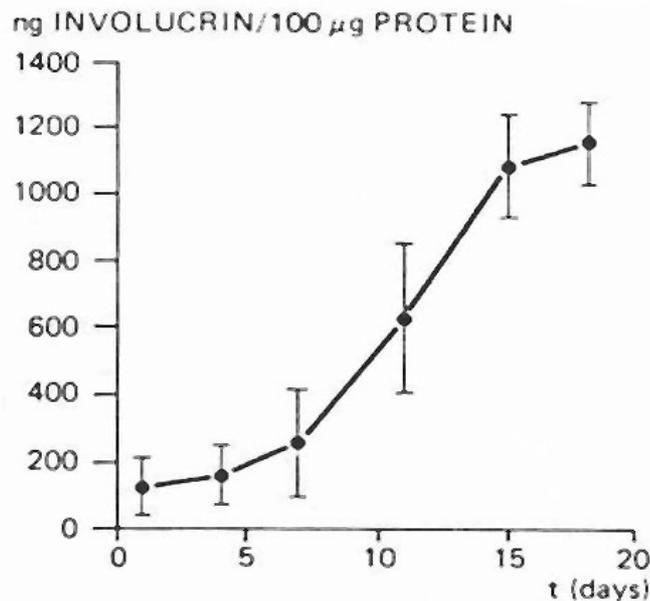


Abb. 2: Zeitabhängige Freisetzung von Involukrin aus normalen, über die Dauer von 20 Tagen kultivierten humanen Keratinozyten

(Aus dem Labor von Prof. Henz, mit freundlicher Erlaubnis).

Ghahary et al. konnten ebenfalls die Bedeutung von Involukrin als Differenzierungsmarker in ihren Versuchen zeigen. Die quantitativ höchste mRNA Expression von Involukrin wurde in späteren Stadien der Zelldifferenzierung von Keratinozyten nachgewiesen (*Ghahary, Marcoux et al. 2001*).

Olsen et al. konnten ebenfalls die vermehrte Freisetzung (11.1-fach) von Involukrin aus (frisch isolierten) humanen Keratinozyten unter ähnlichen Kulturbedingungen wie in diesen Untersuchungen nachweisen (*Olsen, Rasmussen et al. 1995*), ähnlich wie Kehe et al., die in einem Hautmodell (HaCaT-Zellen in Co-Kultur mit Fibroblasten) auch einen entsprechenden Anstieg von Involukrin verzeichnen konnten (*Kehe K 1999*). Dies spricht insgesamt für eine ausreichende Differenzierung der HaCaT-Zellen, um sie als Modell u. a. auch für unsere Untersuchungen zu verwenden.

Durch die Zugabe von Tretinoin zu kultivierten Keratinozyten tritt eine verminderte Expression von verschiedenen terminalen Differenzierungsmarkern auf, u. a. von Involukrin (*Motta, Monti et al. 1998*) (*Tur, Hohl et al. 1995*).

In unseren Versuchen haben wir Involukrin aufgrund obiger Eigenschaften als Differenzierungsmarker eingesetzt. Dabei ist mit zunehmender Differenzierung Involukrin vermehrt nachweisbar.

1.5 Stem Cell Factor (SCF)

1.5.1 SCF und seine Herkunft

Stem Cell Factor (SCF) wurde 1985 erstmals ursprünglich als muriner Leukämie-Antikörper und später dann 1990 von 3 Gruppen als neuer Faktor abstammend von humanen Fibroblasten und Leberzellen beschrieben (*Gadd and Ashman 1985*) (*Copeland, Gilbert et al. 1990*) (*Zsebo, Wypych et al. 1990*) (*Huang, Nocka et al. 1990*). Gebräuchliche Synonyme sind Mast Cell Growth Factor (MGF), Stem Cell Factor (SCF), Steel Factor (SLF) und c-Kit Ligand.

Humanes SCF wird durch ein Gen auf Chromosom 12q22-24 kodiert und besteht aus 248 Aminosäuren, während das SCF der Ratte bzw. Maus (Chromosom 10) nur aus 164 Aminosäuren gebildet wird. SCF wird in erster Linie, aber nicht ausschließlich, durch Stromazellen produziert. Nur wenige Zellen, in der Haut nur Mastzellen und Melanozyten, besitzen einen Rezeptor für SCF, der dem c-Kit, einem Produkt eines Protoonkogens entspricht. Dieser Rezeptor (c-Kit) ist auf dem W-Locus lokalisiert, beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 4, bei Mäusen auf dem Chromosom 5 (*Grabbe, Welker et al. 1994*).

SCF wird von vielen Zellen des menschlichen Körpers produziert, so u.a. von Fibroblasten, Hepatozyten, Keratinozyten, Endothelzellen, Langerhans Zellen, Thymus-Stroma Zellen, Knochenmarkstromazellen, „small cell lung cancer cells“ und Mastzellen. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte auch gezeigt werden, dass Keratinozyten der Zelllinie HaCaT SCF in vitro produzieren (*Grabbe, Welker et al. 1994*) (*Grabbe et al., 1996*).

SCF liegt in zwei Splicevarianten vor, deren Proteine eine lösliche Form, das sSCF (soluble Stem Cell Factor, sSCF, 20-35 kDa), und eine an der Oberfläche von Stromazellen gebundene Form, das mSCF (membrane-bound Stem Cell Factor, mSCF, 37-42 kDa) bilden. Diese beiden Splicevarianten wurden von uns in der vorliegenden Arbeit untersucht und auch quantifiziert. In der normalen menschlichen Haut kommt

SCF hauptsächlich intrazellulär bzw. membrangebunden vor (Ratio mSCF zu sSCF z. B. im Hirn 10:1, im Knochenmark 4:1, im Hoden 0.4:1) (*Broudy 1997*).

Es gibt zwei mRNAs für SCF. Die eine enthält Exon 6, bei der anderen ist Exon 6 durch Splicing herausgeschnitten. Die längere Form enthält dann auf Proteinebene eine Proteaseschnittstelle. Die lösliche Form des SCF kann abgeschnitten werden. Die Form ohne Exon 6 enthält diese nicht. Sie bleibt in der Membran.

1.5.2 Wirkung und Funktion von SCF

Für die Wirkung von SCF ist meist die Kooperation mit anderen Faktoren erforderlich, u.a. deshalb, weil nur wenige Zellen einen Rezeptor für SCF besitzen, so sind z. B. nur 2,1 % der Knochenmarkszellen positiv für c-Kit, im Nabelschnurblut sind es sogar nur 0,7 %. Reife Lymphozyten sind negativ für c-Kit, hier erfolgt die Expression durch B-Zell Vorstufen. Dieser Rezeptor besteht aus einer membrangebundenen Tyrosin-Kinase, die homolog ist für PDGF, CSF-1 und FGF. Bei der Reaktion von c-Kit Ligand mit dem c-Kit Rezeptor kommt es zur einer Phosphorylierung einer 145 kDa Protein-Kinase (bei Melanozyten) und Dimerbildung des Rezeptors, anschl. zur Internalisation des Rezeptor-Ligand-Komplexes (gleicher Reaktionsweg bei IL-3). SCF selber führt zu einer Herab-Regulation des Rezeptors (*Smith, Court et al. 2001*).

Die Funktionen des SCF beinhalten u. a. das Wachstum sowie das Überleben der einzelnen Zielzellen durch eine Inhibierung der Apoptose. In vivo wird außerdem durch eine Prä-Inkubation mit SCF eine erhöhte IgE-vermittelte Histamin- und Serotoninfreisetzung beobachtet. Bei Melanozyten kommt es zu vermehrter Melaninsynthese. Als Protein für sich alleine bewirkt SCF, ähnlich wie IL-3 und IL-4, das Überleben von unreifen Vorläuferzellen. Zudem kommt es durch SCF zur Induktion bzw. Verstärkung von Sekretion, Adhäsion und Migration der Zellen (*Grabbe, Welker et al. 1994*).

1.5.3 SCF und Pathologie

In der Pathologie spielt SCF eine Rolle bei Mastzellvermehrungen im Sinne der reaktiven und idiopathischen Mastozytose. Die idiopathische Mastozytose ist entweder angeboren (15%) bzw. entsteht kurz nach der Geburt im Kindesalter, mit zumeist spontaner Rückbildung bis zur Pubertät, oder tritt spontan im Erwachsenenalter auf. Bei

der Kindheitsform wird eine verstärkte Sekretion von SCF in der Epidermis diskutiert. Unumstritten sind jedoch aktivierende Mutationen im c-Kit bei praktisch allen Formen der Erkrankung von Erwachsenen (*Hartmann and Henz 2001*), die auch den chronischen Verlauf erklären können und die möglicherweise zur malignen Entartung bei einigen Patienten beitragen. Bei reaktiven Mastzellvermehrungen im Rahmen von Entzündungserkrankungen (s. Tab. 2) konnte am Beispiel der Wundheilung eine verstärkte Expression von SCF sowie eine Modulation der c-Kit Expression in Mastzellen und Melanozyten nachgewiesen werden (*Hermes, Feldmann-Boddeker et al. 2000*) (*Hermes, Welker et al. 2001*).

SCF ist auch an der Ätiologie von Pigmentstörungen (z.B. der Piebaldismus als genetisch bedingter Defekt im c-kit-Gen) und der Tumorgenese insbesondere beim malignen Melanom und bei Nävuszellnävi beteiligt, wobei ein Rezeptordefekt in Form verminderter Expression des Rezeptors nachgewiesen wurde (*Dippel, Haas et al. 1995*) (*Welker P 2000*).

1.6 Die Mastzelle

1.6.1 Herkunft und Heterogenität

Die Mastzelle ist eine im menschlichen Körper in allen durchbluteten Geweben ubiquitär vorkommende Zelle und hauptsächlich in der Umgebung von Blutgefäßen und Nerven sowie in der Nähe von Epithelien zu finden. Nach ihrer Entdeckung im Jahre 1878 aufgrund ihrer Färbeeigenschaften (zytoplasmatische Granula färben sich dabei metachromatisch an) durch Paul Ehrlich (*Ehrlich 1877*) (*Metcalf DD 1997*) liegt die Zelle heute im besonderen Interesse u.a. der molekularbiologischen Forschung.

Die Mastzelle ist den basophilen Granulozyten ähnlich, mit Fragment-crystallizable (Fc)-Rezeptoren für Immunglobulin E (IgE) versehen, und sie ist die Schlüsselzelle allergischer Reaktionen (Typ I-Überempfindlichkeitsreaktionen) (*Staines et al., 1994*).

Als Ursprung der Mastzelle gelten pluripotente hämatopoetische Zellen des Knochenmarks (*Metcalf DD 1997*), im Falle von humanen Mastzellen CD34 positive Stammzellen. Im sogenannten WBB6_{F1}-W/W^V Mausmodell (*Kitamura, Go et al. 1978*) (*Metcalf DD 1997*) werden etwa 10 - 68 Vorstufen auf 10⁵ Knochenmarkszellen angenommen (*Metcalf DD 1997*). Durch Proliferation und Differenzierung bilden sich verschiedene Reifungsformen in Abhängigkeit vom jeweiligen Mikromilieu aus. Dabei

spielen diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren, insbesondere SCF, ebenso wie die Adhäsion an Matrixkomponenten eine Rolle (*Metcalfe DD 1997*).

1.6.2 Reifung, Adhäsion, Aktivierung und Mediatorfreisetzung der Mastzelle

Im Mausmodell wurde die pluripotente Stammzelle (Knochenmark) der Mastzelle als nicht granuliert, mit einer Dichte von 1.060 – 1.070 g/ml identifiziert. Es konnten diverse Zytokine identifiziert werden, welche die Mastzellproliferation in verschiedenen Spezies und Organismen auf unterschiedliche Weise induzieren bzw. verstärken: Interleukin (IL)-1 α , IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 und Nerve Growth Factor (NGF) (*Metcalfe DD 1997*). IL-3 im speziellen fördert die Reifung aller hämatopoetischen Zellreihen, die durch Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), GCSF und Interferon (IFN)- γ allerdings blockiert werden kann. Den gleichen Effekt zeigt Transforming Growth Factor (TGF)- β . IL-4 dagegen benötigt für die Reifung der Mastzellen als Kofaktor das IL-3. IL-9 verstärkt in Kombination mit IL-3 die Proliferation von Mastzellen (*Metcalfe DD 1997*). IL-10 wirkt in Kombination mit IL-3 oder IL-4 ähnlich wie IL-9, für sich gesehen hat es keine signifikante Auswirkung weder auf IL-3 abhängige Maus Knochenmarkszellreihen noch auf andere Mastzellvorstufen.

Die Proliferation der Mastzellen ist abhängig von der Fc ϵ RI Aggregation in Anwesenheit von IL-3. Auch nach der Degranulierung bleibt die Fähigkeit zur Proliferation erhalten (*Metcalfe et al., 1997*).

1.6.3 Mediatoren und biologische Funktionen der Mastzelle

Mastzellen phagozytieren, prozessieren Antigene, produzieren Zytokine und setzen vasoaktive Substanzen frei, und damit sind nur einige der biologischen Aktivitäten der Mastzellen genannt. Als neue biologische Funktion der Mastzellen wurde eine protektive Wirkung im Rahmen einer Sepsis beschrieben, dabei kommt es zur Förderung der Homöostase durch eine Limitierung der Toxizität in Assoziation mit einem endogenen Faktor (Endothelin-1) (*Maurer, Wedemeyer et al. 2004*).

Mastzellen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. So produzieren humane Mastzellen bioaktives VEGF (Vascular endothelial Growth Factor) (*Grützkau, Krüger-Krasagakes et al. 1998*).

1.6.4 Pathophysiologie der Mastzelle

Die Funktion der Mastzellen im pathologischen Geschehen ist bisher primär am Beispiel der allergischen Reaktion vom Typ I (Sofortreaktion) weitgehend erforscht worden. Mastzellen stellen die Gewebe-gebundenen Effektorzellen für allergische Reaktionen dar (*Metcalf DD 1997*) (*Artuc, Hermes et al. 1999*). Man nimmt jedoch auch bei anderen pathophysiologischen Vorgängen eine zentrale Rolle der Mastzellen und ihrer Mediatoren bzw. Zytokine an, u.a. bei der allergischen Reaktion vom Typ IV (Reaktion vom Spättyp) (*Henz, Maurer et al. 2001*).

Bei praktisch allen entzündlichen Hauterkrankungen (s. Tab. 2), aber auch bei diversen Tumoren, kommt es zu einer ausgeprägten Mastzellhyperplasie (*Kameyoshi Y 2000*). Pathogenetisch kommt dies durch Mediatoren aus der entzündlichen Läsion bzw. den Tumorzellen zustande, die ein entsprechendes Mikromilieu für das Mastzellwachstum bereiten.

Tabelle 2: Hautkrankheiten, bei denen eine Mastzellvermehrung und / oder Mastzellhyperplasie beobachtet worden ist
(nach Grabbe et al., 1994)

Allergische Kontaktdermatitis
Atopische Dermatitis
Bullöses Pemphigoid
Chronische Ekzeme
Chronische Urtikaria
Chronischer Lichen simplex
Epitheliale Tumoren
Fibrome
Graft-versus-host Reaktion
Granulationsgewebe im Wundheilungsprozess
Hämangiome
Karzinome
Keloide
Lichen planus
Lichen ruber planus
Lichen sclerosus et atrophicus
M. Behcet
Malignes Melanom
Mastozytose
Neurofibrome
Pemphigus vulgaris
Prurigo nodularis
Psoriasis
Sklerodermie
Urtikaria pigmentosa
Vaskulitis

1.6.5 SCF und Mastzellen

Proliferation, Differenzierung von Mastzellen und deren Überleben hängen essentiell von der Interaktion zwischen SCF und seinem Rezeptor ab (*Feger, Ribadeau Dumas et al. 2002*). SCF ist der entscheidende Wachstumsfaktor für Mastzellen. So erfolgt die extramedulläre Reifung der Mastzellen unter dem Einfluss von SCF (und anderen Zytokinen, s.o.).

SCF ist bei einigen Erkrankungen im menschlichen Blut nachweisbar. SCF ist einer der wichtigsten bisher identifizierten Wachstumsfaktoren für Mastzellen; IL-3 dagegen spielt im Gegensatz zum Mausmodell beim Menschen praktisch keine Rolle (*Kameyoshi Y 2000*).

Darüber hinaus konnte noch gezeigt werden, dass der bekannte Hemmeffekt von SCF auf die Apoptose weder durch Dexamethason noch durch Cyclosporin A inhibiert wird, wohl aber durch TGF- β 1 (*Metcalfe DD 1997*).

1.7 Der Melanozyt

Melanozyten sind Bestandteil der unteren Schichten der Epidermis und üben eine wichtige Funktion im Schutz der Haut gegen UV-Licht sowie in der Interaktion mit Keratinozyten aus. In einer funktionellen Melanineinheit coexistieren ca. 36 Keratinozyten mit jedem einzelnen Melanozyten (*Fitzpatrick TB 1999*). Aufgrund von in vitro Beobachtungen geht man davon aus, dass die Keratinozyten lösliche Faktoren produzieren, die für die Proliferation, die Ausbildung von Dendriten und die Melaninsynthese der Melanozyten verantwortlich sind. Zu diesen Faktoren gehören FGF, EGF, Endothelin-1, LTC₄, LTD₄ und SCF (s. auch Tab. 1).

Unter dem Einfluss von SCF kommt es zu einer Einwanderung von Melanozyten in die Haut sowie einer erhöhten Proliferation der Zellen und einer verstärkten Melaninsynthese (in vivo durch Prä-Inkubation mit SCF).

Wegen der räumlichen Nähe und der intensiven Interaktion von Melanozyten und Keratinozyten, die am augenscheinlichsten im dauernd erfolgenden direkten physischen Transfer von Melanin aus Melanozyten zu Keratinozyten erfolgt, gibt es zahlreiche weitere Zell-Zell Interaktionen in diesem Mikromilieu. Dies wird von in vitro erhobenen Befunden unterstrichen, die ein Wachstum isolierter Melanozyten in Anwesenheit von Keratinozyten zeigten (*Morita E 1994*), wobei der mSCF eine Rolle spielen mag.

1.8 Glukokortikoide

Glukokortikoide sind eine von drei Gruppen von Steroidhormonen, die in der Nebennierenrinde (Zona fasciculata und Zona reticularis) gebildet werden. Die wichtigsten natürlichen Glukokortikoide sind Kortisol (Hydrokortison), Kortison und Kortikosteron.

Die Regulation der Glukokortikoide erfolgt vom Hypothalamus aus über das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), welches im Hypophysenvorderlappen die Sekretion vom Adrenokortikotropen Hormon (ACTH) bewirkt. Dieses wiederum stimuliert in der Nebennierenrinde in erster Linie die Sekretion von Glukokortikoiden. Bei dieser Regulation der Glukokortikoide ist ein Tag-Nacht-Rhythmus zu beobachten: Der Kortisol-Spiegel hat ein Minimum um Mitternacht und ein Maximum um ca. 9 Uhr morgens. Besonders gesteigert ist die Kortikoid-Ausschüttung bei starken körperlichen und seelischen Belastungen, sog. Stress-Situationen.

1.8.1 Physiologie und Pathophysiologie von Glukokortikoiden (Dexamethason)

Glukokortikoide sind in vivo potente Inhibitoren physiologischer DNA Synthese in Keratinozyten (*Spiegelman, Budunova et al. 1997*).

Bei der topischen Applikation von Glukokortikoiden kommt es zu einem vielfach belegten Abfall der Mastzellzahl. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Gewebemastzellen hauptsächlich durch SCF reguliert wird. Der Abfall der Mastzellzahl ist vermutlich über eine verminderte SCF Produktion vermittelt, in vitro durch Fibroblasten, in vivo durch ortsständige Bindegewebszellen, und nicht durch eine Beeinflussung der Apoptose, da es nach Zugabe des Glukokortikoids Dexamethason zu einer SCF-abhängigen Mastzellkultur nämlich nicht zu einer erhöhten Absterberate von Mastzellen kam (*Finotto et al., 1997*).

1.8.2 Rezeptoren von Glukokortikoiden

Die Wirkung der Glukokortikoide wird über den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) vermittelt. Dieser Rezeptor gehört zu einer Steroidrezeptor Superfamilie (*Fuller 1991*) (*Evans 1988*) und ist im Cytosol, aber auch im Nukleus der meisten menschlichen Zellen vorhanden (*Serres M 1996*). Die Expression des GR ist das Ergebnis alternativen Splicings von prä-mRNA des GR, der in zwei homologen mRNAs und Protein Isoformen vorliegt. Diese Isoformen sind GR- α und GR- β . In der Western blot Analyse bei frisch isolierten basalen Keratinozyten zeigte sich eine Hauptbande des GR bei 97 kDa und eine Doppelbande bei etwa 59-56 kDa (gleiches Resultat bei kultivierten Keratinozyten). Nach Vorbehandlung der Zellen mit Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-6} M für 16 Stunden bei 37 °C war der Nachweis der 59 kDa Bande des Doublets nicht mehr möglich, was Serres et al. auf den aktivierten Glukokortikoid Rezeptor in Anwesenheit des Liganden Dexamethason (nach Translokation in den Nukleus) zurückführen (*Serres et al., 1996*). Diese Translokation des GR vom Zytoplasma in den Zellnukleus steht unter hormoneller Kontrolle (*Muller and Renkawitz 1991*). In ungebundenem Zustand befindet sich GR hauptsächlich im Zytoplasma in Assoziation mit Hitzeschock Proteinen. Nach Bindung des Rezeptors mit Glukokortikoiden dissoziiert GR von den Hitzeschock Proteinen, formt ein Homodimer und transloziert in den Nukleus, wo er an

spezifische DNA Sequenzen bindet. Diese Sequenzen nennt man Glukokortikoid Response Elemente (GRE) (*Spiegelman et al., 1997*).

Taylor et al. haben eine SCF Promoterregion beschrieben, die dem GRE grenzwertig homolog ist (*Taylor, Najmabadi et al. 1996*). Neuere Untersuchungen zeigen, dass GR mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 über direkte Protein-Protein Interaktionen interferiert (*Serres et al., 1996*).

GR- β ist unfähig, Kortikoide zu binden, was in Unterschieden der Aminosäuresequenz gegenüber GR- α begründet ist. Der Rezeptor GR- β wirkt als Inhibitor von GR- α , wahrscheinlich funktioniert dies über die Bildung von antagonistischen GR- α / GR- β Heterodimeren (*Strickland, Kisich et al. 2001*). Dabei ändert GR- β nicht die Affinität von GR- α für dessen Liganden. Es kommt nach der Bildung von Heterodimeren (s.o.) zu deren kompetitivem Verhalten gegenüber den Bindungsdomänen an den GRE.

1.9 Retinoide / All-Trans-Retinsäure (RA)

1.9.1 Vorkommen von Retinoiden

Retinoide sind endogene Derivate des Vitamin A und stellen einen wichtigen Modulator für das Wachstum und die Differenzierung menschlicher Keratinozyten dar (*Bikle et al., 1993*). Die physiologische Konzentration von Retinsäure beim Menschen beträgt etwa 10^{-9} bis 10^{-8} M, pharmakologische Konzentrationen liegen bei durchschnittlich 10^{-6} M (*Inui et al., 1999*).

1.9.2 Rezeptoren der Retinoide

Die molekularen Wirkungen der Retinoide werden in erster Linie über ihre nukleären Rezeptoren (RAR- α , - β , - γ sowie die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR, 9-cis Rezeptoren) - α , - β , - γ) vermittelt, die zur Familie der Steroidrezeptoren mit hohen Aminosäuresequenzhomologien gehören, die untereinander funktionelle Heterodimere bilden können. RA-Rezeptoren fungieren als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren (*Shang et al., 1999*). Sie zeigen ein räumlich zeitliches Expressionsmuster während der Entwicklung und weisen ein Gewebe-spezifisches Verteilungsmuster beim Adulten auf. Dies könnte nach Shang et al. (1999) ein Hinweis für unterschiedliche Aufgaben und Funktionen der verschiedenen Rezeptoren bei der

Signalvermittlung der Retinoide sein. Allerdings existieren mehrere Rezeptortypen parallel in einem Gewebe, was wiederum auf eine Art von Kompensation bzw. Koordination in der Vermittlung von durch Retinsäure ausgelösten Signalen schließen lässt.

Der Retinsäurerezeptor alpha (RAR- α) zeigt ein ubiquitäres Verteilungsmuster in adultem Gewebe, RAR- β ist vorwiegend in Epithelzellen lokalisiert, und RAR- γ wird hauptsächlich in der Haut exprimiert (*Elder et al., 1991*). In der Epidermis ist das Verhältnis von RAR- γ mit 90% gegenüber RAR- α mit 10% sehr einseitig (*Fisher et al., 1994*). Die Expression des Beta-Retinsäurerezeptors (RAR- β) kann als Reaktion auf das Vorhandensein von All-Trans-Retinsäure (RA) erfolgen (*Shang et al., 1999*). Diese Expression erfolgt über einen vom Alpha-Retinsäurerezeptor (RAR- α) abhängigen Signalweg.

Die Transkription des RAR- β Genes erfolgt sehr schnell nach Retinsäuretherapie, mit einem Maximum der Transkription nach ca. 6 Stunden. Darüber hinaus ist diese Transkription unabhängig von erneuter Proteinsynthese. Die Induktion der Expression von RAR- β korreliert gut mit der Wachstumsinhibierung und den apoptotischen Effekten von Retinsäure (*Seewaldt, Johnson et al. 1995*).

1.9.3 Physiologie / Pathophysiologie der Retinoide

Retinoide inhibieren die Differenzierung kultivierter menschlicher Keratinozyten (wie z. B. HaCaT). Dies erfolgt über die Suppression der Expression von Differenzierungsmarkern wie z. B. Keratin 1, Keratin 10, Filaggrin und Involukrin. Die Antwort der Keratinozyten auf RA ist in vitro und in vivo sehr unterschiedlich (*Bikle, Gee et al. 1993*). So kommt es sowohl bei systemischer als auch bei topischer Anwendung von Retinoiden meistens zu einer Verdickung der Epidermis, im Falle von Psoriasis herden und bei der Ichthyose jedoch zu einer Normalisierung der verdickten Epidermis.

Die Metabolisierung der RA wird initiiert durch 4-Hydroxylierung (*Marikar et al., 1998*). Katalysiert wird diese 4-Hydroxylierung durch ein Cytochrom P-450 Isoenzym (CYP26), die RA 4-Hydroxylase. RA 4-Hydroxylase ist abhängig von RA und wird durch diese selbst induziert. Marikar et al. konnten bei HaCaT-Keratinozyten zeigen, dass in Abwesenheit von RA die RA 4-Hydroxylase sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene kaum nachzuweisen war; nach Zugabe von All-Trans RA kam es dagegen schon

nach 2 h zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Level von 4-Hydroxylase (*Marikar et al., 1998*).

Retinoide induzieren Apoptosemechanismen und eine Inhibierung von Wachstum in einer Vielzahl von Tumorzellen (*Hong, Benner et al. 1994*). Sowohl RAR- α als auch RAR- β sind bei der Entstehung von Tumoren beteiligt. Es wird angenommen, dass eine defekte RAR- β Expression ein frühes Ereignis in der Genese von epithelialen Karzinomen darstellt; so konnte kürzlich festgestellt werden, dass es bei vielen epithelialen Tumoren und Tumorzelllinien zu einem Verlust der Expression von RAR- β kommt.

Kligman et al. konnten im Mausversuch zeigen, dass es nach topischer Behandlung mit All-Trans RA über 4-6 Wochen zur verstärkten Expression von SCF in der Epidermis kommt. Immunhistologische Färbungen zeigen ein Überwiegen der membrangebundenen Form und in interzellulären Räumen (*Kligman und Murphy 1996*). Retinoiden konnte in mehreren experimentellen Ansätzen außerdem eine Inhibierung von Angiogenese nachgewiesen werden (*Weninger et al., 1998*).

Eine wichtige Rolle als negativer feedback-Regulator kommt wohl dem „orphan“ Rezeptor TR4 zu, der zur Superfamilie der Steroid- /Thyreoid-Rezeptoren gehört. Inui et al konnten zeigen, dass TR4 die RA-vermittelte Transkriptionsaktivität in HaCaT-Keratinocyten supprimiert. Weiterhin zeigten sie einen Anstieg der Expression von TR4 durch RA selbst, dies wiederum bei HaCaT-Keratinocyten.

1.10 Zielsetzung der Untersuchungen

Im vorliegenden Projekt sollte unter in-vitro Bedingungen untersucht werden, wie der bekannte Mastzellendifferenzierungsfaktor SCF durch exogene bzw. endogene Faktoren in seiner Freisetzung reguliert wird und damit die Differenzierung und Reifung menschlicher Mastzellen beeinflusst.

Als Modell für die in-vitro Freisetzung von SCF aus Keratinocyten wurden HaCaT-Zellen ausgewählt, weil an diesen Zellen schon eine spontan und Stimulus-induzierte, differenzierungsabhängige Produktion von SCF von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen worden war und dieses Modell in unseren Laboren gut etabliert und standardisiert ist (*Grabbe et al., 1996*), auch bezüglich des Einflusses von Retinoiden auf die Keratinocyten-differenzierung (*Wanner et al., 1995*).

Als Modulatoren der SCF Freisetzung wurden RA und Dexamethason gewählt wegen der Bedeutung dieser Substanzen bei der Behandlung von Dermatosen, die mit einer Proliferation und einer pathologisch veränderten Differenzierung von Keratinozyten und Entzündungsprozessen einhergehen. Dabei wurde auch der Überlegung nachgegangen, dass diese endogen produzierten Substanzen bei physiologischen Regulationsprozessen der SCF Produktion aus Keratinozyten eine Rolle spielen könnten.

Ferner sollte die Spezifität der RA- und Glukokortikoid-vermittelten Effekte während der SCF Sekretion anhand der Expression der Rezeptoren für diese Substanzen untersucht werden.

Da nach den bisherigen Untersuchungen zur Synthese des wichtigen Mastzellwachstumsfaktors SCF bislang nur wenige Daten bezüglich der Regulation dieses Prozesses vorliegen, haben wir die in-vitro Freisetzung aus HaCaT-Zellen unter dem Einfluss von All-Trans-Retinsäure und Dexamethason nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels ELISA und semiquantitativer RT-PCR untersucht. Die Auswahl der auf ihre regulierende Funktion zu untersuchenden Faktoren beruhte auf folgenden Überlegungen: 1. Auf HaCaT-Keratinozyten wurden bislang nur Rezeptoren für Bradykinin und Thrombin beschrieben. 2. Retinoide stimulieren in murinen Keratinozyten die Freisetzung einer vermutlich auf SCF beruhenden, das Wachstum von Mastzellen fördernden Aktivität. 3. In vivo beeinflussen Glukokortikoide die Dichte und die Funktion kutaner Mastzellen auf direkte oder indirekte Weise.

Mit der Bestimmung der RA- und Glukokortikoid-Rezeptoren sollte auch die Spezifität der vermittelten Effekte während der SCF Sekretion untersucht werden. Ferner sollte eruiert werden, ob im Falle der HaCaT-Keratinozyten die Antwort der Zellen – wie bei der spontanen oder unspezifisch über A23187 induzierten SCF-Freisetzung – von ihrem Differenzierungsgrad abhängt.

2. Methoden

2.1 Chemikalien- und Geräteliste

2.1.1 Chemikalien-/Geräteliste und Zubehör der Zellkultur

Gewebekulturschalen und –flaschen:	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Varipipette 4810:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serological Pipet, sterile, 5/10/25 ml:	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
2070 Blue Max Conical Tubes, sterile, 15 ml:	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
2097 Blue Max Conical Tubes, sterile, 50 ml:	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen:	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
HaCaT-Zelllinie:	Humane Keratinozytenlinie, spontan immortalisiert (Boukamp P 1988)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium, 500 ml with Sodium Pyruvate with 1000 MG/l Glucose with Pyridoxine:	Gibco Bethesda Research Laboratories , Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline(1x), 500 ml without Calcium & Magnesium Endotoxin tested	Gibco BRL, Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Sterile Filtered:	
50x Trypsin / EDTA:	Seromed, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Kälberserum, fötales (FCS):	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

Penicillin, 10.000 U, 100 ml:	Seromed, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Streptomycin, 10.000 µg/ml, 100 ml:	Seromed, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin (200mM):	Seromed, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Dexamethason:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Lyse-Puffer "Buffer RLT":	RNEasy Kit, Quiagen, Chatsworth, CA, USA
2-Mercaptoethanol:	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Brutschrank: CO ₂ -Auto-Zero:	Heraeus Holding GmbH, Osterode/Harz, Deutschland
Minifuge RF, r=14,09 cm, 1200U/min = 226,8 g:	Heraeus Sepatech, Osterode/Harz, Deutschland
Zentrifuge 5402, 14.000U/min =:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop ID03:	Zeiss, Jena, Deutschland
Sterilbank, Mikrobiologische Sicherheitskabine, 0,45 m/s:	Karl Bleyemehl, Reinraumtechnik GmbH, Berlin, Deutschland
Neubauer-Zählkammer; 0,1 mm; Fläche 9 mm ² :	Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland

2.1.2 Geräteliste und Zubehör des verwendeten ELISA

Quantikine™ "Human SCF Immunoassay"	R&D Systems, Minneapolis, USA
Multiskan® MCC/340, MK II:	Titertek Instruments, Inc., Alabama, USA
Microplate Reader MRX:	Dynatech Laboratories GmbH Deutschland, Denkendorf, Deutschland
Pipetten und –spitzen:	s. 2.1.1

2.1.3 Chemikalien- und Geräteliste der Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

GeneAmp PCR System 2400:	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
cDNA Cycle® Kit:	Invitrogen Corporation, San Diego, USA
Abzug:	Köttermann Labortechnik GmbH & Co., Uetze, Deutschland
Thermocycler 60:	bio-med Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße:	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Zentrifuge: Zentrifuge 5402:	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Netheler-Hinz- GmbH; Hamburg, Deutschland
Wasserbäder: MS/M6 Lauda:	MS Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Agarosegel: Agarose Electrophoresis Grade:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland

50x TAE-Puffer:	Selbstansatz: 242 g Tris Base, 57.1 ml Essigsäure, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0) auf 1000 ml Aqua bidest.
Waage: MA AF 200:	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
RNeasy Total RNA Kit:	Quiagen, Hilden, Deutschland
RNase Inhibitor:	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Safe lock Reaktionsgefäße:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen:	Falcon, Heidelberg, Deutschland
10x PCR-Puffer:	Perkin Elmer, Norwalk, USA
5x RT-Puffer:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Taq DNA Polymerase, native:	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
Reverse Transkriptase Superscript:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP:	Boehringer, Mannheim, Deutschland
1-kb-DNA-Leiter:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
100-bp-DNA-Leiter:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Spezifische Oligonukleotidprimer (s. Tabelle 1):	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
Mikrowelle: Mikromat:	AEG, Berlin, Deutschland
Elektrophoresis Power Supply:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Gelkammer: Horizon 11.14:	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Kamera: Polaroid Quick Shooter, Modell QSR:	Kodak Company, Cambridge, USA

2.2 Zellkultivierung

2.2.1 Kultivierung der Zelllinie HaCaT

Die Kultivierung der humanen Keratinozytenlinie HaCaT (bereit gestellt von Prof. Dr. N. E. Fusenig, Deutsches Krebs-Forschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Germany) (Boukamp et al., 1988) erfolgte bei 37° C, 5% Kohlendioxid (CO₂) und 100% Luftfeuchtigkeit. Die verwendeten Gewebekulturschalen waren aus Polystyrol. Zur Kultivierung wurde dem "Modified Eagle Medium" (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 1% Penicillin/Streptomycin und 1% 200mM L-Glutamin zugesetzt. Da tierische Zellen zur Proliferation zusätzliche biologische Wirkstoffe benötigen, wurde dem Medium weiterhin 5% fötales Kälberserum (FCS) zugegeben. FCS enthält Hormone, Aminosäuren, organische Salze, Spurenelemente und Albumin und begünstigt die Adhärenz von Zellen und stimuliert als Proliferationsfaktor die DNA-, RNA- und Proteinsynthese. So kann eine kultivierte Zelllinie, wie in unserem Fall die Zelllinie HaCaT, über eine lange Zeit ihre Homogenität und Teilungsfähigkeit behalten.

Adhärente Zellen in Kultur wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS (je 5 ml, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) mit einer Mischung aus Trypsin / EDTA (0.05% / 0.02%) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dadurch von der Kulturschale gelöst.

Zur Sicherung der Vitalität der Zellen erfolgte vor der eigentlichen Zählung in der Neubauer-Zählkammer die Anfärbung mit Trypanblau in einer Verdünnung von 1:2.

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der an Proteine bindet. Der Farbstoff diffundiert ausschließlich durch die Membran toter Zellen, die dadurch blau angefärbt werden.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 9 großen Quadraten, die jeweils wiederum in 16 Quadrate unterteilt sind. Ein großes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm², dies ergibt bei einer Tiefe von 0.1 mm ein Volumen von 0.1µl. Gezählt wurden dann ausschließlich die vitalen Zellen (Auszählung aller vier Felder). Die Zellzahl pro Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen / ml} = (\Sigma \text{ lebender Zellen} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Berechnung der auszusäenden Milliliter Zellsuspension erfolgte nach folgender Formel:

$$(\text{Gewünschte Zellzahl} / \text{Platte}) / (\text{Errechnete Zellzahl} / \text{ml})$$

Zur Probengewinnung haben wir nach Ermittlung der Zellzahl jeweils die Überstände der Zellkulturen gewonnen, zentrifugiert (1200 U / min), portioniert und bei -80 °C

eingefroren. Zur späteren RNA-Analyse wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in sterilen Eppendorf-Hütchen mit Lysepuffer "Buffer-RLT®" behandelt und ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

Die Inkubation der HaCaT-Zellen mit All-Trans-Retinsäure und Dexamethason erfolgte durch Zugabe der beiden Stoffe zu obiger Kultur in das Medium in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-5} M; als Lösungsmittel (vor allem für RA) und Kontrollmedium diente DMSO in einer Konzentration von 10^{-5} M.

Ab etwa Tag 10 haben die Zellen die Proliferation beendet und differenzieren. Aufgrund dieser Wachstumseigenschaften der HaCaT-Zellen haben wir zwei unterschiedliche Zeiteinheiten für die Inkubation gewählt: Zum einen erfolgte die Zugabe von RA bzw. Dexamethason über 24 Stunden (von Tag 4 auf Tag 5 und von Tag 11 auf Tag 12), zum anderen wurden die beiden Stoffe über die gesamte Dauer von 11 Tagen dem Medium beigegeben, dementsprechend erfolgte hier bei erforderlichlichem Wechsel des Mediums die erneute Zugabe der entsprechenden Konzentrationen.

2.2.2 ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) ist ein standardisiertes Verfahren in der physiologischen Chemie zum Nachweis von Immunkomplexen. Dabei wird ein in diesem Fall für SCF spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet. Nach dem Binden dieses Antikörpers an das in der Probe vorliegende SCF (beide Splicevarianten, s.o.) wird ein weiterer Enzym-gebundener polyklonaler Antikörper zugegeben, der ebenfalls spezifisch für SCF ist (sog. Sandwich-ELISA). Durch eine Farbreaktion mit Streptavidin kann die entsprechende Menge an SCF photometrisch bei 450 bzw. 540 nm bestimmt werden.

Das für diese Versuche benutzte ELISA-Kit ist kalibriert gegen eine von E. coli produzierte, hoch aufgereinigte Variante des löslichen humanen SCF. Die Sensitivität ist im typischen Fall geringer als 4.0 pg/ml, die Spezifität erfaßt sowohl beide Splicevarianten des humanen SCF als auch rekombinantes humanes SCF.

2.2.3 Messenger Ribonukleinsäure / Copy Desoxyribonukleinsäure

Nach Isolierung der RNA mittels kommerziell erhältlichem RNA-Isolierungskit (RNeasy, Quiagen) wurde mit Hilfe des cDNA Cycle® Kit (s. o.) die mRNA mittels der Affen-Myeloblastosis-Virus (AMV) Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

In einem ersten Schritt werden dazu steriles Wasser und 2 µl mRNA zu einem Gesamtvolumen von 11,5 µl zusammen pipettiert. Nach Zugabe von 1 µl eines Oligo-Desoxy-Thymidin (dT)-Primers erfolgt die Inkubation im Wasserbad bei 65 °C für 10 Minuten, um die Sekundärstruktur zu lösen, anschl. Abkühlung bei Raumtemperatur für 2 min. Im Anschluss an kurzes Anzentrifugieren werden folgende Reagenzien zugegeben:

1 µl RNAse Inhibitor

4 µl 5fach RT Buffer

1 µl 100 mM dNTPs

1 µl 80 mM Natrium Pyrophosphate

0,5 µl AMV Reverse Transkriptase

Anschl. erneutes Anzentrifugieren und Inkubation im Wasserbad bei 42 °C für 60 min. Danach Inkubation bei 95 °C für 5 min., um die entstandenen RNA-cDNA Hybride zu denaturieren und um die für die weitere Verarbeitung erforderliche cDNA zu gewinnen.

2.2.4 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

Die PCR (Polymerase -Kettenreaktion/Polymerase chain reaction) wurde erstmalig 1984 durch Kary B. Mullis, Kalifornien, als Verfahren beschrieben (*Mullis et al., 1992*). Sie beruht auf doppelt-helikalen Struktur der DNA und ermöglicht die Amplifizierung beliebiger DNA-Abschnitte und damit den Nachweis bestimmter Gensequenzen bzw. auch ganzer Gene.

Heute stellt die Reverse-Transkriptase PCR das meist verbreitete Verfahren zur Charakterisierung und zum Nachweis von mRNA (quantitativ) in verschiedenen Proben dar (*Orlando et al., 1998*).

Im ersten Schritt wird durch Erhitzen des Doppelstranges der DNA auf 94° C dieser zunächst in Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung). An diese Einzelstränge binden nach Abkühlung auf 60° C nun die zugegebenen Primer (= synthetische Oligonukleotide für den Start der PCR) und verhindern damit eine Rückbildung der alten

Doppelstrangstruktur. Dieser Schritt der PCR wird als Annealing bezeichnet. Durch die DNA Polymerase (Taq-Polymerase aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*) erfolgt nun die Synthese einer Kopie der ursprünglichen DNA Sequenz vom freien 3'-OH-Ende aus. Im weiteren Verlauf dienen sowohl die ursprüngliche DNA als auch die Kopie als Template (= Matrize zur weiteren Kopie), so dass schließlich durch die Wiederholung obiger Schritte eine exponentielle Vermehrung der ursprünglich vorhandenen DNA Sequenz stattfindet.

In unserem Fall kommt ein besonderes Verfahren der PCR, die sogenannte semi-quantitative PCR, zur Anwendung. Dabei wird die gewonnene cDNA (s.o.) zur weiteren Verwendung erst mittels eines bekannten Primers, GAPDH (s. o.), so eingestellt, dass sich das PCR-Produkt aus der Sättigung heraus im linearen Bereich befindet. Dies ist anhand einer Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8) nachweisbar, der Verdünnung entsprechend halbiert sich jeweils das PCR-Produkt.

Zu je 1 µl cDNA bzw. 1 µl Aqua. dest. als Negativkontrolle wurden pipettiert:

0.1 µl Taq-Polymerase

16.9 µl Aqua. bidest.

2.0 µl dNTP

2.5 µl PCR-Puffer (10x)

1.25 µl 3'-Primer

1.25 µl 5'-Primer

Bei Benutzung des PCR-Gerätes von Perkin Elmer konnten wir auf die Überschichtung der Proben mit Öl verzichten, da eine Deckelheizung das Verdunsten der Probe verhindert.

Zur Quantifizierung der mRNA-Produkte mittels PCR wurden die einzelnen Proben jeweils in einer Konzentration von 10^{-6} M (Dexamethason, RA, Ra) und 10^{-5} M benutzt. Als Basisprogramm der PCR für die Einstellung mit GAPDH wurde der folgende Zyklus gewählt: 5 min. bei 94 °C als einmaliger Anfang des PCR-Zyklus, 1 min. bei 94 °C, 1 min. bei der jeweiligen Annealing-Temperatur (s. Tab. 1), 1 min. bei 72 °C, 10 min. bei 60 °C, und abschließend der Abkühlmodus bei 4 °C im Endlosbetrieb.

Dieser Zyklus ist für die jeweiligen Primer mit der Annealing-Temperatur und/oder der Zyklenzahl angepasst worden.

Die im folgenden angegebenen Werte gelten für die mit Retinoiden behandelten HaCaT-Zellen: Die Einstellung der cDNA mit GAPDH erfolgte mit 28 Zyklen, die

erwartete Fragmentgröße des spezifischen Primers beträgt 197 bp (*Grabbe et al., 1996*).

Als Kontrolle für die Differenzierung der Zellen haben wir den bereits beschriebenen, für Keratin 5 spezifischen Primer (K5) verwendet. Dieser ist ein Maß für den Reifungsgrad der Zellen, er wird mit zunehmender Differenzierung schwächer exprimiert. Hierbei wurde der Basiszyklus der PCR mit einer Annealing-Temperatur von 60° C und 35 Zyklen angepasst.

Für den für das Gesamt-SCF spezifischen Primer (SCF 3`5`), der sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Splicevariante erfasst, wurde die Annealing-Temperatur auf 58° C bei 31 Zyklen gewählt.

Der für die beiden Splicevarianten spezifische Primer (SCF 2/3) wurde bei einer Annealing-Temperatur von ebenfalls 58° C und 32 Zyklen zugegeben.

Zu den verwendeten Primerpaaren s. Tab. 3.

2.3 Statistik

Aus jeweils 5 Experimenten wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel[®] für Windows 2000[®] die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Als statistischer Test wurde der zweiseitige t-Test für paarige Stichproben mit Hilfe der Software T-Ease 2.0 von Harvey J. Motulski ISI[®] durchgeführt.

Die in der folgenden Arbeit dargestellten PCR-Abbildungen sind immer repräsentativ für 1 von 5 Experimenten.

Tabelle 3: Spezifische Oligonukleotidprimer mit Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen

<i>spezifisch für das Gen:</i>	<i>Sequenz:</i>	<i>Größe:</i>	<i>Annealing-temperatur/ Zyklenzahl</i>
GAPDH	P ₁ : 5`-GATGACATCAAGAAGGTGGTG-3` P ₂ : 5`-GCTGTAGCCAAATTCGTTGTC-3`	197bp	57° C/28
K5	P ₁ : 5`-CAAGCTGCTGGAGGGCGAGG-3` P ₂ : 5`-GGGCTGGGAATGGGGCTCTC-3`	319bp	60° C/35
RAR α	P ₁ : 5`-TGGGTGGACTCTCCCCGCCA-3` P ₂ : 5`-CCCACCTCCGGCGTCAGCGTG-3`	438bp	57° C/37
RAR β	P ₁ : 5`-CACTGGCTTGACCATCGCAGACC-3` P ₂ : 5`-GAGAGGTGGCATTGATCCAGG-3`	435bp	57° C/39
RAR γ	P ₁ : 5`-GGCCTGGGCCAGCCTGACCTC-3` P ₂ : 5`-CAGCCCCAGATCCAGCTGCACG-3`	515bp	65° C/37
SCF- gesamt	P ₁ : 5`-CTCCACAAGGTCATCCAC-3` P ₂ : 5`-GGGCTGGATCGCAGCGC-3`	276bp	57° C/31
SCF-1/2	P ₁ : 5`-CTTCAACATTAAGTCCTGAG-3` P ₂ : 5`-CAGTGTTGATACAAGCCACA-3`	359/ 275bp	57° C/35
GCR α	P _S : 5`-ACACAGGCTTCAGGTATCTT-3` P _{AS} : 5`-ACTGCTTCTGTTGCCAAG-3`	539bp	54° C/39
GCR β	P _S : 5`-ACACAGGCTTCAGGTATCTT-3` P _{AS} : 5`-CGCCAAGATTGTTGGGATGA-3`	293bp	56° C/39

3. Resultate

3.1 Zellkultur der HaCaT-Zellen

Alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen basieren auf der im Methodenteil beschriebenen Zellkultur mit Zellen der HaCaT-Zelllinie, es handelt sich ausnahmslos um in-vitro Modelle.

Die einzelnen Versuche sind – mit Ausnahme der Zellwachstumskurven, s. u. - jeweils mindestens fünf mal durchgeführt worden, um eine statistische Sicherung zu gewährleisten. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde der „Student's T-Test“ durchgeführt und damit die Signifikanz der Resultate bestätigt (s. jeweilige Abbildung).

3.1.1 Zellwachstum der HaCaT-Zellen (Charakterisierung der Differenzierung durch Keratin 5 und Involukrin)

In drei Wachstumskurven zu verschiedenen Zeitpunkten (Aussaat jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen pro ml) war die Konfluenz der Zellen am sechsten bzw. siebten Tag mikroskopisch erkennbar. Das durchschnittliche Wachstum der Zellen erfolgte von Tag 0 zu Tag 4 um den Faktor 2,8, von Tag 4 zu Tag 7 um den Faktor 4,99, von Tag 7 zu Tag 11 um den Faktor 1,04 und von Tag 11 zu Tag 14 um den Faktor 1,15. Dies zeigt die vorher schon beschriebene Eigenschaft der HaCaT-Keratinocyten, ab etwa dem siebten Tag einen konstanten Teilungszyklus einzugehen (s. Abb. 3 und Abb. 1, Einleitung), d. h. wenn die Proliferation in die Differenzierung übergeht.

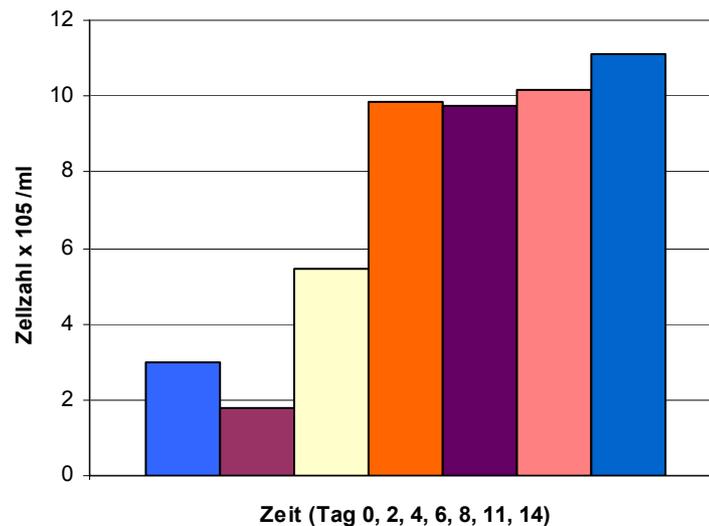


Abb. 3: Wachstumskurve der HaCaT-Zellen über 14 Tage. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit jeweils 3×10^5 Zellen /ml. Zur Darstellung kommt hier ein repräsentatives Experiment.

3.2 Inkubation der HaCaT-Zellen mit All-Trans-Retinsäure (RA)

3.2.1 Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA für 24 Stunden

3.2.1.1 Zellwachstum der HaCaT-Zellen

Die Inkubation der humanen Keratinozyten Zelllinie HaCaT mit RA erfolgte in einer Verdünnungsreihe von 10^{-5} bis 10^{-9} M. Zusätzlich wurde ein Kontrollmedium unter Zugabe von DMSO in einer Konzentration von 10^{-5} M angelegt. Jeweils nach 24 Stunden Inkubation (Tag 4 auf 5 und Tag 11 auf 12) wurde sowohl die Zellzahl, als auch quantitativ die SCF-Freisetzung auf Protein-, und qualitativ und quantitativ auf mRNA-Ebene gemessen.

Bezüglich der Konfluenz der Zellen konnte Folgendes festgestellt werden: Am Tag 4 waren die Zellen in keinem Fall (n=5) konfluent, am Tag 7 in 4 von 5 Versuchen, am Tag 11 waren die Zellen in allen Fällen konfluent. Mit RA in unterschiedlichen Konzentrationen (s.o.) war dabei kein Unterschied nachzuweisen, nur in einem Fall

waren die Zellen bei einer Konzentration von 10^{-5} und 10^{-6} RA M auch am Tag 7 nicht konfluent (Konfluenz am Tag 11).

Auf das messbare Zellwachstum (Neubauer-Zählkammer, s.o.) hat RA je nach Zeitpunkt der Inkubation unterschiedliche Effekte: So war am Tag 5 eine dosisabhängige Inhibierung des Wachstums zu beobachten. Auch hier gilt: Mit steigender Konzentration stieg auch die Inhibierung. Dagegen war am Tag 12 kaum ein Effekt nachweisbar (s. Abb. 4, 5).

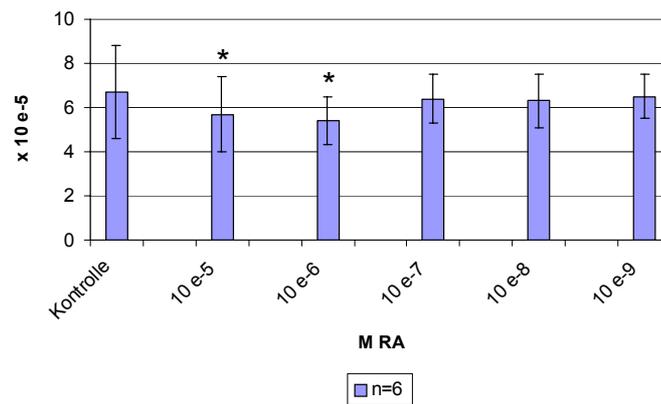


Abb. 4: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit RA über 24 h am Tag 5.

* = $p < 0.05$, im Vergleich zum Kontrollwert.

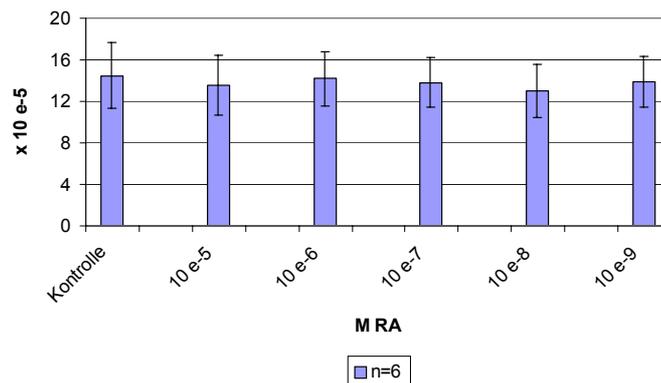


Abb. 5: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit RA über 24 h am Tag 12.

3.2.1.2 SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)

Nach Messung der SCF-Produktion auf Proteinebene über die Extinktion im ELISA haben wir am Tag 5 (nach Inkubation mit RA für 24 Stunden) keinen Effekt auf diese feststellen können. Am Tag 12, wiederum nach 24 Stunden Inkubation mit RA, ergab sich eine Erhöhung der SCF-Produktion, die teils konzentrationsabhängig war; mit steigender Konzentration (s. Konzentrationsreihe oben) war die Erhöhung ausgeprägter, bei einer RA-Konzentration von 10^{-5} M war die Erhöhung der SCF-Produktion mit $p < 0.01$ am signifikantesten gegenüber den übrigen Konzentrationen (s. Abb. 6, 7).

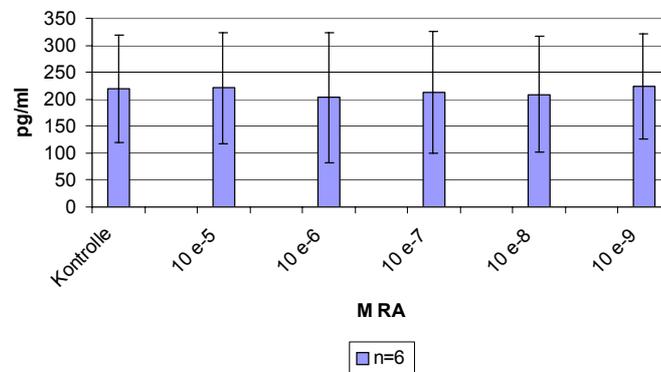


Abb. 6: SCF-Produktion aus HaCaT-Zellen nach Inkubation mit RA über 24 h am Tag 5.

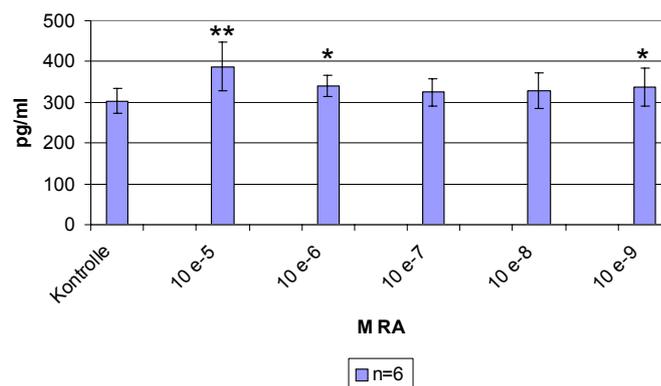


Abb. 7: SCF-Produktion aus HaCaT-Zellen nach Inkubation mit RA über 24 h am Tag 12. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

3.2.1.3 SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf mRNA-Ebene (PCR)

Siehe hierzu Punkt 3.7

3.2.2 Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA für 11 Tage

3.2.2.1 Zellwachstum der HaCaT-Zellen

Die Inkubation der humanen Keratinozyten Zelllinie HaCaT mit RA erfolgte in einer Verdünnungsreihe von 10^{-5} bis 10^{-9} /ml. Zusätzlich wurde ein Kontrollmedium unter Zugabe von DMSO in einer Konzentration von 10^{-5} /ml angelegt. Jeweils nach 11 Tagen Inkubation (über die gesamte Dauer) wurde sowohl die Zellzahl, als auch quantitativ die SCF-Freisetzung auf Protein, und qualitativ und quantitativ auf mRNA-Ebene gemessen.

Bezüglich der Konfluenz der Zellen konnte folgendes festgestellt werden: Am Tag 4 waren die Zellen in keinem Fall (n=5) konfluent, am Tag 7 in 3 von 5 Versuchen nicht konfluent bis subkonfluent (2 von 5 waren konfluent), am Tag 11 waren die Zellen in allen Fällen konfluent. Auffällig dabei war, dass mit abnehmender Konzentration von RA (s.o.) die Konfluenz der HaCaT-Zellen zeitlich früher erreicht war.

Das messbare Zellwachstum (mittels der Neubauer-Zählkammer) wird durch RA beeinflusst. Mit steigender Konzentration der RA ist eine vermehrte Inhibierung des Zellwachstums zu beobachten. Vor allem im Vergleich zur DMSO-Kontrolle fällt eine über das Konzentrationsgefälle durchgängige Inhibierung des Zellwachstums auf (s. Abb. 8, 9).

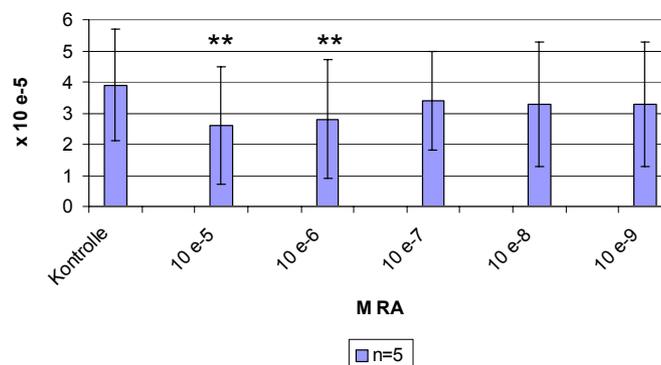


Abb. 8: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach kontinuierlicher Inkubation mit RA über 11 Tage am Tag 4. ** = $p < 0.01$

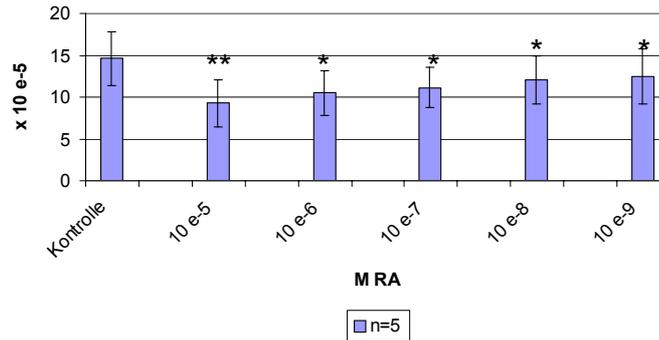


Abb. 9: Zellzahl der HaCaT-Zellen am Tag 11, nach kontinuierlicher Inkubation mit RA über 11 Tage. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

3.2.1.2 Gesamt-SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)

Nach Messung der SCF-Produktion auf Proteinebene über die Extinktion im ELISA konnte am Tag 4 (nach Dauerinkubation) ein geringer Hemm-Effekt durch RA festgestellt werden, am Tag 11 ist eher eine Hochregulation zu beobachten, die jedoch keine Signifikanz erreichte. Für beide Zeitpunkte und Effekte gilt, dass sie konzentrationsabhängig sind (s. Abb. 10, 11).

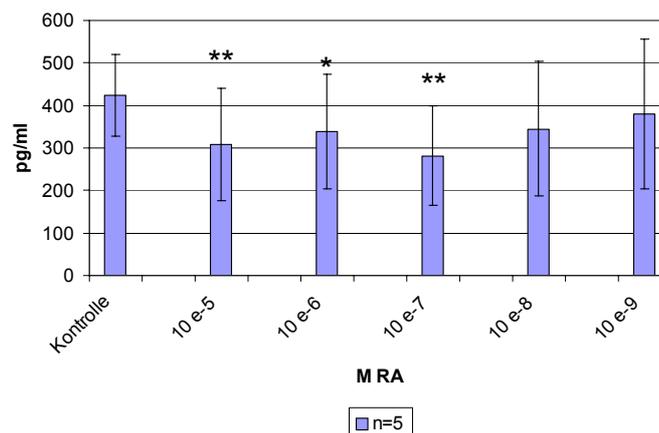


Abb. 10: SCF Produktion aus HaCaT-Zellen am Tag 4, bei Inkubation mit RA über 11 Tage. * = $p < 0.05$

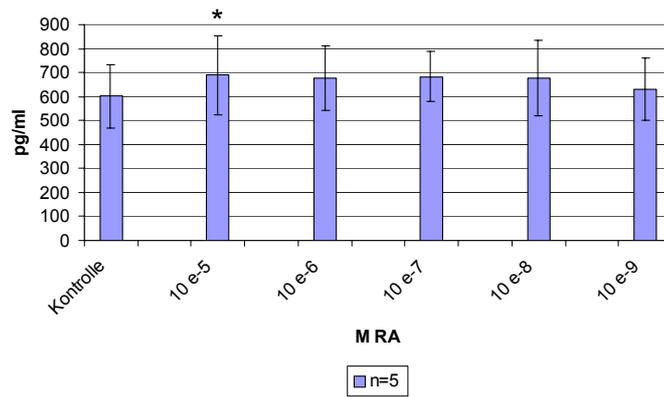


Abb. 11: SCF Produktion aus HaCaT-Zellen am Tag 11, bei Inkubation mit RA über 11 Tage. * = $p < 0.05$

3.2.2.2 Gesamt-SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf mRNA-Ebene (PCR)

Während der Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA über 11 Tage (Dauerinkubation) konnten wir keinen Effekt auf der mRNA-Ebene mittels der RT-PCR nachweisen.

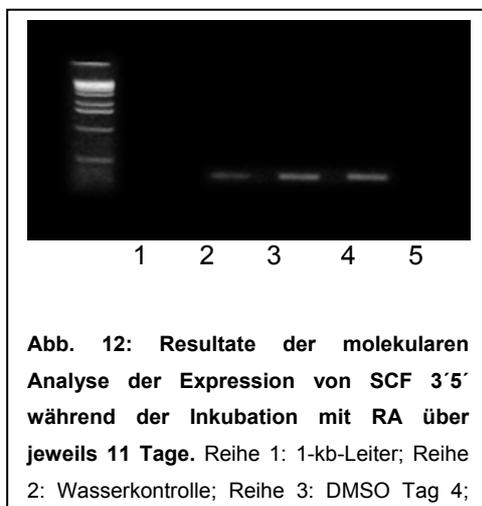


Abb. 12: Resultate der molekularen Analyse der Expression von SCF 3'5' während der Inkubation mit RA über jeweils 11 Tage. Reihe 1: 1-kb-Leiter; Reihe 2: Wasserkontrolle; Reihe 3: DMSO Tag 4;

Zur Übersicht sind in der folgenden Tabelle die Ergebnisse noch einmal aufgelistet:

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse unter RA Einfluss

		Tag 4/5	Tag 11/12
RA 24 h	Zellzahl	(↓)	↔
	SCF (Elisa)	↔	↑
	SCF (PCR)	↔	↔
RA 11 d	Zellzahl	↓	↓
	SCF (Elisa)	(↓)	(↑)
	SCF (PCR)	↔	↔

3.3 Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason

3.3.1 Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason für 24 Stunden

3.3.1.1 Zellwachstum der HaCaT-Zellen

Nach Inkubation der humanen Keratinozyten Zelllinie HaCaT mit Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-6} M über jeweils 24 h war auf das messbare Zellwachstum an Tag 5 keinerlei Effekt nachzuweisen (s. Abb. 13). An Tag 12 trat eine schwache, aber signifikante Inhibierung des Zellwachstums (Faktor 1.1, s. Abb. 14) durch Dexamethason auf. Der Vergleich erfolgte über ein Kontrollmedium mit DMSO in einer Konzentration von 10^{-5} M, die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer (s. o.). Jeweils nach 24 h Inkubation wurden sowohl die Zellzahl, als auch quantitativ die SCF-Freisetzung auf Protein-, und qualitativ und quantitativ auf mRNA-Ebene gemessen.

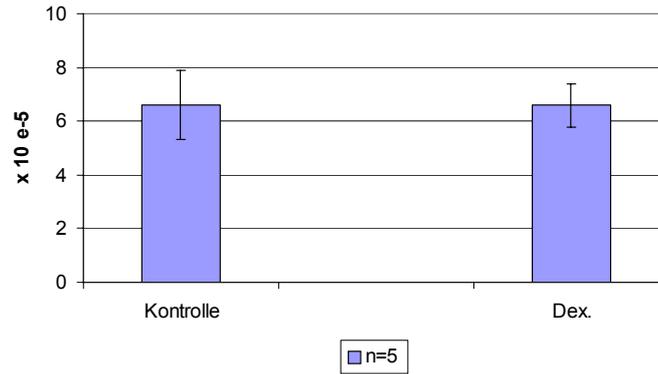


Abb. 13: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason (10^{-6} M) über 24 h am Tag 5.

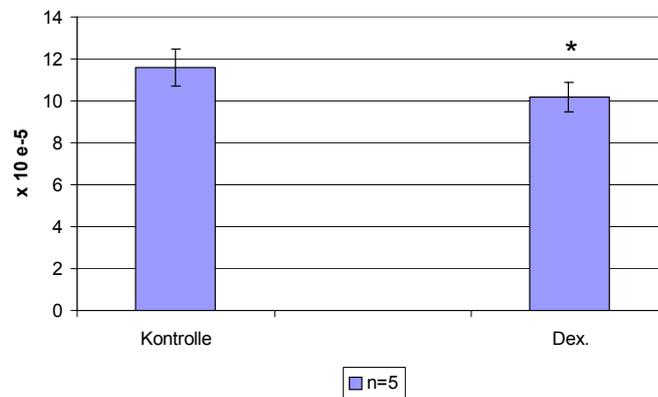


Abb. 14: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason (10^{-6} M) über 24 h am Tag 12. * = $p < 0.05$

3.3.1.2 SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)

Nach Messung der SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen über die Extinktion im ELISA war sowohl an Tag 5 als auch an Tag 12 eine nur schwache, aber jeweils doch signifikante Inhibierung der Produktion zu sehen (Tag 5 Faktor 1.2, Tag 12 Faktor 1.1, jeweils bezogen auf DMSO, s. Abb. 15, 16).

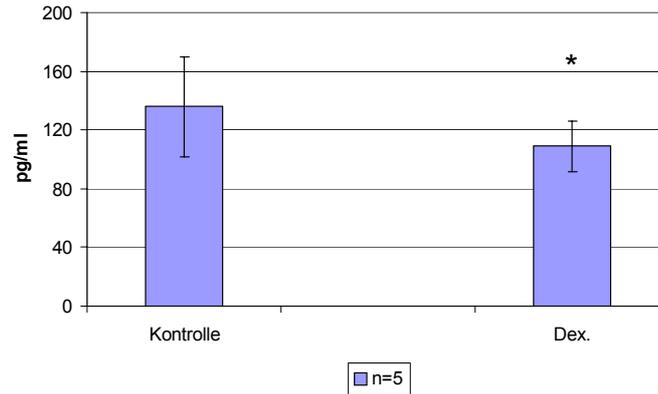


Abb. 15: SCF Produktion aus HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason (10^{-6} M) über 24 h am Tag 5. * = $p < 0.05$

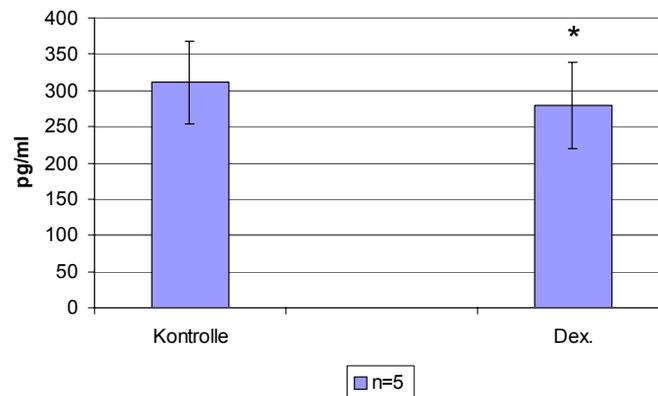
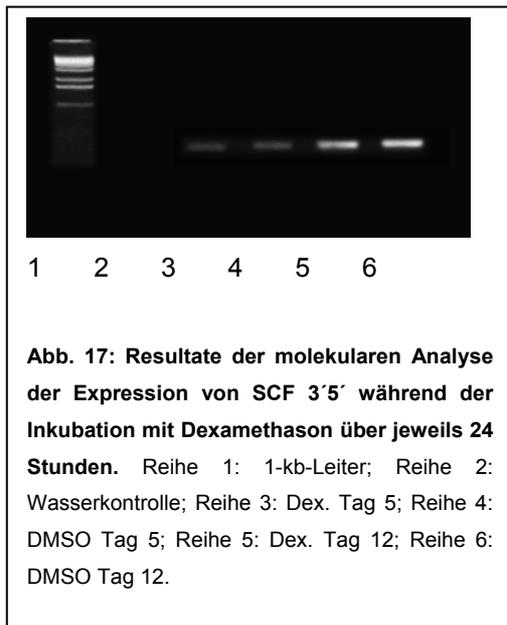


Abb. 16: SCF Produktion aus HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason (10^{-6} M) über 24 h am Tag 12. ** $p < 0.01$

3.3.1.3 SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf mRNA-Ebene (PCR)

Während der Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason über jeweils 24 h ist eine deutliche Hochregulation der SCF-Produktion nachzuweisen. Von Tag 5 zu Tag 12 erfolgt die Hochregulation der SCF-Produktion im Mittel um den Faktor 1.6. Bezogen auf DMSO (als Lösungsmittel) wird die Hochregulation noch stärker deutlich: Am Tag 5 erfolgt sie im Mittel um den Faktor 1.1, am Tag 12 hingegen um den Faktor 2.3 (s. Abb. 17).



3.3.2 Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason für 11 Tage

3.3.2.1 Zellwachstum der HaCaT-Zellen

Die Inkubation der HaCaT-Zelllinie mit Dexamethason erfolgte in einer Verdünnungsreihe von 10^{-5} bis 10^{-9} M. Zusätzlich wurde ein Kontrollmedium unter Zugabe von DMSO in einer Konzentration von 10^{-5} M angelegt. Jeweils nach 4 und 11 Tagen Inkubation wurde sowohl die Zellzahl, als auch quantitativ die SCF-Produktion auf Protein-, und qualitativ und quantitativ auf mRNA-Ebene gemessen.

Am Tag 4 waren dabei die Zellen in allen Fällen (n=5) nicht konfluent, am Tag 7 in 2 Fällen subkonfluent, in 3 Fällen konfluent, und am Tag 11 waren die Zellen in allen Fällen konfluent. Auch hierbei fiel wie schon in anderen Versuchen (s. o.) die Konzentrationsabhängigkeit auf, Sub- bzw. Nicht-Konfluenz war nur bei Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-6} M festzustellen.

Bezogen auf das messbare Zellwachstum (Neubauer-Zählkammer, s. o.) hat Dexamethason je nach Zeitpunkt unterschiedliche Effekte: Am Tag 4 war eine schwache, konzentrationsunabhängige Hochregulation des Zellwachstums zu sehen, die keine statistische Signifikanz erreichte; am Tag 11 hingegen war bei einer Konzentration von 10^{-5} und 10^{-8} M eine signifikante Inhibierung des Zellwachstums zu beobachten (s. Abb. 18, 19).

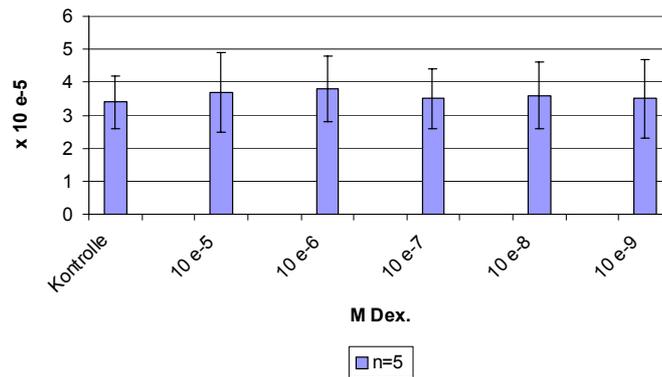


Abb. 18: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason über 11 Tage am Tag 4.

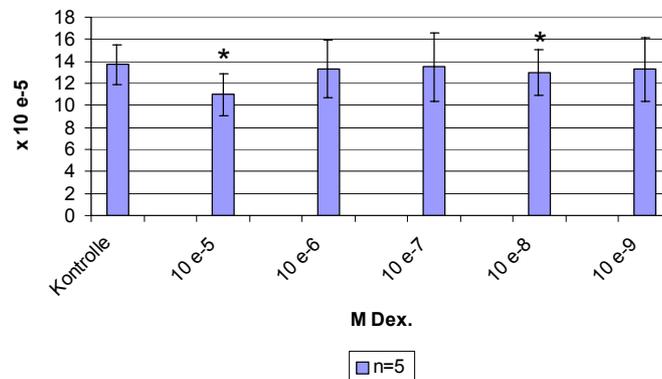


Abb. 19: Zellzahl der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason über 11 Tage am Tag 11. * = $p < 0.05$

3.3.2.2 SCF-Produktion aus den HaCaT-Zellen auf Proteinebene (ELISA)

Nach Messung der SCF-Produktion auf Proteinebene über die Extinktion im ELISA konnte an Tag 4 und Tag 11 eine konzentrationsabhängige signifikante Inhibierung der Produktion gezeigt werden. Auch hierbei gilt: Mit steigender Konzentration erfolgte eine stärkere Inhibierung der Produktion (s. Abb. 20, 21).

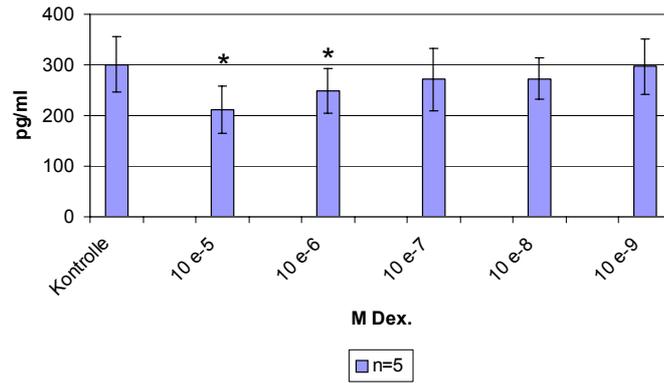


Abb. 20: SCF Produktion aus HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason über 11 Tage am Tag 4. * = $p < 0.05$

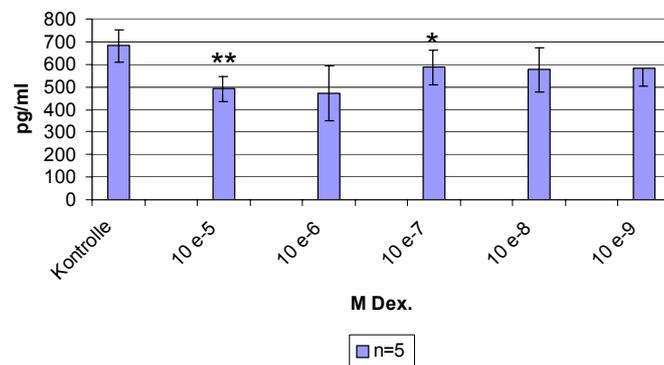


Abb. 21: SCF Produktion aus HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason über 11 Tage am Tag 11. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

Zur Übersicht sind die Ergebnisse in der folgenden Tabelle noch einmal dargestellt:

Tab. 5: Zusammenfassung der Daten zur Modulation mit Dexamethason

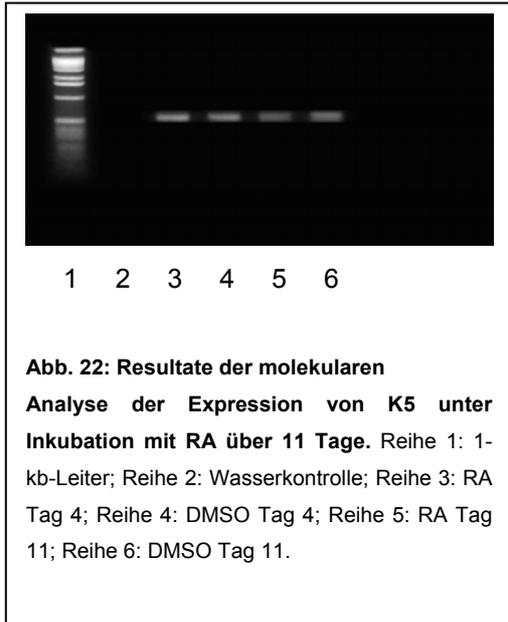
		Tag 4/5	Tag 11/12
Dex. 24 h	Zellzahl	↔	↓
	SCF (Elisa)	↓	↓
	SCF (PCR)	↑	↑↑
Dex. 11 d	Zellzahl	(↑)	↓↓
	SCF (Elisa)	↓↓	↓↓

3.4 Bestimmung des Differenzierungsmarkers Keratin 5 (K5) auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR

3.4.1 Differenzierungsmarker Keratin 5 (K5)

Keratin 5 wird mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten (auch der HaCaT-Keratinozyten) herunterreguliert.

Bei der Inkubation mit RA für 11 Tage (Dauerinkubation) konnten wir am Tag 4 keinen Effekt auf die Expression von Keratin 5 mRNA feststellen, am Tag 11 wurde K5 leicht herunterreguliert (s. Abb. 22). Im Vergleich zur Inkubation mit RA über jeweils 24 h fällt hierbei die Inhibierung der Expression schwächer aus als bei der beschriebenen Dauerinkubation. Dexamethason hemmt Keratin 5, bei einer Inkubation über 24 h sowohl am Tag 5 als auch am Tag 12.



Zur Übersicht sind die Ergebnisse noch einmal in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 6: Zusammenfassung der Daten zur K5 Expression

		Tag 4/5	Tag 11/12
RA 24 h	K5	↔	(↓)
RA 11 d	K5	↔	↓
Dex. 24 h	K5	↓	↓

3.5 Auftrennung in Gesamt-SCF und SCF-Splicevarianten

3.5.1 Gesamt-SCF (SCF 3'5')

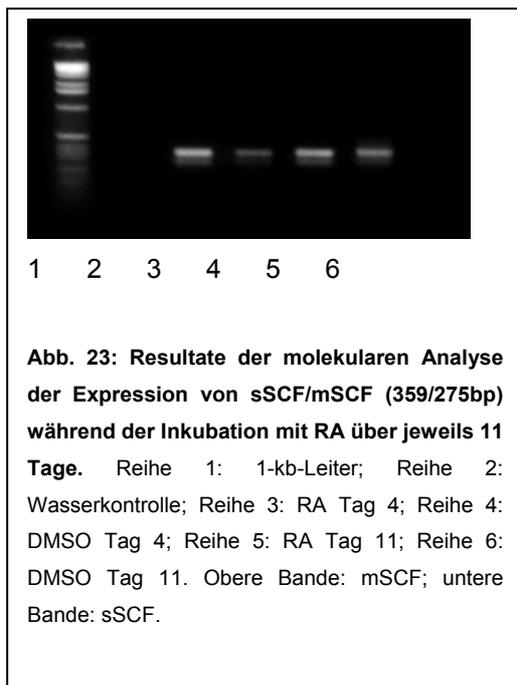
Während der Differenzierung der HaCaT-Zellen steigt die Produktion von Gesamt-SCF. Die jeweiligen Effekte von RA und Dexamethason während der Inkubation mit den HaCaT-Zellen über 24 h bzw. 11 Tage auf die Produktion von Gesamt-SCF sind sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene unter den einzelnen Abschnitten (s. o.) erläutert.

3.5.2 sSCF/mSCF

Es handelt sich bei sSCF/mSCF um die beiden Splicevarianten von SCF (siehe dazu Einleitung Nr. 1.5.1).

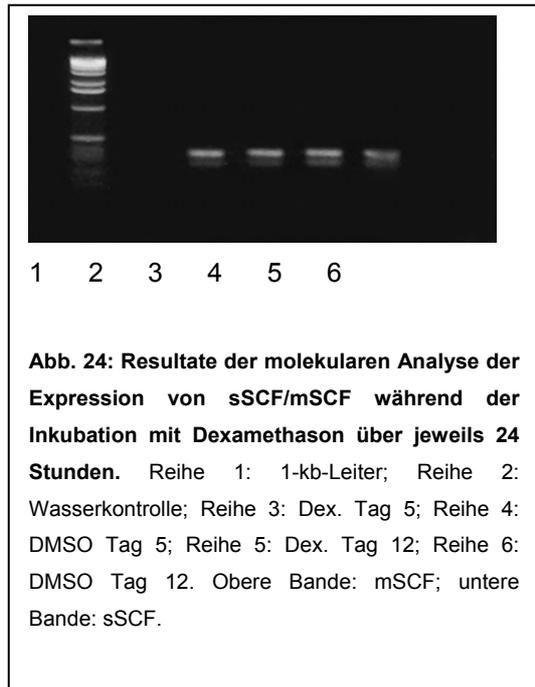
3.5.2.1 Produktion von sSCF/mSCF nach Inkubation mit RA über 11 Tage

Während der Inkubation von HaCaT-Zellen mit RA über 11 Tage (Dauerinkubation) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO eine deutlich stärkere Produktion von sSCF/mSCF (entspricht den Splicevarianten, s. o.), wie in Abb. 23 klar zu sehen ist. Auffällig ist darüber hinaus auch die höhere Expression der mRNA von mSCF gegenüber der mRNA von sSCF.



3.5.2.2 Produktion von sSCF/mSCF nach Inkubation mit Dexamethason über 24 h

Während der Inkubation von HaCaT-Zellen mit Dexamethason über jeweils 24 h war am Tag 5 kein Effekt nachzuweisen, am Tag 12 fiel eine im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO gleiche bzw. leicht verstärkte Produktion von sSCF/mSCF auf (s. Abb. 24).



Zur Übersicht sind die Ergebnisse noch einmal in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse zur sSCF/mSCF Expression

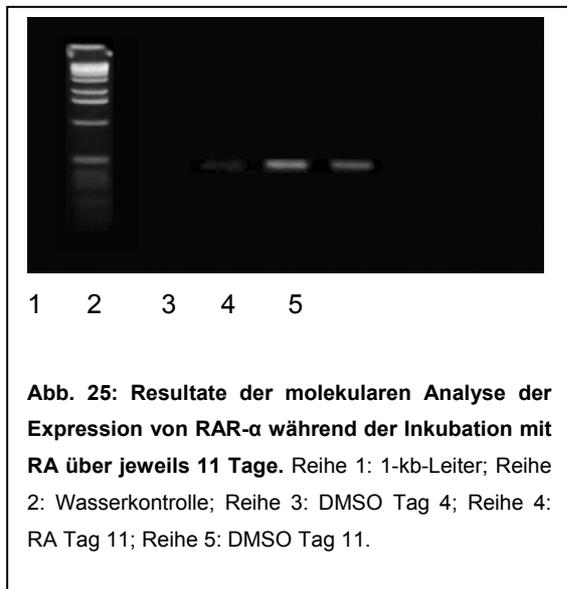
		Tag 4/5	Tag 11/12
RA 11 d	sSCF/mSCF (PCR)	↑↑	↑↑
Dex. 24 h	sSCF/mSCF (PCR)	↔	↑

3.6 All-Trans-Retinsäure Rezeptoren (RAR)

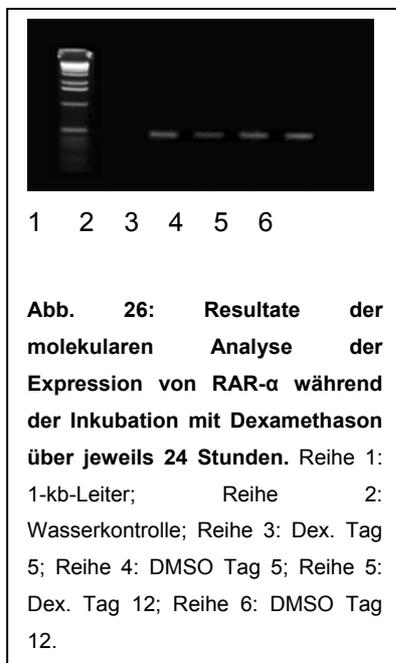
3.6.1 RAR- α

Während der Inkubation der HaCaT-Zellen mit Retinsäure über jeweils 24 h konnten wir eine Hochregulierung der mRNA des Retinsäure- α Rezeptors feststellen (nicht gezeigt); während der Inkubation mit RA über 11 Tage (Dauerinkubation) zeigte sich im Vergleich

zur Kontrolle mit DMSO ebenfalls eine Hochregulierung der mRNA des RAR- α Rezeptors (s. Abb. 25).



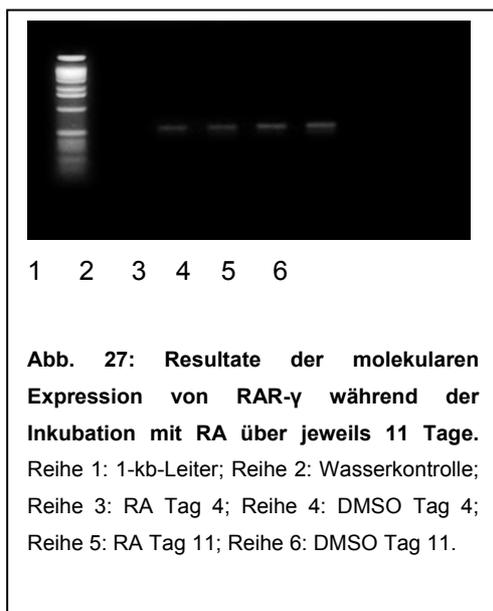
Dexamethason zeigt dagegen während der Inkubation mit HaCaT-Zellen keinen Effekt auf den RAR- α Rezeptor, unabhängig von der Dauer der Inkubation (s. Abb. 26).



HaCaT-Zellen sollen laut Literatur im Gegensatz zu humanen Keratinozyten den RAR- β exprimieren (Törmä H 1999). In diesen Untersuchungen ist es dagegen in keinem Fall (n=4) gelungen, diesen Rezeptortyp auf mRNA-Ebene nachzuweisen.

3.6.3 RAR- γ

In bezug auf den Retinsäure- γ -Rezeptor haben wir durch die Inkubation mit Retinsäure keinen signifikanten Effekt auf die Regulation dieses Rezeptors aufweisen können, wiederum unabhängig von der jeweiligen Dauer der Inkubation. Lediglich während der Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA über 11 Tage (Dauerinkubation) zeigte sich eine sehr schwache Hochregulation der Produktion des RAR- γ Rezeptors von Tag 4 zu Tag 11 (s. Abb. 27).



Während der Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason über jeweils 24 h wurde die Produktion des RAR- γ Rezeptors im Mittel um den Faktor 1.9 von Tag 5 zu Tag 12 hochreguliert. Im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO zeigte sich sowohl an Tag 5 als auch an Tag 12 nur eine schwache Hochregulierung der RAR- γ Rezeptor-Produktion (jeweils im Mittel um den Faktor 1.0; keine Abb. zu diesen Daten).

Zur Übersicht sind die Ergebnisse in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse zur mRNA Expression der RAR Rezeptoren

		Tag 4/5	Tag 11/12
RA 24 h	RAR- α	\leftrightarrow	\uparrow
	RAR- γ	\leftrightarrow	\leftrightarrow
RA 11 d	RAR- α	\leftrightarrow	\uparrow
	RAR- γ	\leftrightarrow	(\uparrow)
Dex. 24 h	RAR- α	\leftrightarrow	\leftrightarrow
	RAR- γ	(\uparrow)	(\uparrow)
Dex. 11 d	RAR- α	\leftrightarrow	\leftrightarrow

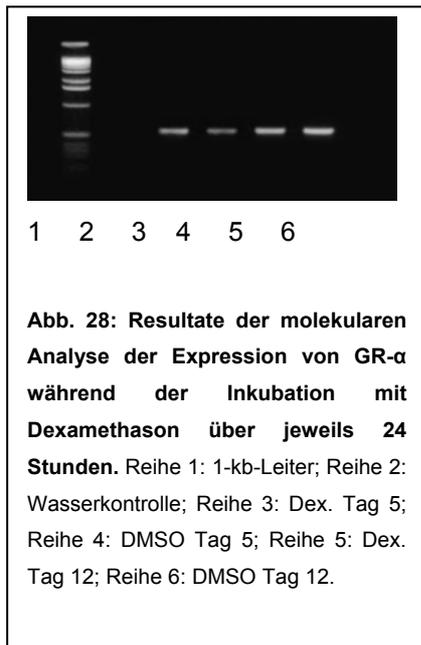
3.7 Glukokortikoid-Rezeptoren (GR)

3.7.1 GR- α

Unter der Behandlung (jeweils 24 h und Dauerinkubation) mit Retinsäure haben wir bei proliferierenden HaCaT-Zellen eine Hochregulierung der mRNA des GR- α Rezeptors nachweisen können, dagegen ergab sich bei den differenzierenden Zellen kein Hinweis auf eine Regulationsveränderung durch Retinsäure (nicht gezeigt).

Dexamethason erhöht die Expressierung des GR- α Rezeptors sowohl bei den proliferierenden als auch bei den differenzierenden Zellen während der Inkubation der HaCaT-Zellen über jeweils 24 h.

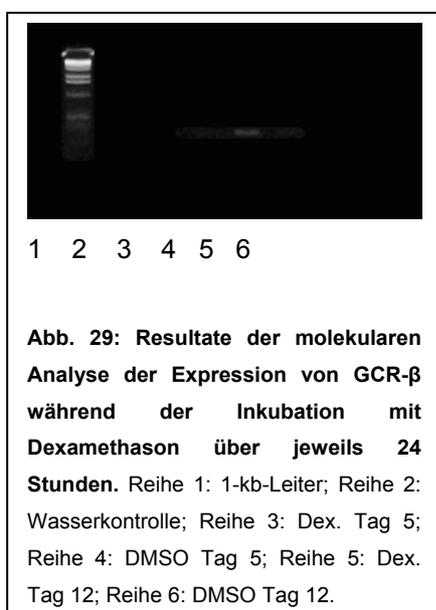
Dies war zum einen von Tag 5 zu Tag 12 zu sehen (im Mittel um den Faktor 1.8), zum anderen erfolgte am Tag 5 im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO eine starke Hochregulation (stärker auch als am Tag 12) der Expressierung des GR- α Rezeptors, im Mittel um den Faktor 1.2 im Vergleich zu 0.5 (s. Abb. 28).



3.7.2 GR- β

Bei der Inkubation mit Retinsäure (jeweils über 24 h und Dauerinkubation) konnten wir bei den proliferierenden HaCaT-Zellen keinerlei Effekt nachweisen. Auf die differenzierenden Zellen übte Retinsäure jedoch einen inhibierenden Effekt in bezug auf die mRNA Expression des Rezeptortyps GCR- β aus.

Während der Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason über 24 h erfolgt von Tag 5 zu Tag 12 eine schwache Hochregulierung der Expressierung des GCR- β Rezeptors, an Tag 12 auch im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO (s. Abb. 29).



Zur Übersicht sind die Ergebnisse in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 9 : Zusammenfassung der Daten zur mRNA Expression der GR-Rezeptoren

		Tag 4/5	Tag 11/12
RA 24 h	GR- α	↑	↔
	GCR- β	↔	↓
RA 11 d	GR- α	↑	↔
Dex. 24 h	GR- α	↑↑	↑
	GR- β	↔	(↑)

4. Diskussion

4.1 Zellwachstum der HaCaT-Zellen

Die Rolle und Funktion von humanen Keratinozyten ist gut untersucht. Die Zellen stellen den Hauptbestandteil der Oberhautzellen dar und durchlaufen auf ihrem Reifungsweg bis zur Abschilferung an der Hautoberfläche verschiedene Differenzierungs- und Proliferationsstufen (*Fuchs 1994*) (*Metcalfe DD 1997*) (*Möller A 1992*) (*Henz, Maurer et al. 2001*). Humane Keratinozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Physiologie und vor allem auch der Pathophysiologie des Menschen (s. u. a. Tabelle 2), wobei sie durch Produktion von diversen Wachstumsfaktoren und Zytokinen andersartige Zellen in ihrer nahen Umgebung beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (*Boukamp P 1988*) als Modell benutzt, um die Regulation der Expression des Stammzell-, Melanozyten- und Mastzellwachstumsfaktors (Stem Cell Factor, SCF) in proliferierenden versus differenzierenden Keratinozyten unter dem Einfluss von All-Trans-Retinsäure und Dexamethason zu untersuchen.

Als Modell für die vorliegenden Untersuchungen bot sich diese spontan immortalisierte Zelllinie dar, weil sie gegenüber den frisch von verschiedenen Spendern isolierten Keratinozyten reproduzierbarere und konsistentere Ergebnisse versprach. Die Zelllinie ist auch relativ stabil und durchlief selbst bei sehr hohen Passagezahlen (>300) weder eine maligne Transformation im Sinne von Tumorgenität, noch ließen sich zytogenetische Änderungen nachweisen (*Boukamp, Popp et al. 1997*).

Einzig auffälliger Unterschied zwischen den HaCaT-Keratinozyten und frischen humanen Keratinozyten besteht in der zeitlichen Ausbildung einer zusammenhängenden Zellschicht in Zellkultur: Dies geschieht bei letzteren nach durchschnittlich 6 Tagen, HaCaT-Keratinozyten benötigen dafür zwischen zwei und drei Wochen. Pivarcsi et al. konnten am Beispiel der Regulation von $\alpha 5$ -Integrin und Keratin 1 (K1) eindrucksvoll belegen, dass es zwischen frisch isolierten humanen Keratinozyten und HaCaT-Zellen einen sehr hohen Übereinstimmungsgrad in bezug auf Physiologie und Pathologie gibt (*Pivarcsi, Szell et al. 2001*).

Zusammenfassend sprechen all diese Befunde dafür, dass HaCaT-Zellen als Modell für humane Keratinozyten geeignet sind, auch wenn man kritisch anmerken muss, dass die

sterile Zellkultur nicht der natürlichen Situation im Zellverband eines komplexen Organismus entspricht.

Bei der kritischen Beurteilung der in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse muss konstatiert werden, dass die Effekte von RA und Dexamethason auf die Freisetzung von SCF aus HaCaT-Keratinocyten in diesen Untersuchungen schwach ausgefallen sind.

Um zu ermitteln, ob dies einen speziellen Aspekt der Zelllinie HaCaT darstellt oder allgemeine Gültigkeit hat, wäre für weitere Untersuchungen zur Regulation der Freisetzung von SCF unter dem Einfluss von Dexamethason und All-Trans Retinsäure die Durchführung mit frisch isolierten humanen Keratinocyten wünschenswert. In bezug auf die Inkubation der HaCaT-Zellen z. B. könnte damit ein Gegenüberstellen von in vivo und in vitro Bedingungen angestellt werden, da kultivierte Keratinocyten im Vergleich zu „frischen“ humanen Keratinocyten etwa viermal weniger RAR-Rezeptoren exprimieren (*Fisher and Voorhees 1996*).

Im Gegensatz dazu scheint es bei den Glukokortikoid-Rezeptoren GR- α und GR- β keine quantitativen Unterschiede zwischen frisch isolierten basalen Keratinocyten und HaCaT-Zellen zu geben (*Serres M 1996*).

Henseleit et al (*Henseleit U 1996*) konnten zeigen, dass sowohl Dexamethason als auch RA in HaCaT-Zellen keine Apoptose auslösen, obwohl beide Substanzen dafür bekannt sind, dies bei anderen Zelltypen zu tun (Dexamethason: z. B. bei Thymuszellen; RA: z. B. bei HL-(human leukemia)60-Zellen) (*Martin, Bradley et al. 1990*) (*Wyllie 1980*). Somit kann der Effekt auf die Zellzahl der HaCaT-Zellen beider Stoffe in unseren Untersuchungen untermauert werden, da für die Induktion evtl. durch Apoptose „ausfallende“ Zellen quasi ausgeschlossen werden können. Beide Substanzen (RA und Dexamethason) wurden in fast gleichen Konzentrationen wie in diesen eigenen Untersuchungen verwendet (RA 10^{-8} – 10^{-4} M, Dexamethason 10^{-9} – 10^{-5} M).

4.1.1 Charakterisierung der Differenzierung der HaCaT-Zellen durch K5

K5 wird nur von basalen, sich teilenden HaCaT-Zellen exprimiert (Keratin-Paar K5 K14). K5 wird mit zunehmender Differenzierung der HaCaT-Keratinocyten herunterreguliert. Wanner et al. konnten während der 21-tägigen Kultur von HaCaT-Zellen keine Erhöhung der mRNA-Level von K5 zeigen (Wanner, Panteleyev et al. 1996), während hingegen Olsen et al. und Gilfix et al. eine Reduzierung von K5 in der Kultur sahen (Fisher and Voorhees 1996) (Olsen, Rasmussen et al. 1995) (Gilfix and Eckert 1985). Im Einklang damit konnten Lee et al. vergleichbar bei humanen bronchialen Epithelzellen eine Inhibierung der Differenzierung nach Inkubation mit RA über 48 h aufzeigen (Lee HY 1996). Es kam im Verlauf der Differenzierung zur verminderten Expression der Differenzierungsmarker Involukrin und K5, was sich mit den hier beschriebenen Ergebnissen deckt: Sowohl nach Inkubation über 24 h als auch nach Dauerinkubation mit RA ist am Tag 11 bzw. 12 eine schwächere (ausgeprägter nach Dauerinkubation) Expression von K5 zu sehen.

4.2 Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA

Im Vergleich zu den Glukokortikoiden zeichnen sich Retinoid-vermittelte Signale durch eine viel größere Diversität aus, was unter anderem auf die größere Anzahl von Rezeptoren, ihre verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten und die Variabilität der betreffenden responsiven Elemente zurückzuführen ist (Leid, Kastner et al. 1992). RA wirkt in der Regel bei fast allen zellulären Systemen anti-proliferativ (Nagy, Thomazy et al. 1998).

Bei der Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA zeigte sich in bezug auf die Zellzahl am Tag 5 sowohl bei der Kurz- (=24 h) als auch bei der Dauerinkubation (über 11 Tage) eine Reduktion der Zellzahl (stärker bei Dauerinkubation). Am Tag 11 dagegen war bei der Kurzinkubation kein Effekt nachweisbar, bei der Dauerinkubation zeigte sich ebenfalls eine Inhibierung. Der antiproliferative Effekt von RA zeigt sich zusammenfassend bei der Kurzinkubation in der proliferativen Phase der HaCaT-Zellen, bei der Dauerinkubation in der proliferativen und der differenzierenden Phase, bzw. hier ist der in der proliferativen Phase sichtbare hemmende Effekt auch noch in der differenzierenden Phase zu sehen.

Dies ist konsistent mit den Daten von Wanner et al., die ebenfalls nach (Dauer-) Inkubation von HaCaT-Zellen mit RA (in der Konzentration von 1 μM) eine Abnahme der Zellzahl feststellen konnten, bedingt durch das Abschilfern von nicht mehr vitalen Zellen ins Medium aufgrund einer Abnahme des desmosomalen Cadherins (Wanner R 1999).

Der hemmende Effekt war dosisabhängig, d. h. mit steigender Dosierung (von 10^{-9} bis 10^{-5} M) war er stärker ausgeprägt. Zouboulis et al. konnten ebenfalls eine Suppression der Proliferation der HaCaT-Keratinocyten nach Zugabe von RA zeigen (Dauer der Inkubation zwischen 6 und 120 h) (Zouboulis, Seltmann et al. 1999). Auffällig hierbei war, dass sich der supprimierende Effekt am deutlichsten bei einer ganz bestimmten Konzentration ($10^{-9.5}$ – $10^{-8.5}$ M, was etwa der physiologischen Konzentration von RA in humanen Keratinocyten entspricht) zeigte, im Vergleich dazu die hohe Konzentration von 10^{-6} M einen weniger deutlichen Effekt hatte. Auffällig hierbei scheint auch, dass obwohl bereits nach 30 Minuten Inkubation mit RA eine im Vergleich zum Medium ca. 330-fach höhere intrazelluläre Konzentration von RA festzustellen ist, die Gesamtdauer der Inkubation durchaus eine Rolle zu spielen scheint (Chen, Sass et al. 2000).

Dies steht im Gegensatz zu Daten von Breitzkreutz et al., die eine – wenn auch schwache und nur bei niedrigen Konzentrationen (10^{-8} – 10^{-10}) – Verstärkung der Proliferation (= Tag 5) feststellen konnten (Breitzkreutz, Stark et al. 1993). Evtl. überwiegt bei höheren Konzentrationen der abnehmende Effekt von RA durch zahlenmäßig stärkeren Besetzungsgrad zum Rezeptor (Hautzellen v. a. RAR- γ als molekulare Zielstruktur); weiterhin wurden in den erwähnten Untersuchungen von Breitzkreutz zeitliche Unterschiede in der Inkubation (24 h versus Dauerinkubation) nicht berücksichtigt.

Andere Daten, die zwar nicht auf die Proliferation und Differenzierung der HaCaT-Zellen ausgerichtet waren, konnten bei Dauerinkubation und Kurzinkubation (auch bereits differenzierter Zellen) ebenfalls eine Inhibierung verschiedener Faktoren nachweisen (u. a. Aryl Hydrocarbon Rezeptor, AhR) (Wanner, Zhang et al. 1996) (Haase, Liesegang et al. 1997).

Es ist zu überlegen, inwieweit der RA-Gehalt von FCS als Mediumzugabe der Zellkultur (s. o. Methodik) die gewonnenen Ergebnisse beeinflusst (Fuchs and Green 1981). In humanem Serum (das mit FCS in der Zusammensetzung vergleichbar ist) beträgt die RA Konzentration ca. 10^{-9} M (entspricht etwa 10^{-10} M in Kultur); im Allgemeinen gilt für

die Effekte von RA, dass bei dieser Konzentration von 10^{-9} M Effekte eher als fraglich anzusehen sind, bei 10^{-6} M (i. S. einer Standarddosis) als sicher gelten, und bei 10^{-5} M bereits fraglich toxische Aspekte eine Rolle spielen (*Babina, Henz et al. 2003*).

Unterschiedliche Resultate in der Quantität oben beschriebener Untersuchungen bzw. deren Ergebnisse (s. u. a. Abb. 17) auf Protein- und mRNA-Ebene können u. a. auf folgenden Tatsachen beruhen: Es gibt von der mRNA bis hin zum Protein zahlreiche zwischengeschaltete Kontrollebenen, um hier nur als Beispiele die Translation und Prozessierung, den Transport zur Zellmembran und die Stabilität des Proteins zu nennen. Außerdem stellt die (RT-)PCR einen konkreten Zeitpunkt im Rahmen einer Messung dar, während der ELISA eine Akkumulation von Effekten beinhaltet.

In den hier dargestellten Untersuchungen konnten in bezug auf die SCF-Freisetzung unterschiedliche Effekte von RA gezeigt werden: Bei der Inkubation mit RA über 24 h ist am Tag 5 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene kein Effekt zu sehen, am Tag 12 zeigt sich auf Proteinebene eine Erhöhung der SCF-Freisetzung, auf mRNA-Ebene ist jedoch kein Effekt zu sehen. Bei der Dauerinkubation über 11 Tage ist am Tag 4 auf der Proteinebene im ELISA eine schwache Inhibierung nachzuweisen, die auf mRNA-Ebene nicht nachzuvollziehen war. Am Tag 11 dagegen sieht man auf Proteinebene eine schwache Erhöhung der SCF-Freisetzung, die ebenfalls auf mRNA-Ebene nicht nachzuweisen war.

Nach den Untersuchungen von Kligman et al. bewirkte die topische Applikation von 0.05% Tretinoin über einen längeren Zeitraum (2 – 10 Wochen) auf (unbestrahlte) haarlose Mäuse eine vermehrte Freisetzung von SCF (*Kligman LH 1996*); dies steht im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen, bei denen nach Dauerinkubation der HaCaT-Zellen mit RA ebenfalls eine (zumindest schwache) Erhöhung der SCF-Expression zu beobachten ist.

4.3 Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason

Glukokortikoide sind sehr potente Inhibitoren der normalen Proliferation und der Synthese physiologischer RNA bzw. von Proteinen bei (humanen) Keratinozyten.

Bei der Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason zeigten sich in bezug auf die Zellzahl unterschiedliche Effekte in der Kurz- und in der Dauerinkubation. Nach Inkubation über 24 Stunden (jeweils Tag 4 zu 5 und Tag 11 zu 12) war am Tag 5 kein

Effekt und am Tag 12 eine Herunterregulierung der Zellzahl zu sehen. Während der Dauerinkubation zeigte sich am Tag 4 eine schwache Erhöhung, am Tag 11 eine signifikante Erniedrigung der Zellzahl. Wie auch bei Gingras et al (*Gingras, Turgeon et al. 2003*) konnte in den vorliegenden Untersuchungen zum Teil bestätigt werden, dass Dexamethason einen Hemmeffekt u. a. auf die Proliferation von HaCaT-Zellen ausübt. Auf die Freisetzung von SCF aus HaCaT-Keratinocyten hat Dexamethason sowohl in der Kurz-, als auch in der Dauerinkubation einen stark inhibierenden Effekt (signifikant bis hoch signifikant). Im Unterschied dazu ist bei Lungen-Fibroblasten nach Inkubation mit Budenosid und Dexamethason zunächst ebenfalls ein abnehmender Effekt (sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene) zu sehen, dann aber nach längerer Zeit (24 – 72 Stunden) eine verstärkte SCF-Freisetzung (*Kassel O 1998*). Diese Ergebnisse zeigten darüber hinaus eine Konzentrationsabhängigkeit. Eine Voraussetzung für die Suppression des SCF durch Dexamethason ist der Vorgang der Translokation: Nach Inkubation mit Dexamethason kommt es durch Aktivierung des Rezeptors (GR- α und $-\beta$) zur Translokation des Rezeptors in den Nukleus (konsistent mit den unter 4.7 beschriebenen eigenen Resultaten, weitere Vorgänge im Zellkern bleiben unbekannt). Finotto et al. zeigten nach Inkubation (auch von Fibroblasten) mit Dexamethason eine Herunterregulierung von SCF auf mRNA- und Protein-Ebene (*Finotto S 1997*), die konzentrationsabhängig war (0.1 und 1.0 μ M). In diesen Untersuchungen zeigten sich dabei in der Kurzinkubation Unterschiede zwischen der Protein- und der mRNA-Ebene: Auf Proteinebene ist am Tag 5 und Tag 12 eine Inhibierung zu sehen, während sich auf der mRNA-Ebene an beiden Tagen eine Erhöhung zeigt (am Tag 12 stärker als am Tag 5). Unterschiede auf der Protein- und der mRNA-Ebene können durch verschiedene Faktoren verursacht sein, die bereits an früherer Stelle erläutert wurden (s. 4.2).

4.4 Produktion von sSCF/mSCF

Die Signalvermittlung von sSCF/mSCF (das wie oben beschrieben dem sSCF und mSCF entspricht) geschieht auf unterschiedlichen Ebenen. Nach Ligandenbindung und der dadurch initiierten Kaskade der Signaltransduktion erfolgen u. a. die Autophosphorylierung von Tyrosin in der zytoplasmatischen Domäne (s. o.). Bei sSCF geschieht dies sehr schnell innerhalb von Minuten, was wiederum zu einem Nachlassen der Phosphorylierung selbst führt. Gleichzeitig kommt es zur Rezeptor Internalisierung

und Endozytose (Smith, Pallister et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung beim mSCF dauerhafter aufgrund von Rezeptor Stabilität und nicht (in diesem Maße) erfolgreicher Internalisierung (Smith, Court et al. 2001). mSCF bewirkt im Vergleich mit sSCF eine stärkere Aktivität der Kinase, eine langsamere Herabregulierung und verstärkte Stabilisierung des SCF-Rezeptors c-Kit an der Zelloberfläche (Lyman and Jacobsen 1998). Diese Effekte könnten auf der schnelleren Internalisierung des löslichen SCF-Liganden-Komplexes beruhen, die wiederum eine erhöhte Tyrosin-Kinase Aktivität zur Folge hat.

In diesen Untersuchungen zeigte sich nach Inkubation der HaCaT-Zellen mit RA über 11 Tage (Dauerinkubation) sowohl an Tag 4 als auch an Tag 11 ein deutlicher Anstieg von sSCF/mSCF.

Nach Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason über 24 Stunden (Kurzinkubation) sieht man an Tag 5 keinen Effekt, an Tag 12 ist ein Anstieg von sSCF/mSCF zu beobachten, wobei wie zu erwarten der Effekt bei mSCF sehr viel deutlicher ausfällt als bei sSCF (s. Abb. 24, Resultateteil).

Im Unterschied zu den bisher gezeigten Ergebnissen von sSCF/mSCF war bei der Inkubation mit RA über 11 Tage (Dauerinkubation) sowohl am Tag 4 als auch Tag 11 kein Effekt in bezug auf das Gesamt-SCF zu beobachten. Hingegen sah man bei der Inkubation mit Dexamethason über 24 Stunden (Kurzinkubation) ähnliche Resultate beim Gesamt-SCF wie beim sSCF/mSCF, nur fielen diese Ergebnisse deutlicher aus, d. h. am Tag 5 eine schwache Erhöhung, am Tag 12 eine stärkere Expression von Gesamt-SCF (im Vergleich zu Tag 5 und zu sSCF/mSCF).

Die teils gegensätzlichen Ergebnisse zwischen Gesamt-SCF und sSCF/mSCF könnten, wie bereits oben beschrieben, zum einen durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit im Nachweisverfahren für das Gesamt-Protein und dessen Splicevarianten bedingt sein, zum anderen spielen wohl auch hier die verschiedenen Kontrollebenen zwischen Translation und Transkription eine Rolle.

4.5 Expression von RAR-Rezeptoren

Wie auf Seite 22 ff (Resultateteil) dargestellt, ist die erhöhte Expression von RAR- α und RAR- γ durch RA selbst schwach und nur an Tag 11 (Kurz- und Dauerinkubation) nachzuweisen, obwohl bei transdermaler Aufnahme von therapeutischer RA (0.1%) in einer Cremegrundlage eine Erhöhung von RA-Spiegeln bzw. RAR- γ als Hauptziel-

Rezeptor von RA in den behandelten Arealen zu sehen ist (Duell, Astrom et al. 1992) (Elder, Fisher et al. 1991). Dies könnte an der raschen Resorption und dem ausgeprägten Metabolismus von RA liegen: Nach Randolph et al. werden ca. 85% von RA in nicht identifizierbare polare Komponenten metabolisiert (Randolph and Simon 1997). HaCaT-Zellen metabolisieren Retinol sehr schnell zu Retinyl-Estern, weshalb im zeitlichen Verlauf nur geringe Spiegel von Retinol nachweisbar sind; weiterhin induziert RA in vivo die eigene Inaktivierung mittels der RA 4-Hydroxylase (Marikar Y 1998), während in vitro kaum ein Effekt durch zusätzlich zugegebene RA nachweisbar ist (Zouboulis, Seltmann et al. 1999). Zudem konnten Fisher et al. zeigen, dass die Proteinlevel von RXR im Vergleich zu RAR etwa fünffach höher liegen, so dass eventuelle Effekte von RA wahrscheinlich über letztere Rezeptoren vermittelt wurden (Fisher, Talwar et al. 1994). Physiologische Effekte von Retinoiden werden mittels eines Komplexes aus RAR/RXR (Retinoid-X-Rezeptoren) vermittelt (Fisher and Voorhees 1996).

Der quantitative Unterschied der RAR-(γ) Level auf Protein- und mRNA-Ebene könnte auch am bereits beschriebenen negativen Feedback-Mechanismus von RA auf die eigenen Rezeptoren liegen, wie Boudjelal et al. zeigen (Boudjelal, Voorhees et al. 2002). Boudjelal et al. konnten nach Inkubation von HaCaT-Zellen mit RA (All-Trans-) über 24 Stunden eine Reduzierung der RAR- γ und RXR- α -Rezeptoren auf Proteinebene um die Hälfte zeigen, die auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar war.

RAR- β konnte in den beschriebenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden (s. o.), auch nicht nach Stimulation mit RA (24 h und Dauerinkubation). Ähnliche Ergebnisse sahen Fisher et al., die RAR- β ebenfalls weder in vivo noch in vitro nach Inkubation mit RA detektieren konnten (Fisher and Voorhees 1996). Dies geht weiterhin einher mit Ergebnissen von Elder et al. (Elder, Fisher et al. 1991), die eine zahlenmäßige Erhöhung von RAR- β in Fibroblasten, nicht aber in Keratinozyten zeigen konnten. Shang et al. und von Lotan et al. konnten nach Inkubation mit (Iso-) Tretinoin eine Hochregulation des RAR- β Rezeptors zeigen. Allerdings wurden in deren Experimenten prä-maligne und maligne Zellen aus oralen Läsionen bzw. aus einer Brustkrebs-Zelllinie verwendet (Lotan, Xu et al. 1995) (Shang, Baumrucker et al. 1999). RAR- β ist insgesamt in einem zellulären System reguliert (Babina, Mammeri et al. 2001).

4.6 Expression von GR-Rezeptoren

Frisch isolierte basale Keratinozyten exprimieren die beiden Glukokortikoid-Rezeptoren in gleicher Höhe wie HaCaT-Keratinozyten (*Serres M 1996*). Dabei werden die GR-Rezeptoren v. a. in proliferativen Zellen exprimiert, in differenzierenden Zellen geschieht dies weitaus schwächer. Dies deckt sich mit den beschriebenen eigenen Untersuchungen: Nach Inkubation der HaCaT-Zellen mit Dexamethason über 24 Stunden (Kurzinkubation) zeigt sich eine am Tag 5 im Vergleich zum Tag 12 stärkere Erhöhung des GR- α ; bei GR- β ist am Tag 5 kein Effekt, am Tag 12 aber eine schwache Erhöhung zu sehen. Da GR- β ohnehin eine hemmende Funktion in bezug auf GR- α ausübt, sind die Resultate aufgrund der Physiologie erklärbar.

4.7 Fazit

Humane Keratinozyten stellen die wichtigste Komponente des größten Organes des menschlichen Körpers, nämlich der Haut dar. Mithilfe von anderen Zellen in ihrer Mikroumgebung vermitteln sie die Interaktion des Körpers mit seiner Umwelt. Dies geschieht, indem Keratinozyten eine Vielzahl von Mediatoren produzieren, unter anderem auch SCF als zentralem Wachstumsfaktor für Mastzellen in der Dermis und Melanozyten in den Basalschichten der Epidermis.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf zwei in der Dermatologie relativ lange bekannte, physiologisch im Körper produzierte und aktive sowie auch therapeutisch eingesetzte Substanzen gerichtet, nämlich auf Retinoide und Kortikoide, im letzteren Falle exemplarisch auf Dexamethason. Retinoide werden erfolgreich bei Akne vulgaris, Ichthyosen und Psoriasis, Kortikoide bei einer Vielzahl entzündlicher Prozesse eingesetzt. Die hier vorliegenden Resultate zeigen eine modulatorische Wirkung beider Substanzen sowohl auf mRNA-, Protein- und Rezeptorebene, obwohl die in vitro erhobenen Befunde allerdings nicht dramatisch sind. Sie deuten jedoch zweifellos auf eine Kontrolle der SCF Produktion durch diese Stoffe in Keratinozyten unter physiologischen Bedingungen hin und mögen zudem zumindest teilweise erklären, warum es unter therapeutischen Bedingungen zu klinisch beobachteten Änderungen der Anzahl und Funktion der durch SCF kontrollierten Zielzellen kommt.

5. Zusammenfassung

Der humane Stammzellfaktor (SCF) ist ein zentraler Wachstumsfaktor für Mastzellen in der Dermis und für Melanozyten in den Basalzellschichten der Epidermis. Er wird von zahlreichen Zellen des menschlichen Organismus produziert, u. a. von Keratinozyten, und ist auf dem Chromosom 12 kodiert.

In dieser Arbeit wurde die mögliche Regulation der Expression von SCF aus Keratinozyten durch All-Trans-Retinsäure (RA) und Dexamethason in vitro untersucht.

Als Modell für humane Keratinozyten wurde die spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT benutzt. RA und Dexamethason sind physiologisch beim Menschen vorkommende Substanzen und werden seit relativ langer Zeit in der Dermatologie systemisch und topisch eingesetzt.

Die HaCaT Zellen wurden mit den beiden o. g. Substanzen über 24 h **und** 11 Tage in Konzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-9} M inkubiert. Im Anschluss erfolgte sowohl die photospektrometrische Auswertung der SCF Produktion, als auch die Bestimmung auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Dabei standen zum einen die Zellzahl der HaCaT Zellen an sich, aber auch das Gesamtprotein SCF, dessen Splicevarianten (mSCF, sSCF) und die bekannten Rezeptoren von RA (RAR- α , - β , - γ) und von Dexamethason bzw. von Glukokortikoiden (GR- α , - β) im Fokus.

Dabei ergaben sich folgende Resultate: RA bewirkt einen Anstieg von SCF, Dexamethason bei Kurzinkubation eine deutliche Zunahme von SCF, bei Dauerinkubation einen starken Abfall.

Die RA-Rezeptoren RA- α und - γ waren nach Inkubation mit RA verstärkt nachzuweisen; die Glukokortikoid-Rezeptoren GR- α und - β zeigten nach Inkubation mit Dexamethason ebenfalls eine vermehrte Expression.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Kontrolle der Expression bzw. Freisetzung von SCF aus Keratinozyten durch RA und Dexamethason unter physiologischen Bedingungen, mit Implikationen für die unter therapeutischen Bedingungen beobachtete klinische Wirkung dieser Substanzen insbesondere bei dermatologischen Erkrankungen.

6. Literaturverzeichnis

- **Artuc, M., Hermes B., Steckelings, U. M., Grützkau, A., Henz, B. M.** Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing – active participants or innocent bystanders (1999)? *Exp Dermatol* 8(1): 1-16.
- **Babina, M., Henz B. M., Mammeri, K.** All-trans retinoic acid down-regulates expression and function of beta2 integrins by human monocytes: opposite effects on monocytic cell lines (2003). *Eur J Immunol* 33(3): 616-25.
- **Babina, M., Mammeri, K., Henz, B. M., Maurer, M., Lippert, U., Worm, M.** Retinoic acid up-regulates myeloid ICAM-3 expression and function in a cell-specific fashion – evidence for retinoid signalling pathways in the mast cell lineage (2001). *J Leukoc Biol* 69(3): 361-72.
- **Bamberger, C. M. and Chrousos G. P.** The glucocorticoid receptor and RU486 in man (1995). *Ann N Y Acad Sci* 761: 296-310.
- **Bikle, D. D., Gee, E., Pillai, S.** Regulation of keratinocyte growth, differentiation, and vitamin D metabolism by analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D (1993). *J Invest Dermatol* 101(5): 713-8.
- **Boudjelal, M., Voorhees, J. J., Fisher, G. J.** Retinoid signaling is attenuated by proteasome-mediated degradation of retinoid receptors in human keratinocyte HaCaT cells (2002). *Exp Cell Res* 274(1): 130-7.
- **Boukamp, P., Popp, S. et al.** Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT (1997). *Genes Chromosomes Cancer* 19(4): 201-14.
- **Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E.** Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line (1988). *J Cell Biology* 106: 761-71.
- **Breitkreutz, D., Stark, H. J., Plein, P., Baur, M., Fusenig, N. E.** Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺ (1993). *Differentiation* 54(3): 201-17.

- **Broudy, V. C.** Stem cell factor and hematopoiesis (1997). *Blood* 90(4): 1345-64.
- **Chen, W. C., Sass, O., Seltmann, H., Nau, H., Orfanos, C. E., Zouboulis, C. C.** Biological effects and metabolism of 9-cis-retinoic acid and its metabolite 9,13-di-cis-retinoic acid in HaCaT keratinocytes in vitro: comparison with all-trans-retinoic acid (2000). *Arch Dermatol Res* 292(12): 612-20.
- **Chu, A. C., Morris, J. F.** The Keratinocyte. In: *Skin Immune System (SIS)*, Bos J. D. ed., CRC Press, Boca Raton, New York, 2nd ed., 1997, pp. 43-57.
- **Copeland, N. G., Gilbert, D. J. et al.** Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles (1990). *Cell* 63(1): 175-83.
- **Deucher, A., Efimova, T., Eckert, R. L.** Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC)alpha and PKCdelta (2002). *J Biol Chem* 277(19): 17032-40.
- **Dippel, E., Haas, N., Grabbe, J., Schadendorf, D., Hamann, K., Czarnetzki, B. M.** Expression of the c-Kit receptor in hypomelanosis : a comparative study between piebaldism, naevus depigmentosus and vitiligo (1995). *Br J Dermatol* 132(2): 182-9.
- **Duell, E. A., Astrom, A., Griffiths, C. E., Chambon, P., Voorhees, J. J.** Human skin levels of retinoic acid and cytochrome P-450-derived 4-hydroxyretinoic acid after topical application of retinoic acid in vivo compared to concentrations required to stimulate retinoic acid receptor-mediated transcription in vitro (1992). *J Clin Invest* 90(4): 1269-74.
- **Eckert, R. L. und Green, H.** Structure and evolution of the human involucrin gene (1986). *Cell* 46(4): 583-9.
- **Ehrlich, P.** Beiträge zur Kenntnis der Quilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik (1877). *Arch Mikros Anat* 13: 263-7.
- **Elder, J. T., Fisher, G. J. et al.** Retinoic acid receptor gene expression in human skin (1991). *J Invest Dermatol* 96(4): 425-33.
- **Evans, R. M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily (1988). *Science* 240(4854): 889-95.

- **Feger, F., Ribadeau Dumas, A., Leriche, L., Valent, P., Arock, M.** Kit and c-Kit mutations in mastocytosis : a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts (2002). *Int Arch Allergy Immunol* 127(2): 110-4.
- **Finotto, S., Mekori, Y. A., Metcalfe, D. D.** Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-Kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems (1997). *J Clin Invest* 99(7): 1721-8.
- **Fisher, G. J., Talwar, H. S. et al.** Immunological identification and functional quantitation of retinoic acid and retinoid X receptor proteins in human skin (1994). *J Biol Chem* 269(32): 20629-35.
- **Fisher, G. J. und Voorhees, J. J.** Molecular mechanisms of retinoid actions in skin (1996). *Faseb J* 10(9): 1002-13.
- **Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. M., Austen, K. F.** Dermatology in General Medicine, Fifth Edition (1999). *McGraw-Hill Inc.*
- **Fritsch, P.** Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas (2004). *Springer Verlag.*
- **Fuchs, E.** Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation (1988). *Trends Genet* 4(10): 277-81.
- **Fuchs, E.** Epidermal differentiation and keratin gene expression (1994). *Princess Takamatsu Symp* 24: 290-302.
- **Fuchs, E. und Green, H.** Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A (1981). *Cell* 25(3): 617-25.
- **Fuller, P. J.** The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity (1991). *Faseb J* 5(15): 3092-9.
- **Gadd, S. J. und Ashman, L. K.** A murine monoclonal antibody specific for a cell-surface antigen expressed by a subgroup of human myeloid leukaemias (1985). *Leuk Res* 9(11): 1329-36.
- **Ghahary, A., Marcoux, Y., Karimi-Busheri, F., Tredget, E. E.** Keratinocyte differentiation inversely regulates the expression of involucrin and transforming growth factor beta1 (2001). *J Cell Biochem* 83(2): 239-48.
- **Gilfix, B. M. und Eckert, R. L.** Coordinate control by vitamin A of keratin gene expression in human keratinocytes (1985). *J Biol Chem* 260(26): 14026-9.

- **Gingras, S., Turgeon, C., Brochu, N., Soucy, P., Labrie, F., Simard, J.** Characterization and modulation of sex steroid metabolizing activity in normal human keratinocytes in primary culture and HaCaT cells (2003). *J Steroid Biochem Mol Biol* 87(2-3): 167-79.
- **Grabbe, J., Haas, N., Czarnetzki, B. M.** The mast cell (1994). *Hautarzt* 45(1): 55-63; quiz 64.
- **Grabbe, J., Welker, P., Dippel, E., Czarnetzki, B. M.** Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes (1994). *Arch Dermatol Res* 287(1): 78-84.
- **Grabbe, J., Welker, P. et al.** Release of Stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells (1996). *J Invest Dermatol* 107(2): 219-24.
- **Grützkau, A., Krüger-Krasagakes, S. et al.** Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206 (1998). *Mol Biol Cell* 9 (4): 875-84.
- **Haase, I., Liesegang, C., Henz, B. M., Rosenbach, T.** Retinoid acid attenuates phospholipase C-mediated signaling in HaCaT keratinocytes (1997). *Arch Dermatol Res* 289(9): 533-9.
- **Hartmann, K. und Henz, B. M.** Mastocytosis: recent advances in defining the disease (2001). *Br J Dermatol* 144(4): 682-95.
- **Henseleit, U., Rosenbach, T., Kolde, G.** Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes (1996). *Arch Dermatol Res* 288: 676-83.
- **Henz, B. M., Maurer, M., Lippert, U., Worm, M., Babina, M.** Mast cells as initiators of immunity and host defense (2001). *Exp Dermatol* 10(1): 1-10.
- **Hermes, B., Feldmann-Boddeker, I. et al.** Altered expression of mast cells chymase and tryptase and of c-Kit in human cutaneous scar tissue (2000). *J Invest Dermatol* 114(1): 51-5.
- **Hermes, B., Welker, P. et al.** Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars (2001). *J Invest Dermatol* 116(3): 387-93.

- **Hong, W. K., Benner, S. E., Lippmann, S. M.** Evolution of aerodigestive tract 13-cis-retinoid acid chemoprevention : the M. D. Anderson experience (1994). *Leukemia 8 Suppl 3: S33-7.*
- **Huang, E., Nocka, K. et al.** The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-Kit receptor, the gene product of the W locus (1990). *Cell 63(1): 225-33.*
- **Inui, S., Lee, Y. F., Haake, A. R., Goldsmith, L. A., Chang, C.** Induction of TR4 orphan receptor by retinoic acid in human HaCaT keratinocytes (1999). *J Invest Dermatol 112(4): 426-31.*
- **Kameyoshi, Y., Morita, E., Tanaka, T., Hiragun, T., Yamamoto, S.** Interleukin-1alpha enhances mast cell growth by a fibroblast-dependent mechanism (2000). *Arch Dermatol Res 292: 240-47.*
- **Kassel, O., Schmidlin, F., Duvernelle, C., de Blay, F., Frossard, N.** Up- and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor stem cell factor by human lung fibroblasts in culture (1998). *Mol Pharmacol 54(6): 1073-9.*
- **Kehe, K., Abend, M., Kehe, K., Ridi, R., Peter, R. U., van Beuningen, D.** Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line (1999). *Arch Dermatol Res 291(11): 600-5.*
- **Kitamura, Y., Go, S., Hatanaka, K.** Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation (1978). *Blood 52(2): 447-52.*
- **Kligman, L. H. und Murphy, G. F.** Topical tretinoin increases dermal mast cells, induces epidermal mast cell growth factor (c-Kit ligand) and modulates its distribution in hairless mice (1996). *Arch Dermatol Res 228: 537-42.*
- **Lee, H. Y., Dawson, M. I. et al.** Retinoic acid receptor- and retinoid X Receptor-selective retinoids activate signaling pathways that converge on AP-1 and inhibit squamous differentiation in human bronchial epithelial cells (1996). *Cell Growth and Differentiation 7: 997-1004.*
- **Lehman, T. A., Modali, R. et al.** p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines (1993). *Carcinogenesis 14(5): 883-9.*
- **Leid, M., Kastner, P., Chambon, P.** Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signaling pathways (1992). *Trends Biochem Sci 17(10): 427-33.*

- **Lotan, R., Xu, X. C. et al.** Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin (1995). *N Engl J Med* 332(21): 1405-10.
- **Lyman, S. D. und Jacobsen S. E.** c-Kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities (1998). *Blood* 91 (4): 1101-34.
- **Marikar, Y., Wang, Z. Q., Duell, E. A., Petkovich, M., Voorhees, J. J., Fisher, G. J.** Retinoic acid receptors regulate expression of retinoic acid 4-hydroxylase that specifically inactivates all-trans retinoic acid in human keratinocyte HaCaT cells (1998). *J Invest Dermatol* 111(3): 434-39.
- **Marti, S. J., Bradley, J. G., Cotter, T. G.** HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis (1990). *Clin Exp Immunol* 79 (3): 448-53.
- **Maurer, M., Wedemeyer, J. et al.** Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity (2004). *Nature* 432 (70169): 512-6.
- **Metcalfe, D. D., Baram, D., Mekori, Y. A.** Mast Cells (1997). *Physiol Rev* 77(4): 1033-79
- **Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R.** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells (1982). *Cell* 31(1): 11-24.
- **Möller, A. und Czarnetzki, B. M.** Ontogenese und Funktion der Mastzelle. Ätiopathogenese, Diagnostik und Therapie des Asthma bronchiale (1992). *Pneumologisches Kolloquium* 7: 37-45
- **Morita, E., Lee, D. G., Sugiyama, M., Yamamoto, S.** Expression of c-Kit ligand in human keratinocytes (1994). *Arch Dermatol Res* 286: 273-77.
- **Motta, S., Monti, M., Caretti, A., Ghidoni, R.** Influence of topical tretinoin on skin lipid production in vivo (1998). *Arch Dermatol Res* 290(8): 450-2.
- **Muller, M. und Renkawitz, R.** The glucocorticoid receptor (1991). *Biochim Biophys Acta* 1088(2): 171-82.
- **Mullis, K., Faloona, F. et al.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction (1986). *Biotechnology* 24(8): 17-27.
- **Nagy, L., Thomazy, V. A., Heymann, R. A., Davies, P. J.** Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues (1998). *Cell Death Differ* 5(1): 11-9.

- **Olsen, E., Rasmussen, H. H., Celis, J. E.** Identification of proteins that are abnormally regulated in differentiated cultured human keratinocytes (1995). *Electrophoresis* 16(12): 2241-48.
- **Orlando, C., Pinzani, P., Pazzagli, M.** Developments in quantitative PCR (1998). *Clin Chem Lab Med* 36(5): 255-69.
- **Pivarcsi, A., Szell, M., Kemeny, L., Dobozy, A., Bata-Csorgo, Z.** Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes (2001). *Arch Dermatol Res* 293(4): 206-13.
- **Randolph, R. K. und Simon, M.** Metabolism of all-trans-retinoic acid by cultured human epidermal keratinocytes (1997). *J Lipid Res* 38(7): 1374-83.
- **Ryle, C. M., Breitzkreutz, D. et al.** Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones (1989). *Differentiation, Ontogeny and Neoplasia* 40: 42-54.
- **Schoop, V. M., Mirancea, N., Fusenig, N. E.** Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts (1999). *J Invest Dermatol* 112(3): 343-53.
- **Seewaldt, V. L., Johnson, B. S., Parker, M. B., Collins, S. J., Swisshelm, K.** Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoid acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells (1995). *Cell Growth Differ* 6(9): 1077-88.
- **Serres, M., Viac, J., Schmitt, D.** Glucocorticoid receptor localization in human epidermal cells (1996). *Arch Dermatol Res* 288(3): 140-6.
- **Shang, Y., Baumrucker, C. R., Green, M. H.** Signal relay by retinoic acid receptors alpha and beta in the retinoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells (1999). *J Biol Chem* 274(25): 18005-10.
- **Smith, M., Court, E. L., Smith, J. G.** Stem cell factor: laboratory and clinical aspects (2001). *Blood Rev* 15(4): 191-7.
- **Smith, M. A., Pallister, C. J., Smith, J. G.** Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice (2001). *Acta Haematol* 105(3): 143-50.

- **Spiegelman, V. S., Budunova, I. V., Carbajal, S., Slaga, T. J.** Resistance of transformed mouse keratinocytes to growth inhibition by glucocorticoids (1997). *Mol Carcinog* 20(1): 99-107.
- **Staines, N., Brostoff, J., James, K.** Immunologisches Grundwissen, 2. Auflage (1994), *Gustav Fischer Verlag*.
- **Steinert, P. M., Marekov, L. N., Parry, D. A. D.** Conservation of the structure of keratin intermediate filaments: molecular mechanism by which different keratin molecules integrate into preexisting keratin intermediate filaments during differentiation (1993). *Biochem* 32: 10046-56.
- **Strickland, I., Kisich, K. et al.** High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids (2001). *J Exp Med* 193(5): 585-93.
- **Taylor, W. E., Najmabadi, H. et al.** Human stem cell factor promoter deoxyribonucleic acid sequence and regulation by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in a Sertoli cell line (1996). *Endocrinology* 137(12): 5407-14.
- **Törmä, H., Rollman, O., Vahlquist, A.** The vitamin A metabolism and expression of retinoid-binding proteins differ in HaCaT cells and normal human keratinocytes (1999). *Arch Dermatol Res* 291(6): 339-45.
- **Tur, E., Hohl, D., Jetten, A., Panizzon, R., Frenk, E.** Modification of late epidermal differentiation in photoaged skin treated with topical retinoic acid cream (1995). *Dermatology* 191(2): 124-8.
- **Wanner, R., Brommer, S., Czarnetzki, B. M., Rosenbach, T.** The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoid acid (1995). *Biochem Biophys Res Commun* 209(2): 706-11.
- **Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. M., Rosenbach, T.** Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only (1996). *Biochim Biophys Acta* 1317(2): 105-11.
- **Wanner, R., Zhang, J., Henz, B. M., Rosenbach, T.** AP-2 gene expression and modulation by retinoic acid during keratinocyte differentiation (1996). *Biochem Biophys Res Commun* 223(3): 666-9.

- **Wanner, R., Förster, H. H., Tilmans, I., Mischke, D.** Allelic variations of human keratins K4 and K5 provide polymorphic markers within the type II keratin gene cluster on chromosome 12 (1993). *J Invest Dermatol* 100(6): 735-41.
- **Wanner, R., Wolff, B., Glowacki, F., Kolde, G., Wittig, B.** The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCaT keratinocyte differentiation (1999). *Arch Dermatol Res* 291(6): 346-53.
- **Watt, F. M. und Green, H.** Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures (1981). *J Cell Biol* 90(3): 738-42.
- **Welker, P., Schadendorf, D., Artuc, M., Grabbe, J., Henz, B. M.** Expression of SCF splice variants in human melanocytes and melanoma cell lines: potential prognostic implications (2000). *Br J Cancer* 82(8): 1453-8.
- **Weninger, W., Rendl, M., Mildner, M., Tschachler, E.** Retinoids downregulate vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor production by normal human keratinocytes (1998). *J Invest Dermatol* 111(5): 907-11.
- **Wyllie, A. H.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation (1980). *Nature* 284 (5756): 555-6.
- **Younus, J. und Gilchrist, B. A.** Modulation of mRNA levels during human keratinocyte differentiation (1992). *J Cell Physiol* 152: 232-39.
- **Ziegler, A., Jonason, A. S. et al.** Sunburn and p53 in the onset of skin cancer (1994). *Nature* 372(6508): 773-6.
- **Ziegler, A., Leffell, D. J. et al.** Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. PG – 4216-20 (1993). *Proc Natl Acad Sci USA* 90(9).
- **Zouboulis, C. C., Seltmann, H. et al.** Retinoid signaling by all-trans retinoic acid and all-trans retinoyl-beta-D-glucuronide is attenuated by simultaneous exposure of human keratinocytes to retinol (1999). *J Invest Dermatol* 112(2): 157-64.
- **Zsebo, K. M., Wypych, J. et al.** Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver – conditioned medium (1990). *Cell* 63(1): 195-201.

7. Danksagung

Bei Frau PD Dr. Pia Welker möchte ich mich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in den Laboren der Hautklinik Charité Campus Virchow Klinikum der Universitätsmedizin Berlin und für die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Besonders danke ich auch Frau Prof. Dr. Beate Henz, die mich über einen langen Zeitraum sehr intensiv, immer wieder spontan und über das eigentlich Übliche hinaus ebenfalls betreut hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen, die mir beim Erlernen von verschiedenen Methoden im Labor geholfen haben. Mein besonderer Dank gilt hier (alphabetisch) Dr. Magda Babina, Sven Guhl und besonders Regina Nordheim. Die angenehme Atmosphäre im Labor sowie die ausgeprägte Hilfsbereitschaft und Kommunikation aller hat sehr zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern, als Dank für die allumfassende Unterstützung.

Vielen Dank!

8. Erklärung

„Ich, Christian Kors, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Die Regulation der Freisetzung von SCF aus proliferierenden versus differenzierenden Keratinozyten HaCaT“

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.“