

Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen

vorgelegt von

Dorette Christel Else Monika Spötter

aus

Freudenberg/Nordrhein-Westfalen

Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dorette Christel Else Monika Spötter

aus

Freudenberg/Nordrhein-Westfalen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
 Dr. med. Hans F. Merk

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Joachim Greven

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2003

„Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.“

GLIEDERUNG

1 Einleitung

2 Die Bedeutung der Retinoide

- 2.1 Retinoide
 - 2.1.1 Einteilung der Retinoide
 - 2.1.2 Vitamin A (Retinol)
 - 2.1.2.1 Funktion des Vitamins A für den Menschen
 - 2.1.2.2 Der Tagesbedarf von Vitamin A
 - 2.1.2.3 Der Vitamin-A-Mangel
 - 2.1.2.4 Vitamin-A-Überdosierung und Nebenwirkungen
 - 2.1.3 Carotinoide
 - 2.1.3.1 Die Bedeutung der Carotinoide
 - 2.1.4 Retinoid Derivate und Indikationsbereiche in der Dermatologie
- 2.2 Die Bedeutung des Vitamins A in der Medizin
 - 2.2.1 Kontraindikationen
 - 2.2.2 Therapieformen
 - 2.2.2.1 Die Akne-Therapie
 - 2.2.2.2 Indikationsbereiche in der Krebs-Therapie
 - 2.2.2.3 Indikationsbereiche in der Psoriasis-Therapie
 - 2.2.2.4 Indikationsbereiche in der Strahlentherapie
 - 2.2.2.5 Indikationsbereiche in der Schlaganfall-Therapie
 - 2.2.2.6 Indikationsbereiche in der Augenheilkunde

3 Der Retinoidmetabolismus der Haut

- 3.1 Resorption, Transport und Speicherung der Retinoide
- 3.2 Die Retinsäure Biosynthese
- 3.3 Retinoid Bindungsproteine
 - 3.3.1 Cellular Retinol Binding Proteins I und II
 - 3.3.2 Cellular Retinoic Acid Binding Proteins I und II
- 3.4 Die Umwandlung von Retinol zu Retinsäure

- 3.4.1 Alkohol/Retinol Dehydrogenase und Short-Chain Dehydrogenasen/Reduktasen
- 3.4.2 Aldehyd/Retinal Dehydrogenase und Cytochrom P450 Isoenzyme
- 3.5 Die Retinsäuren
- 3.6 Retinoid Katabolismus
 - 3.6.1 Cytochrom-abhängige 4-Hydroxylase
 - 3.6.2 4-*oxo*-Metabolite
 - 3.6.3 Cytochrom P450 Isoenzyme
 - 3.6.3.1 Cytochrom 1A1 und Cytochrom 1A2
 - 3.6.3.2 Cytochrom 2E1
 - 3.6.3.3 Cytochrom 3A
 - 3.6.4 Rezeptoren
 - 3.6.4.1 Aryl Hydrokarbon Rezeptor
 - 3.6.4.2 Peroxisom Proliferator-Aktivierender Rezeptor

4 Aufgabenstellung

- 4.1 Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen
- 4.2 Zielsetzung und Fragestellungen
- 4.3 Die HaCaT-Zelle
 - 4.3.1 Zelllinien
 - 4.3.2 Die Entstehung der HaCaT-Zellen
 - 4.3.3 Eigenschaften der HaCaT-Zelle
 - 4.3.4 Verwendbarkeit von immortalisierten Zelllinien
 - 4.3.5 Vorteile der HaCaT-Zellen

5 Material und Methoden

- 5.1 Zellkultur
 - 5.1.1 Passagieren der HaCaT-Zellen
 - 5.1.2 Mediumwechsel
 - 5.1.3 Mediumzusammensetzung
 - 5.1.4 Retinoidbehandlung der Zellen
 - 5.1.5 Extraktion der Retinoide
 - 5.1.6 Geräte

5.1.7	Chemikalien und Zellkulturmedien
5.2	Reversed-Phase-High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)
5.2.1	Vorbereitung der Versuchsproben für die Reversed-Phase-HPLC
5.2.2	Nachweis von Retinoiden durch die Reversed-Phase-HPLC
5.2.3	Chemikalien
5.2.4	Geräte
5.3	RNA Isolation
5.3.1	RNA Isolation für die RT-Polymerase-Kettenreaktion
5.3.2	Lyse der Zellen
5.3.3	Filtern des Lysates
5.3.4	Reinigen der RNA
5.3.5	Herauslösen der RNA aus der Säule
5.3.6	Geräte und Materialien
5.3.7	Medien
5.4	Die RT (Reverse Transcribed)-Polymerase-Kettenreaktion
5.4.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
5.4.2	Das RT-Polymerase-Kettenreaktion Verfahren
5.4.3	mRNA
5.4.4	RT-Polymerase-Kettenreaktion Komponenten
5.4.5	MuLV Reverse Transkriptase
5.4.6	DNA-Polymerase
5.4.7	Weitere Bestandteile des RNA PCR Kits und ihre Bedeutung
5.4.8	RT-Primer
5.4.9	Primersequenzen und Basenpaare
5.4.10	Design der Primer
5.4.11	Zwei-Schritt RT-Polymerase-Kettenreaktion
5.4.12	Interne-Standards
5.4.12.1	β -Actin
5.4.12.2	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
5.4.13	RT-PCR Protokoll
5.4.14	Nachweis der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese
5.4.15	Material und Geräte
5.4.15.1	Material und Geräte für die Polymerase-Kettenreaktion
5.4.15.2	Material und Geräte für die Gelelektrophorese
5.4.15.3	Material und Geräte für die photographische Gelelektrophoresedarstellung

6	Ergebnisse
6.1	Ergebnisse der Reversed-Phase-HPLC
6.1.1	Retinol Inkubation ohne HaCaT-Zellen
6.1.2	Retinol Inkubation mit HaCaT-Zellen
6.1.3	Retinal Inkubation ohne HaCaT-Zellen
6.1.4	Retinal Inkubation mit HaCaT-Zellen
6.1.5	<i>All-trans</i> RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen
6.1.6	<i>All-trans</i> RA Inkubation mit HaCaT-Zellen
6.1.7	9- <i>cis</i> -RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen
6.1.8	9- <i>cis</i> -RA Inkubation mit HaCaT-Zellen
6.1.9	13- <i>cis</i> -RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen
6.1.10	13- <i>cis</i> -RA Inkubation mit HaCaT-Zellen
6.2	Ergebnisse der RT-Polymerase-Kettenreaktion
6.2.1	Proteine, deren mRNA Expression mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte
6.2.2	Proteine, deren mRNA Expression mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden konnte
6.3	Darstellung der RT-PCR Ergebnisse
6.3.1	Retinol Dehydrogenase
6.3.2	9- <i>cis</i> -Retinol Dehydrogenase
6.3.3	Cellular Retinol Binding Protein II
6.3.4	Retinal Dehydrogenase
6.3.5	Cellular Retinoic Acid Binding Protein I
6.3.6	Cellular Retinoic Acid Binding Protein II
6.3.7	Cytochrom 1A1
6.3.8	Cytochrom 1A2
7	Diskussion
8	Zusammenfassung
9	Literatur
10	Eid + Dank
11	Lebenslauf

1. Einleitung

Die Bedeutung des Vitamins A (Retinol) als essentieller Wirkstoff ist seit den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts bekannt (41). Retinol bildet zusammen mit anderen Verbindungen ähnlicher Struktur die Gruppe der Retinoide, denen eine Schlüsselfunktion im epidermalen Wachstum und in der zellulären Differenzierung normaler und neoplastischer Zellen von Vertebraten zukommt. Zusätzlich beeinflussen Retinoide wichtige Prozesse der Embryonalentwicklung und des Sehvorgangs (191). Weltweit ist der Mangel an Vitamin A der häufigste unter allen bekannten Vitamin-Mangelerkrankungen. Betroffen davon sind nahezu alle Entwicklungsländer, in denen jährlich für ca. 200 Millionen Kinder das Risiko einer Vitamin-A-Unterversorgung besteht (216). Typische Folgen leichter Mangelerkrankungen (Hypovitaminosen) an Vitamin A sind Störungen des Sehvorgangs, zum Beispiel in Form von Nachtblindheit (168). Bei stärkerem Mangel (Avitaminosen) kann es zu generellen Verhornungsstörungen der Epithelien kommen. Hierbei ist besonders die Kornea des Auges betroffen, was in schweren Fällen bis zur Erblindung führen kann. Dieses Krankheitsbild wird als Xerophthalmie bezeichnet und führte zu der alten Bezeichnung „Axerophthol“ für Retinol (168).

Im Verlauf des 20. Jahrhunderts entdeckte man die Retinoide als Therapeutika. Die im Laufe der Zeit gewonnenen Erkenntnisse führten dazu, daß sie heutzutage in verschiedenen Bereichen der Medizin etabliert sind und insbesondere in der Dermatologie eine zentrale Rolle spielen. Bis zum heutigen Tage wurden weit mehr als 5000 Retinsäure-Analoga synthetisiert, aus welchen die folgenden Generationen zur systemischen und topischen Behandlung verschiedener Hauterkrankungen entstanden sind (s. Tab. 7-10). Retinoide gehören weltweit zu den wirksamsten Präparaten zur Behandlung der entstellenden *Acne conglobata* und *nodulocystica* (139, 140, 141), aber auch zur Behandlung von Psoriasis (175, 90) und der Xerophthalmie (168, 149). Schließlich stellen sie die Therapie der Wahl bei verschiedenen hereditären Erkrankungen des verhornenden Systems dar, wie z.B. des Morbus Darier und einzelner Formen der Ichthyosen (s. Tab. 7-10). Eine besondere Einschränkung hinsichtlich der therapeutischen Breite ist bei gebärfähigen Frauen und Schwangeren geboten, da Retinoide ein teratogenes und embryotoxisches Potential aufweisen (191).

Es hat sich herausgestellt, daß die Wirksamkeit der Retinoide grundlegend durch ihren Metabolismus beeinflußt wird. Bekannt ist, daß oral zugeführtes Retinol nach der enteralen Resorption im Dünndarm (84) auf dem Lymph- und Blutweg zu den Zielzellen transportiert wird (108). Die Resorption in die Zelle erfolgt durch einen noch nicht vollständig bekannten Mechanismus. Anschließend wird in einem zweiteiligen Prozeß Retinol über Retinal zu *all-trans*-Retinsäure (*atRA*) oxidiert. *All-trans*-RA stellt den aktivsten Metaboliten der Retinsäuren dar (220,

46), gefolgt von 9-*cis*-RA, wohingegen die dritte nachweisbare Retinsäure 13-*cis*-RA hinsichtlich ihrer Bedeutung heutzutage noch Gegenstand der Diskussion (51, 66) ist. Der Abbau dieser aktiven Hormone in den Zellen zu inaktiven 4-*oxo*-Metaboliten (186), die danach schnell ausgeschieden werden, ist ein weiterer wesentlicher Teil der Steuerung der Retinoidwirksamkeit.

Keratinocyten der menschlichen Haut sind offensichtlich Zielzellen des Retinoidmetabolismus (199, 200, 201, 149). Deshalb interessieren in besonderem Maße die Verstoffwechselung und die Regulierungsmechanismen in dieser Zellart. Die HaCaT-Zelllinie, die ein Modell der humanen Keratinocyten *in vitro* darstellt, steht der Wissenschaft seit 1987 als unsterbliche Zelllinie zur Verfügung. Diese Zellart transformierte unter niedrigen Ca^{2+} Bedingungen und erhöhter Temperatur und weist trotz ihrer Immortalität eine erhaltene Differenzierungsfähigkeit auf (15). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die HaCaT-Zelle auf Grund der Art und Weise wie sie entstand, Stoffwechselwege geschaffen hat, die nicht mehr die natürliche *in vivo* Situation der humanen Keratinocyten reflektiert. Auf der anderen Seite haben die HaCaT-Zellen den Vorteil der Standardisierung und der unbegrenzten Reproduzierbarkeit. Die Zelllinie wird in neueren Studien als Grundlage zur Konstruktion von dreidimensionaler Haut und für pharmakologische und toxikologische Studien verwendet. Das Wissen um Anlagen und Eigenschaften der HaCaT-Zellen bildet dabei die wesentliche Voraussetzung solcher Studien.

Dieser Stand des Wissens führte uns zu der Zielsetzung, den Retinoidmetabolismus von HaCaT-Zellen *in vitro* zu untersuchen und die gewonnenen Ergebnisse mit den Verhältnissen in *ex vivo* gewonnenen Keratinocyten zu vergleichen. Hierbei konzentrierten wir uns insbesondere auf den Einfluß der Retinol-Dehydrogenase und der Retinal-Dehydrogenase in Bezug auf die Synthese der Retinsäuren und die quantitative Verteilung der Retinsäure-Isomere zueinander. Zusätzlich interessierte uns die Auswirkung unterschiedlicher Substratzugaben auf den Metabolismus. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden HaCaT-Zellen mit Retinol, Retinal und den Retinsäuren *all-trans*-RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA inkubiert. Die entstehenden Abbauprodukte wurden nach festgelegten Zeitspannen auf katalytischer Ebene mittels HPLC analysiert, wodurch Rückschlüsse auf die Verstoffwechselung der Retinoide gezogen werden konnten. Diese Ergebnisse wurden durch molekularbiologische Nachweise ergänzt, in denen mit Hilfe von RT-PCR die mRNA von verschiedenen Enzymen und Bindungsproteinen, die bekanntermaßen im Retinoidmetabolismus eine Rolle spielen, nachgewiesen wurden.

Bevor in dieser Arbeit die von uns verwendeten Materialien und Methoden beschrieben werden, soll zur Erläuterung unserer Fragestellungen und Ergebnisse auf den folgenden Seiten (Kapitel 2 und 3) auf wesentliche bekannte wissenschaftliche Erkenntnisse über den Retinoidmetabolismus zum besseren Verständnis ausführlicher eingegangen werden.

2. Die Bedeutung der Retinoide

2.1 Retinoide

2.1.1 Einteilung der Retinoide

Die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K gehören zur Gruppe der Isoprenoide und sind in Nahrungsfetten gelöst. Vitamin A (Retinol) ist ein lebensnotwendiges Vitamin, das der Mensch nicht selbst synthetisieren kann und daher über die Nahrung aufgenommen werden muß. Aus Retinol und Carotinoiden werden *in vivo* nur eine relativ geringe Menge von Retinsäuren gebildet, die jedoch eine 100- bis 1000fach höhere biologische Aktivität aufweisen als andere Produkte der Metabolisierungskaskade der Retinoide.

Das Retinol bildet zusammen mit anderen Verbindungen mit ähnlicher Struktur die Gruppe der Retinoide, die in natürlich vorkommende und synthetisch hergestellte Gruppen (s. Tab 7-10) eingeteilt werden.

Abkürzung	Bedeutung	Anmerkung
ROL	Retinol/Vit. A-Alkohol	Vitamin A
RAL	Retinal/Vit. A-Aldehyd	
RAL- Steroisomere	<i>all-trans</i> -RAL <i>13-cis</i> -RAL 11- <i>cis</i> Form + Protein Opsin = Rhodopsin	Sehpigment
RA-Isomere	Retinsäure-Isomere	aktive Hormone
<i>at</i> RA	<i>all-trans</i> RA 13- <i>cis</i> -RA 9- <i>cis</i> -RA	Tretinoin Isotretinoin
RE	Retinylester	Speicherform
(Carotine)	β-Carotine	Spaltung zu Retinal
	3,4-Didehydroretinol	Vitamin A2

Tabelle 1 : Natürlich vorkommende Retinoide

Retinoide vermitteln ihre biologische Wirkung durch Bindung von Retinsäuren (RAs) an nukleäre Rezeptoren, welche Retinoid Acid Receptors (RARs) und Retinoid X Receptors (RXRs) genannt werden. Sie gehören zur Superfamilie der Liganden-induzierbaren Transkriptionsregulatoren wie auch die Steroid- und Thyroid-Hormone und Vitamin-D-Rezeptoren (109, 23). Es gibt drei Subtypen der beiden Rezeptortypen RAR und RXR, die α , β und γ genannt werden (62). In der menschlichen Haut ist die Expression dieser Rezeptoren unterschiedlich verteilt. Von den RAR-Rezeptoren ist der RAR α mit etwa 90 % vorhanden, und RAR β ist mit <1 % sehr gering exprimiert. Die übrigen Rezeptoren gehören dem RAR γ -Rezeptortyp an. *All-trans*-RA bindet nur an RARs, wohingegen 9-*cis*-RA sowohl eine Affinität zu RARs als auch zu RXRs zeigt (118). Bei dem Stereoisomer von *atRA*, 13-*cis*-RA, beobachtet man eine viel geringere Affinität zu beiden Rezeptorgruppen. Somit besteht wahrscheinlich der Haupteinfluß seiner molekularen Effekte in der Isomerisation von 13-*cis*-RA in *atRA* (1).

Von den RXRs ist der Subtyp α mit mehr als 90 % vertreten, gefolgt von RXR β mit 1-5 %. RXR γ ist in der Haut nicht vorhanden. Die Expression von RAR β ist in dermalen Fibroblasten und basalen Keratinozyten durch Induktion möglich. Sowohl RARs als auch RXRs wirken über polymorphe “*cis*-acting“ responsive Elemente, und zwar die “Retinoid Acid Responsive Elements“ (RAREs) und die “Retinoid X Responsive Elements“ (RXREs). Diese Strukturen sind in der Promotorregion Retinoid-responsiver Gene lokalisiert und vermitteln hier die Retinoidwirkung (70). Die funktionellen Interaktionen der Retinoid Rezeptoren in der Haut wurden in einer Übersicht von Fisher und Vorhees beschrieben (56).

Abkürzung	Bedeutung	Anmerkung
I	Nukleäre Rezeptoren	
RARs	Retinoic Acid Rezeptor	je 3 Subtypen : α, β, γ
RXRs	Retinoid X Rezeptor	je 3 Subtypen : α, β, γ
II	Polymorphe <i>cis</i>-acting responsive Elemente	
RAREs	Retinoic Acid Responsive Elements	
RXREs	Retinoid X Responsive Elements	

Tabelle 2: Die Retinoid Rezeptoren

Abkürzung	Bedeutung	Anmerkung
CRBP I + II	Cellular Retinol Binding Proteins I und II	binden ROL u. RAL
CRABP I + II	Cellular Retinoic Acid Binding Proteins I und II	binden <i>at</i> RA u. 9- <i>cis</i> -RA
Apo-CRBP	ungebundenes CRBP	inhibiert die LRAT
Holo-CRBP	CRBP I verbunden mit ROL	Schutz vor Oxidation
RBP	Retinol-Bindungsprotein	Transportprotein
Albumin	Transportprotein	Plasmaträger von RA

Tabelle 3: Bindungsproteine von Retinoiden

Abkürzung	Bedeutung	Anmerkung
I	Transferasen	
ARAT	Acetyl-CoA Transferase	
LRAT	Lecithin: Retinol Acetyltransferase	ROL in RE
II	Dehydrogenasen	
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	Klassen I, II, IV und VII (zinkabhängig)
SDR	Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase	irreversible Konversion: ROL zu RAL; Klassen I, II und III
ROLDH	Retinol-Dehydrogenase	ADH 7 aktivste Form
RALDH	Retinal-Dehydrogenase	
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase	Klassen I, II u. III
III	Cytochrom P450 Isoenzyme	Superfamilie
CYP26 A1	<i>all-trans</i> -RA-4-Hydroxylase	Abbau von RA
CYP1A1	eines der wichtigsten humanen Cytochrome	
CYP1A2		

Tabelle 4: Die wichtigen Transferasen, Dehydrogenasen und Cytochrom P450 Isoenzyme, die an dem Retinoidmetabolismus beteiligt sind.

2.1.2 Vitamin A (Retinol)

Das am weitesten verbreitete Retinoid ist das Retinol. Das zugehörige Aldehyd heißt Retinal, welches Bestandteil des Sehpigments (11-*cis*-RAL) ist. Das als Vitamin A₂ bekannte Dehydroretinol wurde von Edisbury *et al.* 1937 (50) zuerst in Süßwasserfischen gefunden und hat 40 % der biologischen Aktivität von Retinol (35). 1952 synthetisierte Farrar *et al.* (54) als Erster die genaue Struktur des Vitamins A als 3,4-Didehydroretinol, das zu den ungesättigten 3-Dehydro-Verbindungen gehört. Retinol kommt in natürlicher Form in Butter, in geringen Mengen auch in der Milch und im Käse, außerdem in Seefisch, z.B. in Heilbutt und Makrelen, und vor allem in der Leber vor.

Weltweit erfolgt die Angabe der Vitamin-A-Mengen bzw. der Carotinoide in Internationale Einheiten (I.E.). 1000 I.E. entsprechen 0,3 mg Retinol, 0,6 mg β -Carotin oder 1,2 mg gemischten Carotinoiden.

Fischleberöl	24,0 mg/100 g	Rinderleber	14,2 mg/100 g
Schweineleber	9,0 mg/100 g	Karotten	1,6 mg/100 g
Petersilie	1,2 mg/100 g	Grünkohl	0,8 mg/100 g
Butter	0,7 mg/100 g	Margarine	0,6 mg/100 g
Feldsalat/Fenchel	0,6 mg/100 g	Spinat	0,5 mg/100 g

Tabelle 5: Die Hauptlieferanten von Vitamin A

1 mg (3 000 I.E.) Vitamin A, das etwa dem durchschnittlichen Tagesbedarf entspricht, sind enthalten in: 10 g Leber, 100 g Leberwurst, 150 g Butter, 200 g Camembert oder Thunfisch, 300 g Emmentaler oder Mozzarella, 2000 g Fisch oder 3 Liter Vollmilch.

2.1.2.1 Funktion des Vitamins A für den Menschen

Vitamin A hat zahlreiche biochemische Funktionen und weist daher kein einheitliches Wirkungsspektrum auf. Retinoide spielen eine Schlüsselfunktion im epidermalen Wachstum und in der zellulären Differenzierung. Das Vitamin A wird deshalb auch als Epithelschutz- und Wachstumshormon bezeichnet (191).

Die Retinoide beeinflussen u. a. das Wachstum und die Differenzierung von normalen und neoplastischen Zellen von Vertebraten, die Produktion von Testosteron, das Wachstum von Schleimhaut und Knorpelgewebe, die Regulation von Entzündungen, die Entwicklung der Plazenta ebenso wie wichtige Effekte in der Embryonalentwicklung, bestimmte Prozesse der Fortpflanzung und den Sehvorgang (180, 13). Auch in Bezug auf das Immunsystem, speziell für die Abwehr von Infektionen, spielen sie eine wichtige Rolle (33). Da Vitamin A auf die Differenzierung von Zellen Einfluß nimmt, erhöht es bei optimaler Versorgung den Widerstand gegen krebsfördernde Faktoren. Darüber hinaus kennt man noch weitere Prozesse, an denen Retinoide beteiligt sind. Retinylphosphat dient als Träger für Mannose und Galaktose beim Transport des Zuckers durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums. Retinsäure bewirkt u.a. eine Vermehrung der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und fördert die Differenzierung embryonaler Karzinomzellen in Kulturen (170).

2.1.2.2 Der Tagesbedarf von Vitamin A

Laut Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) (33) beträgt der Tagesbedarf für Männer 1 mg (ca. 3000 I.E.) und für Frauen 0,8 mg (ca. 2600 I.E.) Vitamin A. Schwangere und stillende Frauen haben mit 1,1 bzw. 1,5 mg (ca. 4300 I.E.) täglich einen etwas erhöhten Bedarf an Vitamin A (156).

Der Bedarf an Vitamin A wird in Retinol-Äquivalenten angegeben, da neben Retinol auch die verschiedenen Carotinoide in unterschiedlichem Maße zur Bedarfsdeckung an Vitamin A beitragen. β -Carotin ist für die Deckung des Bedarfs an Vitamin A nicht unbedingt erforderlich. Wegen der schützenden Wirkung von Carotinoiden als Radikalfänger wird es jedoch von vielen Fachleuten als wichtig angesehen. Es wurde deshalb empfohlen, die Bedarfswerte entsprechend zu teilen bzw. gesondert anzugeben, z.B. 1/3 an Vitamin A als Retinol und 2/3 als Carotin zuzuführen. Die DGE empfiehlt bisher nur eine an Carotinoiden reiche Ernährung, ohne Mengen zu benennen (33). In den Niederlanden wird zur Deckung des Vitamin-A-Bedarfs empfohlen, 0,45 mg (1500 I.E.) Retinol und 2,4 mg (4000 I.E.) β -Carotin täglich aufzunehmen. Das "National Cancer Institute" (USA) rät wegen der starken antioxidativen Wirkung, täglich etwa 5 bis 6 mg (ca. 5000 I.E.) Carotinoide zur Vorbeugung einzunehmen. Es werden jedoch mit der üblichen westlichen Ernährung von der Bevölkerung keine ausreichenden Carotinoid-Mengen für eine sinnvolle Prävention aufgenommen. Tatsächlich macht der Anteil an Carotinoiden bisher meist nur 1/4 bis 1/5 statt der gewünschten 2/3 der gesamten Aufnahme an Vitamin A aus.

2.1.2.3

Der Vitamin-A-Mangel

Weltweit ist der Mangel an Vitamin A der häufigste unter allen bekannten Vitamin-Mangelerkrankungen. Betroffen davon sind nahezu alle Entwicklungsländer, wo jährlich bei ca. 200 Millionen Kindern das Risiko einer Vitamin-A-Unterversorgung besteht. Von ihnen erblinden jährlich etwa 500 000 und ein Großteil (ca. 70 %) stirbt innerhalb eines Jahres (216). In den westlichen Industriestaaten kommt ein Mangel an Vitamin A dagegen nur sehr selten vor. Generell können eine unausgewogene Nahrungszufuhr oder Erkrankungen zum Mangel an Vitamin A bzw. zu einem Mehrbedarf führen.

Bei starken Belastungen mit freien Radikalen (z.B. durch Rauchen) und bei vorhandenen Schwächen des Abwehrsystems besteht ein Mehrbedarf, und eine Ergänzung mit Vitamin A und/oder Carotinoiden ist sinnvoll. Eine mangelnde Resorption bzw. Verdauung von Vitamin A tritt bei einigen Krankheiten, z.B. Morbus Crohn, Sprue und parasitär bedingten Darmerkrankungen, auf. Weiter werden bei Krankheiten wie z.B. Diabetes, Mukoviszidose und alkoholbedingter Lebererkrankung oft niedrige Vitamin-A-Spiegel beobachtet.

Vitamin A kann, wie auch die Vitamine D und E, im Körper gespeichert werden, so daß sich ein Mangel erst mit Verzögerung auswirkt. Die Retinol-Plasmaspiegel bleiben, unabhängig von der Zufuhr durch Freisetzung aus den Ito-Zellen der Leber, über längere Zeiträume konstant, weshalb Blutwerte den Vitamin-A-Status oft nicht genau widerspiegeln. Bei gesunden Erwachsenen treten Mangelerkrankungen erst nach monatelanger Verringerung der Vitamin-A-Zufuhr auf. Kinder können dagegen Vitamin A nur wenige Wochen speichern.

Die Folgen eines Mangels an Vitamin A können vielfältig sein. Typisch sind bei leichterem Ausmaß Störungen des Sehorgans in Form von Nachtblindheit. Akne gehört zu den wichtigsten frühklinischen Symptomen. Bei stärkerem Mangel kann es zur Verhornung des Epithels, besonders der des Auges kommen, die bis zur Erblindung führen kann. Dies führt zur Ausprägung des Krankheitsbildes der Xerophthalmie, woher die alte Bezeichnung „Xerophthol“ für Retinol stammt (168). In Abwesenheit von Retinol kommt es zu strukturellen Defiziten und zur Morbidität von verschiedenen Geweben (112). Durch fehlendes Vitamin A kann das Wachstum generell gehemmt sein und bei Embryos letal enden (131, 181). Außerdem steigt die Anfälligkeit für Infekte auf Grund eines geschwächten Immunsystems. Es treten häufiger Erkrankungen der Atemwege und Durchfallerkrankungen auf.

2.1.2.4 Vitamin-A-Überdosierung und Nebenwirkungen

Gemessen an der Anzahl von Menschen, die jährlich an Vitamin-A-Mangel erkranken und erblinden, erscheinen die pro Jahr weltweit beobachteten Fälle einer Überdosierung eher von untergeordneter Bedeutung.

Im Rahmen einer therapeutischen Anwendung von Vitamin A können hohe Dosierungen angebracht sein. Bei sehr hoher Zufuhr von Vitamin A über längere Zeit, z.B. einer ständigen Zufuhr von 50 000 - 100 000 I.E. (das 10-30fache des Tagesbedarfs), aber auch bei extrem hoher Einzelzufuhr, sind Nebenwirkungen möglich. Tagesdosen von mehr als 15 mg (50 000 I.E.) sollten daher nur unter ärztlicher Aufsicht eingenommen werden (61).

Als Nebenwirkungen von Vitamin-A-Unverträglichkeiten wurden z.B. Appetitverlust, Muskelschmerzen, Lippenaustrocknung, Kopfschmerzen, Haarausfall, Nasenbluten, Schlafstörungen, Exantheme, Leberfunktionsstörungen, vermehrte Gewebsneubildung, Hautschuppung und -abschälung, Erytheme und Hyper- oder Hypopigmentierung beobachtet. Außerdem besteht die erhöhte Gefahr eines Sonnenbrandes, da sich das Stratum corneum verdünnt. Besondere Vorsicht ist bei schwangeren Frauen angebracht, da Retinoide ein embryotoxisches Potential aufweisen. Sie sollten Mengen über 3 mg Vitamin A (10 000 I.E.) nicht mehrfach während der Schwangerschaft einnehmen. Die, nach Exposition von Foeten mit Retinoiden, auftretenden Retinoid-Embryopathien (foetal retinoic acid syndrome) sind charakterisiert durch Symptome wie Mikrozephalie mit schwerer geistiger Behinderung, Mikrophthalmie, Helixaplasie, Herzfehler, Thymusaplasie, ZNS-, Augen-, Gaumen-, urogenitale Mißbildungen und Gesichtsdysmorphien. Die Mißbildungen können zum Fruchttod und Abort des Foeten führen. Schwangeren wird deshalb empfohlen, nicht zu häufig Leber zu verzehren, da eine Lebermahlzeit unter Umständen mit der Aufnahme der vielfachen Menge des Risikogrenzwertes einhergehen kann (191).

2.1.3 Carotinoide

Pflanzen enthalten statt Vitamin A überwiegend Carotinoide. Als „Carotinoide“ bezeichnet man Vitamin-A-ähnliche chemische Verwandte des Carotins. Es sind Isoprenderivate, die 8-9 konjugierte Doppelbindungen enthalten und daher intensiv gelb oder rot gefärbt sind. Sie kommen deshalb in vielen Pflanzen und Tieren als Farbstoffe vor. Einige Substanzen können im Organismus zu Vitamin A umgewandelt werden, wie z.B. das β -Carotin, das deshalb auch als

Provitamin A bezeichnet wird. Es gibt rund 400 Carotinoide, davon 50 mit Provitamin-A-Aktivität, wobei β -Carotin für den Menschen die aktivste Form ist.

2.1.3.1 Die Bedeutung der Carotinoide

Wie das Retinol sind auch die Carotinoide für den Menschen von Bedeutung. Sie oxidieren rasch und beugen somit der Oxidation anderer wichtiger Substanzen vor. Sie sind potente Radikalfänger und bauen aggressive Sauerstoffradikale und ähnliche Oxidationsprodukte wirksam ab. Sie schützen beispielsweise Zellen vor der negativen Wirkung des UV-Lichts, hemmen die Oxidation von Lipiden und sind damit ein wirksames Antioxidans. Vermutlich können sie so die Risiken für die Entstehung von Neoplasien verringern (208). Außerdem steigern sie die Aktivität von T- und B-Zellen, die für die zelluläre Immunantwort wichtig sind (120).

Da der Körper β -Carotin kaum speichern kann, muß es täglich in ausreichender Menge zugeführt werden.

Minze	110 mg/1 kg	Petersilie	80 mg/1 kg
Karotten	70 mg/1 kg	Spinat	60 mg/1 kg
Rote Bete/Grünkohl	50 mg/1 kg	Kresse	30 mg/1 kg
Brokkoli (gekocht)	25 mg/1 kg		

Tabelle 6: Auflistung von β -Carotin-reichen Lebensmitteln

2 mg β -Carotin (ca. 3000 I.E.), das etwa dem täglichen Bedarf entspricht, sind enthalten in: 50 g roter Paprika, Möhren oder Spinat, 100 g Feldsalat, 200 g Aprikosen, 300 g Rosenkohl oder Grapefruit, 400 g Sauerkirschen und 500 g Papaya.

2.1.4 Retinoid Derivate und Indikationsbereiche in der Dermatologie

Schon 1937 erhielt Paul Karrer den Nobelpreis für die Aufschlüsselung der chemischen Struktur des Vitamins A. Die ersten Erkenntnisse über die Bedeutung der Retinoide in der Dermatologie sind zurückzuführen auf Wolbach und Howe, die 1925 epidermale Veränderungen als Keratinisierungsdefekt in Vitamin-A-defizienten Tieren identifizierten (217). In den 60er Jahren folgten zahlreiche Studien, die sich auf die klinische Anwendung und die Pharmakologie von

Retinoiden in der Haut konzentrierten (182, 6). Seit 1967 kann Vitamin A künstlich hergestellt werden, und im gleichen Jahr erhielt George Wald den Nobelpreis für die Aufklärung der Schlüsselfunktion des Vitamins A beim Sehvorgang.

Die gewonnenen Erkenntnisse führten dazu, daß sich die Behandlung mit Retinoiden bei verschiedenen Hauterkrankungen etablieren konnte. Bis zum heutigen Tage wurden weit mehr als 5000 Retinsäure-Analoga synthetisiert, aus welchen die folgenden Generationen zur systemischen und topischen Behandlung verschiedener Hauterkrankungen etabliert werden konnten (s. Tabelle 7-10).

Diese Stoffe kann man in Gruppen einteilen:

Einerseits in die nicht-aromatischen Retinoide wie β -Carotin (Provitamin A), *all-trans*-Retinsäure (Tretinoin) und 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin).

Andererseits in die mono-aromatischen Retinoid-Derivate Trimethyl-Methoxyphenyl-Analoga des Tretinoin (Etretinat) und der 9-(4-Methoxy-2,3,6-Trimethylphenyl)-3-2,4,6,8-Nonatetraensäure (Acitretin).

Und zusätzlich in die Polyaromatischen Retinoid-Derivate Tazarotensäure und 6-(3-1-Adamantyl-4-Methoxyphenyl)-2-Naphtholsäure (Adapalen) (172, 140).

Indikationsbereiche der Retinoid-Derivate in der Dermatologie

Vitamin-A-Alkohole

Gruppe	Art der Anwendung	Hauptindikation	Weitere Indikationen
Retinol (Vitamin A)	Oral	Vitamin-Substitution <i>Xerophthalmie</i>	Krebsvorbeugung
Retinyl Palmitate	topisch 0,5-5 % Emulsionen	Kosmetika	

Tabelle 7: Indikationsbereiche von Vitamin-A-Alkoholen

Nicht aromatische Retinoide

Gruppe	Art der Anwendung	Hauptindikation	Weitere Indikationen
β-Carotine (Provitamin A)	topisch 0,5-5 %	Hypopigmentation Hyperpigmentation Hautschutz	Nahrungsfarbstoff Krebsvorbeugung Antioxidans
Tretinoin (<i>at</i> RA)	Topisch Gele 0,025-0,1 % Crèmes	<i>Acne vulgaris</i> <i>Parakeratosis</i> <i>Hyperkeratosis</i>	<i>Keratosis</i> Lichtinduzierte Haut- alterung
Isotretinoin (13- <i>cis</i> -RA)	topisch 0,05 % Crème oral 0,25-1,0 mg/kg/d	<i>Acne conglobata</i> <i>Acne nodulocystica</i> <i>Recalcitrant Nodular</i>	<i>Rosazea</i> gramneg. <i>Follikulitis</i> <i>Pyoderma Faziale</i> Krebsvorbeugung <i>Psoriasis</i>
Motretinid	Topisch	<i>Acne vulgaris</i> <i>Parakeratosis</i> <i>Hyperkeratosis</i>	<i>Keratosis</i>

Tabelle 8: Indikationsbereiche von nicht aromatischen Retinoiden

Mono-aromatische Retinoid-Derivate

Gruppe	Art der Anwendung	Hauptindikation	Weitere Indikationen
Etretinat	oral 0,25-1,0 mg/kg/d	<i>Psoriasis generalisata</i> <i>pustularis et Psoriasis</i> <i>exfoliativa</i>	<i>Plaque Psoriasis</i>
Acitretin	oral 0,25-1,0 mg/kg/d	<i>Psoriasis pustulosa</i> <i>et erythrodermica</i>	<i>Lichen ruber planus</i> <i>Morbus Darier</i> <i>Ichthyosis, Pustulosis</i> <i>palmoplantaris, Palmo-</i> <i>plantar keratoderma</i>

Tabelle 9: Indikationsbereiche von mono-aromatischen Retinoid-Derivaten

Polyaromatische Retinoid-Derivate

Gruppe	Art der Anwendung	Hauptindikation	Weitere Indikationen
Tazarotene	topisch 0,05-0,1 % Gel	<i>Psoriasis vulgaris</i>	
Adapalene	topisch 0,1 % Gel	<i>Acne vulgaris</i>	

Tabelle 10: Indikationsbereiche von polyaromatischen Retinoid-Derivaten

2.2 Die Bedeutung des Vitamins A in der Medizin

Vitamin A wurde in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts zuerst als essentieller Nährstoff (fettlösliche Aminosäure = "fat soluble A") beschrieben (41). Im weiteren Verlauf entdeckte man die Retinoide als Therapeutika. Heutzutage sind sie in verschiedenen Bereichen der Medizin etabliert. Eine große Einschränkung hinsichtlich der Therapie ist jedoch bis heute die Teratogenität dieser Substanzen (s.o.). Daher steht die Entwicklung von nebenwirkungsärmeren Medikamenten im wissenschaftlichen Interesse. Auch die Wege des Metabolismus derjenigen Retinoide, die pharmakologisch-therapeutisch wichtig sind und die immunologischen und biochemischen Veränderungen, die mit den Retinoiden assoziiert sind, wurden bis heute noch nicht vollständig aufgedeckt (106).

2.2.1 Kontraindikationen

Kontraindikationen für eine Retinoid-Therapie sind Leberfunktionsstörungen, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz und Frauen im gebärfähigen Alter.

Die zur Akne- und Psoriasisbehandlung eingesetzten Retinoide mit ihrer potentiellen Teratogenität erfordern wegen ihrer langen Eliminationshalbwertszeit auch nach dem Absetzen noch eine sichere Konzeptionsverhütung: Bei Isotretinoin für ca. weitere vier Wochen und bei Acitretin sogar für etwa zwei Jahre (61).

2.2.2 Therapieformen

2.2.2.1 Die Akne-Therapie

In der Akne-Therapie werden hauptsächlich Isotretinoin, Tretinoin und Motretinid angewendet (s. Tab. 8 und 9).

Isotretinoin:

Die Verbindung ist bei oraler Anwendung ein potentes Anti-Akne-Mittel, das besonders effektiv gegen die schwere *Acne conglobata* und *nodulocystica* eingesetzt wird (87, 139, 140, 141). Bei der *Acne conglobata* läßt sich mit Isotretinoin eine gute Besserung des Krankheitsbildes erzielen. Auch die lokale Anwendung (Isotretinoin in Gelform) ist bei entsprechender Indikationsstellung sehr erfolgreich. Fortgesetzte Bemühungen, das Molekül zu manipulieren und nicht teratogene Retinoide mit Anti-Akne-Aktivität zu entwickeln, blieben bisher erfolglos. Isotretinoin ist die einzige Substanz, die die Verhornung in den follikulären Akroinfundibuli normalisiert und daneben starke sebostatische Kapazität besitzt, indem sie die Größe der *Glandulae sebaceae* und den Umfang der Talgdrüsen reduziert. Die Zusammensetzung des Talges wird ebenfalls verändert, und zwar zugunsten nicht oder weniger komedogener Komponenten. Dies geschieht, indem die Fraktion der Triglyzeride dezimiert und durch Ceramide ersetzt wird. Dadurch wird insbesondere das Wachstum von *Propionibacterium acnes* stark vermindert. Antiinflammatorische Eigenschaften tragen zusätzlich dazu bei, daß eine schwere Akne erfahrungsgemäß nach 6-monatiger bis 1-jähriger oraler Medikation zurückgeht.

Vitamin-A-Säure (Tretinoin):

Die Tretinoin-Therapie (z.B. Retin A) spielt in Deutschland nur eine untergeordnete Rolle. Die Vitamin-A-Säure normalisiert den gestörten Verhornungsprozeß. Sie löst den Zusammenhalt verklebter Hornzellen und sorgt für die Öffnung der Komedonen durch eine geregelte Steigerung der Proliferation in den Follikeln. Der entscheidende Nachteil liegt in den Nebenwirkungen. Die Substanz reizt die Haut mit nachfolgender Rötung, Juckreiz, Schuppung, Brennen und in vielen Fällen auch ein Aufblühen der Akne (87).

Motretinid (Tasmaderm):

Motretinid wird lokal appliziert und erhöht die mitotische Aktivität der follikulären Epithelzellen, so daß sich das dicht gepackte verhornte Material auflockert. Die Komedonenbildung wird unterdrückt. Bei der Anwendung dieser Substanz treten weniger Hautirritationen auf als bei Tretinoin (72).

2.2.2.2 Indikationsbereiche in der Krebs-Therapie

Bereits in den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckten Ärzte, daß ein Mangel an Vitamin A die Zellen der Schleimhäute, des Verdauungstraktes und der Atemwege verändern kann. Diese Veränderungen bilden sich zurück, wenn Vitamin A gegeben wird. Schon früh lag daher ein Zusammenhang zwischen dem Vitamin-A-Stoffwechsel und der Entstehung von Krebs nahe. Inzwischen können zahlreiche Berichte über eine vorbeugende beziehungsweise therapeutische Aktivität von Vitamin A in der Krebsbekämpfung gefunden werden.

Vitamin A spielt nach heutigen Erkenntnissen in der Prävention verschiedener Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Nach neusten Veröffentlichungen wird über einen positiv schützenden Effekt bei hohen Retinol-Einnahmedosen bei Arbeitern aus australischen Asbestminen gegen die Entstehung von Mesotheliomen berichtet (30, 31).

Vor allem bei der Therapie von Tumoren des Gebärmutterhalses sowie bei bestimmten Leukämieformen werden gute Therapieergebnisse mit Retinoiden erzielt. Niedrige Vitamin-A- und β -Carotin-Werte wurden häufig bei Menschen beobachtet, die später an Krebs erkrankten. Betroffene Organe waren die Brust, die Lunge, die Prostata und der Dickdarm. Menschen mit höheren β -Carotinspiegeln im Serum zeigen ein geringeres Risiko, an Krebs, vor allem Lungenkrebs, zu erkranken (208). In einigen therapeutischen Studien wurde durch Gabe von Vitamin A in sehr hohen Dosen (20facher bis 300facher Tagesbedarf) das Tumorwachstum gehemmt (143). Auch die Proliferation von Krebsvorstufen bei starken Rauchern in der Bronchialschleimhaut konnte verringert werden (134).

2.2.2.3 Indikationsbereiche in der Psoriasis-Therapie

Auch in der Psoriasis-Behandlung sind Vitamin-A-Säure Präparate erfolgreich (175, 189, 24). Etretnat, Acitretin und Isotretinoin hemmen Teilung, Wachstum und Reifung der Zellen. Sie werden allein oder bei schweren Verlaufsformen in Kombination mit PUVA (Psoralen und UVA-Licht) eingesetzt. In besonders schweren Fällen wird eine systemische Kombinationstherapie, z.B. mit Ciclosporin A und Isotretinoin, angewandt (89, 90).

Therapie Nebenwirkungen können Trockenheit der Schleimhäute und Haarausfall sein.

2.2.2.4 Indikationsbereiche in der Strahlentherapie

Wissenschaftler haben beobachtet, daß der zellwachstumshemmende Effekt durch Kombination mit Vitamin-A-Säuren (Retinoiden) und Interferon-Alpha (Kombinationstherapie) verstärkt wird. Bei der Vorbehandlung des Plattenepithelkarzinoms mit Retinoiden (*all*RA und 13-*cis*-RA) und Interferon-Alpha und nachfolgender Bestrahlung konnte eine um den Faktor 2 bis 3 stärkere Inaktivierung der Tumorzellen beobachtet werden (75). Auch bei fortgeschrittenen kutanen Lymphomen können systemische Therapieformen gewählt werden: z.B. Kombination aus PUVA mit Retinoiden oder rekombinantem Interferon-Alpha (85, 48).

2.2.2.5 Indikationsbereiche in der Schlaganfall-Therapie

Höhere Blutspiegel von Vitamin A haben eine schützende Wirkung vor Schlaganfällen. Des weiteren erholen sich Patienten mit hohen Werten an Vitamin A nach einem Schlaganfall schneller und besser als Patienten mit niedrigen Werten (143).

2.2.2.6 Indikationsbereiche in der Augenheilkunde

Die Folgen eines Mangels an Vitamin A können bei leichterem Ausmaß Störungen des Sehvorgangs in Form von Nachtblindheit hervorrufen. Bei stärkerem Mangel kann es zur Verhornung des Augenepithels kommen, was bis zur Erblindung führen kann. Dies führt zur Ausprägung des Krankheitsbildes der Xerophthalmie, woher die alte Bezeichnung „Xerophthol“ für Retinol stammt (168). In den Entwicklungsländern erblinden jährlich ca. 500 000 Kinder auf Grund einer Vitamin-A-Unterversorgung.

Ausreichende Mengen an Vitamin A schützen auch, besonders in Kombination mit β -Carotin, Vitamin E, Vitamin C und Selen, vor der Entstehung des grauen Stars (10).

3 Der Retinoidmetabolismus der Haut

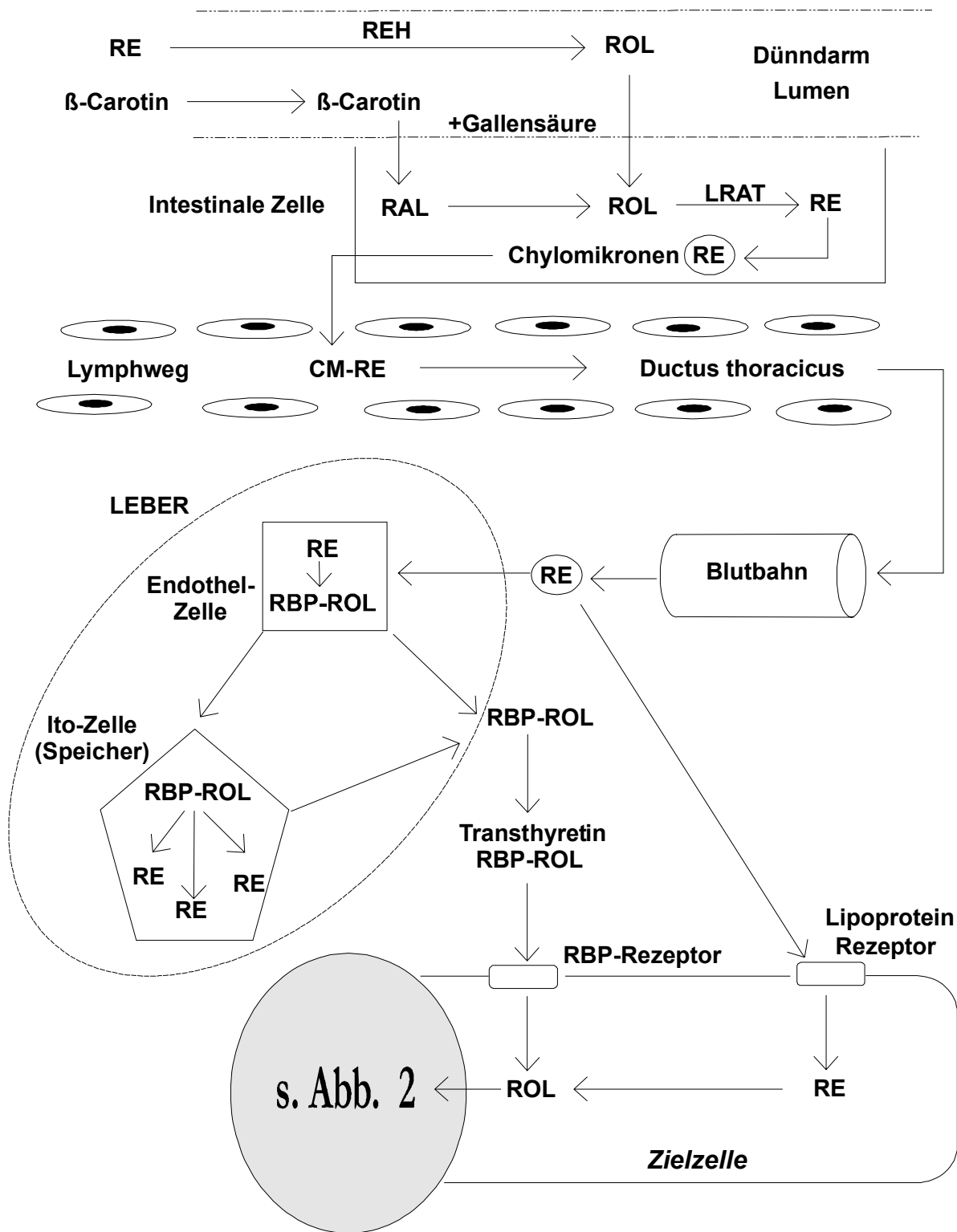
3.1 Resorption, Transport und Speicherung der Retinoide

Die Hauptquellen für natürliche Retinoide sind tierische Fette, Fisch (Retinylester (RE)) sowie gelbe, grüne und rote pflanzliche Nahrungsmittel. Von dem zugeführten Vitamin A werden ca. 20 % nicht resorbiert und innerhalb von 1-2 Tagen ausgeschieden. Zusätzlich weisen Carotinoide, abhängig von der Art der Zubereitung, deutliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit auf. Meist werden nur 30-50 % aufgenommen. Möhren enthalten z.B. relativ viel β -Carotin, beim rohen Verzehr können jedoch nur 10 % aufgenommen werden. In geriebener Form verbessert sich die Resorption, und durch Öl- bzw. Fettzugabe kann diese weiter erhöht werden. Grüngemüse haben hingegen erheblich weniger Carotinoide als Karotten, sie sind aber besser verfügbar.

Aufgenommene Retinylester, die Speicherform von Vitamin A, werden durch Hydrolasen in der Dünndarmmukosa zu Retinol (ROL) hydrolysiert. Retinol und Carotinoide werden durch die Mukosazellen des Dünndarms resorbiert. Ihre Resorption wird von Gallensäure gefördert (s. Abb. 1).

Nach der enteralen Resorption kann die Entstehung von Retinoiden aus Carotinoiden auf zwei Wegen erfolgen. Einerseits kann Retinal (RAL) durch eine mikrosomale Retinal-Reduktase mittels oxidativer Spaltung der zentralen Doppelbindung mit nachfolgender Reduktion zu Retinol synthetisiert werden (84). Hier spielt das zelluläre Retinol-bindende Protein II (CRBP II) eine wichtige Rolle, indem es Retinol durch Bindung vor der Oxidation zu Retinsäure (RA) schützt. Andererseits können als zweite Möglichkeit Apo-Carotinoide durch exzentrische Spaltung aus β -Carotin hergestellt und durch eine nachfolgende Transformation in Retinsäuren überführt werden (205).

In den intestinalen Zellen bildet Retinol Komplexe mit CRBP II. Dieser ROL-CRBP II Komplex ist Grundlage für die Veresterung von Retinol in Retinylester. Diese Reaktion wird durch die Lecithin: Retinol Acetyltransferase (LRAT) katalysiert (108). Retinylester beinhalten langkettige Fettsäuren, durch die sie in Chylomikronen, welche als Transportmittel für resorbierte Fette dienen, aufgenommen werden. Chylomikronen sind Fetttröpfchen mit einer netzartigen Proteinhülle, die von den Zellen der Darmmukosa gebildet werden und Triglyzeride (90 %), Phospholipide (4 %), Cholesterol und Cholesterolester (5 %) und Proteine (1 %) enthalten. Die RE-Chylomikronen-Komplexe werden über die Lymphwege abtransportiert, wo verschiedene biochemische Umwandlungen stattfinden, die zu verschiedenen Chylomikronen-Umbauprodukten führen (z.B.: HDL, LDL, CM-Remblin).



Legende

LRAT = Lecithin Retinol Acetyltransferase

RBP = Retinol-Bindungsprotein

REH = Retinylester-Hydroxylase

CM = Chylomikronen

RAL = Retinal

RE = Retinylester

ROL = Retinol

Abbildung 1: Retinoid Resorption, Transport und Speicherung im menschlichen Körper. Zusammentragung aus verschiedenen Veröffentlichungen (13, 33, 84, 108, 123, 163, 164, 200, 205). Ausführliche Erläuterung siehe Text (Kapitel 3.1).

Über den *Ductus thoracicus* gelangen die Chylomikronen in die Blutbahn, wo sie vom HDL-Protein, dem Apo-C2-Protein, aufgenommen werden, das einen Aktivator für die Lipoprotein-Lipase darstellt. Die Produkte werden hauptsächlich in der Leber abgebaut, obwohl die Aufnahme auch im Knochenmark, in der Milz und zu einem kleinen Anteil auch in Gonaden, Lunge, Niere, Fett und Skelettmuskulatur stattfinden kann (13).

In den parenchymalen Hepatozyten werden die Chylomikronen-RE-Komplexe hydrolysiert, und das freiwerdende Retinol bindet an ein ROL-Bindungsprotein (RBP), ein Serum-Transportprotein. Überschüssiges Retinol wird parakrin von den Hepatozyten an die perisinusoidalen Sternzellen weitergegeben, wo sie gespeichert werden. Die Sternzellen, die auch Vitamin-A-Vorrats- oder Ito-Zellen (fettspeichernde interstitielle Zellen der Leber) genannt werden, enthalten ungefähr 50-80 % des totalen Körper-Vitamins A in Form von Retinylester. Abhängig von ihrem lipophilen Charakter weisen die exogenen und endogenen Retinsäure-Derivate im menschlichen Körper sehr unterschiedliche Halbwertszeiten auf, was zur Akkumulation führen kann. Hypervitaminosen sind somit möglich. Dies muß besonders bei der klinischen Therapie mit synthetischen Retinsäure-Derivaten berücksichtigt werden (s. Kap. 1.2). Um einen konstanten physiologischen ROL-Spiegel von 2 µmol/L im Plasma aufrechtzuerhalten, kann Retinol aus den Ito-Zellen freigesetzt werden, wo seine Konzentration annähernd das 1000fache der durchschnittlichen Plasmakonzentration beträgt (7-14 nmol/L) (123, 49).

ROL-RBP Komplexe, die von der Leber abgegeben werden, binden an Transthyretin (Präalbumin), das die Fähigkeit besitzt, sowohl das Thyroid-Hormon als auch den ROL-RBP-Komplex gleichzeitig, jedoch unabhängig voneinander, binden zu können.

Der Plasmaträger von Retinol, das RBP, sowie der Plasmaträger der Retinsäuren, das Albumin, kommen in den Intrazellulärspalten der Haut vor (200). Neben Retinol wurden in menschlicher Haut auch β-Carotine, 3,4-Didehydro-Retinoide, Retinal, *all-trans* RA (*at*RA) und einige ihrer Metabolite sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert (199, 200, 201). Man konnte auch nachweisen, daß humane, epidermale Keratinozyten, die in einem Medium mit einer physiologischen Konzentration an Retinol kultiviert wurden, eine Retinoid-Zusammensetzung aufwiesen, die vergleichbar war mit der Verteilung, die in einer intakten Epidermis nachgewiesen werden kann (149).

Der genaue Mechanismus der ROL-Aufnahme in die Zielzellen ist bis heute noch nicht vollständig bekannt. Verschiedene Möglichkeiten werden diskutiert: Einerseits könnte die Aufnahme RBP-Rezeptor vermittelt sein, mit einem nicht spezifischen Transfer von Retinol, und einer darauffolgenden Flüssig-Phase-Exozytose (33). Andererseits könnte oral aufgenommenes *at*RA, 13-*cis*-RA und Etretinat einer direkten First-Pass-Absorption in das portale Blut

unterliegen. Die Substanzen liegen im Plasma hauptsächlich an Albumin gebunden vor und können so im Blut zirkulieren. Die Aufnahme dieser Retinoide von den Zielzellen wird durch noch unbekannte Faktoren reguliert. Gleichmaßen ist weder der Mechanismus der transkutanen Resorption von topischen Retinoiden noch ihr Transfer in die Zielzellen bekannt. Jüngere Studien diskutieren die Aufnahme von Retinol in die Zelle durch spezielle Bindungsproteine, die CRBPs (73).

Topisch appliziertes *at*RA wird in der Epidermis partiell in 9-*cis*-RA, 13-*cis*-RA und weitere Metabolite isomerisiert (103). Ungefähr 80 % des aufgetragenen *at*RA verbleibt auf der Hautoberfläche. Nach der anfänglichen Diffusion in das Stratum corneum innerhalb weniger Minuten erfolgt die weitere Diffusion in die Epidermis und Dermis wesentlich langsamer (187). Experimente zeigten, daß topisch appliziertes *at*RA und 13-*cis*-RA nur sehr schwer in und durch die Haut penetrieren. Gelartige Vehikel scheinen die Eigenschaften zu haben, auf der Haut festgehalten zu werden. Crèmes haben eine höhere Penetrationsrate, was somit zu einer höheren Eindringrate des Wirkstoffs führt. Dahingegen penetriert 13-*cis*-RA *in vitro* sehr schnell in normale menschliche Keratinozyten (163, 164).

Die Speicherung von Retinol in der menschlichen Haut erfolgt durch Veresterung von Retinol zu Retinylester (86). Hautzellen enthalten verschiedene Transferasen, wie z.B. die Lecithin: Retinol Acetyltransferase (LRAT) oder die Acetyl-CoA Acetyltransferase (ARAT). Beide Enzyme katalysieren die RE-Synthese (99, 100).

Die Hydrolyse von Retinylester in Retinol wird durch eine spezifische RE-Hydrolase reguliert. Nach 12-stündiger Inkubation mit Retinol ist in kultivierten Keratinozyten eine LRAT Aktivität induzierbar, und gleichzeitig wird die Biosynthese von *at*RA verringert. Eine Hemmung von LRAT durch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) führt hingegen zu einer Normalisierung der *at*RA Synthese. Diese Regulation der LRAT Aktivität läßt auf einen Autoregulationsmechanismus schließen, der die RA-Synthese auf Grund einer negativen Rückkopplung des gebildeten Substrats reguliert. *In vivo* ist die Veresterungsaktivität pro Zelle in den Keratinozyten der menschlichen Haut in der Basalschicht vierfach größer als die in den Keratinozyten der oberen Epidermisschichten. Das deutet auf eine höhere Konzentration von Retinoiden in der unteren Epidermis hin, die auf Grund ihrer Lokalisation einer besseren Perfusion aus den Kapillaren der Dermis zugänglich ist. Somit liegt die Vermutung nahe, daß mehr Retinylester in den unteren als in den oberen Schichten der Epidermis gespeichert werden. Während der Wanderung der Zellen von den tieferen zu den oberen Schichten könnte dieses gespeicherte Retinylester als Retinol-Nachschub für die Keratinozyten und gleichzeitig als Quelle für Retinsäuren dienen, die ausgereifte Keratinozyten aus Retinol synthetisieren können (175, 176). Menschliche Keratinozyten, die mit *at*RA inkubiert werden, weisen einen zeit- und konzentrationsabhängigen

Anstieg der Menge von Retinylester, eine erhöhte RE-Syntheserate und eine verringerte RE-Verwertung auf (150). Das zeigt, daß Keratinozyten auf exogene Retinsäuren mit einem Rückkopplungsmechanismus reagieren, indem sie die Produktion von endogenem aktiven Retinoid hemmen. Dies wird durch die Umwandlung von extrazellulärem Retinol in Retinylester und einer verringerten Mobilisierung von Retinylester erreicht. Wie genau diese Reaktionen vermittelt werden, und mit welchem Anteil die nukleären Rezeptoren daran beteiligt sind, ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Man ist sich jedoch, wie oben erläutert, sicher, daß das Steady-State-System der intrazellulären Retinoide durch komplexe Rückkopplungsmechanismen reguliert wird, bei denen verschiedene Enzyme und Retinoid-Bindungsproteine eine Rolle spielen (163, 164).

3.2 Die Retinsäure Biosynthese

Wohingegen ausführliche und ergiebige Untersuchungen das Feld der Retinoid-Rezeptoren erhellen, weist das Wissen um die Metabolisierung von Retinol in aktive Liganden noch große Lücken auf.

Auf Grund der Beobachtung, daß Retinol *in vivo* Veränderungen in der Haut hervorruft, die denen durch Retinsäuren hervorgerufenen ähneln, jedoch kein meßbarer Spiegel von Retinsäuren festgestellt werden konnte, wird Retinol als das Prohormon der Retinsäuren angesehen. Das würde voraussetzen, daß die Wirkung von Retinol auf die menschlichen Keratinozyten durch die Umwandlung von Retinol zu Retinsäure streng reguliert wird. Die enzymatische Umwandlung von Retinol und Retinal zu Retinsäuren unterliegt einer so engen Kontrolle, daß *atRA* gerade oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden kann, wenn man unbehandelte oder Retinol-behandelte menschliche Haut verwendet (86). Es werden nur sehr niedrige Spiegel an Retinsäuren benötigt, um deren Funktion als Liganden mit Bindung und Aktivierung an nukleäre RARs und RXRs zu entfalten. Die Mengen Retinsäuren, die aus Retinol entstehen, werden sehr schnell durch eine RA-4-Hydroxylase inaktiviert. Die so entstehenden Metabolite 4-OH-RA und 4-*oxo*-RA weisen eine sehr viel geringere Affinität zu den Retinoid Rezeptoren auf (1).

Zahlreiche Enzyme, die in den Retinoidmetabolismus eingreifen, konnten identifiziert werden. Diese Enzyme gehören vier verschiedenen Familien an: den Alkohol/Retinol Dehydrogenasen (ADH/RoLDH), den kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR), den Aldehyd/RAL Dehydrogenasen (ALDH/RalDH) und verschiedenen Cytochrom P450-Isoenzymen.

3.3 Retinoid Bindungsproteine

Neben diesem komplexen Enzymsystem bilden die Retinoid-bindenden Proteine eine andere Gruppe, die den intrazellulären Retinoidmetabolismus beeinflussen. Diese extrem wichtigen Regulatoren interagieren sowohl mit dem Substrat als auch mit den Enzymen selbst.

Im Cytoplasma werden sowohl Retinol als auch die Retinsäuren an spezifische, zelluläre Bindungsproteine gebunden. CRBP I und II und CRABP I und II sind die Proteine, die an der Regulierung der intrazellulären Konzentrationen von Retinol, Retinal und der Retinsäuren beteiligt sind. Beide dienen als Lagerungs- und Transportproteine und sind somit in der Lage, zellspezifisch konstante Spiegel an freiem Retinol und Retinsäuren herzustellen und aufrechtzuerhalten.

Bemerkenswert ist, daß sowohl die Konzentration von CRBP I/II als auch die von CRABP I/II die Konzentration ihrer Liganden übersteigt (38). Zusätzlich ist die Affinität zu ihren Liganden um vieles höher als die vieler Enzyme zu ihrem Substrat (132).

3.3.1 Cellular Retinol Binding Proteins I und II

Die CRBP-Proteine binden Retinol und präsentieren es der LRAT, die wiederum Retinylester als Speicherstoff bilden kann. Im weiteren schützen sie Retinol vor spontaner nicht-enzymatischer Isomerisierung und Oxidation, die sehr schnell in der Abwesenheit von CRBP stattfindet. Ungebundenes CRBP (Apo-CRBP) inhibiert die LRAT, wohingegen der Komplex CRBP verbunden mit Retinol (Holo-CRBP) auch als Substrat für die Umwandlung zu Retinsäuren dient. Auf diese Weise trägt das Verhältnis zwischen Apo- und Holo-CRBP zum Gleichgewicht zwischen Oxidation und Veresterung von Retinol bei (14).

Die Expression von CRBP wird in verschiedenen Geweben, inklusive der menschlichen Haut, durch die Anwesenheit von Retinsäuren und Retinol erhöht. Es wird vermutet, daß diese Induktion der CRBP Gentranskription ein negativer Rückkopplungsmechanismus der RA-Synthese durch *α*RA ist. Der Spiegel an freiem Retinol sinkt, und somit reduziert sich die Umwandlungsrate von Retinol zu Retinsäuren (14).

CRBP I und CRBP II haben zum Teil unterschiedliche Funktionen. CRBP I scheint mit Hilfe des sRBP (Serum Retinol Bindungsprotein) Retinol in die Zelle zu transportieren (73). Es weist im Gegensatz zu CRBP II eine viel höhere Affinität zu Retinol als zu Retinal auf (78). CRBP II bindet Retinal und Retinol mit gleich hoher Affinität und scheint in der Zelle eher für den passiven Transport zuständig zu sein (73).

3.3.2 Cellular Retinoic Acid Binding Proteins I und II

Ursprünglich stammt CRABP I in der menschlichen Haut überwiegend aus Melanozyten, wogegen CRABP II eher in Keratinozyten und Fibroblasten gebildet wird. Die basale CRABP I Expression ist sehr viel niedriger als die des CRABP II. Die intrazellulären Spiegel von CRABP I sind in der Dermis und Epidermis gleich hoch, während CRABP II in der Epidermis in viel höheren Konzentrationen gefunden wird. Beide Bindungsproteine weisen unterschiedliche RA-Bindungsaffinitäten auf, die durch ihre RA-responsiven Elemente (RARE) in den Promotorregionen hervorgerufen werden. Es wird vermutet, daß CRABP I den Metabolismus von Retinsäuren zu inaktiven Metaboliten beschleunigt, indem die Retinsäuren von CRABP I zu Cytochrom P450 Isoenzymen transportiert werden. CRABP II ist wahrscheinlich an der Regulation von nukleären Rezeptoren durch Retinsäuren beteiligt und könnte somit den Transport von Retinsäuren zum Nukleus vereinfachen (38).

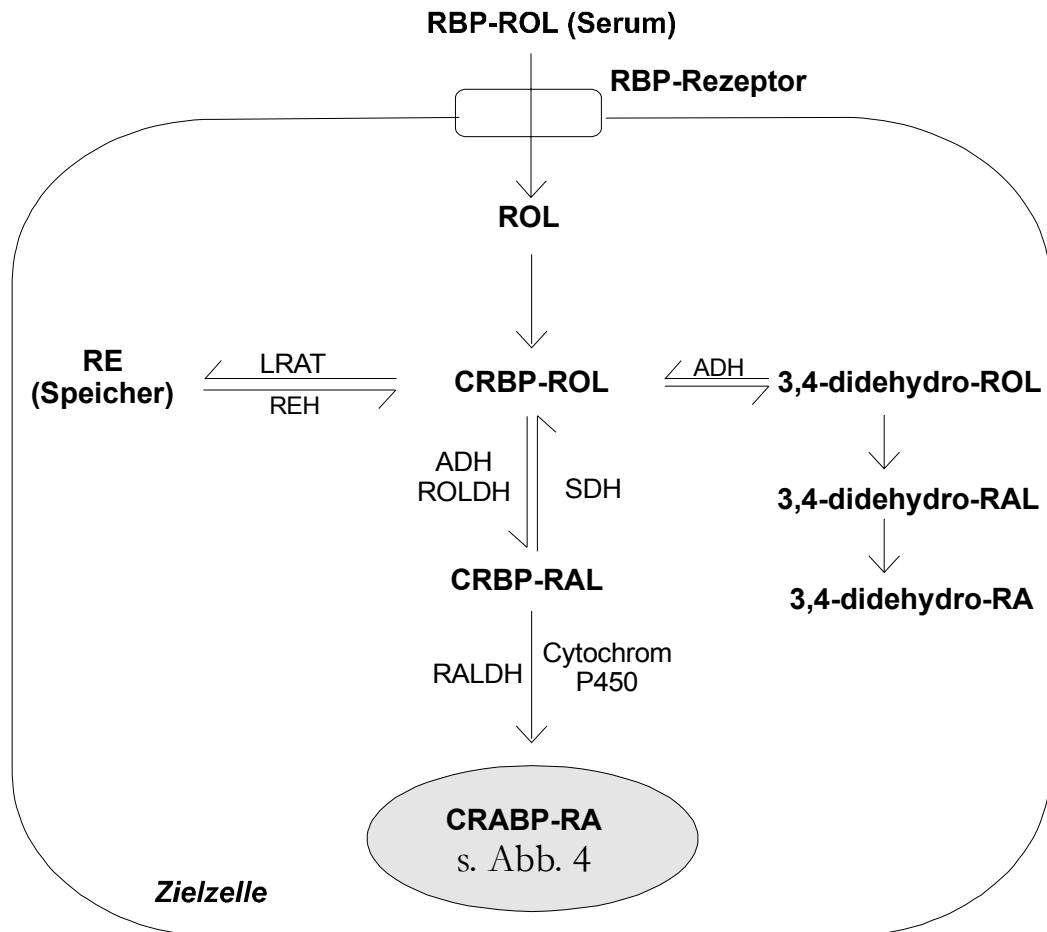
Interessant ist die Beobachtung, daß 13-*cis*-RA nicht an CRABP I, II oder andere Bindungsproteine im Cytosol gebunden wird. Daher dringt es nach topischer oder systemischer Applikation schneller in den Zellkern ein als *at*RA oder 9-*cis*-RA, die nur in limitierten Konzentrationen in den Zellkern gelangen, da sie an CRABP I/II gebunden sind (129). Dieser Befund könnte den profunden teratogenen Effekt von 13-*cis*-RA nach topischer oder systemischer Behandlung erklären (140, 141, 142).

Bei psoriatischer Haut wurde eine signifikante Erniedrigung der mRNA-Expression von CRABP I und eine Zunahme der CRABP II mRNA-Expression beschrieben (193). Zusätzlich ist auch die Expression der mRNA von CRBP I erhöht. Ob diese Veränderungen von CRBP I und CRABP I eine besondere Charakteristik der Psoriasis darstellt, oder einfach die Tatsache widerspiegelt, daß die psoriatische Epidermis größere Mengen an undifferenzierten Keratinozyten beinhaltet, ist noch unbekannt. Auch in Basaliomen und Spinaliomen ist die CRABP I Expression stark erniedrigt, während CRBP I exprimiert bleibt. Interessant ist auch, daß sich die Expression der Bindungsproteine und der spezifischen Rezeptoren in psoriatischer Haut nach topischer Retinoidbehandlung verändert (88, 89, 90, 195).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Retinoid-Bindungsproteine (CRBPs und CRABPs) an der Regulierung der intrazellulären Konzentrationen der Retinoide beteiligt sind. Ihr untypisches Expressionsmuster in der psoriatischen Haut und anderen hyperproliferativen Hauterkrankungen könnte somit als Erklärung dieser Krankheitsbilder herangezogen werden. Dies bedarf jedoch noch weiterer Studien und Beweise.

3.4 Die Umwandlung von Retinol zu Retinsäure

Die Umwandlung von Retinol zu Retinsäure ist ein zweiteiliger Prozeß von Retinol über Retinal zu Retinsäure.



Legende

ADH = Alkohol Dehydrogenase	CRABP = Cellular Retinoic Acid Binding Protein
RA = Retinsäure	CRBP = Cellular Retinol Binding Protein
RAL = Retinal	LRAT = Lecithin Retinol Acetyltransferase
RBP = Retinol-Bindungsprotein	REH = Retinylester Dehydrogenase
RE = Retinylester	ROLDH = Retinol- Dehydrogenase
ROL = Retinol	RALDH = Retinal- Dehydrogenase
SDR = Short-Chain Dehydrogenase /Reduktase	

Abbildung 2: Die Aufnahmen von RBP-ROL aus dem Serum in die Zielzellen und der Metabolismus von Retinol zu Retinal und anschließend zu Retinsäure. Nähere Erläuterungen siehe Kapitel 3.4.

3.4.1 Alkohol/Retinol Dehydrogenase und Short-Chain Dehydrogenasen/Reduktasen

An dem ersten Schritt, der auch der limitierende ist, sind die Alkohol Dehydrogenasen (ADH Isoformen) und die Short-Chain Dehydrogenase/Reduktase (SDR) beteiligt. Hierbei katalysieren Mitglieder der ADH (ADH 1, 2 und 4) (92) und Enzyme der SDR Familie die reversible Interkonversion von Retinol in Retinal (25).

Die cDNA von ADH7 wurde zuerst aus einem menschlichen Magen isoliert und geklont (58). Die Ähnlichkeiten der Sequenzen zu den anderen bekannten menschlichen ADH Klassen betragen zwischen 60 bis 70 % (167). *In Vitro* ist die Klasse IV ADH (ADH7) nach heutiger Erfahrung die aktivste der Retinol Dehydrogenasen (ROLDH) (220, 221). Die ROLDH wurde auch bereits in humanen epidermalen Keratinozyten nachgewiesen und geklont (82). *In Vivo* spielen wahrscheinlich die beiden ADHs, ADH I und ADH IV eine wichtige Rolle (47). Die ADH Isoformen benutzen dabei NAD(H) als Coenzym, wohingegen SDR an CRBP I mit NADP(H) als phosphorylierendem Coenzym bindet (14). Ähnliche ADH Enzyme wie diese, die Retinol zu Retinal metabolisieren, wurden neben in Chordatieren auch in sich differenzierenden Keratinozyten, in anderen Zellarten *in vitro*, in menschlicher psoriatischer Epidermis und in niedrigen Konzentrationen auch in normaler menschlicher Haut gefunden (26). Inwieweit die anderen Klassen der ADH im Retinoidmetabolismus der menschlichen Haut aktiv sind, ist bis heute unbekannt.

Drei Formen der mikrosomalen Retinol Dehydrogenase, die in Rattenleber zu finden sind, ROLDH I, II und III, enthalten Sequenzhomologien zu den Mitgliedern der SDR Familie. Die Fähigkeit dieser Enzyme, CRBP zu erkennen, ist ein gut funktionierender Mechanismus, um den Hauptvorrat an Retinol *in vivo* zu verwalten, da CRBP die Verfügbarkeit und Verteilung von Retinol reguliert. Diese ROLDHs repräsentieren eine dritte Klasse von Proteinen, die potentiell wichtig für die Retinoidtätigkeit ist und zur Superfamilie von Steroid/Lipid-spezifischen Proteinen gehört. ROLDH I erkennt Holo-Zelluläres CRBP als Substrat, und ROLDH II erkennt die physiologische Form von Retinol als Substrat (21).

Die beiden Familien der ADH und der SDR sind evolutionär verwandt, was man dadurch erkennen kann, daß sie sich ähnliche Coenzym-bindende Domänen teilen (144). Inwieweit diese SDH an dem Metabolismus der Retinoide in der menschlichen Haut beteiligt sind, ist noch nicht geklärt.

Wissenschaftliche Untersuchungen des Wellcome Trust Grant Projekts beschrieben erst kürzlich den möglichen Zusammenhang zwischen dem RBP-Vorkommen und den Enzymen ROLDH und RALDH. Die Studie zeigte zum ersten Mal die funktionelle Verbindung zwischen dem RBP

Rezeptor, intrazellulärem CRBP I und den ROLDH Enzymen auf. Die Proteine wurden alle in den Geweben gefunden, die besonders auf eine ausgeglichene Vitamin-A-Versorgung angewiesen sind (212, 213).

3.4.2 Aldehyd/Retinal Dehydrogenase und Cytochrom P450 Isoenzyme

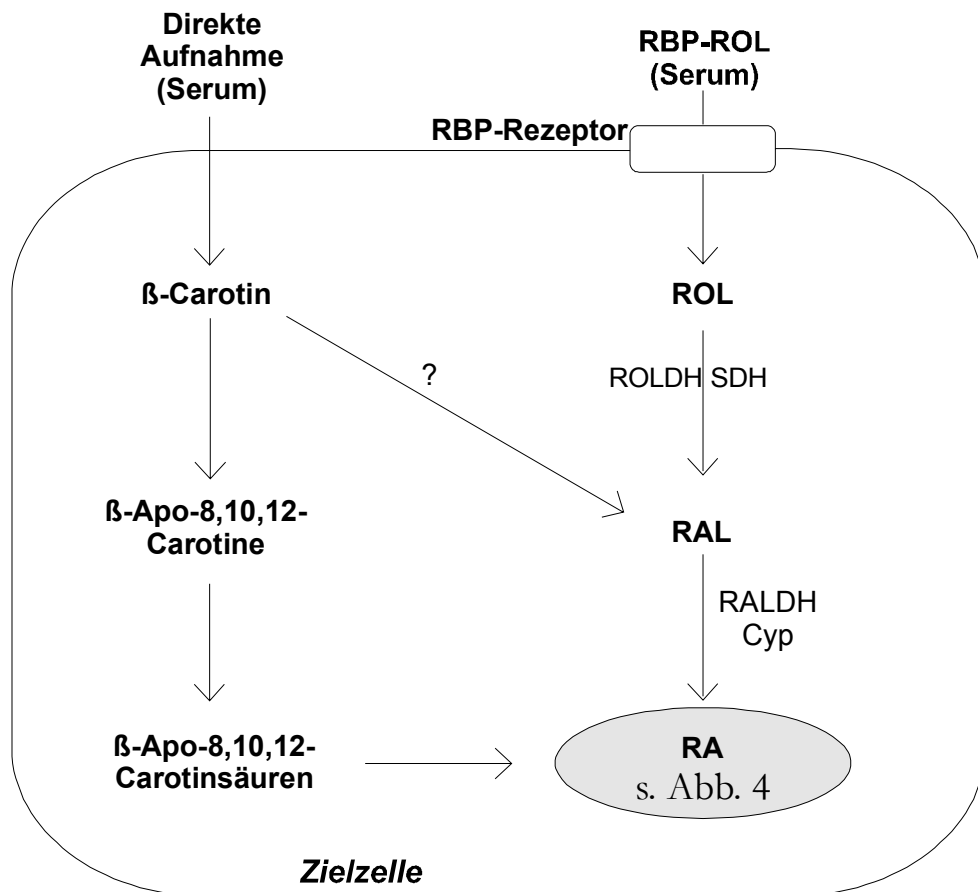
An dem zweiten Schritt der Umwandlung von Retinol zu Retinsäuren, somit Retinal zu Retinsäure, sind die Aldehyd/Retinal Dehydrogenasen (ALDH/RALDH) und Cytochrom P450 Isoenzyme beteiligt. Die genannten Enzyme katalysieren die irreversible Oxidation von Retinal zu *at*RA (46). Dies erklärt die Beobachtung, daß die Gabe von *at*RA an Vitamin-A-defiziente Tiere zu keinem Anstieg des Retinols oder Retinals führt. Ohne diese Produkte kann weder der Retinoid-Speicher aufgefüllt werden, noch wird die Produktion des Sehpigmentes 11-*cis*-Retinal induziert (40).

Enzyme	Ort	Reaktion
Aldehyd Dehydrogenase1	Cytosol	Retinal → Retinsäure
CYP26	ER	Retinal → 4-OH-Retinal
CYP1A1	ER	Retinal → Retinsäure
CYP1A1		Retinal → 4-OH-Retinal
CYP3A6	ER	
CYP1A2	ER	9- <i>cis</i> -Retinal →
		4-OH-9- <i>cis</i> -Retinal →
		4- <i>oxo</i> -9- <i>cis</i> -Retinal
CYP1A2		9- <i>cis</i> -Retinal →
		9- <i>cis</i> -Retinsäure
CYP2B4, CYP2C3	ER	9- <i>cis</i> -RAL →
		4-OH-Retinal

Tabelle 11: Die Aldehyd/Retinal Dehydrogenasen 1 und verschiedene Cytochrom P450 Isoenzyme mit ihren dazugehörigen Oxidationsreaktionen in der menschlichen Haut.

In der Epidermis der Haut wird topisch appliziertes Retinal in *at*RA umgewandelt, und die biologische Aktivität der RALDH kann *in vivo* durch den Nachweis von mRNA-Spiegeln des Filaggrins und Loricrins belegt werden (36). Von den drei charakterisierten Klassen dieses

Enzyms, die in verschiedenen Spezies nachgewiesen wurden, zeigt die ALDH I die höchste Aktivität für die Oxidation von Retinal zu den korrespondierenden Retinsäure-Isomeren (101). Ob diese Vorgänge auch beim Menschen in dieser Art und Weise vorliegen, ist noch nicht erforscht. Auch neuere Forschungsergebnisse, die sich mit diesem Thema beschäftigen, sagen aus, daß die RALDH das Schlüsselenzym im finalen Schritt zur RA-Synthese und zur RA-Regulation ist (8, 196).



Legende	
CYP	= Cytochrom
RA	= Retinsäure
ROL	= Retinol
RALDH	= Retinal-Dehydrogenase
RBP	= Retinol-Bindungsprotein
ROLDH	= Retinol-Dehydrogenase
SDH	= Short-Chain Dehydrogenase

Abbildung 3: Die Aufnahme von β-Carotin und RBP-ROL in die Zielzellen und deren Metabolismus zu Retinsäuren. Nähere Erläuterungen siehe Kapitel 3.4.

Das Enzym wurde im Embryonalstadium auch in P19 Teratokarzinomzellen und COS Zellen nachgewiesen (219). Forschungsarbeiten zeigten auch, daß dieses Enzym auch in anderen Spezies wie Ratten, Vögeln und Fischen die primäre Rolle der Katalysierung von Retinal in Retinsäuren spielt. Es konnte auch festgestellt werden, daß der Vitamin-A-Mangel zu einer Erhöhung der RALDH-Expression führte, wohingegen die Zugabe von Retinol zu einer Erniedrigung der

RALDH-Expression führte. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Vitamin-A-Status die Expression von RALDH im Gewebe reguliert (9). Obwohl einige Mitglieder der Cytochrom P450 Superfamilie für ihre Beteiligung an der RA-Synthese bekannt sind, scheinen sie eine wesentlich bedeutendere Rolle für den Katabolismus von aktiven Liganden zu spielen. Das wichtigste CYP-Isoenzym in der menschlichen Haut scheint offensichtlich CYP1A1 zu sein.

Natürlich darf hier nicht vergessen werden, daß die Synthese von Retinsäuren nicht einzig und allein von dem Substrat Retinol abhängig ist. Bei der Spaltung von β -Carotin wird Retinal als intermediäres Produkt gebildet, und somit kann β -Carotin als alternativer Vorläufer für Retinsäuren in epidermalen Zellen und in verschiedenen anderen Geweben fungieren (98).

3.5 Die Retinsäuren

Obwohl 9-*cis*-RA als Ligand für RXRs und RARs bekannt ist, konnte sein Syntheseweg noch nicht komplett aufgeklärt werden. Es gibt Ergebnisse, die darauf hinweisen, daß es aus nicht-enzymatischer Isomerisierung aus *at*RA entsteht (51). Andere Untersuchungen mit humanen Fibroblasten zeigten allerdings, daß 9-*cis*-RA nicht in nennenswerten Mengen gebildet wurde, weder wenn *at*RA noch 13-*cis*-RA *in vitro* zu den Kulturen gegeben wurden (Mündliche Mitteilung F. Jugert). Dies war in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC 13 anders. Hier wurden über 10 % der hinzugefügten RA-Isomere zu 9-*cis*-RA isomerisiert. Andere natürlich vorkommende Derivate von 9-*cis*-Retinoiden, wie z.B. 9-*cis*-ROL oder 9-*cis*- β -Carotin, könnten auch als Vorläufer für 9-*cis*-RA dienen.

In Rattenleber wurden hohe Aktivitäten der 9-*cis*-ROL Dehydrogenase beobachtet (124), und die wichtigste Retinal Dehydrogenase wandelt *all-trans*-RAL und 9-*cis*-RAL mit hoher Effektivität in ihre jeweiligen Säuren um, während sie 13-*cis*-RAL klar ausgrenzt (66). Diese 9-*cis*-RAL Dehydrogenase kann 9-*cis*-RAL, das ein Produkt des aus der Nahrungsaufnahme stammenden 9-*cis*-ROL oder 9-*cis*- β -Carotin ist, zu 9-*cis*-RA umwandeln. Auf Grund der Tatsache, daß der Mechanismus der Isomerisierung von *at*RA zu 11-*cis*-RA vergleichbar mit der von *at*RA zu 9-*cis*-RA ist, könnte 9-*cis*-RA ursprünglich auch ein Erzeugnis von 9-*cis*-ROL aus Retinylester sein, wie es bei 11-*cis*-ROL beobachtet werden konnte. Im menschlichen Plasma wird 9-*cis*-RA sehr schnell, aber reversibel in 9,13-*dicis*-RA überführt (76). *In vitro* ist dieser Metabolit auch in menschlichen epidermalen Keratinozyten nachweisbar. Allerdings ist die genaue Funktion des 9,13-*dicis*-RA noch nicht bekannt. Die Interkonversion könnte einerseits ein Weg zur Eliminierung von 9-*cis*-RA sein, andererseits ein Weg, um ein Depot des nicht so toxischen Derivates für eine eventuelle spätere Nutzung zu schaffen (124, 163, 164). Ob die 9-*cis*-

Interkonversion zu 9,13-*dicis* in der Haut auch ein reversibler Schritt ist, bleibt noch zu untersuchen. Bislang ermittelte Versuchsergebnisse weisen eher auf eine irreversible Interkonversion hin, da die Konzentration von 9,13-*dicis*-RA als einzige, im Vergleich mit den anderen Isomeren, konstant über die Zeit ansteigt (Mündliche Mitteilung F. Jugert).

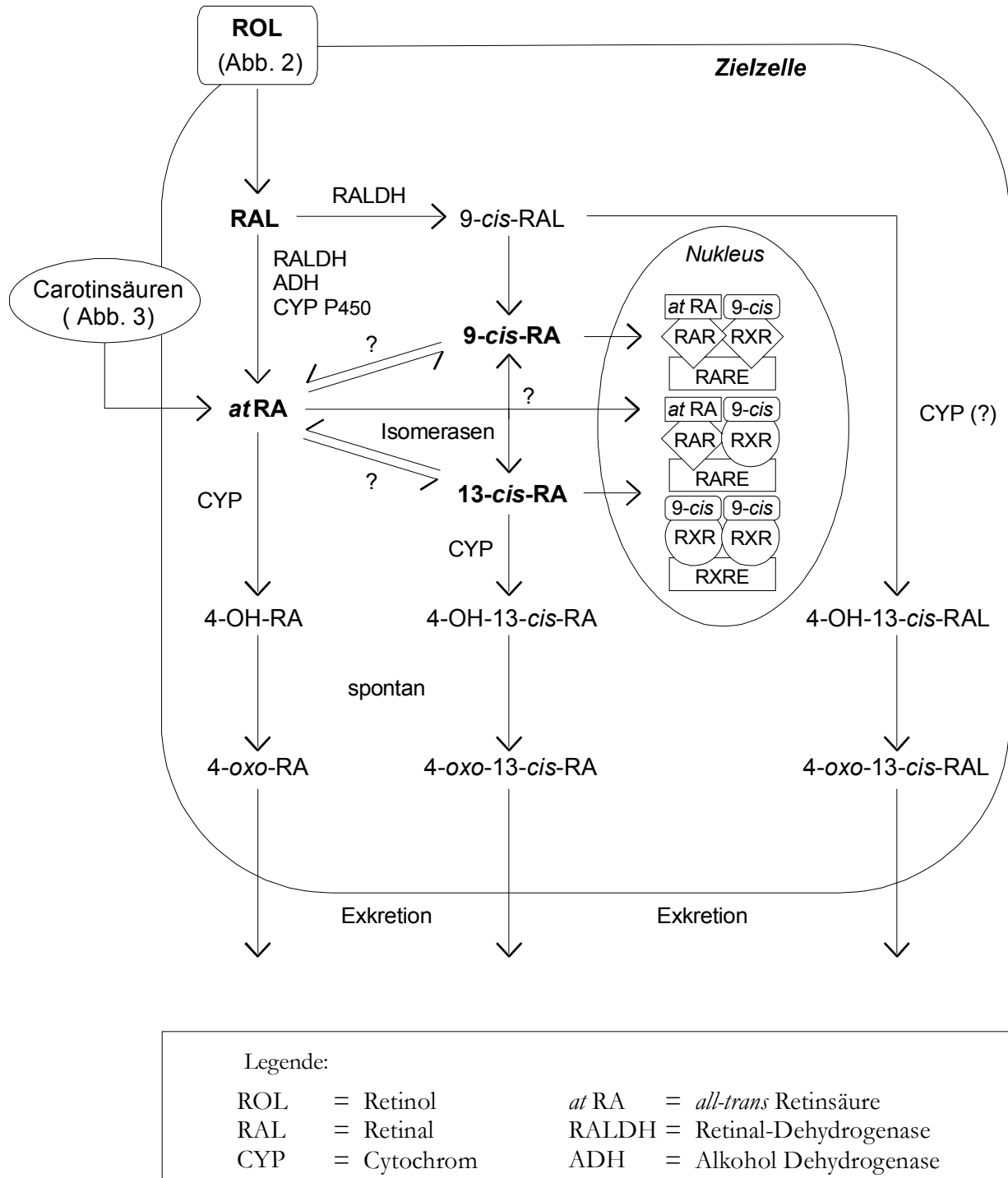


Abbildung 4: Die intrazelluläre Isomerisation der Retinsäuren *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA und deren Beziehung zu den Retinoid-Rezeptoren (RAR, RXR, RXRE) im Zellkern. Nähere Erläuterungen siehe Kapitel 3.5 bis 3.6.2.

Bis heute ist über die Isomerisierung von Retinoiden sehr wenig bekannt, obwohl genau diese Schritte eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung von angemessenen intrazellulären Spiegeln von aktiven Retinsäuren haben.

Die *all-trans* zu 9-*cis*-Isomerisierung, die den wichtigsten Liganden für die RXRs herstellt, ist nicht nur bei den RA-Isomeren zu beobachten, sondern auch bei der *all-trans*-RAL zu 9-*cis*-RAL Konversion. Letztere wird durch eine spezifische ADH gesteuert (101). Bemerkenswerterweise sind die Spiegel von 9-*cis*-RA in der menschlichen Haut wesentlich niedriger als die von *at*RA. Zusätzlich wird topisch auf die menschliche Haut aufgetragenes 9-*cis*-RA sehr schnell zu *at*RA transformiert (44). Das läßt Spielraum für die Vermutung, daß eine Isomerase existiert, die hauptsächlich *at*RA produziert. Alternativ wird 9-*cis*-RA auch aus 9-*cis*- β -Carotin hergestellt (206, 207). Die physiologische Bedeutung dieser Reaktion ist noch unbekannt.

Zusätzlich zu vielen RA-Derivaten produziert die menschliche Epidermis auch 14-OH-4, 14-*ret*o-Retinol, dessen biologische Aktivität zuerst in B-Lymphozyten gezeigt wurde, wo es als Ersatz für Retinol das Wachstum der Zellen in Kultur aufrechterhält (20). Die Rolle dieses Retinoids in der Haut ist noch ungeklärt. Ähnlich unbekannt ist die funktionelle Notwendigkeit von Vitamin-A-Derivaten wie 3,4-*didehydro*-ROL (Vitamin A₂), 9,13-*dicis*-RA und 3,4-*dihydro*-RA, die auch in menschlichen Keratinozyten synthetisiert werden. Die Beobachtung, daß die topische Behandlung mit Retinsäuren zu einer geringeren Konzentration von 3,4-*dihydro*-Retinoiden in der Haut führt, legt die Vermutung nahe, daß diese Retinoide als Speicherformen dienen (150, 151). Es könnte jedoch auch sein, daß 3,4-*dihydro*-RA als endogenes Morphogen fungiert, mit einer ähnlichen Bedeutung wie *at*RA (190).

3.6 Retinoid Katabolismus

3.6.1 Cytochrom-abhängige 4-Hydroxylase

Bei der Umwandlung von hoch aktiven Retinoid-Liganden in inaktive Metabolite sind bestimmte Enzyme und nukleäre Retinoid-Rezeptoren für die Regulation von großer Bedeutung. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die wachstumshemmenden Effekte von Retinsäuren mit der Aktivität des RA-Metabolismus korrelieren (186). Das für diese Reaktion zuständige Enzym ist die CYP-abhängige 4-Hydroxylase, die den β -Ionon Ring von Retinsäuren zu 4-*hydroxy*-RA Metaboliten (4-OH-RA) hydroxyliert und dann einer Autooxidation zu 4-*oxo*-RA unterliegt. Diese Reaktion weist keine nennenswerte Rückreaktion auf. Beide Metabolite können somit viel schneller von

den Zellen ausgeschieden werden als Retinsäuren. Die CYP-Abhängigkeit der 4-Hydroxylierung wurde bereits in Mikrosomen aus Rattenhaut, Kaninchen, menschlicher Leber, menschlicher Haut (43) und muriner Haut (163, 164) gezeigt. Sie wird zu der neu entdeckten CYP26-Familie gezählt (214, 215, 62). In HaCaT-Zellen ist das Enzym in unserem Labor in Nativ-Proben und mit *atRA* behandelten Zellen nachgewiesen worden (Poster 1998).

Duell beschrieb, daß *atRA*, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA die 4-Hydroxylase induziert. Diese Hydroxylase scheint in der menschlichen Haut jedoch nur *atRA* zu metabolisieren (43, 44). Andererseits wurde berichtet, daß 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA die 4-Hydroxylierung von *atRA* in der menschlichen Leber behindert (121). Popa beschrieb nur eine niedrige Expression von CYP26A1 in humanen Keratinozyten, die nicht durch Retinsäure-Behandlung erhöht werden konnte (146). Fakt ist, daß die topische Applikation pharmakologischer Mengen von *atRA* auf der menschlichen Haut einen 4,5fachen Anstieg der Umwandlung zu 4-OH-RA und anderen polaren Metaboliten induziert.

3.6.2 4-*oxo*-Metabolite

Das am besten charakterisierte RA-Metabolit ist das 4-*oxo-atRA*, welches an RAR β , mit einer ähnlichen Affinität wie *atRA*, bindet. *In vitro* bindet 4-*oxo*-RA auch an CRABP, hat aber eine geringfügig niedrigere Affinität als *atRA* zu diesem Bindungsprotein.

Experimente zeigten, daß die Isomere 13-*cis*-RA und *atRA* hauptsächlich intrazellulär vorhanden waren, während 4-OH- und 4-*oxo*-Metabolite sehr schnell von den Zellen ausgeschieden wurden. Dies deutete darauf hin, daß diese Metabolite kaum meßbar an intrazelluläre Rezeptoren binden (Mündliche Mitteilung F. Jugert).

Wir beobachteten keinen Unterschied in der Oxidationsaktivität von 4-OH-RA in Medien mit kultivierten menschlichen Keratinozyten und Fibroblasten, verglichen mit Kulturmedien ohne Zellen. Dies legte die Vermutung nahe, daß 4-OH-RA spontan zu 4-*oxo*-RA oxidiert und somit nur von der Konzentration der *atRA* im Kulturmedium und der Induktion/Inhibition der RA-4-Hydroxylase abhängig ist.

Alternativ kann die Herstellung von 4-*oxo*-RA durch die Oxidation von 4-OH-RAL an der 2. oder 3. Position des β -Ionon Rings erfolgen. Dies ist eine Reaktion, die durch das Cytochrom P450 1A2 vermittelt wird. Hierbei wird durch 4-Oxidation von *all-trans*- und 9-*cis*-RAL, und nicht wie sonst aus Retinsäuren, 4-*oxo*-RA gebildet. Das könnte ein alternativer Weg für die Generierung von 4-*oxo*-RA sein, der jedoch nicht vollständig erklären würde, wie Retinsäuren gespalten werden.

3.6.3 Cytochrom P450 Isoenzyme (CYP)

Cytochrom P450 Formen kommen ubiquitär in der Natur vor. Die Superfamilie besteht nach dem heutigen Kenntnisstand aus über 1200 individuellen Genen, 157 Familien und beinhaltet alleine 310 Formen, die in Säugetieren vorkommen. Sie erscheinen in fast allen Lebensformen, und ein Organismus weist meist mehrere, unterschiedliche Cytochrome auf. 52 verschiedene Formen konnten bereits im menschlichen Körper identifiziert werden (181).

Verschiedene Isoenzyme der Cytochrom P450 Gensuperfamilie sind speziell an dem Katabolismus von Retinoiden in der Leber (152), der Trachea (59), dem Intestinum und der Haut (163, 164) von Nagern beteiligt. An dem Katabolismus von Retinsäuren im Gewebe von Nagern und Menschen sind verschiedene CYP-Isoenzyme beteiligt.

Es sei darauf hingewiesen, mit welchen Schwierigkeiten das Auffinden der beteiligten Isoenzyme speziell für einen Metabolismus verbunden ist. Die insgesamt 52 im menschlichen Genom vorkommenden CYP-Gene beinhalten ca. 18 Formen, die an der Umwandlung von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen beteiligt sind (7). Von diesen sind viele polymorphisch, einige induzierbar und andere unterliegen interindividuellen Unterschieden in Hinblick auf ihre Hemmbarkeit. Zusätzlich weiß man von geschlechtlichen (3A), altersspezifischen (2E1, 3A9, 51) und ethnischen (1A2, 2D6, u.a.) Unterschieden. Als nicht geringe Komplikation kommt hinzu, daß es sogenannte „Silent“-Polymorphismen gibt (69, 181) und, daß auch bei der Induzierbarkeit Polymorphismen vermutet werden. All diese Aspekte verdeutlichen, wie schwierig es ist, die genaue Determination des Anteils herauszufinden, mit dem dieses Enzym am Metabolismus von Retinsäuren beteiligt ist. Äußere Einflüsse dürfen dabei natürlich nicht außer acht gelassen werden. Zum Beispiel enthält nur eine Tasse Kaffee ca. 300 verschiedene Substanzen, die auch Einfluß auf den Metabolismus haben könnten (153).

3.6.3.1 Cytochrom 1A1 und Cytochrom 1A2

Das wichtigste CYP-Isoenzym in der menschlichen Haut scheint offensichtlich CYP1A1 zu sein. Das Enzym ist in der Lage, *all-trans*- und *9-cis*-RAL in das korrespondierende RA-Isomer zu oxidieren. Ferner ist bekannt, daß die basale Expression von CYP1A1 durch die Anwesenheit von Retinsäure in der menschlichen Haut gehemmt werden kann (105), was auf einen Rückkopplungsmechanismus durch eines der Produkte dieses Isoenzyms hindeutet.

In Lebermikrosomen vom Kaninchen sind CYP 1A2 und 2B4 die am effektivsten Retinsäuren zu 4-OH-RA metabolisierenden Isoenzyme (159). In weiteren Studien fanden Roberts und

Mitarbeiter, daß CYP1A2 hohe Aktivität sowohl bei der 4-Hydroxylase von Retinsäuren als auch bei der Oxidation von Retinal zu Retinsäuren zeigte. Raner (151, 152) und Mitarbeiter konnten in Kaninchen Lebermikrosomen nachweisen, daß CYP1A1 und etwas geringer auch 1A2 die aktivsten Enzyme bei der Konversion von *all-trans*-, 13-*cis*- und 9-*cis*-RAL zu ihren korrespondierenden RA-Isomeren sind (151, 152). Somit spielt CYP1A1, und in geringerem Maße auch 1A2, vermutlich eine größere Rolle in der Aktivierung als in der katalytischen Oxidierung der Retinoide. Weitere Ergebnisse lassen auf eine Doppelrolle für diese Enzyme bei der Oxidation von *all-trans*-RAL und *at*RA schließen.

Humane Keratinozyten in Kultur exprimieren CYP1A1. Die 4-Hydroxylierung von Retinsäuren steigt in gleichem Maße an wie 3-Methylcholantren, das CYP1A1 induziert. Auf der anderen Seite inhibieren Retinsäuren die katalytische Aktivität von CYP1A1 in der menschlichen Leber, was auf eine Beteiligung des 1A1 an der 4-Hydroxylierung von Retinsäuren in diesem Gewebe hindeutet. Die RA-4-Hydroxylase, die speziell für den Katabolismus von Retinsäuren in der menschlichen Haut verantwortlich ist, wird heute zu der Familie 26 der Cytochrom P450 Enzyme gezählt (214, 215). RALDH und CYP26 werden somit als sogenannte Funktionelle-Einheit gesehen. Das erste Enzym ist für die Bildung der Retinsäuren verantwortlich und das zweite für die Elimination (181). Eine CYP26 Transkription konnte in menschlicher Leber, Gehirn und Plazenta nachgewiesen werden. Außerdem scheint es einen großen Einfluß auf die embryonale Entwicklung zu haben, was an Mäuseembryonen und Stammzellen getestet wurde (154). Marikar (111) beschrieb, daß die Zugabe von *at*RA zu HaCaT-Zellen sofort die mRNA und die Aktivität der RA-4-Hydroxylase induzierte. In der Abwesenheit von Retinoiden oder der Zugabe von Retinol waren die mRNA der 4-Hydroxylase und das Protein (CYP26) kaum nachweisbar. Ob es hauptsächlich die CYP26 ist, die Retinsäuren in ihre weniger effizienten 4-Hydroxy-Retinsäuren katabolisiert oder noch andere Enzyme daran beteiligt sind, bleibt abzuwarten. Popa (146) hingegen konnte in humaner Epidermis und *in vitro* Keratinozyten keine Hinweise von RA-Induzierbarkeit der CYP26 mRNA-Expression feststellen. Diese Studie läßt somit vermuten, daß noch weitere unbekannte CYP-Isoformen an dem RA-Katabolismus in Keratinozyten beteiligt sind.

In Bezug auf diese Ergebnisse ist es im weiteren interessant zu untersuchen, ob die basale und induzierbare Aktivität dieses Enzyms in der Haut von Patienten variiert, die an Hauterkrankungen leiden, wo eine RA-Behandlung eine therapeutisch positive Wirkung aufweist, wie z. B. bei der Psoriasis, SSC, Morbus Darier, der Akne und Solaren Keratosen. Weiterhin wäre es von Interesse nachzusehen, welche Fremdstoffe die Aktivität des Enzyms induzieren oder auch inhibieren, und inwieweit diese Stoffe das klinische Bild der Retinoid-sensitiven Hauterkrankungen beeinflussen und verändern.

3.6.3.2 Cytochrom 2E1

In unserem Labor konnte gezeigt werden, daß sowohl in der murinen Haut als auch in humanen Keratinozyten CYP2E1 immunologisch nachweisbar ist. Bemerkenswert ist die im Vergleich zur Leber relativ niedrige katalytische Aktivität, die durch eine Behandlung mit Ethanol induzierbar ist (*para*-Nitrophenol Hydroxylase) (184). Ein plausibler Grund der Speicherung dieses Enzyms in großen Mengen wäre eine möglichst schnelle Reaktion auf eine Überdosis von Retinoiden, die z.B. diätetisch entstehen könnte. Ein gewisser Schutz vor fatalen Nebenwirkungen in Bezug auf Proliferation und Differenzierung erscheint eine sinnvolle Einrichtung der Natur. Möglicherweise spielt CYP2E1 für diesen Schutz eine Rolle.

3.6.3.3 Cytochrom 3A

In der regulatorischen Region des CYP3A wurde eine Bindungsstelle für einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus einem RXR und einem PXR (Pregnenolon-16 α -Carbonitril Rezeptor), gefunden (95). Das deutet zumindest auf eine wichtige Rolle des CYP3A im Retinoid Stoffwechsel hin. Da diese CYP3A Familie in der menschlichen Haut mit drei Isoenzymen vorhanden ist (CYP 3A 4, 5 und 7), und zwei durch Dexamethason induzierbar sind, ist auch hier die Voraussetzung für eine Beteiligung dieser Isoenzyme am Retinoidmetabolismus in der Haut gegeben.

3.6.4 Rezeptoren

3.6.4.1 Aryl Hydrokarbon Rezeptor

Der Aryl Hydrokarbon Rezeptor (AHR) ist dafür bekannt, daß er toxische und kanzerogene Effekte von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bzw. Dioxinen vermittelt. Hoch affine Liganden, wie 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzeno-*p*-Dioxin, zeigten sich als beeinflussende Faktoren in Hinblick auf Zellproliferation und Differenzierung. Auf welche Weise der AHR Rezeptor die Zellproliferation und Differenzierung im einzelnen beeinflußt, ist noch nicht vollständig geklärt (53). Außerdem wird vermutet, daß AHR direkt oder indirekt Cytochrome P450 kontrolliert, welche verantwortlich für den Abbau von Retinoiden sind (68, 69).

3.6.4.2

Peroxisom Proliferator-Aktivierender Rezeptor

Der Peroxisome Proliferator-Aktivierende Rezeptor (PPAR) gehört zur Superfamilie der Steroidhormon-Nuklear-Rezeptoren. Ähnlich wie andere nukleäre Hormonrezeptoren agiert PPAR als Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor. Er bindet Fettsäuren und spielt eine Rolle bei deren Aufnahme in die Zellen. Es wird vermutet, daß er zusammen mit dem RXR-Rezeptor ein PPAR-Responsives-Element (PPRE) bildet (67, 185). Zusätzlich reguliert PPAR die Expression von Genen in den Zielzellen, die am Katabolismus von Fettsäuren beteiligt sind (74).

4 Aufgabenstellung

4.1 Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Retinoidmetabolismus der HaCaT-Zellen näher untersucht. Retinoide werden heutzutage in verschiedenen Bereichen der Medizin als wirksame Präparate eingesetzt. Es hat sich dabei herausgestellt, daß die Wirksamkeit der Retinoide grundlegend durch ihren Metabolismus beeinflußt wird. Der Wissensstand hinsichtlich des genauen Ablaufs der Stoffwechselwege weist momentan noch große Lücken auf. Offensichtlich sind Keratinozyten der menschlichen Haut Zielzellen des Retinoidmetabolismus (149, 199, 200, 201). Deshalb interessieren in besonderem Maße die Verstoffwechselung und die Regulierungsmechanismen in dieser Zellart. Ein Modell der humanen Keratinozyten *in vitro* stellt die HaCaT-Zelllinie dar, welche den Vorteil der Standardisierung und der unbegrenzten Reproduzierbarkeit aufweist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die HaCaT-Zelle auf Grund der Art und Weise, wie sie entstand, Stoffwechselwege geschaffen hat, die nicht mehr die natürliche *in vivo* Situation der humanen Keratinozyten reflektieren.

Dies veranlaßte uns, den Retinoidmetabolismus von HaCaT-Zellen *in vitro* zu untersuchen und die gewonnenen Ergebnisse mit den bekannten Verhältnissen, in *ex vivo* gewonnenen Keratinozyten, zu vergleichen.

Die HaCaT-Zellen wurden in unserem Versuch jeweils mit Retinol, Retinal, *all-trans* Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure oder 13-*cis*-Retinsäure in einer Konzentration von je 10^{-5} M behandelt. Parallel zu den Kulturflaschen mit HaCaT-Zellen wurde eine Kontrollgruppe von je 10^{-5} M ohne Zellen angelegt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂. Durch Analyse der spontanen Abbauprodukte und der nachweisbaren Metabolite konnte man Rückschlüsse auf die Verstoffwechselung der Retinoide ziehen. Alle Experimente wurden in fünffach-Ansätzen durchgeführt. Die interne Varianz der Methode lag jeweils bei weniger als 5 %. Diese Ergebnisse wurden durch molekularbiologische Nachweise ergänzt, in denen die mRNA von verschiedenen Enzymen und Bindungsproteinen, die bekanntermaßen im Retinoidmetabolismus eine Rolle spielen, nachgewiesen wurden. Hierfür wurden HaCaT-Zellen für 72 Stunden mit Retinoiden inkubiert und die mRNA Induktion mittels RT-PCR nachgewiesen. Es wurde versucht, die Expression der Enzyme ROLDH, RALDH, 9-*cis*-ROLDH, CYP1A1, CYP1A2, hLRAT, der Bindungsproteine CRBP I, CRBP II, CRABP I, CRABP II und der Rezeptoren AHR und PPAR in HaCaT-Zellen nachzuweisen.

4.2 Zielsetzung und Fragestellungen

Ziel dieser Dissertation ist der Vergleich des Metabolismus von Retinoiden in HaCaT-Zellen *in vitro* zu bekannten Daten in primären humanen Keratinozyten.

Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche Metabolisierungswege weisen die HaCaT-Zellen im Vergleich zu primären humanen Keratinozyten *in vitro* auf, wenn sie mit Retinol inkubiert werden?
2. Beeinflussen die Retinol Dehydrogenase und die Retinal Dehydrogenase in HaCaT-Zellen die Synthese von Retinsäure in gleicher Weise wie in primären humanen Keratinozyten *in vitro* ?
3. Weist der Metabolismus nach der Zugabe von Retinal, *at*RA, 9-*cis*-RA oder 13-*cis*-RA in HaCaT-Zellen Unterschiede auf?
4. Wie sind die quantitativen Verhältnisse der Isomere, *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA untereinander?
5. Ist eine mRNA-Induktion der Bindungsproteine CRBP I, CRBP II, CRABP I und CRABP II in HaCaT-Zellen nach Retinoid-Inkubation nachweisbar?
6. Findet die Hydroxylierung und Oxidation von *at*RA und 13-*cis*-RA zu den entsprechenden, inaktiven 4-*oxo*-Metaboliten in gleicher Weise wie in primären humanen Keratinozyten *in vitro* statt?
7. Ist eine mRNA-Induktion der Cytochromen 1A1 und 1A2 in HaCaT-Zellen nach Retinoid-Inkubation nachweisbar?

4.3 Die HaCaT-Zelle

4.3.1 Zelllinien

Die Immortalisierung von menschlichen Hautzellen bzw. Keratinozyten wurde zuerst durch Infektion mit einem Virus oder der Transfektion mit der entsprechenden, isolierten Virus-DNA erreicht. Dafür wurden das Simian Virus 40 (SV40) und das humane Papilloma Virus (HPV 16, 18, 31 und 33) verwendet. Das Resultat waren potentiell-unsterbliche, nicht tumorgene Zelllinien, die im Vergleich zu normalen Keratinozyten eine veränderte Differenzierung aufwiesen. Abhängig von dem verwendeten Virus zeigten diese genetisch instabilen Zelllinien mit fortschreitender Passage die Tendenz zu tumorösen Veränderungen. Damals wurde zuerst angenommen, daß ein Mangel an Differenzierungsfähigkeit ausnahmslos mit Transformation oder Malignität verbunden sein müsse. Deshalb wurde nach weiteren Zelllinien gesucht, die diese Differenzierungsfähigkeit noch aufweisen könnten. Zusätzlich zu diesen viral transformierten menschlichen Zelllinien gibt es drei Berichte von spontan immortalisierten menschlichen Keratinozyten. Diese Zellen werden als genetisch stabiler angesehen und sind somit besser dafür geeignet, eine normale Epidermis *in vitro* zu repräsentieren als solche, die virusinduziert sind. Im speziellen ähnelt besonders die spontan immortalisierte, humane Keratinozytenlinie der HaCaT-Zellen den normalen Zellen in ihrem Wachstums- und Differenzierungsverhalten (15, 16).

4.3.2 Die Entstehung der HaCaT-Zellen

Nach langanhaltender Inkubation der Zellen bei erniedrigten Ca^{2+} Bedingungen und erhöhter Temperatur (38,5°C) weichen normale menschliche Keratinozyten *in vitro* immer weiter von der natürlichen Wachstumskontrolle ab und werden autonom, das heißt, daß sie sich klonal vermehren. So wurde 1987 unter diesen bestimmten Bedingungen eine spontan transformierte menschliche epidermale Zelllinie aus Erwachsenenhaut geschaffen, die sich jedoch die epidermale Differenzierungsfähigkeit erhalten hatte. Diese Zelllinie wurde **HaCaT** genannt, um auf ihren Ursprung von humanen Keratinozyten der Erwachsenenhaut unter niedrigen Ca^{2+} Bedingungen und erhöhter Temperatur hinzuweisen: “ the origin is from **human adult skin keratinocytes** propagated under low **Ca²⁺** conditions and elevated temperature“ (15).

4.3.3 Eigenschaften der HaCaT-Zelle

Die stabilen Marker-Chromosomen, die man in den HaCaT-Zellen nachweisen kann, lassen eindeutig einen monoklonalen Ursprung erkennen. Ein Identitätsvergleich der HaCaT-Linie mit nativen Keratinozyten wurde mit Hilfe eines DNA-Fingerabdrucks (Fingerprint) durchgeführt. Der hoch charakteristische DNA-Fingerprint konnte in allen Zellen eindeutig nachgewiesen werden (16). Die Zellen zeigen einen leicht veränderten Phänotypus, doch sie entarten unter diesen Bedingungen auch nach langer Inkubation und häufigen Passagen nicht. Karyotypisch weist die Zelllinie eine Abweichung vom euploiden Chromosomensatz auf. Einzelne Chromosomen sind nicht in normaler Anzahl vorhanden. Dieser veränderte Karyotyp kann dazu führen, daß besonders unter Streß und Selektionsdruck verschiedene Zellpopulationen erzeugt werden. Die Charakteristiken der HaCaT-Zelllinie dokumentieren somit klar, daß sich die spontane Transformation von Erwachsenenhaut *in vitro* ereignen kann und mit einer sequentiellen chromosomalen Veränderung in Verbindung steht, wobei dies nicht zwangsweise mit schwerwiegenden Defiziten hinsichtlich der Differenzierung verbunden sein muß.

Trotz des veränderten und unbeschränkten Wachstumspotentials bilden HaCaT-Zellen, vergleichbar mit nativen, humanen Keratinozyten, ein neues, ordentlich strukturiertes und differenziertes epidermales Gewebe, wenn man sie z.B. auf Nacktmäuse transplantiert. Spezifisch nachweisbare Keratine und andere Marker, wie z.B. Involucrin und Filaggrin, sind exprimiert und regelgerecht lokalisiert (16).

4.3.4 Verwendbarkeit von immortalisierten Zelllinien

Unsterbliche Keratinozyten-Zelllinien werden für *in vitro* Testversuche eingesetzt. Sie bieten die Vorteile einer leichten Handhabung, der unbegrenzten Reproduzierbarkeit, und man geht zusätzlich von einer besseren Standardisierbarkeit aus. Ein Hauptvorteil stabil transformierter Zelllinien ist, daß sie eine Beurteilung von stabilen genetischen Modifikationen ermöglichen.

Die *in vivo* Situation von menschlichen Keratinozyten, die exogene Stimuli empfangen und diese in endogene Signale umsetzen, ist die Voraussetzung für die Bildung von menschlichem Gewebe. Wenn HaCaT- oder genetisch modifizierte Zellen unter optimalen organotypischen Kulturbedingungen gehalten werden, könnte ihnen ermöglicht werden, eine funktionierende Epidermis zu bilden. Diese künstliche Epidermis wäre ein vielversprechendes und attraktives *in vitro* Testsystem. Verschiedene Veröffentlichungen haben sich bereits mit diesem Thema beschäftigt (63, 19).

4.3.5 Die Vorteile der HaCaT-Zellen

Ein Nachteil von Zelllinien ist oft, daß sie kleinere oder größere Defizite hinsichtlich ihrer Funktions- oder Differenzierungsfähigkeit gegenüber ihrem Originalgewebe aufweisen. Die HaCaT-Zelle zeigt jedoch eine sehr gering veränderte Differenzierungsfähigkeit und ein Expressionsmuster der Cytochrom P450 Enzyme, welches den nativen menschlichen Keratinozyten sehr ähnelt. Auch benötigen sie keine mesenchymalen Nahrungszellen für ihre klonale Proliferation. Sie sind sowohl in flüssigen als auch in halbflüssigen Substraten vermehrungsfähig und auf Plastik sowie in Agarosegel klonierbar (63). Somit sind sie mittlerweile ein gebräuchliches Hilfsmittel, um den Mechanismus der Keratinisierung in menschlichen Zellen zu studieren.

HaCaT-Zellen haben außerdem über ausgedehnte Kulturperioden eine hohe genetische Stabilität. Selbst wenn die Zellen über 300 Passagen kultiviert und durch UV-Licht spezifische Mutationen in beiden Allelen des Tumorsuppressorgens P53 hervorgerufen werden, wechseln die Zellen nicht zu einem tumorigenen Phänotyp (16). Innerhalb der ersten 300 Passagen erhöhen sich Proliferationsrate, die Klonierungsfähigkeit und das serumabhängige Wachstumspotential. Danach erlangen HaCaT-Zellen eine Unabhängigkeit vom Wachstumsort und zeigen in späteren Passagen eine verringerte Differenzierungsfähigkeit. Trotzdem bleiben die Zellen nicht-tumorigen, wenn man sie subkutan in die Haut von Nacktmäusen injiziert (16). Diese Differenzierungsfähigkeit und genetische Stabilität hat die HaCaT-Zelllinie zu einem weit verbreiteten Ersatz für native humane Keratinozyten gemacht.

HaCaT-Zellen zeigen bei Kultivierung auf einem Kollagengel mit inkorporierten, transformierten, murinen Fibroblasten ein mehrschichtiges, durchgängiges Stratum corneum, das die Hauptpermeationsbarriere für topisch applizierte Substanzen darstellt (169). Um die Zellen zu einem mehrschichtigen Wachstum zu stimulieren, ist eine Angleichung der Kultivierungsbedingungen an die Verhältnisse *in vivo* nötig. Die Entwicklung organotypischer Hautäquivalente ist für viele verschiedene Bereiche, wie z.B. für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen, interessant (179).

HaCaT-Zellen reagieren auch *in vitro* auf modulierende Faktoren wie z.B. Retinoide (15). So zeigen sie eine erhöhte Expression von den epidermalen Keratinen K1 und K10 bei RA-Verringerung im Medium. Dieses Muster kann durch eine RA-Konzentrationserhöhung umgedreht werden. Bei RA-Dosen von 10^{-10} bis 10^{-8} M kann nur eine leichte Stimulation des Wachstums verzeichnet werden, die nicht direkt mit einer weitgehend unterdrückten Verhornung korreliert (211).

Die Einflüsse von Retinoiden auf HaCaT-Zellen stehen weiterhin im Mittelpunkt vieler wissenschaftlicher Studien. Das Wissen um die genaue Metabolisierung von Retinoiden und ihre Einflüsse auf die HaCaT-Zellen beeinflusst die Arbeit mit dieser Zelllinie grundlegend und kann beispielsweise die Suche nach effizienteren Behandlungsmöglichkeiten in der Therapie mit Retinoidpräparaten erleichtern.

HaCaT-Zellen sind somit unumstritten eine anerkannte Zelllinie, um den Retinoid-Metabolismus *in vitro* zu studieren.

5 Material und Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Passagieren der HaCaT-Zellen

Die verwendete HaCaT-Zelllinie wurde freundlicherweise von P. Boukamp und N. Fusenig (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Wenn der Boden einer Kulturflasche vollständig mit HaCaT Zellen bedeckt ist, ist es nötig, diese abzulösen und wiederum auf mehrere Kulturflaschen aufzuteilen. Dieses Passagieren der Zellen dient der kontrollierten Vermehrung und dem Wachstum der Zellen.

Im ersten Arbeitsschritt wird das alte Medium mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette aus der Kulturflasche abgesaugt, da das Medium noch Serum enthält, welches die Wirkung des Trypsins, das im nächsten Arbeitsschritt verwendet werden muß, inhibieren würde. Um dieses Serum zu entfernen, spült man die Flasche mit den Zellen mit sterilem PBS aus.

Dann saugt man das PBS wieder ab und pipettiert 2,5 ml Trypsin/EDTA in die Flasche. Trypsin ist eine Protease, die Proteine spalten kann. Sie wird hier eingesetzt, um die Ablösung der Zellen vom Boden einzuleiten. Die Flasche wird hierfür 3 Minuten in den Inkubator bei 37°C gestellt, wo die Zellen sich lösen und abkugeln sollen. Unter dem Mikroskop kontrolliert man diesen Vorgang. Wenn sich nach 3 Minuten die Zellen noch nicht vollständig gelöst haben, kann die Inkubationszeit verlängert werden. Dies sollte unbedingt minütlich kontrolliert werden, da zu lange Trypsineinwirkung die Zellen auf Grund ihrer Proteaseaktivität irreversibel schädigen kann. Deshalb wird nach dem Ablösen der Zellen serumhaltiges Kulturmedium zugegeben, um die Wirkung des Trypsins zu neutralisieren.

Im nächsten Arbeitsschritt werden die Zellen vom Medium mittels Zentrifugation getrennt. Bei 1300 Umdrehungen wird 6 Min. zentrifugiert, bis die Zellen als Pellet am Boden zu sehen sind. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, während das Zellpellet mit 5-6 ml frischem Kulturmedium resuspendiert wird. Nun können die Zellen wieder in Kulturflaschen aufgeteilt werden, wobei man pro Flasche 10 ml Medium zu 1-1,5 ml Zellsuspension gibt, die gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt wird. Wie viele neue Flaschen angelegt werden, hängt von der Zelldichte ab. Anschließend werden die Flaschen so verschlossen, daß eine ausreichende Belüftung gesichert ist. Die Inkubation erfolgt in einem CO²-Inkubator, der 37°C und einen CO²-Gehalt von 5 % in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre konstant hält. Die Zellen heften sich nun innerhalb der nächsten 2-3 Stunden an den Boden. An dem darauffolgenden Tag sollte nochmals

ein Mediumwechsel vorgenommen werden. Dieser dient dazu, nicht adhärente Zellen zu entfernen. Zusätzlich ist eine Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop sinnvoll, um eine Kontamination oder Fehler bei der Durchführung schnell genug am veränderten Aussehen und Verhalten der Zellen erkennen zu können.

5.1.2 Mediumwechsel

Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt. Mit einer sterilen Pasteurpipette saugt man das alte Medium ab. Anschließend gibt man 10 ml neues Medium mit Hilfe einer Einmalpipette dazu. Bei jedem Mediumwechsel werden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet.

5.1.3 Mediumzusammensetzung

Die Mediumzusammensetzung für die HaCaT-Zellen beinhaltet 450 ml DMEM mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glukose. Diesen 450 ml werden 50 ml Foetales Kälber Serum (FCS) zugegeben.

5.1.4 Retinoidbehandlung der Zellen

Die HaCaT-Zellen wurden in unserem Versuch jeweils mit Retinol, Retinal, *all-trans* Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure oder 13-*cis*-Retinsäure behandelt. Die HaCaT-Zellen stammten aus der 84. Passage. Die gesamte Versuchsdurchführung fand im Dunkeln statt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nur mit Rotlicht durchgeführt, um die lichtinduzierte Autooxidation der Retinoide zu verhindern.

Für jedes Retinoid wurden 6 Kulturflaschen mit HaCaT-Zellen vorbereitet. Jedem Ansatz wurde 10^{-5} M des zu untersuchenden Retinoids zugefügt.

Parallel zu den Kulturflaschen, in denen die HaCaT-Zellen mit Retinoiden stimuliert wurden, wurde eine Kontrollgruppe angelegt. Die gleiche Anzahl Kulturflaschen, mit derselben Endkonzentration von 10^{-5} M, wurde ohne HaCaT-Zellen inkubiert.

Die Inkubationszeit betrug jeweils 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden. Die Kulturflaschen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in dem Inkubator kultiviert. Nach der vorgesehenen Inkubationszeit konnten die einzelnen Ansätze für die Analyse in der RP-HPLC aufbereitet werden.

5.1.5 Extraktion der Retinoide

Zu jedem Ansatz wird die 3,75fache Menge IST (Ethanol plus Interner Standard) gegeben, um die Proteine auszufällen und die Retinoide, die in der RP-HPLC analysiert werden sollen, zu extrahieren. Das Medium-Ethanol Gemisch wird dabei nicht aus der Kulturflasche entfernt. Die Proben werden nun mindestens einen Tag im Gefrierschrank bei -20°C gelagert, bevor sie für die RP-HPLC weiterverarbeitet werden.

5.1.6 Geräte

Pipetten:	Pasteurpipetten: Einmalgebrauch aus Glas; Brand GmbH; Cat. No 747720
Pipetten:	Eppendorf-Pipetten; Research von 10-1000 µl
Multipette:	Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg
Kulturflaschen:	75 cm ² Gewebekulturflaschen; Costar-Corporation; Cambridge USA; Nr. 430198
	25 cm ² ; Greiner GmbH; Frickenhausen Deutschland; Nr. 690168
Sterilbank:	HS 18; Heraeus, Hanau
Pipettierhilfe:	Hirschmann, Pipetus-Akku
Mikroskop:	Phasenkontrast- Mikroskop; DMIL Leica, Wetzlar
Absaugsystem:	Integra
CO ₂ -Inkubator:	MCO17 AI; Sanyo, Japan
Zentrifuge:	Labofuge 400; Heraeus, Hanau
Rotlichtquelle:	Osram 4563

5.1.7 Chemikalien und Zellkulturmedien

Medium:	DMEM; High Glucose (1x) mit L-Glutamin ; 4,5 g/l Glucose; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria, Cat NO: E 15-810
FCS:	Foetales Kälber Serum: Biochrom 50115/500 ml; Chargen Nr.: 5535
PBS:	Phosphate Buffered Saline: PAA, PBS; ohne Calcium und Magnesium; Nr.H 15-002
Trypsin/EDTA:	PAA 11-660; 100 ml; Laboratorien GmbH Linz, Austria
IST:	Acitretin; Hoffmann-La Roche, Basel

5.2 Reversed-Phase-High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

5.2.1 Vorbereitung der Versuchsproben für die Reversed-Phase-HPLC

Die Kulturflaschen mit den ausgefällten Proteinen werden bis zur Analyse in der RP-HPLC in einem Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Vorbereitung der Proben für die RP-HPLC wird unter Rotlicht durchgeführt, damit die UV-sensiblen Produkte erhalten bleiben. Nach Abdunklung des Raumes können die Kulturflaschen aus dem Gefrierschrank genommen werden. Vor der Probeentnahme sollte darauf geachtet werden, daß der Flascheninhalt nochmals gut durchgemischt wird. Anschließend füllt man jeweils 1,5 ml der Flüssigkeit in Proberöhrchen, die vorher ausreichend beschriftet wurden. Die befüllten Röhrchen können dann mit einem Schraubverschluß mit Dichtungsring sicher verschlossen werden. Nachdem der Deckel fest angezogen ist, kann man die Proberöhrchen in die Zentrifuge stellen, wobei darauf geachtet werden muß, daß die Bestückung austariert ist. Bei 15000 Umdrehungen läßt man die Zentrifuge 4 Minuten laufen und erreicht am Ende eine Trennung der gefällten Proteine von den zu untersuchenden Substanzen, die in der Mischung aus Medium und Ethanol gelöst sind. Nach der angegebenen Zeit werden die Proberöhrchen herausgenommen, der Überstand vorsichtig mittels einer 3,5 ml Transferpipette abgenommen und in die vorbereiteten Gewindeflaschen gefüllt. Bei diesem Vorgang muß darauf geachtet werden, daß nicht das Pellet mit den Proteinen vom Boden versehentlich mit aufgesaugt wird. Mit einer Schraubkappe mit Loch, die nur leicht zuge dreht wird und einem Schlitzseptum, verschließt man die Gewindeflasche. Nach dem Einsortieren in den Autosampler der RP-HPLC kann das Gerät gestartet werden.

5.2.2 Nachweis von Retinoiden durch die Reversed-Phase-HPLC

Die Methode zum Nachweis der Retinoide stammt von R. Wyss (218), Hoffmann-La Roche, Basel. Dabei kommt eine Reversed-Phase-HPLC Analytik zum Einsatz. Nachdem die Retinoide, wie oben beschrieben, aus Kulturmedium und Zellen durch Addition von 3,75 Volumen Ethanol (Merck, Darmstadt), welches den Internen Standard Acitretin (Hoffmann-La Roche, Basel) enthält, extrahiert worden sind, werden 1,5 ml der Flüssigkeit in eine Mikrotube transferiert und zentrifugiert, um die Proteine zu pelletieren. Die Überstände werden für die RP-HPLC-Analyse verwendet. Wir injizierten 100 μl der Probe in die RP-HPLC mit automatischem

Vorsäulenwechsel (Intelligenter Autosampler AS-4000; zwei L-6000A Pumpen; eine L-6200A intelligente Pumpe, D-6000 AIF; D-6000 HPLC Manager Software, Merck-Hitachi, Darmstadt; E.A. 6-port Ventile 7066 CPR; zwei H.S. Ventile 7000 E, Solvent Degasser Unit SDU 2004, Solvent Selector, LabSource, Rheinach, Schweiz; UV-VIS Detector SPD-10A, Shimadzu, Japan) mit zwei 250-4 Supersher 100 RP-18 (Merck) als analytische Säulen. Die analytischen Säulen werden auf 26°C mit einem Säulenofen, kontrolliert durch eine Peltier Controller Unit PCU 1000 (LabSource), temperiert. Die analytische Methode wurde im Detail von R. Wyss beschrieben (218). Die Bestimmung wurde durch die Verwendung des Internen Standards Acitretin und der Externen Standards 13-*cis*-RA, 9-*cis*-RA und *at*RA und der 4-*oxo*-13-*cis*- und der 4-*oxo-at*RA als Metabolite validiert.

Alle Experimente wurden in fünffach-Ansätzen durchgeführt, und die interne Varianz der Methode lag bei weniger als 5 %.

5.2.3 Chemikalien

Interner-Standard: Acitretin; Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

Externe-Standards: 13-*cis*-RA (Sigma, Deisenhofen, Germany)
 9-*cis*-RA (Sigma, Deisenhofen, Germany)
*at*RA (Sigma, Deisenhofen, Germany)

Metabolite: 4-*oxo*-13-*cis*-RA
 4-*oxo-at*RA
 (Geschenk der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)

Ethanol, absolut: Merck, Darmstadt

Acetonitril HPLC-Grade, Baker, Deventer, Niederlande

Essigsäure 100 %, Merck, Darmstadt

HPLC-Wasser Merk, Darmstadt

5.2.4 Geräte:

Waage:	Sartorius, Analysewaage 1200
Zentrifuge :	Eppendorf Zentrifuge 5415 C
Proberöhrchen :	BIOzym; 1,5 ml, Amber mit Schraubdeckel und Dichtung
Schraubkappen (mit Loch):	GPI 8-425; MERCK (NR. 18082)
Silicon-PTFE-Septen:	geschlitzt für Probegläser (Art. 1818)
Gewindeflaschen:	32x11,5 MM, PAC
Transferpipetten:	3,5 ml; Sarstedt
Autoklav:	Webecke Typ WEBECO; Bad Schwartau
Rotlichtquelle:	Osram 4563

5.3 RNA Isolation

5.3.1 RNA Isolation für die RT-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Isolierung von RNA aus Zellen muß darauf geachtet werden, daß die verwendete Zellanzahl mindestens eine Menge von 5×10^6 Zellen beträgt und eine Menge von 1×10^8 nicht überschreitet. Die maximal verwendete Menge hängt von dem spezifischen RNA-Gehalt einzelner Zelllinien ab, welche sehr große Unterschiede in den verschiedenen Arten aufweisen. Die Bindungskapazität der verwendeten „RNeasy midi spin column“ liegt bei 1 mg RNA. Wieviel RNA gewonnen werden kann, hängt neben der Zellzahl von der effektiven Zelllyse ab und der somit freiwerdenden RNA.

Alle Schritte der RNA Isolierung werden bei Raumtemperatur (20-25°C) durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte werden in einer Laborzentrifuge mit Schwinghaltern durchgeführt.

Vorbereitungen:

β -Mercaptoethanol (β -ME) muß vor dem Gebrauch zu dem Lyse-Puffer gegeben werden. Man gibt 10 μ l des 14.5 M β -ME auf 1 ml Puffer (RLT).

5.3.2 Lyse der Zellen

Die Zellen in den Zellkulturflaschen wurden direkt lysiert, wozu sie vorher in einem Pellet gesammelt wurden. Das alte Zellmedium wird dafür abgesaugt, und anschließend werden die Zellen zur Reinigung nochmals mit DPBS-Puffer gespült. Das DPBS wird so abgesaugt, daß nur die am Boden haftenden Zellen in der Flasche zurückbleiben. Nun erfolgt die eigentliche Lyse der Zellen, indem man 3,8 ml RLT Lyse-Puffer, welcher vorher mit β -Mercaptoethanol gemischt wurde, auf die Zellen gibt und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Zellproteine werden gespalten, und es entsteht ein dünnflüssiger Schleim, der mit einem speziellen „Cell Scraper“ vom Boden der Zellkulturflasche abgekratzt werden kann. Um ein homogenes Lysat zu erhalten, aspiriert man es mehrere Male mit der Pipette und gibt es anschließend in ein RNase-freies Polypropylen-Röhrchen.

5.3.3 Filtern des Lysates

Das Röhrchen mit dem Inhalt wird für 10 Sek. gevortext, damit die Suspension einheitlich dünnflüssig wird. Eine inkomplette Homogenisierung führt zu einer signifikanten Reduktion der RNA-Ausbeute und kann zu einer Verstopfung der „RNeasy midi spin column“ (Säule) führen. Dann fügt man 3,8 ml 70 % Ethanol zu dem homogenisierten Lysat und vortext die neue Mischung, um die Entstehung von Präzipitaten zu verhindern. Falls doch sichtbare Präzipitate erkennbar sein sollten, wird das Röhrchen so lange kräftig geschüttelt, bis diese sich wieder aufgelöst haben. Die insuffiziente Resuspendierung von Präzipitaten kann eine DNA-Kontamination hervorrufen und zu einer unreinen RNA Ausbeute führen.

Das Lysat kann nun in die „RNeasy midi spin column“ pipettiert werden, die sich in einem 15 ml Zentrifugen-Röhrchen befindet. Das maximale Füllvolumen beträgt 3,8 ml. Vor dem Zentrifugieren wird das Röhrchen verschlossen und 5 Minuten bei 3000-5000x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wird nun wiederholt, um auch das restliche Lysat zu filtern, wobei bei jedem Zentrifugationsschritt darauf zu achten ist, daß das Lysat komplett durch den Filter gelaufen ist. Sollte dies nicht der Fall sein, wird die Zentrifugationszeit von 5 auf 10 Minuten erhöht. Die Flüssigkeit, die sich in dem 15 ml Röhrchen ansammelt, kann verworfen werden. Die RNA bindet an die RNeasy-Membran und wird somit vom restlichen Lysat getrennt.

5.3.4 Reinigen der RNA

Zum Reinigen der RNA werden Puffer auf die im Filter gebundene RNA gegeben, um unerwünschte Stoffe herauszuwaschen. Die RNA-Ausbeute bleibt dabei jedoch weiterhin in der Säule gebunden. Die Flüssigkeitsmengen, die sich nach dem Zentrifugieren jeweils in dem 15 ml Röhrchen befinden, können verworfen werden.

Zuerst wird 3,8 ml RW1-Puffer in das Röhrchen gegeben und für 5 Minuten bei 3000-5000 x g zentrifugiert. Im nächsten Schritt gibt man 2,5 ml RPE-Puffer, der vorher mit Ethanol gemischt wurde, auf die Säule. Nach Schließen des Röhrchens wird es für 2 Minuten bei 3000-5000x g zentrifugiert. Anschließend gibt man nochmals die gleiche Menge RPE-Puffer auf die Säule, aber zentrifugiert dieses Mal 5 Minuten, damit die Membran trocken wird. Es ist wichtig, die Membran gründlich zu trocknen, da sonst die Gefahr besteht, daß zurückbleibendes Ethanol die weiteren Reaktionen behindern könnte.

5.3.5 Herauslösen der RNA aus der Säule

Zuerst wird die Säule in ein neues RNase-freies Röhrchen überführt, damit keine ungewollt zurückgebliebenen Zellbestandteile die RNA-Ausbeute verunreinigen. Nun gibt man 250 µl RNase-freies Wasser auf die Säule und läßt es eine Minute lang einwirken. Anschließend wird die Säule 3 Minuten bei 3000-5000x g zentrifugiert, wobei sich unten in dem Röhrchen die RNA im Wasser gelöst ansammelt. Dieser Schritt wird nochmals mit der gleichen Menge Wasser wiederholt. Die isolierte RNA kann nun direkt für Versuche genutzt, oder sollte bei nicht sofortigem Gebrauch bei -80°C gelagert werden.

5.3.6 Geräte und Materialien

Pipettenspitzen:	steril, RNase –frei
Zentrifuge:	Labofuge 400 (3000-5000x g) ; Heraeus, Deutschland
Zell-Schaber:	Disposable Cell Scraper; Costa Corporation ; Cambride, USA
Pipette:	Gold Seal; 10 ml
RNase-freies Polypropylen-Röhrchen	

5.3.7 Medien

Waschpuffer :	RW1 ; Qiagen GmbH; Hilden
β -Mercaptoethanol	14.5 M β -ME; BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Ethanol:	96-100 %
Puffer RLN:	50 mM Tris-HCL, pH 8,0, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 % (v/v) Nonidet P 40 (1,06 g/ml)
Puffer RPE:	Konzentrat + 4 Volumen Ethanol (100-96 %)
DPBS:	Dulbecco's phosphate buffered saline (1x); ohne Calcium und Magnesium

Vor Gebrauch zufügen: 1000 U/ml RNasin (optional) und 1 mM DTT.

5.4 Die Reverse Transcribed-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

5.4.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) wurde Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entwickelt und hat, wie die DNA Sequenzierung, die Molekulargenetik revolutioniert (91). Mit ihrer Hilfe kann man nun Gene, die seltene Zielobjekte in einem riesigen Genom von bis zu 100000 Genen sind, gezielt nachweisen. Die PCR erlaubt, eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren, ohne auf das Klonieren zurückgreifen zu müssen. Die PCR wird heutzutage z.B. zum Nachweis von Mutationen, zur Überwachung von Krebstherapien, zum Nachweis von Bakterien- und Virusinfektionen, zur Geschlechtsbestimmung pränataler Zellen und für molekulare Evolutionsstudien eingesetzt.

5.4.2 Das RT-Polymerase-Kettenreaktion Verfahren

Die PCR-Methode läßt sich zur Untersuchung von Genexpressions-Mustern einsetzen. Solche empfindlichen Methoden für den Nachweis und die Analyse von seltenen mRNA-Transkriptionen oder RNA, die in geringen Mengen vorhanden sind, spielen eine wichtige Rolle in zell- und molekularbiologischen-Studien. Da jedoch RNA nicht als Vorlage für eine PCR dienen kann, muß sie zuerst „umgeschrieben“ (reverse transcribed) werden, in eine sogenannte copy-DNA (cDNA). Die mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase umgeschrieben, und die so entstandene cDNA dient als Matrize für die PCR. Dazu können Reverse Transkriptasen wie die vom Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) oder dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV) dienen.

Powell *et al.* (147) beschrieb als erster die kombinierte Technik, in welcher die Reverse Transkription (RT) direkt mit einer anschließenden PCR-Amplifikation der resultierenden cDNA kombiniert wurde (147). Heute wird diese Technik gebräuchlicherweise als RT-PCR bezeichnet.

5.4.3 mRNA

Die mRNA, die für die RT-PCR benutzt wird, sollte vorher gründlich gereinigt werden. Kontaminationen sollte vorgebeugt und ein RNase-Inhibitor benutzt werden. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der RNA kann die Probe durch Gelelektrophorese untersucht werden. Gute mRNA-Proben stellen sich als Schmier zwischen 500 BP und 8 kb dar, wobei die meiste mRNA zwischen 1,5 kb und 2 kb sichtbar sein sollte.

5.4.4 RT-Polymerase-Kettenreaktion Komponenten

Wir benutzen in unserem Labor das Perkin-Elmer GeneAmp RNA PCR Kit (Part No. N808-0143). Dieses Kit ist zum Auffinden und zum Analysieren von Genexpressionen auf der RNA Ebene entwickelt worden. Es enthält Reagenzien für die Reverse Transkription der RNA zur cDNA, wobei hier das klonierte Murine Leukemia Virus (MuLV) als Reverse Transkriptase verwendet wird, und für die nachfolgende Amplifikation wird die AmpliTaq DNA Polymerase benutzt. Ein RNase Inhibitor, ursprünglich aus der menschlichen Plazenta isoliert, ist zugefügt, um spezielle Säugetier-RNasen zu unterdrücken.

Inhalt:

AmpliTaq DNA Polymerase	N801-0060	50 µl
MuLV Reverse Transkriptase	N808-0018	100 µl
RNase Inhibitor	N808-0119	100 µl
dATP	N808-0007	320 µl
dCTP	N808-0007	320 µl
dGTP	N808-0007	320 µl
dTTP	N808-0007	320 µl
10xPCR Buffer II	N808-0010	1,5 ml
25 mM MgCl ₂ Lösung	N808-0010	1,5 ml

5.4.5 MuLV Reverse Transkriptase

Die MuLV Reverse Transkriptase ist eine RNA abhängige DNA Polymerase und ist für die umgekehrte Transkription von RNA in cDNA zuständig. Diese Polymerase ist entstanden aus der Fusion des E.coli trpE Gens mit der zentralen Region der Polgen des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV). Sie benutzt einzelsträngige RNA als Vorlage, um mit einem präsenten Primer einen kompletten DNA Strang zu synthetisieren und kann für RT-PCR von viraler RNA oder mRNA verwendet werden. Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt bei 37°C, und man verwendet 1 µl bei ganzer RNA oder 50-100 ng bei mRNA. Die Reverse Transkriptase benötigt Mg²⁺ Ionen für ihre Reaktion.

Die Vorteile der MuLV-Reversen Transkriptase liegen in der Produktion von komplett-langen cDNA-Fragmenten mit hoher Effizienz, da das Enzym hochwertig aufgearbeitet ist. Zusätzlich können auch geringe mRNA-Mengen mit hoher Sensitivität vervielfältigt werden, da das Enzym eine niedrige RNase H Aktivität besitzt (im Vergleich z.B. zur AMV-RT) und die Endonuklease Aktivität fehlt.

5.4.6 DNA-Polymerase

Die Schlüsselkomponente in dem Kit ist die AmpliTaq DNA Polymerase, welche die Primer bei der Amplifikation unterstützt. Sie ist eine rekombinierte, thermostabile 94 kDa DNA Polymerase, die sich der Einzelstrang-DNA als Matrix für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges bedient. Diese einzelsträngige DNA-Vorlage kann man dadurch erzeugen, daß man doppelsträngige DNA auf Temperaturen nahe dem Siedepunkt erhitzt. Außerdem benötigt die DNA-Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, um die Synthese zu beginnen (englisch: prime). Man kann also einen Startpunkt der DNA-Synthese festlegen, indem man einen Primer hinzufügt, der sich an der gewünschten Stelle an die Matrize anlagert. So wird die DNA-Polymerase gezielt zur Synthese eines speziellen DNA-Bereiches eingesetzt.

Ein wichtiger methodischer Fortschritt ergab sich in den 70er Jahren aus der Entdeckung, daß die DNA-Polymerase von Bakterien, die in heißen Quellen leben, bei hohen Temperaturen am besten funktioniert. Das Bakterium *Thermus aquaticus* lebt im Wasser bei einer Temperatur von 75°C. Seine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) hat ein Temperaturoptimum von 72°C und ist selbst bei 94°C recht stabil. Eine modifizierte Form des *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Gens konnte dann in einen *Escherichia coli* Wirt eingepflanzt werden. Auf Grund seiner Eigenschaften muß man die Taq-Polymerase nur einmal zu Beginn einer Reaktion zugeben (29).

5.4.7 Weitere Bestandteile des RNA PCR Kits und ihre Bedeutung

Der RNase Inhibitor inhibiert die RNase Aktivität und beugt so Kontaminationen vor. Die Enzyme dATP, dCTP, dGTP und dTTP sind Deoxyribonukleosid Triphosphate, die in destilliertem Wasser gelöst sind und mit NaOH auf pH 7 titriert wurden.

Der 10xPCR Puffer II enthält 500 mM KCl und 100 mM Tris-HCl, welches die bevorzugte Ionenstärke und den geeigneten pH-Wert für die Reverse Transkriptase und die PCR Amplifikation schafft. Für die Enzymaktivität wird letztendlich noch MgCl₂ Lösung benötigt.

5.4.8 RT-Primer

Die Primer beeinflussen die Größe und die Spezifität der zu produzierenden cDNA. Es gibt drei Arten von Primer, die man für die Reverse Transkription benutzt:

1. Oligonukleotid-Primer :

Dieser bindet an dem endogenen (innenstehenden) Poly(A)⁺-Schwanz des 3'-Endes der Mutter-RNA. Dieser Primer produziert meist cDNA-Stränge in voller Länge.

2. Random Hexanukleotid Primer:

Dieser Primer bindet an der RNA an einer Vielfalt von komplementären Seiten, was dazu führt, daß die Stränge nur partiell komplett lang sind = short cDNA. Dieser Primer ist dazu geeignet, um schwierige, umfangreiche Sekundärstrukturen in der Schablone besser zu synthetisieren.

3. Specific Oligonukleotide Primer:

Diese bearbeiten selektiv nur die zu untersuchende mRNA. Diese Primer-Art wird auch sehr erfolgreich zu diagnostischen Zwecken eingesetzt.

Wir haben für unsere Versuche Oligonukleotid-Primer verwendet. Diese bezogen wir von Sigma-Genosys Ltd. London, UK.

5.4.9 Primersequenzen und Basenpaare

Die Primersequenzen und Basenpaare der Enzyme und Proteine, die mittels der RT-PCR in HaCaT-Zellen untersucht wurden.

Enzym und Temperatur	Sequenzen	Basenpaare
ROLDH 52-62°C	5' GTA AAT CTG GTG GTG CCA TC 3' 3' CAA GAG AAA GAC AGG ATG GG 5'	406
hLRAT 58-60°C	5' GGT GAC GAG GTC CGA CGA C 3' 3' GGT GAG GTC CGA CGA C 5'	523
9-cis-ROLDH 62°C	5' ATG GTG TGG GTC CGA TGA TA 3' 3' GTA CCT GCC AGC TTT CGC CA 5'	424
CRBP I 52-58°C	5' GTC GAC TTC ACT GGG TAC TGG A 3' 3' TTG AAT ACT TGC TTG CAG ACC ACA 5'	388
CRBP II 55°C	5' TCA CCA CAG GTC AGC TCC AG 3' 3' ATG ACG AGG GAC CAG AAT GG 5'	371
RALDH 62°C	5' CCG TGC GAC TGG TGC TGC CC 3' 3' CGC GGC AGG AAG GCC TTG GT 5'	411
CRABP I 59°C	5' CCA CGT CAT CGG CGC CAA AC 3' 3' CGG CAC CTG GAA GAT GCG CA 5'	370
CRABP II 54°C	5' CTC TCG GAC GTA GAC CCT GGT 3' 3' CCC AAC TTC TCT GGC AAC TGG A 5'	400
CYP1A1 55°C	5' GAT GGG TTG ACC CAT AGC TT 3' 3' GCT TTG AGA AGG GCC ACA TC 5'	510
CYP1A2 58°C	5' GAA ATC GTC GCC CTG CCG CACC 3' 3' GCC TCG GGT CCC CAA AGG CCTG 5'	219
PPAR 59°C	5' GGC CTT GGA GAA TTC CGT GA 3' 3' TCG CGA TGG TGG AGA CGG AA 5'	884
AHR 52°C	5' ATC TTC TGA CAC AGC TGT TG 3' 3' GTG ACT TGT ACA GCA TAA TG 5'	310
GAPDH 59°C	5' GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC 3' 3' GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG 5'	184
β-ACTIN 60°C	5' TGG ATG ATG ATA TCG CCG CGC TCG 3' 3' CAC ATA GGA ATC CTT CTG ACC CA 5'	530

Tabelle 30: Auflistung der Primersequenzen und Basenpaare der untersuchten Enzyme und ihren jeweiligen Anlagerungstemperaturen.

5.4.10 Design der Primer

Die RT-PCR Amplifikation von einer speziellen mRNA-Sequenz benötigt zwei PCR-Primer. Das Design der Primer sollte außerdem eine Unterscheidung zwischen dem amplifizierten Produkt der cDNA und solchen Produkten vornehmen können, die auf kontaminierte DNA zurückzuführen sind.

Es gibt zwei Methoden, die Primer zu gestalten, derer man bedarf. Das eine sind Primer, die sich an Sequenzen des Exons zu beiden Seiten des Introns anheften. Jedes Produkt, das von der genomischen DNA amplifiziert wird, muß somit viel größer sein als Produkte, die von intronloser DNA stammen. Die anderen Primer umspannen die Exon/Exon-Umgrenzung auf der RNA. Diese Primer haben den Vorteil, daß sie genomische DNA gar nicht amplifizieren.

5.4.11 Zwei-Schritt RT-Polymerase-Kettenreaktion

Wir arbeiteten in unserem Labor mit einem Zwei-Schritt RP-PCR Verfahren. Hierbei werden im ersten Schritt die cDNA-Stränge synthetisiert. Am Ende dieses ersten Zyklus liegt dann ein Pool von vielen DNA Fragmenten vor. Im zweiten Schritt findet die eigentliche PCR mit Amplifikation statt. In sich wiederholenden PCR-Zyklen werden doppelsträngige (ds) DNA-Stränge synthetisiert und amplifiziert.

Die Zwei-Schritt-Methode bietet im Gegensatz zur Ein-Schritt-Methode mehrere Vorteile, wie z.B. die Optimierung der Reaktionsbedingungen. Die getrennten Reaktionsschritte ermöglichen es, daß sowohl die Reverse Transkriptase als auch die PCR jeweils unter optimalen Bedingungen ablaufen können. Dies erhöht die Effizienz und begünstigt eine akkurate Amplifikation. Außerdem ist die Methode flexibler, da die synthetisierte cDNA auch für die Analyse anderer Transkriptionen verwendet werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, daß lange Sequenzen besser amplifiziert werden können. Mit der richtigen Kombination von Reverser Transkriptase und thermostabiler DNA Polymerase können RNA-Sequenzen von bis zu 14 kb amplifiziert werden. Auf der anderen Seite birgt diese Methode einen erhöhten Zeitaufwand und ein erhöhtes Kontaminationsrisiko.

5.4.12 Interne-Standards

Zur Kontrolle wurden in unseren Versuchen zusätzlich zu den Enzymen und Proteinen, die nachgewiesen werden sollten, eine Positivkontrolle angefertigt, bestehend aus dem Nachweis von β -Actin und / oder GAPDH im gleichen Versuchsansatz (2).

5.4.12.1 β -Actin

β -Actin mRNA war eine der ersten RNAs, die als Interner-Standard verwendet wurden (2). Es verschlüsselt ein allgegenwärtiges Cytoskeleton-Protein und ist verhältnismäßig reichhaltig exprimiert. In einer 10 μ g Probe reiner RNA sind etwa 300 pg der β -Actin mRNA vorhanden. Das β -Actin-Gen ist hoch konserviert in Eukaryonten (133) und ist in den meisten Zellspezies exprimiert (94).

5.4.12.2 Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Schlüsselenzym in der Glykolyse. Es ist auf ähnlich hohem Expressions-Niveau in Zellen vorhanden wie β -Actin. Das GAPDH-Gen ist Bestandteil vieler Gewebe und wird in der Literatur als sinnvoller Interner-Standard beschrieben (2). Häufig wird es in Experimenten, die mit Zelllinien arbeiten, als Kontrolle verwandt (27, 77, 188).

5.4.13 RT-PCR Protokoll

Schritt 1: Reverse Transkription von RNA zu cDNA

<u>Komponenten</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
25 mM MgCl ₂ Lös.	4 µl	5 mM
10x PCR Buffer II	2 µl	1x
DEPC, DI Wasser	2 µl	-
dGTP	2 µl	1 mM
dATP	2 µl	1 mM
dTTP	2 µl	1 mM
dCTP	2 µl	1 mM
RNase Inhibitor	1 µl	1 U/µl
MuLV Reverse Transkriptase	1 µl	2,5 U/µl
Downstream Primer	1 µl	0,75 µl
RNA Probe	1 µl	<1 µg totale RNA

Zeiten und Temperaturen für die Reverse Transkription:

Reverse Transkription :	15 Minuten	bei 42°C
Denaturierung :	5 Minuten	bei 99°C
Abkühlung :	5 Minuten	bei 5°C

Schritt 2: PCR Protokoll; Synthese von dsDNA und Amplifikation

<u>Komponenten</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
25 mM MgCl ₂ Lösung	4 µl	2 mM
10x PCR Buffer II	8 µl	1x
DI Wasser	65,5 µl	-
AmpliTaQ DNA Polymerase	0,5 µl	2,5 U/100 µl
Downstream Primer	1 µl	0,15 µM
Upstream Primer	1 µl	0,15 µM

Jedes RT-Röhrchen wird mit 78 µl PCR Mix aufgefüllt, so daß das Endvolumen 100 µl beträgt.

Zeiten und Temperaturen für die Amplifikation :

Anfangsschritt	120 Sekunden	bei 94°C	1 Zyklus
Schmelzung	60 Sekunden	bei 95°C	35 Zyklen
Anlagerungs-Temperatur	60 Sekunden	bei 60°C	35 Zyklen
Finaler Schritt	7 Minuten	bei 72°C	1 Zyklus

5.4.14 Nachweis der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Das Agarosepulver wird so mit Puffer gemischt, daß eine 2 prozentige Lösung entsteht. Um die Agaroseflocken aufzulösen, muß die Mischung so lange erhitzt werden (z.B. in der Mikrowelle), bis die Flüssigkeit durchsichtig wird. Nach Zugabe von ca. 10 µl Farbstoff (Gel Stain) kann das Gel in die vorgefertigten Schalen gegossen werden.

Je 10 µl der RT-PCR Proben werden mit ca. 1,5 µl „Loading Dye“ zum Beschweren der Proben gemischt. Diese Mischung wird mittels Pipette in die dafür vorgesehenen Aussparungen im Agarosegel, das sich in Puffer eingebettet in dem Elektrophorese-System befindet, gegeben. Die Fragmente der Proben trennen sich nach 40 Minuten bei ca. 90 V, werden durch Auflegen auf einen UV-Licht Projektor sichtbar gemacht und können anschließend mit einer Polaroid Gel-Kamera photographiert werden.

5.4.15 Material und Geräte

5.4.15.1 Material und Geräte für die Polymerase-Kettenreaktion

PCR Cycler: Stratagene; Robo Cycler Gradient 96; No. 4008869815369
mit PCR Hot Top, Kalifornien, USA

Safe-Lock Tubes: 1,5 ml Eppendorf Biopur, No. 0459, Hamburg

PCR 8-Strip Tubes: Thin walled with attached lid and contamination shield, No. 0030 124.227;
Eppendorf Hamburg

Eppendorf Research Pipetten; Eppendorf Hamburg

- 0,5-10 µl Research Pipette
- 10-100 µl Research Pipette
- 100-1000 µl Research Pipette

Pipettenspitzen Eppendorf; 10 x 90 Eurotips in Racks; Eppendorf Hamburg

- 20 µl No. 0030.063.600

- 100 µl No. 0030.063.619

- 1000 µl No. 0030.063.627

Sterilisationsgerät: WEBECO Sterilisationsgerät ; Nr. 73210, Bad Schwartau

5.4.15.2 Material und Geräte für die Gelelektrophorese

Agarose Gel: NuSieve 3:1 agarose Gel; For analysis of nucleic acids < 1 kb
No. 50094, Rockland, Maine USA

Gel Stain: FMC Bio Products; GelStar nucleic acid gel stain, 250 µl
10000x concentrate in DMSO; No. 50535, Rockland, Maine USA

Loading Dye: Loading Dye Solution Lot: DR45, Sigma

Wärmeschrank: WTB Binder; 230-0 Nenntemperatur (hier 75°C), Typ: 29028230001010;
Tutlingen

Elektrophorese: Spannungsgerät, BIORAD; Serial No. 283 BR 10894, Kalifornien, USA
Model No. PowerPac 300; Max Power 195 VA

Elektrophorese System: Easy-East, Electrophoresis System; Model B1A, No. 112537
Portsmouth, NH USA

Mikrowellengerät: Mikrowelle HMT 812 B; No. 3874W501095, Bosch, Stuttgart

5.4.15.3 Material und Geräte für die photographische Gelelektrophoresedarstellung

Kamera: Polaroid GelCam mit 0,8x Electrophoresis HOOD, GH10, 10x8 cm
Made in U.K.

Film: Polaroid Film-Pack 3 ¼ x 4 ¼ ; Professional Coaterless; B&W Instant
Pack Film ISO 3000/36°, No. 617798; Made in U.K.

UV-Licht Projektor Vilber Lourmat, Marne La Villee, Frankreich

6 Ergebnisse

6.1 Ergebnisse der Reversed-Phase-HPLC

6.1.1 Retinol Inkubation ohne HaCaT-Zellen

Retinol	<i>Iso</i> -Retinol	Retinal	9- <i>cis</i> -RA	<i>at</i> RA	13- <i>cis</i> -RA	Stunden
96,7	1,9	1	0,4	0	0	0
79,2	17,2	2,2	1	0	0	24
69	26,5	2,7	1,8	0	0	48
62,8	31,5	3	2,6	0	0	72
58,7	34,2	3,5	3,6	0	0	96
57,1	35,4	2,8	4,7	0	0	120

Tabelle 13: Ergebnisse der Retinol Inkubation ohne HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M Retinol wurde 100 % gleichgesetzt, und die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

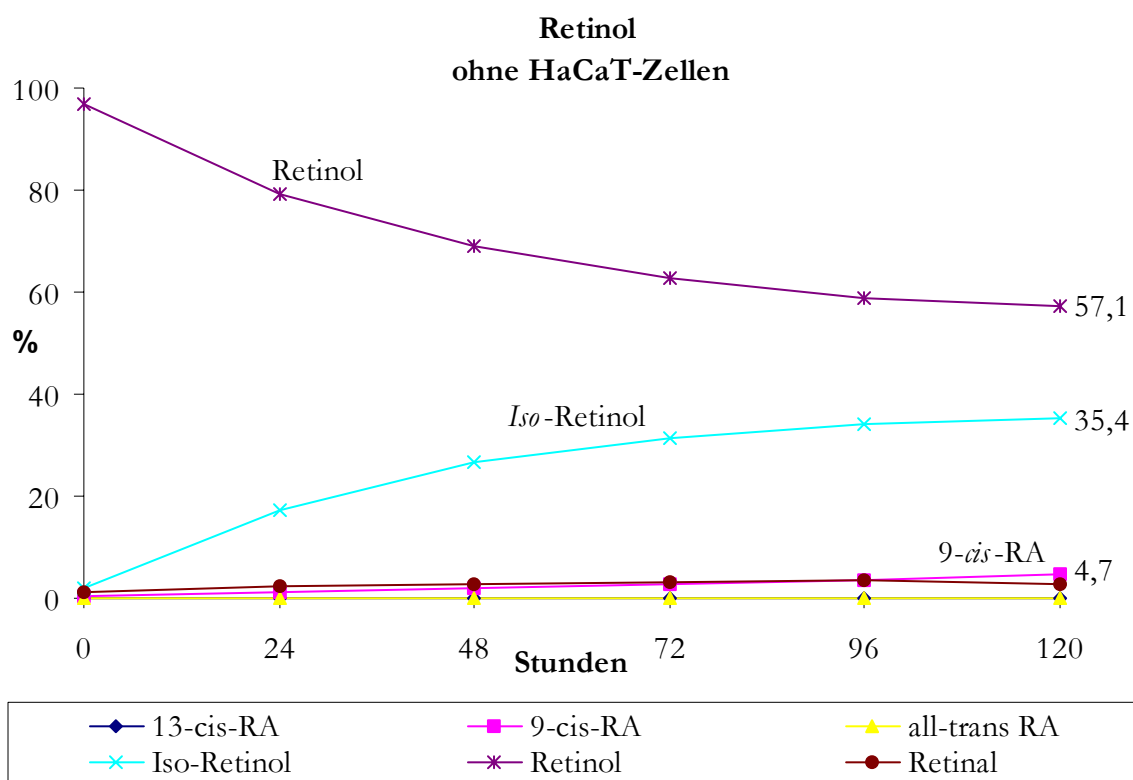


Abbildung 5: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von Retinol ohne HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 13).

6.1.2 Retinol Inkubation mit HaCaT-Zellen

Retinol	<i>Iso</i> -Retinol	Retinal	<i>at</i> RA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA	Stunden
96,7	1,9	1	0	0	0,4	0
78,7	7,7	0,9	12,4	0,4	0	24
85,2	11,3	0	2,2	3,4	0	48
81,4	15,6	0	0	3	0	72
76,7	19,9	0	0	3,4	0	96
72,3	23,2	0	0	4,5	0	120

Tabelle 14: Ergebnisse der Retinol Inkubation mit HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M Retinol wurde 100 % gleichgesetzt, und die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

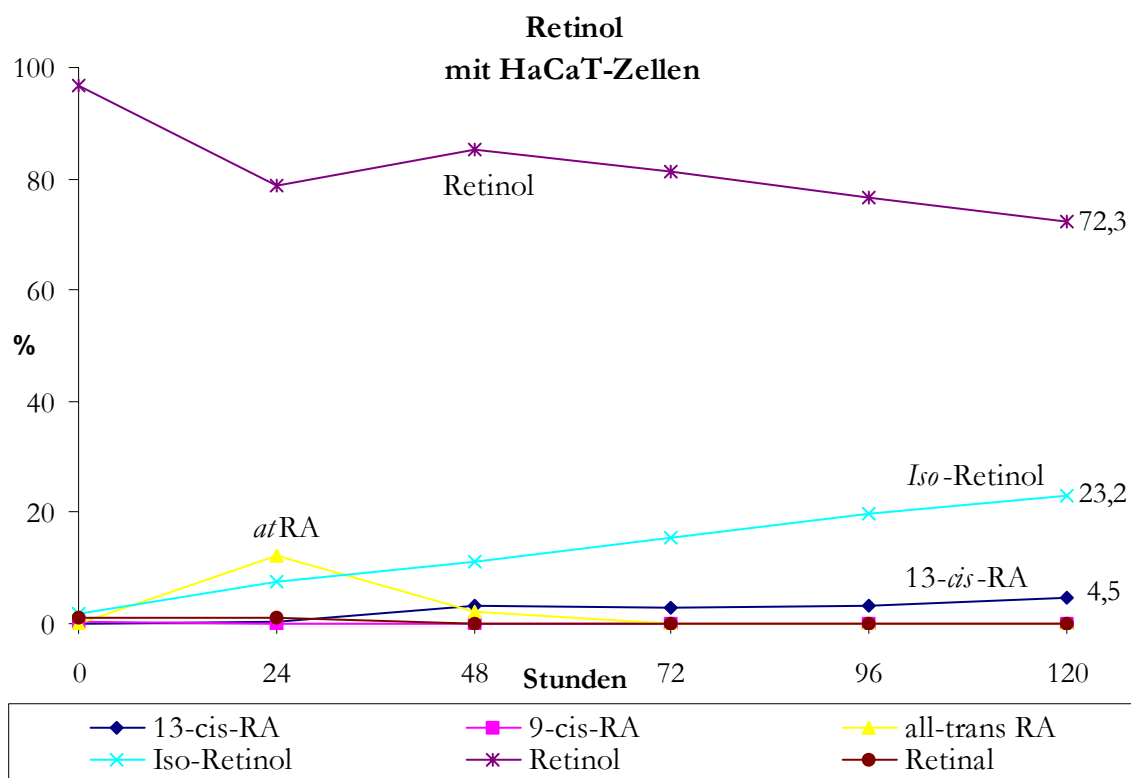


Abbildung 6: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von Retinol mit HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 14).

6.1.3 Retinal Inkubation ohne HaCaT-Zellen

Retinal	<i>Iso</i> -Retinal	Retinol	9- <i>cis</i> -RA	13- <i>cis</i> -RA	<i>at</i> RA	Stunden
92,4	7	0,6	0	0	0	0
74,6	22,7	1,5	1,2	0	0	24
72,1	23,7	2,2	2	0	0	48
69,9	23,6	3,3	3,4	0	0	72
67,5	23,8	5,2	3,7	0	0	96
65,1	22,6	6,4	5,9	0	0	120

Tabelle 15: Ergebnisse der Retinal Inkubation ohne HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M Retinal wurde 100 % gleichgesetzt, und die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

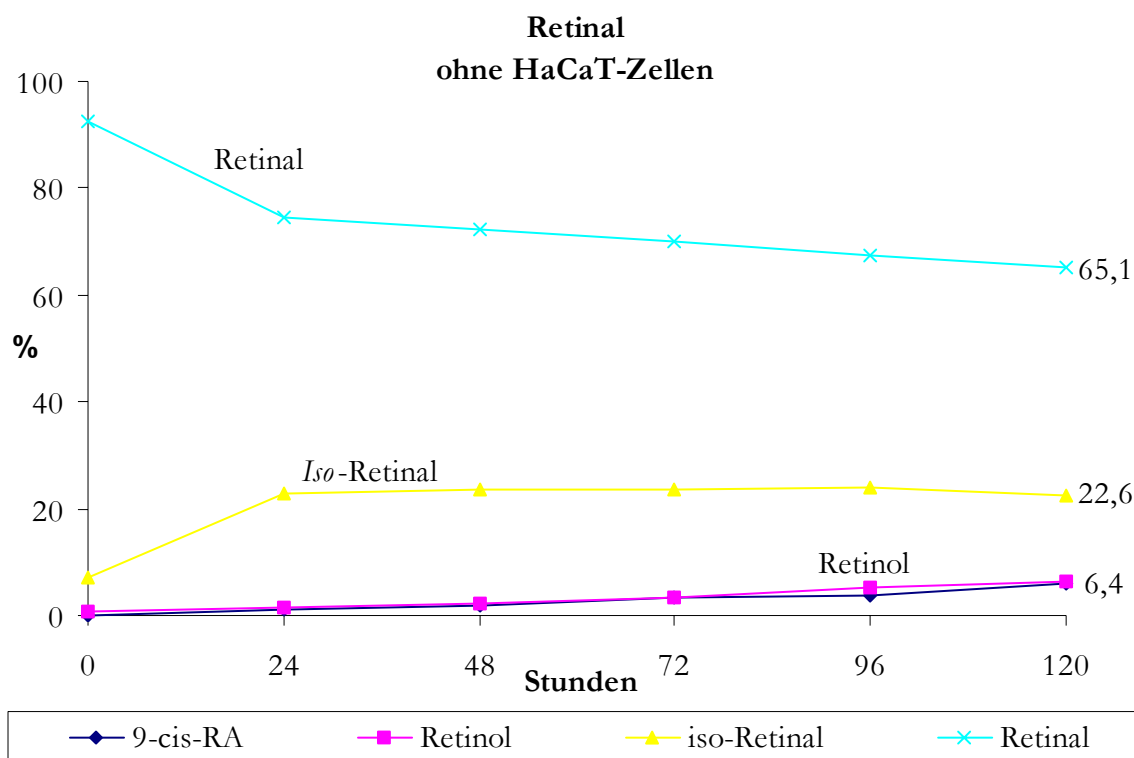


Abbildung 7: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von Retinal ohne HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO², wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab.15).

6.1.4 Retinal Inkubation mit HaCaT-Zellen

Retinal	<i>Iso</i> -Retinal	Retinol	<i>Iso</i> -Retinol	<i>at</i> RA	Stunden
92,4	7	0,6	0	0	0
2,4	0,6	14,9	0,5	72,6	24
1,4	0,2	16	0,7	56,4	48
1,8	0,5	18,9	1,9	35,1	72
3,8	0	27,4	5,5	17,4	96
6	0	30,9	7,1	6,9	120
9- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	13- <i>cis</i> -RA	4- <i>oxo-at</i> RA	4- <i>oxo</i> -13- <i>cis</i> -RA	Stunden
0	0	0	0	0	0
0,5	0,5	2,3	0	5,9	24
0,9	0,8	3,5	0,5	19,6	48
1,8	1,4	6,4	2,2	30,1	72
3,3	2,4	11,3	7,8	21,2	96
4,5	3,8	14,5	12,9	13,5	120

Tabelle 16: Ergebnisse der Retinal Inkubation mit HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M Retinal wurde 100 % gleichgesetzt, und die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

Zusammenfassung der Retinoide in Gruppen:

Zur besseren Übersicht können die Substanzen in Gruppen zusammengefaßt und die Konzentrationen addiert werden. Die Gruppen sind wie folgt:

Retinale:	Retinal und <i>Iso</i> -Retinal
Retinole:	Retinol und <i>Iso</i> -Retinol
Retinsäuren:	<i>at</i> RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA und 9,13- <i>dicis</i> -RA
Oxo-Säuren:	4- <i>oxo-at</i> RA und 4- <i>oxo</i> -13- <i>cis</i> -RA

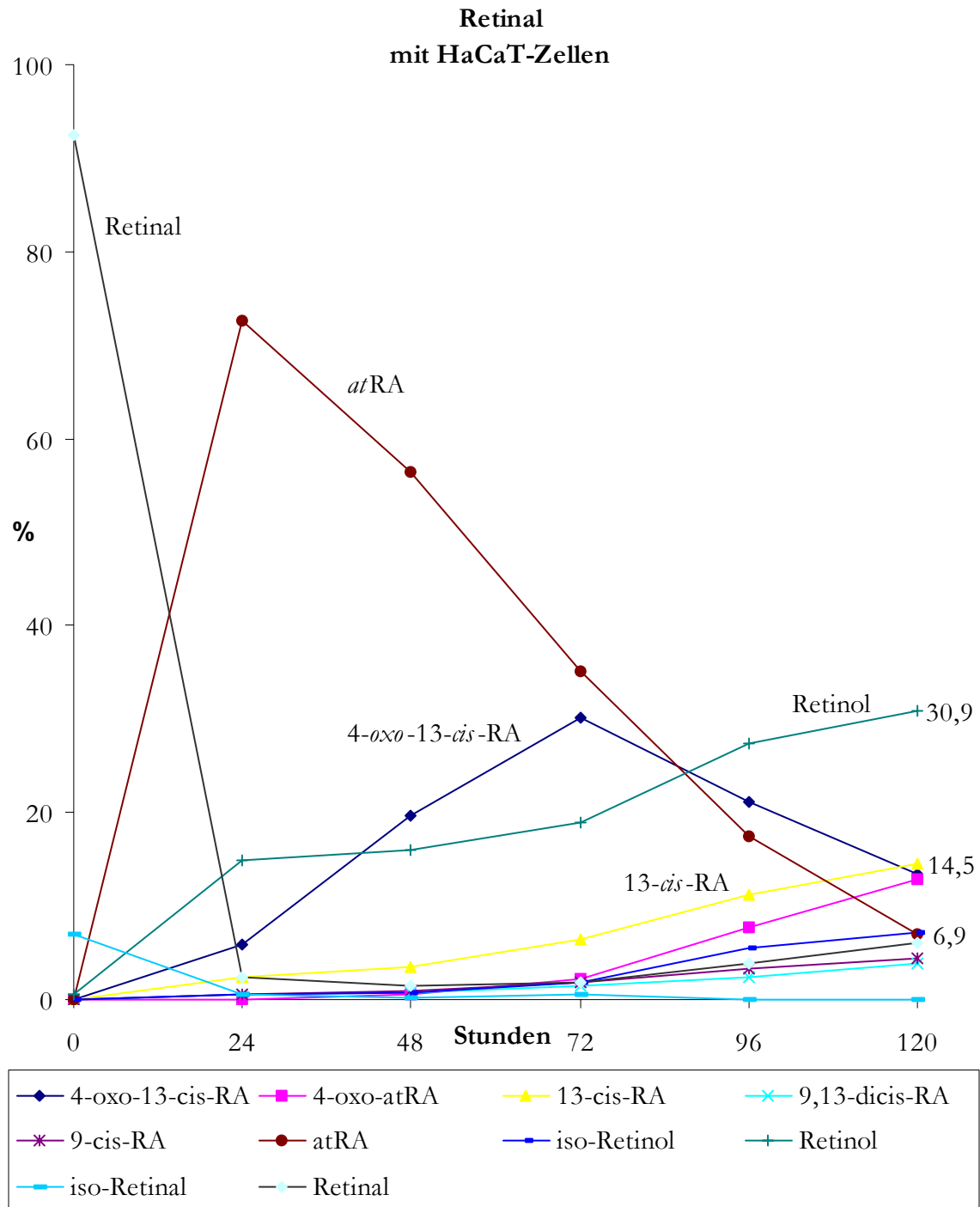


Abbildung 8: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von Retinal mit HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10⁻⁵ M ist mit 100 % angegeben. Die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 16).

Zusammenfassung der Retinoide zu Gruppen

Retinale	Retinole	Säuren	Oxo-Säuren	Stunden
99,4	0,6	0	0	0
3	15,4	75,9	5,9	24
1,6	16,7	62,1	20,1	48
2,3	20,8	44,7	32,3	72
3,8	32,9	34,4	29	96
6	38	29,7	26,4	120

Tabelle 17: Zusammenfassung der Retinoide in Gruppen (s.o.). Die HaCaT-Zellen wurden mit Retinal inkubiert und die Metabolite mittels HPLC gemessen. Alle Angaben in %.

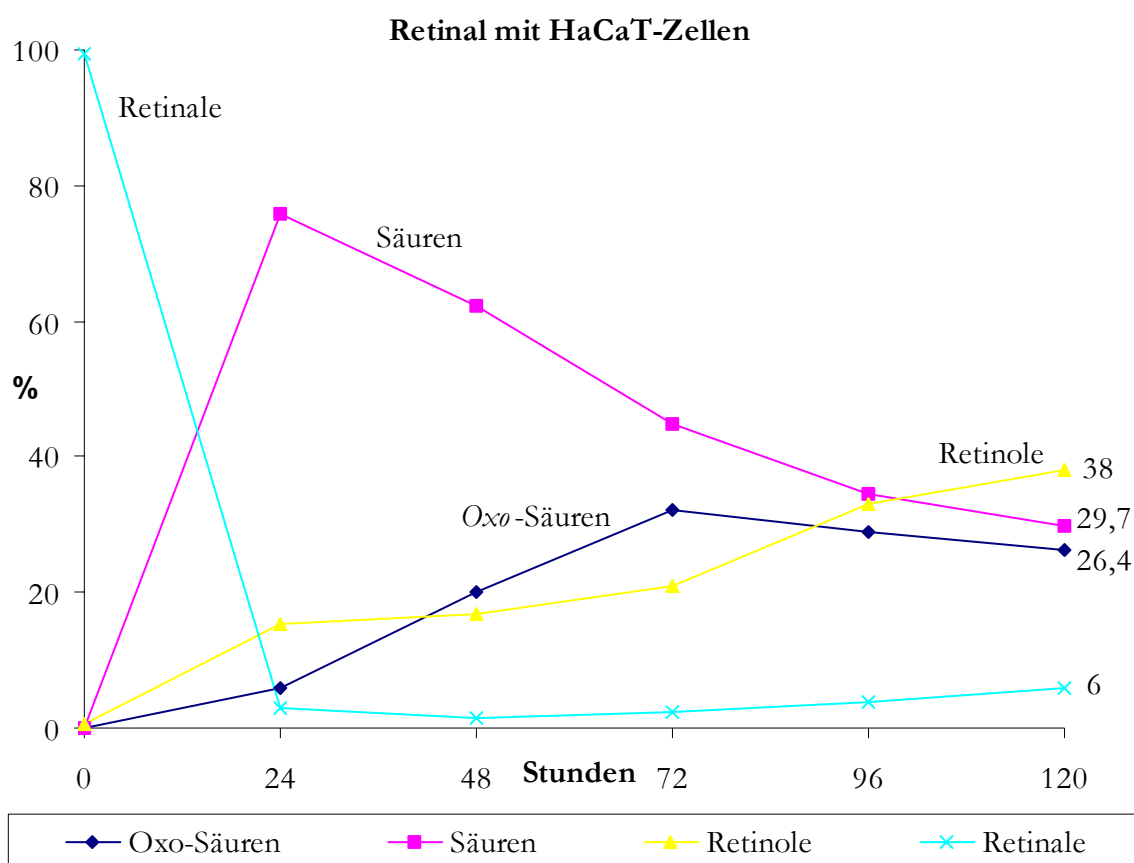


Abbildung 9: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von Retinal mit HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO², wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10⁻⁵ M ist mit 100 % angegeben. Die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 16). Bei den Retinalen sind Retinal und *Iso*-Retinal, bei den Retinolen sind Retinol und *Iso*-Retinol, bei den Retinsäuren sind *at*RA, 9-*cis*-RA, 13-*cis*-RA und 9,13-*divis*-RA und bei den Oxo-Säuren sind 4-*oxo-at*RA und 4-*oxo*-13-*cis*-RA zusammengefaßt (s. Tab. 17).

6.1.5 *All-trans* RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen

<i>all-trans</i> RA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	4- <i>oxo-at</i> RA	4- <i>oxo-13-cis</i> -RA	Stunden
99,3	0,4	0,2	0	0	0,1	0
81,1	10,5	4,9	2,9	0	0,6	24
76,6	12,5	6,5	3,8	0	0,6	48
64,6	17	10,1	7,1	0	1,2	72
51	20,4	14,5	13	0	1,1	96
45,3	20,3	16,4	16,8	0	1,2	120

Tabelle 18: Ergebnisse der *all-trans* RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M *all-trans* RA wurde 100 % gleichgesetzt, und die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

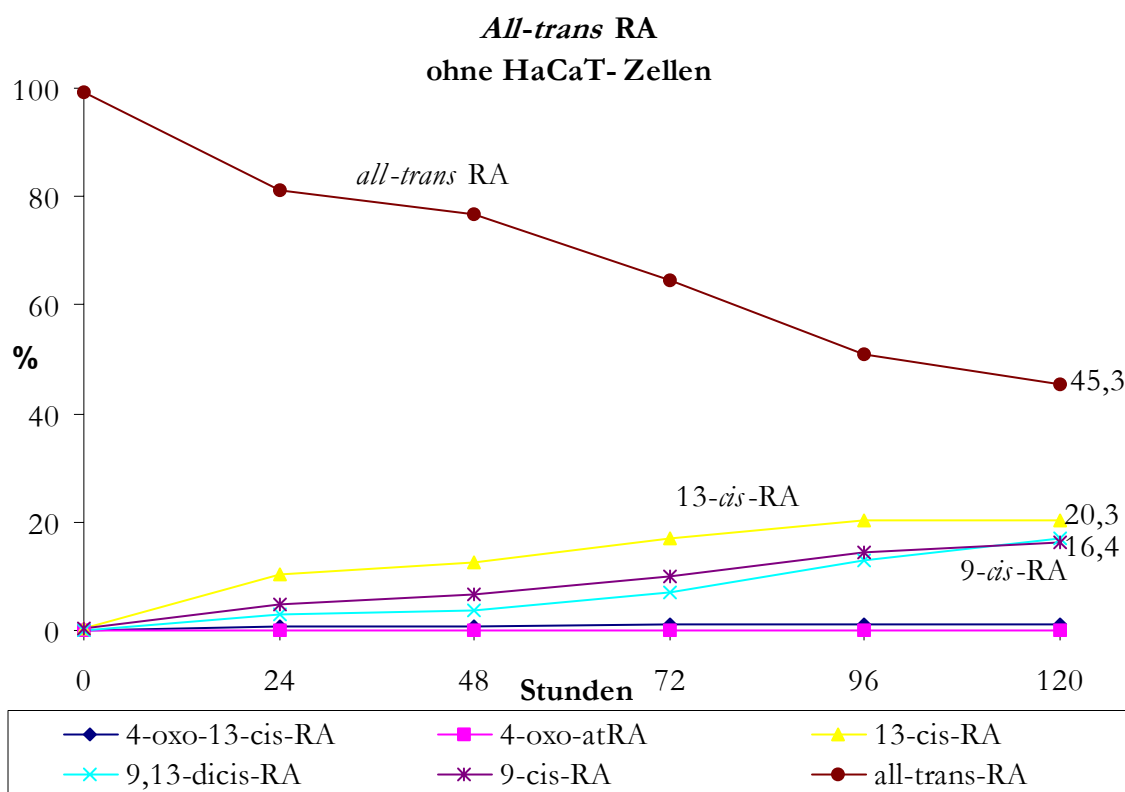


Abbildung 10: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von *all-trans* RA ohne HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO², wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 18).

6.1.6 *All-trans* RA Inkubation mit HaCaT-Zellen

<i>all-trans</i> RA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	4- <i>oxo</i> - <i>at</i> RA	4- <i>oxo</i> -13- <i>cis</i> -RA	Stunden
99,3	0,4	0,2	0	0	0,1	0
95,3	1,6	0,5	0,3	0,5	1,8	24
87,5	2,9	1	0,5	0,9	7,2	48
87,7	3,9	1,5	1	0,7	5,2	72
79,6	5,1	1,9	1,1	1,2	11,1	96
77,8	7,2	2,9	1,8	1,6	8,7	120

Tabelle 19: Ergebnisse der *all-trans* RA Inkubation mit HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M *all-trans* RA wurde 100 % gleichgesetzt, und die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

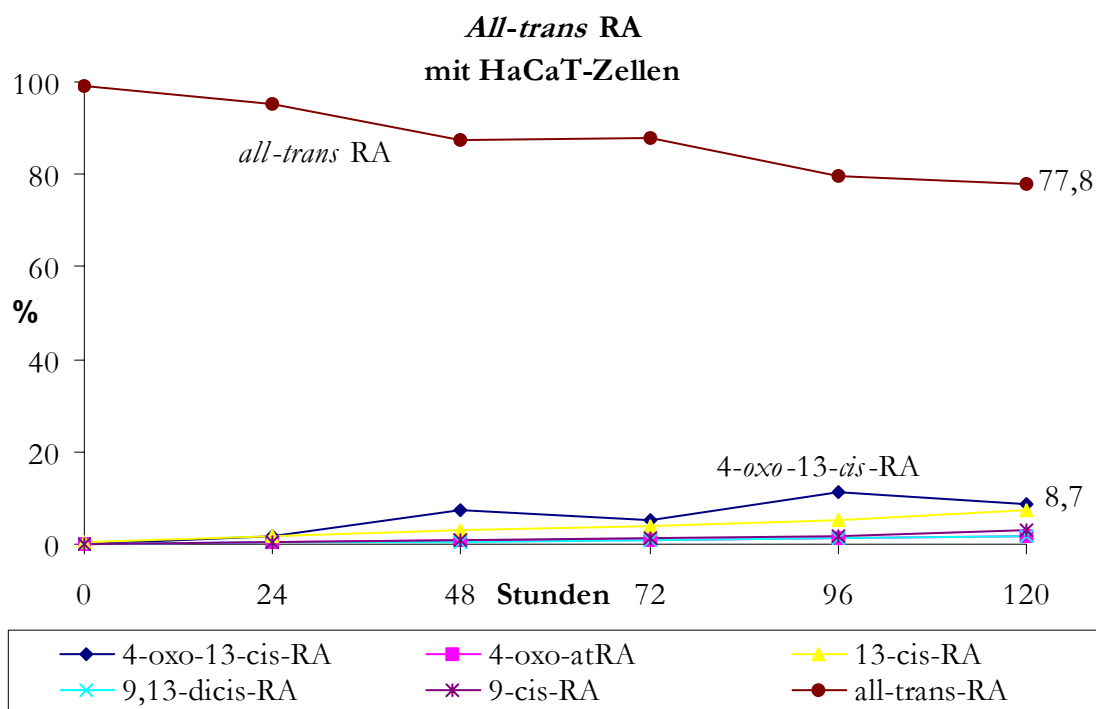


Abbildung 11: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von *all-trans* RA mit HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 19).

6.1.7 9-*cis*-RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen

9- <i>cis</i> -RA	<i>all-trans</i> RA	13- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	4- <i>oxo</i> - <i>at</i> RA	4- <i>oxo</i> -13- <i>cis</i> -RA	Stunden
97,9	0	0,2	0	1,2	0,6	0
85,6	6,7	3	2,9	1	0,8	24
72,4	12,8	6,2	6,3	0,7	1,6	48
61,5	17,7	9	9,8	0,6	1,6	72
53,4	20,7	10,9	13,1	0,5	1,5	96
46,3	23,1	12,4	16,1	0,6	1,5	120

Tabelle 20: Ergebnisse der 9-*cis*-RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M 9-*cis*-RA wurde 100 % gleichgesetzt, und die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

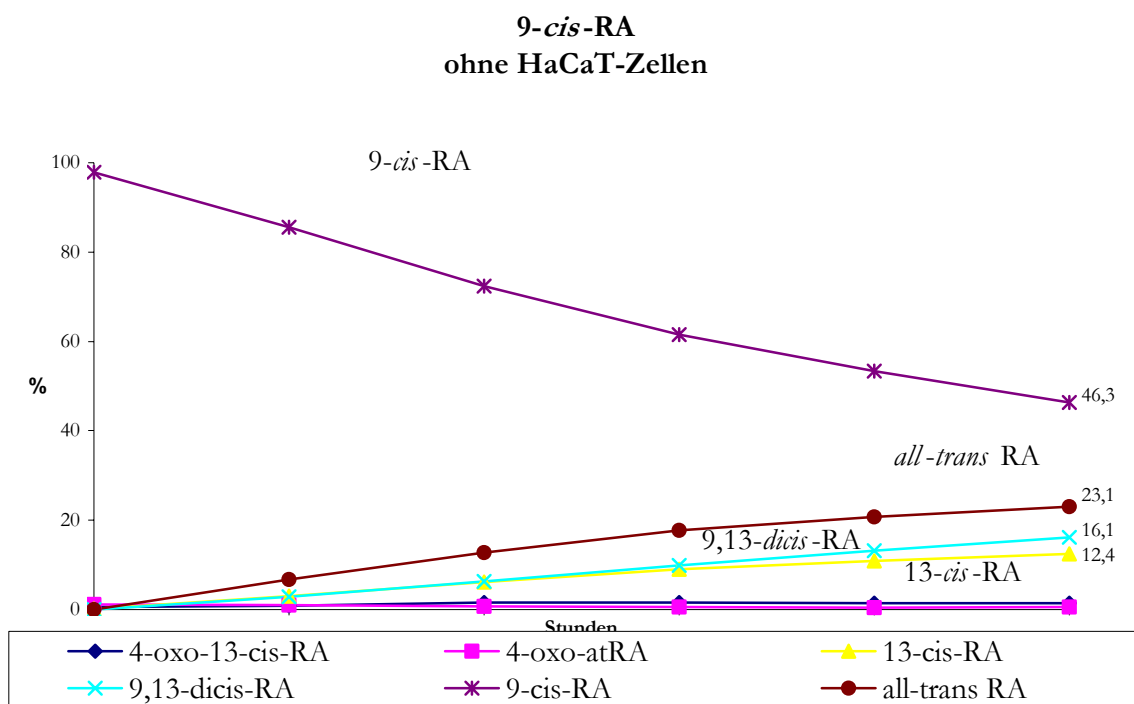


Abbildung 12: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von 9-*cis*-RA ohne HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 20).

6.1.8 9-*cis*-RA Inkubation mit HaCaT-Zellen

9- <i>cis</i> -RA	<i>all-trans</i> RA	13- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	4- <i>oxo-at</i> RA	4- <i>oxo-13-cis</i> -RA	Stunden
97,9	0	0,2	0	1,2	0,6	0
92,3	0,9	0,5	0,6	2,2	3,4	24
79,8	1,4	1,2	1,1	8,1	8,4	48
74,2	1,5	1,4	1,8	10,7	10,5	72
85,6	2,5	1,6	2,1	4,3	3,9	96
61,4	9,9	4,7	5	9,5	9,6	120

Tabelle 21: Ergebnisse der 9-*cis*-RA Inkubation mit HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M 9-*cis*-RA wurde 100 % gleichgesetzt, und die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

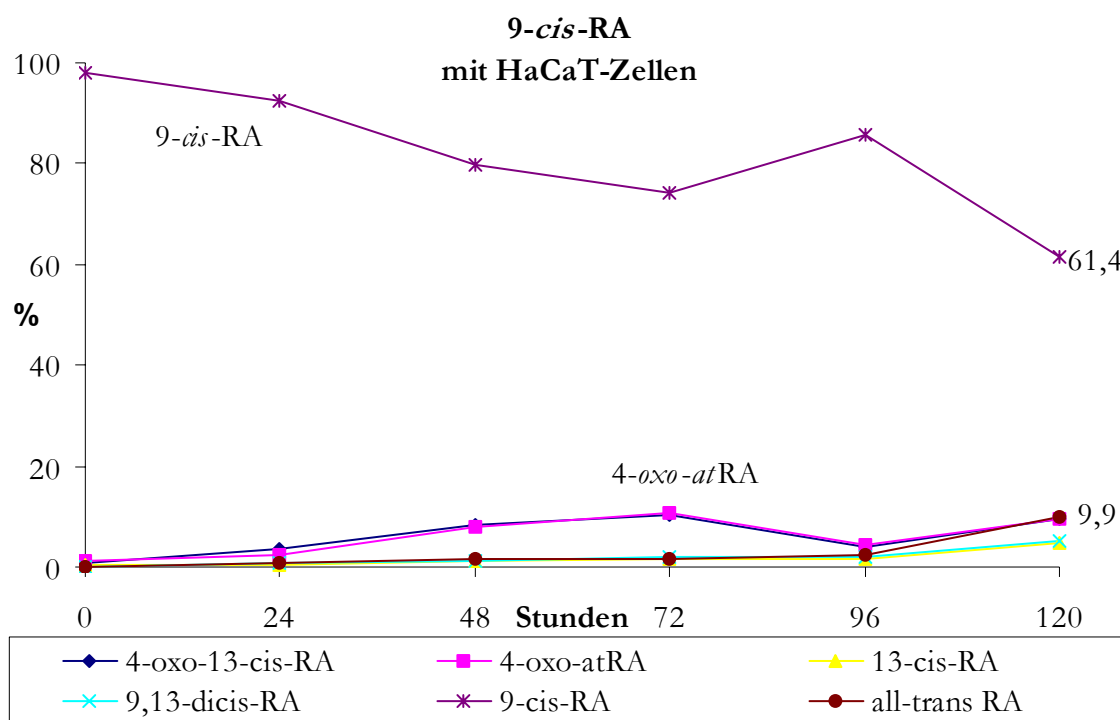


Abbildung 13: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von 9-*cis*-RA mit HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO², wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 21).

6.1.9 13-*cis*-RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen

13- <i>cis</i> -RA	<i>all-trans</i> RA	9- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	4- <i>oxo</i> - <i>at</i> RA	4- <i>oxo</i> -13- <i>cis</i> -RA	Stunden
99,2	0,8	0	0	0	0	0
69,4	22,4	4,8	3,4	0	0	24
44	36,5	10,1	9,4	0	0	48
34,9	39,7	12,7	12,7	0	0	72
29	40	14,7	16,3	0	0	96
25,1	39,7	16	19,2	0	0	120

Tabelle 22: Ergebnisse der 13-*cis*-RA Inkubation ohne HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M 13-*cis*-RA wurde 100 % gleichgesetzt, und die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

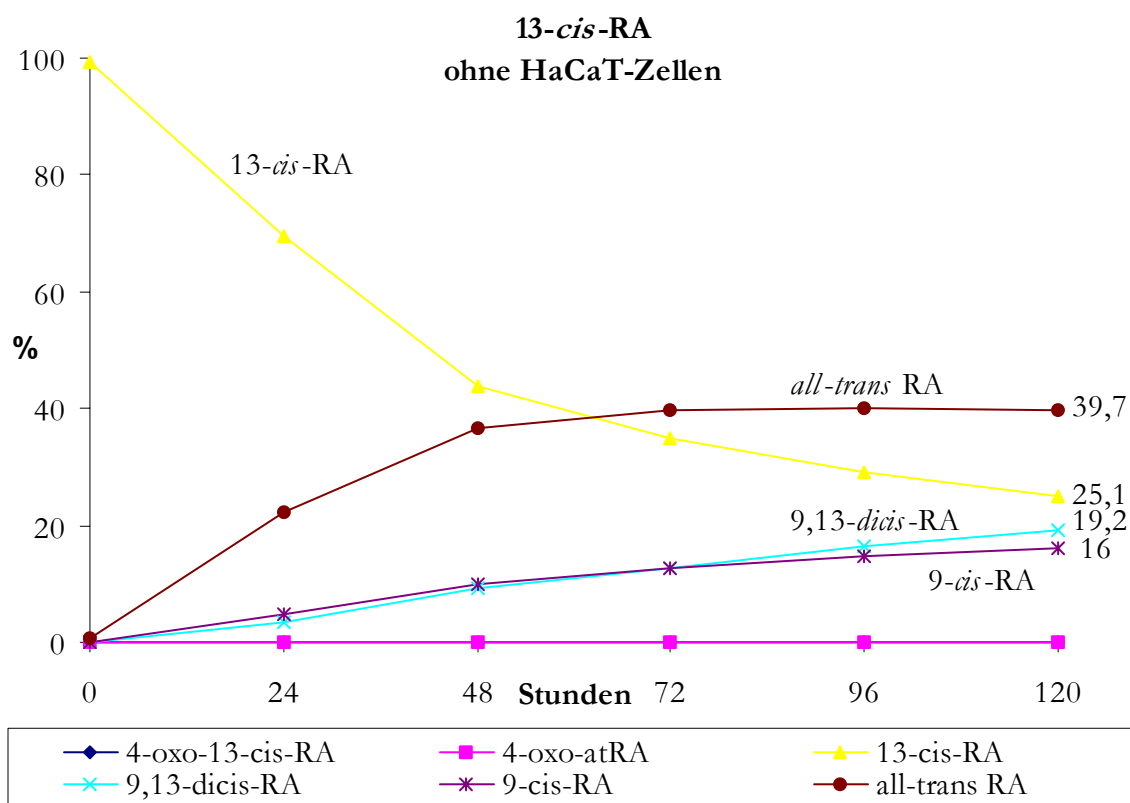


Abbildung 14: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von 13-*cis*-RA ohne HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die spontanen Abbauprodukte wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 22).

6.1.10 13-*cis*-RA Inkubation mit HaCaT-Zellen

13- <i>cis</i> -RA	<i>all-trans</i> RA	9- <i>cis</i> -RA	9,13- <i>dicis</i> -RA	4- <i>oxo-at</i> RA	4- <i>oxo-13-cis</i> -RA	Stunden
99,2	0,8	0	0	0	0	0
92,6	1,6	0,4	0,1	5,3	0	24
77,3	2,8	0,8	0,5	18	0,7	48
68,5	2,2	0,9	0,8	26,4	1,2	72
60,5	3,5	1,4	1,3	30,1	3,2	96
54,5	8,2	2,3	2,1	24,7	8,3	120

Tabelle 23: Ergebnisse der 13-*cis*-RA Inkubation mit HaCaT-Zellen, die mit Hilfe der HPLC ermittelt wurden (Kap. 5.2.2). Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M 13-*cis*-RA wurde 100 % gleichgesetzt, und die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden gemessen.

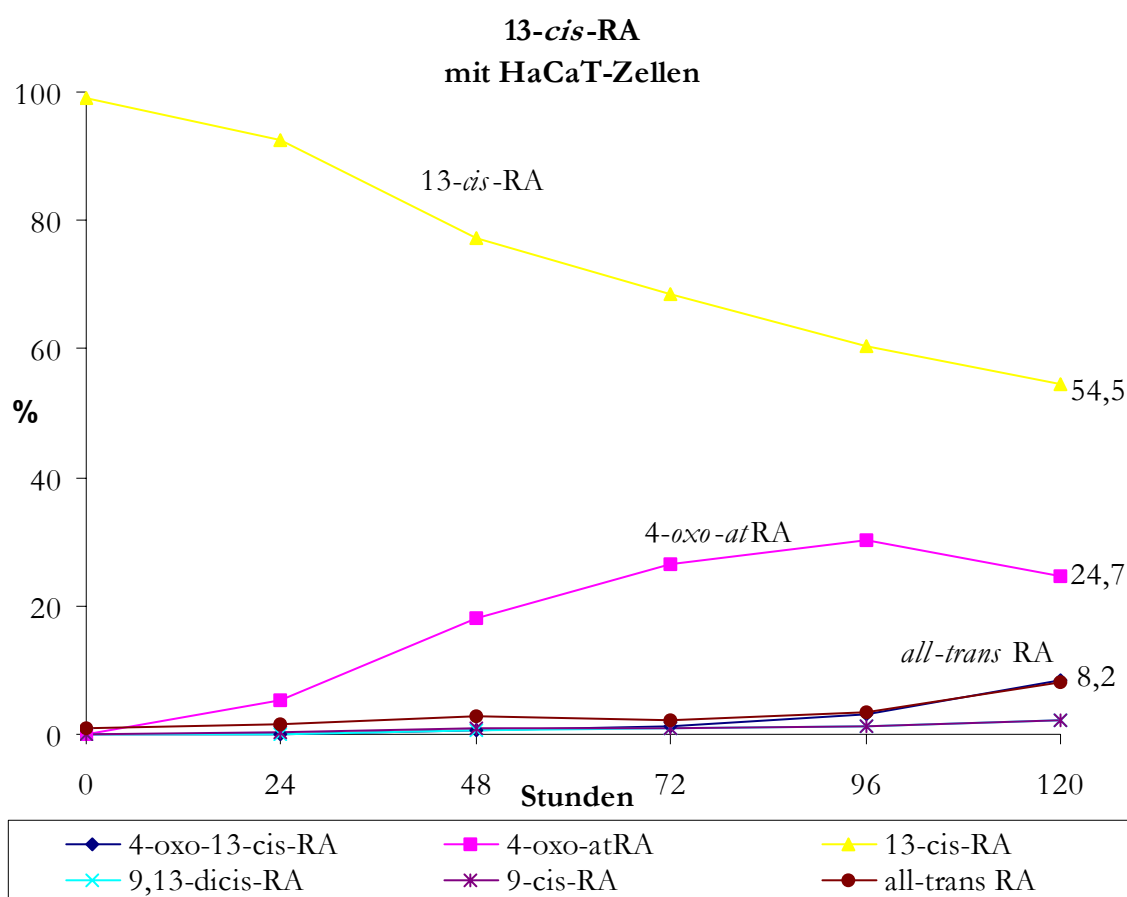


Abbildung 15: Auf dieser Abbildung ist die Inkubation von 13-*cis*-RA mit HaCaT-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, graphisch dargestellt. Die Anfangskonzentration von 10^{-5} M ist mit 100 % angegeben. Die Metabolite wurden nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mittels HPLC, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, quantitativ gemessen (s. Tab. 23).

6.2 Ergebnisse der RT-Polymerase-Kettenreaktion

Auflistung der RT-PCR Ergebnisse. Die Expression der mRNA verschiedener Enzyme und Proteine, die für den Retinoidmetabolismus von Bedeutung sind, wurden untersucht.

Es wurde versucht, die Expression der Enzyme ROLDH, RALDH, 9-*cis*-ROLDH, CYP1A1, CYP1A2, hLRAT, der Bindungsproteine CRBP I, CRBP II, CRABP I, CRABP II und der Rezeptoren AHR und PPAR in HaCaT-Zellen nachzuweisen.

6.2.1 Proteine, deren mRNA Expression mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte:

- RALDH
- 9-*cis*-ROLDH
- CYP1A1
- CYP1A2
- CRBP II
- CRABP I
- CRABP II

6.2.2 Proteine, deren mRNA Expression mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden konnte:

- ROLDH
- hLRAT
- CRBP I
- AHR
- PPAR

6.3 Darstellung der RT-PCR Ergebnisse

6.3.1 Retinol Dehydrogenase

Darstellung der mRNA-Expression des Enzyms Retinol Dehydrogenase (ROLDH) in HaCaT-Zellen. Als Interne-Standards wurden in diesem Versuch GAPDH und β -Actin verwendet.

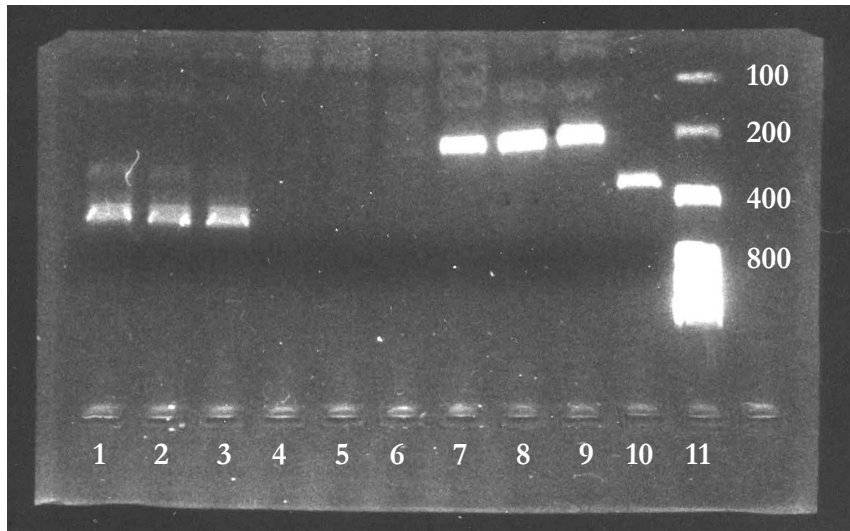


Abbildung 16:

Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis, der ROLDH-, GAPDH und β -Actin-Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol und Retinal in einer Konzentration von je 10^{-5} M zu sehen. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. β -Actin; Native HaCaT-Zellen
2. β -Actin; Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
3. β -Actin; Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
4. ROLDH; Native HaCaT-Zellen
5. ROLDH; Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
6. ROLDH; Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
7. GAPDH; Native HaCaT-Zellen
8. GAPDH; Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
9. GAPDH; Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
10. Positivkontrolle
11. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Es kann keine Expression des Enzyms ROLDH in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden.

6.3.2 9-*cis*-Retinol Dehydrogenase

Darstellung der mRNA-Expression des Enzyms 9-*cis*-Retinol Dehydrogenase (9-*cis*-ROLDH) in HaCaT-Zellen (1-3) und vergleichsweise auch in Keratinozyten (4 und 5).

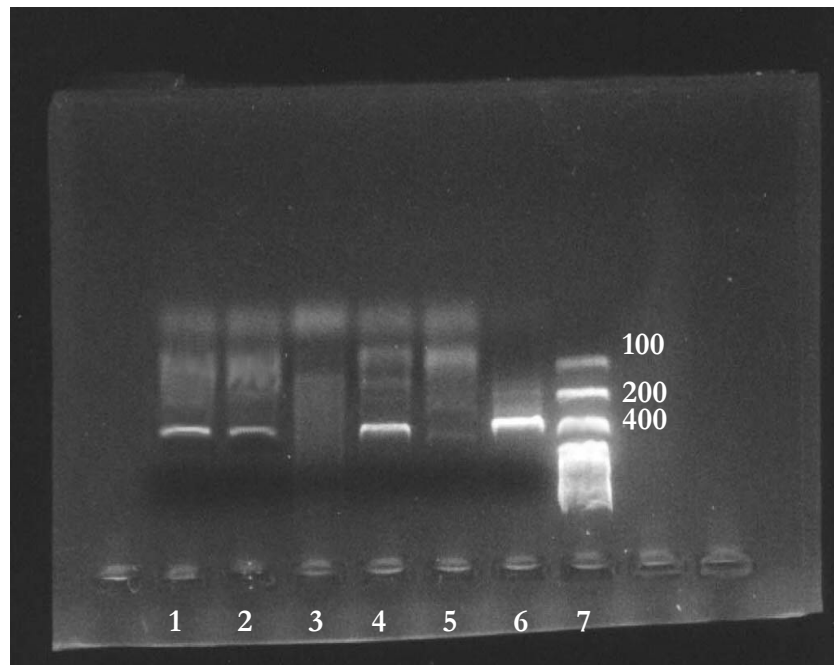


Abbildung 17: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der 9-*cis*-ROLDH Expression in HaCaT-Zellen und Keratinozyten (*ex vivo*) nach 72-stündiger Inkubation zu sehen. Beide Zelltypen wurden mit Retinol und Retinal in einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. Native HaCaT-Zellen
2. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
3. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
4. Inkubation von Keratinozyten mit Retinol
5. Inkubation von Keratinozyten mit Retinal
6. Positivkontrolle
7. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Das Enzym kann nach Retinol Inkubation sowohl bei HaCaT-Zellen als auch bei Keratinozyten nachgewiesen werden. Nach Retinal Inkubation ist, wie zu erwarten, keine Bande sichtbar. Die Expression ist bei Keratinozyten stärker als bei HaCaT-Zellen. Das Fragment ist bei 424 Basenpaaren im Agarosegel sichtbar.

6.3.3 Cellular Retinol Binding Protein II

Darstellung der mRNA-Expression des Bindungsproteins Cellular Retinol Binding Protein II (CRBP II) in HaCaT-Zellen.

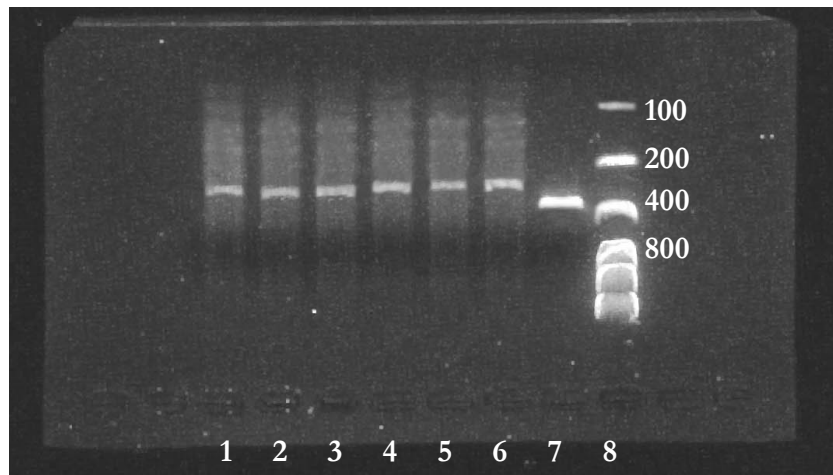


Abbildung 18: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der CRBP II Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol, Retinal, *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA zu sehen. Die Zellen wurden jeweils mit einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. Native HaCaT-Zellen
2. Inkubation von Retinol in HaCaT-Zellen
3. Inkubation von Retinal in HaCaT-Zellen
4. Inkubation von *at*RA in HaCaT-Zellen
5. Inkubation von 9-*cis*-RA in HaCaT-Zellen
6. Inkubation von 13-*cis*-RA in HaCaT-Zellen
7. Positivkontrolle
8. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Das Bindungsprotein CRBP II kann in HaCaT-Zellen sowohl im nativen Zustand als auch nach Inkubation mit Retinol, Retinal, *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA nachgewiesen werden. Das Fragment ist bei 371 Basenpaaren im Agarosegel sichtbar.

6.3.4 Retinal Dehydrogenase

Darstellung der mRNA-Expression des Enzyms Retinal Dehydrogenase (RALDH) in HaCaT-Zellen.

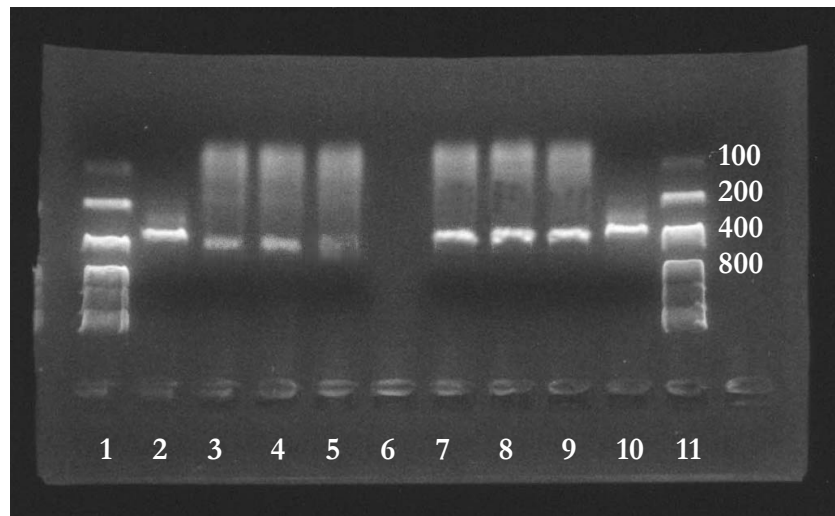


Abbildung 19: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der RALDH Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol und Retinal zu sehen. Die Zellen wurden jeweils mit einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Die Proben 2 bis 5 wurden bei einer Anlagerungs-Temperatur von 63°C und die Proben 7 bis 10 bei einer Anlagerungs-Temperatur von 62°C bearbeitet. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

- | | | |
|----|---|-------------------------------|
| 1 | DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare | |
| 2 | Positivkontrolle | (Anlagerungs-Temperatur 63°C) |
| 3 | Native HaCaT-Zellen | (Anlagerungs-Temperatur 63°C) |
| 4 | Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol | (Anlagerungs-Temperatur 63°C) |
| 5 | Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal | (Anlagerungs-Temperatur 63°C) |
| 7 | Native HaCaT-Zellen | (Anlagerungs-Temperatur 62°C) |
| 8 | Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol | (Anlagerungs-Temperatur 62°C) |
| 9 | Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal | (Anlagerungs-Temperatur 62°C) |
| 10 | Positivkontrolle | (Anlagerungs-Temperatur 62°C) |
| 11 | DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare | |

Das Enzym kann bei HaCaT-Zellen sowohl im nativen Zustand, als auch nach Retinol und Retinal Inkubation nachgewiesen werden. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ist die Expression bei einer Anlagerungs-Temperatur von 62°C am Besten im Agarosegel sichtbar. Das Fragment ist bei 411 Basenpaaren zu erkennen.

6.3.5 Cellular Retinoic Acid Binding Protein I

Darstellung der mRNA-Expression des Bindungsproteins Cellular Retinoic Acid Binding Protein I (CRABP I) in HaCaT-Zellen.

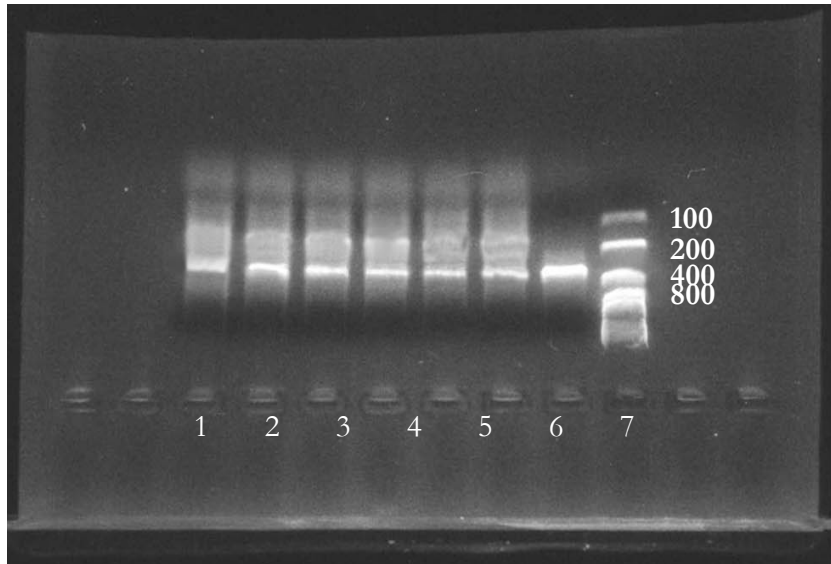


Abbildung 20: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der CRABP I Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol, Retinal, *all-trans*-RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA zu sehen. Die Zellen wurden jeweils mit einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. Native HaCaT-Zellen
2. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
3. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
4. Inkubation von HaCaT-Zellen mit *all-trans*-RA
5. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 9-*cis*-RA
6. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 13-*cis*-RA
7. Positivkontrolle
8. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Das Bindungsprotein CRABP I kann in HaCaT-Zellen sowohl im nativen Zustand als auch nach Inkubation mit Retinol, Retinal, *all-trans*-RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA nachgewiesen werden. Das Fragment ist bei 370 Basenpaaren im Agarosegel sichtbar.

6.3.6 Cellular Retinoic Acid Binding Protein II

Darstellung der mRNA-Expression des Bindungsproteins Cellular Retinoic Acid Binding Protein II (CRABP II) in HaCaT-Zellen.

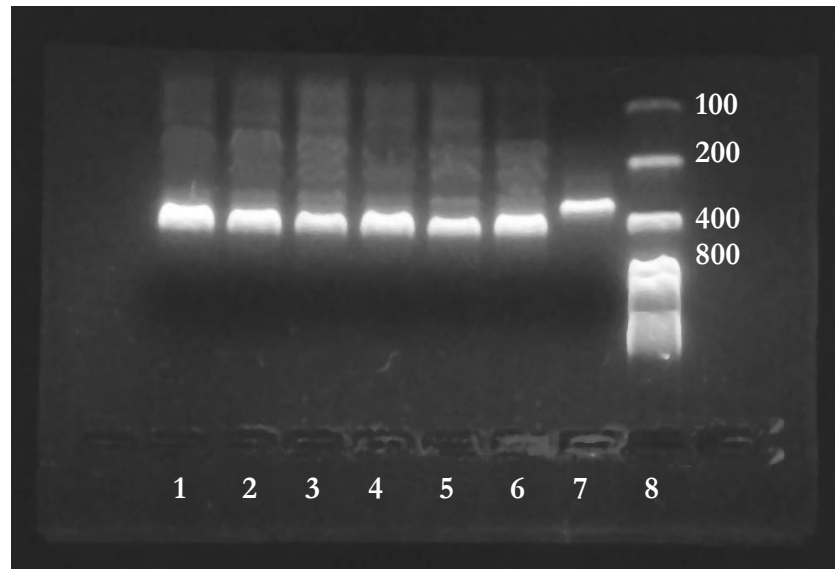


Abbildung 21: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der CRABP II Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol, Retinal, *all-trans*-RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA zu sehen. Die Zellen wurden jeweils mit einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. Native HaCaT-Zellen
2. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
3. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
4. Inkubation von HaCaT-Zellen mit *all-trans*-RA
5. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 9-*cis*-RA
6. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 13-*cis*-RA
7. Positivkontrolle
8. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Das Bindungsprotein CRABP II kann in HaCaT-Zellen sowohl im nativen Zustand als auch nach Inkubation mit Retinol, Retinal, *all-trans*-RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA nachgewiesen werden. Das Fragment ist bei 400 Basenpaaren im Agarosegel sichtbar.

6.3.7 Cytochrom 1A1

Darstellung der mRNA-Expression des Enzyms Cytochrom (CYP) 1A1 in HaCaT-Zellen.

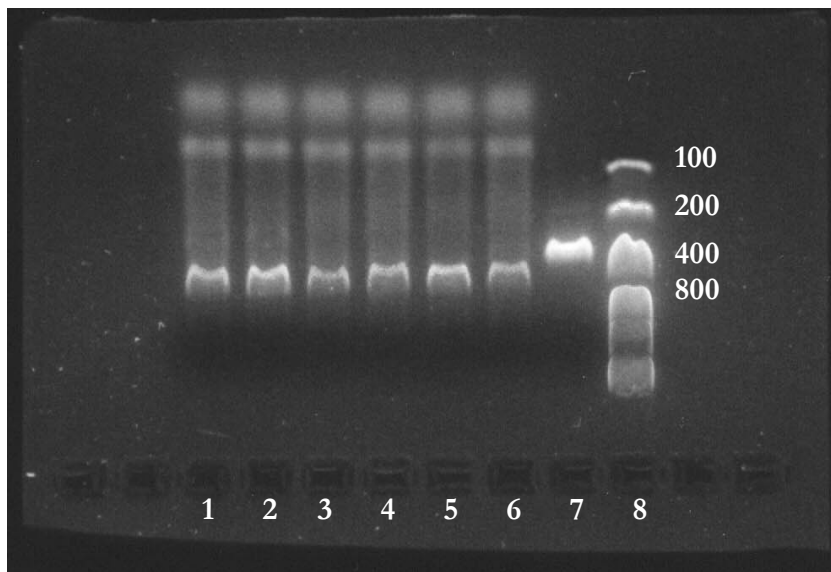


Abbildung 22: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der CYP1A1 Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol, Retinal, *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA zu sehen. Die Zellen wurden jeweils mit einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. Native HaCaT-Zellen
2. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
3. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
4. Inkubation von HaCaT-Zellen mit *at*RA
5. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 9-*cis*-RA
6. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 13-*cis*-RA
7. Positivkontrolle
8. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Das Enzym CYP1A1 kann in HaCaT-Zellen sowohl im nativen Zustand als auch nach Inkubation mit Retinol, Retinal, *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA nachgewiesen werden. Das Fragment ist bei 510 Basenpaaren im Agarosegel sichtbar.

6.3.8 Cytochrom 1A2

Darstellung der mRNA-Expression des Enzyms Cytochrom (CYP) 1A2 in HaCaT-Zellen.

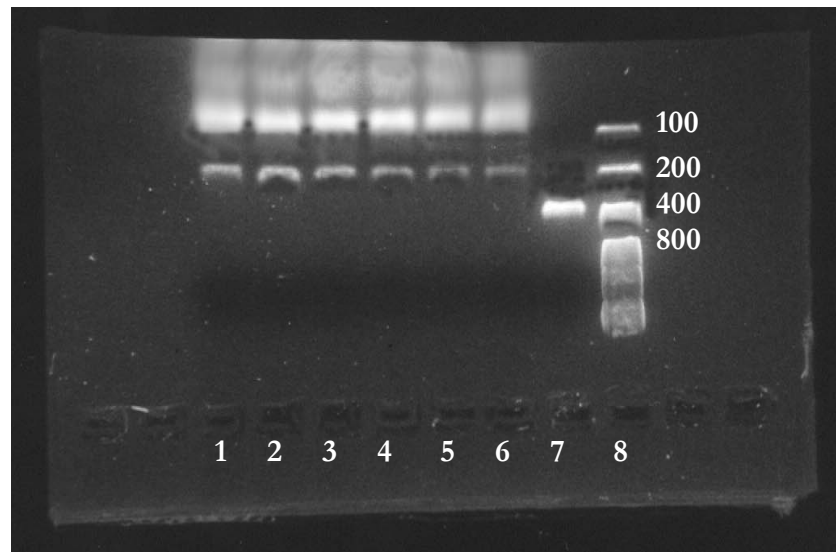


Abbildung 23: Auf dieser Abbildung ist das Ergebnis der CYP1A2 Expression in HaCaT-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Retinol, Retinal, *aTRA*, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA zu sehen. Die Zellen wurden jeweils mit einer Konzentration von je 10^{-5} M inkubiert. Der Nachweis der mRNA erfolgte mittels RT-PCR und die Darstellung der DNA-Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel.

Beschriftung:

1. Native HaCaT-Zellen
2. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol
3. Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinal
4. Inkubation von HaCaT-Zellen mit *aTRA*
5. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 9-*cis*-RA
6. Inkubation von HaCaT-Zellen mit 13-*cis*-RA
7. Positivkontrolle
8. DNA Mass-Ladder mit Anzahl der Basenpaare

Das Enzym CYP1A2 kann in HaCaT-Zellen sowohl im nativen Zustand als auch nach Inkubation mit Retinol, Retinal, *aTRA*, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA nachgewiesen werden. Das Fragment ist bei 229 Basenpaaren im Agarosegel sichtbar.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Inkubation von HaCaT-Zellen mit Retinol, Retinal und Retinsäuren der Retinoidmetabolismus in dieser Zelllinie näher untersucht.

Diese Zellart ist gut charakterisiert und dient im Rahmen von *in vitro* Studien als Beispiel für menschliche nicht-maligne Keratinozyten. Darüberhinaus wird diese Zelllinie in aktuellen Studien als Grundlage zur Konstruktion von dreidimensionaler Haut und für pharmakologische und toxikologische Studien verwendet. Das Wissen um Anlagen und Eigenschaften der HaCaT-Zellen bildet dabei die wesentliche Voraussetzung solcher Studien. In diesem Zusammenhang ist auch der Retinoidmetabolismus von Bedeutung, welcher großen Einfluß auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen hat. Wie in der Einleitung erläutert, ist Retinol ein essentielles Vitamin, das eine wesentliche Rolle in der Zellentwicklung spielt. Des weiteren stellen Retinoide heutzutage Inhaltsstoffe in der Behandlung von verschiedenen Hautkrankheiten in der Dermatologie dar. Deshalb ist es wichtig, die Umwandlungsprozesse und ihren Abbau in Hautzellen, wie z.B. Keratinozyten, genau zu kennen. Dieses Wissen ist für die Therapie mit Retinoidpräparaten wichtig und ist auch die Basis, um neue, effizientere Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln.

Schon Anfang der 90er Jahre veröffentlichten Fuchs *et al.* (60), daß unter retinoid-freien Bedingungen menschliche Keratinozyten verschiedene Marker (Keratin 1 und 10) exprimieren, die in der Gegenwart von kleinen Mengen Retinol im Medium unterdrückt werden. HaCaT-Zellen hingegen exprimieren unter gleichen Versuchsbedingungen weiterhin Keratin 1 und 10 (15, 17, 18). Damals wurde gemutmaß, daß in den HaCaT-Zellen eine Dysregulation oder ein anderer Metabolismus vorliegen müsse.

Die hier vorgelegte Arbeit untersuchte den Retinoidmetabolismus und die daran beteiligten Proteine in HaCaT-Zellen.

Zur genauen Untersuchung des Metabolismus von Retinoiden in HaCaT-Keratinozyten wurde eine hoch sensitive RP-HPLC-Analyse angewandt. Über einen Zeitraum von 120 Stunden wurden die Konzentrationen von Retinol, Retinal und Retinoidsäuren sowie ihrer Isomere und deren 4-Hydroxy-Metabolite in den Zellen und in deren Medien gemessen. Zusätzlich wurde mit Hilfe der RT-PCR versucht, wichtige Enzyme und Bindungsproteine nachzuweisen, die an dem Retinoid-Metabolismus in humanen Keratinozyten beteiligt sind. Die verwendete mRNA stammte aus HaCaT-Zellen, die je 72 Stunden mit den entsprechenden Retinoiden inkubiert waren und danach isoliert wurden.

Die Veresterung von Retinol zur Speicherform Retinylester:

Retinol wird in menschlichen Keratinozyten einerseits über Retinal zu Retinsäuren metabolisiert, andererseits kann es auch durch Veresterung in Retinylester, seine Speicherform, überführt werden (86). Die Enzyme, die die letztgenannte Reaktion katalysieren, sind zwei Transferasen, die Lecithin: Retinol-Acetyltransferase (LRAT) und die Acetyl-CoA Transferase (ARAT), die beide in der menschlichen Haut vorkommen (193, 99). Auch HaCaT-Zellen bilden Retinylester, wenn ihnen Retinol zugeführt wird (222). Die an dieser Reaktion in humanen Keratinozyten beteiligte LRAT (hLRAT) konnte in unserem Versuch jedoch nicht nachgewiesen werden. Auf Grund dessen liegt die Vermutung nahe, daß hier andere Enzyme an der Veresterung von Retinol zu Retinylester beteiligt sind.

Die Metabolisierung von Retinol in HaCaT-Zellen:

Wird Retinol nicht gespeichert, steht es in menschlichen Keratinozyten am Anfang einer Metabolisierungskaskade, die über Retinal zu den aktiven Retinsäuren und letztendlich zu den inaktiven 4-*oxo*-Metaboliten führt (92).

Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist die Feststellung, daß HaCaT-Zellen Retinol nicht in Retinal oxidieren können (s. Tab. 14; Abb. 6). Nach 120 Stunden Inkubationszeit mit Retinol kann kein Retinal nachgewiesen werden. Normale menschliche Keratinozyten hingegen sind fähig, Retinol mit Hilfe von Dehydrogenasen in Retinal umzuwandeln (11, 25, 93). In unseren Versuchsreihen konnten wir Ähnlichkeiten zwischen dem Metabolismus von Retinol in Fibroblasten und HaCaT-Zellen feststellen. Auch Fibroblasten sind nicht in der Lage, Retinol als Quelle für die Dehydrogenierung und Produktion von Retinal und Retinsäuren zu nutzen. Andererseits können sie Retinal oxidieren, um Retinsäuren zu produzieren (Daten hier nicht gezeigt; Mündliche Mitteilung F. Jugert).

Die nicht nachweisbare Metabolisierung von Retinol und die Tatsache, daß Retinal hingegen von den HaCaT-Zellen sofort in große Mengen *atRA* umgesetzt werden kann, läßt darauf schließen, daß die enzymatische Umwandlung von Retinol in Retinal unterbleibt. Mittels RT-PCR konnte zusätzlich nachgewiesen werden, daß die für diese Reaktion notwendige Retinol-Dehydrogenase (ROLDH) nicht in HaCaT-Zellen expremiert wird (s. Kap. 5.3.1). Auch die Erhöhung auf bis zu 45 Zyklen (normal 35 Zyklen) erbrachte keinen Nachweis, daß die mRNA des Enzyms in HaCaT-Zellen vorliegt. Somit konnten die Beobachtungen, die mittels RP-HPLC gemacht wurden, mit dem Ergebnis der RT-PCR unterstützt und ergänzt werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Beobachtung von Törmä (194), der eine undeutliche Expression von ROLDH nach der Erhöhung der Zyklenanzahl auf 40 Durchläufe beschreibt (194).

Unter Einbeziehung der hier vorgestellten Resultate lassen sich verschiedene Beobachtungen, die in der Vergangenheit über den Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen, besonders im Vergleich zu menschlichen Keratinozyten, gemacht wurden, neu beurteilen:

Marikar (111) beschrieb, daß die Zugabe von *at*RA zu HaCaT-Zellen sofort die Transkription von mRNA und die Aktivität der RA-4-Hydroxylase induzierte. In der Abwesenheit von Retinoiden oder der Zugabe von Retinol waren die mRNA der 4-Hydroxylase und das Protein (CYP26) kaum nachweisbar. Diese Beobachtung wird erklärbar unter der Annahme, daß Retinol nicht von HaCaT-Zellen metabolisiert wird und somit auch Retinsäuren nicht in dem Maße gebildet werden, daß eine Induktion der RA-4-Hydroxylase stattfinden kann.

Zouboulis (222), der den Signalweg von Retinal und RAG (*all-trans*-Retinoyl- β -D-Glucuronide) untersuchte, beschrieb, daß nach der Zugabe von Retinol zu HaCaT-Zellen schnell Retinylester, aber nur sehr langsam kleine Mengen von Retinsäuren metabolisiert wurden. Die Tatsache, ob Retinal bei diesem Prozeß gebildet wird, ist jedoch nicht untersucht worden. Im weiteren wurden den Zellen direkt Retinsäuren zugeführt, die sofort weiter verstoffwechselt wurden. Diese Beobachtung ist identisch mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Unter der kombinierten RA- und Retinol-Behandlung wurde eine erhöhte Metabolisierung zu Retinylestern, jedoch eine verringerte RA-Produktion in HaCaT-Zellen gemessen (222). Der Autoregulationsmechanismus, wie er in menschlichen Keratinozyten zu finden ist, um eine Anhäufung von zellulären Retinsäuren zu verhindern, ist demzufolge auch in HaCaT-Zellen vorhanden.

Törmä (194) untersuchte den Vitamin-A-Metabolismus in HaCaT-Zellen im Vergleich zu menschlichen Keratinozyten und die Verstoffwechselung von Retinol in HaCaT-Zellen. Die veröffentlichten Ergebnisse unterscheiden sich in Teilen von den hier vorgestellten Ergebnissen. Törmä erhält beispielsweise in seinen Versuchsreihen nach Retinoid-Inkubation Produkte, die in unseren Versuchen mittels RP-HPLC nicht nachgewiesen werden konnten. Selbst wenn die Versuchsbedingungen angeglichen wurden, konnten die Resultate nicht reproduziert werden. In seinen Ergebnissen beschreibt er z.B., daß HaCaT-Zellen (^3H)RA zu 4-keto-RA, aber nicht zu ddRA und 9-*cis*-RA, metabolisieren können. 9-*cis*-RA wurde jedoch in unserem Versuch nach der Zugabe von *at*RA eindeutig nachgewiesen (s. Tab. 19; Abb. 12). In seinem Artikel werden weiterhin Peaks im Protokoll der RP-HPLC-Analyse beschrieben, die von ihm nicht definiert werden konnten.

Auch die Anhäufung von Didehydro-Verbindungen, die Törmä in seinen Zellen mißt, scheinen eher eine Reaktion auf die äußeren Versuchsbedingungen zu sein, als wirkliche Produkte des Retinoidstoffwechsels der HaCaT-Zellen. In seiner Studie wurde das Medium sowohl mit

Penicillin (50 U/ml)/Streptomycin (50 µl/ml) und Fungizone versetzt als auch die zugegebenen Substanzen radioaktiv gekennzeichnet (z.B. ^3H) Retinol), obwohl bekannt ist, daß sich radioaktiv markierte Stoffe oft anderes Verhalten als unbehandelte. Die Studie von Redfern (155) beschreibt z.B. ausführlich, daß radioaktiv markierte Retinoide sehr instabil sind und schneller zerfallen als unbehandelte Retinoide (155). Daher ist die Vermutung naheliegend, daß die von Törmä gemessenen Didehydro-Verbindungen und auch die nicht identifizierbaren Peaks wahrscheinlich Abbauprodukte der radioaktiv-markierten Retinoide sind. Im weiteren ist eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse Törmäs auf Grund der Antibiotikabehandlung denkbar.

Der Erklärungsversuch von Törmä, daß der veränderte Retinoid-Metabolismus von HaCaT-Zellen durch die geringere Konzentration von Retinol in HaCaT-Zellen und die geringen Konzentrationen von Bindungsproteinen zu belegen sei, ist somit nur Teil einer Antwort und ist in Hinblick auf die Behandlung der Zellen und den Versuchsablauf kritisch zu beurteilen.

Obwohl kein Retinal durch die HaCaT-Zellen gebildet wurde, konnte nach 24 Stunden Inkubationszeit kurzzeitig ein Vorkommen von 12 % *at*RA gemessen werden. Der Spiegel sinkt im weiteren Verlauf wieder stark ab und ist nach 72 Stunden nicht mehr meßbar. Zusätzlich wurde in kleinen Mengen 13-*cis*-RA gemessen, jedoch keine weiteren RA-Isomere. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung, daß die RA-Isomere ein Gleichgewicht bilden, wobei *at*RA das Hauptisomer darstellt, wie an späterer Stelle noch erläutert wird. Somit scheint es sich hier um einen Metabolisierungsweg zu handeln, in dem Retinol in kleinen Mengen zu Retinsäuren umgewandelt wird, ohne vorher in Retinal umgewandelt worden zu sein. Hierbei könnte beispielsweise eine 13-*cis*-RALDH beteiligt sein. Die genaue Funktionsweise solcher Dehydrogenasen in HaCaT-Zellen ist wissenschaftlich noch nicht ausreichend erforscht.

Es wurde bereits eine Untergruppe der Short-Chain Dehydrogenasen/Reduktasen mittels RT-PCR identifiziert, die spezifisch *cis*-Retinol-Isomere oxidieren kann. Diese Enzyme wurden 9-*cis*-Retinol Dehydrogenasen genannt (9-*cis*-ROLDH) (116, 160) oder 11-*cis*-Retinol Dehydrogenasen (27). Die Identifizierung dieser Enzyme impliziert, daß 9-*cis*-RA nicht nur aus RA-Isomeren erzeugt werden kann (162), sondern auch aus 9-*cis*-Retinol-Vorgängern (101). Eine spezifische RA-Isomerase konnte bislang nicht identifiziert werden (197, 198). Der Nachweis gestaltet sich auch deshalb als sehr schwierig, da verschiedene Gewebe und Zellarten unterschiedliche Fähigkeiten besitzen, *at*RA in 9-*cis*-RA zu isomerisieren (102). Romert (161) postulierte die These, daß diese Enzyme sogar zwei unterschiedliche Funktionen haben könnten, die von der Substratverfügbarkeit und dem Expressionsort abhängig seien. Sie beschrieb, daß im Auge 9-*cis*-ROLDH als 11-*cis*-Retinol Dehydrogenase fungiert, wohingegen in anderen Geweben die primäre Funktion die Erzeugung von 9-*cis*-RA sei.

Die 9-*cis*-ROLDH konnte von uns sowohl in HaCaT-Zellen als auch in Keratinozyten *in vitro* nach Inkubation mit Retinol nachgewiesen werden. Wurde den Zellen nur Retinal angeboten blieb die Expression des Enzyms aus (s. Kap. 5.3.2). Inwieweit sie genau in den Metabolismus von HaCaT-Zellen eingreift, bleibt noch zu untersuchen.

Die Verstoffwechselung von Retinal zu *at*RA:

Die Substanz Retinal ist ohne äußere Einflüsse sehr stabil, was daran erkennbar ist, daß Retinal im reinen Medium ohne Zellen über einen Zeitraum von 120 Stunden nur geringfügig abgebaut wird. Iso-Retinal wird als Hauptprodukt (22 %) gebildet (s. Tab. 15; Abb. 7).

Hingegen wird in Gegenwart von HaCaT-Zellen Retinal sofort zu *at*RA verstoffwechselt (s. Tab. 16; Abb. 8). Interessanterweise werden auch signifikante Mengen von Retinol und Iso-Retinol produziert. Die Endkonzentration der Retinole beträgt nach 120 Stunden 38 %. Der Versuch zeigt, daß HaCaT-Zellen wie humane Keratinozyten die Möglichkeit besitzen, Retinol aus Retinal zu bilden. Somit ist HaCaT-Zellen nur die Oxidation von Retinol zu Retinal nicht möglich, die Rückreaktion von Retinal zu Retinol findet statt. Ein ähnliches Phänomen ist bei Fibroblasten festgestellt worden, die, wie oben beschrieben, Ähnlichkeiten zu dem Metabolismus von HaCaT-Zellen aufweisen. Menschliche Keratinozyten hingegen weisen eine reversible Umwandlung von Retinol zu Retinal auf.

In aktuellen Studien wird davon ausgegangen, daß für die Oxidation von Retinal zu Retinsäuren ausschließlich Retinal-Dehydrogenasen (RALDHs) verantwortlich sind, und andere Enzyme eine eher untergeordnete Rolle spielen (114, 119, 130, 162, 163). Die zugehörige Dehydrogenase, die die Reaktion von Retinal zu *at*RA katalysiert, ist erwartungsgemäß mittels RT-PCR in HaCaT-Zellen nachweisbar (s. Kap. 5.3.4).

Retinol und Retinal binden an die Bindungsproteine CRBP I und II (s. Kap. 2.3.1). Diese Proteine begleiten mittels einer Reihe von Protein-Protein-Interaktionen die Retinoide durch ihren Syntheseweg zu Retinsäuren und katalysieren die RA-Synthese (124).

CRBP I ist wahrscheinlich an der Aufnahme von Retinol in die Zelle beteiligt und präsentiert das gebundene Retinol anschließend der Retinol Dehydrogenase. Das Bindungsprotein hat erwiesenermaßen eine 4fach höhere Affinität zu Retinol als zu Retinal (122). CRBP I konnte von uns in HaCaT-Zellen nicht nachgewiesen werden. Es besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen der fehlenden ROLDH und der nicht nachzuweisenden Expression von CRBP I. CRBP II hingegen bindet Retinol und Retinal mit gleicher Affinität und transportiert wahrscheinlich Retinal vom mikrosomalen Raum ins Cytosol (162). Da HaCaT-Zellen in der Lage sind, Retinal zu verstoffwechseln, ist anzunehmen, daß dieses Protein auch hier die

Reaktion katalysiert. Dies entspricht auch unserem RT-PCR Ergebnis welches eine hohe Expression von mRNA des Bindungsproteins CRBP II aufweist (s. Kap. 5.3.3).

Das Isomerisationsgleichgewicht der Retinsäuren im reinen Medium:

In unseren Versuchsansätzen ohne HaCaT-Zellen konnte beobachtet werden, daß das Isomerisationsgleichgewicht von *atRA*, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA weitestgehend auf der Seite von *atRA* lag. Die Verteilung betrug z.B. nach 120 Stunden Inkubationszeit mit 13-*cis*-RA 1,6 : 1 : 0,6 für *atRA* : 13-*cis*-RA : 9-*cis*-RA (s. Kap. 5.3.8). In einer ähnlichen Versuchsreihe mit primären menschlichen Keratinozyten aus der Vorhaut konnten noch höhere Konzentrationen von *atRA* gemessen werden (Mündliche Mitteilung F. Jugert).

Wie in Tab. 18-23 und Abb. 11-16 (Kap. 5) dargestellt, bildete sich in unseren Untersuchungen *atRA* immer als Hauptisomer. Diese Isomerisation könnte auf die physikalische Stabilität von *atRA* zurückzuführen sein, bzw. auf die geringere Stabilität der beiden anderen *cis*-Isomeren. 13-*cis*-RA scheint wiederum das instabilere der beiden RA-Isomere zu sein. Nach 120 Stunden Inkubationszeit im Medium ohne Zellen wurde 3/4 der Ausgangskonzentration zu *atRA*, 9-*cis*-RA und 9,13-*dicis*-RA metabolisiert.

Die Tendenz zu einem definierten Gleichgewicht der *cis*-Isomere scheint eine Grundvoraussetzung für ein stabiles Isomerisations-Muster zu sein.

Es ist bekannt, daß 9-*cis*-RA durch 9-C-Konversion aus *atRA* erzeugt wird (12). In dem darauffolgenden Schritt wird 9-*cis*-RA durch 13-*cis*-Konversion in 9,13-*dicis*-RA umgebaut. Hohe Mengen an 9,13-*dicis*-RA sind ein Hinweis für die Schädigung von Retinsäuren durch Sauerstoff und Licht, die diese Reaktion begünstigen. 9,13-*dicis*-RA wird als inaktives Endprodukt in dieser Kaskade angesehen. In zellfreien Systemen konnten bemerkenswert hohe Konzentrationen gemessen werden. Die Konversion scheint irreversibel zu sein, da sich die Kurvenverläufe von 9,13-*dicis*-RA immer kontinuierlich ansteigend darstellen (s. Abb. 14 und 16).

Die Isomerisation der Retinsäuren in Anwesenheit von HaCaT-Zellen:

Bekanntermaßen bilden *atRA* und 9-*cis*-RA mit den Bindungsproteinen CRABP I und II einen Komplex (s. Kap. 2.3.2). Beide Bindungsproteine sind in der Haut *in vivo* nachweisbar. CRABP I ist in der Epidermis und Dermis in gleich hohen Konzentrationen meßbar. Die Hauptquelle scheint in erster Linie Melanozyten zu sein (165). Die CRABP II Expression ist in der Epidermis dagegen viel höher (174, 177, 178). Zusätzlich kann CRABP II durch *atRA* und seine Analoga induziert werden (5, 52). Die Erkenntnis, daß 13-*cis*-RA nicht mit hoher Affinität an diese Bindungsproteine bindet, legt die Schlußfolgerung nahe, daß 13-*cis*-RA ein Isomer der Retinsäure

ist, welches die Fähigkeit besitzt, in den Nukleus einzudringen, ohne an ein Bindungsprotein gebunden zu sein.

In unseren Versuchsergebnissen konnten wir beobachten, daß der Abbau aller Retinsäuren in Anwesenheit von HaCaT-Zellen langsamer stattfand als in den Versuchsansätzen ohne Zellen. Das Gleichgewicht der Substanzen konnte somit innerhalb von 120 Stunden nicht erreicht werden, wobei sich trotzdem als Hauptisomer *at*RA abzeichnete. Auch *in vivo* isomerisieren 13-*cis*-RA und 9-*cis*-RA zu *at*RA, welches das Hauptisomer darstellt (57).

Im weiteren wurde beobachtet, daß 9-*cis*-RA von HaCaT-Zellen schnell zu 13-*cis*-RA und *at*RA isomerisiert. Dies deutet darauf hin, daß es ein oder mehrere Enzyme (Isomerasen) gibt, die diese Interkonversion innerhalb der drei Isomeren reguliert. Aus 13-*cis*-RA und *at*RA wurden wiederum 4-*oxo*-Metabolite gebildet, die Abbauprodukte der aktiven Hormone sind (12). Untersuchte man die Mengen von 4-Hydroxylierten Metaboliten, die gebildet wurden, wenn nur 9-*cis*-RA als Quelle benutzt wurde (s. Kap. 5.1.11), stellte man fest, daß signifikante Mengen dieser Metabolite gemessen werden konnten. Dies veranschaulicht noch einmal die relative Instabilität dieser Isomere. Der genaue Zusammenhang und die eventuell dazugehörigen Isomerasen, die in unterschiedlichem Maße auf die Isomerisation der Retinsäuren Einfluß nehmen könnten, sind noch nicht bis in alle Einzelheiten erforscht.

Diese Verbindung der einzelnen Retinsäuren könnte jedoch erklären, warum die topische Applikation dieser Substanzen auf der menschlichen Haut die RA-4-Hydroxylase induziert, wobei es keine Rolle spielt, welches Retinsäure-Isomer appliziert wird (214). Auch diese Beobachtung erhärtet den Verdacht, daß es Enzyme gibt, die die Interkonversion der Isoformen in HaCaT-Zellen steuern. Es wurden jedoch schon viele verschiedene Wege des Metabolismus der Retinsäuren beschrieben, und diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß der Metabolismus von der Gewebeart abhängig ist (4, 64, 97, 98, 162, 173).

Unsere Untersuchungen zeigten, daß in HaCaT-Zellen nicht nur 9-*cis*-RA, sondern auch 13-*cis*-RA nach einer bestimmten Zeit zu *at*RA isomerisiert wurden. Diese Reaktionen sind vermutlich reversibel und werden durch die Bindung an Rezeptoren und spezielle Isomerasen kontrolliert (163, 164).

Das Isomerisations-Muster von *at*RA und 9-*cis*-RA in HaCaT-Zellen:

Die Isomerisations-Muster von *at*RA und 9-*cis*-RA sind sehr ähnlich. Nach 120 Stunden Inkubationszeit wurden in beiden Versuchsreihen ohne HaCaT-Zellen je 55% der Ausgangskonzentration umgewandelt (s. Kap. 5.1.6 u. 5.1.10). Die Verteilung stellte sich wie folgt dar: nach *at*RA-Inkubation 2,2 : 1 : 0,8 (*at*RA : 13-*cis*-RA : 9-*cis*-RA); nach 9-*cis*-RA Inkubation

2 : 1 : 0,5 (9-*cis*-RA : *at*RA : 13-*cis*-RA). Wenn dem Medium HaCaT-Zellen zugegeben wurden, betrug der Abbau unter gleichen Versuchsbedingungen weniger als 40 % (s. Kap. 5.1.7 u. 5.1.11). Diese Ergebnisse können durch mehrere Gründe erklärt werden. In Anbetracht der Gegebenheit, daß genau diese beiden Isomere *at*RA und 9-*cis*-RA an CRABPs binden, könnte man vermuten, daß die Bindung an die Bindungsproteine zu einer Konservierung seiner Isomere führt und die Isomerisierung hemmt. Es könnte jedoch auch eine Anlagerung an Rezeptoren sein. *All-trans* RA ist der natürliche Ligand für den RAR-Rezeptor (65, 145) und 9-*cis*-RA Ligand für den RXR-Rezeptor (102, 162). RAR kann sowohl *at*RA als auch 9-*cis*-RA binden (110), wobei *at*RA jedoch eine viel höhere Affinität aufweist (57).

Betrachtet man hingegen die *at*RA-Metabolisierung, wenn zuerst Retinal den Zellen zugeführt wurde (s. Kap. 5.1.4), konnte keine Hemmung der Isomerisierung oder Katabolisierung beobachtet werden. *All-trans*-RA, das nach 24 Stunden mit 72 % in HaCaT-Zellen vorhanden war, wurde innerhalb der nächsten 96 Stunden fast vollständig in andere Retinoide, hauptsächlich 4-*oxo*-Metabolite und Retinole, umgewandelt (s. Abb. 8). Dies läßt darauf schließen, daß *at*RA hier ungebunden vorliegt. Ferner hat die Aufnahme des Retinals in die Zelle und die Dehydrogenierung wahrscheinlich eine Induktion von Enzymen zur Folge, die die weitere Verstoffwechselung der Retinsäuren katalysiert. Werden die HaCaT-Zellen direkt mit *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA inkubiert, scheinen einerseits die Enzyminduktion geringer zu sein, andererseits die Retinsäuren schneller an CRABP I und II gebunden zu werden, wodurch die Isomerisation gehemmt wird.

Die beschriebenen Bindungsproteine CRABP I und CRABP II konnten in HaCaT-Zellen mit einer relativ hohen Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 21 und 22). In hypothetischen Annahmen wird davon ausgegangen, daß es Aufgabe dieser Bindungsproteine sei, Retinsäuren in Zellen festzuhalten, die nicht selbst in der Lage sind, diese zu synthetisieren (162). CRABP I ist primär für die Isomerisierung von Retinsäuren verantwortlich, wobei CRABP II seine Hauptfunktion in der RA-Synthese und Sekretion besitzt.

Die aktiven Hormone werden im weiteren Verlauf der Metabolisierungskaskade der Retinoide zu 4-*oxo*-Metaboliten abgebaut, die nur noch eine geringe biologische Aktivität und keine nennenswerte Rückreaktion zu den aktiven RA-Isomeren aufweisen.

Die 4-Hydroxylierung von *at*RA und 13-*cis*-RA:

Die beiden Isomere der 4-*oxo*-Retinsäuren, 4-*oxo*-RA und 4-*oxo*-13-*cis*-RA, können aus ihren vorhergehenden Retinsäuren, *at*RA und 13-*cis*-RA synthetisiert werden. Die These, daß 4-*oxo*-RA direkt aus *at*RA und 4-*oxo*-13-*cis*-RA aus 13-*cis*-RA umgewandelt wird (163, 164), konnte in unseren Versuchsreihen nicht bestätigt werden.

13-*cis*-RA zeigte sich im reinen Medium ohne Zellen als sehr instabil. Bis *dato* wurden für 13-*cis*-RA noch keine Rezeptoren oder Bindungsproteine gefunden, die in der Lage sind, dieses Isomer zu stabilisieren. In unseren Versuchsreihen wurde aus 13-*cis*-RA im Vergleich zu *at*RA oder 9-*cis*-RA in Gegenwart von HaCaT-Zellen die größte Menge an 4-hydroxylierten Metaboliten gebildet. 13-*cis*-RA kann somit als Hauptquelle der 4-Hydroxy-Retinsäuren bezeichnet werden (s. Kap. 5.1.9). Die 4-*oxo*-Metabolite 4-*oxo-at*RA und 4-*oxo*-13-*cis*-RA stellten nach 120 Stunden mehr als 1/4 der Gesamtkonzentration aller Retinoide dar. Wir konnten sehen, daß als Hauptprodukt 4-*oxo-at*RA gebildet wurde. Die Konzentration von 4-*oxo-at*RA war dreifach höher als die von 4-*oxo*-13-*cis*-RA (s. Tab. 21; Abb. 14). *All-trans* RA war nur mit 9 % und 9-*cis*-RA mit 2 % nachweisbar. Auf Grund dieser geringen Konzentrationen ist zu vermuten, daß die Hydroxylierung von 13-*cis*-RA zu den genannten 4-*oxo*-Metaboliten offensichtlich in HaCaT-Zellen so schnell stattfand, daß die anderen Retinsäuren kaum isomerisiert werden konnten.

Wurde hingegen *at*RA den HaCaT-Zellen zugeführt, bildeten sich einerseits viel geringere Mengen von 4-*oxo*-Metaboliten, andererseits wurde aber verhältnismäßig mehr 4-*oxo*-13-*cis*-RA gebildet als 4-*oxo-at*RA (s. Tab. 19 u. Abb. 12). In diesem Fall könnte vermutet werden, daß *at*RA schneller in das instabile 13-*cis*-RA isomerisiert und in der Folge dann zu 4-*oxo*-13-*cis*-RA abgebaut wird, als daß es direkt zu 4-*oxo-at*RA metabolisiert werden kann. Ein anderer Erklärungsversuch wäre, daß 4-*oxo-at*RA und 4-*oxo*-13-*cis*-RA oder die Vorstufen 4-OH-RA und 4-OH-13-*cis*-RA auf die gleiche Weise isomerisieren, wie es bei *at*RA und 13-*cis*-RA zu beobachten ist.

Wie zu erkennen ist, weist das Wissen um den genauen Ablauf der Hydroxylierung der Retinsäuren und den oxidativen Abbau heute noch große Lücken auf. Die Inaktivierung der aktiven Retinoid-Hormone und die Exkretion der Abbauprodukte aus den HaCaT-Zellen, die wichtige Punkte in der Retinoidkaskade darstellen, bedürfen in Zukunft noch näheren Untersuchungen.

Die 4-Hydroxylase:

In menschlicher Haut ist der Hauptmetabolisierungsweg von *at*RA und 13-*cis*-RA die 4-Hydroxylierung. Die beiden genannten Retinsäuren werden mit Hilfe von RA-4-Hydroxylasen zu 4-Hydroxy-Retinsäuren umgewandelt, die wiederum durch spontane Oxidation in 4-*oxo*-Retinsäuren abgebaut werden. Die 4-Hydroxylierung von *at*RA wird primär von einem Mitglied der Cytochrom P450 Familie (CYP26) katalysiert (181, 154, 215), das aber 9-*cis*-RA oder 13-*cis*-RA nicht hydroxyliert. Die Hauptmetabolite von CYP26 in menschlichen Zellen sind 4-Hydroxy-RA (162), 18-*oxo*-RA, 4-*oxo*-RA (154, 215) und 5,8-*epoxy*-RA (62).

In HaCaT-Zellen führte die Zugabe von *atRA* zur sofortigen Induktion von CYP26. Eine hohe Aktivität dieses Enzyms konnte gemessen werden (111). Der damit verbundene schnelle Anstieg des mRNA-Niveaus normalisierte sich jedoch, wenn *atRA* nicht mehr zugegeben wurde, schon nach 48 Stunden (111).

Ein weiteres Enzym, das CYP1A1, welches auch an der katalytischen Oxidierung von Retinsäuren zu seinen 4-*oxo*-Metaboliten beteiligt ist (105, 159, 181), konnte auch in unseren Versuchsreihen nachgewiesen werden.

Der Einfluß von *atRA* als aktives Hormon auf die HaCaT-Zellen wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Es wurde beschrieben, daß *atRA* die Transkription von desmosomalem-Cadherin unterdrückt. Eine kontinuierliche RA-Behandlung inhibierte sogar die Differenzierung der HaCaT-Keratinocyten (211). Im weiteren wurde beobachtet, daß *atRA* einen Wachstumsstop vermitteln konnte, indem die Retinsäure mit dem bipolaren Spindelapparat während der Mitose interagiert (83). Auf genetischer Ebene konnte festgestellt werden, daß eine anhaltende Behandlung von HaCaT-Zellen mit *atRA* sowohl zu einer Unterdrückung von AP-2, das an der Genregulation beteiligt ist, als auch zu einer Erniedrigung der Transkription von Keratin 4, ein Marker für die Differenzierung in HaCaT-Keratinocyten (209) und des Aryl Hydrocarbon Rezeptors (AHR; s. Kap. 2.6.4.1) führte (210). Die Expression des AHR-Rezeptors konnte in unseren Versuchsreihen nicht nachgewiesen werden. Wurden die HaCaT-Zellen hingegen unter natürlichen Bedingungen gezüchtet, wurde AHR in dieser Zelllinie nachgewiesen (209, 210). Die Behandlung von HaCaT-Zellen mit Retinoiden während des Wachstums führte wahrscheinlich zu einer so starken Herabsetzung des mRNA-Niveaus, daß es sich unter der Nachweisgrenze befand. Die diskutierten Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die Expression von AHR vom Differenzierungszustand der Zellen abhängt und durch *atRA* beeinflusst wird (211).

Der schnelle Abbau von Retinsäuren kann somit als ein Schutzmechanismus der HaCaT-Zellen verstanden werden, der Zellschäden auf Grund zu hoher *atRA*-Konzentrationen vorbeugt.

In bestimmten medizinischen Behandlungsmethoden sind jedoch gerade hohe Konzentrationen notwendig, um einen Therapieerfolg zu bewirken. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei die Verhinderung des zu schnellen Abbaus der aktiven Hormone. Deshalb wird nach Stoffen geforscht, die den zu schnellen Abbau verhindern. Neu entwickelte, synthetisierte Derivate mit RAR- oder RXR-Bindungskapazität erwiesen sich im Modellversuch sowie in Phase-I- und Phase-II-Studien den natürlichen Retinsäuren eindeutig unterlegen (140). Die Addition des Azolderivates Liarasol hingegen als ein Inhibitor der 4-Retinsäure-Hydroxylase (CYP26), um die Verstoffwechselung der Retinsäuren in *Oxo*-Retinoide zu hemmen, erwies sich als eine effizientere Methode und wird medizinisch schon erfolgreich angewandt. Die Wirkung der aktiven Hormone wird durch die Addition von Liarasol nicht beeinträchtigt (61).

Die Retinoidkaskade in primären humanen Keratinozyten

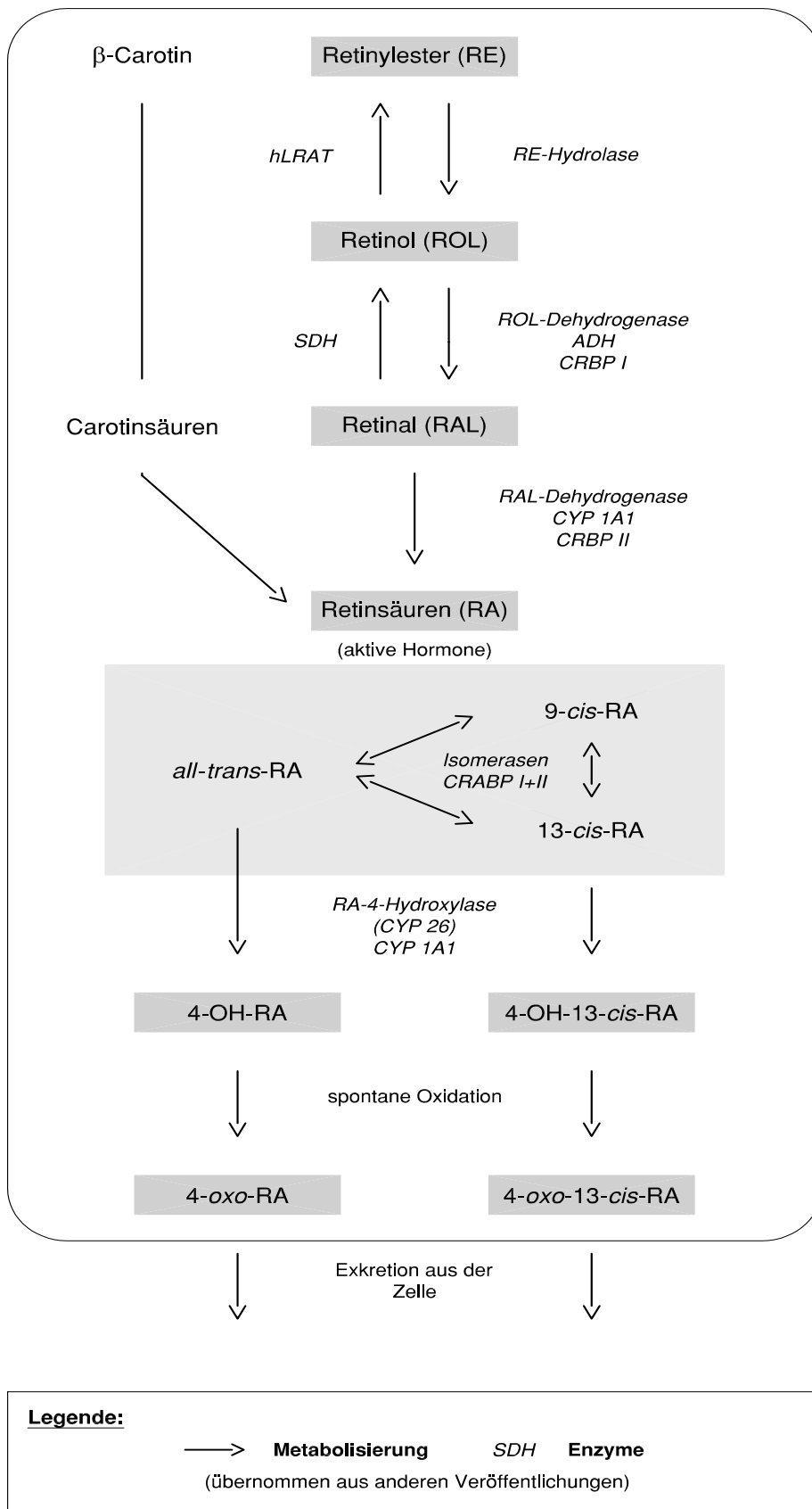


Abbildung 24: Die Retinoidkaskade in primären humanen Keratinozyten

Die Retinoidkaskade in HaCaT-Zellen

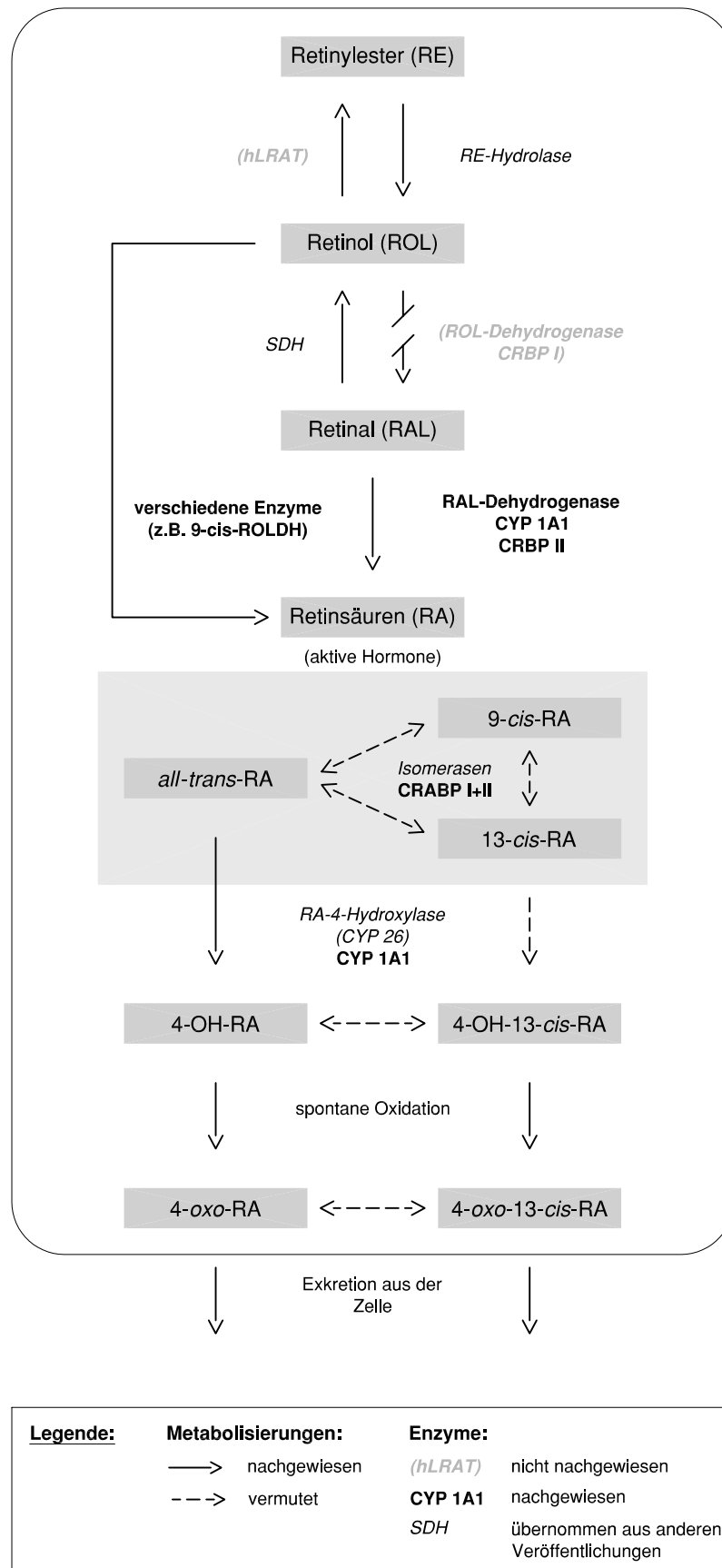


Abbildung 25: Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen

8 Zusammenfassung

Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen

Der Metabolismus von Retinoiden wurde in der Keratinozyten ähnlichen Zelllinie, den HaCaT-Zellen, umfassend und detailliert untersucht. Verwendet wurde eine hoch sensitive RP-HPLC-Methode, und die Expression der beteiligten Enzyme wurde mittels RT-PCR überprüft.

Es konnten folgende Ergebnisse in Bezug auf die Fragestellungen (s. Kapitel 4.2) ermittelt werden:

1. HaCaT-Zellen können Retinol nicht zu Retinal oxidieren, wie dies in primären menschlichen Keratinozyten mittels ROLDH der Fall ist (11, 25, 46, 93, 94, 194).

Die Beobachtung unserer Versuchsreihe impliziert jedoch einen Metabolisierungsweg von Retinol zu Retinsäure, ohne daß der Intermediärmetabolit Retinal nachweisbar war. Mögliche Umgehungswege durch die Enzyme 9-*cis*-ROLDH oder 13-*cis*-RALDH werden diskutiert (116, 160). Eine 9-*cis*-ROLDH konnte in HaCaT-Zellen mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

2. Die Retinol Dehydrogenase (ROLDH), die die Oxidation von Retinol zu Retinal in primären humanen Keratinozyten katalysiert (11, 25, 93), konnte in HaCaT-Zellen mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden.

Die Retinal Dehydrogenase (RALDH), die die Dehydrogenierung von Retinal zu *at*RA katalysiert (46), konnte jedoch in HaCaT-Zellen mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

3. Obwohl HaCaT-Zellen Retinol nicht zu Retinal oxidieren können, ist nach der Zugabe von Retinal die Reduktion von Retinal zu Retinol, wie in primären menschlichen Keratinozyten, auch in HaCaT-Zellen nachweisbar.

Außerdem wurde Retinal von den HaCaT-Zellen effizient zu *at*RA metabolisiert. Diese Reaktion erwies sich als irreversibel.

Nach Inkubation von HaCaT-Zellen mit den Retinsäuren *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA, konnte in Anwesenheit von HaCaT-Zellen eine deutlich verlangsamte Metabolisierung der Retinsäuren, im Vergleich zu unseren Versuchsreihen ohne Zellen, nachgewiesen werden.

4. In Medien ohne HaCaT-Zellen bildeten die Retinsäuren *at*RA, 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA ein Isomerisationsgleichgewicht, in welchem sich *at*RA als Hauptisomer zeigte. Die Tendenz zu einem definierten Gleichgewicht der *cis*-Isomere scheint eine Grundvoraussetzung für ein stabiles Isomerisations-Muster zu sein.
5. Eine mRNA-Induktion des Bindungsproteins CRBP I, dessen primäre Funktion einerseits die Aufnahme von Retinol in die Zelle ist und in primären humanen Keratinozyten notwendiger Ligand ist, um Retinol der ROLDH zu präsentieren (122, 124, 125), konnte in HaCaT-Zellen mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden. CRBP II hingegen war in den Zellen exprimiert.
Die Bindungsproteine CRABP I und CRABP II, deren Funktionen die Isomerisierung und der kontrollierte Abbau der Retinsäuren sind (38, 129), konnten in HaCaT-Zellen mittels RT-PCR nachgewiesen werden.
6. Die These, daß 4-*oxo*-RA direkt aus *at*RA und 4-*oxo*-13-*cis*-RA aus 13-*cis*-RA umgewandelt wird (163, 164), konnte in unseren Versuchsreihen nicht bestätigt werden. Bei der Inkubation von HaCaT-Zellen mit *at*RA wurde sogar mehr 4-*oxo*-13-*cis*-RA als 4-*oxo*-*at*RA gebildet, und bei der Inkubation mit 13-*cis*-RA konnte als Hauptabbauprodukt 4-*oxo*-*at*RA nachgewiesen werden. Die Hydroxylierung und Oxidation von *at*RA und 13-*cis*-RA zu den entsprechenden 4-*oxo*-Metaboliten fanden somit nach unseren Beobachtungen nicht in zwei getrennten Katalysewegen statt. Dies legte die Vermutung weiterer Umwandlungsmöglichkeiten nahe, die bis *dato* noch nicht beschrieben wurden.
7. Eine mRNA-Induktion der Cytochrome 1A1 und 1A2 konnte in HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Retinoiden mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

Auf Grund der vorliegenden Daten konnte nachgewiesen werden, daß die Metabolisierung von Retinol in HaCaT-Zellen im Vergleich zu menschlichen Keratinozyten Gemeinsamkeiten, wie auch relevante Unterschiede aufweist. Die auffälligste Beobachtung dieser Arbeit war die Tatsache, daß Retinol von HaCaT-Zellen nicht zu Retinal oxidiert werden kann. Die mit Hilfe von HaCaT-Zellen gewonnenen Ergebnisse dürfen daher nur mit Vorsicht auf menschliche Keratinozyten übertragen werden.

Da HaCaT-Zellen eine anerkannte und in vielen wissenschaftlichen Studien verwendete Zelllinie darstellen, sind die hier vorgestellten Ergebnisse für diese Versuchsreihen von großem Interesse. Das Wissen um die genaue Metabolisierung von Retinoiden und ihre Einflüsse auf die HaCaT-Zellen beeinflußt die Arbeit mit dieser Zelllinie grundlegend und kann beispielsweise die Suche nach effizienteren Behandlungsmöglichkeiten in der Therapie mit Retinoidpräparaten erleichtern.

9 Literatur

1. Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P and Levin AA (1993) Retinoic acid receptors and retinoid x receptors: Interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:30-34.
2. Ambion's (2001) Use of Internal and External Standards of Reference RNAs for Accurate Quantitation of RNA Levels. *Catalog*; Page **151**
3. Ang HL, Deltour L, Hayamizu TF, Zgombic-Knight M and Duester G (1996) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J Biol Chem* **271**:9526-9534.
4. Arnhold T, Tzimas G, Wittfoht W, Plonait S and Nau H (1996) Identification of 9-*cis*-retinoic acid, 9,13-di-*cis*-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-retro-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sci* **59**:169-177.
5. Astrom A, Tavakkol A, Petersson U, Cromie M, Elder JT and Voorhees JJ (1991) Molecular cloning of two human cellular retinoic acid binding proteins (CRABP): Retinoic acid induced expression of CRABP II but not CRABP I in adult human skin in vivo and skin fibroblasts in vitro. *J Biol Chem* **266**:17662-17666.
6. Baer R (1962) Untersuchungen über die Wirkung von Vitamin-A-Säure. *Dermatologica* **124**:192-195.
7. Benitez J, Ramos SI, Herraiz Agand Callillo JA (1998) Effects of caffeine withdrawal from the diet on the metabolism of clozapine in schizophrenic patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **18**:311-316.
8. Berkovitz BK *et al.* (2001) The distribution of retinaldehyde dehydrogenase-2 in rat and human orodental tissues. *Arch Oral Biol* **46(12)**:1099-1104.
9. Bhat PV (1988) Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in Vitamin A deficiency. *FEBS Lett.* **426(2)**:260-262.
10. Biesalski HK und Grimm P (1999) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
11. Blaner WS and Olson JA (1994) Retinol and retinoic acid metabolism, in *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine* (Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS eds) ed **2**, pp 229-255, Raven Press, New York.

12. **Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T and Norum KR** (1991) Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* **71**:951-990.
13. **Blomhoff R** (1994) *Vitamin A in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York.
14. **Boerman MHEM and Napoli JL** (1995) Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase: A short-chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that interacts with holo-CRBP (type I). *Biochemistry* **34**:7027-7037.
15. **Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A and Fusenig NE** (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* **106**:761-771.
16. **Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hulsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE** (1997) Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* **19**:201-214.
17. **Breitkreutz D, Boukamp P, Ryle C, Stark H-J, Roop D, Fusenig N** (1991) Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. *Cancer Res* **51**:4402-4409.
18. **Breitkreutz D, Stark HJ, Plein P, Baur M, Fusenig NE** (1993) Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca^{2+} . *Differentiation* **54**:201-217.
19. **Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ und Fusenig NE** (1998) Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *European Journal of Cell Biology* **75**:1-14.
20. **Buck J, Derguini F, Levi E, Nakanishi K and Hammerling U** (1991) Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-retro-retinol. *Science (Wash. DC)* **254**:1654-1656.
21. **Chai X, Boerman MHEM, Zhai Y und Napoli JL** (1995), *J Biol Chem* **270**:3900-3904.
22. **Chai X, Zhai Y, Popescu G and Napoli JL** (1995) Cloning of a second retinol dehydrogenase type II. *J Biol. Chem.* **270** (47):28408.
23. **Chambon P** (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10**:940-954.

24. **Chandraratna RA.** (1996) Tazarotene- first of a new generation of receptor-selective retinoids. *Br J Dermatol.* **230(49):** 18-25.
25. **Chen H, Namkung MJ and Juchau MR** (1995) Biotransformation of all-trans retinol and all-trans retinal to all-trans retinoic acid in rat conceptual homogenates. *Biochem Pharmacol* **50:**1257-1264.
26. **Chen M, Achkar C and Gudas LJ** (1994) Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Mol Pharmacol* **46:**88-96.
27. **Chen P, Lee TD, Fong HK.** (2001) Interaction of 11-cis-retinol dehydrogenase with the chromophore of retinal g protein-coupled receptor opsin. *J Biol Chem* **276(24):**21098-104.
28. **Chen S, Darling IM, Yu KL, Starrett JE Jr, Mansuri MM, Whiting G and Tramposch KM** (1995) In vivo activity of retinoid esters in skin is related to in vitro hydrolysis rate. *J Pharm Pharmacol* **47:**626-631.
29. **Chien A , Edgar DB and Treal JM** (1976) Taq Polymerase. *J Bacteriol* **127:**1550-15557.
30. **de Klerk NH, Beilby J, Hobbs MST, Musk AW, Ambrosini GL, Eccles JL, Hansen J, Olsen N, Watts VL, Lund HG and Pang SC** (1998) Vitamin A and cancer prevention II: comparison of the effects of retinol and beta-carotene. *International Journal of Cancer* **75:**362-367.
31. **de Klerk NH and Musk AW** (1998) Silica, compensated silicosis, and lung cancer in Western Australian goldminers. *Occupational and Environmental Medicine* **55:**243-248.
32. **Dew SE and Ong DE** (1995) Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry* **321:**434-441.
33. **DGE;** Deutsch Gesellschaft für Ernährung: www.de-ge-ge.de/Studien/ms.htm-14k.
34. **Dickman ED, Thaller C, Smith SM** (1997) Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neutral crest ocular and nervous system defects. *Development* **124:**3111-3121.
35. **Dictionary of Medicine**(2000) Food and Nutrition, Oxford University.
36. **Didierjean L, Carraux P, Grand D, Sass JO, Nau H and Saurat JH** (1996) Topical retinaldehyde increases skin content of retinoic acid and exerts biological activity in mouse skin. *J Invest Dermatol* **107:**714-719.

37. **Diffenbach C, SenGupta D, Krause D, Sawzak D und Silverman R** (1988) Cloning of murine gelsolin and its regulation during differentiation of embryonal Carcinoma Cells *J Biol Chem* **264**:13281-13288.
38. **Donovan M, Olofsson B, Gustafson AL, Dencker L and Eriksson U** (1995) The cellular retinoic acid binding proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**:459-465.
39. **Dowling JE and Wald G** (1960) The role of vitamin A acid. *Vitam Horm* **18**:514-541.
40. **Dowling JE and Schmitt EA** (1994) Early eye morphogenesis in the zebrafish; *J Comp Neurol* **344**:532-542.
41. **Drummond JC** (1920) Nomenclature of the so-called accessory food factors (vitamins). *Biochem J* **14**:660-661.
42. **Duell EA, Astrom A, Griffith CEM, Chambon P and Voorhees J** (1992) 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. *J Clin Invest* **90**:1269-1272.
43. **Duell EA, Astrom A, Kang S, Griffith CEM and Voorhees J** (1994) All-trans, 9-cis and 13-cis retinoic acid each induce a cytochrome P450 4-hydroxylase which causes all-trans but not 9-cis retinoic acid to self metabolize [abstract]. *J Invest Dermatol* **102**:641.
44. **Duell EA, Derguini F, Kang S, Elder JT and Voorhees JJ** (1996) Extraction of human epidermis treated with retinol yields retro retinoids in addition to free retinol and retinyl esters. *J Invest Dermatol* **107**:178-182.
45. **Duester G, Ang HL, Deltour L, Foglio MH, Hayamizu TF and Zgombic-Knight M** (1995) Class I and class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene expression in mouse embryos. *Adv Exp Med Biol* **372**:301-313.
46. **Duester G** (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**:12221-12227.
47. **Duester G et al.** (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: Production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry* **267**(14):4315-4324.

48. **Dummer R, Häffner AC, Hess M and Burg G** (1996) A retinol approach to the therapy of cutaneous T-cell lymphomas. *Onkologie* **19**:226-230.
49. **Eckhoff C and Nau H** (1990) Identification and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxo-retinoic acid in human plasma. *J Lipid Res* **31**:1145-1154.
50. **Edisbury JR, Morton RA and Simikins GW** (1937) London. *Nature* **140**:124.
51. **El Akawi Z and Napoli JL** (1994) Rat liver cytosolic dehydrogenase: Comparison of 13-cis-, 9-cis- and all-trans-retinal as substrates and effects of cellular retinoid-binding proteins and retinoic acid on activity. *Biochemistry* **33**:1938-1943.
52. **Elder JT, Astrom A, Petersson U, Tavakkol A, Griffith CE, Krust A, Kastner P, Chambon P and Voorhees JJ** (1992) Differential regulation of retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J Invest Dermatol* **100**:356-359.
53. **Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Sheikh MS, Kim G-Y, Fornace JA, Lee KS und Gonzales FJ** (2000) Altered cell cycle control at the G2/M Phases in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Embryo Fibroblast. *Mol Pharm* **57** (5):1056-1063.
54. **Farrar et al.**, (1952); Syntheses of Vitamin A 3,4 Didehydroretinol
<http://www.dcnutrition.com/vitamins/Detail.CFM?RecordNumber=90>.
55. **Fisher GJ, Esmann J, Griffith CEM, Talwar HS, Duell EA, Hammerberg C, Elder JT, Karabin GD, Nickoloff BJ, Cooper KD and Voorhees JJ** (1991) Cellular, immunologic, and biochemical characterization of topical retinoic acid-treated human skin. *J Invest Dermatol* **96**:699-707.
56. **Fisher GJ and Voorhees JJ** (1996) Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J* **10**:1002-1013.
57. **Fisher GJ, Datta SC and Voorhees JJ** (1998) Retinoid acid receptor-γ in human epidermis preferentially traps all-trans retinoic acid as its ligand rather than 9-cis retinoic acid. *J Invest Dermatol* **110**:297-300.
58. **Folkers G**; *Thesis* 1997 Struktur und Funktion of Retinoic Acid Receptors.
59. **Frolik CA, Roberts AB, Tavel TE, Roller PP, Newton DL and Sporn MB** (1979) Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxo-retinoic acid: In vitro metabolism of all-trans retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry* **18**:2092-2097.
60. **Fuchs E, Green H** (1981) Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* **25**: 617-625.

61. **Fülgraff G und Palm D** (1997) Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie **10**. Auflage, Gustav Fischer Verlag.
62. **Fujii H, Sato T, Kaneko S, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y, Osawa K, Kato S and Hamada H** (1997) Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P-450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J* **16**:4163-4173.
63. **Fusenig** unveröffentlichte Ergebnisse : www.dkfz-heidelberg.de/presse/pressemitteilung/pm00-46.htm-6k.
64. **Genchi G, Wang W, Barua A, Bidlack WR and Olson JA** (1996) Formation of beta-glucuronides and of beta-galacturonides of various retinoids catalyzed by induced and noninduced microsomal UDP-glucuronosyltransferases of rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1289**:284-290.
65. **Giguere V, Ong ES, Segui P and Evans RM** (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**:624-629.
66. **Giguere V** (1994) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: Complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* **52**:32-44.
67. **Goda T** (1999) Symposium in 8th Asian Congress of Nutrition, Seoul, Korea; Role of Nutrients in the regulation of gene expression in the small intestine.
68. **Gonzales FJ and Fernandez-Salguero P** (1998) The Aryl Hydrocarbon Receptor *DMD Abstracts* Vol. **26**, Issue **12**, 1194-1198.
69. **Gonzales MV, Alvarez V and Pello MF** (1998) Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1 and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer; *J Clin Pathol* **51**:294-298.
70. **Gronemeyer H and Laudet V** (1996) Transcription factors 3: Nuclear receptors, in *Protein Profile*, Vol. **2**, Academic Press, New York.
71. **Haeseleer F, Huang J, Lebioda L, Saari JC und Palczewski K** (1998)
Homo sapiens Retinal short-chain dehydrogenase/reductase retSDR1
Titel: Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *J Biol Chem* **273 (34)**:21790-21799.
72. **Healy E and Simpson N** (1994) Acne Vulgaris; *Br Med J* **308**:831-833.
73. **Herr** (1999) Differential Mechanisms of Retinoid Transfer from Cellular Retinoid Binding Proteins Types I and II Phospholipid Membranes. *J Mol Biol* **286**:1179-1195.

74. **Heuvent JV** (2001) Interactive web-based recourses. Basic mechanism of action of PPAR and effects on gene expression. *BioCarta*.
75. **Hoffmann W, Bamberg M, Rodemann HP** (1994) Antiproliferative effects of ionizing radiation, all-trans-RA and interferon-Alpha on cultured human squamous cell carcinomas. *Radiat Oncol Invest* **2**:1219.
76. **Horst RL, Reinhardt TA, Goff JP, Nonnecke BJ, Gambhir VK, Fiorella PD and Napoli JL** (1995) Identification of 9,13-cis-retinoic acid as a major circulating retinoid in human plasma. *Biochemistry* **34**:1203-1209.
77. **Inghirami G, Grignani F, Sternas L, Lombardi L, Knowles D, Dalla-Favera R** (1990) Down-Regulation of LFA-1 Adhesion Receptors by C-myc Oncogene in Human B Lymphoblastoid. *Celle Scienc* **250**:682-685.
78. **Jones TA** (Latest update at 5 February 2001) Biomedical Center, Uppsala Sweden II **1.2.1**
Research interests: Retinoid proteins; <http://xray.bmc.uu.se/>
79. **Jugert FK, Agarwal R, Kuhn A, Bickers DR, Merk HF and Mukhtar H** (1994) Multiple cytochrome P450 isoenzymes in murine skin: Induction of P450 IA, 2 β , 2E and 3A by dexamethasone. *J Invest Dermatol* **102**:970-975.
80. **Jugert FK, Notzon I and Merk HF** (1996) Cytochrome P450 dependent metabolism of retinoic acid in cultured human keratinocytes [abstract]. *J Invest Dermatol* **107**:453.
81. **Julia P, Farres J and Pares X.** (1986) Ocular alcohol dehydrogenase in the rat; regional distribution and kinetics of the ADH-1 isoenzyme with retinol and retinal. *Exp Eye Res* **42**:305-314.
82. **Jurukovski V et al.** (1999) Cloning and characterization of retinol dehydrogenase transcripts expressed in human epidermal keratinocytes. *Mol Gent Metab* **67(1)**: 62-73.
83. **Kaiser A, Brembeck FH, Nicke B, Wiedenmann B, Riecken EO, Roeswicz S** (1999) All-trans retinoic acid-mediated growth inhibition involves inhibition of human kinesin-related protein HsEg5.
84. **Kakkad B, Ong DE and Mac Donald PN** (1987) Acety-CoA-independent esterification of retinol bound to a cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J Biol Chem* **262**:2729-2736.
85. **Kalinke D-U, Dummer R and Burg G** (1996) Management of cutaneous T-cell Lymphoma. *Curr Opinion Dermatol* **3**:71-76.

86. **Kang S, Duell EA, Fisher GJ, Datta SC, Wang ZQ, Reddy AP, Tavakkol A, Yi JY, Griffith CEM, Elder JT and Voorhees JJ** (1995) Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding protein characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation.
J Invest Dermatol **105**:549-556.
87. **Kappeler T** (1996) Therapie der Akne, *Pharma-Kritik*, Jahrgang 17, Nr **13**.
88. **Karlsson T, Rollman O, Vahlquist A, Törmä H**. Altered expression pattern of retinoid receptors RAR α , RAR γ and RXR α in psoriatic lesions versus non-lesional and normal skin. (*Manuscript*).
89. **Karlsson T, Virtanen M, Sirsjö A, Rollman O, Vahlquist A, Törmä H**. (2002) Topical retinoic acid alters the expression of cellular retinoic acid-binding protein-I and cellular retinoic acid-binding protein II in non-lesional but not lesional psoriatic skin. *Exp Dermatol* **11(2)**: 143-152.
90. **Karlsson T**. (2002) Studies on Vitamin A Signaling in Psoriasis. University of Uppsala. *Comprehensive Sammaries of Dissertations* **1155**. 63 pp. Uppsala. ISBN 91-554-5317-1.
91. **Kary Mullis** (1990) The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction.
Scientific-American **262**:56-65.
92. **Kedishvili NY, Bosron WF, Stone CL, Hurley TD, Peggs CF, Thomasson HR, Popov KM, Carr LG, Edenberg HJ and Li T-K** (1995) Expression and kinetic characterization of recombinant human stomach alcohol dehydrogenase. Active-site amino acid sequence explains substrate specificity compared to liver isoenzymes.
J Biol Chem **270**:3625-3630.
93. **Kim CI, Leo MA and Lieber CS** (1992) Retinol forms retinoic acid via retinal.
Arch Biochem Biophys **294**:388-393.
94. **Kinoshita T, Imamura J, Hagai H und Shinotohna K** (1992) Quantification of Gene Expression over a wide range by Polymerase Chain Reaction.
Analytical Biochem **206**:231-235.
95. **Kliwer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JF, Watson MA, Jones ST and Lehmann JM** (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**:73-82.

96. Kojima R, Fujimori T, Kiyota N, Toriya Y, Fukuda T, Ohashi T, Sato T, Yoshizawa Y, Takeyama K and Mano H (1994) In vivo isomerization of retinoic acids. Rapid isomer exchange and gene expression. *J Biol Chem* **269**:32700-32707.
97. Kraft JC, Schuh T, Juicau M and Kimelman D (1994) The retinoid X receptor ligand, 9-*cis*-retinoic acid, is a potential regulator of early *Xenopus* development. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:3067-3071.
98. Krinsky NI, Wang XD, Tang G and Russel RM (1993) Mechanism of carotenoid cleavage to retinoids. *Ann NY Acad Sci* **691**:167-176.
99. Kurlandsky SB, Duell EA, Kang S, Voorhees JJ and Fisher GJ (1996) Autoregulation of retinoic acid biosynthesis through regulation of retinol esterification in human keratinocytes. *J Biol Chem* **271**:15346-15352.
100. Kurlandsky SB, Xiao JH, Duell EA, Voorhees JJ and Fisher GJ (1994) Biological activity of all-trans retinol requires metabolic conversion to all-trans retinoic acid and is mediated through activation of nuclear retinoid receptors in human keratinocytes. *J Biol Chem* **269**:32821-32827.
101. Labrecque J, Dumas F, Lacroix A and Bhat PV (1995) A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and all-trans retinoic acid. *Biochem J* **305**:681-684.
102. Lansink M, Van Bennekum AM, Blaner WS and Kooistra T (1997) Differences in metabolism and isomerization of all-*trans*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid between human endothelial cells and hepatocytes. *Eur J Biochem* **247**:596-604.
103. Lehmann PA and Malany AM (1989) Evidence for percutaneous absorption of isotretinoin from the photoisomerization of topical tretinoin. *J Invest Dermatol* **93**:595-599.
104. Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen G, Rosenberger M, Lovey A and Grippo JF (1992) 9-*cis* Retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* **355**:359-361.
105. Li XY, Astrom A, Duell EA, Quin L, Griffiths CEM and Voorhees JJ (1995) Retinoic acid antagonizes basal as well as coal tar and glucocorticoid-induced cytochrome P4501A1 expression in human skin. *Carcinogenesis* **16**:519-524.
106. Livrea MA (2000) Vitamin A and retinoids: an update of biological aspects and clinical applications; *Molecular and cell biology updates* **XI** Bosten.

107. **Luca de LM.** Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia (1991) *FASEB J* **5**:2924-2933.
108. **MacDonald PN and Ong DE** (1988) Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J Biol Chem* **263**:12478-12482.
109. **Mangelsdorf DJ, Umesono K and Evans RM** (1994) The retinoid receptors, in *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS eds) 2nd ed, pp 319-350, Raven Press, New York.
110. **Mangelsdorf DJ and Evans RM.** (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**:41-850.
111. **Marikar Y, Wang Z, Duell EA, Petkovich M, Voorhees JJ, Fisher GJ** (1998) Retinoic acid receptor regulate expression of retinoic acid 4-hydroxylase that specifically inactivates all-trans retinoic acid in human keratinocyte HaCaT cells. *J Invest. Dermatol* **111**(3): 34-439.
112. **Mark M, Ghyselinck NB, Wendling D, Dupe v, Marcerez B, Kastner P, Chambon P.** (1999) A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. *Proc Nutr Soc* **58**:609-613.
113. **Martini R and Murray M** (1993) Participation of P450 3A enzymes in rat hepatic microsomal retinoic acid 4-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* **303**:57-66.
114. **Mc Caffery P and Drager UC** (1994) Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:7194-7197.
115. **Mc Caffery P and Drager UC** (1995) Retinoic acid synthesizing enzymes in the embryonic and adult vertebrate. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, edited by H. Weiner, D.W. Crabb, and T. G. Flynn. *New York: Plenum*, p. **173-184**.
116. **Mertz JR, Shang E, Piantedosi R, Wei S, Wolfgemuth DJ and Blaner WS** (1997) Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-*cis*-retinol oxidation: a possible role in 9-*cis*-retinoic acid formation. *J Biol Chem* **272**:11744-11749.
117. **Mezey E and Holt PR** (1971) The inhibitory effect of ethanol on retinol oxidation by human liver and cattle retina. *Exp Mol Pathol* **15**:148-156.
118. **Morriss-Kay GM, Sokolova N.** (1996) Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* **10**: 961-968.

119. Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Nayeem SM, Mc Caffery Y P, Drager UC and Rosenthal N (1998) Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol* **199**:55-71.
120. Nährstoffe (2000) *Biotics Research Corporation*.
121. Nadin L and Murray M (1996) All-trans retinoic acid 4-hydroxylation in human liver microsomes: In vitro modulation by therapeutic retinoids. *Br J Clin Pharmacol* **41**:609-612.
122. Napoli JL (1993) Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J Nutr* **123**:362-366.
123. Napoli JL, Boerman MHEM, Chai X, Zhai Y and Fiorella PD (1995) Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**:497-502.
124. Napoli JL (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* **10**:993-1001.
125. Napoli JL (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* **10**:993-1001.
126. Napoli JL, Khalil H and McCormick AM (1982) Metabolism of 5,6-epoxy retinoic acid in vivo: Isolation of a major intestinal metabolite. *Biochemistry* **21**:1942-1949.
127. Napoli JL, Pramanik BC, Williams JB, Dawson MI and Hobbs PD (1985) Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: Total versus all-trans-retinoic acid in human plasma. *J Lipid Res* **26**:387-392.
128. Napoli JL (1999) Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Molecular Biology* **63**:139-188.
129. Nau H and Elmazar MME (1997) Subcellular localization of 13-cis and all-trans-retinoic acid in mouse embryo after application of equipotent teratogenic doses of either substance. *European Retinoid Research Group Meeting, Nizga*, Poster.
130. Niederreither K, Mc Caffery P, Drager UC, Chambon P and Dolle P (1997) Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* **62**:67-78.
131. Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* **21**:444-448.

132. **Norris AW, Cheng L, Giguere V, Rosenberger M and Li E** (1994) Measurement of subnanomolar retinoic acid binding affinities for cellular retinoic acid binding proteins by fluorometric titration. *Biochim Biophys Acta* **1209**:10-18.
133. **Nudel U, Kakut R, Snani S, Neuman S, Levy Z und Yaffe D** (1983) The nucleotide Sequence of the Rat Cytoplasmic Beta-actin Gene. *NAR* **11**:1759.
134. **Nutrition:** Interaction of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts (Oct. 2000) *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. **72**, No. **4**:990-997.
135. **Ong DE** (1994) Cellular transport and metabolism of vitamin A; Roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* **52**:24-31.
136. **Ong DE, Newcomer ME and Chytil F** (1994) Cellular retinoid binding protein, in *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS eds) pp **283-318**, Raven Press, New York.
137. **Orfanos CE, Schmidt HW, Mahrle G and Runne U** (1972) Die Wirksamkeit von Vitamin-A-Säure bei Psoriasis. Topische Kombinationsbehandlung mit Corticoiden. Zwei neue VAS-Präparate zur peroralen Therapie. *Arch Dermatol Forsch* **244**:424-426.
138. **Orfanos CE, Schmidt HW, Mahrle G, Gartmann H and Lever WF** (1973) Retinoic acid in psoriasis: Its value for topical therapy with and without corticosteroids. Clinical histological and electron microscopical studies on forty-four hospitalized patients with extensive psoriasis. *Br J Dermatol* **88**:167-188.
139. **Orfanos CE, Ehlert R and Gollnick H** (1987) The Retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* **34**:459-503.
140. **Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond-Roesler B and Geilen CC** (1997) Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs* **53**:358-388.
141. **Orfanos CE**, Berlin (1997); Orale Retinoide in der Akne Therapie, *Der Deutsche Dermatologe*.
142. **Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond-Roesler B and Geilen CC** (1997) Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs* **53**:358-388.
143. **Pauling L** (2000) Orthomolekulare Medizin: Schlaganfälle, *Journal of OM*; Ralf Regling-Verlag.
144. **Persson B, Krook M and Jörnvall H** (1995) Short chain dehydrogenases/reductases. *Adv Exp Med Biol* **372**:383-396.

145. **Petkovich M, Brand NJ, Krust A and Chambon P** (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**:444-450.
146. **Popa C et al** (1999) Cytochrom P450, CYP26A1 is expressed at low level in human epidermal keratinocytes and is not retinoic acid-inducible. *Br J Dermatol.* **141**: 460-468.
147. **Powell LM** (1987) The RT-PCR, *Cell* **50**:831-841.
148. **Psychrembel Klinisches Wörterbuch (1998)** Auflage (258) *de Gruyter*, ISBN 3110148242
149. **Randolph RK and Simon M** (1993) Characterization of retinol metabolism in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* **268**:9198-9205.
150. **Randolph RK and Simon M** (1996) All-trans-retinoic acid regulates retinol and 3,4-didehydro-retinol metabolism in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **106**:168-175.
151. **Raner GM, Vaz and and Coon MJ** (1995) Metabolism of all-trans, 9-cis, and 13-cis isomers of retinal by purified isoenzymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol Pharmacol* **49**:515-522.
152. **Raner GM, Vaz and Coon MJ** (1995) Metabolism of all-trans, 9-cis, and 13-cis isomers of retinal by purified isoenzymes of microsomal cytochrom P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol Pharmacol* **49**:515-522.
153. **Raunio H and Juvonen R** (1998) Induction of CYP 245 by pyrazole and its derivatives in mouse primary hepatocytes. *Arch Toxicol* **72**:336-341.
154. **Ray WJ, Bain G, Yao M and Gottlieb DI** (1997) CYP26, a novel mammalian cytochrome P-450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem* **272**:18702-18708.
155. **Redfern CPF**; Methods in molecular biology Vol **89**, Retinoid Protocols, Humana Press, Totwa NJ. USA ; p.7.
156. **Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr** (Umschau/Braus, 2000) *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.*; **1.** Auflage. .
157. **Preisling M**, Retina International's Scientific Newsletter: Protein Pages, Retinoid Binding Proteins; Recent update from: 31.01.2001.

158. **Reynolds NJ, Fisher GJ, Griffith CEM, Tavakkol A, Talwar HS, Rowse PE, Hamilton PA and Voorhees JJ** (1993) Retinoic acid metabolites exhibit biological activity in human keratinocytes, mouse melanoma cells, and hairless mouse skin in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **226**:1632-1642.
159. **Roberts ES, Vaz AD and Coon MJ** (1991) Metabolism of retinoids by rabbit P450 cytochromes. *FASEB J* **5**:614.
160. **Romert A, Tuvendal P, Simon A, Dencker L and Eeriksson U** (1998) The identification of a 9-*cis* retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-*cis* retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:4404-4409.
161. **Romert Anne**, Doctor's *Thesis*: Diss: 2000:441; (Oct 2000) Retinol dehydrogenases in retinoid metabolism.
162. **Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC and De Luca L** (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiological Reviews*, Vol. **80**, No.3 1021-1054.
163. **Roos TC, Jugert FK, Notzon I and Merk HF** (1996) Cytochrome P450-mediated 4-hydroxy-metabolites of retinoic acid are produced by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **106**:870.
164. **Roos TC, Jugert FK, Merk HF and Bickers DR** (1998) Retinoid metabolism in the skin. *Pharmacol Rev* **50**(2):315-333.
165. **Sanquer S and Gilchrist BA** (1994) Characterization of human cellular retinoic acid-binding proteins-I and -II: Ligand binding affinities and distribution in skin. *Arch Biochem Biophys* **311**:86-94.
166. **Sass JO, Forster A, Bock KW and Nau H** (1994) Glucuronidation and isomerization of all-trans-and 13-cis-retinoic acid by liver microsomes of phenobarbital- or 3-methylcholanthrene-treated rats. *Biochem Pharmacol* **47**:495-492.
167. **Satre MA, Zgombic-Knight M, Duester G** (1994) The complete structure of human class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) determined from the ADH7 gene. *J Biol Chem* **269**:15606-15612.
168. **Schicke H** (1990) Lexikon der Vitamine; MZ-Verlag.
169. **Schoop VM, Mirancea N and Fusenig NE** (1999) Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *The Journal of Investigative Dermatology* Vol.112; **3**:343-353.

170. **Schunk A** (1999) Biochemie Vitamin A, *Seminar Vitamin A*.
171. **Seitz HK** (2000) Alcohol and reinoid metabolism. *Gut* **47**:748-750.
172. **Shalita A, Weiss JS, Chalker DK, Ellis CN, Greenspan A, Katz HI, Kantor I, Millikan LE, Swinehart T, Swinyer L, Whitmore C, Baker M and Czernielewski J** (1996)
A comparison of the efficacy and safety of Adapalene gel 0.1% and tretinoin gel 0.1% in the treatment of acne vulgaris: A multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* **34**:483-485.
173. **Shirley MA, Bennani YL, Boehm MF, Breau AP, Pathirana C and Ulm EH** (1996)
Oxidative and reductive metabolism of 9-*cis*-retinoic acid in the rat. Identification of 13,14-dihydro-9-*cis*-retinoic acid and its taurine conjugate. *Drug Metab Dispos* **24**:293-302.
174. **Siegenthaler G, Saurat JH, Morin C and Hotz R** (1984) Cellular retinol- and retinoic-acid- binding proteins in the epidermis and dermis of normal human skin
Br J Dermatol **111**:647.
175. **Siegenthaler G, Gumowski-Sunec D and Saurat JH** (1990) Metabolism of natural retinoids in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* **95**:47-48.
176. **Siegenthaler G, Saurat JH and Ponc M** (1990) Retinol and retinal metabolism.
Biochem J **268**:371-378.
177. **Siegenthaler G, Tomatis I, Chatellard-Gruaz D, Jaconi S, Eriksson U and Saurat JH** (1992) Expression of CRABP-I and -II in human epidermal cells. *Biochem J* **287**:383-389.
178. **Siegenthaler G, Tomatis I, Didierjean L, Jaconi S and Saurat JH** (1992)
Overexpression of cellular retinoic acid binding protein type II (CRABP-II) and downregulation of CRABP-I in psoriatic skin. *Dermatology* **185**:251-256.
179. **Specht C** *Dissertation* (2000)
Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen.
180. **Sporn MB, Rogers AB and Goodman DS** (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. 2nd ed. Raven Press, New York.
181. **Stoilov I, Jansson I, Sarfarazil M and Schenkman JB** (2001) Roles of Cytochrome P450 in Development. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. Vol. **18**, No.1.
182. **Stuettgen JD** (1962) Zur Lokalbehandlung von Keratosen mit Vitamin-A-Säure.
Dermatologica **124**:65-80.

183. **Su J, Chai X, Kahn B and Napoli JL** (1998) cDNA cloning, tissue distribution, and substrate characteristics of a *cis*-retinol/3 α -hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme. *J Biol Chem* **273**:17910-17916.
184. **Sundberg I, Martini R und Murray M** (1997) Pretranslational and postranslational regulation of rat hepatic CYPs3A2 and 2E1 by disulfiram. *Biochem Pharm* **1329**.
185. **Takase S, Tanaka K, Suruga K, Kitagawa M, Igarashi M und Goda T** (1998) PPRE. *Am J Physiol* **274**:626-632.
186. **Takatsuka J, Takahashi N and De Luca LM** (1996) Retinoic acid metabolism and inhibition of cell proliferation: An unexpected liaison. *Cancer Res* **56**:675-678.
187. **Tavakkol A, Zouboulis CC, Duell EA and Voorhees JJ** (1994) A retinoic acid-inducible skin-specific gene (RIS-1/psoriasin): molecular cloning and analysis of gene expression in human skin in vivo and cultured skin cells in vitro. *Mol Biol Rep* **20**:75-83.
188. **Taylor J, Cupp C, Diaz A, Chowdhury M, Khalili K, Jimenez S, Ajmini S** (1992) Activation of expression of genes coding of extracellular Matrix Proteins in TaT-Producing Glioblasoma Cells. *PNAS* (USA) **89**: 9617-9621.
189. **Thacher SM et al** (2001) New dermatological agents for the treatment of psoriasis. *J Med Chem* **44(3)**: 281-297.
190. **Thaller C and Eichele G** (1990) Isolation of 3,4-retinoic acid, a novel morphogenic signal in the chick. *Nature* **345**:815-819.
191. **Thomas A** Dissertation (2000) Untersuchung zum Metabolismus von Vitamin A.
192. **Törmä H and Vahlquist A** (1987) Retinol esterification by mouse epidermal microsomes: evidence for acyl-CoA: Retinol acyltransferase activity. *J Invest Dermatol* **88**:398-402.
193. **Törmä H, Lonz W, Liu W, Rollmann O and Vahlquist A** (1994) Expression of cytosolic retinoid-binding protein genes in human skin biopsies and cultures keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol* **131**:243-249.
194. **Törmä H, Rollman O und Vahlquist A** (1999); The vitamin A metabolism and expression of retinoid-binding proteins differ in HaCaT cells and normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **291(6)**:339-345.
195. **Törmä H, Karlsson T, Michaelsson G. Rollman O, Vahlquist A** (2000). Decreased mRNA levels of retinoic acid receptor α , retinoid X receptor α and thyroid hormone receptor α in lesional psoriatic skin. *Acta Derm Venereol* **80(1)**: 4-9.

196. **Ulven SM, Gundersen T *et al.*** (2000)
Identifikation of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins and receptors during early postimplantation development in mouse: Important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-*trans*-retinoic acid. *Development Biology*. **220(2)**:379-391.
197. **Urbach J and Rando RR** (1994) Thiol dependent isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid. *FEBS Lett* **351**:429-432.
198. **Urbach J and Rando RR** (1994) Isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid. *Biochem J* **299**:459-465.
199. **Vahlquist A** (1980) The identification of dehydroretinol (vitamin A₂) in human skin. *Experientia* **36**:317-318.
200. **Vahlquist A** (1982) Vitamin A in human skin. I. Detection and identification of retinoids in normal epidermis. *J Invest Dermatol* **79**:89-93.
201. **Vahlquist A, Lee JB, Michaelsson G and Rollmann O** (1982) Vitamin A in human skin. Concentrations of carotene, retinol, and dehydroretinol in various components of normal skin. *J Invest Dermatol* **79**:94-97.
202. **Vahlquist A, Törmä H, Rollmann O and Berne B** (1991) Distribution of natural and synthetic retinoids in the skin, in *Retinoids, New Trends in Research and Therapy* (Saurat JH ed) pp **159-167**, Karger, Basel.
203. **Van Thiel DH, Gavalier J and Lester R** (1974) Ethanol inhibition of vitamin A metabolism in the testis: possible mechanism for sterility in alcoholics. *Science* **186**:941-942.
204. **Volkman P-H**; Orthomolekulare Therapie hypoallergen, Der naturheilkundliche Patienten-Ratgeber, *VBN-Verlag Lübeck*.
205. **Wang XD, Tang GW, Fox JX, Krinsky NI and Russel RM** (1991) Enzymatic conversion of beta-carotene into beta-apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues. *Arch Biochem Biophys* **285**:8-16.
206. **Wang XD, Krinsky NI and Russel RM** (1993) Retinoic acid regulates retinol metabolism via feedback inhibition of retinol oxidation and stimulation of retinol esterification in ferret liver. *J Nutr* **123**:1277-1285.

207. **Wang XD, Krinsky NI, Benotti PN and Russel RM** (1994) Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- β -carotene in human intestinal mucosa in vitro. *Arch Biochem Biophys* **313**:150-166.
208. **Wang XD, Russell RM** (1999) Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr Rev* **57**:263-272.
209. **Wanner R, Panteleyev A, Henz BM, Rosenbach T** (1996); Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only. *Biochem Biophys Acta* **1317**(2):105-111.
210. **Wanner R, Zhang J, Henz BM, Rosenbach T** (1996) AP-2 gene expression and modulation by retinoic acid during keratinocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **223**(3):666-669.
211. **Wanner R, Wolff B, Glowacki F, Kolde G, Wittig B** (1999) The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCaT keratinocyte differentiation. *Archives of Dermatological Research* **291**:346-353.
212. **Ward SJ** (2000); Department of Biomedical Science. *Cell and Dev. Biol* **8**:429-435.
213. **Ward SJ** Department of Biomedical Science (2000) Tissue-specific uptake of retinol and production of retinoic acid. *Mech. Dev.* **69**:155-167.
214. **White JA, Guo YD, Baetz K, Beckett-Jones B, Bonasoro J, Hsu KE, Dilworth FJ, Jones G and Petkovich M** (1996) Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem* **271**: 29922-29927.
215. **White JA, Beckett-Jones B, Guo J-D, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G and Petkovich M** (1997) cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP460RAI) identifies a novel family of cytochromes P450 (CYP26). *J Biol Chem* **272**:18538-18641.
216. **WHO**: MDIS, 1997; *Poster*: Sight and Life, 2000.
217. **Wolbach SB and Howe PR** (1925) Tissue changes following deprivation of fat soluble vitamin A. *J Exp Med* **43**:763.
218. **Wyss R and Bucheli F** (1988) Quantitative Analysis of retinoids in biological fluids by High-Performance Liquid Chromatography using column switching. I. Determination of Isotretinoin and tretinoin and their 4-Oxo Metabolites in Plasma. *Journal of Chromatography* **424**:303-314.

- 219. Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Drager UC;**
Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase.
- 220. Zgombic-Knight M, Ang HL, Foglio MH and Duester G (1995)** Cloning of the mouse class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) cDNA and tissue specific expression patterns of the murine ADH gene family. *J Biol Chem* **270**:10868-10877.
- 221. Zgombic-Knight M, Foglio MH, Duester G (1995)** Genomic Structure and Expression of the ADH7 Gene Encoding Human Class IV Alcohol Dehydrogenase, the form most efficient for Retinol Metabolism in vitro. *J Biol Chem* **270**:4305-4311.
- 222. Zouboulis CC, Seltsmann H, Sass JO, Ruhl R, Plum C, Hettmannsperger U, Blume-Peytavi U, Nau H, Orfanos CE (1999)** Retinoid signaling by all-trans retinoic acid and all-trans retinol-beta-D-glucuronide is attenuated by simultaneous exposure of human keratinocytes to retinol. *J Invest Dermatol* **112**(2):157-165.

10 Eid und Dank

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation ohne unerlaubte Hilfe, selbständig verfaßt, das verwendete Schrifttum vollständig zitiert und alle in Anspruch genommene Hilfe angegeben habe. Ich versichere eidesstattlich, dass ich diesen Promotionsantrag erstmalig einreiche und keine früheren Versuche einer Promotion unternommen habe. Diese Doktorschrift ist noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden. Die in dieser Arbeit angegebenen Untersuchungen sind von mir selbst oder mit Hilfe von Herrn PD. Dr. rer. med. Dipl. biol. Frank K. Jugert durchgeführt worden.

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans F. Merk für die Betreuung der Promotion und die konstruktive Diskussion bei allen aufgetretenen Problemen. Herrn PD. Dr. rer. med. Dipl. biol. Frank K. Jugert danke ich besonders für die stete Hilfsbereitschaft, das geduldige Anlernen und Beaufsichtigen meiner Arbeit, die praktischen Anregungen und die Themenstellung. Nicht vergessen zu erwähnen möchte ich die praktische Unterstützung unserer Medizinisch Technischen Assistentin Frau T. Oepen und die hilfreichen Anregungen von Dr. med. Jorge A. Frank.

Danken möchte ich auch der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Aachen für die Bereitstellung der Mittel.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer in allen Lebenslagen unterstützt haben und ohne deren Rückhalt diese Arbeit wahrscheinlich nicht zustande gekommen wäre. Dank auch an meinen Freund Dipl. Ing. A. Lichtwark und seine stets geduldige Begleitung.

11 Lebenslauf

Name : Dorette Christel Else Monika Spötter
Geboren am : 05.04.1976
Geburtsort : Freudenberg (Nordrhein-Westfalen)
Familienstand : ledig
Eltern : Roland Spötter, Dipl. Betriebswirt
Elke Spötter geb. Löffler, Hausfrau
Geschwister : Christian Spötter, Dipl. Kaufmann
Markus Spötter, Dipl. Ingenieur

Schulausbildung:

1982 - 1986 Ev. Grundschule in Freudenberg-Büschergrund
1986 - 1995 Fürst-Johann-Moritz Gymnasium in Siegen
(1992 Schulaustausch mit Südafrika)
Juni 1995 Abitur am Fürst-Johann-Moritz Gymnasium
Notendurchschnitt: 1,6

Hochschulausbildung:

Oktober 1995 Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-
bis November 2002 Westfälischen Technischen Hochschule in Aachen

September 1997 Ärztliche Vorprüfung

Oktober 1997 Studium an der Universität Paul Valery,
bis März 1998 Montpellier; Frankreich

April 1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Januar bis Juli	2001 2001	Experimentelle Forschung (HPLC, PCR) und Ergebnisauswertung im Rahmen der Doktorarbeit
September	2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 - 2002		Praktisches Jahr
<i>Innere Medizin</i>		bei Chefarzt Dr. B. O'Malley, Victoria Hospital Wynberg, Cape Town, Südafrika
<i>Chirurgie</i>		bei Chefarzt Dr. Liebenberg, Victoria Hospital Wynberg, Cape Town, Südafrika
<i>Wahlfach: Pädiatrie</i>		bei Prof. Dr. med. Heimann, Universitätsklinikum Aachen
November	2002	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote: gut

Praktika und Famulaturen:

April und Mai 1998	Praktikum im Onkologischen Forschungslabor der Dermatologischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen. (Leiter: Herr Prof. Dr. med. H. F. Merk).
August und September 1998	Famulatur in der Dermatologischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen (Leiter: Herr Prof. Dr. med. H. F. Merk).
Juni 1999	Famulatur in der Gynäkologischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen (Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Rath).
August 1999	Famulatur in der Allgemeinmedizinischen Praxis von Dr. P. G. De Villiers in Somerset-West, Südafrika.

Veröffentlichungen:

B. Blömeke, S. Sieben, D. Spötter, O. Landt und H. F. Merk

Identifikation of N-Acetyltransferase 2 Genotypes by Continuous Monitoring of Fluorogenic Hybridization Probes.

Analytical Biochemistry 275, 93-97 (1999)

Berufliche Ausbildung:

Februar 2003

Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der unfallchirurgischen Abteilung des Marienhospitals in Aachen (Burtscheid) unter der Leitung von Chefarzt Dr. med. Borggreffe.