

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Tilgen

**Untersuchungen in Melanomzelllinien und primär
kultivierten humanen Melanozyten zur Modulation der
Expression der Peroxisom Proliferator-Aktivierten
Rezeptoren (PPAR α , PPAR δ , PPAR γ) und des Vitamin D
Rezeptors (VDR) durch korrespondierende Liganden**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von
Pit Sertznig
geboren am 04.05.1983 in Luxemburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität des Saarlandes am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Humanmedizin der Universität des Saarlandes

Dekan:

Berichterstatter:

Datum der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Karzinogenese des malignen Melanoms	3
2.2.	Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren	5
2.2.1.	PPARs	7
2.2.2.	VDR	10
2.3.	Einfluss der PPARs auf Zellwachstum und -differenzierung	12
2.4.	Einfluss des VDRs auf Zellwachstum und -differenzierung	13
2.5.	<i>Cross talk</i> zwischen den PPAR- und VDR-Signalwegen	14
2.6.	Ziele der Arbeit	15
3.	Material und Methoden	17
3.1.	Material	17
3.1.1.	Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Kits und Lösungen	17
3.1.2.	Liganden	17
3.1.3.	Zelllinien, Zellkulturmedien und -lösungen	18
3.1.4.	Primer	20
3.1.5.	Geräte	20
3.1.6.	Sonstige Materialien	21
3.1.7.	Computerprogramme und Datenbanken	21
3.2.	Zellbiologische Methoden	22
3.2.1.	Einfrieren von Zellen	22
3.2.2.	Auftauen von Zellen	23
3.2.3.	Zellpassagierung	23
3.2.4.	Zählen und Aussäen der Zellen	23
3.2.5.	Behandlung der Zelllinien mit Liganden	24
3.2.6.	Ernten der Zellen	25
3.3.	Biochemische Untersuchungsmethode (Proliferations-Assays)	25
3.3.1.	Zellbehandlung	25
3.3.2.	Kristallviolett-Färbung	26
3.3.3.	Fotometrische Vermessung	26
3.4.	Molekularbiologische Methoden	27
3.4.1.	RNA Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen	27
3.4.2.	RNA Isolierung nach der Trizol-Methode	28
3.4.3.	Agarosegelelektrophorese	28
3.4.4.	Reverse Transkription	29
3.4.5.	Quantitative Real-Time PCR	30
3.4.5.1.	Theorie der quantitativen Real-Time PCR	30
3.4.5.2.	PCR-Effizienzen und Standardkurven	34
3.4.5.3.	Kalibratoren und relative Quantifizierung	36
3.5.	Statistik	38

4.	Ergebnisse	40
4.1.	Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo in Abhängigkeit von der Kulturdauer	41
4.2.	Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach 1,25(OH) ₂ D ₃ -Behandlung	45
4.3.	Basale PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression in anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien	49
4.4.	PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression nach 1,25(OH) ₂ D ₃ -Behandlung in anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien	53
4.5.	Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach Behandlung mit PPAR-Liganden allein	58
4.6.	Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ +PPAR-Liganden	62
4.7.	Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach Behandlung mit Calcipotriol-Analoga	68
4.8.	<i>Cross talk</i> zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs	74
5.	Diskussion	75
5.1.	Basale PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen im Vergleich zu anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien	76
5.2.	1,25(OH) ₂ D ₃ -Behandlung führte neben der VDR-vermittelten Proliferationshemmung auch zu Anstiegen der PPAR α - und PPAR δ -Expression in MeWo-Zellen	77
5.3.	1,25(OH) ₂ D ₃ -Behandlung bewirkte in der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien einen Expressionsanstieg von PPAR α , aber nicht von PPAR δ oder des VDRs	79
5.4.	VDR-Expressionsanstieg und Proliferationshemmung von MeWo-Zellen nach Behandlung mit den PPAR-Liganden WY14643 und GW501516	80
5.5.	PPAR α - und PPAR δ -Expressionsanstieg in MeWo-Zellen nach Behandlung mit den PPAR-Liganden	82
5.6.	Keine synergistischen Effekte in MeWo nach kombinierter Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ +PPAR-Liganden	83
5.7.	Behandlung mit synthetischen Calcipotriol-Analoga (an Calcipotriol gekoppelte PPAR-Liganden)	84
5.8.	<i>Cross talk</i> zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs	85
5.9.	Fazit und Ausblick	86
6.	Literaturverzeichnis	90
7.	Abkürzungsverzeichnis	98
8.	Anhang	101
9.	Publikationen und Kongressbeiträge	106
10.	Danksagung	107
11.	Lebenslauf	108

1. Zusammenfassung

Zahlreiche aktuelle Studien belegen einen wichtigen Einfluss der Ernährung auf die Entstehung und den Verlauf von Tumorerkrankungen. Als eine Konsequenz hat das Gebiet der *nutrigenomics* in den letzten Jahren für die Onkologie erheblich an Bedeutung gewonnen. Dabei kamen auch ungesättigte Fettsäuren und deren korrespondierenden Kernrezeptoren (Peroxisom Proliferator-Aktivierten Rezeptoren, PPAR α , PPAR δ , PPAR γ), sowie Vitamin D-Metabolite und der Vitamin D Rezeptor (VDR) ins Blickfeld der Forschung. Sowohl die PPARs als auch der VDR spielen für die Entstehung und den Verlauf einer Vielzahl von Tumoren eine wichtige Rolle. Es ist bislang ungewiss welche Rolle diese Rezeptoren bei der Ätiologie und Progression des malignen Melanoms spielen und inwieweit Melanomzellen durch Behandlung mit PPAR- oder VDR-Liganden in ihrem Wachstumsverhalten und ihrer Genexpression beeinflusst werden. Ziele dieser Arbeit waren die Bestimmung der PPAR- und VDR-Expression in Melanomzellen und die Untersuchung von Effekten auf das Wachstumsverhalten der Zellen durch korrespondierende Liganden.

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR wurde gezeigt, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$ die mRNA-Expression von PPAR α und PPAR δ in MeWo-Zellen signifikant erhöht. Einige PPAR-Liganden bewirkten neben einem Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression auch einen VDR-Expressionsanstieg. Die PPAR-Liganden welche die VDR-Expression am stärksten steigerten (WY14643 und GW501516), hemmten auch die Proliferation von MeWo-Zellen signifikant. Diese Proliferationshemmung (ca. 10 %) war allerdings nicht so stark ausgeprägt wie nach 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung (ca. 40 %). Die kombinierte Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden führte zu keiner synergistischen Steigerung der Proliferationshemmung oder der PPAR- oder VDR-Expression. Nach 120 h Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +Bezafibrat kam es sogar zu starken Abfällen der PPAR- und VDR-Expression. Gleichzeitig wurde auch der antiproliferative Effekt von 1,25(OH) $_2$ D $_3$ abgeschwächt. In zusätzlichen Untersuchungen wurden MeWo-Zellen mit 2 synthetischen Calcipotriol-Analoga behandelt, denen je eine ungesättigte Fettsäure (α -Linolensäure = ALA oder Docosahexaensäure = DHA) als Seitenkette angehängt wurde. Beide Calcipotriol-Analoga zeigten unterschiedliche Effekte auf die Modulation der Expression der Kernrezeptoren und hatten einen unterschiedlich starken antiproliferativen Effekt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Bedeutung der PPARs und des VDRs, sowie von deren korrespondierenden Liganden, bei der Wachstumsregulation von Melanomzellen. Zudem konnte in der Melanomzelllinie MeWo ein funktioneller *cross talk* zwischen den PPAR- und VDR-Signalwegen nachgewiesen werden.

Summary:

Many current studies have shown that diet influences the development and progression of tumour diseases. Therefore in oncology the field of nutrigenomics gained the past few years in importance. As a result unsaturated fatty acids and their corresponding nuclear receptors (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α , PPAR δ , PPAR γ), as well as vitamin D-metabolites and the vitamin D receptor (VDR) were investigated intensively. Both PPARs and VDR play an important role in tumour carcinogenesis and progression of a large number of tumours. So far it is uncertain how these receptors are implicated in the development and progression of malignant melanoma and to what extent proliferation and gene expression of melanoma cells are influenced by treatment with PPAR- or VDR-ligands. The aims of this study were the investigation of PPAR- and VDR-expression in melanoma cells and the description of effects on cell proliferation by corresponding ligands.

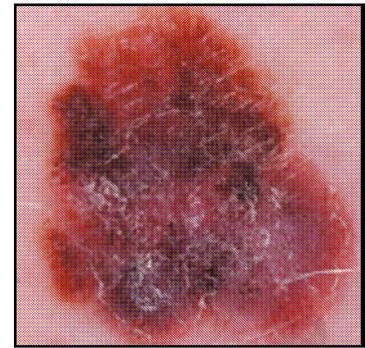
Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ significantly increased the mRNA-expression of PPAR α and PPAR δ . Part of the PPAR-ligands induced besides an up-regulation of the PPAR α - and PPAR δ -expression an elevation of the VDR-expression. The PPAR-ligands showing the strongest increase of VDR-expression (WY14643 and GW501516) inhibited significantly proliferation of MeWo-cells. This inhibition of cell proliferation (about 10 %) was less strong as compared to cell proliferation after treatment with 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (about 40 %). The combined treatment with 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-ligands didn't led to a synergistic inhibition of cell proliferation or a synergistic increase of PPAR- and VDR-expression. 120 h of treatment with 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +Bezafibrate even strongly decreased mRNA-expression of PPARs and VDR. At the same time the 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced inhibition of MeWo cell proliferation was partially antagonized. In additional investigations MeWo-cells were treated with 2 synthetic Calcipotriol-analogues, which were conjugated at the side chain with a fatty acid (α -linolenic acid = ALA or docosahexaenic acid = DHA). Beside this, both Calcipotriol-ligands differed by their modulating effects on the expression of the nuclear receptors from each other and showed distinct antiproliferative effects.

The results of this study suggest that PPARs and VDR, as well as their corresponding ligands, play in melanoma cells an important role in the regulation of cell growth. Moreover a functional cross talk between the PPAR- and VDR-mediated signalling pathways could be demonstrated in the melanoma cell line MeWo.

2. Einleitung

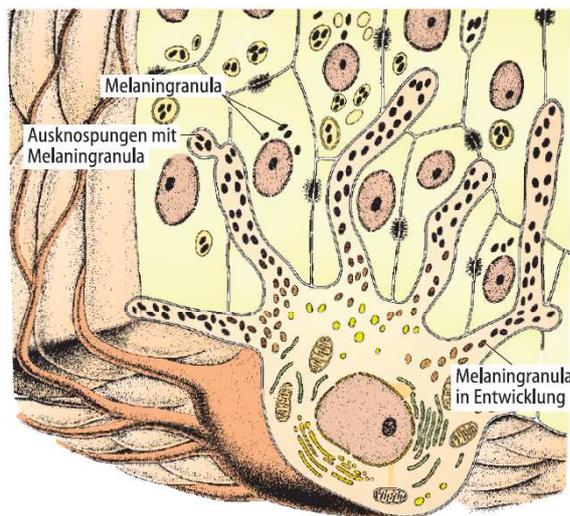
2.1. Karzinogenese des malignen Melanoms

Das Melanom stellt einen hochgradig malignen Tumor dar, der sich überwiegend an der Haut manifestiert und in 60% der Fälle aus einem seit Jahren bestehenden Nävuszellnävus entsteht (Abb. 2-1). In bis zu 5 % der Fälle tritt es in den Schleimhäuten, den Leptomeningen, der Uvea, der Retina des Auges und in der Cochlea des Innenohres auf (Herz, 2005).

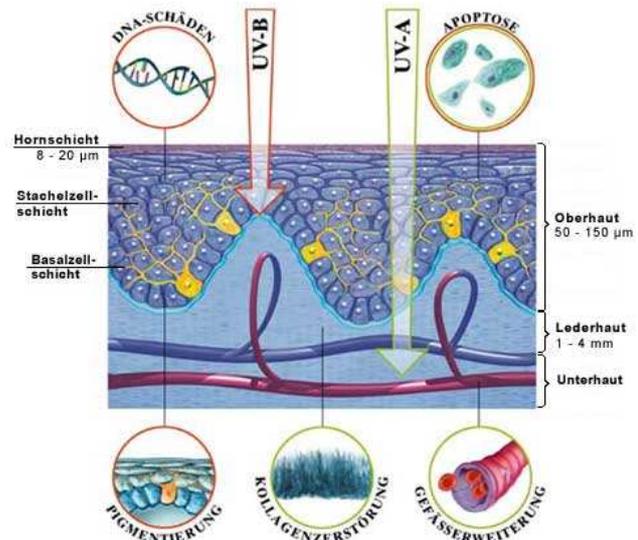


-Abb. 2-1: Malignes Melanom (Hauschild, 2005)

Das maligne Melanom geht von den Melanozyten aus, welche hauptsächlich in der Basalschicht der Epidermis der Haut lokalisiert sind. Melanozyten synthetisieren das Pigment Melanin und speichern dieses in den so genannten Melanosomen. Diese werden dann an die benachbarten Keratinozyten abgegeben (Abb. 2-2). Die Keratinozyten nutzen das Melanin primär, um ihre DNA vor Schäden wie z.B. UV-Strahlung zu schützen (Holick, 2004). UV-Strahlen haben auf den menschlichen Organismus positive Effekte (z.B. Vitamin D-Synthese und somit Stärkung des Knochenbaus, Stärkung des Immunsystems, Förderung des Allgemeinbefindens) wie auch negative Auswirkungen (z.B. Erytheme, Hautalterung, Hautkrebs) (Abb. 2-3).



-Abb.2-2: Schematisierte Darstellung eines Melanozyts (Junqueira und Carneiro, 2005)



-Abb. 2-3: Wirkungen von UV-Strahlung in der menschlichen Haut (grün: UV-A-Wirkung; rot: UV-B-Wirkung) (www.unserehaut.de)

Sowohl für den hellen Hautkrebs als auch für das Lentigo-maligna-Melanom konnte ein kanzerogener Effekt der UV-Strahlung nachgewiesen werden (Herz, 2005). Sonnenbestrahlung ist allerdings nur einer von vielen Risikofaktoren für ein Melanom. Epidemiologische Studien stellten ein Süd-Nord-Gefälle innerhalb der Bevölkerung europäischer Herkunft fest. Signifikant

war auch der direkte Zusammenhang zwischen dem Risiko an einem Melanom zu erkranken und der Zahl der erlittenen Sonnenbrände (vor allem in der Kindheit) sowie dem Lebensalter der ersten extremen Sonnenexposition (Marks, 2000; Whiteman et al., 2001). Daneben wird die Bedeutung toxischer, medikamentöser, endokriner oder immunologischer Einflüsse diskutiert.

In den letzten Jahrzehnten hat die Inzidenz weltweit, unabhängig vom Geschlecht, stärker zugenommen als bei jeder anderen Krebsart (Armstrong und Kricke, 1995; Stang et al., 2000; Garbe und Blum, 2001). Dies wurde vor allem auf das veränderte Freizeit- und Sozialverhalten (z.B. exzessives Sonnenbaden, Reisen, evtl. Solarien) zurückgeführt. Eine weitere Ursache für die steigenden Fallzahlen ist die Verbesserung der Untersuchungsmethoden in den letzten Jahrzehnten (Brochez und Naeyaert, 2000; Marks, 2000). Es zeigte sich, dass die Zahl von weniger aggressiven, superfiziell spreitenden Melanomen in Frühstadien zugenommen hat. Diese haben eine wesentlich bessere Prognose. Dies erklärt auch wieso die Zahl neu diagnostizierter Melanome laut National Cancer Institute im Zeitraum von 1950 bis 2000 um 619 % zunahm, während die Mortalität nur um 165 % zunahm (Garbe und Blum, 2001; Lens und Dawes, 2004). Obwohl das maligne Melanom nur 4 % aller Hauttumoren darstellt, ist es für 90 % der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich. Melanozyten (benigne und maligne) bilden keine Interzellularbrücken. Sie können nicht im Zellverband wachsen und wandern somit rasch in dünnwandige Lymphgefäße der oberen Dermis ein. Neben dem aggressiven und infiltrativen Wachstum neigt das Melanom deshalb bereits frühzeitig zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung.

Bisherige Chemotherapie-Schemata sind nur wenig Erfolg versprechend. Dacarbazin ist die effizienteste Monochemotherapie und hat sich bisher in allen klinischen Studien gegenüber anderen Mono- und Kombinationstherapien als überlegen erwiesen (Moon et al., 1975, Chapman et al., 1999, Chiarion Sileni et al., 2001). Trotzdem sprechen nur 5 - 29 % der Melanome auf Dacarbazin an und dies auch nur etwa 4 Monate lang (Eigentler et al., 2003). Auch Immunmodulatoren wie Interferon- α oder Interleukin-2 brachten nicht den erwünschten Durchbruch und haben zudem erhebliche Nebenwirkungen (Hauschild et al., 2003). Deswegen wurden in den letzten Jahren fieberhaft nach neuen natürlichen und synthetischen Substanzen gesucht, welche die Therapie des malignen Melanoms revolutionieren, den Progress prämaligener Läsionen oder sogar die Entstehung eines Melanoms verhindern könnten (Grabacka et al., 2006).

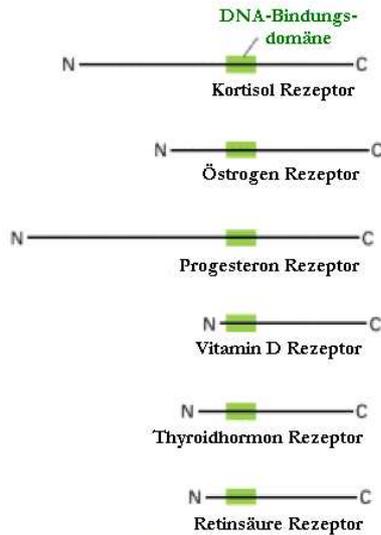
Neben Vitaminen und anderen Antioxydantien wurde eine Vielzahl von anderen Stoffgruppen, darunter auch ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. Omega-3-Fettsäuren (ALA, DHA, ...), Eicosanoide und Oxysterole sowie andere Bestandteile der Nahrung als kanzeroprotektive Substanzen identifiziert. In den letzten Jahren zeigte sich, dass die Ernährung oft in Verbindung

mit der Entstehung diverser Krebsarten steht (Henderson, 1995; Lipkin et al., 1999; Astorg, 2004). Konsequenterweise sieht die Weltgesundheitsorganisation (WHO) aktuell die Ernährung, nach dem Rauchen, als den zweitwichtigsten Faktor bei der Krebsprävention an. So konnte beim Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinom ein signifikanter Zusammenhang zur Ernährung gestellt werden. Zudem konnte belegt werden, dass die Aktivierung der Peroxisom Proliferator-aktivierenden Rezeptoren (PPARs) durch eine erhöhte orale Aufnahme von Fettsäuren zu einer Abnahme der Inzidenz von Magenkarzinomen führte (Tominaga und Kuroishi, 1997; Takahashi et al., 1999). Auch das maligne Melanom scheint durch die Ernährung beeinflusst zu werden. Antioxydantien, wie z.B. Polyphenole, Vitamin C und E können den karzinogenen Effekt der UV-Strahlung mindern (Afaq und Mukhtar, 2002; Ichihashi et al., 2003). Auch Omega-3-Fettsäuren wurden protektive Eigenschaften zugeschrieben (Bain et al., 1993; Albino et al., 2000), während Omega-6-Fettsäuren die Melanominduktion förderte (Wagner et al., 1984; Mackie et al., 1987; Cario-André et al., 2005). Zurzeit werden vor allem auf dem Gebiet der *nutrigenomics* die Einflüsse der Ernährung auf die Regulierung von Genen und deren Einfluss auf die Karzinogenese untersucht. Bisher ist noch nicht endgültig geklärt, welche Rolle die Ernährung in der Karzinogenese des malignen Melanoms spielt.

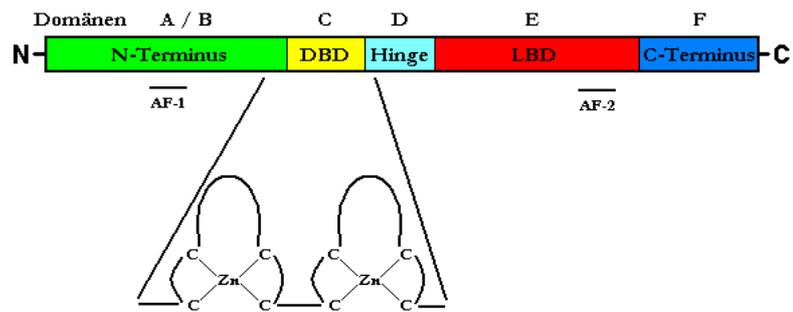
2.2. Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren

Im Laufe der letzten Jahre wurden eine Reihe von Kernrezeptoren untersucht, die sowohl eine wichtige Rolle im Zucker- und Fettstoffwechsel, aber auch in der Beeinflussung des Zellzyklus, der Apoptose oder der Angiogenese und somit im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen spielen (Desvergne und Wahli, 1999; Di-Poi et al., 2002; Elstner et al., 2002; Cutler et al., 2003).

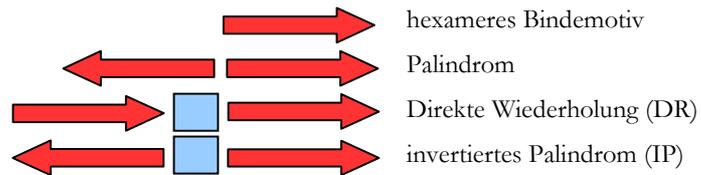
Alle Kernrezeptoren der Superfamilie besitzen einen sehr ähnlichen modularen Aufbau (Abb. 2-4). Am N-terminalen Ende befindet sich die A/B-Domäne, welche die größte Variabilität zwischen den verschiedenen nukleären Rezeptoren aufzeigt (Abb. 2-5). Auf die A/B-Domäne folgt die C-Domäne, welche die DNA-Bindungsdomäne (DBD) darstellt. Die hochkonservierte DBD beinhaltet 2 Zinkfinger-Motive (Freedman et al., 1988; Gronemeyer und Moras, 1995) (Abb. 2-4). Diese sind verantwortlich für die spezifische DNA-Erkennung und -Bindung an bestimmte DNA-Bindemotive (Hormon-responsive Elemente, HRE) in Promotorbereichen von regulierten Genen (Aranda und Pascual, 2001). Diese HREs haben meist hexamere Bindemotive, die einzeln, als direkte Wiederholungen (DR), als Palindrome oder als invertierte Palindrome (IP) vorliegen können. DR und IP können durch 1 bis 5 Basenpaare voneinander getrennt sein (Abb. 2-6). Das hexamere Bindemotiv RGGTCA (R = A oder G) wird von den meisten Mitgliedern der Superfamilie der nukleären Rezeptoren erkannt.



-Abb. 2-5: Aufbau verschiedener nukleärer Rezeptoren (nach Alberts, 2002; modifiziert)

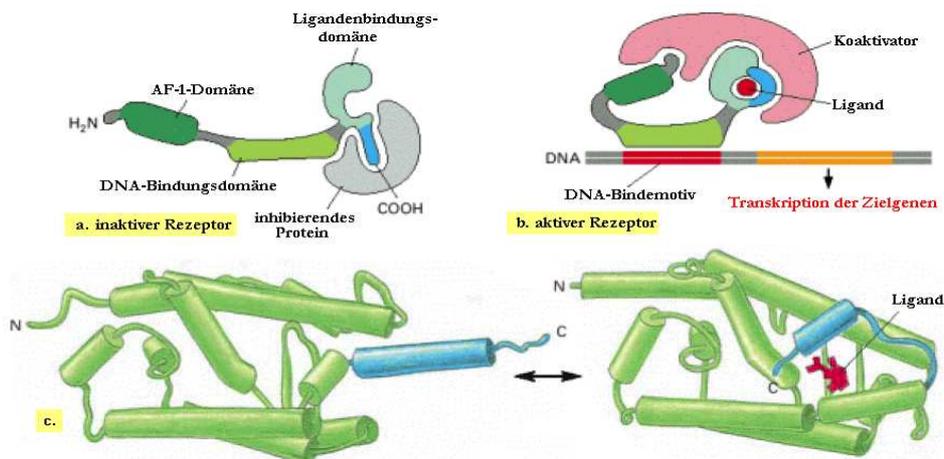


-Abb. 2-4: modularer Aufbau der Superfamilie der Kernrezeptoren



-Abb. 2-6: verschiedene Aufbaumöglichkeiten der HREs

An die etwa 66 bis 70 Aminosäuren-große DBD (Freedman, 1992) schließt sich die Scharnier- oder Hinge-Region (D) an, welche die freie Rotation zwischen DBD und Ligandenbindungsdomäne (LBD) ermöglicht. Anschließend folgt die ca. 250 Aminosäuren-große LBD (bzw. E-Domäne), die am C-terminalen Ende α -Helices (in Form einer antiparallelen, dreilagigen Sandwich-Struktur) sowie β -Faltblätter bildet (Wurtz et al., 1996). In der Helix 12 befindet sich die AF2-Domäne, welche zusammen mit dem sogenannten *signature motif* die Bindung der Liganden vermittelt und dadurch die transkriptionelle Aktivität reguliert (Burmester et al., 1988). Einige der Rezeptoren besitzen zudem eine Region F, für die bisher keine Funktion bekannt ist.



-Abb. 2-7 a.-c.: a. inaktiver Rezeptor
b. aktiver Rezeptor
c. Konformationsänderung des Rezeptors (nach Alberts, 2002; modifiziert)

Nach Bindung von Liganden über elektrostatische Wechselwirkungen an die hydrophobe LBD kommt es zu einer Konformationsänderung der LBD, wodurch die AF2-Domäne exponiert (Abb. 2-7 a.-c.). Dadurch wird einerseits die Bindung des Rezeptors an die DNA stabilisiert und andererseits entsteht eine neue Rezeptoroberfläche an der Kofaktoren und Proteine der basalen

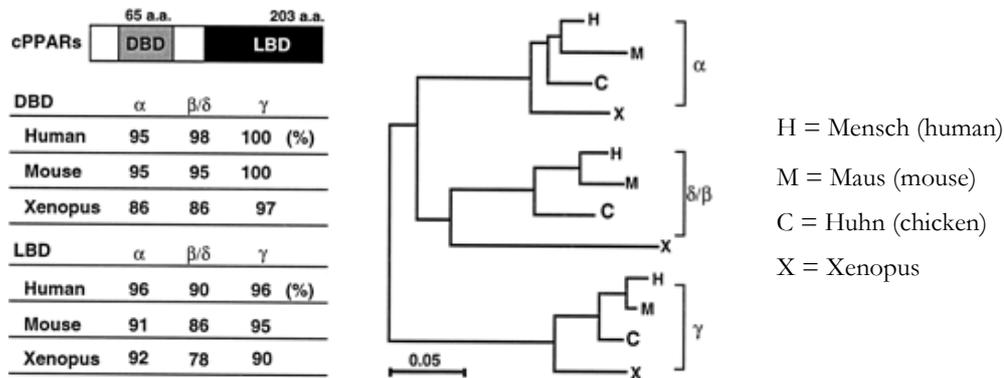
Transkriptionsmaschinerie mit dem Rezeptor interagieren können, wodurch die Transkription des entsprechenden Gens initiiert wird (Wurtz et al, 1996). Bei manchen Rezeptoren, u.a. bei den PPARs und dem VDR, wurde ein Mausefallen-Modell beschrieben (Moras und Gronemeyer, 1998). Diese Konformationsänderung des C-Terminalen Bereichs der LBD (Helix 12) bewirkt, dass die Ligandenbindungstasche verschlossen wird und der Ligand darin eingeschlossen wird. Die meisten Agonisten induzieren eine aktivierend wirkende Konformationsänderung der LBD, wohingegen Antagonisten die Struktur der LBD zerstören oder die Position der Helix 12 so ändern, dass keine Koregulatoren mehr binden können. Die Aktivierung der AF-2 führt neben einer aktivierten Helix 12-Konformation auch zu einer Kofaktorrekrutierung und einer Stabilisierung der Bindung des Rezeptors an die HREs im 5'-Bereich der DNA, meist nahe der transkriptionellen Initiationsstelle. Ein Teil der nukleären Rezeptoren, wie auch die PPARs und der VDRs, binden an ihr HRE bevorzugt als Heterodimer mit RXR. Mit Hilfe der Heterodimerisierung ist es möglich mit einer kleinen Anzahl an Rezeptoren viele funktionell verschiedene Rezeptor-Komplexe zu generieren. Dadurch können nukleäre Rezeptoren über viele verschiedene Signalwege koordiniert wirken. Die Signalübertragung nukleärer Rezeptoren und die Transkription der entsprechend regulierten Gene sind also primär abhängig von der Bindung und Stabilisierung des Rezeptor-Komplexes. Die Transkriptionseffizienz des Zielgens wird aber durch Koaktivatoren und Kointegratoren moduliert, deren Wirkung ihrerseits durch Phosphorylierung moduliert werden kann (Rowan et al., 2000).

2.2.1. PPARs

1990 gelang Isseman und Green das erste Klonen von PPAR cDNA, als diese auf der Suche nach dem molekularen Ziel von Aktivatoren der Proliferation von Peroxisomen, *peroxisome proliferators* (PPs), in der Leber von Nagetieren waren. Auf Grund des beobachteten, starken Anstiegs in Zahl und Größe der Peroxisomen in Hepatozyten bekam die geklonte cDNA den Namen PPAR α (Isseman und Green, 1990; Dreyer et al., 1992). Diesen Effekt schrieb man der gleichzeitigen Aktivitätssteigerung von verschiedenen Enzymen der peroxisomalen β -Oxidation zu (Lock et al., 1989). In menschlichen Zellen führen PPAR Liganden zwar zu einer Aktivierung aber zu keiner Proliferation der Peroxisomen. Daten aus Tiermodellen können dementsprechend nicht ohne Bedenken auf den Menschen übertragen werden (Vamecq und Draye, 1989).

Dreyer et al. (1992) veröffentlichten die Entdeckung und das Klonen von 2 Rezeptoren, die sehr nah mit PPAR α verwandt waren, aber von anderen Genen kodiert wurden und somit PPAR β und PPAR γ benannt wurden. Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten in den Folgejahren über das Klonen dieser 2 Gene in verschiedenen Säugetieren. Man stellte fest, dass die kodierenden

Sequenzen von PPAR α und PPAR γ in den unterschiedlichen Spezies sehr ähnlich sind. Die Sequenzen des dritten PPAR Subtyps variierte dagegen stark. Durch das Klonen des PPAR β des Huhns gelang es durch das Klonen den Stammbaum der PPARs zu zeichnen (Abb. 2-8). Nun war klar, dass es sich bei dem Xenopus PPAR β und dem PPAR δ der Säugetiere um zwei verschiedene Orthologe handelt (Takada et al., 2000).



-Abb. 2-8: Übereinstimmung (in %) der Sequenz der PPARs zwischen den verschiedenen Spezies und daraus gezeichneter Stammbaum (Takada et al., 2000)

Die Familie der PPARs (NR1C) besteht aktuell aus 3 verschiedenen Mitgliedern, die sich sowohl in ihrer Ligandenbindung, genetisch, als auch in ihrer lokalen Expression unterscheiden:

Gen	Proteingröße	Genlokalisierung	Referenz
PPAR α (NR1C1)	468 Aminosäuren	22q12-22q13.1	Sher et al., 1993
PPAR β oder - δ (NR1C2)	441 Aminosäuren	6p21.1-6p21.2	Yoshikawa et al., 1996
PPAR γ (NR1C3)	479 Aminosäuren	3p25	Greene et al., 1995

Alle 3 PPARs wurden in einer Vielzahl von Zelllinien nachgewiesen. Die Stärke der mRNA Expression schwankt allerdings sehr zwischen verschiedenen Geweben. Generell hat man allerdings festgestellt, dass PPAR δ ubiquitär und meist in höheren Konzentrationen als die beiden anderen PPARs exprimiert wird (Desvergne und Wahli, 1999). Unter den Liganden der PPARs befinden sich viele Fettsäuren, die bevorzugt langkettig und ungesättigt sind. Mittlerweile wurden aber auch eine Vielzahl von synthetischen Liganden entwickelt (Tab. 2-1).

Neben spezifischen endogenen und synthetischen Liganden wurden inzwischen alltäglich therapeutisch genutzte Medikamente als PPAR-Liganden identifiziert. So binden Fibrate, wie z.B. Fenofibrat, welche als Lipidsenker erfolgreich zur Therapie der Hyperlipidämie (Bard et al., 1992; Davignon, 2001) eingesetzt werden, vor allem an PPAR α (Schoonjans et al., 1996; Forman et al., 1997; Staels et al., 1998). Thiazolidindione (TZD), zu denen Glitazone gehören, werden als „Insulin-Sensitizer“ in der Therapie des Typ-II-Diabetes mellitus eingesetzt und binden vor allem an PPAR γ (Spiegelman, 1998; Olefsky, 2000; Debril et al., 2001). Ein anderes Beispiel sind die NSAIDs, welche vor allem PPAR α und PPAR γ binden (Lehmann et al., 1997) und zu denen z.B. Ibuprofen gehört, das wegen seiner schmerz- und entzündungshemmenden Wirkung als

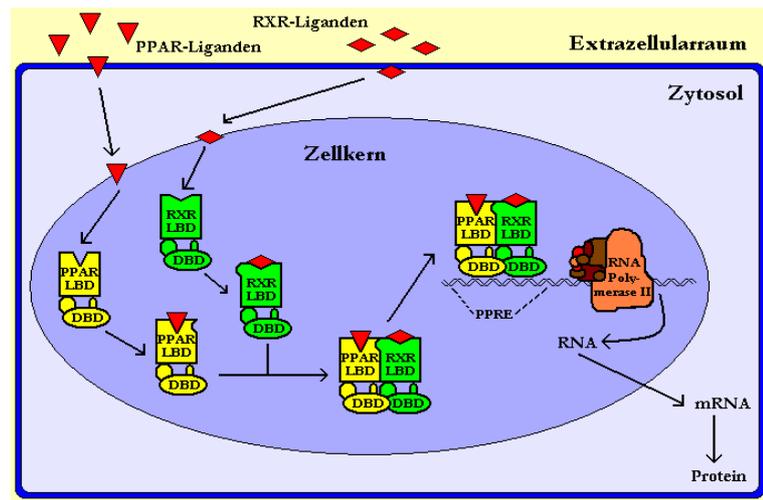
Antirheumatikum eingesetzt wird. Auffällig ist, dass manche Liganden an alle 3 PPARs binden, andere hingegen spezifisch nur an eines der 3 PPARs. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Sequenzen der LBD und DBD der verschiedenen PPARs zu 60 - 80 % untereinander übereinstimmen und dadurch einen sehr ähnlichen Aufbau haben, der sich dennoch leicht unterscheidet (Desvergne und Wahli, 1999).

Liganden	PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
Eicosanoide: Leukotrien B4	+		
Prostaglandin A1, Prostaglandin A2, Prostaglandin D2	+	+	+
Prostaglandin I2 (Prostacyclin), Carbaprostacyclin	+	+	+
15-deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J2	+	+	+
8(S)-Hydroxyeicosatetraensäure (8-HETE)	+		
15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE)	+		+
9-Hydroxyoctadecadiensäure (9-HODE)	+		+
13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE)	+		+
Fibrate: Bezafibrat	+	+	+
Clofibrat, Ciprofibrat, Fenofibrat, WY14643	+		+ (10x<PPAR α)
GW2331	+		+
GW2433	+	+	
NSAIDs: Fenoprofen, Ibuprofen, Indomethacin	+		+
Sulindac		-	+
GW0072, L764406			/+ /
L165041		+	+ (30x<PPAR δ)
Thiazolidinedione (TZD): Ciglitazon, Englitazon, Pioglitazon	+ (<PPAR γ)		+
Rosiglitazon (BRL49653), Troglitazon, DANA87, DANA88	+ (<PPAR γ)		+
KRP297	+ (<PPAR γ)		+
Gesättigte Fettsäuren: Palmitinsäure, Stearinsäure	+	+	
Ungesättigte Fettsäuren: Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure	+	+	+
Linolsäure, Linolensäure, α -Linolensäure, γ -Linolensäure	+	+	+
Oleinsäure, Palmitoleinsäure	+	+	+
Tetradecylthioacidsäure	+ (<PPAR β / δ)	+	+ (<PPAR α)
AD5075, FMOC-Leucin, GW1929, GW2570, GW7845, L805645			+
Bisphenol A diglycidyl (BADGE), GW9662, T0070907			-
GI262570 (Farglitazar), GW409544, SB219994	+		+
GW0742, GW501516		+	
GW6471	-		
GW7647	+	+ (200x<PPAR α)	+ (200x<PPAR α)
GW9578	+		
JTT501	+ (<PPAR γ)		+
L165461, L783483		+	+
L796449, LY171883	+	+	+

Legende: + Agonist; /+ / partialer Agonist ; - Antagonist; < weniger

-Tab. 2-1: Zusammenstellung natürlicher und synthetischer PPAR-Liganden mit der Rezeptorspezifität (nach Sertznig et al., 2007 und Sertznig et al., 2008 modifiziert)

Werden die PPARs durch die Liganden aktiviert, wird die tertiäre Struktur der PPARs verändert. Sie bilden dann mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (9-cis-RA), dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), Heterodimere (Abb. 2-9) (Harmon et al., 1995). Das Heterodimer bindet dann an ein HRE, das bei den PPARs auch *PPAR response element* (PPRE)



-Abb. 2-9: Transkriptionelle Signalübertragung durch PPAR-RXR-Heterodimerbildung

genannt wird (Ijpenberg et al., 1997). Diese PPREs bestehen aus 2 Hexanukleotiden mit der Konsensussequenz AGGTCA, die durch ein einzelnes Nukleotid (N) beim DR1-Typ oder 2 Nukleotide beim DR2-Typ getrennt sind. Welches PPAR-RXR-Heterodimer an das PPRE gebunden wird, hängt von den Nukleotiden zwischen den Konsensussequenzen ab. Diese Sequenzen befinden sich in den Zielgenen, welche den Fett- und Glukosestoffwechsel regulieren und zudem auch eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose spielen (Forman et al., 1995; Palmer et al., 1995; Varanasi et al., 1996; Zhang et al., 1996).

2.2.2. VDR

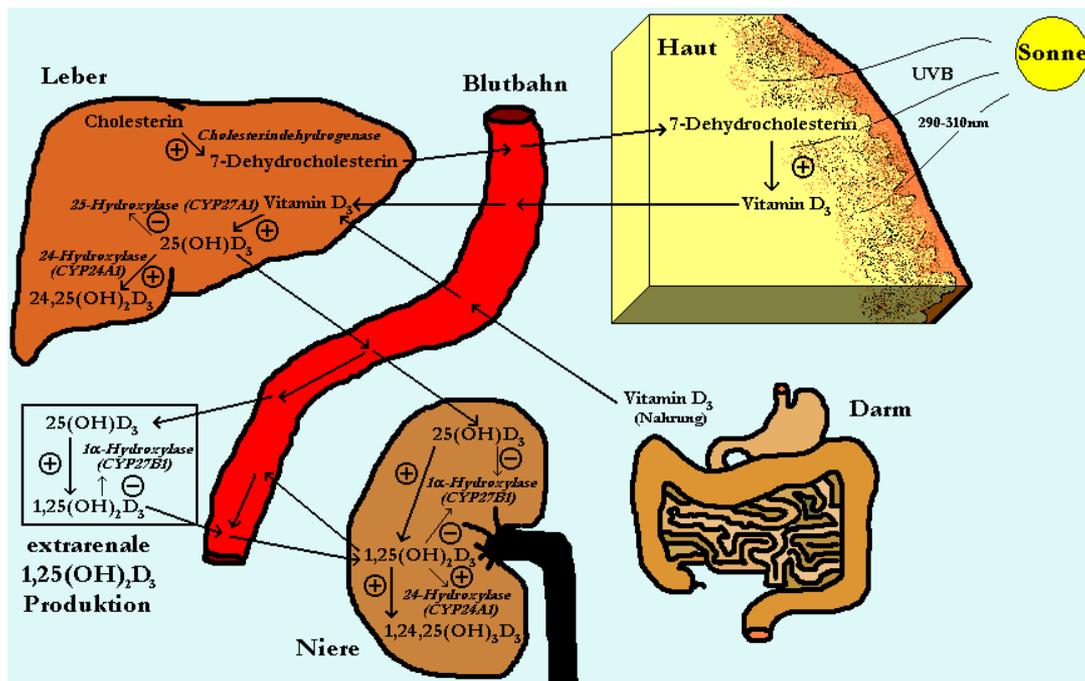
Der VDR wird als klassischer Hormonrezeptor angesehen, da er $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, den aktivsten natürlichen Vitamin D-Metaboliten, mit sehr hoher Affinität ($K_d = 0,1 \text{ nM}$) bindet (Sutton und MacDonald, 2003). Das Gen des menschlichen VDRs (NR1H1) liegt auf dem langen Arm von Chromosom 12 in der Region 12q13-14, umfasst ca. 75 kb und 12 Exons (Pike et al., 1989; Szpirer et al., 1991) und wurde 1988 zum ersten Mal geklont (Baker et al., 1988).

Der VDR besteht aus 427 bzw. 424 Aminosäuren und gehört, wie die PPARs, zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und ähnelt diesen auch in seinem molekularen Aufbau. Nach der Bindung eines Liganden an die LBD kommt es zu einer Konformationsänderung gemäß dem Mausefallen-Modell (Moras und Gronemeyer, 1998). Der VDR bildet bevorzugt Heterodimere mit dem RXR, wie etwa auch die Hälfte der anderen nukleären Hormonrezeptoren. Diese Heterodimere binden an Vitamin D-responsive Elemente (VDREs). Im VDRE trägt das passende Hexamer zum VDR die Konsensussequenz RGKTCA (R = A oder G; K = G oder T). Die einfachen VDREs vom DR3-Typ bestehen oft aus einer Wiederholung des Bindemotivs mit einem Abstand von 3 Nukleotiden. Die stärkste DNA-Bindung erfolgt allerdings zu einem

VDRE (DR4-Typ) mit der wiederholten Konsensussequenz RGTTCA (R= A oder G) die durch 4 Nukleotide getrennt ist (Toell et al., 2000). Es wurden allerdings auch VDREs gefunden, deren Bindemotive durch 6 oder 9 Nukleotiden getrennt sind (Carlberg und Polly, 1998; Schröder et al., 1995). Die Bindung des VDR-RXR-Heterodimers an strukturell verschiedene VDREs erfordert ein hohes Maß an Flexibilität (Carlberg, 1996).

Neben der Hauptwirkung, der Erhöhung der intestinalen Kalzium-Resorption und der Förderung der normalen Knochenmineralisation, nimmt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über die Aktivierung des VDRs Einfluss auf die Zell-Differenzierung, Zellproliferation und Apoptose (Carlberg und Polly, 1998). Neben der chemisch deskriptiven Bezeichnungen gibt für die Vitamin D-Metabolite auch vereinfachte Trivialnamen:

Cholecalciferol	(Vitamin D ₃)	→ Calcidiol
25-Hydroxycholecalciferol	(25(OH)-Vitamin D ₃)	→ Calcidiol
1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol	(1 α ,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ , 1,25(OH) ₂ D ₃)	→ Calcitriol

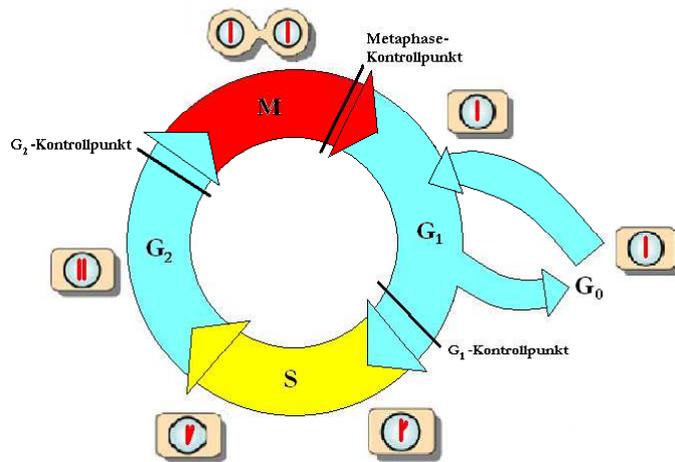


-Abb. 2-10: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Synthese- und Abbauweg

Etwa 80 - 100 % der vom Menschen benötigten Menge an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird in der Haut, der Leber und der Niere aus 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D₃) synthetisiert (Holick, 1994; Holick, 2002) (Abb. 2-10). Die Niere stellt auch den Hauptabbauort von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dar. Hierbei spielt die 24-Hydroxylase eine entscheidende Rolle. Das entstandene $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ hat eine 5-fach geringere biologische Aktivität als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Das Gen der 24-Hydroxylase, CYP24A1, wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mehr als 10000-fach induziert und ist ein Biomarker für dessen Wirkung (Lemay et al., 1995). Bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Überschuss wird auch $25(\text{OH})\text{D}_3$ in der Leber in $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt. Ob $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eigenständig biologische Wirkungen ausübt, ist unbekannt (Norman et al., 2002).

2.3. Einfluss der PPARs auf Zellwachstum und -differenzierung

Maligne Tumore entstehen, wenn Zellen in ihrer Entwicklung gestört werden und nicht mehr ausdifferenzieren können. Die unkontrollierte Vermehrung der Zellen beruht oft auf einer Störung des Zellzyklus (Abb. 2-11). Die Dauer und der Ablauf der verschiedenen Phasen des Zellzyklus werden durch verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen reguliert. Diese Regulatoren werden in den verschiedenen Phasen periodisch an- und abgeschaltet und sind in Tumoren oft mutiert.



-Abb. 2-11: schematische Darstellung des Zellzyklus:
 - G₀-Phase: Ruheperiode (Dauer: variabel)
 - G₁-Phase: Wachstumsphase (Dauer: variabel)
 - S-Phase: DNA-Synthesephase (Dauer: ~8 h)
 - G₂-Phase: Reparaturphase (Dauer: ~4 h)
 - M-Phase: Mitose, Kern- & Zellteilung (Dauer: ~3 h)

Sowohl die PPARs als auch der VDR spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose aber auch bei der Angiogenese und somit in der Entstehung von Tumoren. Bei kurzer Behandlung mit PPAR-Liganden kommt es zuerst zu einer erhöhten Expression von wachstumsregulierenden Genen und danach zu einem früheren Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus (Ledwith et al., 1996). Außerdem inhibieren sie die Apoptose der Zellen.

Diverse *in vitro* und *in vivo* Studien haben den Effekt von PPAR-Liganden auf Melanozyten und Melanomzellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass der PPAR α -Agonist WY14643 und der PPAR γ -Agonist Ciglitazon einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von primär kultivierten humanen Melanozyten (NHM) hatten (Lee et al., 2007). Diese Wachstumshemmung wurde von einer Veränderung der Morphologie der Melanozyten begleitet. Sie gingen in eine aktivierte Form über, indem sie größer wurden und die Zahl ihrer Dendriten vermehrten. Auch die Melaninsynthese wurde durch eine erhöhte Expression der Tyrosinase als durch die Stimulierung der Tyrosinaseaktivität gesteigert (Kang et al., 2004; Lee et al., 2007). In menschlichen Melanomzellen (SK-Mel188) wurde die Zellmigration *in vitro* durch Behandlung mit PPAR α -Agonisten gehemmt (Grabacka et al., 2006). Fettsäuren (wie z.B. DHA) und Glitazone inhibierten außerdem in einer Reihe von Melanomzelllinien die Proliferation (Albino et al., 2000; Freudlsperger et al., 2006). Welche PPAR-Liganden in welchen Melanomzelllinien den stärksten antiproliferativen Effekt haben, ist noch nicht bekannt.

PPAR δ wird dagegen ein antiapoptotischer Effekt zugeschrieben der z.B. Epithelzellen länger überleben lässt und deren Differenzierung fördert (Braissant und Wahli, 1998; Wahli, 2002; Di-Poi et al., 2003). Zudem gibt es zunehmend Hinweise, dass PPAR δ in der Angiogenese eine Rolle spielen könnte (Margeli et al., 2003) und eine proliferationsfördernde Funktion bei der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen hat (Jaeckel et al., 2001; Nijsten et al., 2005). Eine erhöhte PPAR δ -Expression scheint in vielen Tumoren einen positiven Einfluss auf die Prognose zu haben (Müller und Kersten, 2003; Reed et al., 2004). Welche Rolle PPAR δ in der Ätiologie und Pathogenese des malignen Melanoms spielt ist noch unbekannt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den meisten Geweben eine Aktivierung von PPAR α oder PPAR γ einer Krebsentstehung entgegen wirken kann. PPAR α wirkt antiinflammatorisch, fördert die Zelldifferenzierung und schützt die Zellen vor oxidativen Schäden. PPAR γ wird in verschiedenen Tumoren überexprimiert und kontrolliert das Tumorstadium, indem es als Tumorsuppressor wirkt (Sarraf et al., 1998). PPAR γ -Agonisten induzieren die Differenzierung und verhindern das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* durch Zellzyklusarrest und Auslösung der Apoptose (Tontonoz et al., 1997; Kubota et al., 1998; Sarraf et al., 1998; Desvergne und Wahli, 1999; Elstner et al., 2002). Die Rolle von PPAR δ in der Karzinogenese ist noch ungeklärt, da PPAR δ sowohl prokanzerogene (Verhinderung der Apoptose und Förderung der Migration) als auch antikanzerogene (Abnahme der Proliferation) Effekte hat.

2.4. Einfluss des VDRs auf Zellwachstum und -differenzierung

Nicht nur den PPARs wird ein möglicher Einfluss auf Tumorzellen zugeschrieben. Auch der VDR hat neben seinen Funktionen im Mineralhaushalt auch antiproliferative Effekte. In *in vivo* und *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$ die Differenzierung induzieren kann und die Proliferation von Zellen und somit die Entstehung und das Wachstum von Krebszellen hemmen kann. Schon 1936 fiel Peller auf, dass Sonnenlichtexposition zwar vermehrt Hautkrebs auslöste, andere Krebsarten dafür aber weniger auftraten (Peller, 1936). Dies wurde auch von Apperly (1941) in einer epidemiologischen Studie in Nordamerika beobachtet, bei der Patienten mit Krebserkrankungen häufiger in höheren Latituden vorkamen (Apperly, 1941). Als man Anfang der neunziger Jahre erneut epidemiologische Studien in Nordamerika durchführte, stellte man fest, dass eine niedrige Sonnenlichtexposition mit einer Erhöhung der Mortalität vor allem bei Kolon- (Garland et al., 1989), Brust- (Garland et al., 1990), Ovarial- und Prostatakrebs (Hanchette und Schwarz, 1992) einherging. Allerdings konnte eine Erhöhung der 1,25(OH) $_2$ D $_3$ Serum-Konzentration selbst bei sehr hohen Mengen von zugeführtem Vitamin D und zusätzlicher Sonnenlichtexposition nicht festgestellt werden (Jacobus et al., 1992, Holick, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass neben der Niere auch Zellen der Prostata und des Kolons und Keratinozyten mittels einer 1α -Hydroxylase das zirkulierende $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umwandeln können (Bikle et al., 1986; Lehmann, 1997; Schwartz et al., 1998; Tangpricha et al., 2001; Cross et al., 2001;). Man schlussfolgerte, dass Menschen, die in niedrigeren Latituden wohnen, höhere $25(\text{OH})\text{D}_3$ Spiegel haben und dieses dann direkt in den Organen (Kolon, Brust, Prostata,...) in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt wird und an Ort und Stelle das Zellwachstum reguliert. Mehrere Studien zeigten, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in pharmazeutischen d.h. hohen Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) sowohl prodifferenzierend wirkt, als auch die Apoptose einleitet und sogar die Zellmigration durch die Hemmung von Serin- und Metalloproteinasen verhindert (Studzinski und Moore, 1995; Van Leeuwen und Pols, 1997). Diese Effekte konnten in zahlreichen malignen als auch nicht-malignen Zelllinien beobachtet werden, sofern sie den VDR exprimierten.

Seit einigen Jahren wird das therapeutische Potential von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als antiproliferatives Agens im klinischen Einsatz vor allem in der Tumorbehandlung als auch in der Behandlung der Psoriasis genutzt. Systemische Therapie mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt aber häufig zu hyperkalzämischen Nebenwirkungen. Deswegen wurden in den letzten Jahren vermehrt Vitamin D_3 -Analoge entwickelt, deren Effekte auf die Zelldifferenzierung und -proliferation dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ähnlich sind, aber weniger Einfluss auf den Kalziumhaushalt haben. Vor allem diese Metabolite könnten eine wichtige Rolle in der Vorbeugung und Therapie von Krebs spielen (Stein und Wark, 2003). Da auch Melanomzelllinien wie z.B. MeWo den VDR exprimieren (Reichrath et al., 2007), ist eine therapeutische Nutzung von Vitamin D-Analoga als antiproliferatives Agens denkbar.

2.5. *Cross talk* zwischen den PPAR- und VDR-Signalwegen

Cross talk werden zelluläre Mechanismen bezeichnet die Einfluss auf die Regulation der Gene haben. Hierzu zählen unter anderem die zelluläre Rezeptor-Stöchiometrie, aber auch die Konkurrenz um Partnerrezeptoren und um Kofaktoren. Ein *cross talk* zwischen den PPAR- und VDR-Signalwegen ist sehr wahrscheinlich, da die PPARs und der VDR zur gleichen Superfamilie der Kernrezeptoren gehören und beide bevorzugt Heterodimere mit einem der RXR ($\text{RXR}\alpha$, β , γ) bilden. Vor allem $\text{RXR}\alpha$ scheint optimal positioniert, um die transkriptionelle Aktivität seiner Bindungspartner zu regulieren (Floyd et al., 2006). $\text{RXR}\alpha$ spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Bildung und der malignen Transformation von epidermalen und melanozytären Tumoren in Mäusen (Indra et al., 2007). $\text{RXR}\alpha$ -vermittelte Prozesse könnten dementsprechend eine wichtige Rolle in der UV-induzierten Tumorigenese und somit der Formation von Nävi und der Progression zu Melanomen spielen (Indra et al., 2007).

In einer Vielzahl von Geweben werden die PPARs und der VDR koexprimiert (Berger und Moller, 2002). In einem Tierversuch mit SAM-P/6-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die PPAR- und VDR-Signalwege sehr eng zusammenhängen. Die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibierte die Adipogenese und führte gleichzeitig zu einem Abfall der mRNA- und Proteinexpression von $\text{PPAR}\gamma$ um 50 % (Lemon und Freedman, 1996; Duque et al., 2004). Vor kurzem konnte zudem gezeigt werden, dass das $\text{PPAR}\delta$ -Gen in Brust- und Prostatakrebszellen ein Zielgen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist (Dunlop et al., 2005). Zusätzlich hat man auf dem $\text{PPAR}\delta$ -Gen in der Brustkrebszelllinie MCF-7, 350 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart, ein potentes DR3-Typ VDRE identifiziert (Dunlop et al., 2005). Dieser VDRE-Typ wurde auch in anderen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -responsiven Genen, wie dem CYP24A1, gefunden (Chen und DeLuca, 1995). Dies sind Hinweise für eine bidirektionale Verbindung zwischen den Signalwegen von $\text{PPAR}\delta$ und dem VDR in Brust- und Prostatakrebszellen (Dunlop et al., 2005). Ob es einen ähnlichen *cross talk* auch in Melanomzellen gibt, ist bisher nicht untersucht worden.

2.6. Ziele der Arbeit

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Ernährung eine wichtige Bedeutung sowohl für die Entstehung als auch die Progression von Krebserkrankungen hat. Konsequenterweise ist das Gebiet der *nutrigenomics*, d.h. der Bedeutung diätischer Faktoren für die Regulation von Genen und deren physiologische Auswirkungen, aktuell Gegenstand intensivster Forschungsbemühungen. Ziel der Arbeit war die Charakterisierung von zwei Gruppen von Kernrezeptoren (PPAR und VDR), deren Liganden durch die Nahrung oder andere Umwelteinflüsse (UVB-Strahlung) vom Körper aufgenommen oder gebildet werden. Die Behandlung von Melanomzellen, primär kultivierte humane Melanozyten (NHM) und nicht-melanozytären Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und/oder PPAR-Liganden sollte zeigen welche Einflüsse diese Liganden auf das Wachstum der Zellen und die PPAR- und VDR-Expression haben.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

Frage 1: Welchen Einfluss hat die Kulturdauer auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

Frage 2: Werden die PPARs und der VDR in MeWo-Zellen exprimiert? Hat die Kulturdauer einen Einfluss auf die Expression der PPARs und des VDRs in MeWo-Zellen?

Frage 3: Welchen Einfluss hat die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

Frage 4: Welchen Einfluss hat die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?

Frage 5: Haben andere Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytäre Zelllinien ein ähnliches basales Expressionsmuster der Kernrezeptoren wie MeWo-Zellen?

- Frage 6: *Kommt es nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung in den anderen Melanomzelllinien, in NHM und in den nicht-melanozytären Zelllinien zu ähnlichen Expressionsveränderungen der Kernrezeptoren wie in MeWo?*
- Frage 7: *Welchen Einfluss hat die Behandlung mit PPAR-Liganden auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?*
- Frage 8: *Welchen Einfluss hat die Behandlung mit PPAR-Liganden auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?*
- Frage 9: *Welchen Einfluss hat die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?*
- Frage 10: *Welchen Einfluss hat die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?*
- Frage 11: *Welchen Einfluss hat die Behandlung mit Calcipotriol-Analoga auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?*
- Frage 12: *Welchen Einfluss hat die Behandlung mit Calcipotriol-Analoga auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?*
- Frage 13: *Gibt es Hinweise auf einen cross talk der PPAR- und VDR-Signalwege in den MeWo-Zellen?*

Die Ergebnisse könnten weitere Hinweise auf einen funktionellen *cross talk* zwischen den Signalwegen des VDRs und den PPARs in Melanomzellen liefern. Sie könnten als Grundlage für weitergehende funktionelle molekularbiologische Untersuchungen dienen. Diese müssen zeigen, ob und in welcher Form PPAR-Liganden allein oder in Kombination mit 1,25(OH)₂D₃ in der Prävention oder Therapie des malignen Melanoms eine Rolle spielen können.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Kits und Lösungen

● 2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
● Agarose	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim, Deutschland
● Ethanol (absolut)	Riedel de Haën, Seelze, Deutschland
● Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
● Isopropanol	Hedinger GmbH & Co, Stuttgart, Deutschland
● Kristallvioletpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
● Omniscript Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
● QIAshredder	Qiagen, Hilden Deutschland
● RNasin	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
● RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
● RQ1 RNase-free DNase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
● RQ1 DNase Buffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
● Sybr Green Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
● Trizol LS Reagent	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
● Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

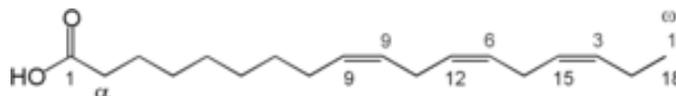
Alle übrigen nicht extra erwähnten Chemikalien und Reagenzien stammen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Hedinger GmbH & Co (Stuttgart, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland), Promega GmbH (Mannheim, Deutschland).

Stammlösungen:

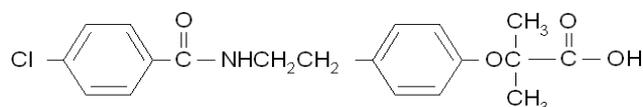
● Elektrophoresepuffer (10 x)	● PBS (10 x)
2,5M Tris-HCl, pH 8,8	1,37 M NaCl
1,92 M Glycin	27 mM KCl
350 mM SDS	80 mM Na ₂ HPO ₄
	15 mM KH ₂ PO ₄
● Kristallviolett-Lösung (Stammlösung)	● TBE-Puffer (5 x) (für 1 Liter)
1 % Kristallvioletpulver	54 g Tris-HCl, pH 8,0
20 % EtOH abs.	27,5 g Borsäure
Arbeitslösung: 1:10 mit EtOH 20 % verdünnen	20 ml 0,5 M EDTA

3.1.2. Liganden

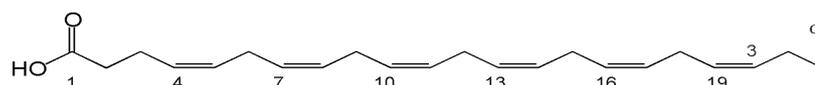
- α -Linolensäure (ALA, 18:3n-3): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland



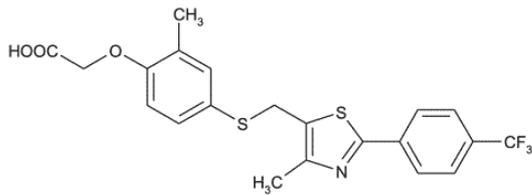
- Bezafibrat: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland



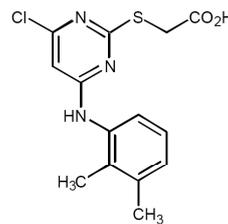
- Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland



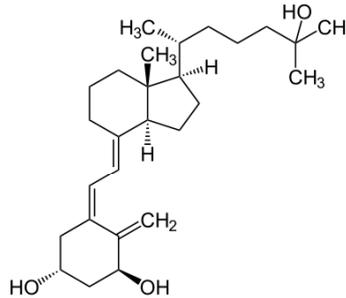
- GW501516: Alexis/Axxora, Lörrach, Deutschland

PPAR δ spezifisch

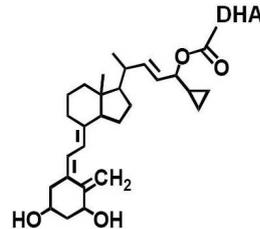
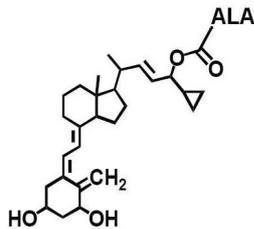
- WY14643: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

PPAR α spezifisch

- 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Calcitriol):
Lise Binderup, Leo Pharmaceuticals,
Ballerup, Dänemark



- Calcipotriol- α -Linolensäure
(Calcipotriol-ALA, Calcipotriol-18:3n-3):
Amnon C. Sintov Ph. D., Ben Gurion University of the Negev, Israel
- Calcipotriol-Docosahexaensäure
(Calcipotriol-DHA, Calcipotriol-22:6n-3):



3.1.3. Zelllinien, Zellkulturmedien und -lösungen

- Zelllinien:
 - MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25 und SK-Mel-28 sind Zellen von Patienten mit malignem Melanom. MeWo-Zellen wurden aus einer Lymphknotenmetastase (Carey et al., 1976) gewonnen. SK-Mel-5 sind Zellen aus einer Hautmetastase eines Melanoms. SK-Mel-25 ist eine Zelllinie aus einem metastasierten malignen Melanom. Die Zelllinie SK-Mel-28 wurde aus einem nicht-metastasierten kutanen Melanom eines 51-jährigen Patienten gewonnen. SK-Mel-28 ist genau wie MeWo auch Vitamin D-sensibel, während SK-Mel-5 und SK-Mel-25 zu den Vitamin D-resistenten Zelllinien zählen (Seifert et al., 2004).
 - Primär kultivierte humane Melanozyten (NHM) waren die einzigen Zellen, die nicht immortalisiert sind und somit nicht unendlich kultiviert werden konnten. Sie wurden aus menschlicher Vorhaut (Phimose-Patienten aus der urologischen Universitätsklinik Homburg) isoliert. Dazu wurde das Präparat zunächst mit der Epidermis nach unten auf einer 10 cm Kulturschale ausgebreitet, mit Präparationsbesteck das Subkutangewebe entfernt und in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden in einem 50 ml Reagiergefäß mit 5 ml 10 x Trypsin gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Ablösen der Epidermis mit dem Skalpell wurde diese in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 0,7 mM EDTA in PBS gegeben. Das Gewebegemisch wurde vorsichtig gevortext um eine Einzelzellsuspension zu erhalten und bei 1200 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in

Melanocyte Growth Media kultiviert, wobei dem Medium Supplementmix, 1 % P/S sowie Amphotericin B (0,25 mg/ml) hinzugefügt wurden. Um das Anwachsen der Zellen zu fördern, wurde noch 500 µl FCS zugegeben. Um eine Reinkultur von Melanozyten wurde die Mischkultur für 2 Tage mit G418 (Genetecin, 400 ng/ml) behandelt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach täglich durchgeführtem Mediumwechsel wurde am 6. Tag bei weiterhin vitalen Fibroblasten eine erneute Behandlung mit G418 durchgeführt.

- SCL-1 sind wenig differenzierte menschliche Plattenepithelkarzinomzellen (Boukamp et al., 1982).
 - Die Zellen der SZ95-Zelllinie sind immortalisierte humane Sebozyten, welche in Kultur die gleiche Morphologie und Sebozyten-spezifischen Marker wie primäre Sebozyten haben (Zouboulis et al., 1999). Die Zellen wurden dem Labor freundlicherweise von Prof. Zouboulis (Universitäts-Hautklinik, Charité, Berlin) überlassen.
 - HEK293 ist eine humane embryonale Nierenepithelzelllinie. Diese Zelllinie wurde dem Labor freundlicherweise von Prof. Welter (Humangenetik, Homburg/Saar) überlassen.
 - HepG2 sind humane Hepatoblastomzellen mit epithelialer, hochdifferenzierter Morphologie, welche aus dem Leberkarzinom eines 15-jährigen kaukasischen Argentiniers gewonnen wurden (Aden et al. 1979). Steffie Becker (Frauenklinik der Universität Lübeck) überließ uns freundlicherweise diese Zelllinie.
 - Die LNCaP-Zelllinie („Lymph Node Carcinoma of the Prostate“) ist eine androgenabhängige menschliche Prostatakarzinomzelllinie, die 1977 der supraclaviculären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Mannes mit Prostata-Adenokarzinom gewonnen wurde (Horszewicz et al., 1983).
 - MCF-7 ist eine humane Mammakarzinom-Zelllinie, die 1973 aus einem pleuralen Erguss einer 69-jährigen kaukasischen Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom gewonnen wurde. Die gut differenzierte Zelllinie ist eine der am besten charakterisierten steroidhormonrezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinien (Soule et al., 1973).
- Zellkulturmedien und -lösungen:
 - Ammoniumperoxodisulfat (APS) PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Amphotericin B PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - DMEM PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 - fötales Kalbserum (FCS) PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - G418 (Genetecin) PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Gentamicin PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - L-Glutamin PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Melanocyte Growth Media PromoCell, Heidelberg, Deutschland
 - Melanocyte Supplementmix PromoCell, Heidelberg, Deutschland
 - Penicillin / Streptomycin PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Rinder-Serumalbumin (BSA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 - RPMI 1640 Medium PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Sebomed Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 - Trypsin PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
 - Trypsin/EDTA PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

3.1.4. Primer

Bei der reversen Transkription wurden Random Primer (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) benutzt. Bei den RT-PCR Versuchen wurden verschiedene Primer (Tab. 3-1) eingesetzt. Alle Primer wurden ständig auf Eis gehalten oder bei -20 °C gelagert. Die PPAR Primer, bestehend aus einem Mix des forward- und reverse-Primers, wurden lyophilisiert geliefert und wurden mit 1,1 ml TE (pH 8,0) aufgelöst. Bei allen anderen Primer musste der forward- und reverse-Primer vor Gebrauch jeweils zu einem Primermix vermischt und 1:10 verdünnt werden.

Primer	Sequenz	Hersteller
PPAR α	QuantiTect Primer Assay (QT00017451)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PPAR δ	QuantiTect Primer Assay (QT00078064)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PPAR γ	QuantiTect Primer Assay (QT00029841)	Qiagen, Hilden, Deutschland
β 2- μ globulin foward	5'- CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3'	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
β 2- μ globulin reverse	5'- GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3'	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
CYP24A1 foward	5'- GCA GCC TAG TGC AGA TTT-3'	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
CYP24A1 reverse	5'- ATT CAC CCA GAA CTG TTG-3'	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
VDR foward	5'-CCA GTT CGT GTG AAT GAT GG-3'	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
VDR reverse	5'- GTC GTC CAT GGT GAA GGA-3'	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

-Tab. 3-1: Liste der benutzten Primer

3.1.5. Geräte

- Brutschrank: Forma scientific Modell 3336 (Labortect Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Drehschüttler: Coulter mixer (Coulter Electronics, Hertfordshire, UK)
- Eismaschine: Tritec Gesellschaft für Labortechnik und Umweltsimulation mbH, Hannover, Deutschland
- Gefrierschrank (-20°C): Privileg (Quelle, Fürth, Deutschland)
- Gefrierschrank (-70°C): Ultra-low freezer (Sanyo Biomedical Europe B.V., Az Etten Leur, Niederlande)
- Gelelektrophorese-Kammer für (SDS-PAGE): Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Heizblock: Thermoleader (Uniequip Laborgerätebau und Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland)
- Kühlschrank: BBC SL240 (Brown, Boveri & Cie AG, Mannheim, Deutschland)
- Mikroskope:
 - Leica DMIL (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
 - Hund Medicus (Hund, Wetzlar, Deutschland)
 - Mikroskop mit Kamera:
 - Mikroskop: Diavert (Leitz, Wetzlar, Deutschland)
 - Kamera: CF 8/1 81126 (Kappa, Gleichen, Deutschland)
 - Lichtquelle (Leitz, Wetzlar, Deutschland)
 - Drucker: Video graphic printer UP850 (Sony, Berlin, Deutschland)
 - Monitor: Hitachi, Hamburg, Deutschland
- Netzgerät (Gelelektrophorese): Power Pack P30 (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Fotometer:
 - Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
 - Titertek Multiskan Plus MK II (Labsystems, Helsinki, Finnland)
- RT-PCR-Gerät: LightCycler 1.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Sterile Werkbank: Lamin Air HLB2472 GS (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
- UV-Lampe (Agarosegel): Biometra UV Transilluminator TI2 (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Vortex: Heidolph Reax 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland)
- Wärmebad:
 - Julabo U3 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland)
 - Precitherm PFV (Labora Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

- Wiegeschüttler: KL1 (Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland)
- Zentrifugen:
 - Biofuge fresco (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
 - Megafuge 1,0 R (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
 - Microcentrifuge Force 6 (Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland)

3.1.6. Sonstige Materialien

- Einfrierröhrchen: 1 ml Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Wiesbaden)
- Flüssiger Stickstoff (-196°C): Air liquide Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
- Handschuhe: Peha-soft (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland)
- Kapillaren: LightCycler capillaries (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Kühlblock für LightCycler Kapillaren: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer: Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm² (Blaubrand, Brand, Deutschland)
- Pipetten:
 - Gilson Pipetman (Gilson, Villiers-le-Bez, Frankreich)
 - Multipette plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettierhelfer: Accujet (Brand GmbH & Co KG, Wertheim/Main, Deutschland)
- Pipettenspitzen: Biosphere Qualitätsspitzen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäße: 1,5 ml Reagiergefäße (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland)
- Stickstoffbehälter: Arpege 55 (Air liquide Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Stickstofftank: Apollo 100 (Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland)
- Vakuum-Filterssystem: Steritop-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Zellkulturmaterialien:
 - 10 cm Kulturschalen Cellstar (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
 - 15 ml Reagiergefäße Cellstar (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
 - 50 ml Reagiergefäße Cellstar (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
 - 24-Well-Mikrotiterplatten (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
 - 96-Well-Mikrotiterplatten Nunclon Surface (Nunc, Roskilde, Dänemark)
 - Zellschaber (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

3.1.7. Computerprogramme und Datenbanken

- Alle benutzten Rechner waren mit den Betriebssystemen Windows 98 oder Windows XP ausgestattet.
- RT-PCR Auswertung:
 - LightCycler-Software (Front): Version 3.5.17
 - LightCycler-Software für PCR-Reaktion (Run): Version 5.32
 - LightCycler-Software zur Analyse der Daten (Data Analysis): Version 3.5.28
 - LightCycler-Software zur graphischen Darstellung (Graphic Works): Version 10.0.7
 - Berechnung der normalisierten Ratio, Erstellung der Coefficient Files, Abgleichung der Standardkurve: RelQuant Version 1.01
- Statistischen Auswertung und graphischen Darstellung: Microsoft Excel 2000
- Textverarbeitung: OpenOffice.org 2.1, Microsoft Word 2000
- Präsentationen: Microsoft PowerPoint 2000
- Literaturrecherche:
 - „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
 - Suchmaschinen: Google (www.google.de), Yahoo (www.yahoo.de)

3.2. Zellbiologische Methoden

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Partialdruck und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zur Aufzucht der Zellen dienten 10 cm Kulturschalen in welche Medium und Supplementation in folgenden Konzentrationen zugegeben wurden (Tab. 3-2):

Zelllinie	Medium	Supplementation
MeWo	RPMI 1640	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
SK-Mel-5	RPMI 1640	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
SK-Mel-25	RPMI 1640	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
SK-Mel-28	RPMI 1640	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
NHM	Melanocyte Growth Media	Supplementmix: 0,4 % BPE + 1 ng/ml bFGF + 5 µg/ml Insulin + 0,5 µg/ml Hydrocortison + 10 ng/ml PMA + 1 % P/S + 0,05 % Amphotericin B
LNCaP	RPMI 1640	5 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
SZ95	Sebomed	10 % FCS + 0,002 % epidermal growth factor (EGF) + 1 % P/S
SCL-1	RPMI 1640	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
HepG2	DMEM	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
HEK293	DMEM	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S
MCF-7	DMEM	10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S

-Tab. 3-2: verwendete Zelllinien und deren Medium

In den Versuchen wurde zudem allen benutzten Medien mittels Vakuump-Filterssystem 10 mg/ml sterilfiltriertes BSA hinzugefügt, welches das 1,25(OH)₂D₃ löst und ein Binden an das Plastik der Kulturschalen und der Pipettenspitzen verhindert (Lehmann et al., 1998).

3.2.1. Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit 500 µl einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und mit 5 ml Medium in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 4 °C und 1200 U/min 10 min zentrifugiert und der Überstand im Anschluss abgesaugt. Die Zellpellets wurden mit 500 µl Medium mit 40 % FCS resuspendiert und auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurde unter Schütteln 500 µl Medium mit 20 % DMSO, ein für hydrophile und lipophile Substanzen gleichermaßen geeignetes Lösungsmittel, tropfenweise hinzugegeben. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, welche die Zelle schädigen. Die fertige Suspension wurde in vorgekühlte Kryogefäße gegeben. Um die Zellen nicht schlagartig auf -80 °C abzukühlen, wurde eine dickwandige Styroporbox verwendet (optimale Abkühlung ca. 1 °C/min). Nach 24 h Lagerung bei -80 °C wurden die präparierten Kryogefäße möglichst rasch in einem mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) gefüllten Lagerbehälter dauerhaft gelagert.

3.2.2. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß erst in ein 37 °C warmes Wasserbad getaucht. In bereits angetautem Zustand wurde dann der Inhalt des Kryogefäßes in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. 20 ml Medium wurden langsam, tropfenweise und unter ständigem Schütteln auf die Suspension gegeben damit das DMSO aus den Zellen diffundieren konnte. Das DMSO dient nicht nur als Frostschutzmittel, sondern stellt bei Temperaturen von über 20 °C ein wirksames Zellgift dar und muss deswegen vor dem Kontakt mit den Zellen stets gekühlt werden. Die Zellen wurden bei 4 °C und für 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert und das überstehende Medium mit dem DMSO vorsichtig entfernt. Das zelluläre Pellet wurde mit 6 ml frischem Medium mit FCS resuspendiert und auf Petrischalen verteilt. Die Schalen wurden bei 37 °C und 5 %-iger CO₂-Atmosphäre in den Brutschrank gestellt und am folgenden Tag mit frischem Medium versorgt.

3.2.3. Zellpassagierung

Da nach ein paar Tagen die meisten Nährstoffe des Mediums verbraucht waren, wurde letzteres mindestens 2 x wöchentlich gewechselt. Zu einer Verschlechterung der Wachstumsbedingungen und sogar einem Absterben der Zellen kam es, wenn die Kulturschalen zu dicht zugewachsen (konfluent) waren. Deswegen erfolgte eine Passagierung der Zellen bei einer Konfluenz von 80 - 90 %. Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen 2 x mit 5 ml sterilem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl einer Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben um die Zellen vom Kunststoffboden der Schale zu lösen. Trypsin spaltete dabei die Adhäsionsproteine der Zellen, während das EDTA alle zweiwertigen Kationen (Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen) band. Durch zusätzliche, leicht seitliche Schläge gegen die Zellkulturschale wurde das Loslösen der Zellen vom Kunststoffboden erleichtert. Das Trypsin sollte allerdings nicht zu lange mit den Zellen in Berührung bleiben, da es die Zellen abtöten kann. Die abgelösten Zellen, welche im Hellfeldmikroskop kugelförmig erschienen, wurden in neue Zellkulturschalen mit frischem Medium (5 ml) gegeben. Durch das im Medium zugesetzte FCS und die Inkubation bei 37 °C wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert.

3.2.4. Zählen und Aussäen der Zellen

Um eine bestimmte Menge von Zellen auszusäen, musste zuerst die Anzahl der Zellen pro ml Suspension festgestellt werden. Dazu wurden konfluent gewachsene Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und durch Medium in Suspension gehalten. Zur Zellzählung

wurde ein Haemocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer (Neubauer-Zählkammer) benutzt, welches vor Gebrauch mit EtOH gereinigt wurde. Der Haemocytometer ist ein spezieller Objektträger mit zugehörigem Deckglas, welches leicht befeuchtet und unter geringem Druck auf den Objektträger geschoben wird. Dabei treten regenbogenartige Lichtinterferenzeffekte, sogenannte Newton'sche Ringe auf, welche ein Hinweis für den richtigen Abstand (0,1 mm) zwischen Deckglas und Objektträger sind. Bei korrektem Abstand passt ein Volumen von 0,1 µl in die Zählkammer. Das Zählen der Zellen erfolgte durch auf dem Objektträger aufgezeichneter Quadrate. Dabei bestanden die 4 Quadrate aus jeweils 16 Einzelfeldern. Um eine Lebendzellzahlbestimmung durchzuführen, wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Die Trypanblaulösung besteht aus 4 Teilen einer Trypanblau-Stammlösung (0,2 g Trypanblau auf 100 ml H₂O_{dd}) und 1 Teil einer NaCl-Stammlösung (0,425 g NaCl auf 100 ml H₂O_{dd}). 50 µl der Zellsuspension wurden dann mit 50 µl Trypanblaulösung vermischt. Ein Teil dieser Mischung wurde mit einer Pipette auf den Objektträger aufgetragen und unter dem Mikroskop betrachtet. Der Farbstoff Trypanblau kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren, wohingegen das Zytoplasma abgestorbener Zellen blau gefärbt wird. Somit kann man die Vitalität einer Zelllinie bestimmen. Nach dem Auszählen der 4 Quadrate kann die Zellzahl pro ml mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl} : 4 (\text{Quadrate}) \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4$$

3.2.5. Behandlung der Zelllinien mit Liganden

Bei allen Versuchen wurden die Zellen nach dem Aussähen zuerst bebrütet, damit sie anwachsen konnten und erst nach 48 h zum ersten Mal behandelt. Die Terminologie „nach X h Kultur“ beinhaltet also in allen durchgeführten Versuchen (auch ohne Behandlung) eine Vorlaufzeit von 48 h, so dass die Zellen in Wirklichkeit am Zeitpunkt 48 + X h ausgesät wurden.

Da das 1,25(OH)₂D₃, die PPAR-Liganden und auch die Analoga wasserunlöslich sind, wurden alle Liganden in EtOH gelöst. Deswegen musste man neben einer Medium-Kontrolle auch eine EtOH-Kontrolle bei jedem Versuch mitbestimmen. Die Konzentration 10⁻⁸ M von 1,25(OH)₂D₃ wurde gewählt, da bei dieser Konzentration Effekte auf die Genexpression von MeWo-Zellen ohne toxische Schädigung der Zellen festgestellt wurden (Reichrath et al., 2007). Als Kontrolle der 1,25(OH)₂D₃-Behandlung wurde die CYP24A1-Expression in der RT-PCR gemessen. Mit Ausnahme von Bezafibrat erfolgte die Behandlung der Zellen mit den PPAR-Liganden in einer Konzentration von 10⁻⁸ M. Diese recht niedrige Konzentrationen wurden gewählt, da viele der strukturell sehr verschiedenen ungesättigten Fettsäuren (darunter auch ALA und DHA), aber auch die natürlichen und synthetischen Liganden mit hoher Affinität auch in nanomolaren

Konzentrationen an die PPARs binden (Lin et al., 1999; Xu et al., 1999, Wahli, 2002). Viele der PPAR-Liganden verlieren in hohen Konzentrationen ihre Rezeptorspezifität (Seimandi et al., 2005). Außerdem wurde diese relativ niedrige Konzentration gewählt, da die Zellen bis zu 120 h behandelt wurden und sowohl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch die PPAR-Liganden in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirken. Bezafibrat wurde dagegen in einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ benutzt, weil diese in anderen Studien signifikante Effekte ohne Zytotoxizität zeigte (Kippenberger et al., 2001).

3.2.6. Ernten der Zellen

Um die kultivierten Zellen für die RT-PCR Versuche nutzen zu können, mussten sie geerntet werden. Dabei wurde das Medium abgesaugt, 2 x mit 1 x PBS gewaschen und mit einem Zellschaber und 5 ml 1 x PBS abgelöst. Die Flüssigkeit wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 1000 U/min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde 1 ml 1 x PBS hinzugefügt und das Reaktionsgefäß noch mal 10 min bei 1000 U/min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Sollte von den Zellen später die RNA isoliert werden, wurden sie bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.3. Biochemische Untersuchungsmethode (Proliferations-Assays)

Mit der Kristallviolett-Färbung kann man *in vitro* die Überlebensfähigkeit von Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen austesten, da sich lebende Zellen im Gegensatz zu den abgestorbenen Zellen mit Kristallviolett anfärben lassen. Durch Zugabe von verschiedenen Substanzen können antiproliferative/wachstumsfördernde Effekte auf Zellen bestimmt werden.

3.3.1. Zellbehandlung

Die Proliferations-Assays wurden mit der Melanom-Zelllinie MeWo durchgeführt. Die Zellen wurden in 24 Well-Mikrotiterplatten kultiviert um mehrere Messungen gleichzeitig unter identischen Bedingungen durchführen zu können. Damit die Resultate der Proliferations-Assays besser mit den mRNA-Expressionsdaten verglichen werden konnten, wurden die Zellen genauso kultiviert und behandelt wie bei den RT-PCR Versuchen. Um eine ähnliche Zelldichte wie in den RT-PCR Versuchen zu erreichen, wurden die Zellen ausgezählt und in jedes Well 3000 Zellen mit $500 \mu\text{l}$ Medium gegeben. Um die verschiedenen Platten miteinander vergleichen zu können, wurden 2 Blindproben mit unbehandelten Zellen und 2 Wells, die nur Medium und keine Zellen enthielten, angelegt.

3.3.2. Kristallviolett-Färbung

Nach der gewünschten Behandlungszeit wurde das Medium aus den Wells gesaugt und die Zellen 2 x mit 500 µl/Well kaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen über 24 h bei 4 °C mit 500 µl/Well 70 %-igem EtOH fixiert. Am folgenden Tag konnte das EtOH ausgeschüttet werden und die Zellen mit 250 µl/Well Kristallviolett-Lösung für 30 min bei 4 °C inkubiert werden. Die Platten wurden anschließend mehrmals mit H₂O_{dd} abgewaschen und danach zum Trocknen bei Raumtemperatur umgedreht. Die Platten konnten so tagelang gelagert werden.

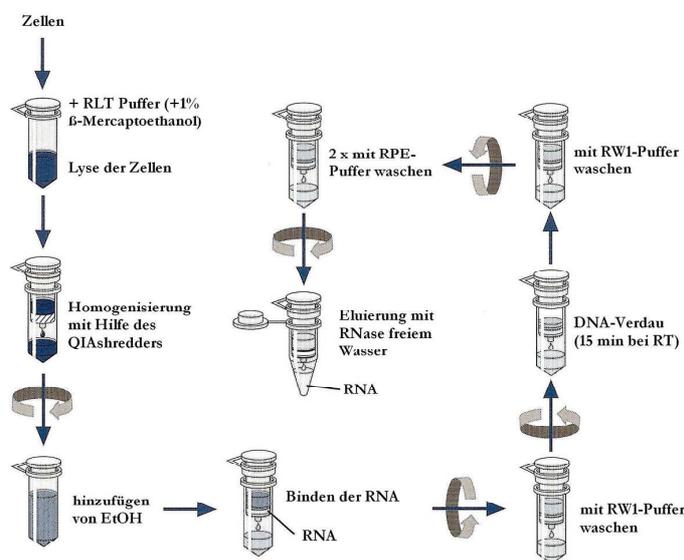
3.3.3. Fotometrische Vermessung

Nachdem die Platten getrocknet waren, wurde der Farbstoff durch Zugabe von 400 µl/Well 70 %-igem EtOH wieder aus den Zellen gelöst. Dazu wurden die Platten für 30 min auf dem Wiegeschüttler mit dem EtOH bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das EtOH mit dem gelösten Kristallviolett zur einfacheren Messung mit dem Fotometer (550 nm) in 96 Well-Mikrotiterplatten übertragen. Dabei wurde von den Wells der 24 Well-Mikrotiterplatte jeweils 100 µl auf 3 Wells der 96 Well-Mikrotiterplatte übertragen. So erhielt man mehr Werte zum Mitteln. Zudem wurde die Messung dadurch genauer, da am Boden haftenden Zellen nicht zur Absorption beitragen. Die gemessene Absorption bei 550 nm ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Da die Platten selbst leicht das Kristallviolett aufnehmen und es so zu Schwankungen innerhalb der Messungen kommen kann, bestimmte man für jede Platte den Mittelwert der gemessenen Absorption in den Wells in denen sich nur das Medium ohne Zellen befand und nahm diesen als Referenzwert um die übrigen Wells auszumessen. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen wurden mehrere Platten zu unterschiedlichen Zeitpunkten angesetzt, behandelt und geerntet. Es wurden nur die Platten miteinander verglichen in denen alle zu vergleichenden Behandlungen vertreten waren.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. RNA Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen

Da RNA-abbauenden RNasen ubiquitär vorhanden sind, und die RNA im Vergleich zur DNA viel instabiler ist, muss bei der Isolierung der RNA zügig und auf Eis gearbeitet werden (Sambrook et al., 1989). Um das Risiko einer Kontamination zu verringern, wurden immer Einmal-Handschuhe getragen und nur autoklavierte Einmal-Gefäße sowie spezielle gestopfte RNase-freie Pipettenspitzen verwendet. Nach dem Ernten der Zellen, wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet (Abb. 3-1).



- Abb. 3-1: RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (nach Qiagen; modifiziert)

Laut Aussage von Qiagen ermöglicht der Einsatz eines Hochsalzpuffersystems die Gesam-RNA bestehend aus mRNA, tRNA, rRNA und eventuell virale RNA aus verschiedenen Materialien (tierische Zellen und Gewebe, Bakterien, Hefe) zu isolieren. Das Zellpellet wurde im RLT Puffer (+ 1 % 2-Mercaptoethanol) lysiert und mit Hilfe der QIAshredder Säulen homogenisiert. Im RLT Puffer befand sich das stark denaturierende Guanidinisothiocyanat, welches augenblicklich RNasen und andere

Proteine inaktiviert und den Abbau von intakter RNA hemmt. Nach Zugabe von EtOH zur Einstellung optimaler Bedingungen wurde das Lysat nun auf RNeasy Säulen aufgetragen. Die an der Silicagel-basierenden Membran der Säulen gebundene Gesam-RNA konnte somit durch Waschgänge mit den Puffern RW1 und RPE von DNA, Proteine und allen anderen Substanzen gereinigt werden. Durch die Größe von mindestens 200 Nukleotiden wird so der mRNA-Anteil vergrößert, da die kleineren RNA-Moleküle wie z.B. rRNA und tRNA ausgeschlossen werden können. Um auch die DNA-Moleküle auszuschließen, wurde im Laufe des Protokolls ein DNA-Verdau mit RQ1 RNase-Free DNase durchgeführt. Diese DNase degradiert dsDNA und ssDNA endonukleolytisch und produziert dabei 3'-OH Oligonukleotide. Diese können dann bei der RNA-Isolierung nicht mehr an die Säulenmatrix binden und werden in den Waschsritten entfernt. Die Isolierung der Gesam-RNA und der DNase-Verdau erfolgte nach den Herstellerangaben der Firmen Qiagen und Promega. Die Elution erfolgte mit RNase-freiem

Wasser. Die isolierte RNA wurde in insgesamt 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Kontrolle der RNA-Isolierung wurden Ausbeute und Qualität mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese bestimmt (Sambrook et al., 1989).

3.4.2. RNA Isolierung nach der Trizol-Methode

War die Ausbeute mit dem RNeasy Kit zu gering, konnte die RNA alternativ mit der Trizol-Methode isoliert werden. Die Trizol-Methode beruht auf einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Iso-Thiocyanat, die die Zellen direkt lysiert, wobei die RNA intakt bleibt. Nach dem Ernten wurden die Zellen mit Trizol LS Reagenz (ca. 0,75 ml/5-10 x 10⁶ Zellen) resuspendiert um die Zellen zu lysieren. Dann folgte eine 5-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur, der eine Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 0,75 ml eingesetzten Trizol folgte. Das Chloroform sorgte für eine Auftrennung in eine wässrige und eine organische Phase, die durch Zentrifugation bei 2000 U/min während 15 min bei 4 °C erreicht wurde. Die farblose wässrige Phase wurde abgetrennt und die darin enthaltene RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro 0,75 ml Trizol versetzt und vorsichtig geschwenkt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation (10 min bei 2000 U/min und 4 °C). Das Pellet wurde 10 min mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und 5 min mit 1200 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet getrocknet und in 50 - 100 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O_{dd} resuspendiert. Auch hier wurde die Qualität der RNA durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft.

3.4.3. Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Nukleinsäuren (DNA oder RNA) durch ein elektrisches Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA- und RNA-Moleküle bewegen sich aufgrund der Phosphatgruppen im Zucker-Phosphat-Rückgrat, die dem Molekül eine negative Ladung geben vom negativ geladenen Pol (Kathode) zum positiv geladenen Pol (Anode) hin. Da das Gel hier als Molekularsieb wirkte, wurden größere Fragmente stärker behindert als kleinere. Um Fragmente ähnlicher Größe aufzutrennen, verwendete man Agarosegele mit höherer Agarosekonzentration. Das Gel bestand aus 50 - 100 ml 0,5 x Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer und 2 % Agarose, welches durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst wurde. Bevor die Lösung zum Abkühlen in eine Quader-Form gegossen wurde, wurde ihr 1 µl Ethidiumbromid pro 10 ml TBE hinzugefügt. In die noch flüssige Agaroselösung wurde ein Kamm gesetzt, der die Taschen für das Auftragen der Proben bildete.

Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm herausgezogen und die Taschen mit den RNA-Proben befüllt. Dazu wurden 1 µl von der isolierten RNA, 3 µl Ethidiumbromid und 9 µl H₂O_{dd} miteinander vermischt und in die Taschen gegeben. Das Gel wurde während 1 h unter eine Spannung von 70 V gesetzt. Als interner Marker und auch als Gütekriterium dienten die ribosomale 28-S-rRNA und die 18-S-rRNA bei 4,7 bzw. 1,9 kb. Sichtbar wurden die RNA Fragmente mit Hilfe des in dem Probenpuffer enthaltenen Ethidiumbromids, welches mit den Nukleinsäuren interagiert. Dadurch änderte sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid. Die Intensität der Fluoreszenz-Emission nahm unter Anregung durch UV-Licht (Biometra TI 2 transilluminator) zu. Bei Degradation der RNA war nur eine diffuse Zone zu erkennen, da sie in viele Fragmente unterschiedlicher Länge zerbrochen wurde. Zudem ist die Lichtintensität der Banden proportional zur vorliegenden RNA-Konzentration, so dass man unter dem UV-Licht den RNA Gehalt der Proben abgeschätzen konnte.

3.4.4. Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist ein gentechnisches Verfahren, mit dem ssRNA-Moleküle in dsDNA-Moleküle überführt werden. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus dem Omniscript RT Kit der Firma Qiagen wird eine der mRNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die reverse Transkriptase ist ein Enzym, das ursprünglich aus Retroviren stammt. Gegenüber der natürlich vorkommenden Variante unterscheidet sich die Omniscript reverse Transkriptase darin, dass sie in *Escherichia coli* exprimiert wird und ein rekombinantes heterodimeres Enzym darstellt, das 3 verschiedene enzymatische Aktivitäten besitzt. Die RNA-abhängigen DNA-Polymerase synthetisiert zuerst ein RNA-DNA-Hybridmolekül. Die RNase-H-Aktivität kann den RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybridmoleküls abbauen. Als drittes verfügt die reverse Transkriptase über eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die ssDNA in eine dsDNA überführt.

Insgesamt wird maximal 2 µg RNA (mRNA, rRNA, tRNA) pro Reaktionsansatz umgeschrieben. Da RNA schnell degradieren kann, werden alle Schritte der Umschreibung auf Eis durchgeführt und ein RNase-Inhibitor (verdünnt mit eiskaltem 1 x RT Puffer auf 10 U/µl) hinzugefügt, der den vorzeitigen Abbau der instabilen RNA verhindert. Das Enzym inhibiert RNase A, RNase B, RNase C und humane plazentale RNasen, nicht jedoch RNase-H. Als Primer wurde ein Random Primer (verdünnt mit RNase-freiem Wasser auf 50 µg/ml), ein Oligonukleotid-Primer, der sich am Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern kann, benutzt. Hierdurch wird aus der isolierten Gesamt-RNA nur die mRNA in cDNA umgeschrieben. Der Primer hat ein freies 3'-Ende, was der reversen Transkriptase die Synthese des komplementären Strangs ermöglicht.

Reagenz	Menge [μ l]	Endkonzentration
10 x RT Puffer	2,0	1 x
dNTP Mix (5 mM jedes dNTP)	2,0	0,5 mM jedes dNTP
Random Primer (50 μ g/ml)	1,8	1 μ M
RNase Inhibitor (10 U/ μ l)	1,0	10 U
Omniscript RT	1,0	4 U
RNA	variabel	max. 2,0 μ g/ μ l
RNase-freies Wasser	Probe auf 20 μ l auffüllen	-

-Tab. 3-3: Pipettierschema für Omniscript RT

Nach dem Mischen der Komponenten (Tab. 3-3) erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 2 h. Zum Stoppen der Enzymaktivität wurde jeder Ansatz nach der Inkubation für 5 min auf 93 °C erhitzt. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.5. Quantitative Real-Time PCR

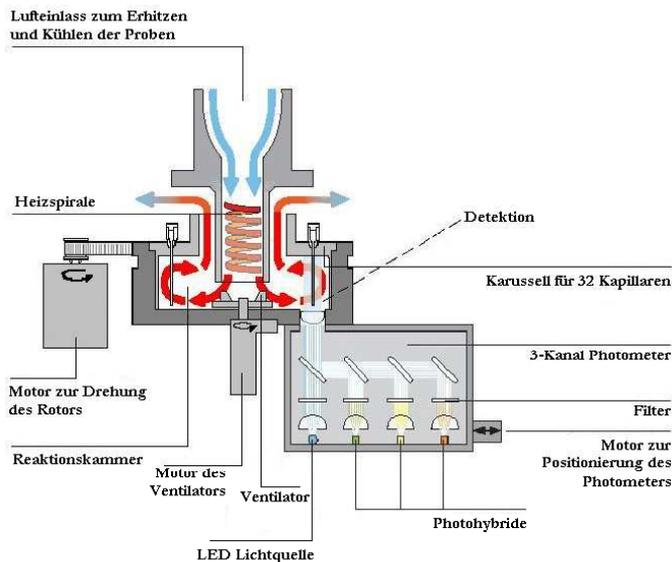
3.4.5.1. Theorie der quantitativen Real-Time PCR

Die Real-Time-PCR (RT-PCR) Versuche wurden mit einem Thermocycler (LightCycler, Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Die Methode der RT-PCR ist ähnlich wie eine normale PCR aufgebaut, erlaubt aber eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die kontinuierliche Messung von Laser-induzierten Fluoreszenzsignalen, die während der PCR proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes ansteigen. Die RT-PCR hat zudem den Vorteil, dass die Kontaminationsgefahr geringer ist, da das PCR-Amplifikat nicht mehr auf ein Agarosegel aufgetragen werden muss und man so das *carry-over* vermeiden kann.

Wie bei der PCR handelt es sich bei der RT-PCR um ein *in vitro*-Verfahren zur gezielten Amplifikation bestimmter Nukleinsäureabschnitte. Die DNA dient dabei als Matrize, wobei die DNA-Sequenzen der beiden Enden des gewünschten Bereichs bekannt sein müssen, damit man zwei komplementär dazu synthetisierte Oligonukleotide (Primer) zum Eingrenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts benutzen kann. Man bedient sich hierbei thermostabiler DNA-Polymerasen, die mit Hilfe eines Primers eine ssDNA zu einer dsDNA zu synthetisieren vermögen. Ein PCR-Zyklus besteht aus folgenden 3 Abschnitten:

- Denaturierung (94 °C): dsDNA \rightarrow ssDNA
- Annealing (55 °C): Primerbindung an die ssDNA
- Extension (72 °C): ssDNA \rightarrow dsDNA

Durch die mehrfache Wiederholung dieses Zyklus erfolgt pro Zyklus eine zumindest theoretisch exponentielle Vermehrung der zwischen den Primern liegenden Sequenzen.

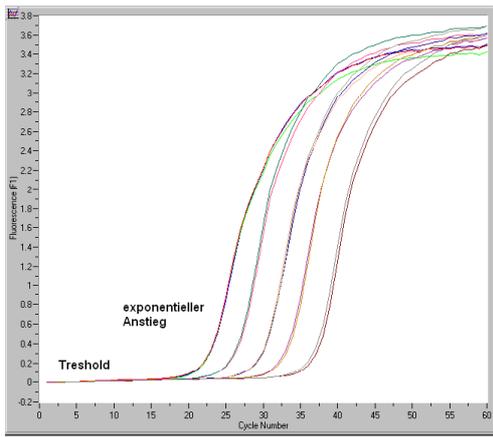


-Abb. 3-2: Schematische Darstellung des LightCyclers (nach Roche)

Die Reaktion findet nicht wie bei einer normalen PCR in Plastikreaktionsgefäßen, sondern in speziellen Borosilikatglaskapillaren statt, die aufgrund ihrer Beschaffenheit eine schnelle und gleichmäßige Verteilung der Temperatur innerhalb des Reaktionsansatzes ermöglichen. Diese werden in den Rotor des LightCyclers gesteckt in den gleichzeitig 32 dieser Kapillaren passen. Der Rotor steht in einer Reaktionskammer, in welcher die Temperatur per Luftstrom eingestellt

wird. Ein Ventilator verteilt die durch eine Heizspirale erwärmte oder die von außen zugeführte Luft gleichmäßig in der Reaktionskammer. Wie in Abb. 3-2 gezeigt, befindet sich direkt unter den Kapillaren eine Linse, unter der das Fluorimeter, die Detektionseinheit des Gerätes, die Extinktion unterschiedlicher Wellenlängen misst. Das Fluorimeter besteht aus einem Anregungs- und drei Detektionskanälen (F1 = 521 nm = grün; F2 = 640 nm = rot; F3 = 705 nm = tiefrot). Nach Anregung durch eine Diode (LED) wird die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb eines Reaktionsansatzes durch halbdurchlässige Spiegel und wellenspezifische Filter geleitet und von 3 Fotohybriden unterschiedlicher Wellenlänge gemessen. Da der Rotor gedreht werden kann, gelangt jede der Kapillaren über die Linse und kann gemessen werden. Optische Signale werden in elektrische Signale umgewandelt, an einen Computer weitergeleitet und in Form von Fluoreszenzkurven auf dem Monitor dargestellt.

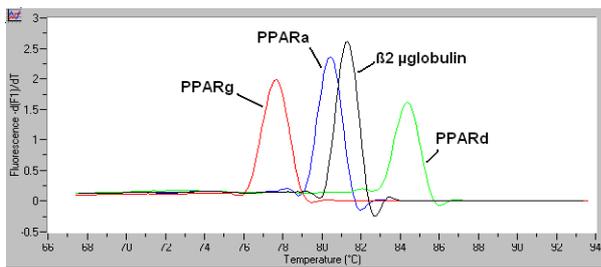
Um die Amplifikation während des Laufes zu beobachten, verwendet man einen Cyaninfluoreszenzfarbstoff namens SYBR Green I. Dieser hat eine hohe Spezifität für jede Art von dsDNA und wird durch eine Wellenlänge von 485 nm angeregt. Er bindet sich ähnlich wie Ethidiumbromid an die neu gebildete dsDNA, interkaliert in die kleine Furche (Wittwer et al., 1997 und Dhar et al., 2001), und emittiert ein Fluoreszenzsignal, das direkt proportional zu der DNA-Konzentration und über 100-fach höher als der Ausgangswert ist. Während des Reaktionsverlaufs, wird die Extinktion dieses Fluoreszenzsignals bei 521 nm im Kanal F1 nach jedem Zyklus gemessen. Die Quantifizierung geschieht mit einer Software, die anhand des Zyklus, bei der die PCR-Reaktion aus der Hintergrundfluoreszenz des SYBR Green I tritt (*threshold*), die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA (mRNA) bestimmt (Abb. 3-3).



-Abb. 3-3: Fluoreszenzmessung von verschiedenen cDNA-Konzentrationen

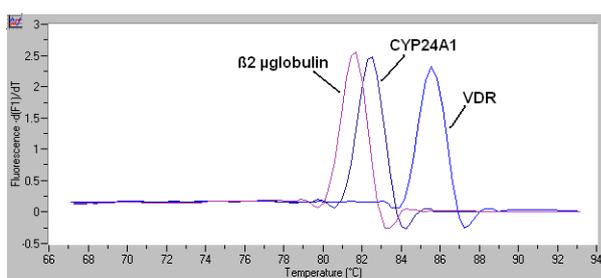
Der Vorteil des SYBR Green I liegt darin, dass er an jeder dsDNA bindet und das spezielle Designen von *probes* nicht nötig ist. Durch dieses Fehlen der Spezifität bindet es allerdings auch an Primerdimeren und nicht-spezifischen Nebenprodukten, die sich während der Reaktion bilden und somit einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion mit Hilfe von einer Schmelzkurvenanalyse

erfolgen. Dazu werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Mit steigender Temperatur nimmt die Fluoreszenz ab und spiegelt die Qualität der PCR-Reaktion wieder. Die Schmelztemperatur kann dabei durch unterschiedliche Faktoren, wie die Länge der PCR-Produkte und der GC-Gehalt der Primer beeinflusst werden (Abb. 3-4 und 3-5). Durch die graphische Darstellung der Schmelztemperatur lassen sich



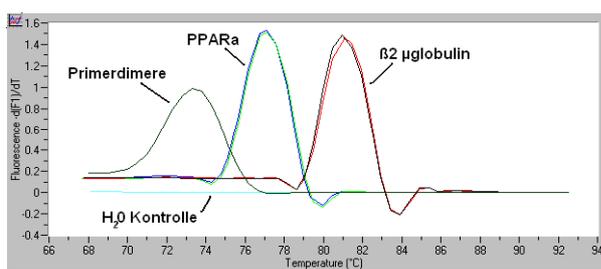
-Abb. 3-4: Schmelzkurve von PPAR α , PPAR δ und PPAR γ im Vergleich zur β 2- μ globulin

Primerdimere vom eigentlichen PCR Produkt unterscheiden, da sie aufgrund ihrer geringeren Größe früher denaturieren und in der Negativkontrolle (H_2O_{dd}) erkennbar werden (Abb. 3-6). Das Vorhandensein von Primerdimeren hat auf die Quantifizierung der Proben keinen Einfluss, solange sie vom PCR Produkt eindeutig zu unterscheiden sind.



-Abb. 3-5: Schmelzkurve von VDR und CYP24A1 im Vergleich zur β 2- μ globulin

Für die PCR-Reaktionen wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen benutzt. Der verwendete SYBR Green PCR Master Mix enthält neben dem SYBR Green I den Fluoreszenzfarbstoff ROX, der nicht an dsDNA binden kann und somit als interne Referenz gesehen werden kann. Er kann Pipettierungenauigkeiten und Fluktuationen in der Fluoreszenz des Master Mixes korrigieren. Der Master Mix enthält außerdem einen speziellen QuantiTect SYBR



-Abb. 3-6: Schmelzkurve von Primerdimeren im Vergleich zu PPAR α , β 2- μ globulin und H_2O

Green PCR Puffer, 5 mM MgCl₂, dNTPs mit dUTP und eine HotStarTaq DNA Polymerase, die eine erhöhte Spezifität und Sensitivität für PCR-Anwendungen hat. Auf diese Weise werden unspezifische PCR-Produkte minimiert. Die HotStarTaq DNA Polymerase ist wegen ihrer hitzelabilen Gruppen, die an einigen ihrer Aminosäuren hängen, bei Raumtemperatur inaktiv. Deswegen wurde sie 15 min bei 95 °C denaturiert. Ohne diese Hitzeaktivierung kann die DNA-Polymerase nicht richtig arbeiten. Es folgten 60 Zyklen nach folgendem Schema (Tab. 3-4) und anschließend noch die oben erwähnte Schmelzkurve, wobei die Temperatur zuerst auf 65 °C für 15 s abfällt um dann langsam auf 95 °C anzusteigen.

Phase	Endtemperatur (°C)	Dauer (s)	Temperaturänderung (°C/s)	Zyklenzahl	Messung
Aktivierung	95	900	20	1	keine
Amplifikation	94	15	2	60	keine
	55	20	2		keine
	72	20	2		einmalige
Schmelzkurve	95	0	20	1	keine
	65	15	20		keine
	95	0	0,1		kontinuierliche
Abkühlung	40	10	20	1	keine

-Tab. 3-4: LightCycler PCR-Programm zur Erstellung der Standardkurven und Amplifizierung der Proben

Damit Variationen zwischen den einzelnen Kapillaren so gering wie möglich blieben, wurde ein SYBR Green Primer Mix angesetzt, der alle Komponenten (außer der untersuchten cDNA) enthält. Zur Untersuchung des Ziel- oder des Referenzgens mussten unterschiedliche Ansätze hergestellt werden, da sie das jeweilige Primerpaar enthielten. Von diesen Ansätzen wurden jeweils 18 µl in jede Kapillare gegeben und 2 µl der zu untersuchenden cDNA-Probe. Die Kapillaren enthielten neben dem SYBR Green PCR Master Mix auch noch MgCl₂, H₂O und ein Primermix des Ziel- oder Referenzgens (Tab. 3-5). Lediglich bei PPAR_γ wurde ein anderes Schema benutzt (Tab. 3-6), da sich in Vorversuchen herausstellte, dass mit dem benutzten PPAR_γ Primer bessere Ergebnisse ohne MgCl₂ erreicht wurden. Damit die Proben im LightCycler gemessen werden konnten, mussten die Kapillaren kurz anzentrifugiert werden, damit sich die Komponenten unten in den Kapillaren ansammelten.

Reaktionskomponente	Volumen [µl]
SYBR Green PCR Master Mix	10
Primermix	2
MgCl ₂	0,8
H ₂ O _{dd} (Nuklease-frei)	5,2
cDNA	2
TOTAL	20

-Tab. 3-5: PCR-Ansatz für LightCycler

Reaktionskomponente	Volumen [µl]
SYBR Green PCR Master Mix	10
PPAR _γ Primer	2
MgCl ₂	0
H ₂ O _{dd} (Nuklease-frei)	6
cDNA	2
TOTAL	20

-Tab. 3-6: PPAR_γ-PCR-Ansatz für LightCycler

3.4.5.2. PCR-Effizienzen und Standardkurven

Bei einer PCR geht man von einer exponentiellen Amplifikation der Ausgangsmenge, also einer Verdopplung der cDNA pro Zyklus aus. Mathematisch betrachtet kann man eine PCR-Reaktion mit folgender Formel darstellen:

$$N = N_0 \times E^n$$

N = Anzahl der cDNA-Kopien nach n Zyklen
 N_0 = initiale Anzahl an cDNA-Kopien
 E = Amplifikationseffizienz (Theorie: $E = 2$)
 n = Zyklenanzahl der PCR-Reaktion

Bei der kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierung lautet die Formel für die PCR dann:

$$N = N_0 \times E^{C_p}$$

C_p = crossing point

Hierbei muss vorausgesetzt werden, dass sich die Effizienzen der PCR bei Ziel- und Referenzgenen nicht von Probe zu Probe unterscheiden. Fast alle Variablen, die das Endergebnis beeinflussen können, werden durch die Normalisierung mit einer Referenz und einem Kalibrator, eliminiert. Somit kann nur noch die unterschiedliche PCR-Effizienz das Endergebnis beeinflussen.

Basierend auf der Basis-PCR-Gleichung für die relative Quantifizierung $N = N_0 \times E^{C_p}$, ist die entstehende Kopienzahl bei einem bestimmten Zyklus die Funktion der eingesetzten Kopienzahl N_0 , der PCR-Effizienz E und dem gemessenen *crossing point* (C_p), also dem Zyklus, bei dem die PCR-Amplifikation in die exponentielle Phase eintritt und somit der Punkt, der als zuverlässig proportional zur Ausgangskonzentration angesehen werden kann.

Die Effizienz einer PCR wird durch ihre Kinetik während der PCR-Reaktion eingeschränkt. Jeder Primer, jeder Fluoreszenzfarbstoff und jede Polymerase hat ihre eigene Kinetik während des Reaktionsablaufes, so dass diese Formel nicht mehr vollkommen gültig ist. Einfluss auf die PCR Effizienz haben unterschiedliche Faktoren wie, Ausgangskonzentration des Templates, Qualität der Nukleinsäure, Dauer einer PCR Reaktion, Effizienz der Polymerase, Nukleotid- und $MgCl_2$ -Konzentration, sowie Primersequenz und Primerlänge. Zudem wird die Reaktion nach ca. 30 Zyklen wegen der zu geringen Enzymmenge im Verhältnis zur DNA begrenzt und die Aktivität der Polymerase nimmt ab, da die Hitze das Enzym mit der Dauer denaturiert. Weiterhin konkurriert die Hybridisierung der DNA-Stränge untereinander mit der Primerbindung. Deswegen wird bei der endgültigen Berechnung die Effizienz E für jedes Primerpaar mit Hilfe einer Standardkurve und folgender Formel neu definiert:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

slope = Steigung der Standardkurve

Ohne Berücksichtigung der wirklichen Effizienz, würde man einen hohen Fehler in die Quantifizierung mit einbeziehen (Tab. 3-7).

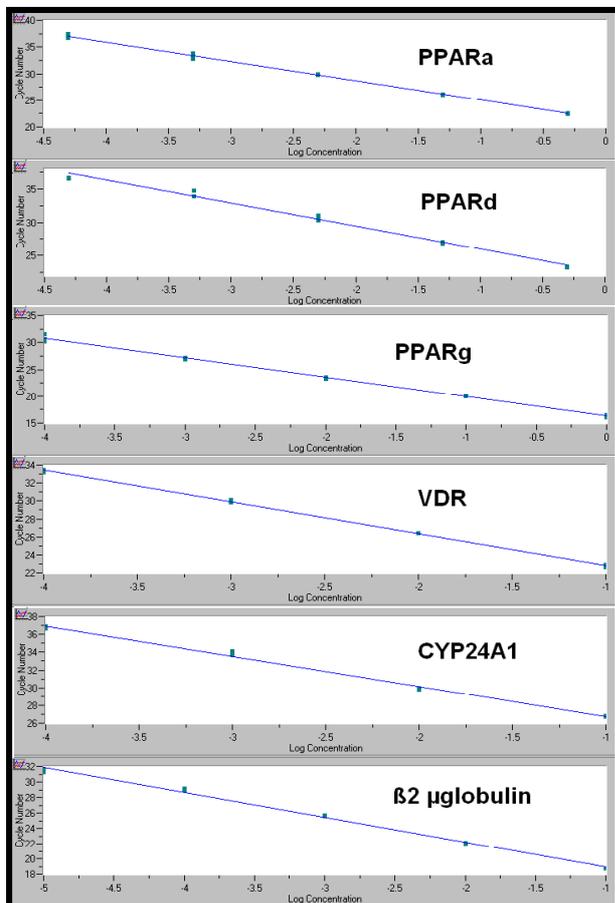
Detektionszyklus		10	15	20	25	30	35
PCR-Effizienz	2,00	-	-	-	-	-	-
	1,97	16%	25%	35%	46%	57%	70%
	1,95	29%	46%	66%	88%	113%	142%
	1,90	67%	116%	179%	260%	365%	500%
	1,80	187%	385%	722%	1290%	2260%	3900%
	1,70	408%	1045%	2480%	5710%	13000%	29500%
	1,60	920%	2740%	8570%	26400%	80700%	246400%

-Tab. 3-7: Mathematische Berechnung des systemischen Fehlers $(2^n/E^n-1) \times 100$ bei Missachtung der wahren Effizienz (nach Roche)

1	cDNA 1:2	9	cDNA 1:200
2	cDNA 1:2	10	cDNA 1:2000
3	cDNA 1:2	11	cDNA 1:2000
4	cDNA 1:20	12	cDNA 1:2000
5	cDNA 1:20	13	cDNA 1:20000
6	cDNA 1:20	14	cDNA 1:20000
7	cDNA 1:200	15	cDNA 1:20000
8	cDNA 1:200	16	H ₂ O _{dd}

-Tab. 3-8: Pipetierzusätze (2 µl) zu den 18 µl SYBR Green Primer Mix

Die PCR-Effizienz wurde mit Hilfe von Standardkurven ermittelt, welche 5 Verdünnungsstufen einer cDNA-Probe enthielten, die das Zielgen stark exprimierten und eine PCR-Effizienz wie die der Proben aufzeigten, sowie den jeweilige SYBR Green Primer Mix (Tab. 3-8). Da die Expression der Zielgene in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark und teilweise an der Nachweisgrenze war, musste für die verschiedenen Zielgene unterschiedliche cDNAs benutzt und eigene Standardkurven angefertigt werden. Mit Hilfe der RelQuant kann man die *.cof-Files erstellen die eine Quantifizierung ermöglichen.



-Abb. 3-7: Standardkurven der PPAR-, VDR-, CYP24A1- und β2 globulin-Primer

Die erstellten Standardkurven (Abb. 3-7) bestanden aus einem linearen Teil und vor allem bei schwacher Expression des Zielgens in den höheren Zyklen aus einem parabolischen Teil. Die Steigung des linearen Teils erlaubte die Berechnung der PCR-Effizienz. Bei einer optimalen Effizienz und einer Zehnerverdünnung verdoppelte sich die cDNA-Menge innerhalb von 3,3 Zyklen. Eine geringere Effizienz ($E < 2$) entsprach einer steileren Standardkurve (Tab. 3-9).

Primer	Korrelation (r)	Steigung (slope)	Effizienz (E)
PPAR α	-1,00	-3,629	1,886
PPAR δ	-0,99	-3,443	1,952
PPAR γ	-1,00	-3,608	1,893
VDR	-1,00	-3,540	1,916
CYP24A1	-1,00	-3,408	1,965
β2 globulin	-1,00	-3,342	1,992

-Tab. 3-9: errechnete PCR-Effizienzen

3.4.5.3. Kalibratoren und relative Quantifizierung

Die Standardkurven wurden neben der Berechnung der Effizienz auch zur relativen kalibrator-normierten Quantifizierung benötigt. Zur Quantifizierung wurde das zu untersuchende Zielgen auf ein konstant exprimiertes Gen bezogen und mit einem Kalibrator verglichen um Lauf-zu-Lauf Variationen auszugleichen.

Mit Hilfe der *.cof-Files konnte man mit einem Kalibrator die gemessenen Konzentrationen unterschiedlicher Läufe miteinander vergleichen. Um alle Proben innerhalb eines Laufs zu normalisieren wurde eine Probe, die eine stabile Ratio aus Zielamplifikat (*target*) zu Referenzamplifikat (*reference*) besaß, als Kalibrator genommen. Zusätzlich musste der Kalibrator einen konstanten Cp-Wert zwischen verschiedenen LightCycler-Läufen besitzen. Diese Voraussetzungen erschwerten die Wahl des Kalibrators erheblich. Da bei jedem LightCycler Lauf eine Probe des Kalibrators mitlief, konnte es bei einer großen Anzahl an Läufen vorkommen, dass man nicht genug cDNA hatte um alle Läufe mit dem gleichen Kalibrator durchzuführen. Um aber dennoch die Werte, die mit verschiedenen Kalibratoren ermittelt wurden, miteinander vergleichen zu können, verwendete man den sogenannten *correction factor*. Der *correction factor* hatte beim ursprünglichen Kalibrator den Wert 1 und wurde durch einen Vergleich des ursprünglichen mit dem neuen Kalibrator neu ermittelt. Dazu erstellte man mehrere Proben (Tab. 3-10), sowie $H_2O+target$ und $H_2O+reference$, die es ermöglichten die Expression des Zielgens mit der des Referenzgens sowohl in der ursprünglichen Kalibrator-cDNA als auch im neuen Kalibrator miteinander zu vergleichen.

1	Kalibrator (neu)+ <i>target</i>	7	Kalibrator (neu)+ <i>reference</i>	13	Kalibrator (alt)+ <i>target</i>	19	Kalibrator (alt)+ <i>target</i>
2	Kalibrator (neu)+ <i>target</i>	8	Kalibrator (neu)+ <i>reference</i>	14	Kalibrator (alt)+ <i>target</i>	20	Kalibrator (alt)+ <i>target</i>
3	Kalibrator (neu)+ <i>target</i>	9	Kalibrator (neu)+ <i>reference</i>	15	Kalibrator (alt)+ <i>target</i>	21	Kalibrator (alt)+ <i>target</i>
4	Kalibrator (neu)+ <i>target</i>	10	Kalibrator (neu)+ <i>reference</i>	16	Kalibrator (alt)+ <i>reference</i>	22	Kalibrator (alt)+ <i>reference</i>
5	Kalibrator (neu)+ <i>target</i>	11	Kalibrator (neu)+ <i>reference</i>	17	Kalibrator (alt)+ <i>reference</i>	23	Kalibrator (alt)+ <i>reference</i>
6	Kalibrator (neu)+ <i>target</i>	12	Kalibrator (neu)+ <i>reference</i>	18	Kalibrator (alt)+ <i>reference</i>	24	Kalibrator (alt)+ <i>reference</i>

-Tab. 3-10: Pipettierschema zur Erstellung des *correction factors*

Bei der Berechnung des *correction factors* wurden die Werte 1 bis 6 und 7 bis 12 gemittelt und die beiden Mittelwerte voneinander abgezogen. Die restlichen Werte wurden jeweils zu dritt gemittelt und die *references* von den *targets* abgezogen. Die beiden Differenzen ergaben gemittelt den *correction factor*, mit dem man eine neue *.cof-File herstellen konnte indem man den *correction factor* mit der bisherigen Standardkurve mit der RelQuant Software verrechnete. Die jeweiligen Kalibratoren wurden als Aliquots von jeweils 10 µl bei -20 °C gelagert (Tab. 3-11).

Zielgen	Kalibrator 1 (cDNA)	Kalibrator 2 (cDNA)	Kalibrator 3 (cDNA)
PPAR α	NHM unbehandelt (1:100)	LNCaP unbehandelt (1:10)	LNCaP unbehandelt (1:10)
PPAR δ	NHM unbehandelt (1:100)	LNCaP unbehandelt (1:10)	LNCaP unbehandelt (1:10)
PPAR γ	NHM unbehandelt (1:100)	LNCaP unbehandelt (1:10)	LNCaP unbehandelt (1:10)
VDR	NHM unbehandelt (1:100)	MeWo 96h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 10 $^{-8}$ M (1:50)	MeWo 24h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 10 $^{-6}$ M (1:10)
CYP24A1	MeWo 72h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 10 $^{-8}$ M (1:10)		

-Tab. 3-11: Pipettierschema zur Erstellung des *correction factors*

Mit der RelQuant konnten folgende *correction factors* (Tab. 3-12) zwischen den Kalibratoren ermittelt werden:

Gen	Kal. 2→Kal. 1	Kal. 3→Kal. 1
PPAR α	0,0825	0,2200
PPAR δ	0,0212	0,0777
PPAR γ	0,1400	0,2300
VDR	0,0316	0,0158

-Tab. 3-12: *correction factors* zwischen den verschiedenen Kalibratoren

Mit der RT-PCR wurde die relative Expression eines Ziel- oder Referenzgens (Haushaltsgen = β 2 μ globulin) (Schneider-Stock et al., 2003) für jede Probe gemessen. Jeder Lauf hatte ein festgelegtes Pipettierschema (Tab. 3-13), damit die RelQuant Software die Daten auswerten konnte:

1	Kalibrator+ <i>target</i>	9	Probe 2+ <i>target</i>	17	Probe 4+ <i>target</i>	25	Probe 6+ <i>target</i>
2	Kalibrator+ <i>target</i>	10	Probe 2+ <i>target</i>	18	Probe 4+ <i>target</i>	26	Probe 6+ <i>target</i>
3	Kalibrator+ <i>reference</i>	11	Probe 2+ <i>reference</i>	19	Probe 4+ <i>reference</i>	27	Probe 6+ <i>reference</i>
4	Kalibrator+ <i>reference</i>	12	Probe 2+ <i>reference</i>	20	Probe 4+ <i>reference</i>	28	Probe 6+ <i>reference</i>
5	Probe 1+ <i>target</i>	13	Probe 3+ <i>target</i>	21	Probe 5+ <i>target</i>	29	H $_2$ O+ <i>target</i>
6	Probe 1+ <i>target</i>	14	Probe 3+ <i>target</i>	22	Probe 5+ <i>target</i>	30	H $_2$ O+ <i>reference</i>
7	Probe 1+ <i>reference</i>	15	Probe 3+ <i>reference</i>	23	Probe 5+ <i>reference</i>	31	
8	Probe 1+ <i>reference</i>	16	Probe 3+ <i>reference</i>	24	Probe 5+ <i>reference</i>	32	

-Tab. 3-13: Pipettierschema für die Quantifizierung mittels RT-PCR durch den LightCycler

Da jeweils Doppelbestimmungen für jeden Wert des Laufs vorliegen sollten und der Rotor insgesamt Platz für 32 Kapillaren hatte, konnten maximal 6 Proben pro Lauf gleichzeitig quantifiziert werden. Die endgültige Ratio ist eine Funktion der PCR-Effizienz und des detektierten *crossing points*, also die Zyklusnummer in dem die messbare Extinktion einer Probe während der Amplifikation aus dem Hintergrund der generellen SYBR Green I Fluoreszenz (*threshold*) hervortritt. Die absolute Kopienzahl am Detektionshintergrund wurde hierbei nicht benötigt. Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen ermittelte die Software Mittelwerte (CP median) der doppelt vorhandenen *target*- und *reference*-Amplifikate. Nun wurde der CP median des

targets von dem der *reference* subtrahiert. Dieser Δ CP median-Wert wurde ausgerechnet um Lauf-zu-Lauf Variationen in der Quantifizierung der Zielgene zu messen. Somit erhielt man einen Überblick über Reproduzierbarkeit einer Messung. Zur Quantifizierung musste eine Normalisierung auf einen Kalibrator erfolgen:

$$\text{relative Ratio} = \frac{[\textit{target} (\textit{Probe})] / [\textit{reference} (\textit{Probe})]}{([\textit{target} (\textit{Kalibrator})] / [\textit{reference} (\textit{Kalibrator})]) \times \textit{correction factor}}$$

Die daraus resultierende Berechnung der kalibrator-normalisierten Ratio benötigte nicht die Anwesenheit einer Standardkurve in jedem LightCycler-Analyse-Lauf. Die im LightCycler generierten Daten wurden in einer Textdatei exportiert und in Bezug zu der Standardkurve gesetzt, indem sie mit der schon gesicherten *.cof-File verglichen wurden. Man erhielt eine normalisierte Ratio als Endresultat. Jede Probe wurde 4 x gemessen und die gemessenen Werte gemittelt und davon die Standardabweichung berechnet. Da die RT-PCR eine sehr sensible Detektionsmethode ist, muss beim Pipettieren und Hantieren der Proben ständig Handschuhe tragen. Zusätzlich fand das Pipettieren der Proben und die relative Quantifizierung im LightCycler in unterschiedlichen Räumen statt um mögliche Kontaminationen mit fremder DNA zu verhindern.

3.5.Statistik

Die Einzelwerte oder Mittelwerte einzelner Versuche wurden als Mittelwerte +/- Standardfehler angegeben. Die Signifikanz wurde bei Normalverteilung mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist in den Abbildungen wie in Tab. 3-14 angezeigt:

n.s.	p > 0,05	nicht signifikant
*	p ≤ 0,05	signifikant
**	p ≤ 0,005	starksignifikant
***	p ≤ 0,0005	hochsignifikant

-Tab. 3-14: Irrtumswahrscheinlichkeit p

Um die lineare Abhängigkeit zwischen 2 (Intervall-skalierten) Variablen zu ermitteln, wurde der Korrelationskoeffizient r berechnet. Für Werte, die im Bereich von einer steigenden Geraden liegen, ergibt der empirische Korrelationskoeffizient r einen Wert, der "ungefähr" bei 1 liegt, für solche auf einer fallenden Geraden einen Wert "ungefähr" bei (-1) und z.B. für stark streuende einen Wert bei 0. Variablen mit einem positiven Korrelationskoeffizienten heißen positiv korreliert, in diesem Fall wächst Y mit X, Variablen mit negativen Korrelationskoeffizienten heißen negativ korreliert, in diesem Fall fällt Y mit wachsendem X. Die Bewertung des Korrelationskoeffizients r wird in der Tab. 3-15 zusammengefasst.

Korrelationskoeffizient r	Bewertung
$-0,2 \leq r \leq 0,2$	sehr geringer linearer Zusammenhang
$-0,5 \leq r < -0,2$ oder $0,2 < r \leq 0,5$	geringer linearer Zusammenhang
$-0,7 \leq r < -0,5$ oder $0,5 < r \leq 0,7$	mittelgroßer linearer Zusammenhang
$-0,9 \leq r < -0,7$ oder $0,7 < r \leq 0,9$	hoher linearer Zusammenhang
$-1,0 \leq r < -0,9$ oder $0,9 < r \leq 1,0$	sehr hoher linearer Zusammenhang

-Tab. 3-15: Korrelationskoeffizient r

Zudem wurde die lineare Regression zwischen den Variablen X und Y berechnet. Während die Korrelation nur einen einzigen Wert zur Beschreibung einer linearen Abhängigkeit, nämlich den Korrelationskoeffizienten r liefert, dient die lineare Regression zur genaueren Modellierung eines vermuteten linearen Zusammenhangs. Die Regression wird in der Form einer Geradengleichung ($Y = mX + b + Z$) dargestellt. Dabei sind m und b feste, aber unbekannte Parameter und Z ist ein "zufälliger Fehler", z.B. ein physikalischer Messfehler oder ein individueller Störeffekt. Aus dieser Geradengleichung lässt sich ebenfalls die Größe R_2 berechnen. Für R_2 "nahe bei 1" erklärt das lineare Modell $Y = mX + b$ einen Großteil der gesamten empirischen Varianz von Y, während der Fehler Z nur unwesentlich zur Varianz beiträgt.

4. Ergebnisse

Die untersuchten nukleären Hormonrezeptoren (PPARs und VDR) spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und im Verlauf von Tumorerkrankungen. Unbekannt ist bisher welche Rolle diese Rezeptoren bei der Ätiologie und Progression des malignen Melanoms spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden MeWo-Zellen ausgesucht, da man von dieser Melanomzelllinie weiß, dass sie den VDR stark exprimiert und gegenüber den antiproliferativen Effekten von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sensitiv ist (Seifert et al., 2004; Reichrath et al., 2007). Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Melanomzellen wurden *in vitro* Proliferations-Assays durchgeführt. Die Genexpression wurde mit Hilfe der RT-PCR-Methode in MeWo-Zellen, aber auch in anderen Melanomzelllinien, NHM und in nicht-melanozytären Zelllinien untersucht. Um die Ergebnisse der Proliferations-Assays mit den Ergebnissen der RT-PCR-Versuche, d.h. der mRNA-Expressionen besser vergleichen zu können, wurden alle Versuche unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und die Zellen auch gleich behandelt. Als Zeitwerte der Kulturdauer wurden zum einen ein 24 h-Wert gewählt, da sich die Expression der Kernrezeptoren oft schon innerhalb weniger Stunden verändern kann. Zum anderen wurde eine lange Kulturdauer von 120 h gewählt, da sich in den Proliferations-Assays meist erst deutliche Unterschiede nach einer Kulturdauer von 72 h bis 120 h bemerkbar machen und dann Veränderungen des Zellwachstums mit der Expression der Kernrezeptoren besser verglichen werden können.

Die VDR-Bindungskapazität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist in der frühen logarithmischen Phase des Zellwachstums viel stärker als bei zunehmender Konfluenz (Pillai et al., 1988; Merke et al., 1989). Deswegen war es vor der Behandlung mit den Liganden wichtig, die Kulturbedingungen herauszufinden bei denen sich die Zellen in allen Versuchen in der gleichen Wachstumsphase d.h. in der Proliferationsphase befanden. Damit alle Versuche miteinander verglichen werden konnten, wurden alle Kulturschalen bis auf die Liganden-Behandlung den gleichen Kulturbedingungen ausgesetzt. Die Ermittlung der Werte erfolgte ebenfalls einheitlich. Da insgesamt eine sehr große Menge an Daten ermittelt wurde, wurden die Ergebnisse in den nachfolgenden Abbildungen nur graphisch dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Rohdaten befinden sich in Kapitel 8 im Anhang.

Wie oben bereits erwähnt, spielen die untersuchten Kernrezeptoren eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Proliferation von Zellen. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die PPARs in der Melanomzelllinie MeWo exprimiert werden. Erste Vorversuche sollten zeigen, ob und wie stark die PPARs in den MeWo-Zellen exprimiert werden und ob es eine Abhängigkeit von der Zelldichte oder Kulturdauer gibt.

4.1. Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Frage 1: Welchen Einfluss hat die Kulturdauer auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

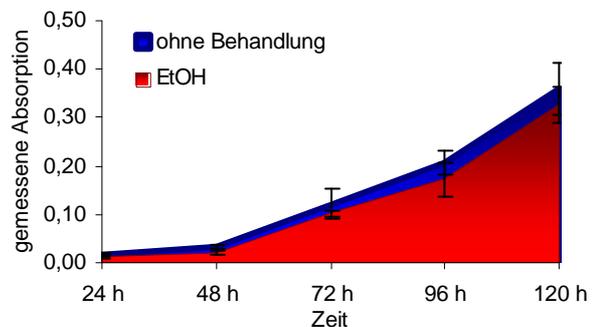
Da sowohl die Proliferations-Assays als auch die RT-PCR-Versuche eine Kulturdauer von bis zu 120 h vorsahen, musste zuerst untersucht werden, ob die MeWo-Zellen über einen Zeitraum von 120 h kontinuierlich proliferieren. Da eine Behandlung mit Liganden geplant war, erfolgte ebenfalls eine Behandlung mit EtOH, dem Lösungsmittel der Liganden.

In einem ersten Vorversuch wurden mit einem Proliferations-Assay 3000 Zellen/Well in 24 Well-Mikrotiterplatten gegeben und 2 Tage vorinkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und ein Teil der Zellen mit EtOH in einer Konzentration von 10^{-8} M behandelt und die Behandlung jeweils nach 48 h erneuert. Nach der entsprechenden Behandlungsdauer wurden sie mit Kristallviolett gefärbt und fotometrisch vermessen. Durch Übertragen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (im Verhältnis 1 zu 3) und 2-maliges Messen konnten zur genaueren statistischen Auswertung mehr Werte ermittelt werden. Da die gemessene Absorption bei 550 nm direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen anstieg, konnte man mit den gemessenen gemittelten Werten eine Wachstumskurve erstellen. Der Versuch wurde insgesamt 3 x wiederholt. Abb. 4-1 zeigt die Werte eines repräsentativen Experiments d.h. einer Mikrotiterplatte.

In allen untersuchten Platten konnte über die Kulturdauer von 120 h ein kontinuierliches Wachstum festgestellt werden. Der stärkere Wachstumsanstieg nach dem 48 h- und 96 h-Wert ließ sich durch den Mediumwechsel erklären der zu diesen Zeitpunkten stattfand. Offensichtlich hatten die Zellen in den ersten 24 h nach dem Mediumwechsel die besten Wachstumsbedingungen.

Fazit:

- Der Versuch zeigte sowohl ohne Behandlung als auch in der EtOH-Kontrolle ein kontinuierliches Wachstum der MeWo-Zellen. Deswegen wurden bei allen Proliferations-Assays nur die 24, 72 und 120 h-Werte untersucht.

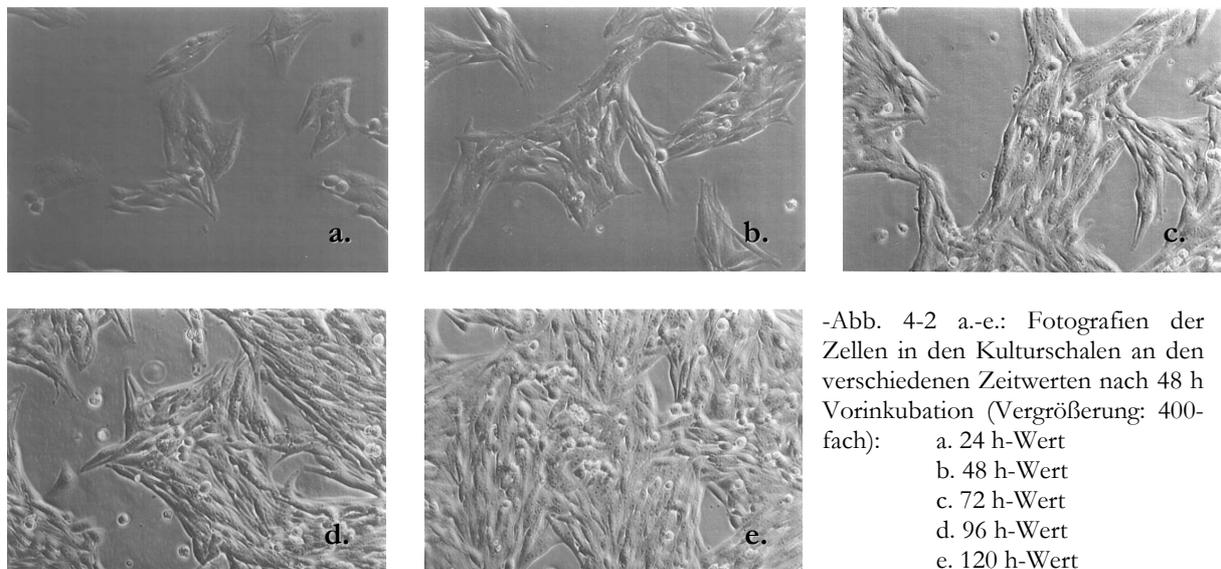


-Abb. 4-1: Anstieg der MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett-färbung der MeWo-Zellen) über eine Kulturdauer von 120 h in 96-Wellmikrotiterplatten ohne Behandlung (blau) und nach EtOH-Behandlung (rot) (representatives Experiment)

Frage 2: Werden die PPARs und der VDR in MeWo-Zellen exprimiert? Hat die Kulturdauer einen Einfluss auf die Expression der PPARs und des VDRs in MeWo-Zellen?

Da die Expression der PPARs in der Zelllinie MeWo bisher noch nicht untersucht wurde, sollte ein Vorversuch zeigen, ob und wie stark (z.B. im Vergleich zum VDR) die Kernrezeptoren exprimiert werden. Es ist bekannt, dass die PPARs und der VDR eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation spielen. Da die Zelldichte und Kulturbedingungen unabhängig von der Behandlung Einfluss auf die mRNA-Expression der nukleären Hormonrezeptoren nehmen können, war deren Untersuchung ebenfalls notwendig.

Dazu wurden MeWo-Zellen nach dem Aussäen (600.000 Zellen/Kulturschale) 2 Tage vorinkubiert und alle 2 Tage das Medium gewechselt. Alle 24 h wurde ein Teil der Kulturschalen (24, 48, 72, 96 und 120 h-Wert) fotografiert, geerntet und die PPAR- und VDR-Expression ermittelt. Bis zum konfluenten Wachstum der Zellen (120 h-Wert) wurden die Zellen weiter kultiviert um auch späte Veränderungen der PPAR- und VDR-Expression feststellen zu können. Die Fotografien wurden zur Bestimmung der Zelldichte und zur Beschreibung morphologischer Veränderungen über die Kulturdauer von 120 h angefertigt (Abb. 4-2 a.-e.).

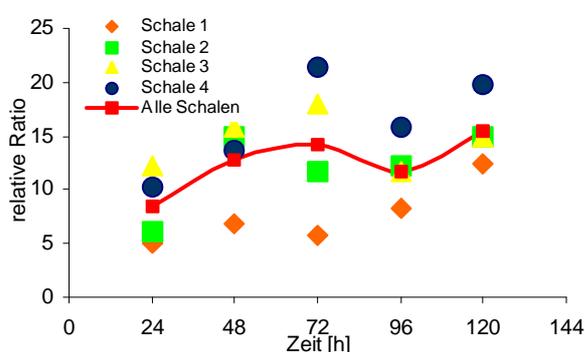


- Alle 4 Kulturschalen eines Zeitwertes zeigten eine ähnliche Zelldichte, welche exemplarisch in Abb. 4-2 a.-e. dargestellt ist.
- Wie in den Fotografien gezeigt, teilten sich die dünn ausgesäten Zellen kontinuierlich und waren bei der Bestimmung des 120 h-Wertes fast vollständig konfluent.
- Morphologische Veränderungen konnten nicht beobachtet werden.

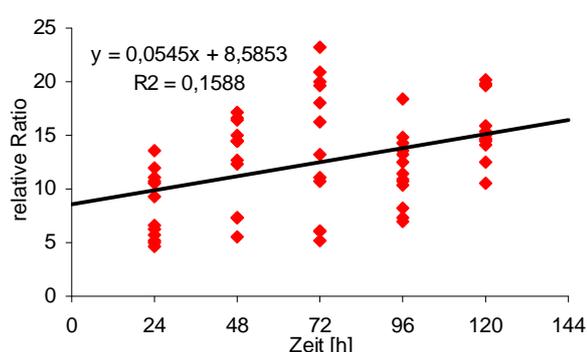
Nach dem Fotografieren wurden die Zellen einer Kulturschale geerntet, die mRNA isoliert und die Expression der PPARs und des VDRs mit Hilfe der RT-PCR-Methode bestimmt.

Hierbei erfolgte die Quantifizierung des gesuchten Gens (PPARs oder VDR) in den Proben mit einer Normalisierung auf einen Kalibrator. Dadurch erhielt man einen Wert, den man relative Ratio nennt. Er erlaubt die Expression verschiedener Gene miteinander zu vergleichen. Eine mRNA-Menge wird allerdings nicht bestimmt. In allen Versuchen wurden mit jeder Probe 4 Messungen durchgeführt. Die ermittelten relativen Ratios einer Probe wurden gemittelt und die jeweilige Standardabweichung berechnet (siehe Kapitel 8) und graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde die Korrelation d.h. der Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression und der Kulturdauer ermittelt.

PPAR α -Expression: Die Standardabweichungen der PPAR α -Expressionswerte der MeWo-Zellen einer einzelnen Kulturschale waren relativ gering (1,68 - 18,96 %). Betrachtet man allerdings die Abb. 4-3, so fällt auf, dass die PPAR α -Expression der MeWo-Zellen der verschiedenen Schalen, trotz gleicher Kulturbedingungen, stark variierte (19,02 - 44,70 % Standardabweichung). Obwohl es nach dem Wechsel des Kulturmediums (48 h und 96 h) jeweils zu einem leichten Anstieg der PPAR α -Expression kam (72 h- und 120 h-Wert), konnte über die gesamte Kulturzeit von 120 h nur eine geringe positive Korrelation ($r = 0,399$) zwischen der PPAR α -Expression und der Kulturzeit festgestellt werden (Abb. 4-4).

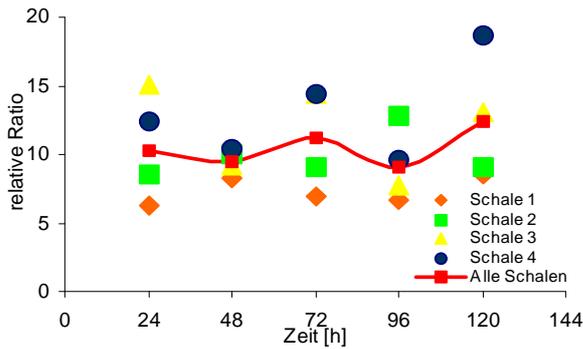


-Abb. 4-3: PPAR α -Expression über die Kulturdauer von 120 h in MeWo ohne Behandlung in verschiedenen Kulturschalen (orange = Schale 1; grün = Schale 2; gelb = Schale 3; blau = Schale 4) und deren Mittelwert (rote Linie) (Methode: RT-PCR)

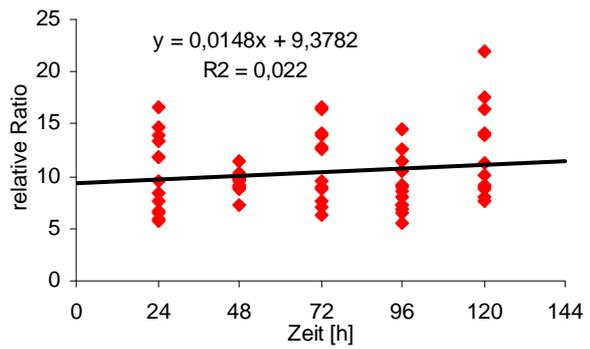


-Abb. 4-4: Korrelation (schwarze Linie) zwischen der PPAR α -Expression in den verschiedenen Kulturschalen (1 roter Punkt = 1 Messwert) und der Kulturdauer (Methode: RT-PCR)

PPAR δ -Expression: Auch die PPAR δ -Expression (Abb. 4-5) der MeWo-Zellen in den verschiedenen Kulturschalen variierte stark (10,94 - 36,69 % Standardabweichung) trotz geringer Standardabweichung der Expressionswerte der Zellen einer Kulturschale (2,79 - 15,73 %). Ähnlich wie PPAR α wurde auch PPAR δ in MeWo-Zellen nach jedem Mediumwechsel (72 h- und 120 h-Wert) leicht stärker exprimiert als vor dem Mediumwechsel. Beim Betrachten der Korrelation zwischen der PPAR δ -Expression und der Kulturzeit konnte nur ein geringer Zusammenhang ($r = 0,148$) zwischen der PPAR δ -Expression und der Kulturzeit festgestellt werden (Abb. 4-6).

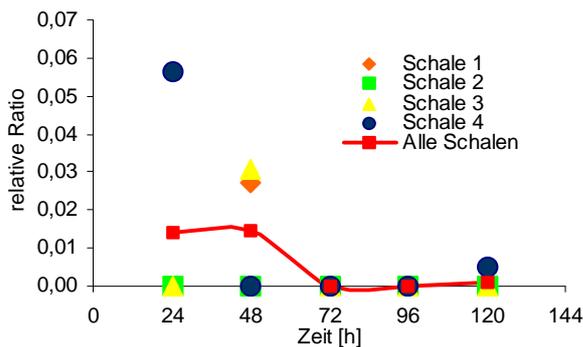


-Abb. 4-5: PPAR δ -Expression über die Kulturdauer von 120 h in MeWo ohne Behandlung in verschiedenen Kulturschalen (orange = Schale 1; grün = Schale 2; gelb = Schale 3; blau = Schale 4) und deren Mittelwert (rote Linie) (Methode: RT-PCR)

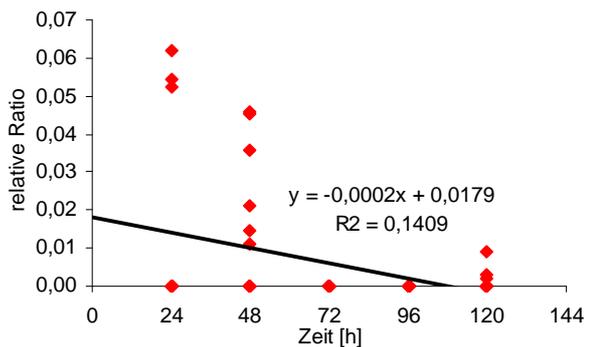


-Abb. 4-6: Korrelation (schwarze Linie) zwischen der PPAR δ -Expression in den verschiedenen Kulturschalen (1 roter Punkt = 1 Messwert) und der Kulturdauer (Methode: RT-PCR)

PPAR γ -Expression: PPAR γ wurde in MeWo sehr niedrig exprimiert und lag teilweise unter der Nachweisgrenze (Abb. 4-7). So waren in den MeWo-Zellen aller 4 Schalen die 72 und 96 h-Werte PPAR γ nicht mehr nachweisbar. Zwischen der PPAR γ -Expression und der Kulturzeit gab es nur eine geringe negative Korrelation ($r = -0,375$) (Abb. 4-8).

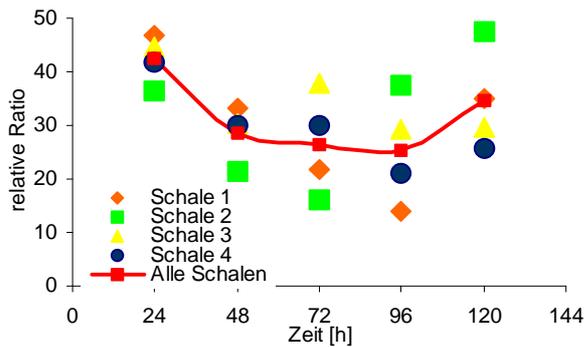


-Abb. 4-7: PPAR γ -Expression über die Kulturdauer von 120 h in MeWo ohne Behandlung in verschiedenen Kulturschalen (orange = Schale 1; grün = Schale 2; gelb = Schale 3; blau = Schale 4) und deren Mittelwert (rote Linie) (Methode: RT-PCR)

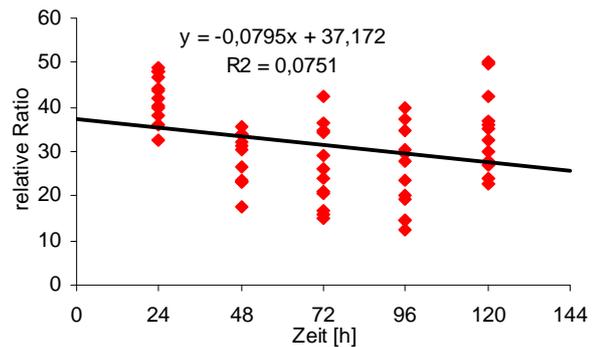


-Abb. 4-8: Korrelation (schwarze Linie) zwischen der PPAR γ -Expression in den verschiedenen Kulturschalen (1 roter Punkt = 1 Messwert) und der Kulturdauer (Methode: RT-PCR)

VDR-Expression: Neben den PPARs wurde auch die basale VDR-Expression in der RT-PCR untersucht (Abb. 4-9). Trotz geringer Standardabweichung der VDR-Expression der MeWo-Zellen der einzelnen Kulturschalen (4,34 - 21,33 %) schwankten die VDR-Expression-Werte der MeWo-Zellen der verschiedenen Kulturschalen stark (12,17 - 36,84 % Standardabweichung). Auffällig war, dass die VDR-Expression nach 24 h im Vergleich zu den späteren Zeitwerten leicht stärker war. Insgesamt bestand aber nur ein geringer negativer linearer Zusammenhang zwischen der VDR-Expression und der Kulturzeit ($r = -0,274$) (Abb. 4-10).



-Abb. 4-9: VDR-Expression über die Kulturdauer von 120 h in MeWo ohne Behandlung in verschiedenen Kulturschalen (orange = Schale 1; grün = Schale 2; gelb = Schale 3; blau = Schale 4) und deren Mittelwert (rote Linie) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-10: Korrelation (schwarze Linie) zwischen der VDR-Expression in den verschiedenen Kulturschalen (1 roter Punkt = 1 Messwert) und der Kulturdauer (Methode: RT-PCR)

Fazit:

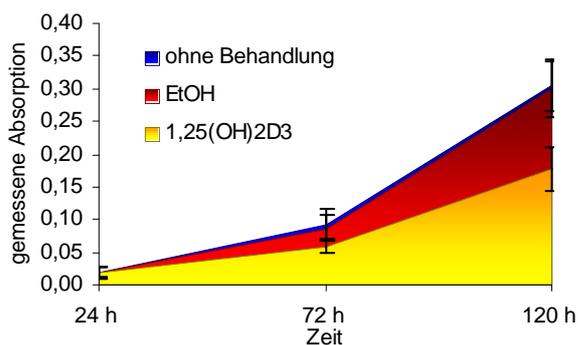
- MeWo-Zellen exprimieren sowohl den VDR als auch alle 3 PPARs.
- Die VDR-Expression war am stärksten, während die PPAR γ -Expression sehr nahe an der Nachweisgrenze der RT-PCR-Methode war. Zur Behandlung mit PPAR-Liganden wurden deswegen in den folgenden Versuchen hauptsächlich Liganden gewählt, die PPAR α und/oder PPAR δ als Bindungspartner bevorzugen.
- Es zeigte sich, dass es an den Zeitwerten nach dem Mediumwechsel (d.h. 72 h- und 120 h-Wert) zu einem leichten Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression in MeWo-Zellen kam. Dies ist am ehesten auf die Verbesserung der Kulturbedingungen zurückzuführen.
- Die Analyse der Korrelation zwischen der PPAR- bzw. der VDR-Expression und der Kulturdauer zeigte, dass die Kulturdauer und somit die Zelldichte keinen starken Einfluss auf die Expression der PPARs und des VDRs hatte. Daher wurden bei den anschließenden Versuchen ein früher (24 h-Wert) und ein später (120 h-Wert) Stundenwert untersucht.
- Um die starken Schwankungen der Expression der Kernrezeptoren zwischen den Kulturschalen trotz gleicher Kulturbedingungen zu minimieren, wurde in den Versuchen die mRNA von 2 - 4 Kulturschalen gepoolt und dann erst die Genexpression mit Hilfe der RT-PCR gemessen.

4.2. Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung

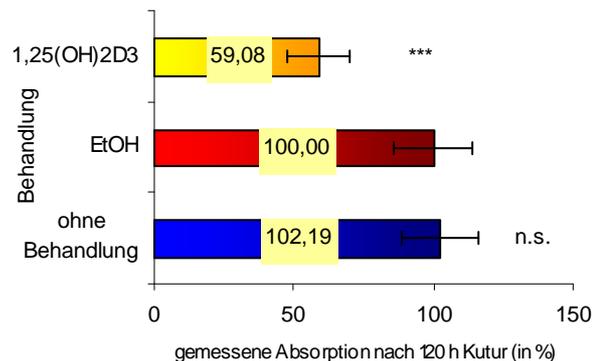
Frage 3: Welchen Einfluss hat die 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

Aus der Literatur weiß man, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$ einen antiproliferativen Effekt auf MeWo hat (Seifert et al., 2004). Zu einem späteren Vergleich mit evtl. Veränderungen des Zellwachstums unter der Behandlung mit anderen PPAR- und VDR-Liganden wurden MeWo-Zellen mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ behandelt. Dazu wurden, wie in dem Vorversuch mit einem Proliferations-Assay,

3000 Zellen/Well in 24 Well-Mikrotiterplatten gegeben und 2 Tage vorinkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Konzentration von 10^{-8} M (oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel EtOH) behandelt und die Behandlung jeweils nach 48 h erneuert. Nach 24, 72 und 120 h wurden dann die Zellen in den Mikrotiterplatten mit Kristallviolett gefärbt und fotometrisch vermessen. Der Versuch wurde 7 x wiederholt, die Werte gemittelt und die Standardabweichung berechnet (Abb. 4-11). Für die prozentuale Darstellung wurden die Mittelwerte auf den Mittelwert der EtOH-Kontrolle (= 100 %) der jeweiligen Platte bezogen, da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in EtOH gelöst war (Abb. 4-12).



-Abb. 4-11: Anstieg der MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett färbung der MeWo-Zellen) über eine Kulturdauer von 120 h in 96-Wellmikrotiterplatten ohne Behandlung (blau), nach EtOH-Behandlung (rot) und nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung (gelb)



-Abb. 4-12: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h ohne Behandlung (blau) und nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung (gelb) im Vergleich zur EtOH-Behandlung (rot) (n.s. = $p > 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$)

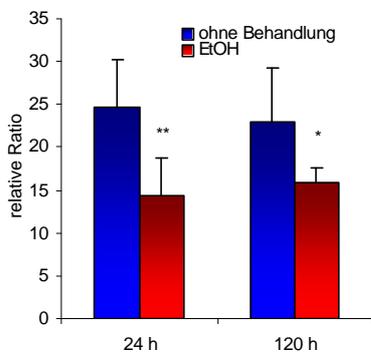
- Unabhängig von der Behandlung konnte ein kontinuierliches Wachstum beobachtet werden.
- Das Wachstum von MeWo wurde von EtOH nicht beeinflusst ($p = 0,34$).
- Nach 120 h $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung betrug die Proliferation im Vergleich zur EtOH-Kontrolle nur noch 59,08 % ($p \leq 0,0005$).

Frage 4: Welchen Einfluss hat die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?

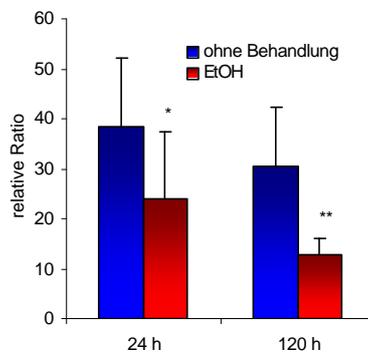
In den Proliferations-Assays zeigte sich nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung eine starke Proliferationshemmung der MeWo-Zellen. Die PPARs und der VDR spielen eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation. Die Behandlung mit Liganden kann neben dem Zellwachstum auch die Expression der Kernrezeptoren verändern. Die Untersuchung der PPAR- und VDR-Expression erfolgte zum Nachweis evtl. starker Veränderungen der mRNA-Expression der Kernrezeptoren, die mit der beobachteten Wachstumshemmung in Verbindung stehen könnten. Daneben gibt es Hinweise, dass die Signalwege verschiedener Kernrezeptoren sehr eng zusammenhängen. Dies konnte in Melanomzellen noch nicht nachgewiesen werden.

Wie beim Vorversuch wurden die Zellen in Kulturschalen (600.000 Zellen/Kulturschale) ausgesät, 2 Tage vorinkubiert und alle 2 Tage das Medium gewechselt, nach 24 und nach 120 h Kulturzeit geerntet und anschließend mit Hilfe der RT-PCR die Genexpression untersucht. Da das 1,25(OH)₂D₃ in EtOH gelöst war, wurden zuerst die Einflüsse der EtOH-Kontrolle untersucht, um sicher gehen zu können, dass Expressionsunterschiede nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung auf die Wirkung des Liganden zurückzuführen waren.

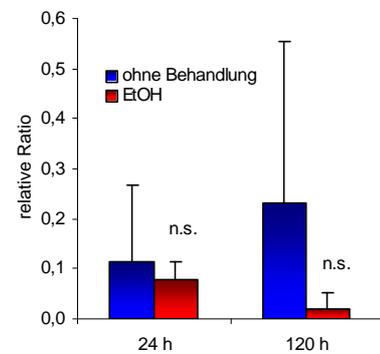
Um die Wirkung des 1,25(OH)₂D₃ zu kontrollieren, wurde zusätzlich die Expression des CYP24A1-Gens untersucht, da diese durch 1,25(OH)₂D₃ mehr als 10000-fach induziert wird. Der Versuch wurde 3 x wiederholt. Die Expression jeder Probe wurde mit Hilfe der RT-PCR 4 x gemessen, die erhaltenen Werte gemittelt und statistisch ausgewertet (Abb. 4-13 bis 4-18).



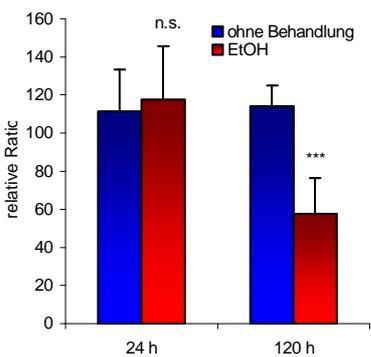
-Abb. 4-13: PPARα-Expression nach 24 und 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten MeWo (blau) (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005) (Methode: RT-PCR)



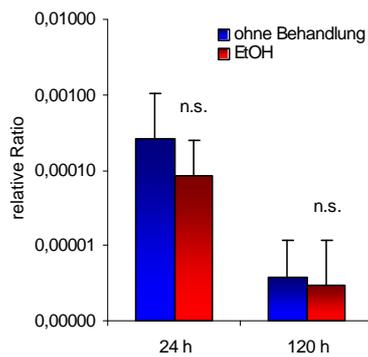
-Abb. 4-14: PPARδ-Expression nach 24 und 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten MeWo (blau) (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005) (Methode: RT-PCR)



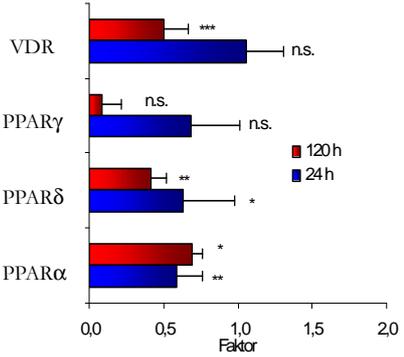
-Abb. 4-15: PPARγ-Expression nach 24 und 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten MeWo (blau) (n.s. = p > 0,05) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-16: VDR-Expression nach 24 und 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten MeWo (blau) (n.s. = p > 0,05; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-17: CYP24A1-Expression nach 24 und 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten MeWo (blau) (n.s. = p > 0,05) (Methode: RT-PCR)



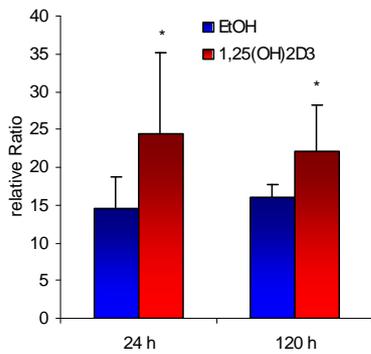
-Abb. 4-18: Faktorielle Veränderung der mRNA-Expression in EtOH-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)

Es zeigte sich, dass die EtOH-Behandlung vor allem zu einer verminderten Expression von PPARα (24 h: 58,67 % (p ≤ 0,005); 120 h: 69,17 % (p ≤ 0,05)) (Abb. 4-13 und 4-18), PPARδ (24 h: 62,89 % (p ≤ 0,05); 120 h: 41,74 % (p ≤ 0,005)) (Abb. 4-14 und 4-18) und des VDRs (24 h: (p = 0,59); 120 h: 50,62 % (p ≤ 0,0005)) (Abb. 4-16 und 4-18) führte.

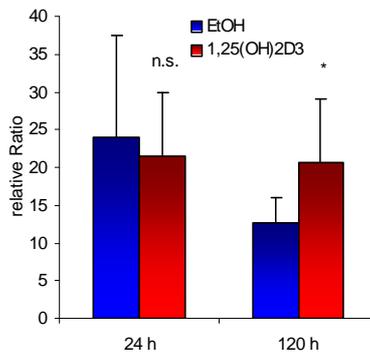
Bei sehr geringer Genexpression nahm die Standardabweichung stark zu. Die RT-PCR-Methode gehört zu den sensibelsten Methoden zum quantitativen Nachweis von selbst geringsten mRNA-Mengen. Jede Methode hat allerdings eine begrenzte Kapazität. Bei sehr geringer Genexpression d.h. nahe an der Nachweisgrenze kommt es zur starken Streuung der Messwerte. Die hohe Standardabweichung in den nachfolgenden Versuchen wie z.B. beim Nachweis der PPAR γ - oder CYP24A1-Expression, ist als ein Zeichen der sehr geringen mRNA-Expression (d.h. an der Nachweisgrenze) anzusehen. Eine häufigere Wiederholung der Versuche konnte die Standardabweichung nur minimal reduzieren.

Fazit:

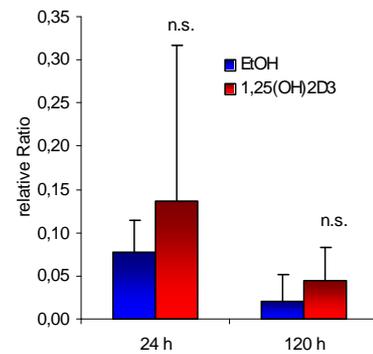
- Da EtOH die Expression der Kernrezeptoren beeinflusste, wurden in den nachfolgenden Versuchen alle Expressionsdaten der Liganden-behandelten Zellen mit der EtOH-Kontrolle in einer Konzentration von 10^{-8} M verglichen.



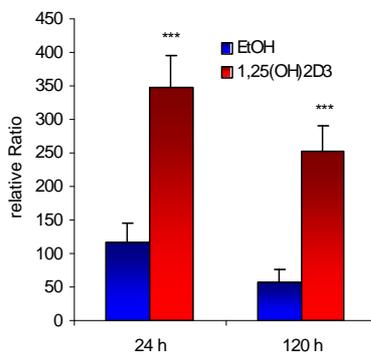
-Abb. 4-19: PPAR α -Expression nach 24 und 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten MeWo (blau) (* = $p \leq 0,05$) (Methode: RT-PCR)



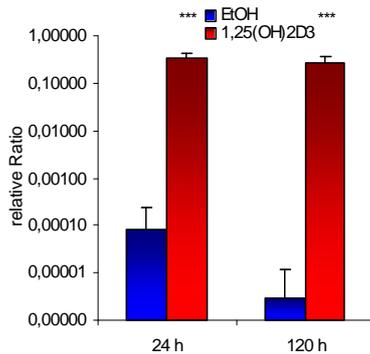
-Abb. 4-20: PPAR δ -Expression nach 24 und 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten MeWo (blau) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$) (Methode: RT-PCR)



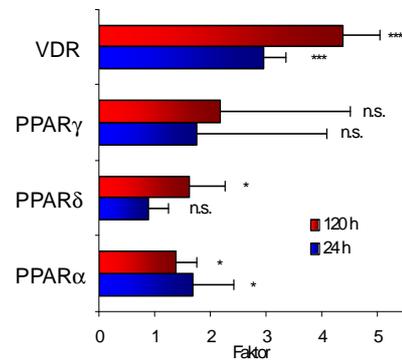
-Abb. 4-21: PPAR γ -Expression nach 24 und 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten MeWo (blau) (n.s. = $p > 0,05$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-22: VDR-Expression nach 24 und 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten MeWo (blau) (***) = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-23: CYP24A1-Expression nach 24 und 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten MeWo (blau) (***) = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-24: Faktorielle Veränderung der mRNA-Expression in 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelten Zellen im Vergleich zu EtOH-behandelten (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

Die Abb. 4-19 bis 4-24 zeigen die graphische Darstellung der gemittelten Werte nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung im Vergleich zur EtOH-Kontrolle. Nach 24 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (Konzentration 10⁻⁸ M) kam es zu einer 1,69-fach ($p \leq 0,05$) und nach 120 h zu einer 1,39-fach ($p \leq 0,05$) höheren PPAR α -Expression (Abb. 4-19 und 4-24). PPAR δ wird erst nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung 1,61-fach stärker exprimiert als die EtOH-behandelten Zellen (24 h: $p = 0,59$; 120 h: $p \leq 0,05$) (Abb. 4-20 und 4-24). Bei PPAR γ gab es keine signifikanten Unterschiede (24 h: $p = 0,36$; 120 h: $p = 0,18$) (Abb. 4-21 und 4-24). Die VDR-Expression wurde nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung hochsignifikant stärker exprimiert (24 h: 2,96-fach ($p \leq 0,0005$); 120 h: 4,39-fach ($p \leq 0,0005$)) (Abb. 4-22 und 4-24). Die CYP24A1-Expression wurde zusätzlich untersucht um die Wirksamkeit des 1,25(OH)₂D₃ beurteilen zu können. Wie erwartet, kam es bei beiden Zeitwerten zu einem sehr starken Expressionsanstieg (24 h: 3874-fach; 120 h: 93716-fach), der auch in beiden Fällen hochsignifikant war ($p \leq 0,0005$) (Abb. 4-23).

Fazit:

- Der sehr starke Expressionsanstieg von CYP24A1 zeigte, dass die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ erfolgreich war.
- Die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃, dem aktivsten natürlichen Liganden des VDRs, führte zu einem hochsignifikanten Anstieg der VDR-Expression.
- Obwohl 1,25(OH)₂D₃ kein direkter Ligand der PPARs ist, kam es zu einem signifikanten Expressionsanstieg von PPAR α (24 und 120 h) und von PPAR δ (120 h).
- Der PPAR-Expressionsanstieg nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung ist ein Hinweis auf einen *cross talk* zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs in der Melanomzelllinie MeWo.

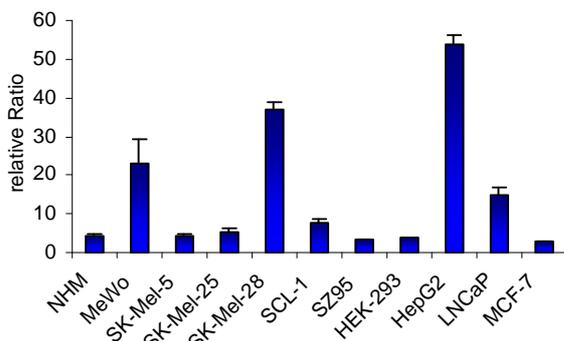
4.3. Basale PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression in anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien

Sowohl EtOH als auch 1,25(OH)₂D₃ hatten einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der Kernrezeptoren in den MeWo-Zellen. Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob diese Beobachtung nur für MeWo-Zellen gilt oder auch auf andere Melanomzelllinien oder nicht-melanozytären Zellen ausgeweitet werden kann. Bevor die Zellen mit EtOH und 1,25(OH)₂D₃ behandelt wurden, war es sinnvoll zuerst die basale mRNA-Expression der PPARs und des VDRs zu bestimmen. Untersucht wurden neben MeWo 3 Melanomzelllinien (SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), primär kultivierte humane Melanozyten (NHM) sowie eine Reihe von Zelllinien nicht-melanozytären Ursprungs (HEK293 = humane embryonale Nierenepithelzellen; HepG2 = humane Hepatoblastomzellen; LNCaP = humane Prostatakarzinomzellen; MCF-7 = humane Brustkrebszellen; SCL-1 = humane Plattenepithelkarzinomzellen; SZ95 = humane Sebozyten).

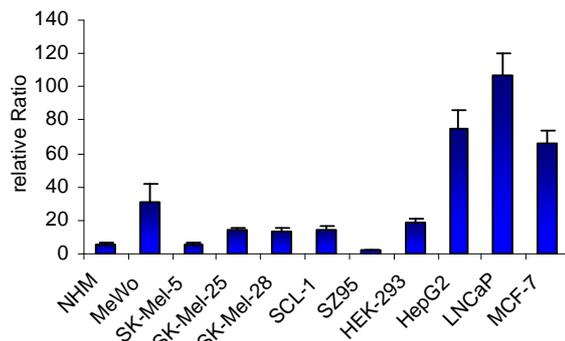
Um vergleichbare Kulturbedingungen zu schaffen, wurden die Zellen wie bei den Versuchen mit den MeWo-Zellen ausgesät, 2 Tage vorinkubiert, alle 2 Tage das Medium gewechselt und nach 120 h Kulturzeit geerntet. Anschließend wurde die Expression der verschiedenen Gene in der quantitativen RT-PCR 4 x gemessen, gemittelt, statistisch ausgewertet und in den Abb. 4-25 bis 4-28 dargestellt.

Frage 5: Haben andere Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytäre Zelllinien ein ähnliches basales Expressionsmuster der Kernrezeptoren wie MeWo-Zellen?

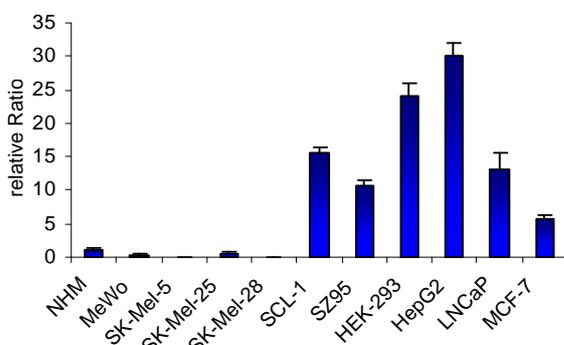
Als allererstes wurde untersucht ob andere Melanomzelllinien oder NHM ein ähnliches Expressionsmuster der Kernrezeptoren wie die MeWo-Zellen haben. Im Vergleich zu den Melanomzelllinien exprimierten NHM nur sehr geringe mRNA-Mengen aller 4 untersuchten Gene. Wenn man die mRNA-Expressionen der verschiedenen melanozytären Zelllinien miteinander vergleicht, so fällt auf, dass es lediglich bei der PPAR α - und VDR-Expression starke Unterschiede gab. SK-Mel-5 und SK-Mel-25 hatten eine etwa ähnlich hohe PPAR α -Expression wie NHM, während die basale PPAR α -Expression in MeWo etwa 5-fach höher und in SK-Mel-28 sogar etwa 8-fach höher war (Abb. 4-25).



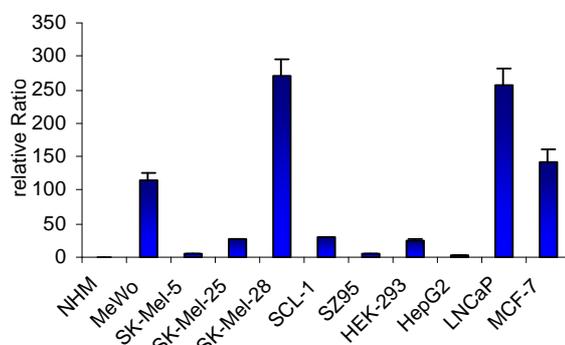
-Abb. 4-25: Basalen PPAR α -Expression nach 120 h Kultur in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28) im Vergleich zu NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, HepG2, LNCaP, MCF-7) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-26: Basalen PPAR δ -Expression nach 120 h Kultur in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28) im Vergleich zu NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, HepG2, LNCaP, MCF-7) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-27: Basalen PPAR γ -Expression nach 120 h Kultur in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28) im Vergleich zu NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, HepG2, LNCaP, MCF-7) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-28: Basalen VDR-Expression nach 120 h Kultur in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28) im Vergleich zu NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, HepG2, LNCaP, MCF-7) (Methode: RT-PCR)

Die PPAR δ -Expression war in den Zelllinien SK-Mel-25 und SK-Mel-28 etwa doppelt so hoch wie in NHM und in SK-Mel-5, war aber trotzdem nur halb so hoch wie in MeWo (Abb. 4-26). PPAR γ -Expression war in allen melanozytären Zelllinien sehr niedrig und lag teilweise unter der Nachweisgrenze. In allen Fällen war die PPAR γ -Expression deutlich unter der Expression von PPAR α und PPAR δ (Abb. 4-27). Der VDR wurde wie PPAR α in NHM sowie in SK-Mel-5 und in SK-Mel-25 nur gering exprimiert vgl. mit MeWo und SK-Mel-28 (Abb. 4-28). Auffällig war, dass ausgerechnet in den Vitamin D-sensitiven Melanomzelllinien (MeWo, SK-Mel-28) sowohl die basale VDR- als auch die PPAR α -Expression viel höher lag als in den Vitamin D-resistenten Zelllinien (SK-Mel-5, SK-Mel-25).

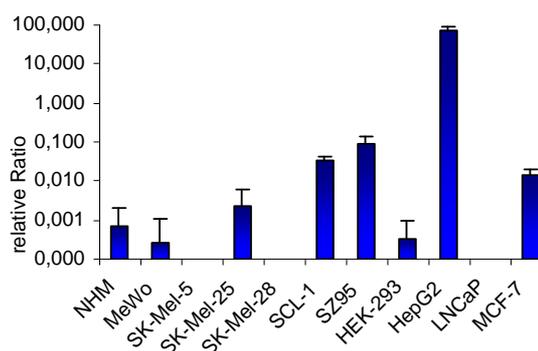
Fazit:

- Die PPAR δ -Expression war in allen Melanomzelllinien ähnlich stark.
- Die PPAR γ -Expression war in den verschiedenen Melanomzelllinien im Vergleich zu NHM sehr schwach und lag teilweise unter der Nachweisgrenze.
- PPAR α und VDR wurden dagegen in den Vitamin D-sensitiven Melanomzelllinien (MeWo, SK-Mel-28) stärker exprimiert als in den Vitamin D-resistenten Melanomzelllinien (SK-Mel-5, SK-Mel-25). Dies lässt vermuten, dass die PPAR α - und VDR-Expression in den untersuchten Melanomzellen eng miteinander verknüpft sind.
- In NHM war die PPAR- und VDR-Expression insgesamt niedriger als in den Melanomzelllinien. Dies lässt vermuten, dass die Transformation zum malignen Melanom zu einem Expressionsanstieg der Kernrezeptoren führt.

Vergleicht man nun die mRNA-Expression der melanozytären Zelllinien mit der mRNA-Expression der nicht-melanozytären Zelllinien, so fällt auf, dass die Expressionsmuster sich deutlich unterscheiden (Abb. 4-25 bis 4-28). PPAR α wurde in allen nicht-melanozytären Zelllinien (mit Ausnahme von HepG2) etwa gleich hoch wie in den melanozytären Zelllinien exprimiert (Abb. 4-25). Die PPAR δ -Expression von SCL-1 und HEK-293 lag in etwa auf gleichem Niveau wie die der melanozytären Zelllinien, während SZ95 die deutlich niedrigste PPAR δ -Expression zeigte (Abb. 4-26). HepG2, MCF-7 und vor allem LNCaP hatten eine hohe PPAR δ -Expression, welche etwa das 2 - 3,5-fache der PPAR δ -Expression in MeWo-Zellen betrug. Auch die PPAR γ -Expression war in allen nicht-melanozytären Zelllinien sehr viel stärker exprimiert (5 - 25-fach im Vergleich zu NHM) (Abb. 4-27). Bei SCL-1, SZ95 und HEK-293 war die PPAR γ -Expression sogar höher als die von PPAR α und PPAR δ . Scheinbar wird PPAR γ in allen melanozytären Zelllinien nur sehr schwach exprimiert. HepG2 hatte insgesamt eine sehr hohe Expression aller 3 PPARs und exprimierte von allen untersuchten Zelllinien sowohl PPAR α als auch PPAR γ am stärksten.

Auch der VDR wurde in allen untersuchten Zelllinien sehr unterschiedlich stark exprimiert (Abb. 4-28). NHM exprimierten den VDR nur sehr gering, während MeWo und SK-Mel-28, auch im Vergleich zu den nicht-melanozytären Zelllinien eine sehr hohe basale VDR-Expression aufwiesen. Die VDR-Expression in SCL-1, SZ95, HEK-293 und HepG2 war in etwa gleich stark wie in den Vitamin D-resistenten Melanomzelllinien (SK-Mel-5 und SK-Mel-25) und entsprach der Größenordnung der PPAR α - und PPAR δ -Expression. Von den nicht-melanozytären Zellen hatten nur LNCaP und MCF-7 eine deutlich höhere VDR-Expression, welche in etwa dem Expressionsniveau von SK-Mel-28 bzw. MeWo entsprach.

Die zusätzlich untersuchte basale CYP24A1-Expression war in den meisten Zelllinien sehr niedrig und lag bei SK-Mel-5, SK-Mel-28 und LNCaP jenseits der Nachweisgrenze (Abb. 4-29). HepG2 besaß eine außerordentlich hohe basale CYP24A1-Expression, die etwa dem 10000-fachen von NHM und etwa dem 30000-fachen von MeWo entsprach.



-Abb. 4-29: Basalen CYP24A1-Expression nach 120 h Kultur in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28) im Vergleich zu NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, HepG2, LNCaP, MCF-7) (Methode: RT-PCR)

Fazit:

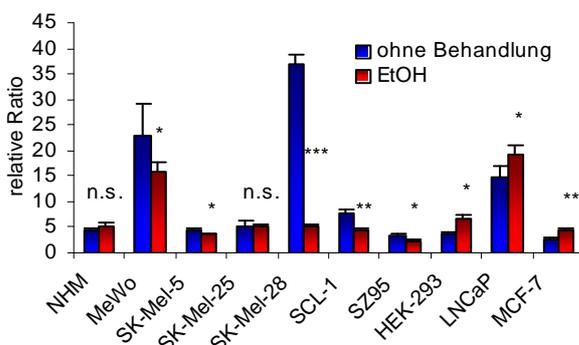
- Die untersuchten Zelllinien hatten sehr unterschiedliche basale Expressionsmuster.
- Vor allem PPAR γ wurde in den melanozytären Zelllinien im Vergleich zu den nicht-melanozytären Zelllinien viel niedriger exprimiert.
- Verglichen mit den nicht-melanozytären Zelllinien war die PPAR- und VDR-Expression in NHM sehr niedrig.
- Die PPARs wurden in LNCaP und HepG2 im Vergleich zu den anderen nicht-melanozytären Zelllinien am stärksten exprimiert.
- Während die basale VDR-Expression in HepG2 am niedrigsten von allen untersuchten Zelllinien war, war die CYP24A1-Expression in HepG2 bei weitem am stärksten ausgeprägt.
- Aus diesem Grund wird 1,25(OH) $_2$ D $_3$ in HepG2 sehr schnell abgebaut. Auf eine 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung von HepG2 wurde deswegen in den nachfolgenden Versuchen abgesehen.

4.4. PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung in anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien

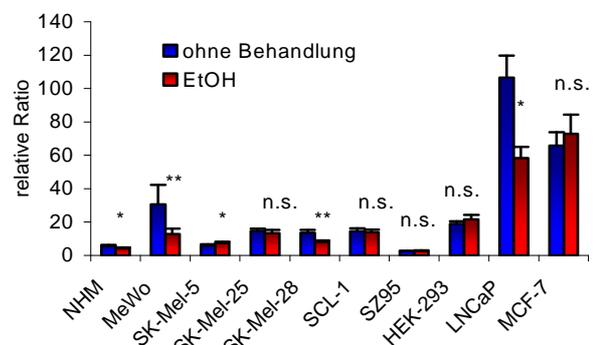
Frage 6: Kommt es nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung in den anderen Melanomzelllinien, in NHM und in den nicht-melanozytären Zelllinien zu ähnlichen Expressionsveränderungen der Kernrezeptoren wie in MeWo?

Wie in Kapitel 4.2. beschrieben führte die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ in MeWo neben einem Anstieg der VDR-Expression auch zu einem Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression in MeWo. Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob diese Beobachtung nur für MeWo-Zellen gilt oder auch auf andere Melanomzelllinien oder nicht-melanozytäre Zellen ausgeweitet werden kann. Da sich in den vorherigen Versuchen zeigte, dass die HepG2-Zellen wegen der niedrigen VDR-Expression und der sehr hohen basalen CYP24A1-Expression das 1,25(OH)₂D₃ sehr schnell abbauen, wurde auf eine Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ verzichtet. Behandlungszyklen über 48 h führten in Vorversuchen zu keinem nachweisbaren 1,25(OH)₂D₃-Effekt. Um die Zellen sinnvoll zu behandeln, müsste man alle 6 - 12 h nachbehandeln. Da die Resultate dann nicht mit den übrigen vergleichbar wären, wurde auf die 1,25(OH)₂D₃-Behandlung von HepG2 verzichtet.

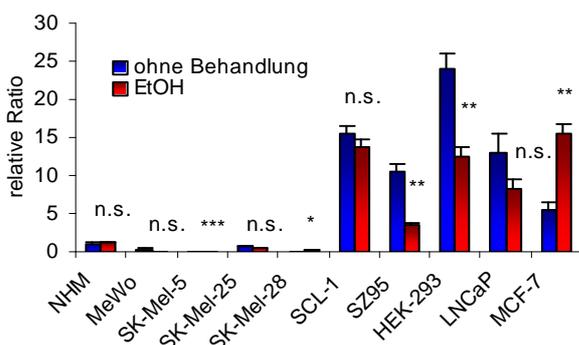
Da auch das Lösungsmittel EtOH die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen signifikant beeinflusst, erfolgte neben der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ ebenfalls eine EtOH-Behandlung (jeweils in einer Konzentration von 10⁻⁸ M). Wie in den Versuchen mit den MeWo-Zellen wurden die verschiedenen Zelllinien 2 Tage vorinkubiert, alle 2 Tage das Medium gewechselt, nach 120 h Kulturzeit geerntet und die Expression der verschiedenen Gene in der quantitativen RT-PCR 4 x gemessen, gemittelt, statistisch ausgewertet und in den Abb. 4-30 bis 4-43 dargestellt.



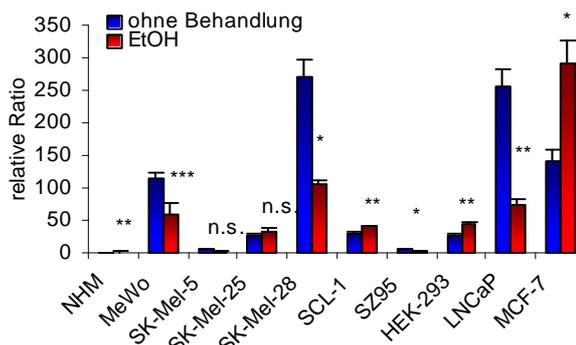
-Abb. 4-30: PPAR α -Expression nach 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-31: PPAR δ -Expression nach 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-32: PPAR γ -Expression nach 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-33: VDR-Expression nach 120 h EtOH-Behandlung (rot) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

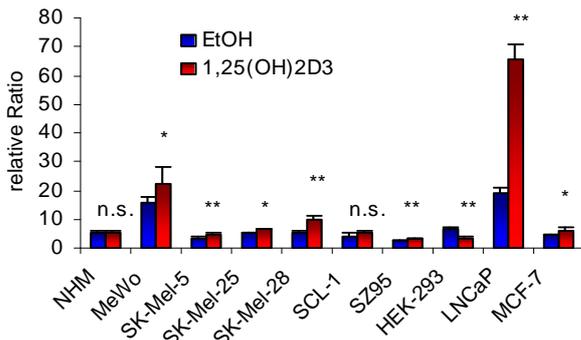
Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte die Behandlung mit EtOH über 120 h vor allem in den Melanomzelllinien zu einer niedrigeren mRNA-Expression der untersuchten Kernrezeptoren (Abb. 4-30 bis 4-33).

Fazit:

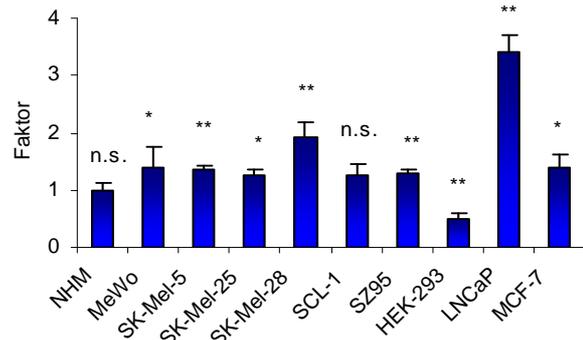
- Die 120 h EtOH-Behandlung nahm nicht nur in MeWo Einfluss auf die Expression der Kernrezeptoren, sondern auch in den anderen untersuchten Zelllinien.
- Verallgemeinerungen fielen schwer, da jede Zelllinie ein anderes Expressionsmuster der Kernrezeptoren besaß und auf das EtOH unterschiedlich reagierte.
- Da EtOH allein zu signifikanten Expressionsveränderungen der Kernrezeptoren führte, mussten die Expressionsdaten nach 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung mit denen der EtOH-Kontrolle verglichen werden um Substanz-spezifische Expressionsunterschiede festzustellen.

Die Abb. 4-34 bis 4-43 zeigen die graphische Darstellung der gemittelten Werte nach 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung im Vergleich zur EtOH-Kontrolle.

PPAR α -Expression: Unter 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung über 120 h kam es wie in MeWo auch in den anderen untersuchten Melanomzelllinien, sowie in einem Teil der nicht-melanozytären Zelllinien zu einer signifikant höheren PPAR α -Expression (SK-Mel-5: 1,35-fach, $p \leq 0,005$; SK-Mel-25: 1,24-fach, $p \leq 0,05$; SK-Mel-28: 1,92-fach, $p \leq 0,005$; SZ95: 1,28-fach, $p \leq 0,005$; LNCaP: 3,41-fach, $p \leq 0,005$; MCF-7: 1,40-fach, $p \leq 0,05$) (Abb. 4-34 und 4-35).

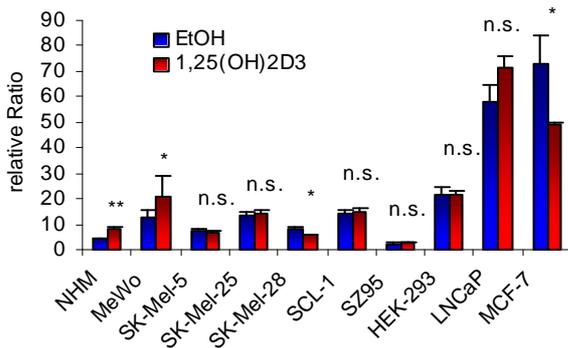


-Abb. 4-34: PPAR α -Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

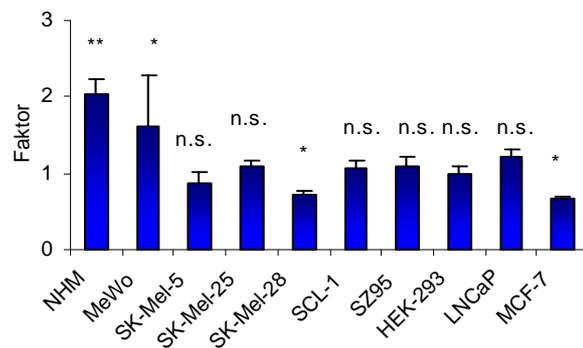


-Abb. 4-35: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

PPAR δ -Expression: Die in MeWo beobachtete höhere PPAR δ -Expression im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ konnte lediglich in NHM beobachtet werden (2,04-fach, $p \leq 0,005$) (Abb. 4-36 und 4-37).

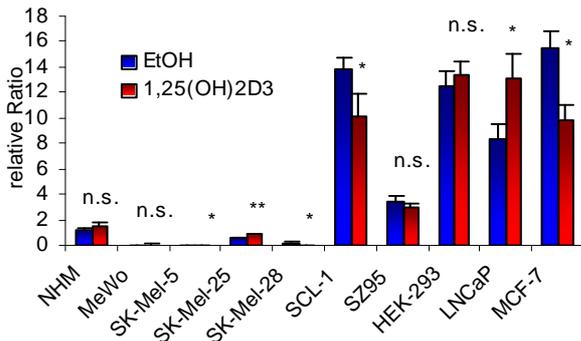


-Abb. 4-36: PPAR δ -Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

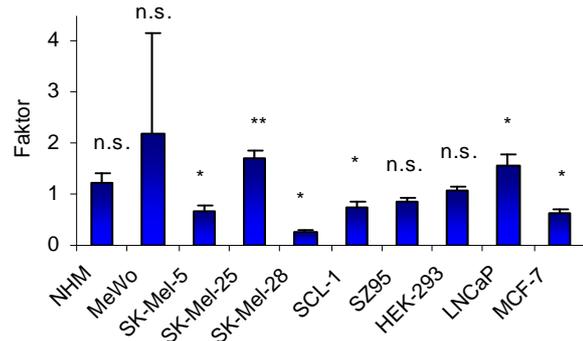


-Abb. 4-37: Faktorielle Veränderung der PPAR δ -Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

PPAR γ -Expression: Nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl zu Anstiegen (SK-Mel-25: 1,71-fach, $p \leq 0,005$; LNCaP: 1,56-fach, $p \leq 0,05$) als auch zu Abfällen der PPAR γ -Expression (SK-Mel-5: 66,72 % ($p \leq 0,05$); SK-Mel-28 27,26 % ($p \leq 0,05$); SCL-1 74,02 % ($p \leq 0,05$); MCF-7 63,01 % ($p \leq 0,05$)) (Abb. 4-38 und 4-39).

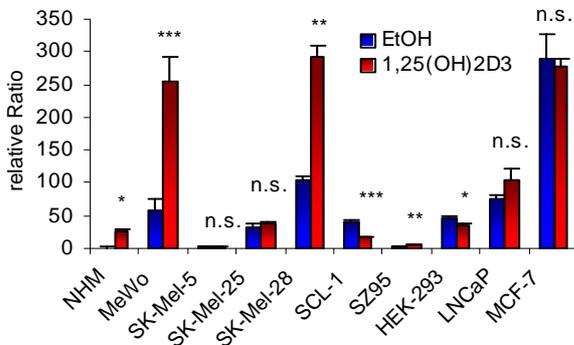


-Abb. 4-38: PPARγ-Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005) (Methode: RT-PCR)

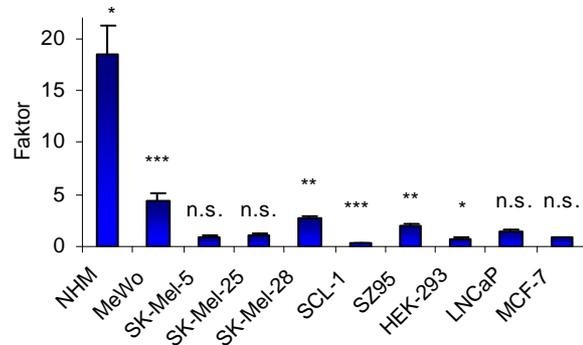


-Abb. 4-39: Faktorielle Veränderung der PPARγ-Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005) (Methode: RT-PCR)

VDR-Expression: Die 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung führte vgl. mit der EtOH-Kontrolle in der Melanomzelllinie SK-Mel-28 (2,79-fach, p ≤ 0,005), in NHM (18,50-fach, p ≤ 0,05) und in SZ95 (2,06-fach, p ≤ 0,005) ähnlich wie in MeWo zu einem Anstieg der VDR-Expression (Abb. 4-40 und 4-41). Nach 120 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ kam es aber zu keiner signifikanten Veränderung der VDR-Expression in SK-Mel-5 und SK-Mel-25 im Vergleich zur Behandlung mit EtOH.

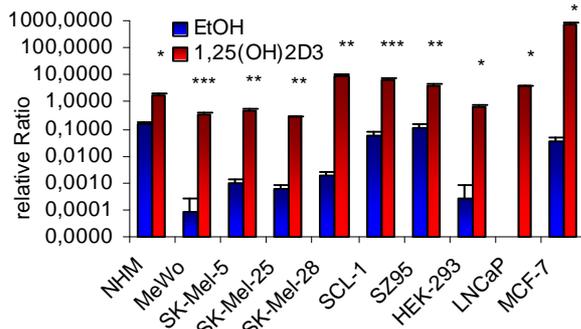


-Abb. 4-40: VDR-Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)

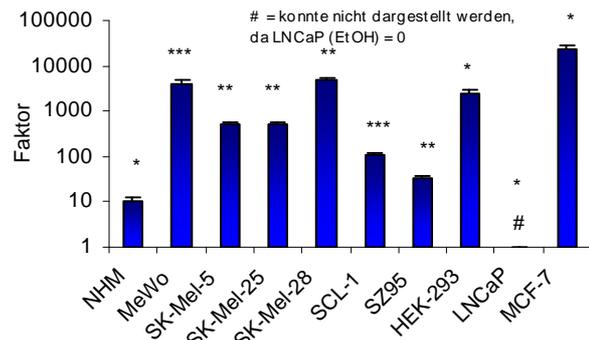


-Abb. 4-41: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)

CYP24A1-Expression: Die Untersuchung der CYP24A1-Expression (als klassisches 1,25(OH)₂D₃-Zielgen) zeigte eine gute transkriptionelle Aktivität von 1,25(OH)₂D₃ in allen Zelllinien (Abb. 4-42 und 4-43). Auffällig war, dass der CYP24A1-Expressionsanstieg in SK-Mel-28 (5092-fach, p ≤ 0,005) in etwa dem in MeWo entspricht, während der Anstieg in den Vitamin D-resistenten Melanomzelllinien etwa 8 - 10 mal niedriger war (SK-Mel-5: 531-fach, p ≤ 0,005; SK-Mel-25: 504-fach, p ≤ 0,005).



-Abb. 4-42: CYP24A1-Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (rot) im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (blau) in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-43: Faktorielle Veränderung der CYP24A1-Expression nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen in Melanomzellen (MeWo, SK-Mel-5, SK-Mel-25, SK-Mel-28), NHM und nicht-melanozytären Zelllinien (SCL-1, SZ95, HEK-293, LNCaP, MCF-7) (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)

Fazit:

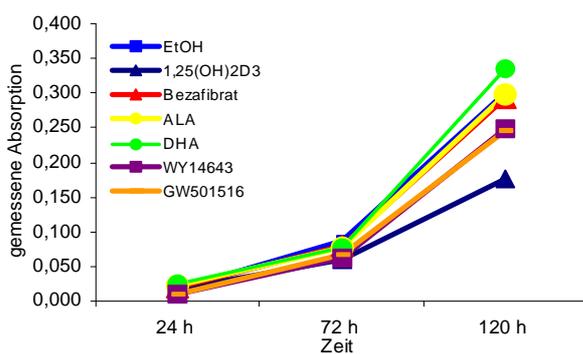
- Der VDR wurde in den Melanomzelllinien MeWo und SK-Mel-28, aber nicht in SK-Mel-5 und SK-Mel-25, nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung signifikant höher exprimiert als in der EtOH-Kontrolle. Zu einem Anstieg der VDR-Expression nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung kam es außerdem auch in NHM und SZ95. In den anderen untersuchten Zelllinien konnte kein signifikanter Anstieg beobachtet werden. Dies zeigt, dass es sowohl unter den Melanomzelllinien als auch unter nicht-melanozytären Zelllinien 1,25(OH)₂D₃-sensitive und 1,25(OH)₂D₃-resistente Zelllinien gibt.
- Der in den MeWo-Zellen beobachtete PPAR δ -Expressionsanstieg nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung konnte in den untersuchten Zelllinien nur in NHM nachgewiesen werden.
- Die PPAR α -Expression stieg nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung in allen untersuchten Melanomzelllinien, sowie in einem Teil der nicht-melanozytären Zelllinien vgl. mit EtOH-behandelten Zellen an. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass die Signalwege der PPARs und des VDRs nicht nur in MeWo, sondern auch in einer ganzen Reihe anderer Zelllinien interagieren.

4.5. Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach Behandlung mit PPAR-Liganden allein

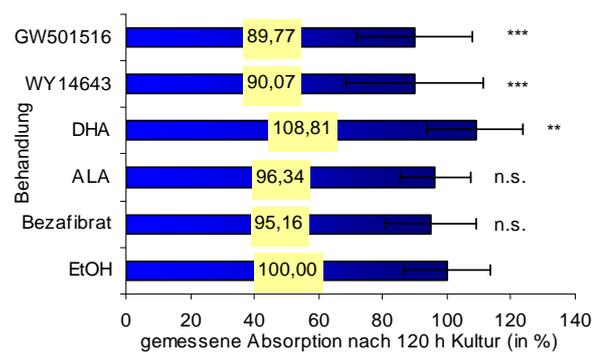
Frage 7: Welchen Einfluss hat die Behandlung mit PPAR-Liganden auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

Der VDR-Ligand 1,25(OH)₂D₃ führte zu einer Proliferationshemmung von MeWo-Zellen (siehe Kapitel 4.2.). Da sowohl der VDR als auch die PPARs eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation spielen, sollte der folgende Versuch zeigen, ob es auch unter der Behandlung mit den PPAR-Liganden Bezafibrat, ALA, DHA, WY14643 oder GW501516 zu einer Veränderung des Wachstums- und Proliferationsverhaltens von MeWo-Zellen kommt.

Wie in den Proliferations-Assays mit der 1,25(OH)₂D₃-Behandlung wurden 3000 Zellen/Well in 24 Well-Mikrotiterplatten gegeben, 2 Tage vorinkubiert und das Medium (mit den PPAR-Liganden) alle 48 h gewechselt. Bis auf Bezafibrat erfolgte die Behandlung mit allen PPAR-Liganden in einer Konzentration von 10⁻⁸ M. Bezafibrat wurde in einer Konzentration von 200 µM benutzt, weil niedrigere Konzentrationen wie in einer anderen Studie gezeigt (Kippenberger et al., 2001) keine signifikanten Effekte erzielen konnten. Da alle Liganden in EtOH gelöst waren, mussten die Mittelwerte der Liganden-behandelten Zellen mit der EtOH-behandelten Kontrolle verglichen werden. Nach 24, 72 und 120 h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und wie in den anderen Proliferations-Assays fotometrisch vermessen. Der Versuch wurde 3 - 5 x wiederholt, gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 4-44 und 4-45).



-Abb. 4-44: Anstieg der MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett färbung der MeWo-Zellen) über eine Kulturdauer von 120 h in 96-Wellmikrotiterplatten nach Behandlung mit Bezafibrat (rot), ALA (gelb), DHA (grün), WY14643 (violett) und GW501516 (orange) im Vergleich zur EtOH- (hellblau) und 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (dunkelblau)



-Abb. 4-45: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h Behandlung mit Bezafibrat, ALA, DHA, WY14643 und GW501516 im Vergleich zur EtOH-Behandlung (n.s. = p > 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005)

Nach 120 h Behandlung mit WY14643 oder GW501516 betrug die Proliferation nur 90,07 % ($p \leq 0,0005$) bzw. 89,77 % ($p \leq 0,0005$) der Proliferation nach EtOH-Behandlung (Abb. 4-44 und 4-45). Dagegen führte die Behandlung mit DHA zu einem starksignifikanten Proliferationsanstieg (108,81 %, $p \leq 0,005$). Die 120 h Behandlung mit Bezafibrat und ALA führte zu keinen Veränderungen des Zellwachstums.

Fazit:

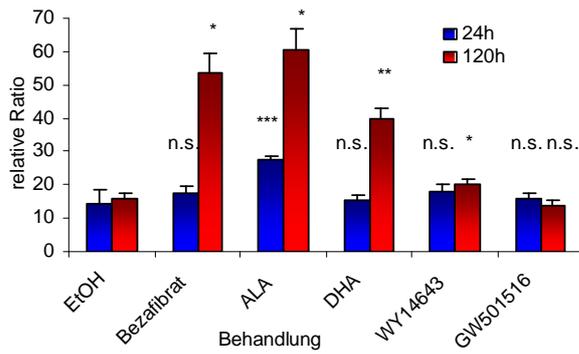
- Die 120 h Behandlung mit DHA förderte das Wachstum von MeWo leicht.
- WY14643 oder GW501516 führte zu einer hochsignifikanten Wachstumshemmung von MeWo von etwa 10 %.
- Der Versuch zeigte, dass ein Teil der PPAR-Liganden die Proliferation von MeWo-Zellen ähnlich wie der VDR-Ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hemmte und potentielle antiproliferative Therapeutika in der Therapie des malignen Melanoms darstellen.
- Nachfolgend wurde untersucht, ob die Behandlung mit PPAR-Liganden zu ähnlichen Veränderungen der PPAR- und VDR-Expression führte wie die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung.

Frage 8: Welchen Einfluss hat die Behandlung mit PPAR-Liganden auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?

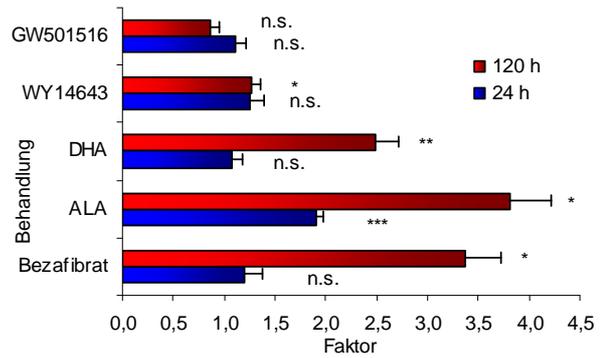
Da es nach Behandlung mit einem Teil der PPAR-Liganden ähnlich wie nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung zu einer Veränderung des Zellwachstums kam und der VDR-Ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ neben einem Anstieg der VDR-Expression auch zu einem Anstieg der PPAR α -Expression führte (siehe Kapitel 4.2.), sollte der folgende Versuch zeigen, ob es auch nach Behandlung mit PPAR-Liganden zu einer Veränderung der PPAR- und VDR-Expression kommt.

Um die Ergebnisse korrelieren zu können, wurden die MeWo-Zellen genauso wie in den Proliferations-Assays und den vorigen RT-PCR-Versuchen 2 Tage vorinkubiert, mit den Liganden Bezafibrat, ALA, DHA, WY14643 oder GW501516 behandelt, nach 24 und 120 h Behandlungszeit geerntet und die Expression der verschiedenen Gene in der quantitativen RT-PCR 4 x gemessen und gemittelt. Da alle PPAR-Liganden in EtOH gelöst waren, wurden alle Ergebnisse mit der EtOH-Kontrolle verglichen und in den Abb. 4-46 bis 4-51 dargestellt.

PPAR α -Expression: Im Vergleich zur Behandlung mit EtOH kam es vor allem nach 120 h Behandlung mit allen PPAR-Liganden (außer GW501516) zu signifikant höheren Werten der PPAR α -Expression (Bezafibrat: 3,37-fach, $p \leq 0,05$; ALA: 3,81-fach, $p \leq 0,05$; DHA: 2,49-fach, $p \leq 0,005$; WY14643: 1,27-fach, $p \leq 0,05$) (Abb. 4-46 bis 4-47). Nach 24 h führte lediglich die Behandlung mit ALA zu einem PPAR α -Expressionsanstieg (1,90-fach, $p \leq 0,0005$).

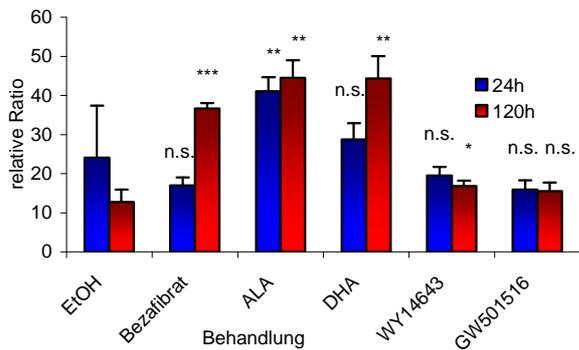


-Abb. 4-46: PPAR α -Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit verschiedenen PPAR-Liganden im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

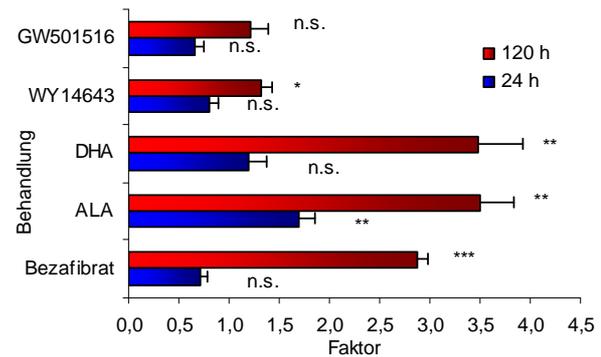


-Abb. 4-47: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach Behandlung mit verschiedenen PPAR-Liganden im Vergleich zur EtOH-Kontrolle (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

PPAR δ -Expression: Nach der Behandlung mit den PPAR-Liganden kam es neben den PPAR α -Expressionanstiegen zu Anstiegen der PPAR δ -Expression (Abb. 4-48 bis 4-49). Nach 24 h ALA-Behandlung kam es zu einem 1,70-fachen PPAR δ -Expressionsanstieg ($p \leq 0,005$). Auch die 120 h Behandlung mit allen PPAR-Liganden (außer GW501516) führte zum Anstieg der PPAR δ -Expression (Bezafibrat: 2,88-fach, $p \leq 0,0005$; ALA: 3,50-fach, $p \leq 0,005$; DHA: 3,48-fach, $p \leq 0,0005$; WY14643: 1,32-fach, $p \leq 0,05$).



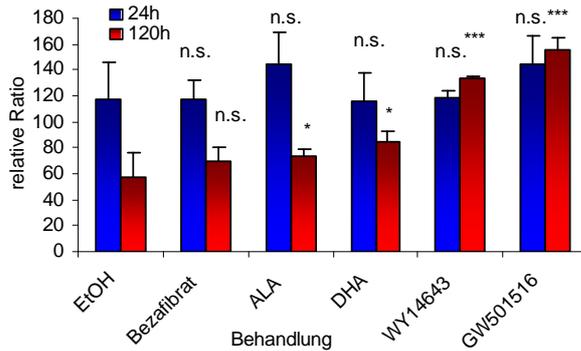
-Abb. 4-48: PPAR δ -Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit verschiedenen PPAR-Liganden im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



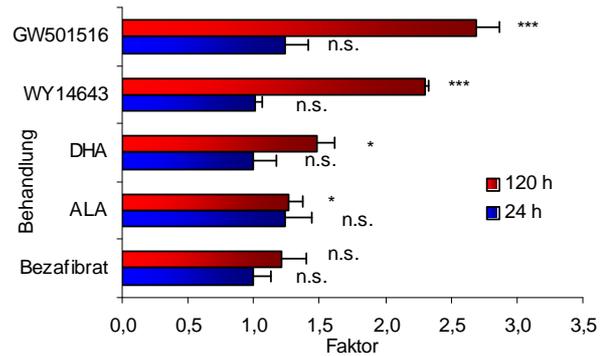
-Abb. 4-49: Faktorielle Veränderung der PPAR δ -Expression nach Behandlung mit verschiedenen PPAR-Liganden im Vergleich zur EtOH-Kontrolle (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

PPAR γ -Expression: Die Behandlung mit den PPAR-Liganden über 24 und 120 h führte zu keinen signifikanten Veränderungen der PPAR γ -Expression (Daten im Anhang Kapitel 8).

VDR-Expression: Neben Expressionsanstiegen von PPAR α und PPAR δ kam es aber auch zu Anstiegen der VDR-Expression (Abb. 4-50 und 4-51). Diese konnten allerdings erst nach 120 h Behandlung mit den PPAR-Liganden (außer Bezafibrat) beobachtet werden (ALA: 1,27-fach, $p \leq 0,05$; DHA: 1,48-fach, $p \leq 0,05$; WY14643: 2,30-fach, $p \leq 0,0005$; GW501516: 2,69-fach, $p \leq 0,0005$). Auffällig war, dass die PPAR-Liganden WY14643 und GW501516, welche den stärksten antiproliferativen Effekt in MeWo hatten, auch den stärksten VDR-Expressionsanstieg bewirkten.



-Abb. 4-50: VDR-Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit verschiedenen PPAR-Liganden im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-51: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach Behandlung mit verschiedenen PPAR-Liganden im Vergleich zur EtOH-Kontrolle (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

CYP24A1-Expression: Da es nach der Behandlung mit den PPAR-Liganden (vor allem WY14643 und GW501516), sowohl zu einer Proliferationshemmung der MeWo-Zellen kam, als auch zu einem Anstieg der VDR-Expression, wurde zusätzlich die CYP24A1-Expression ermittelt. Sowohl vor als auch nach Behandlung mit den PPAR-Liganden fand sich eine sehr niedrige CYP24A1-Expression. Signifikante Anstiege gegenüber EtOH-behandelten Zellen oder im Zeitverlauf konnten unter Behandlung mit den PPAR-Liganden nicht beobachtet werden (Daten im Anhang Kapitel 8).

Fazit:

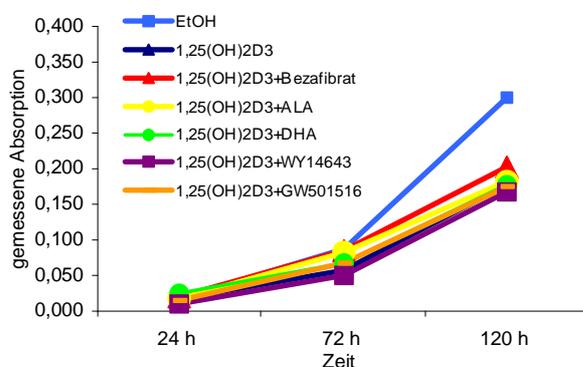
- Vor allem die 120 h Behandlung mit den Rezeptor-unspezifischen PPAR-Liganden (Bezafibrat, ALA und DHA) bewirkte einen Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression in MeWo.
- Mit Ausnahme der Bezafibrat-Behandlung führte die 120 h Behandlung mit allen PPAR-Liganden vgl. mit der EtOH-Behandlung zu einem Anstieg der VDR-Expression. Die beobachtete Wachstumshemmung durch die PPAR-Liganden WY14643 (PPAR α -spezifisch) und GW501516 (PPAR δ -spezifisch) korrelierte mit einem Anstieg der VDR-Expression.
- Der Anstieg der VDR-Expression nach Behandlung mit den PPAR-Liganden war ein weiterer Hinweis auf einen *cross talk* zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs.
- Nachfolgend wurde untersucht welchen Einfluss eine direkte Aktivierung beider Signalwege durch eine kombinierte Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden auf das Wachstumsverhalten und die Expression der Kernrezeptoren hat.

4.6. Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden

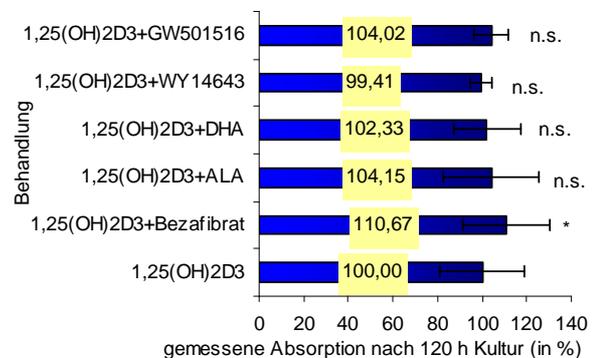
Frage 9: Welchen Einfluss hat die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

Sowohl 1,25(OH)₂D₃ als auch ein Teil der PPAR-Liganden allein (v.a. WY14643 und GW501516) hemmten das Zellwachstum von MeWo signifikant (siehe Kapitel 4.2. und 4.5.). Der folgende Proliferations-Assay sollte zeigen, ob die kombinierte Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden zu einer synergistischen Hemmung des Zellwachstums führt oder die starke Proliferationshemmung von 1,25(OH)₂D₃ sogar durch die gleichzeitige Behandlung mit den PPAR-Liganden abgeschwächt wird.

Wie in den vorherigen Proliferations-Assays wurden 3000 Zellen/Well in 24 Well-Mikrotiterplatten gegeben, 2 Tage vorinkubiert und gleichzeitig mit 1,25(OH)₂D₃ und jeweils einem PPAR-Liganden behandelt. Nach 24, 72 und 120 h wurde dann ein Teil der Mikrotiterplatten mit Kristallviolett gefärbt und wie in den anderen Proliferations-Assays fotometrisch vermessen. Der Versuch wurde 3 - 5 x wiederholt, gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 4-52).



-Abb. 4-52: Anstieg der MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett färbung der MeWo-Zellen) über eine Kulturdauer von 120 h in 96-Wellmikrotiterplatten nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat (rot), 1,25(OH)₂D₃+ALA (gelb), 1,25(OH)₂D₃+DHA (grün), 1,25(OH)₂D₃+WY14643 (violett) und 1,25(OH)₂D₃+GW501516 (orange) im Vergleich zur EtOH-(hellblau) und 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (dunkelblau)

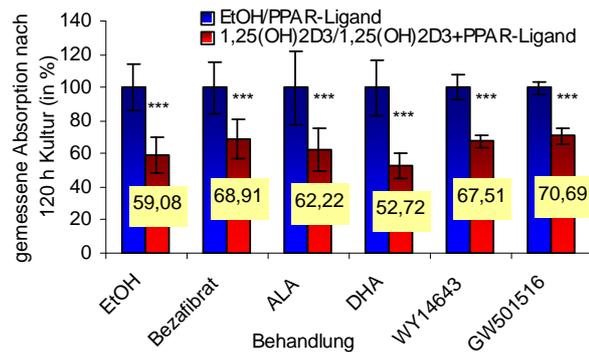


-Abb. 4-53: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat, 1,25(OH)₂D₃+ALA, 1,25(OH)₂D₃+DHA, 1,25(OH)₂D₃+WY14643 und 1,25(OH)₂D₃+GW501516 im Vergleich zur EtOH-Behandlung (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05)

Im Vergleich zur EtOH-behandelten Kontrolle nahm die Proliferation nach 120 h Behandlung bei allen kombinierten Behandlungen wie bei der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ allein um etwa 40 % ab (Abb. 4-52). Es kam aber zu keiner synergistischen Abnahme der Proliferation d.h. zu keiner stärkeren Abnahme der Proliferation als nach alleiniger Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃

(Abb. 4-53). Nach kombinierter Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +Bezafibrat kam es vgl. zur Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein sogar zu einer signifikanten Abnahme der Wachstumshemmung (110,67 %, $p \leq 0,05$).

Im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem jeweiligen Liganden kam es zu einer hochsignifikanten Wachstumshemmung von MeWo-Zellen ($p \leq 0,0005$) (Abb. 4-54). Diese Wachstumshemmung war bei allen Liganden mit Ausnahme von DHA schwächer (1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat: 68,91 %; 1,25(OH)₂D₃+ALA: 62,22 %; 1,25(OH)₂D₃+WY14643: 67,51 %; 1,25(OH)₂D₃+GW501516: 70,69 % jeweils bezogen auf die Behandlung mit dem jeweiligen PPAR-Liganden allein) als bei der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein (59,08 %). Die stärkere Proliferationsabnahme auf 52,72 % durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA konnte durch die Proliferationssteigerung durch Behandlung mit DHA allein erklärt werden.



-Abb. 4-54: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett-färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +Bezafibrat, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ALA, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +WY14643 und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +GW501516 im Vergleich zur Behandlung mit dem jeweiligen PPAR-Liganden alleine (***) = $p \leq 0,0005$

Fazit:

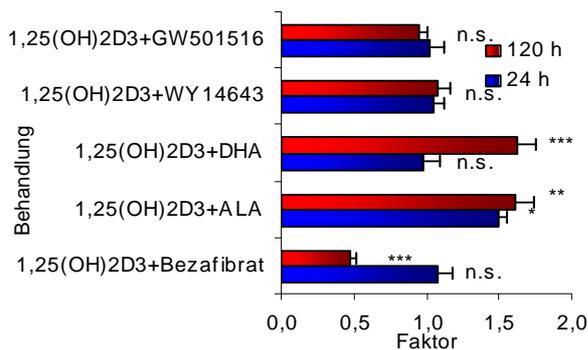
- Eine kombinierte Behandlung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden führte zu einer hochsignifikanten Hemmung des Zellwachstums. Diese betrug etwa 60 % des Wertes der EtOH-Kontrolle.
- Verglichen mit der Behandlung $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder den PPAR-Liganden allein kam es nach der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden zu keinem synergistischen antiproliferativen Effekt.
- Nachfolgend wurde untersucht, ob sich diese Beobachtung auch in der PPAR- und VDR-Expression der behandelten MeWo-Zellen widerspiegelt.

Frage 10: Welchen Einfluss hat die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?

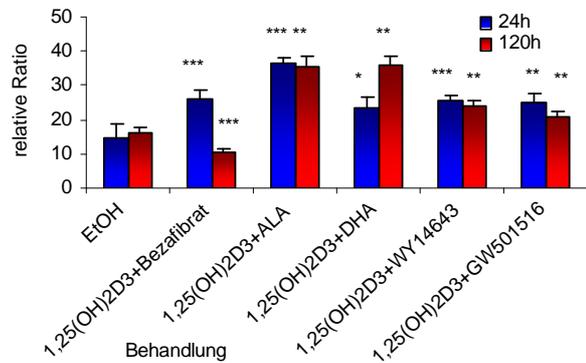
Sowohl die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch die PPAR-Liganden allein führten zu Anstiegen der PPAR- und VDR-Expression in MeWo (siehe Kapitel 4.2. und 4.5.). Die nachfolgenden Versuche sollten zeigen, ob die kombinierte Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden zu ähnlichen oder sogar stärkeren (synergistischen) Anstiegen der PPAR- und VDR-Expression führt als die Behandlungen mit den jeweiligen Liganden allein.

Die MeWo-Zellen wurden genauso wie in den vorigen RT-PCR-Versuchen 2 Tage vorinkubiert, mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und jeweils einem PPAR-Liganden behandelt, nach 24 und 120 h Behandlungszeit geerntet und die Expression der verschiedenen Gene in der quantitativen RT-PCR 4 x gemessen und gemittelt. Die Rohdaten der PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression wurden im Vergleich zur EtOH-Kontrolle in den Abb. 4-55, 4-58, 4-61 und 4-64 dargestellt.

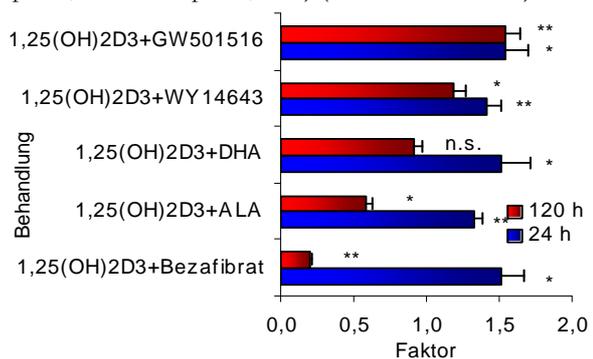
PPAR α -Expression: Im Vergleich zur $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung kam es nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ALA-Behandlung (24 h: 1,50-fach, $p \leq 0,05$; 120 h: 1,61-fach, $p \leq 0,005$) und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA (120 h: 1,63-fach, $p \leq 0,0005$) zu einer signifikant höheren PPAR α -Expression (Abb. 4-56).



-Abb. 4-56: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zur $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-55: PPAR α -Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zur EtOH-behandelten Zellen (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

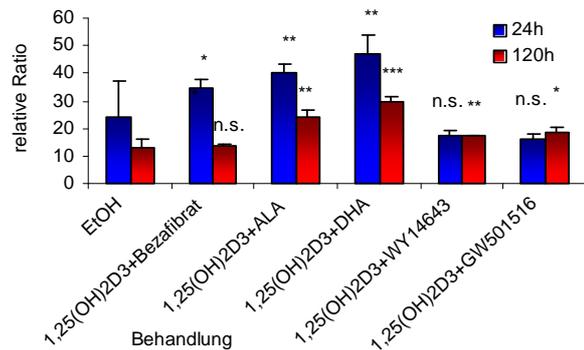


-Abb. 4-57: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zur Behandlung mit den PPAR-Liganden alleine (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

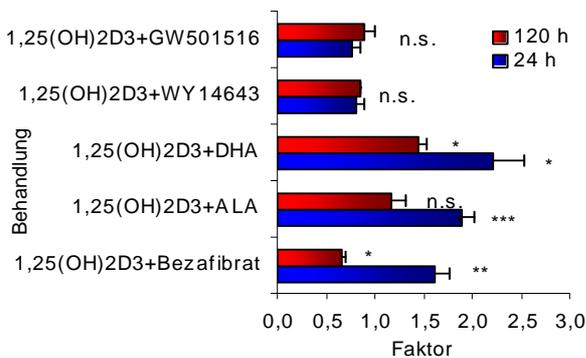
Im Vergleich zur Behandlung mit den PPAR-Liganden allein kam es nach 24 h Behandlung bei allen Kombinationen zu einer erhöhten PPAR α -Expression ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +Bezafibrat: 1,52-fach, $p \leq 0,05$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ALA: 1,33-fach, $p \leq 0,005$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA: 1,51-fach, $p \leq 0,05$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +WY14643: 1,42-fach, $p \leq 0,005$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +GW501516: 1,54-fach, $p \leq 0,05$) (Abb. 4-57). Zu einem ähnlichen Anstieg kam es auch nach 120 h Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +WY14643 (1,18-fach, $p \leq 0,05$) oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +GW501516 (1,54-fach, $p \leq 0,005$). Auffällig war, dass die PPAR α -Expression v.a. nach 120 h $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +Bezafibrat-Behandlung (48,04 % der PPAR α -Expression nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung, $p \leq 0,0005$ oder 19,79 % der PPAR α -Expression nach Bezafibrat-Behandlung, $p \leq 0,005$) signifikant schwächer

war. Auch nach 120 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+ALA betrug die PPARα-Expression 58,74 % (p ≤ 0,05) der PPARα-Expression nach der ALA-Behandlung. Insgesamt führte die kombinierte Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden aber zu keinem synergistischen Anstieg der PPARα-Expression im Vergleich zur Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und den PPAR-Liganden allein.

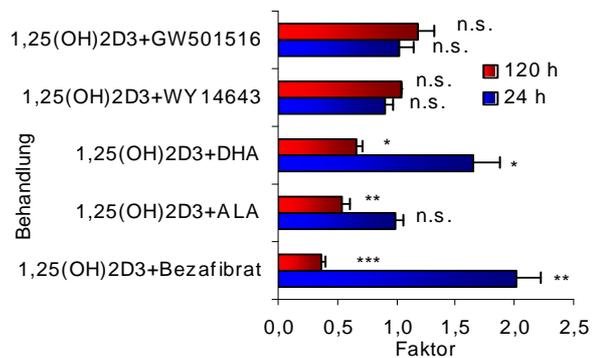
PPARδ-Expression: Beim Vergleich der kombinierten Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden mit den 1,25(OH)₂D₃-behandelten Zellen stieg die PPARδ-Expression nach 24 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat, 1,25(OH)₂D₃+ALA und 1,25(OH)₂D₃+DHA um das 1,61-fache (p ≤ 0,005), 1,89-fache (p ≤ 0,0005) bzw. 2,21-fache (p ≤ 0,05) (Abb. 4-59). Auch nach 120 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+DHA kam es zu einem 1,44-fachen (p ≤ 0,05) Anstieg der PPARδ-Expression. Nach 120 h 1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat-Behandlung war die PPARδ-Expression ähnlich wie die PPARα-Expression signifikant schwächer im Vergleich zur alleinigen 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (65,48 %, p ≤ 0,05).



-Abb. 4-58: PPARδ-Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-59: Faktorielle Veränderung der PPARδ-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden im Vergleich zu 1,25(OH)₂D₃-behandelten Zellen (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,0005) (Methode: RT-PCR)



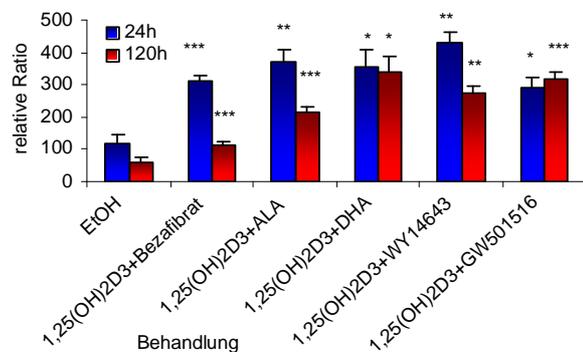
-Abb. 4-60: Faktorielle Veränderung der PPARδ-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+PPAR-Liganden im Vergleich zur Behandlung mit den PPAR-Liganden alleine (n.s. = p > 0,05; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005) (Methode: RT-PCR)

Im Vergleich zur Behandlung mit dem jeweiligen PPAR-Liganden allein kam es nach 24 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat oder mit 1,25(OH)₂D₃+DHA zu einem 2,02-fachen (p ≤ 0,005) bzw. 1,64-fachen (p ≤ 0,05) Anstieg der PPARδ-Expression (Abb. 4-60). Dagegen kam es nach 120 h Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃+Bezafibrat, 1,25(OH)₂D₃+ALA oder 1,25(OH)₂D₃+DHA vgl. mit dem jeweiligen PPAR-Liganden allein zu einem Abfall auf 36,68 %

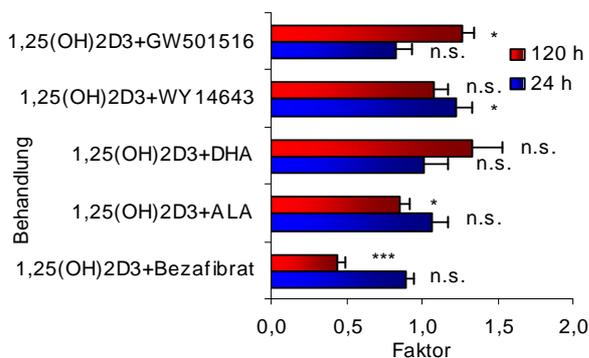
($p \leq 0,0005$), 54,10 % ($p \leq 0,005$) bzw. 66,79 % ($p \leq 0,05$) der PPAR δ -Expression. Auch bei der Untersuchung der PPAR δ -Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden konnten im Vergleich zur Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ und den PPAR-Liganden allein keine synergistischen Effekte beobachtet werden.

PPAR γ -Expression: Die Behandlung mit den 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden über 24 und 120 h führte im Vergleich zur Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ oder den jeweiligen PPAR-Liganden allein zu keinen oder nur geringen Veränderungen der PPAR γ -Expression (Daten im Anhang Kapitel 8.).

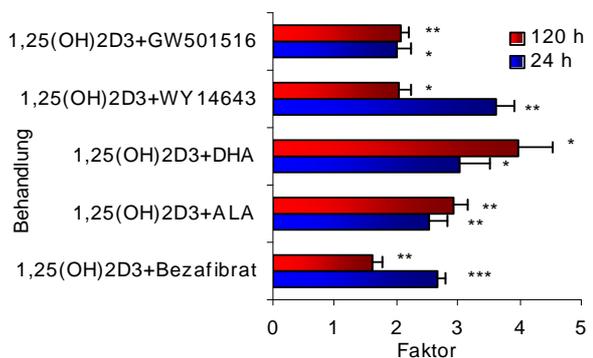
VDR-Expression: Im Vergleich zur Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ allein führte die 120 h Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +Bezafibrat oder 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +ALA zu einer signifikanten Abnahme der VDR-Expression und betrug nur noch 44,44 % ($p \leq 0,0005$) bzw. 84,93 % ($p \leq 0,05$). Die Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +WY14643 oder 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +GW501516 führte dagegen zu einer leicht stärkeren VDR-Expression (1,25(OH) $_2$ D $_3$ +WY14643: 1,23-fach, $p \leq 0,05$; 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +GW501516: 1,26-fach, $p \leq 0,05$) (Abb. 4-62).



-Abb. 4-61: VDR-Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



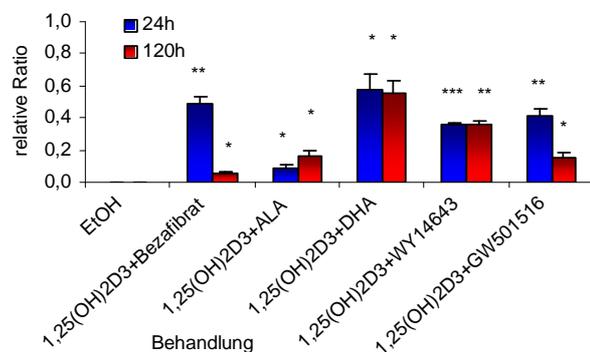
-Abb. 4-62: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-63: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zur Behandlung mit den PPAR-Liganden alleine (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

Dagegen kam es nach 24 und 120 h Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden zu signifikanten Anstiegen der VDR-Expression im Vergleich zu der VDR-Expression der Zellen, die nur mit PPAR-Liganden behandelt wurden ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +Bezafibrat: 24 h: 2,67-fach, $p \leq 0,0005$, 120 h: 1,61-fach, $p \leq 0,005$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ALA: 24 h: 2,54-fach, $p \leq 0,005$, 120 h: 2,94-fach, $p \leq 0,005$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA: 24 h: 3,03-fach, $p \leq 0,05$, 120 h: 3,97-fach, $p \leq 0,05$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +WY14643: 24 h: 3,63-fach, $p \leq 0,005$, 120 h: 2,04-fach, $p \leq 0,05$; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +GW501516: 24 h: 1,99-fach, $p \leq 0,05$, 120 h: 2,06-fach, $p \leq 0,005$) (Abb. 4-63). Insgesamt war die VDR-Expression nach der kombinierten Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden ähnlich stark wie die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein.

CYP24A1-Expression: Die CYP24A1-Expression gibt als Biomarker die Wirksamkeit der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an. Die signifikanten Anstiege der CYP24A1-Expression im Vergleich zur EtOH-Kontrolle zeigten, dass die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden erfolgreich war und die kombinierte Behandlung mit den PPAR-Liganden die Wirksamkeit der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung nicht wesentlich beeinflusste (Abb. 4-64).



-Abb. 4-64: CYP24A1-Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)

Fazit:

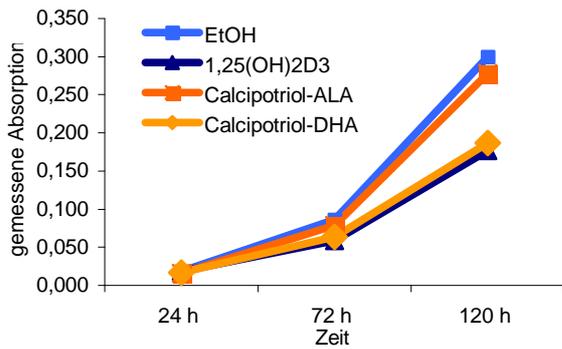
- Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle führten fast alle kombinierten Behandlungen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden zu Anstiegen der PPAR α -, PPAR δ -, VDR- und CYP24A1-Expression.
- Nach der kombinierten Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden kam es im Vergleich zur Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder den PPAR-Liganden allein zu keinen synergistischen Effekten.
- Da die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder den PPAR-Liganden allein die Signalwege sowohl der PPARs als auch des VDRs aktivierte, scheint eine gleichzeitige Behandlung mit PPAR- und VDR-Liganden keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Behandlung mit PPAR- oder VDR-Liganden zu haben.
- Nachfolgend wurde in MeWo-Zellen untersucht, ob eine direkte Bindung von PPAR-Liganden an Calcipotriol (als Vitamin D-Metabolit) Vorzüge gegenüber der kombinierten Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden hat.

4.7. Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen und Expression der PPARs und des VDRs in MeWo nach Behandlung mit Calcipotriol-Analoga

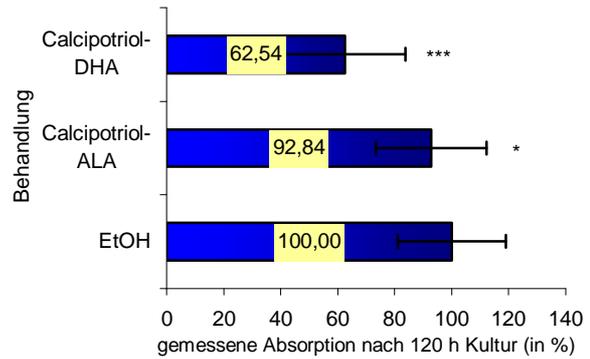
Wie in den vorherigen Versuchen gezeigt, bewirkten sowohl ein Teil der PPAR-Liganden als auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein eine Wachstumshemmung von MeWo und veränderten die PPAR- und VDR-Expression. Die Effekte auf die Zelldifferenzierung und -proliferation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden bereits seit einigen Jahren therapeutisch als antiproliferatives Agens in der Tumorbehandlung und in der Behandlung der Psoriasis genutzt. Da die systemische Therapie mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ häufig zu hyperkalzämischen Nebenwirkungen führt, wurden in den letzten Jahren vermehrt Vitamin D_3 -Analoga entwickelt, die weniger Einfluss auf den Kalziumhaushalt haben. Es zeigte sich, dass z.B. das Vitamin D-Analogon Calcipotriol *in vivo* eine starke dosisabhängige Wachstumshemmung mit geringen kalzämischen Nebenwirkungen besitzt (Colston et al., 1992; Gniadecki, 1996; Reichrath et al., 1997). In den nachfolgenden Versuchen wurden MeWo-Zellen mit Calcipotriol-Analoga behandelt, welche PPAR-Liganden gebunden hatten. Diese Analoga unterschieden sich lediglich durch die jeweiligen gebundenen ungesättigten Fettsäuren (ALA bei Calcipotriol-ALA und DHA bei Calcipotriol-DHA). Es sollte sich zeigen, ob diese Analoga evtl. die wachstumshemmenden Eigenschaften der VDR- und PPAR-Liganden besser vermitteln als die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ALA oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA. Die Untersuchung der PPAR- und VDR-Expression sollte zudem zeigen, welche Signalwege bei der Behandlung mit den Analoga aktiviert werden.

Frage 11: Welchen Einfluss hat die Behandlung mit Calcipotriol-Analoga auf das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen?

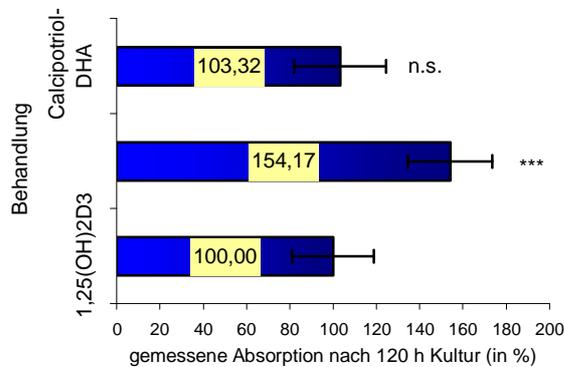
Die ALA- und DHA-Behandlung führte zu keiner signifikanten Proliferationshemmung (siehe Kapitel 4.5.). Dagegen führten sowohl der VDR-Ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch die PPAR-Liganden WY14643 und GW501516 zu einer Proliferationshemmung von MeWo. Der nachfolgende Versuch sollte zeigen inwiefern Analoga, welche sich aus einem VDR- und einem PPAR-Liganden zusammensetzen die wachstumshemmenden Eigenschaften beider Liganden evtl. besser vermitteln als die Einzelsubstanzen. Wie in allen vorherigen Proliferations-Assays wurden 3000 Zellen/Well in 24 Well-Mikrotiterplatten gegeben, 2 Tage vorinkubiert und das Medium (mit den Calcipotriol-Analoga in einer Konzentration von 10^{-8} M) alle 48 h gewechselt. Nach 24, 72 und 120 h wurde dann die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und wie in den anderen Proliferations-Assays fotometrisch vermessen (Abb. 4-65). Der Versuch wurde 3 - 5 x wiederholt. Da die Analoga in EtOH gelöst waren, wurden die ermittelten Mittelwerte mit der EtOH-behandelten Kontrolle verglichen.



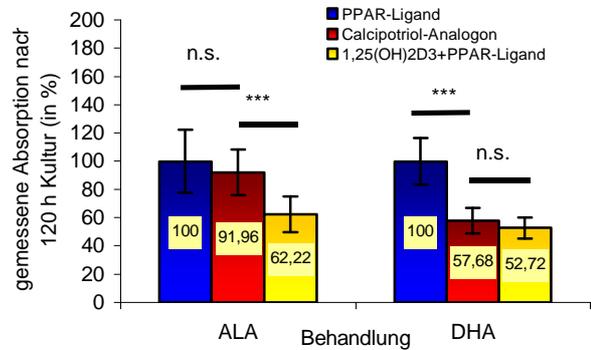
-Abb. 4-65: Anstieg der MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett-färbung der MeWo-Zellen) über eine Kulturdauer von 120 h in 96-Wellmikrotiterplatten nach Behandlung mit Calcipotriol-ALA (dunkelorange) und Calcipotriol-DHA (hellorange) im Vergleich zur EtOH-(hellblau) und 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (dunkelblau)



-Abb. 4-66: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett-färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA und Calcipotriol-DHA im Vergleich zur EtOH-Behandlung (* = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$)



-Abb. 4-67: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett-färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA und Calcipotriol-DHA im Vergleich zur 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (n.s. = $p > 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$)



-Abb. 4-68: MeWo-Zellzahl (= proportional zur gemessenen Absorption bei 550 nm nach Kristallviolett-färbung der MeWo-Zellen) in % nach 120 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA und Calcipotriol-DHA (rot) bzw. 1,25(OH)₂D₃-ALA und 1,25(OH)₂D₃-DHA (gelb) im Vergleich zur Behandlung mit ALA und DHA allein (blau) (n.s. = $p > 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$)

Obwohl beide Calcipotriol-Analoga sehr ähnlich aufgebaut waren, wirkten sie unterschiedlich stark auf das Zellwachstum. Calcipotriol-ALA führte im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen lediglich zu einer leichten Wachstumshemmung (92,84 %, $p \leq 0,05$) (Abb. 4-66). Die Behandlung mit Calcipotriol-ALA bewirkte in MeWo nach 120 h Kultur vgl. mit ALA keine signifikante Wachstumshemmung (91,95 %, $p = 0,08$) und war somit am ehesten mit der alleinigen ALA-Behandlung vergleichbar (Abb. 4-67 und 4-68). Die Behandlung mit Calcipotriol-DHA führte dagegen nach 120 h im Vergleich zur EtOH-Behandlung zu einer stärkeren Proliferationshemmung und betrug nur 62,54 % ($p \leq 0,0005$) der EtOH-Kontrolle (Abb. 4-66). Im Vergleich zur Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ (103,32 %, $p = 0,26$) und 1,25(OH)₂D₃+DHA (107,91 %, $p = 0,06$) konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abb. 4-67 und 4-68). Die Behandlung mit Calcipotriol-DHA war somit mit der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ allein oder in Kombination mit dem PPAR-Liganden DHA vergleichbar.

Fazit:

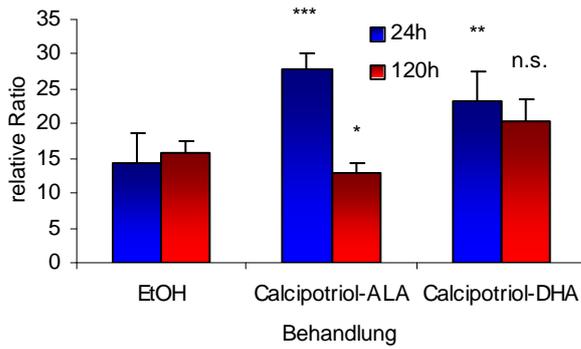
- Obwohl die 2 Analoga ähnlich aufgebaut waren und sich lediglich durch den angehängten PPAR-Liganden unterschieden, wirkten sie ganz unterschiedlich auf MeWo-Zellen.
- Calcipotriol-ALA bewirkte nur eine leichte Proliferationshemmung. Die Behandlung mit Calcipotriol-ALA ähnelte am ehesten der Behandlung mit ALA allein.
- Calcipotriol-DHA führte zu einer viel stärkeren Hemmung des Zellwachstums und ähnelte somit eher der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein oder in Kombination mit DHA.

Frage 12: Welchen Einfluss hat die Behandlung mit Calcipotriol-Analoga auf die PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen?

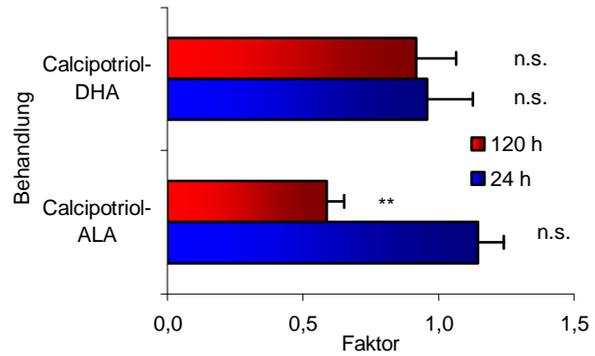
Trotz der ähnlichen chemischen Struktur hatten beide Calcipotriol sehr unterschiedliche Effekte auf die Proliferation der MeWo-Zellen. Die Untersuchung der mRNA-Expression mit Hilfe der quantitativen RT-PCR sollte zeigen, ob das unterschiedliche Wachstumsverhalten von MeWo nach Behandlung mit den beiden Calcipotriol-Analoga auch mit entsprechenden Veränderungen in der Expression von PPAR, VDR oder CYP24A1 einhergeht. Wie in den vorherigen Versuchen wurden die MeWo-Zellen 2 Tage vorinkubiert, mit den Calcipotriol-Analoga (10^{-8} M) behandelt, nach 24 und 120 h Behandlungszeit geerntet und die Expression der verschiedenen Gene in der quantitativen RT-PCR 4 x gemessen und gemittelt. Die Rohdaten der PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression wurden im Vergleich zur EtOH-Kontrolle in den Abb. 4-69, 4-73, 4-77 und 4-81 dargestellt.

PPAR α -Expression: Nach 24 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder ALA kam es zu keinem signifikanten Anstieg der PPAR α -Expression (Abb. 4-70 und 4-71). Nach 120 h betrug die PPAR α -Expression 58,67 % ($p \leq 0,005$) der PPAR α -Expression nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung und 76,24 % ($p \leq 0,05$) der PPAR α -Expression nach ALA-Behandlung. Im Vergleich zur Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ALA nahm die PPAR α -Expression sowohl nach 24 h (76,24 %, $p \leq 0,05$) als auch nach 120 h (36,42 %, $p \leq 0,005$) signifikant ab (Abb. 4-72).

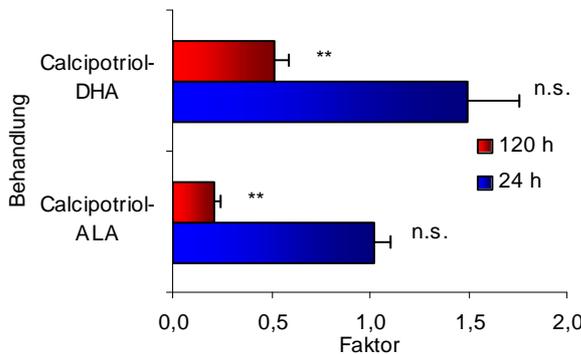
Die Behandlung mit Calcipotriol-DHA führte im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten Zellen zu keinen signifikanten Veränderungen der PPAR α -Expression (Abb. 4-70). Im Vergleich zur Behandlung mit DHA oder mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA kam es nach 24 h zu keinen Veränderungen, während die PPAR α -Expression nach 120 h Behandlung mit Calcipotriol-DHA 51,19 % ($p \leq 0,005$) der PPAR α -Expression nach DHA-Behandlung bzw. 56,32 % ($p \leq 0,005$) der PPAR α -Expression nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +DHA betrug (Abb. 4-71 und 4-72).



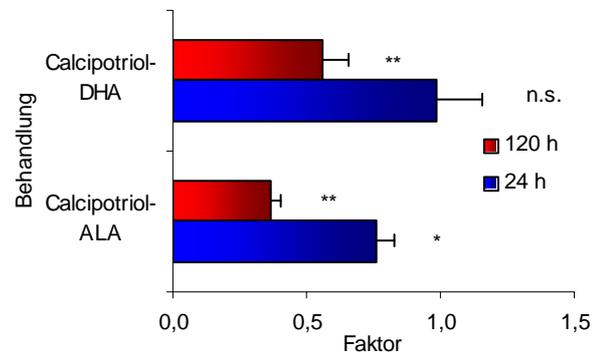
-Abb. 4-69: PPAR α -Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-70: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)



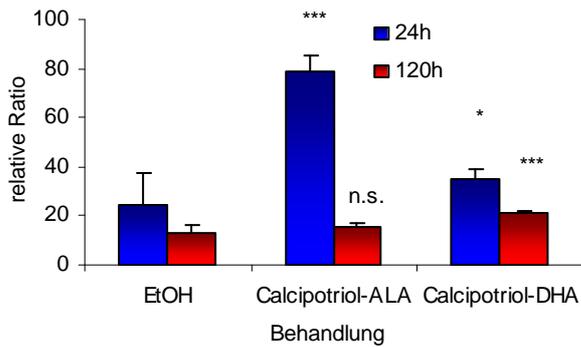
-Abb. 4-71: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu dem jeweiligen PPAR-Liganden alleine (n.s. = $p > 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)



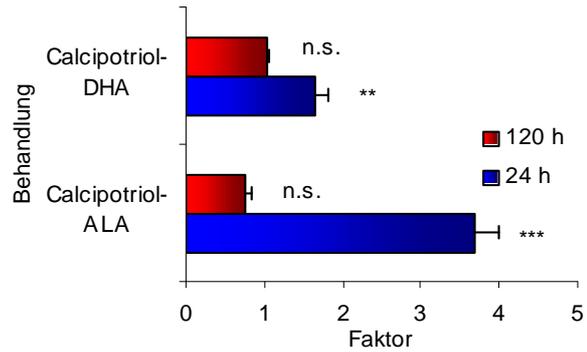
-Abb. 4-72: Faktorielle Veränderung der PPAR α -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

PPAR δ -Expression: Im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelten Zellen bewirkte die 24 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA einen 3,68-fachen ($p \leq 0,0005$) oder mit Calcipotriol-DHA einen 1,65-fachen ($p \leq 0,005$) Expressionsanstieg von PPAR δ (Abb. 4-74). Nach 120 h Behandlung konnte keine Veränderung festgestellt werden (Calcipotriol-ALA: $p = 0,12$; Calcipotriol-DHA: $p = 0,73$).

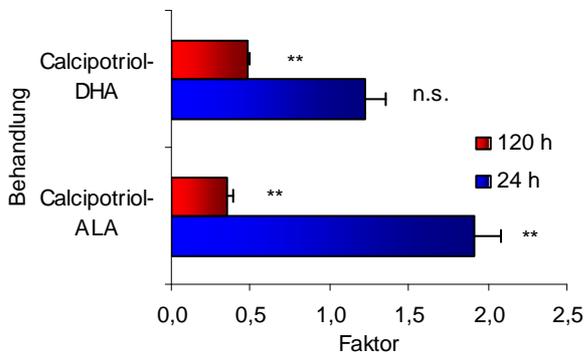
Im Vergleich zur Behandlung mit den jeweiligen PPAR-Liganden allein oder in Kombination mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ führte die 24 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA zu einem 1,92-fachen ($p \leq 0,005$) bzw. 1,95-fachen ($p \leq 0,005$) Anstieg der PPAR δ -Expression (Abb. 4-75 und 4-76). Die 24 h Behandlung mit Calcipotriol-DHA veränderte die PPAR δ -Expression nicht. Nach 120 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA oder Calcipotriol-DHA kam es dagegen zu starksignifikant erniedrigten Werten der PPAR δ -Expression (21,39 % bzw. 48,53 % der PPAR δ -Expression nach Behandlung mit den PPAR-Liganden allein und 65,05 % bzw. 72,67 % der PPAR δ -Expression der 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden-behandelten Zellen).



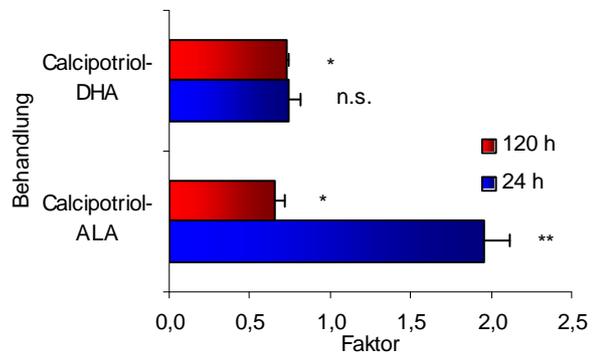
-Abb. 4-73: PPAR δ -Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-74: Faktorielle Veränderung der PPAR δ -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



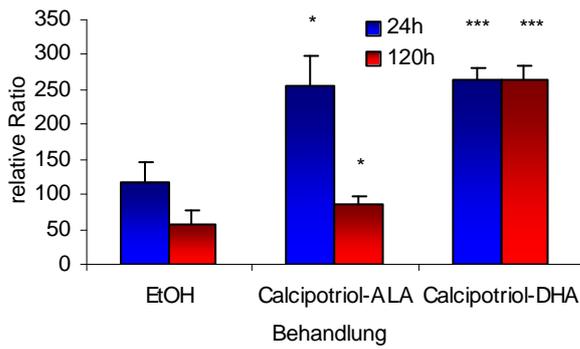
-Abb. 4-75: Faktorielle Veränderung der PPAR δ -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu dem jeweiligen PPAR-Liganden alleine (n.s. = $p > 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)



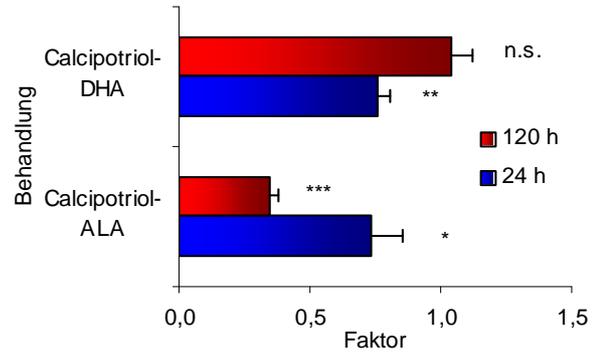
-Abb. 4-76: Faktorielle Veränderung der PPAR δ -Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +PPAR-Liganden (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

PPAR γ -Expression: Nach Behandlung mit den Calcipotriol-Liganden über 24 und 120 h war die PPAR γ -Expression ähnlich wie bei der Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ und/oder den PPAR-Liganden sehr niedrig und nah oder sogar jenseits der Nachweisgrenze (Daten im Anhang Kapitel 8).

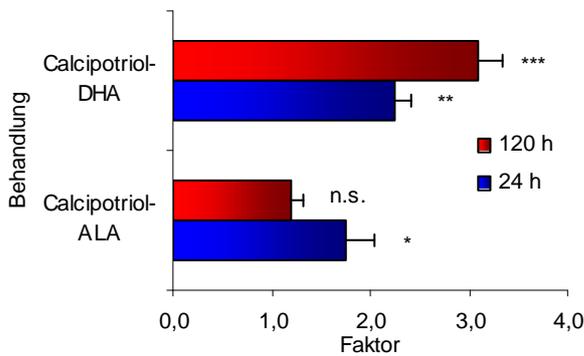
VDR-Expression: Die Behandlung mit Calcipotriol-ALA führte im Vergleich zu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelten Zellen und der Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +ALA zur Verringerung der VDR-Expression (73,14 % ($p \leq 0,05$) bzw. 34,39 % ($p \leq 0,0005$) der VDR-Expression nach 24 h bzw. 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Behandlung und 68,98 % ($p \leq 0,05$) bzw. 40,49 % ($p \leq 0,005$) der VDR-Expression nach 24 h bzw. 120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +ALA-Behandlung) (Abb. 4-78 und 4-80). Im Vergleich zur Behandlung mit ALA allein kam es nach 24 h Behandlung mit Calcipotriol-ALA zu einem 1,75-fachen Anstieg der VDR-Expression (Abb. 4-79). Ein ähnlicher Anstieg konnte nach 120 h Behandlung nicht beobachtet werden ($p = 0,11$).



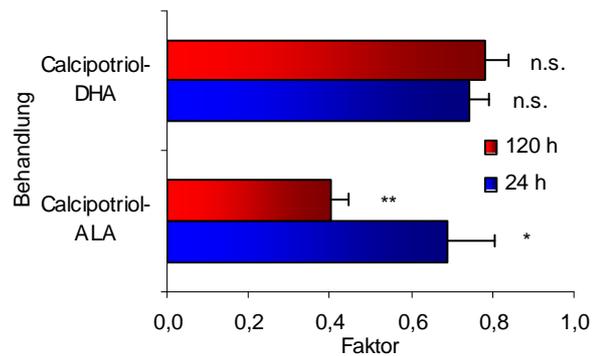
-Abb. 4-77: VDR-Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (* = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-78: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



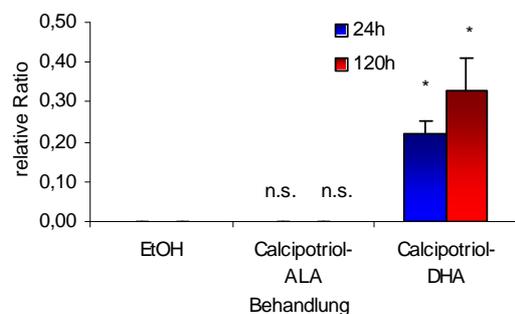
-Abb. 4-79: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu dem jeweiligen PPAR-Liganden alleine (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,0005$) (Methode: RT-PCR)



-Abb. 4-80: Faktorielle Veränderung der VDR-Expression nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$) (Methode: RT-PCR)

Mit Ausnahme des VDR-Expressionsabfalls nach 24 h Behandlung vgl. mit den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten Zellen (75,51 %, $p \leq 0,005$) führte Calcipotriol-DHA zu keinen signifikanten VDR-Expressionsveränderungen im Vergleich zur Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein oder in Kombination mit DHA (Abb. 4-78 und 4-80). Im Vergleich zur Behandlung mit DHA allein kam es sowohl nach 24, als auch nach 120 h Behandlung mit Calcipotriol-DHA zu einem 2,26-fachen ($p \leq 0,005$), bzw. 3,10-fachen ($p \leq 0,0005$) Anstieg der VDR-Expression (Abb. 4-79).

CYP24A1-Expression: Zusätzlich wurde die CYP24A1-Expression untersucht. Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle führte die Behandlung mit Calcipotriol-ALA zu keinem Anstieg der CYP24A1-Expression. Nach Behandlung mit Calcipotriol-DHA stieg die CYP24A1-Expression signifikant an (24 h: 2637-fach, $p \leq 0,05$; 120 h: 113678-fach, $p \leq 0,05$) (Abb. 4-81).



-Abb. 4-81: CYP24A1-Expression in MeWo nach 24 h (blau) und 120 h (rot) Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga im Vergleich zu EtOH-behandelten Zellen (n.s. = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$) (Methode: RT-PCR)

Fazit:

- Calcipotriol-ALA und Calcipotriol-DHA hatten trotz ihrem ähnlichen Aufbau auf die Zellproliferation und die mRNA-Expression unterschiedliche Auswirkungen.
- Die PPAR-, VDR- und vor allem die CYP24A1-Expression zeigten nach Behandlung mit Calcipotriol-ALA keine Anzeichen einer $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - oder Calcipotriol-Wirkung. Die Behandlung mit Calcipotriol-ALA ähnelte insgesamt am ehesten der Behandlung mit ALA allein und scheint keinen Vorteil gegenüber der Behandlung mit ALA allein zu haben.
- Calcipotriol-DHA veränderte dagegen die mRNA-Expression der untersuchten Gene ähnlich wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein oder in Kombination mit DHA. Calcipotriol-DHA scheint somit von allen untersuchten Behandlungen am geeignetsten, da Calcipotriol weniger hyperkalzämische Nebenwirkungen hat als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aber einen stärkeren antiproliferativen Effekt hat als die Behandlung mit den PPAR-Liganden allein.

4.8. *Cross talk* zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs

Frage 13: Gibt es Hinweise auf einen cross talk der PPAR- und VDR-Signalwege in den MeWo-Zellen?

In einer Reihe von Zelllinien (z.B. Brust- und Prostatakarzinomzellen) wurde ein *cross talk* zwischen nukleären Hormonrezeptoren beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass VDR-Liganden auch den PPAR-Signalweg beeinflusste (Dunlop et al., 2005). Durch den Einfluss auf die Regulation von Genen könnte dieser *cross talk* eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation und somit evtl. auch der Pathogenese und Progression von Malignomen spielen. Ebenso könnte dieser *cross talk* aber auch durch entsprechende Liganden therapeutisch genutzt werden. MeWo-Zellen oder andere Melanomzelllinien wurden bisher noch nicht auf Interaktionen zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der VDR-Ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht nur Einfluss auf die VDR-Expression nahm, sondern führte auch zu einem Expressionsanstieg von PPAR α und PPAR δ in MeWo-Zellen (Kapitel 4.2.). Zudem bewirkten fast alle untersuchten PPAR-Liganden einen signifikanten Anstieg der VDR-Expression nach 120 h Behandlungszeit (Kapitel 4.5.). Diese gleichzeitige Beeinflussung der PPAR- und VDR-Expression nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder den PPAR-Liganden ist ein klarer Hinweis für eine bidirektionelle Interaktion der PPAR- und VDR-Expression in der Melanomzelllinie MeWo.

Fazit:

- Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für einen *cross talk* zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs in der Melanomzelllinie MeWo.

5. Diskussion

In den letzten Jahren hat das Gebiet der *nutrigenomics* (d.h. die Modulation der Genexpression durch Nahrungsbestandteile) für die Onkologie erheblich an Bedeutung gewonnen. Zahlreiche ältere und auch aktuelle Studien belegen den Einfluss der Ernährung auf die Entstehung und den Verlauf diverser Tumore. Dabei rückten ungesättigte Fettsäuren und deren Kernrezeptoren (PPARs) sowie Vitamin D-Metabolite und VDR ins Blickfeld der Forschung. Unbekannt ist bisher, welche Rolle diese Rezeptoren bei der Ätiologie und Progression des malignen Melanoms spielen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern Melanomzellen durch Behandlung mit PPAR- oder VDR-Liganden in ihrem Wachstumsverhalten und ihrer Genexpression beeinflusst werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde zum ersten Mal die basale Expression der PPARs in der Melanomzelllinie MeWo ermittelt und mit anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien verglichen. Die anschließende Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sollte zeigen, inwiefern sich die PPAR- aber auch die VDR-Expression in den verschiedenen Zelllinien durch die Behandlung veränderte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die MeWo-Zellen mit verschiedenen PPAR-Liganden allein oder in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelt und anschließend die Effekte auf die PPAR- und VDR-Expression sowie auf das Wachstumsverhalten der Zellen untersucht.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen 2 neuentwickelter Calcipotriol-Analoga auf die PPAR- und VDR-Expression, sowie das Wachstumsverhalten von MeWo-Zellen untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war einerseits die Analyse der PPAR- und VDR-Expression in der Melanomzelllinie MeWo sowie die Untersuchung der Effekte korrespondierender Liganden auf das Wachstumsverhalten der Zellen und deren PPAR- und VDR-Expression. Andererseits sollten die Versuche zeigen, ob es in MeWo, ähnlich wie in Prostata- und Brustkrebszellen (Dunlop et al., 2005), Hinweise auf eine Interaktion zwischen den PPAR- und VDR-Signalwegen gibt. Der Nachweis eines funktionellen *cross talks* in MeWo könnte Grundlage für weitergehende funktionelle molekularbiologische Untersuchungen sein. Diese müssen zeigen, ob und in welcher Form Liganden der PPARs und des VDRs in der Prävention oder Therapie des malignen Melanoms eine Rolle spielen können.

5.1. Basale PPAR- und VDR-Expression in MeWo-Zellen im Vergleich zu anderen Melanomzelllinien, NHM und nicht-melanozytären Zelllinien

Sowohl der VDR als auch die PPARs sind Kernrezeptoren, die nahezu von jeder Zellart exprimiert werden, wenn auch die Stärke der Expression von Gewebe zu Gewebe sehr variieren kann (Bookout et al., 2006). Auch in den humanen Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A375 konnten alle 3 PPARs (PPAR α , PPAR δ , PPAR γ) nachgewiesen werden (Eastham et al., 2008). Da bisher noch nicht untersucht wurde, ob und wie stark die PPARs in der humanen Melanomzelllinie MeWo exprimiert werden, war es wichtig die basale Expression der PPARs zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MeWo-Zellen sowohl den VDR als auch alle 3 PPARs exprimieren. Es zeigte sich, dass die PPAR- und VDR-Expression keiner starken Korrelation mit der Kulturdauer unterlagen. Nach dem Mediumwechsel kam es allerdings zu einem reproduzierbaren, stärkeren Anstieg der Proliferation, mit einhergehendem leichten Expressionsanstieg von PPAR α sowie PPAR δ . Diese Beobachtung beruht möglicherweise auf dem verbesserten Nährstoffangebot nach dem Mediumwechsel.

Mit zunehmender Kulturdauer und folglich mit zunehmender Zelldichte veränderte sich die PPAR- und VDR-Expression nur leicht. Auffällig war, dass die Expression der jeweiligen Kernrezeptoren in den verschiedenen Zellkulturschalen eines Zeitwertes stark variierte, trotz ähnlicher Zelldichte und gleicher Kulturbedingungen. Erklärungen hierfür konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Um diese Schwankungen so gering wie möglich zu halten, wurde bei den folgenden Versuchen die mRNA mehrerer Kulturschalen gepoolt und erst danach die PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression gemessen.

In der vorliegenden Arbeit fiel beim Vergleich der quantitativen Expression der verschiedenen Kernrezeptoren untereinander auf, dass die Expression von VDR in MeWo weit aus stärker war als die von PPAR α oder PPAR δ . Zudem konnte gezeigt werden, dass insgesamt das Expressionsmuster der Melanomzelllinie SK-Mel-28 dem von MeWo am ähnlichsten war. Dagegen war die VDR-Expression, als auch die Expression der PPARs in SK-Mel-5 im Vergleich zu den anderen untersuchten Melanomzelllinien am niedrigsten. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit einer publizierten Studie (Evans et al., 1996), in der die VDR-Expression ebenfalls in SK-Mel-5 im Vergleich zu einer ganzen Reihe anderer Melanomzelllinien am niedrigsten war. Die VDR-Expression steht in einem engen Zusammenhang mit der Sensitivität für 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Hansen et al., 2001). In der Literatur wird zwischen 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -resistenten (SK-Mel-5 und

SK-Mel-25) und 1,25(OH)₂D₃-sensitiven Melanomzelllinien (MeWo und SK-Mel-28) unterschieden (Reichrath et al., 2007). Die stärkste Proliferationshemmung nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ findet man dementsprechend in Zelllinien mit hoher VDR-Expression (Evans et al., 1996). Dementsprechend gibt es abhängig von der basalen VDR-Expression, Melanomzelllinien wie z.B. MeWo und SK-Mel-28, welche durch 1,25(OH)₂D₃-Behandlung stärker in ihrer Proliferation gehemmt werden als andere Zelllinien (SK-Mel-5 und SK-Mel-25).

Neben dem VDR wurde auch PPAR α im Vergleich zu NHM in den 1,25(OH)₂D₃-sensitiven Melanomzelllinien (MeWo und SK-Mel-28) stark exprimiert. Dieses Ergebnis entsprach einer kürzlich veröffentlichten Studie von Eastham et al. (2008), in der die mRNA- und die Proteinexpression von PPAR α in humanen Melanomzelllinien im Vergleich zu NHM verstärkt exprimiert wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die Zellen melanozytären Ursprungs viel geringere Mengen an PPAR γ als Zellen anderer Gewebe exprimieren. Dies unterstützt die Hypothese von Bookout et al. (2006), dass die Expression der PPARs je nach Gewebe sehr stark variieren kann. Wieso Zellen melanozytären Ursprungs PPAR γ in geringeren Mengen exprimieren, ist bisher noch nicht gewusst. Trotz der geringen PPAR γ -Expression konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass PPAR γ -Agonisten die Differenzierung von Melanomzellen fördert und die Zellproliferation hemmt (Mössner et al., 2002; Placha et al., 2003; Freudlsperger et al., 2006; Liu et al., 2006). Auch PPAR α -Agonisten fördern die Differenzierung der Melanomzellen und hemmen deren Migration (Grabacka et al., 2006). Da in anderen Zelllinien bereits ein *cross talk* zwischen PPAR δ und dem VDR beschrieben wurde (Dunlop et al., 2005) und sich in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass eine erhöhte VDR-Expression in den 1,25(OH)₂D₃-sensitiven Melanomzelllinien mit einer erhöhten PPAR α -Expression einherging, wurde in den nachfolgenden Versuchen Liganden ausgesucht, die bevorzugt PPAR α und/oder PPAR δ binden.

5.2. 1,25(OH)₂D₃-Behandlung führte neben der VDR-vermittelten Proliferationshemmung auch zu Anstiegen der PPAR α - und PPAR δ -Expression in MeWo-Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass 1,25(OH)₂D₃ neben seiner Wirkung im Kalziumstoffwechsel auch einen Einfluss auf Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose hat (Carlberg und Polly, 1998). In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung von MeWo mit 1,25(OH)₂D₃ zu einer hochsignifikanten Hemmung der Proliferation und betrug nach 120 h Behandlung nur noch 59,08 % der EtOH-Kontrolle. Gleichzeitig kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg der VDR-Expression (etwa 4,5-fach nach 120 h).

Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit bereits publizierten Daten (Seifert et al., 2004; Reichrath et al., 2007). Obwohl in einer Vielzahl anderer Zelllinien 1,25(OH)₂D₃-Behandlung zu einem Anstieg der VDR-Expression führte, war die Suche nach einem typischen VDRE im VDR-Promotor lange Zeit erfolglos (Mangelsdorf et al., 1987; Favus et al., 1988; Arbour et al., 1993). Erst 2006 gelang es zwischen 2 Introns des VDR-Gens 3 VDREs zu identifizieren, welche sich relativ weit (in kodierender Richtung) vom Transkriptionsstart entfernt befanden. Eines der VDREs war funktionell und zeigte eine hohe transkriptionelle Aktivität. Man weiß, dass die antiproliferative Wirkung von Vitamin D-Metaboliten im Wesentlichen über den VDR und diverse Kofaktoren vermittelt wird (Hansen et al., 2001). Der genaue Funktionsmechanismus konnte allerdings aufgrund des komplexen Zusammenspiels diverser Transkriptionsfaktoren bislang noch nicht vollständig geklärt werden (Zella et al., 2006).

Nach der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ kam es in der vorliegenden Arbeit neben dem VDR-Expressionsanstieg auch zu einem Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression. In der Literatur wurde nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung in Prostata- und Brustkrebszellen ein ähnlicher PPAR δ -Expressionsanstieg beobachtet (Dunlop et al., 2005). Daraufhin wurde von der gleichen Arbeitsgruppe in der Promotorregion des humanen PPAR δ -Gens ein potentes DR3-Typ VDRE (350 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart) identifiziert, welches nach Aktivierung eine Transkriptionssteigerung des PPAR δ -Gens bewirkte.

In der vorliegenden Arbeit war der Expressionsanstieg von PPAR α nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung von MeWo-Zellen mit dem von PPAR δ vergleichbar, jedoch wesentlich schwächer als der VDR-Expressionsanstieg. Da ähnliche PPAR α -Expressionsanstiege nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung in anderen Zelllinien bisher noch nicht beschrieben worden sind, ist nicht geklärt, ob der Expressionsanstieg auf einer direkten Beeinflussung der Transkriptionsrate beruht, andere Signalwege eine Rolle spielen oder sogar die VDR-vermittelte Proliferationshemmung eine Auswirkung auf die PPAR α -Expression hat. Bisher haben alle bekannten primären Zielgene von 1,25(OH)₂D₃ zumindest ein funktionelles VDRE (Carlberg, 2003). In der Promotorregion von PPAR α konnte bisher kein VDRE gefunden werden. Möglicherweise wird die Expression von PPAR α ohne Bindung an klassische *response elements* induziert. Aktivierte Heterodimere können nämlich auch ohne *response elements* einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren bilden und die Expression von Zielgenen induzieren (Alroy et al., 1995; Väisänen et al., 2005).

Die Expressionsanstiege von PPAR α und PPAR δ nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ waren in der vorliegenden Arbeit erste Hinweise auf eine Interaktion der PPAR- und VDR-Signalwege in MeWo.

5.3. 1,25(OH)₂D₃-Behandlung bewirkte in der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien einen Expressionsanstieg von PPAR α , aber nicht von PPAR δ oder des VDRs

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass es in MeWo nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃, neben einem Anstieg der VDR-Expression, auch zu einem Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression kam, ist nachfolgend untersucht worden, ob dies auch in nicht-melanozytären Zelllinien beobachtet werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die PPAR α -Expression in allen untersuchten Melanomzelllinien und auch in der Mehrzahl der übrigen untersuchten Zelllinien nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung anstieg. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben aufgrund der benutzten Methoden aber keine Rückschlüsse auf die Funktion der Rezeptoren und deren Signalwege zu ziehen. Da zudem in der Literatur ähnliche PPAR α -Expressionsanstiege nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung bisher unbekannt sind, müssen weitere Versuche zeigen, ob es ein oder mehrere funktionelle VDREs in der Promotorregion von PPAR α gibt oder ob andere direkte oder indirekte Mechanismen diesen Anstieg der PPAR α -Expression bewirken.

Im Gegensatz zu PPAR α stieg die Expression von PPAR δ in der vorliegenden Arbeit nach 120 h 1,25(OH)₂D₃-Behandlung lediglich in NHM ähnlich stark wie in MeWo an. In der Zelllinie MCF-7 wurden von Dunlop et al. (2005) Anstiege der PPAR δ -Expression nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit kam es allerdings zu einem signifikanten Abfall der PPAR δ -Expression nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte zum einen, die in der vorliegenden Arbeit viel längere Kulturdauer (120 h vs. 3 h) oder zum anderen die geringere 1,25(OH)₂D₃-Konzentration (10⁻⁸ M vs. 10⁻⁷ M) sein. Die bevorzugte Wahl einer niedrigen und dafür längeren Liganden-Behandlung in der vorliegenden Arbeit, wurde getroffen, da dies eher den Bedingungen im menschlichen Körper bei längerfristiger therapeutischer Anwendung entspricht. Es kommt dementsprechend trotz nachgewiesenem VDRE im PPAR δ -Gen nicht in allen Zelllinien zu einem Anstieg der PPAR δ -Expression, unabhängig von der 1,25(OH)₂D₃-Konzentration und Behandlungsdauer.

Aus den Ergebnissen der Bestimmung der VDR-Expression nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung ließ sich schlussfolgern, dass die VDR-Expression in NHM, MeWo und SK-Mel-28 am stärksten anstieg. In den beiden 1,25(OH)₂D₃-resistenten Zelllinien (SK-Mel-5, SK-Mel-25) blieb die VDR-Expression dagegen unverändert. Gleichzeitig kam es in den 1,25(OH)₂D₃-sensitiven Melanomzelllinien (MeWo, SK-Mel-28) zu einer 10000-fachen Expressionssteigerung des

CYP24A1-Gens, während der Anstieg in den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -resistenten Melanomzelllinien (SK-Mel-5, SK-Mel-25) nur das 1000-fache betrug. Aus der Literatur weiß man, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zur Bildung und Aktivierung von VDR/RXR-Heterodimeren führt. Die aktivierten VDR/RXR-Heterodimere binden dann an VDREs mit einer hohen transkriptionellen Aktivität im Promotorbereich des CYP24A1-Gens (Carlberg und Polly, 1998, Väisänen et al., 2005; Zella et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Hypothese von Reichrath et al (2007), dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -resistente Zelllinien einen Defekt in der VDR-vermittelten Transkription und somit im VDR-Signalweg aufweisen. Ob diese $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Resistenz eine klinische Relevanz für die Pathogenese und Progression des malignen Melanoms hat, konnte bislang nicht bewiesen werden.

Obwohl die CYP24A1-Expression in allen hier untersuchten Zelllinien anstieg und somit die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung erfolgreich war, blieb die VDR-Expression in den nicht-melanozytären Zelllinien nach 120 h $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung unbeeinflusst oder veränderte sich nur geringfügig. In der Literatur werden ähnliche Anstiege der CYP24A1-Expression ohne Expressionsanstieg des VDRs vor allem in den ersten Stunden nach der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung beschrieben (Dunlop et al., 2005). Obwohl beide Gene, d.h. VDR und CYP24A1, mehrere VDREs besitzen, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beide Gene gleichermaßen verstärkt transkribiert. Dies zeigt, dass es selbst nach Bildung von aktivierten VDR/RXR-Heterodimeren nicht automatisch an allen Genen, welche ein VDRE im Promotorbereich haben, zu einer Steigerung der Transkriptionsrate kommt. Welche Gene zu welchem Zeitpunkt verstärkt exprimiert werden hängt zum einen von den verschiedenen Typen der VDREs ab und zum anderen kann die Transkription der Gene durch eine Vielzahl von Kofaktoren beeinflusst werden (Zella et al., 2006).

5.4.VDR-Expressionsanstieg und Proliferationshemmung von MeWo-Zellen nach Behandlung mit den PPAR-Liganden WY14643 und GW501516

Ähnlich wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnten PPAR-Liganden (wie z.B. DHA, Fibrate oder Glitazone) antiproliferative Effekte in Melanomzellen zugeschrieben werden (Albino et al., 2000; Grabacka et al. 2004; Freudlsperger et al., 2006; Grabacka et al. 2006). Dieser wachstumshemmende Effekt war nicht auf Apoptose, sondern auf Zellzyklusarrest in der G_1 -Phase (Mössner et al., 2002) oder auf eine Re-Differenzierung der Zellen zurückzuführen (Freudlsperger et al., 2006).

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Studien wurden die Melanomzellen in der vorliegenden Arbeit mit PPAR-Liganden in einer viel niedrigeren Konzentration behandelt. Um

die Bedingungen einer therapeutischen Behandlung mit PPAR-Liganden bestmöglich nachzuahmen, wurde eine lange Kulturdauer von 120 h gewählt. Nach 120 h Behandlung mit Bezafibrat und ALA kam es allerdings zu keiner signifikanten Veränderung des Zellwachstums von MeWo-Zellen. Die Behandlung mit DHA führte sogar zu einer geringen Steigerung der Proliferation. Dies stand im Widerspruch zu den Ergebnissen einer bereits publizierten Studie, in der die Behandlung mit DHA in 7 von 12 untersuchten Zelllinien (darunter auch MeWo) die Zellproliferation signifikant hemmte (Albino et al., 2000). Möglicherweise konnte in der vorliegenden Arbeit keine Proliferationshemmung nach DHA-Behandlung beobachtet werden, da vgl. mit den oben zitierten Arbeiten die Konzentration von DHA sehr viel niedriger gewählt worden ist, um toxische Wirkungen der PPAR-Liganden zu vermeiden. Die Wirkung der PPAR-Liganden hängt somit sehr stark von deren Dosierung ab. Dies bedeutet beispielsweise, dass ein PPAR-Ligand in hohen Konzentrationen eine starke Proliferationshemmung bewirken kann, aber gleichzeitig in niedrigeren Konzentrationen das Zellwachstum sogar fördern kann (Freudlsperger et al., 2006).

Im Gegensatz zu den Rezeptor-unspezifischen PPAR-Liganden (Bezafibrat, ALA und DHA) führte die 120 stündige Behandlung mit dem spezifischen PPAR α -Ligand WY14643 und dem spezifischen PPAR δ -Ligand GW501516 zu einer 10 %-igen Hemmung des Zellwachstums in MeWo-Zellen. Im Einklang mit diesen Resultaten ist eine kürzlich veröffentlichte Studie, welche nach GW501516-Behandlung in der Melanomzelllinie UACC903 und in der Brustkrebszelllinie MCF-7 eine signifikante Hemmung der Zellproliferation nachweist (Girroi et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Behandlung mit WY14643 und GW501516 zu einem viel stärkeren Anstieg der VDR-Expression als bei der Behandlung mit den übrigen Liganden (Bezafibrat-, ALA- und DHA-Behandlung) kam. Dies lässt vermuten, dass der antiproliferative Effekt der PPAR-Liganden WY14643 und GW501516 (ähnlich wie der von 1,25(OH) $_2$ D $_3$) über den VDR-Signalweg zustande kommt. In der Literatur konnte zuvor auch in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 nach 24 h Behandlung mit dem synthetischen PPAR δ -Ligand L783483 ein ähnlicher Anstieg der VDR-Expression festgestellt werden (Dunlop et al., 2005). Da bislang kein PPRE im Promotorbereich des VDR-Gens identifiziert werden konnte, geht man von einer indirekten Interaktion zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs aus. Nach dem detaillierten Mechanismus und dem zeitlichen Ablauf dieser Beeinflussung der PPAR- und VDR-Signalwege wird zurzeit noch gesucht (Dunlop et al., 2005).

Diese Arbeit konnte zeigen, dass es nach Behandlung mit einigen PPAR-Liganden in Abhängigkeit des VDR-Expressionsanstieges zu einer gleichzeitigen Proliferationshemmung (zumindest von MeWo-Zellen) kam.

5.5. PPAR α - und PPAR δ -Expressionsanstieg in MeWo-Zellen nach Behandlung mit den PPAR-Liganden

Aus der Literatur ist bekannt, dass alle 3 PPARs im Fettstoffwechsel (vor allem PPAR α) und im Glukosestoffwechsel (vor allem PPAR γ) eine wichtige Rolle spielen (Kliwer et al., 2001). Da alle 3 PPARs einen ähnlichen molekularen Aufbau haben (siehe Einleitung) binden die PPARs zum Teil die gleichen Liganden. In der vorliegenden Arbeit führten fast alle PPAR-Liganden neben dem Anstieg der VDR-Expression auch zu einem Anstieg der PPAR α - und PPAR δ -Expression. Auf die Expression von PPAR γ hatte die Behandlung mit PPAR-Liganden dagegen keinen Einfluss. Im Promotorbereich von PPAR γ wurde zwar ein PPRE beschrieben. Dieses scheint allerdings nicht funktionell zu sein (Saladin et al., 1999; Lemay et al., 2006). Generell ist gewusst, dass PPAR α bei der Wahl des Liganden am anspruchlosten ist, während PPAR γ am selektivsten ist (Kliwer et al., 2001). PPAR γ wird z.B. von einem Teil der ungesättigten Fettsäuren (darunter auch z.B. ALA und DHA) nicht direkt aktiviert (Kliwer et al., 1994; Nagy et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte, in Übereinstimmung mit diesen bereits publizierten Daten, ebenfalls keine nachhaltige Expressionssteigerung von PPAR γ in MeWo-Zellen durch die Behandlung mit PPAR-Liganden nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Anstiege der PPAR α -Expression nach PPAR-Liganden-Behandlung ließ sich durch ein funktionelles PPRE im PPAR α -Promotor erklären (Pineda Torra et al., 2002). Dieses *response element* bindet vor allem den *hepatocyte nuclear factor-4* (HNF4). Da aber auch PPAR α direkt an dieses *hepatocyte nuclear factor-4-response element* (HNF4-RE) im Promotor des PPAR α -Gens bindet und somit die eigene Transkriptionsrate steigert, kann es als funktionelles PPRE bezeichnet werden (Pineda Torra et al., 2002).

Neben dem PPAR α -Expressionsanstieg führte die Behandlung mit den PPAR-Liganden in der vorliegenden Arbeit zu einem Anstieg der PPAR δ -Expression. Auffällig war außerdem, dass die Behandlung mit dem spezifischen PPAR α -Ligand WY14643 zu einem ebenso starken Expressionsanstieg von PPAR α und PPAR δ führte. PPAR-Liganden verlieren in hohen Konzentrationen ihre Rezeptorspezifität (Seimandi et al., 2005). Da in den hier durchgeführten Versuchen sehr niedrige PPAR-Ligandenkonzentrationen (10^{-8} M) eingesetzt wurden, ist ein Verlust der Rezeptorspezifität wenig wahrscheinlich. Der Expressionsanstieg von PPAR δ kann nicht auf eine direkte Liganden-Wirkung zurückgeführt werden, da bisher noch kein funktionelles PPRE im Promotorbereich von PPAR δ gefunden wurde. Es ist allerdings bekannt, dass PPARs auch über indirekte Mechanismen die Expression von Zielgenen modulieren können.

Somit können Gene, auch ohne PPRE, zu den Zielgenen der PPARs gehören (Tan et al., 2005). Eine gegenseitige Beeinflussung der intrazellulären Signalwege der verschiedenen PPARs ist somit sehr wahrscheinlich.

Daneben fiel auf, dass die Behandlung mit den PPAR-Liganden erst nach 120 h den stärksten Anstieg der PPAR-Expression bewirkte. Im Gegensatz dazu, führte die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ schon nach 24 h zu einem starken Anstieg der PPAR α - und VDR-Expression. Seifert et al. (2004) zeigte, dass die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ innerhalb von 24 h zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von Zielgenen (VDR, CYP24A1, CYP27A1) in MeWo führte. Diese erhöhte Expression der Zielgene ließ sich auch durch eine längere Behandlungsdauer nur wenig steigern. Auch in der vorliegenden Arbeit stieg die mRNA-Expression nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nur wenig weiter an, während die Behandlung mit den PPAR-Liganden erst nach 120 h zu den stärksten Anstiegen der PPAR- und VDR-Expression führte. Bei der Behandlung mit PPAR-Liganden führt eine lange Behandlungsdauer zu den deutlichsten Veränderungen der mRNA-Expression.

5.6. Keine synergistischen Effekte in MeWo nach kombinierter Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden

Wie bereits oben erwähnt, führten sowohl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch ein Teil der PPAR-Liganden allein zur Proliferationshemmung von MeWo. Bei der kombinierten Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden kam es zu einer ähnlich starken Proliferationshemmung (etwa 60 % im Vergleich zur Kontrollgruppe/EtOH) wie nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein. Diese Wachstumshemmung der MeWo-Zellen ging mit einem signifikanten Expressionsanstieg von VDR und CYP24A1 einher und war somit VDR-vermittelt. Ein additiver oder synergistischer wachstumshemmender Effekt nach kombinierter Behandlung konnte nicht beobachtet werden.

Auch in Bezug auf die Expression der Kernrezeptoren konnte in der vorliegenden Arbeit gegenüber der Behandlung mit den 2 Einzelsubstanzen kein additiver oder synergistischer Effekt nach der Behandlung von MeWo-Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelierten mit publizierten Untersuchungen in Brustkrebs- und Prostatakrebszellen, wo es ebenfalls nach kombinierter Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden zu keinem synergistischen Anstieg der VDR-Expression kam (Dunlop et al., 2005). Da sowohl die PPARs als auch der VDR an RXR binden, ist es möglich, dass es auf Grund eines relativen 9-cis-RA-Mangels zu keinem Synergismus kommt. Inaktive RXR-Monomere bilden

nämlich Homotetramere ohne transkriptionelle Aktivität. Steht dann der Ligand 9-cis-RA zur Verfügung, werden die Homotetramere aufgelöst und stehen dann für die Regulation der Genexpression als Homo oder Heterodimere zur Verfügung (Yasmin et al., 2005). Im vorliegenden Fall einer gleichzeitigen starken Aktivierung der PPAR- und VDR-Signalwege kann ein relativer Mangel an 9-cis-RA eine weitere Transkriptionssteigerung behindern.

Bei der 120 h Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +Bezafibrat kam es sogar, vgl. mit der alleinigen Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zu einer leichten Abnahme des antiproliferativen Effekts. Da die VDR-vermittelte Proliferationshemmung in engem Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivität des VDRs steht (Reichrath et al., 2007), kann die gleichzeitig beobachtete hochsignifikante Abnahme der VDR-Expression in Zusammenhang mit dieser Abnahme der Wachstumshemmung gebracht werden. Hier muss angemerkt werden, dass auch die Bezafibrat-Behandlung allein (als einzige PPAR-Liganden-Behandlung) zu keinem Anstieg der VDR-Expression führte. Eine mögliche Erklärung könnte die viel höhere Konzentration von Bezafibrat (2×10^{-4} M vs. 10^{-8} M) im Vergleich zu den anderen benutzten PPAR-Liganden sein. Diese höhere Konzentration für Bezafibrat wurde aufgrund von anderen Studienergebnissen (signifikante Effekte ohne Zytotoxizität in Kippenberger et al., 2001) gewählt.

Insgesamt zeigte die kombinierte Behandlung von Melanomzellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +PPAR-Liganden keine Vorteile gegenüber der alleinigen Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder den PPAR-Liganden, welche sich in der Therapie des malignen Melanoms nutzen ließen.

5.7. Behandlung mit synthetischen Calcipotriol-Analoga (an Calcipotriol gekoppelte PPAR-Liganden)

Das Vitamin D-Analog Calcipotriol hat ähnlich wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine dosisabhängige Wachstumshemmung (Gniadecki, 1996; Reichrath et al., 1997). Da Calcipotriol zudem *in vivo* geringere kalzämische Nebenwirkungen hat (Colston et al., 1992), eignet sich Calcipotriol wesentlich besser zur therapeutischen Anwendung. Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Analoga, unterschieden sich nur durch den jeweils an das Calcipotriol angehängten PPAR-Liganden (ALA oder DHA). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit bewirkte Calcipotriol-ALA eine leichte Proliferationshemmung, während Calcipotriol-DHA zu einer ähnlich starken Wachstumshemmung führte wie die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein oder in Kombination mit DHA. Wenn auch die VDR-Expression nach Behandlung mit beiden Calcipotriol-Analoga anstieg, so zeigte die CYP24A1-Expression, dass Calcipotriol-ALA seine Eigenschaften als Vitamin D-Metabolit nicht entfalten konnte.

Vor allem Calcipotriol-ALA führte zu deutlichen PPAR-Expressionsanstiegen und schien ähnlich wie ALA die Signalwege der Kernrezeptoren wirksam zu beeinflussen. Die PPAR-Expression nach Behandlung mit Calcipotriol-DHA ähnelte dagegen der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein oder in Kombination mit DHA. Eine Behandlung mit den Calcipotriol-Analoga über mehr als 24 h führte zu keinem weiteren Anstieg der PPAR-Expression. Möglich ist, dass Calcipotriol-ALA und Calcipotriol-DHA an die PPARs und/oder den VDR gebunden haben und wegen ihrer Größe die Ligandenbindungstasche schlecht oder gar nicht verlassen konnten. Die dadurch blockierte LBD reduziert damit die Funktionstüchtigkeit des Rezeptors. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass beide Calcipotriol-Analoga unterschiedliche Wirkungen auf die PPAR- und VDR-Expression hatten. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ligandenbindungstaschen der PPARs neben den 12 α -Helices eine zusätzliche Helix H2' haben und somit im Vergleich zu den meisten anderen Kernrezeptoren (wie z.B. VDR), vergleichsweise groß sind (Nolte et al., 1998; Xu et al., 1999). Calcipotriol-ALA hat möglicherweise eine ungünstige sterische Konfiguration, die nicht in die Ligandenbindungstasche des VDRs passt und nur eine Bindung an die PPARs erlaubt. Dadurch könnte es nach Behandlung mit Calcipotriol-ALA zu den gleichen Effekten wie bei der Behandlung mit einem PPAR-Liganden allein kommen. Calcipotriol-DHA hat dagegen evtl. eine günstigere molekulare Struktur, welche in die Ligandenbindungstasche beider Kernrezeptoren (PPARs und VDR) passt und deswegen die PPAR- und VDR-Signalwege direkt aktivieren kann.

Beide Calcipotriol-Analoga wurden erst kürzlich synthetisiert und müssen noch näher auf ihre Wirksamkeit, evtl. Nebenwirkungen und ihre Toxizität untersucht werden. Ob sie als zukünftige Therapeutika in Frage kommen, müssen nachfolgende Versuche zeigen.

5.8. *Cross talk* zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass verschiedene nukleäre Hormonrezeptoren miteinander interagieren. Für die vorliegende Arbeit war die Beschreibung einer bidirektionalen Verbindung zwischen den Signalwegen von PPAR δ und dem VDR in Prostata- und Brustkrebszellen von entscheidender Bedeutung (Dunlop et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch in der Melanomzelllinie MeWo einen *cross talk* zwischen Signalwegen von PPAR δ und dem VDR gibt. Daneben wurde auch die Expression von PPAR α ähnlich wie die von PPAR δ durch Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beeinflusst. Der Expressionsanstieg von PPAR α und PPAR δ nach der Behandlung mit spezifischen PPAR α - oder PPAR δ -Liganden zeigte, dass die Signalwege der verschiedenen

PPARs interagieren. Dies zeigt, dass die Signalwege der nukleären Hormonrezeptoren in MeWo sehr eng zusammenhängen und sich gegenseitig beeinflussen. Diese Interaktion findet direkt über die Bindung der aktivierten Hormonrezeptor-Heterodimeren an den entsprechenden *response elements* im Promotorbereich der Zielgene statt. Andererseits kann die Expression von Zielgenen auch ohne klassische *response elements* induziert werden, indem die aktivierten Heterodimere einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren und bisher unbekanntem Proteinen bilden und nicht direkt an die DNA binden (Alroy et al., 1995; Väisänen et al., 2005). Die Beeinflussung der Heterodimerisierung und die indirekte Regulation über Koaktivatoren oder Korepressoren bilden zusätzliche Mechanismen eines möglichen *cross talks* zwischen den Signalwegen der verschiedenen Kernrezeptoren. Da ständig neue Erkenntnisse über die gegenseitige Regulierung der Kernrezeptoren publiziert werden, kann man aktuell nur erahnen, wie weitgreifend diese Interaktionen der Kernrezeptoren die mRNA-Expression in Zellen beeinflussen können.

In der vorliegenden Arbeit konnten klare Hinweise auf einen *cross talk* zwischen den Signalwegen der PPARs und des VDRs gefunden werden. Da die Arbeit aber vor allem deskriptiv die Wirkung von Liganden auf die Expression der PPARs und des VDRs beschreibt und deren Signalwege bisher nur zum Teil bekannt und verstanden sind, ist es unmöglich genaue Rückschlüsse auf den komplexen Mechanismus dieses *cross talks* zu ziehen. Zur Entschlüsselung des genauen Zusammenspiels der Rezeptoren mit den entsprechenden Koaktivatoren und Korepressoren müssen nachfolgend funktionelle molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

5.9. Fazit und Ausblick

Da die Therapie des metastasierten malignen Melanoms bisher palliativen Charakter hat, spielt die Prävention des Melanoms eine wichtige Rolle. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Krebsvorsorgeuntersuchungen (d.h. die sekundäre Prävention) zwar dafür sorgen, dass die Fallzahlen sehr stark zunehmen, die diagnostizierten Melanome aber in früheren Stadien entdeckt wurden und somit eine bessere Prognose haben (Brochez und Naeyaert, 2000; Marks, 2000; Garbe und Blum, 2001; Lens und Dawes, 2004). Andererseits wird versucht, die Bevölkerung vermehrt auf die negativen Konsequenzen der UV-Strahlung aufmerksam zu machen. Insgesamt ist die primäre Prävention (d.h. die Vermeidung der Entstehung) des malignen Melanoms, aber recht schwierig, da bisher noch nicht alle Faktoren der Pathogenese geklärt sind.

Für die primäre Prävention maligner Tumore hat das Gebiet der *nutrigenomics* einen großen Stellenwert. Die WHO hat kürzlich postuliert, dass eine ungesunde Ernährung die zweithäufigste vermeidbare Krebsursache darstellt. Auch das maligne Melanom konnte durch übermäßige

Aufnahme von ungesunden Omega-6-Fettsäuren in Zusammenhang gebracht werden (Wagner et al., 1984; Mackie et al., 1987; Cario-André et al., 2005), während Omega-3-Fettsäuren, welche auch PPAR-Liganden darstellen, protektive Eigenschaften zugeschrieben wurden (Bain et al., 1993; Albino et al., 2000). Dementsprechend kann man nach der aktuellen Studienlage zur Prävention des malignen Melanoms als auch anderer Malignome, eine gesunde Ernährung mit ausreichend Omega-3-Fettsäuren (z.B. ALA, DHA, ...) empfehlen.

Auf Grund der schlechten Prognose des metastasierten Melanoms wird fieberhaft nach neuen Substanzen gesucht, welche die Therapie des malignen Melanoms revolutionieren würden. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte auch bereits in anderen Studien sein antiproliferatives Potential in Melanomzellen unter Beweis stellen (Carlberg und Polly, 1998; Seifert et al., 2004; Reichrath et al., 2007). Da aber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei systemischer Gabe in der angewendeten Dosis (10^{-8} M) zu starken hyperkalzämischen Nebenwirkungen führt, scheint die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine sinnvolle Therapieoption darzustellen. Nachfolgend muss man also nach Vitamin D-Liganden suchen, die ähnliche antiproliferative Wirkungen, aber ein geringeres Nebenwirkungspotential aufweisen.

Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit 2 neue, synthetisierte Calcipotriol-Analoga untersucht. Es zeigte sich, dass vor allem Calcipotriol-DHA durch seine Wirkung auch als Vitamin D-Metabolit gegenüber der Behandlung mit PPAR-Liganden allein einen stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum hat. Anschließende Untersuchungen müssen zeigen, ob die Calcipotriol-Analoga therapeutisch benutzt werden können und welche Nebenwirkungen sie haben (z.B. Hyperkalzämie (wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) oder Nebenwirkungen im Glukose- und Fettstoffwechsel (wie die PPAR-Liganden)).

Die Behandlung mit PPAR-Liganden allein konnte in Melanozyten und Melanomzellen in der Vergangenheit schon mehrfach ihren wachstumshemmenden Effekt unter Beweis stellen (Albino et al., 2000; Mössner et al., 2002; Kang et al., 2004). In zahlreichen Studien wurden die antiproliferativen Effekte erst nach Behandlung mit PPAR-Liganden in sehr hohen Konzentrationen beobachtet (Placha et al., 2003; Freudlsperger et al., 2006; Lee et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden die PPAR-Liganden in viel niedrigeren Konzentrationen eingesetzt. Möglicherweise konnten deswegen auch nur bei einem Teil der Behandlungen signifikante Proliferationshemmungen beobachtet werden. Im Tiermodell hatte der PPAR α -Agonist Fenofibrat zudem keinen Einfluss auf das induzierte Primärmelanom (Grabacka et al., 2004; Grabacka et al., 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit hatte Bezafibrat (als Vertreter der

Fibrat-Gruppe) ebenfalls im Gegensatz zu anderen PPAR-Liganden keinen Einfluss auf das Wachstum der MeWo-Zellen. Allerdings konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass sich durch die Behandlung mit Fibraten das Metastasierungspotential von Melanomzellen verringert (Grabacka et al., 2004; Grabacka et al., 2006). Auch die Behandlung mit Omega-3-Fettsäuren (wie z.B. ALA oder DHA) senkte im Vergleich zu Omega-6-Fettsäuren die Melanommetastasierungsrate um > 50 % (Abbott et al., 1994).

Interessanterweise haben klinische Studien mit Lipidsenkern, wie dem PPAR α -Agonisten Gemfibrozil, gezeigt, dass bei Patienten der behandelten Gruppe signifikant weniger Melanome diagnostiziert wurden als in der Kontrollgruppe (Rubins et al., 1999). In einer kürzlich publizierten Metaanalyse korrelierte aber eine langzeitige Fibrat-Behandlung im Rahmen einer Hyperlipidämie-Therapie nicht mit einer signifikanten Erniedrigung der Melanominzidenz (Freeman et al., 2006). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Behandlung mit PPAR α -Agonisten mit einer verringerten COX-2-Expression einherging. Die kombinierte Behandlung mit PPAR α -Agonisten und COX-2 Inhibitoren könnten einen synergistischen Effekt haben, indem proapoptotische Mechanismen aktiviert werden und so die Empfänglichkeit von Melanomzellen für die pulsatile Chemotherapie erhöht wird (Reichle et al, 2004; Badawi et al, 2004).

Dementsprechend wurde 2007 eine randomisierte Phase-II-Studie veröffentlicht, welche eine Verlängerung der progressfreien Zeit bei einer kombinierten Behandlung mit dem PPAR-Liganden Pioglitazon, Rofecoxib (COX-2-Inhibitor) und Trofosamid gegenüber der alleinigen Gabe von Trofosamid bei Chemotherapie-refraktären Melanompatienten zeigte (Reichle et al., 2007). Pioglitazon (als PPAR α -und PPAR γ -Agonist) fördert einerseits wie auch andere PPAR-Liganden die Differenzierung und Apoptose von Tumorzellen (Mueller et al., 1998; Sarraf et al., 1998). Andererseits hemmt es unabhängig von seiner PPAR-Wirkung die Initiierung der Translation und Angiogenese (Palakurthi et al., 2001; Panigrahy et al., 2002). Die Toxizität dieser Chemotherapie-Gabe war zudem relativ gering und wurde von den Melanompatienten auch über einen längeren Zeitraum sehr gut vertragen (Reichle et al., 2007).

Eine andere Strategie ist die Bindung von PPAR-Liganden (z.B. DHA) an bereits benutzte Chemotherapeutika wie Paclitaxel oder Doxorubicin (Bradley et al., 2001; Wang et al., 2006; Fracasso et al., 2009). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass DHA-Doxorubicin nicht nur wirksamer war als die Behandlung mit Doxorubicin allein, sondern auch eine geringere Toxizität besitzt (Wang et al., 2006). In einer kürzlich publizierten Phase-I-Studie wurde die wöchentliche intravenöse Gabe von DHA-Paclitaxel in einer Maximaldosis bis zu 600 mg/m² gut toleriert. Bei

einem behandelten Melanompatienten kam es so über 16 Wochen zu keinem Progress des Melanoms (Fracasso et al., 2009). Somit könnte die Kombination von PPAR-Liganden mit bisher eingesetzten Chemotherapeutika zum einen das Metastasierungsrisiko reduzieren und gleichzeitig die Effizienz der Chemotherapie verbessern.

Die vorliegende Arbeit konnte zum ersten Mal zeigen, dass zum einen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Melanomzelllinie die Signalwege der PPARs signifikant beeinflusst und gleichzeitig PPAR-Liganden mit dem VDR-Signalweg interagieren. Da sowohl die PPARs als auch der VDR eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung spielen, könnte diese bidirektionale Interaktion der PPAR- und VDR-Signalwege in der Pathogenese und Therapie des malignen Melanoms von Bedeutung sein.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott WGH, Tezabwala B, Bennett M, Grundy SM. (1994). Melanoma lung metastases and cytolytic effector cells in mice fed antioxidant-balanced corn oil or fish oil diets. *Nat Immun* 13: 15-28
- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615-616
- Afaq F, Mukhtar H. (2002) Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 297-306
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). In: Molecular biology of the cell. 4th ed. *New York, Garland Publishing*
- Albino AP, Juan G, Traganos F, Reinhart L, Connolly J, Rose DP, Darzynkiewicz Z. (2000). Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenic acid: association with decreased pRb phosphorylation. *Cancer Res* 60: 4139-4145
- Alroy I, Towers TL, Freedman LP. (1995). Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 15: 5789-5799
- Apperly FL. (1941). The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Res* 1: 191-195
- Aranda A, Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-1304
- Armstrong BK, Kricger A. (1995). Skin cancer. *Dermatol Clin* 13: 583-594
- Arbour NC, Prah J, and DeLuca HF. (1993). Stabilization of the vitamin D receptor in rat osteosarcoma cells through the action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol* 7: 1307-1312
- Astorg P. (2004). Dietary N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Causes Control* 15: 367-386
- Badawi AF, Eldeen MB, Liu Y, Ross EA, Badr MZ. (2004). Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res* 64: 1181-1189
- Bain C, Green A, Siskind V, Alexander J, Harvey P. (1993). Diet and melanoma: an exploratory case-control study. *Ann Epidemiol* 3: 235-238
- Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. (1988). Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3294-3298
- Bard JM, Parra HJ, Camare R, Luc G, Ziegler O, Dachet C, Bruckert E, Douste-Blazy P, Drouin P, Jacotot B, DeGennes JL, Keller U, Fruchart JC. (1992). A multicenter comparison of the effects of simvastatin and fenofibrate therapy in severe primary hypercholesterolemia, with particular emphasis on lipoproteins defined by their apolipoprotein composition. *Metabolism* 41: 498-503
- Berger J, Moller DE. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53: 409-435
- Bikle DD, Nemanic MK, Gee E, Elias P. (1986). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 production by human keratinocytes. Kinetics and regulation. *J Clin Invest* 78: 557-566
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126: 789-799
- Boukamp P, Tilgen W, Dzarlieva RT, Breitkreutz D, Haag D, Riehl RK, Bohnert A, Fusenig NE. (1982). Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J Natl Cancer Inst* 68: 415-427
- Bradley MO, Webb NL, Anthony FH, Devanesan P, Witman PA, Hemamalini S, Chander MC, Baker SD, He L, Horwitz SB, Swindell CS. (2001). Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. *Clin Cancer Res* 7: 3229-3238
- Braissant O, Wahli W. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139: 2748-2754
- Brochez L, Naeyaert JM. (2000). Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? *Eur J Dermatol* 10: 71-75
- Burmester JK, Wiese RJ, Maeda N, DeLuca HF. (1988). Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9499-9502

- Carlberg C. (1996). The vitamin D3 receptor in the context of the nuclear receptor superfamily: the central role of retinoid X receptor. *Endocrine* 4: 91-105
- Carlberg C, Polly P. (1998). Gene regulation by vitamin D3. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8: 19-42
- Carlberg C. (2003). Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands. *Recent Results Cancer Res* 164: 29-42
- Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma; mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3278-3282
- Cario-André M, Briganti S, Picardo M, Nikaido O, de Verneuil H, Taieb A. (2005). Polyunsaturated fatty acids partially reproduce the role of melanocytes in the epidermal melanin unit. *Exp Dermatol* 14: 194-201
- Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. (1999). Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 17: 2745 - 2751
- Chen KS, DeLuca HF. (1995). Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1263: 1-9
- Chiarion Sileni V, Nortilli R, Aversa SM, Paccagnella A, Medici M, Corti L, Favaretto AG, Cetto GL, Monfardini S. (2001). Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res* 11: 189-196
- Colston KW, Chander SK, Mackay AG, Coombes RC. (1992). Effects of synthetic vitamin D analogues on breast cancer cell proliferation in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 44: 693-702
- Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M. (2001). 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66: 287-292
- Cutler NS, Graves-Deal R, LaFleur BJ, Gao Z, Boman BM, Whitehead RH, Terry E, Morrow JD, Coffey RJ. (2003). Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Res* 63: 1748-1751
- Davignon J. (2001). Advances in lipid-lowering therapy in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 498: 49-58
- Debril MB, Renaud JP, Fajas L, Auwerx J. (2001). The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Med* 79: 30-47
- Desvergne B, Wahli W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688
- Dhar AK, Roux MM, Klimpel KR (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *J Clin Microbiol* 39: 2835-2845
- Di Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. (2002). Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell* 10: 721-733
- Di-Poi N, Michalik L, Tan NS, Desvergne B, Wahli W. (2003). The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 257-265
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. 1992. Control of the peroxisome beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887
- Duque G, Macoritto M, Kremer R. (2004). 1,25(OH)2D3 inhibits bone marrow adipogenesis in senescence accelerated mice (SAM-P/6) by decreasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARGamma2). *Exp Gerontol* 39: 333-338
- Dunlop TW, Väisänen S, Frank C, Molnár F, Sinkkonen L, Carlberg C. (2005). The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J Mol Biol* 349: 248-260
- Eastham LL, Mills CN, Niles RM. (2008). PPARalpha/gamma expression and activity in mouse and human melanocytes and melanoma cells. *Pharma Res* 25: 1327-1333
- Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. (2003). Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 4: 748-759
- Elstner E, Williamson EA, Zang C, Fritz J, Heber D, Fenner M, Possinger K, Koeffler HP. (2002). Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 74: 155-165

- Evans SR, Houghton AM, Schumaker L, Brenner RV, Buras RR, Davoodi F, Nauta RJ, Shabahang M. (1996). Vitamin D receptor and growth inhibition by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human malignant melanoma cell lines. *J Surg Res* 61: 127-133
- Favus MJ, Mangelsdorf DJ, Tembe V, Coe BJ, Haussler MR. (1988). Evidence for in vivo upregulation of the intestinal vitamin D receptor during dietary calcium restriction in the rat. *J Clin Invest* 82: 218-224
- Floyd ZE, Zvonic S, E Nuttall M, M Gimble J. (2006). Fine-Tuning Reception in the Bone: PPARgamma and Company. *PPAR Res* 52950
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-812
- Forman BM, Chen J, Evans RM. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4312-4317
- Fracasso PM, Picus J, Wildi JD, Goodner SA, Creekmore AN, Gao F, Govindan R, Ellis MJ, Tan BR, Linette GP, Fu CJ, Pentikis HS, Zumbun SC, Egorin MJ, Bellet RE. (2009). Phase 1 and pharmacokinetic study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel, Taxoprexin, in resistant solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 63: 451-458
- Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334: 543-546
- Freedman LP. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13: 129-145
- Freeman SR, Drake AL, Heilig LF, Graber M, McNealy K, Schilling LM, Dellavalle RP. (2006). Statins, fibrates and melanoma risk: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 98: 1538-1546
- Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U, Thies A. (2006). Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs* 17: 325-332
- Garbe C, Blum A. (2001). Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 280-290
- Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. (1989). Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 2: 1176-1178
- Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. (1990). Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 19: 614-622
- Girroir EE, Hollingshead HE, Billin AN, Willson TM, Robertson GP, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF7 human cancer cell lines. *Toxicology* 243: 236-243
- Gniadecki R. (1996). Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃: dependence on cell culture conditions. *J Invest Dermatol* 106: 510-516
- Grabacka M, Placha W, Plonka PM, Pajak S, Urbanska K, Laidler P, Slominski A. (2004). Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate. *Arch Dermatol Res* 296: 54-58
- Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. *Clin Cancer Res* 12: 3028-3036
- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. (1995). Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 4: 281-299
- Gronemeyer H, Moras D. (1995). Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature* 375: 377-382
- Hanchette CL, Schwartz GG. (1992). Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* 70: 2861-2869
- Hansen CM, Binderup L, Hamberg KJ, Carlberg C. (2001). Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front Biosci* 6: 820-848
- Harmon MA, Boehm MF, Heymann RA, Mangelsdorf DJ. (1995). Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6157-6160
- Hauschild A, Weichenthal M, Balda BR, Becker JC, Wolff HH, Tilgen W, Schulte KW, Ring J, Schadendorf D, Lischner S, Burg G, Dummer R. (2003). Prospective randomized trial of interferon alfa-2b and interleukin-2 as adjuvant treatment for resected intermediate- and high-risk primary melanoma without clinically detectable node metastasis. *J Clin Oncol* 21: 2883-2888

- Hauschild A. (2005). Hautkrebs, Infobroschüre der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- Henderson MM. (1995). Nutritional aspects of breast cancer. *Cancer* 76: 2053-2058
- Herz E. (2005). Maligne Tumoren und Neoplasien. In: Moll I (ed.) Dermatologie (Duale Reihe) *Thieme, Stuttgart* 306-349
- Holick MF. (1994). McCollum Award Lecture , 1994: vitamin D - new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 60: 619-630
- Holick MF. (2002). Sunlight and vitamin D: both good for cardiovascular health. *J Gen Intern Med* 17: 733-735
- Holick MF. (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79: 362-371
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43: 1809-1818
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. (2003). UV-induced skin cancer. *Toxicology* 189: 21-39
- Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 272: 20108-20117
- Indra AK, Castaneda E, Antal MC, Jiang M, Messaddeq N, Meng X, Loehr CV, Gariglio P, Kato S, Wahli W, Desvergne B, Metzger D, Chambon P. (2007). Malignant transformation of DMBA/TPA-induced papillomas and nevi in the skin of mice selectively lacking retinoid-X-receptor α in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127: 1250-1260
- Issemann I, Green S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650
- Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, Chen TC, Holm IA, Kolodny JM, Fuleihan GE, Seely EW. (1992). Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N Engl J Med* 326: 1173-1177
- Jaeckel EC, Raja S, Tan J, Das SK, Dey SK, Girod DA, Tsue TT, Sanford TR. (2001). Correlation of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and peroxisome proliferator-activated receptor δ with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 1253-1259
- Junqueira LC, Carneiro J. (2005). In: Gratzl M (ed) Histologie *Springer Verlag, Berlin*
- Kang HY, Chung E, Lee M, Cho Y, Kang WH. (2004). Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes. *Br J Dermatol* 150: 462-468
- Kippenberger S, Loitsch SM, Grundmann-Kollmann M, Simon S, Dang TA, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R, Bernd A. (2001). Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 117: 1430-1436
- Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7355-7359
- Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 56: 239-263
- Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. (1998). Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58: 3344-3352
- Ledwith BJ, Johnson TE, Wagner LK, Pauley CJ, Manam S, Galloway SM, Nichols WW. (1996). Growth regulation by peroxisome proliferators: opposing activities in early and late G1. *Cancer Res* 56: 3257-3264
- Lee JS, Choi YM, Kang HY. (2007). PPAR- γ agonist, ciglitazone, increases pigmentation and migration of human melanocytes. *Exp Dermatol* 16: 118-123
- Lehmann B. (1997). HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J Invest Dermatol* 108: 78-82
- Lehmann B, Pietzsch J, Kämpf A, Meurer M. (1998). Human keratinocyte line HaCaT metabolizes 1 α -hydroxyvitamin D3 and vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Dermatol Sci* 18: 118-127
- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliwer SA. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406-3410

- Lemay J, Demers C, Hendy GN, Delvin EE, Gascon-Barré M (1995). Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D₃ and calcitriol administration in vivo. *J Bone Miner Res* 10: 1148-1157
- Lemay DG, Hwang DH. (2006). Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *J Lipid Res* 47: 1583-1587
- Lemon BD, Freedman LP. (1996). Selective effects of ligands on vitamin D₃ receptor- and retinoid X receptor-mediated gene activation in vivo. *Mol Cell Biol* 16: 1006-1016
- Lens MB, Dawes M. (2004). Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 150: 179-185
- Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N. (1999). Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry* 38: 185-190
- Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. (1999). Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr* 19: 545-586
- Liu Y, Meng Y, Liu H, Li J., Fu J., Liu Y., Chen K. (2006). Growth inhibition and differentiation induced by peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand rosiglitazone in human melanoma cell line a375. *Med Oncol* 23: 393-402
- Lock EA, Mitchell AM, Elcombe CR. (1989). Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 145-163
- Mackie BS, Mackie LE, Curtin LD, Bourne DJ. (1987). Melanoma and dietary lipids. *Nutr Cancer* 9: 219-226
- Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR. (1987). Avian and mammalian receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: in vitro translation to characterize size and hormone-dependent regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 354-358
- Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. (2003). Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis* 6: 165-169
- Marks R. (2000). Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 25: 459-463
- Merke J, Milde P, Lewicka S, Hügel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. (1989). Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest* 83: 1903-1915
- Moon JH, Gailani S, Cooper MR, Hayes DM, Rege VB, Blom J, Falkson G, Maurice P, Brunner K, Glidewell O, Holland JF. (1975). Comparison of the combination of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) and vincristine with two dose schedules of 5-(3,3-dimethyl-1-triazino) imidazole 4-carboxamide (DTIC) in the treatment of disseminated malignant melanoma. *Cancer* 1975 35: 368-371.
- Moras D, Gronemeyer H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10: 384-391
- Mössner R, Schulz U, Krüger U, Middel P, Schinner S, Füzesi L, Neumann C, Reich K. (2002). Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit cell growth in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 119: 576-582
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1:465-470
- Müller M, Kersten S. (2003). Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet* 4, 315-322
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93: 229-240
- Nijsten T, Geluyckens E, Colpaert C, Lambert J. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptors in squamous cell carcinoma and its precursors. *J Cutan Pathol* 32: 340-347
- Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfield MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395: 137-143
- Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. (2002). Update on biological actions of 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Moll Cell Endocrinol* 197:1-13
- Olefsky JM. (2000). Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* 106: 467-472

- Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA. (2001). Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 61: 6213–6218
- Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Johnson EF. (1995). Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem* 270: 16114–16121
- Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher JA, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Kaipainen A. (2002). PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 110:923–932
- Peller S. (1936). Carcinogenesis as a means of reducing cancer mortality. *Lancet* 2: 552-556
- Pike JW, McDonnell DP, Scott RA, Kerner SA, Kesterson RA, O'Malley B. (1989). The vitamin D3 receptor and its chromosomal gene. In: Gustafson JA (ed) *The steroid/thyroid hormone receptor family and gene regulation* Birkhäuser Verlag, Basel 147-159
- Pillai S, Bikle DD, Elias PM. (1988). 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J Biol Chem* 263: 5390-5395
- Pineda Torra I, Jamshidi Y, Flavell DM, Fruchart JC, Staels B. (2002). Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol* 16: 1013-1028
- Placha W, Gil D, Dembinska-Kiec, Laidler P. (2003). The effect of PPARgamma ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res* 13: 447-456
- Reed KR, Sansom OJ, Hayes AJ, Gescher AJ, Winton DJ, Peters JM, Clarke AR. (2004). PPARdelta status and Apc-mediated tumorigenesis in the mouse intestine. *Oncogene* 23: 8992-8996
- Reichle A, Bross K, Vogt T, Bataille F, Wild P, Berand A, Krause SW, Andreesen R. (2004). Pioglitazone and rofecoxib combined with angiostatically scheduled trofosfamide in the treatment of far-advanced melanoma and soft tissue sarcoma. *Cancer* 101: 2247-2256
- Reichle A, Vogt T, Coras B, Terheyden P, Neuber K, Trefzer U, Schultz E, Berand A, Bröcker EB, Landthaler M, Andreesen R. (2007). Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial. *Melanoma Res* 17: 360-364
- Reichrath J, Müller SM, Kerber A, Baum HP, Bahmer FA (1997). Biologic effects of topical calcipotriol (MC 903) treatment in psoriatic skin. *J Am Acad Dermatol* 36: 19-28
- Reichrath J, Rech M, Moeni M, Meese E, Tilgen W, Seifert M. (2007). In vitro comparison of the vitamin D endocrine system in 1,25(OH)2D3-responsive and -resistant melanoma cells. *Cancer Biol Ther* 6: 48-55
- Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275: 4475-4483
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 341: 410-418
- Saladin R, Fajas L, Dana S, Halvorsen YD, Auwerx J, Briggs M. (1999). Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 mRNA expression in early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ* 10: 43-48
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. (1998). Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 4:1046-1052
- Schneider-Stock R, Boltze C, Jäger V, Epplen J, Landt O, Peters B, Rys J, Roessner A. (2003). Elevated telomerase activity, c-MYC-, and hTERT mRNA expression: association with tumour progression in malignant lipomatous tumours. *J Pathol* 199: 517-525
- Schoonjans K, Staels B, and Auwerx J. (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37: 907-925
- Schräder M, Nayeri S, Kahlen JP, Müller KM, Carlberg C. (1995). Natural vitamin D3 response elements formed by inverted palindromes: polarity-directed ligand sensitivity of vitamin D3 receptor-retinoid X receptor heterodimer-mediated transactivation. *Mol Cell Biol* 15: 1154-1611

- Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. (1998). Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 391-395
- Seifert M, Rech M, Meineke V, Tilgen W, Reichrath J. (2004). Differential biological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on melanoma cell lines in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 375-379
- Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, Perrin A, Carlvani I, Voegel JJ, Vignon F, Nicolas JC, Balaquer P. (2005). Differential responses to PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem* 344: 8-15
- Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2007). Present concepts and future outlook: Function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Cell Physiol* 212: 1-12
- Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin. Importance of PPARs in Skin Physiology and Dermatologic Diseases. *Am J Clin Dermatol* 9: 15-31
- Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferators activated receptor. *Biochemistry* 32: 5598-5604
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-1416
- Spiegelman BM. (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-514
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98: 2088-2093
- Stang K, Stang A, Stegmaier C, Ziegler H, Eisinger B, Stabenow R, Jöckel KH. (2000): Descriptive epidemiology of cutaneous malignant melanoma. Analyses of German Cancer Registry data. *Stud Health Technol Inform* 77: 139-142
- Stein MS, Wark JD. (2003). An update on the therapeutic potential of vitamin D analogues. *Expert Opin Investig Drugs*. 12: 825-840
- Studzinski GP, Moore DC. (1995). Sunlight-can it prevent as well as cause cancer? *Cancer Res* 55: 4014-4022
- Sutton AL, MacDonald PN. (2003). Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 17: 777-791
- Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, Wiese R, DeLuca HF. (1991). The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 11: 168-173
- Takada I, Yu RT, Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Klier SA, Evans RM, Umesono K. (2000). Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol Endocrinol* 14: 733-740
- Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kogho Y. (1999). Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 455: 135-139
- Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93: 99-105
- Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, Tseng CC, Chen TC, Holt PR, Lipkin MS, Holick MF. (2001). 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet* 357: 1673-1674
- Toell A, Polly P, Carlberg C. (2000). All natural DR3-type vitamin D response elements show a similar functionality in vitro. *Biochem J* 352: 301-309
- Tominaga S, Kuroishi T. (1997). An ecological study on diet/nutrition and cancer in Japan. *Int J Cancer* 10: 2-6
- Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. (1997). Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 237-241
- Väisänen S, Dunlop TW, Sinkkonen L, Frank C, Carlberg C. (2005). Spatio-temporal activation of chromatin on the human CYP24 gene promoter in the presence of 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3. *J Mol Biol* 350: 65-77
- Vamecq J, Draye JP. (1989). Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays Biochem* 24: 115-225
- Van Leeuwen JP, Pols HA (1997). Vitamin D: anticancer and differentiation. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW (eds): *Vitamin D*. Academic Press, San Diego 1089-1106
- Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK. (1996). Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisome fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271: 2147-2155
- Wagner RF, DiSorbo DM, Nathanson L. (1984). Nutrition and melanoma. *Int J Dermatol* 23: 453-457

- Wahli W. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 132: 83-91
- Wang Y, Li L, Jiang W, Yang Z, Zhang Z. (2006). Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 2974-2977
- Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. (2001). Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiological studies. *Cancer Causes Control* 12: 69-82-
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22: 176-181
- Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3: 87-94
- Yasmin R, Williams RM, Xu M, Noy N. (2005). Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. *J Biol Chem* 280: 40152-40160
- Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach RJ, Detera-Wadleigh SD. (1996). Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics* 35: 637-638
- Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3: 397-403
- Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW. (2006). Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Endocrinol* 20: 1231-1247
- Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. (1996). Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* 10: 1457-1466
- Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE. (1999). Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 113 : 1011-1020

7. Abkürzungsverzeichnis

[x]	Konzentration des Stoffes x
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Calcitriol
9-cis-RA	<i>9-cis-retinoic acid</i> (9-cis-Retinsäure)
A	Adenosin bzw. Ampère
Abb.	Abbildung
AF	<i>activation function</i> (Transaktivierungsfunktion)
ALA	<i>α-linolenic acid</i> (α -Linolensäure)
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BPE	<i>bovine pituitary extract</i> (Rinder-Hypophysenextrakt)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
COX	Cyclooxygenase
Cp	<i>crossing point</i> (Kreuzungspunkt; Messpunkt in Real-Time PCR)
CREB	cAMP responsive element binding protein
CYP	Cytochrom P 450 Protein
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DHA	<i>docosahexaenic acid</i> (Docosahexaensäure)
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (Nukleotid-Mix)
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> (Doppelstrang-DNA)
DR	<i>direct repeat</i> (direkte Wiederholung); die darauf folgende Zahl gibt den Abstand in Nukleotiden zwischen den Wiederholungen an
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetate</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kalbserum)

g	gramm
G	Guanosin
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HNF4-RE	<i>hepatocyte nuclear factor-4-response element</i>
HRE	Hormon-responsives Element
IP	invertiertes Palindrom; die darauf folgende Zahl gibt den Abstand in Nukleotiden zwischen den Wiederholungen an
k-	kilo- (z.B. kg, kDa oder kb)
kb	Kilobasen
K _d	Bindungsaffinität
l	Liter
LBD	Ligandenbindungsdomäne
μ-	mikro- (10 ⁻⁶) (z.B. μm, μl oder μM)
M	molar
m-	milli-
m	Meter
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> -RNA (Boten-RNA)
MW	Mittelwert
N	Nukleotid oder Anzahl der Moleküle bei einem PCR-Zyklus
n-	nano- (10 ⁻⁹) (z.B. nm, nl oder nM)
NF-κB	Nukleärer faktor-kappaB
NHM	<i>normal human melanocytes</i> (primär kultivierte humane Melanozyten)
NSAIDs	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> (Nicht-steroidale entzündliche Medikamente)
Oligo-dT	Oligodeoxythimin
p	pico-, Signifikanz oder Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms (petite)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PP	<i>peroxisome proliferator</i> (Peroxisomen Proliferator; Liganden der PPARs)
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> (Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor)
PPRE	<i>PPAR response element</i> (PPAR responsives Element)
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms (queue)
r	Korrelationskoeffizient
RAR	<i>retinoic acid receptor</i> (Retinsäure-Rezeptor)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time-PCR
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

s	Sekunden
SA	Standardabweichung
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Dodecylsulfat-Natriumsalz)
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (Einzelstrang-DNA)
ssRNA	<i>single stranded RNA</i> (Einzelstrang-RNA)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> (Transkriptionsfaktor)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
tRNA	transferrn RNA
TZD	Thiazolidindione "Insulin-Sensitizer"
U	<i>units</i> (Einheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	<i>vitamin D-response element</i> (Vitamin D-responsives Element)
vgl.	verglichen
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

Vorversuche:

- Proliferations-Assay mit MeWo (1 Mittelwert = 12 Messungen):

	24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
Platte 1	MW	SA								
Ohne Behandlung	0.017	0.005	0.033	0.002	0.121	0.030	0.206	0.024	0.359	0.052
EtOH	0.013	0.004	0.020	0.004	0.102	0.006	0.172	0.035	0.326	0.037
1.25(OH) ₂ D ₃	0.012	0.002	0.010	0.003	0.076	0.020	0.117	0.013	0.222	0.027
	24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
Platte 2	MW	SA								
Ohne Behandlung	0.016	0.008	0.019	0.001	0.057	0.006	0.064	0.003	0.135	0.008
EtOH	0.002	0.002	0.010	0.002	0.052	0.004	0.054	0.002	0.107	0.009
1.25(OH) ₂ D ₃	0.006	0.002	0.012	0.002	0.034	0.003	0.042	0.002	0.075	0.012
	24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
Platte 3	MW	SA								
Ohne Behandlung	0.014	0.004	0.009	0.003	0.042	0.011	0.023	0.002	0.052	0.010
EtOH	0.008	0.004	0.010	0.003	0.024	0.002	0.027	0.001	0.045	0.002
1.25(OH) ₂ D ₃	0.007	0.012	0.008	0.002	0.018	0.002	0.013	0.002	0.021	0.002

- RT-PCR: PPAR-, VDR- und CYP24A1-Expression in MeWo ohne Behandlung (1 Mittelwert = 4 Messungen):

PPAR α -Expression:

	Kulturschale 1			Kulturschale 2			Kulturschale 3			Kulturschale 4			Alle Kulturschalen		
	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)									
24 h	5,060	0,583	11,52	6,067	0,743	12,25	12,150	1,433	11,79	10,337	0,976	9,45	8,403	3,177	37,81
48 h	6,773	1,025	15,13	14,867	2,230	15,00	15,833	1,227	7,75	13,733	1,198	8,72	12,802	3,930	30,70
72 h	5,787	0,467	8,07	11,713	1,349	11,52	17,947	1,722	9,59	21,380	1,710	8,00	14,207	6,350	44,70
96 h	8,248	1,564	18,96	12,277	1,341	10,92	11,753	1,319	11,23	15,867	2,177	13,72	11,745	3,223	27,44
120 h	12,387	1,808	14,59	14,953	0,390	14,59	15,010	0,788	5,25	19,873	0,333	1,68	15,556	2,959	19,02

PPAR δ -Expression:

	Kulturschale 1			Kulturschale 2			Kulturschale 3			Kulturschale 4			Alle Kulturschalen		
	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)									
24 h	6,260	0,453	7,24	8,577	0,933	10,88	15,060	1,384	9,19	12,360	0,893	7,23	10,233	3,681	35,97
48 h	8,290	0,960	11,58	9,973	0,300	3,01	9,223	0,257	2,79	10,433	0,942	9,03	9,480	1,037	10,94
72 h	6,973	0,611	8,77	9,103	0,474	5,21	14,400	1,802	12,51	14,417	1,999	13,87	11,223	3,621	32,26
96 h	6,718	1,042	15,51	12,823	1,541	12,02	7,773	0,759	9,77	9,563	0,836	8,75	9,027	2,593	28,73
120 h	8,537	0,788	9,23	9,033	1,028	11,37	13,103	1,642	12,53	18,710	2,94	15,73	12,346	4,530	36,69

PPAR γ -Expression:

	Kulturschale 1			Kulturschale 2			Kulturschale 3			Kulturschale 4			Alle Kulturschalen		
	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)
24 h	0	0	/	0	0	/	0	0	/	0,053	0,062	0,054	0,014	0,026	185,71
48 h	0,027	0,016	59,26	0	0	/	0,031	0,018	58,06	0	0	0	0,014	0,018	128,57
72 h	0	0	/	0	0	/	0	0	/	0	0	0	0	0	/
96 h	0	0	/	0	0	/	0	0	/	0	0	0	0	0	/
120 h	0	0	/	0	0	/	0	0	/	0,002	0,003	0,009	0,001	0,003	300,00

VDR-Expression:

	Kulturschale 1			Kulturschale 2			Kulturschale 3			Kulturschale 4			Alle Kulturschalen		
	MW	SA	SA(%)	MW	SA	SA(%)									
24 h	46,690	2,170	4,65	36,323	3,947	10,87	44,527	5,694	12,79	41,890	1,817	4,34	42,358	5,155	12,17
48 h	33,137	1,045	3,15	21,497	3,501	16,29	30,220	3,539	11,71	29,997	6,398	21,33	28,713	5,723	19,93
72 h	21,697	1,830	8,43	15,917	0,951	5,98	37,840	4,130	10,91	29,843	4,005	13,42	26,324	9,040	34,34
96 h	13,887	1,114	8,02	37,333	2,600	6,97	29,243	1,425	4,78	20,937	2,250	10,75	25,350	9,338	36,84
120 h	35,043	2,243	6,40	47,387	4,331	9,14	29,707	5,555	18,70	25,867	2,627	10,16	34,501	9,119	26,43

Versuche:

- Proliferations-Assays mit MeWo (1 Mittelwert = 12 Messungen):

24 h-Werte:

24 h	Platte 1		Platte 2		Platte 3		Platte 4		Platte 5		Platte 6		Platte 7	
	MW	SA												
Ohne Behandlung	0.023	0.005	0.018	0.003	0.031	0.003	0.030	0.002	0.013	0.001	0.018	0.002	0.006	0.003
EtOH	0.025	0.002	0.016	0.004	0.028	0.007	0.026	0.006	0.014	0.002	0.013	0.002	0.007	0.005
1.25(OH) $_2$ D $_3$	0.023	0.003	0.013	0.003	0.028	0.003	0.030	0.005	0.011	0.001	0.011	0.002	0.011	0.009
Bezafibrat	0.026	0.003	0.011	0.005	0.020	0.005	0.024	0.007	0.012	0.003				
ALA	0.023	0.003	0.018	0.007	0.025	0.006	0.031	0.006			0.013	0.002		
DHA	0.023	0.002	0.022	0.004	0.035	0.002	0.036	0.003			0.011	0.005		
WY14643									0.011	0.003	0.009	0.003	0.009	0.001
GW501516									0.011	0.005	0.010	0.002	0.006	0.002
1.25(OH) $_2$ D $_3$ +Bezafibrat	0.020	0.003	0.013	0.004	0.037	0.003	0.021	0.003	0.007	0.003				
1.25(OH) $_2$ D $_3$ +ALA	0.020	0.002	0.015	0.007	0.025	0.003	0.017	0.003					0.017	0.001
1.25(OH) $_2$ D $_3$ +DHA	0.040	0.002	0.022	0.004	0.022	0.004	0.024	0.002					0.012	0.004
1.25(OH) $_2$ D $_3$ +WY14643									0.010	0.001	0.011	0.002	0.006	0.005
1.25(OH) $_2$ D $_3$ +GW501516									0.016	0.002	0.019	0.004	0.008	0.004
Calcipotriol-ALA					0.024	0.005	0.015	0.008	0.013	0.002	0.014	0.004	0.012	0.004
Calcipotriol-DHA					0.018	0.002	0.024	0.006	0.013	0.002	0.015	0.003	0.016	0.001
Medium ohne Zellen	0.002	0.002	0.002	0.004	0.001	0.001	0.000	0.002	-0.001	0.003	-0.001	0.003	0.000	0.001

72 h-Werte:

72 h	Platte 1		Platte 2		Platte 3		Platte 4		Platte 5		Platte 6		Platte 7	
	MW	SA												
Ohne Behandlung	0.091	0.007	0.091	0.004	0.126	0.011	0.115	0.012	0.081	0.005	0.055	0.006	0.089	0.009
EtOH	0.076	0.006	0.104	0.023	0.110	0.004	0.096	0.008	0.070	0.003	0.058	0.007	0.092	0.003
1.25(OH) ₂ D ₃	0.055	0.006	0.059	0.011	0.073	0.002	0.054	0.003	0.055	0.006	0.052	0.006	0.063	0.006
Bezafibrat	0.072	0.007	0.096	0.008	0.088	0.009	0.085	0.008	0.062	0.004				
ALA	0.058	0.011	0.082	0.005	0.115	0.003	0.082	0.004			0.044	0.002		
DHA	0.061	0.010	0.076	0.007	0.110	0.003	0.089	0.005			0.049	0.003		
WY14643									0.059	0.012	0.053	0.003	0.076	0.004
GW501516									0.070	0.008	0.055	0.006	0.074	0.004
1.25(OH) ₂ D ₃ +Bezafibrat	0.076	0.007	0.074	0.006	0.115	0.007	0.098	0.011	0.061	0.004				
1.25(OH) ₂ D ₃ +ALA	0.058	0.005	0.076	0.008	0.118	0.003	0.078	0.007					0.077	0.003
1.25(OH) ₂ D ₃ +DHA	0.053	0.007	0.075	0.009	0.068	0.008	0.073	0.008					0.066	0.005
1.25(OH) ₂ D ₃ +WY14643									0.055	0.002	0.042	0.003	0.054	0.003
1.25(OH) ₂ D ₃ +GW50151									0.072	0.005	0.050	0.005	0.081	0.005
Calcitriol-ALA					0.090	0.008	0.092	0.003	0.061	0.004	0.057	0.015	0.092	0.006
Calcitriol-DHA					0.054	0.020	0.064	0.005	0.067	0.006	0.052	0.003	0.079	0.004
Medium ohne Zellen	0.000	0.003	-0.001	0.003	-0.001	0.003	-0.001	0.002	-0.001	0.004	0.001	0.001	0.002	0.005

120 h-Werte:

120 h	Platte 1		Platte 2		Platte 3		Platte 4		Platte 5		Platte 6		Platte 7	
	MW	SA												
Ohne Behandlung	0.278	0.005	0.363	0.017	0.320	0.006	0.354	0.030	0.282	0.011	0.255	0.007	0.288	0.009
EtOH	0.270	0.008	0.332	0.015	0.291	0.019	0.378	0.031	0.276	0.032	0.266	0.002	0.284	0.005
1.25(OH) ₂ D ₃	0.124	0.002	0.210	0.008	0.190	0.039	0.208	0.006	0.188	0.014	0.166	0.008	0.152	0.006
Bezafibrat	0.245	0.032	0.322	0.039	0.305	0.018	0.342	0.006	0.256	0.028				
ALA	0.214	0.020	0.346	0.036	0.289	0.027	0.385	0.007			0.258	0.021		
DHA	0.271	0.004	0.360	0.024	0.344	0.009	0.415	0.019			0.286	0.026		
WY14643									0.241	0.006	0.243	0.020	0.261	0.017
GW501516									0.253	0.013	0.245	0.003	0.244	0.006
1.25(OH) ₂ D ₃ +Bezafibrat	0.143	0.008	0.220	0.016	0.233	0.033	0.214	0.006	0.201	0.006				
1.25(OH) ₂ D ₃ +ALA	0.146	0.006	0.199	0.008	0.179	0.017	0.235	0.035					0.153	0.003
1.25(OH) ₂ D ₃ +DHA	0.158	0.016	0.193	0.021	0.175	0.017	0.198	0.030					0.159	0.007
1.25(OH) ₂ D ₃ +WY14643									0.173	0.004	0.171	0.008	0.158	0.003
1.25(OH) ₂ D ₃ +GW50151									0.185	0.008	0.165	0.003	0.173	0.015
Calcitriol-ALA					0.241	0.021	0.367	0.010	0.265	0.031	0.251	0.004	0.267	0.005
Calcitriol-DHA					0.177	0.007	0.237	0.016	0.175	0.012	0.184	0.008	0.160	0.019
Medium ohne Zellen	0.001	0.002	-0.001	0.002	-0.002	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.004	0.001	0.003

● RT-PCR: (1 Mittelwert = 4 Messungen):

	PPAR α		PPAR δ		PPAR γ		VDR		CYP24A1	
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA
24 h ohne Behandlung (Probe 1)	30,467	1,662	44,760	4,312	0,295	0,144	132,393	13,818	0,001	0,001
24 h ohne Behandlung (Probe 2)	17,760	1,774	18,773	0,260	0,043	0,010	109,377	16,370	0,000	0,000
24 h ohne Behandlung (Probe 3)	25,530	0,226	49,063	2,780	0,000	0,000	92,220	15,779	0,000	0,000
24 h EtOH (Probe 1)	15,683	1,967	40,723	1,831	0,105	0,015	142,223	13,755	0,000	0,000
24 h EtOH (Probe 2)	17,705	2,326	15,615	1,305	0,092	0,032	87,407	12,312	0,000	0,000
24 h EtOH (Probe 3)	8,373	0,978	13,093	1,883	0,035	0,007	130,683	19,594	0,000	0,000
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Probe 1)	37,477	1,962	33,177	1,810	0,352	0,149	360,613	34,302	0,211	0,044
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Probe 2)	22,393	1,830	16,030	2,885	0,055	0,013	380,863	24,243	0,374	0,041
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Probe 3)	13,157	2,108	16,693	2,171	0,000	0,000	302,360	46,431	0,396	0,078
24 h Bezafibrat	17,253	2,504	17,020	1,991	0,136	0,113	117,230	15,092	0,001	0,001
24 h ALA	27,400	1,045	41,007	3,635	0,177	0,125	145,227	23,725	0,002	0,002
24 h DHA	15,620	1,398	28,700	4,182	0,060	0,017	116,507	21,529	0,000	0,000
24 h WY14643	18,020	2,047	19,518	2,163	0,084	0,019	118,187	6,305	0,000	0,000
24 h GW501516	16,100	1,358	15,943	2,296	0,068	0,008	144,910	21,539	0,000	0,000
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +Bezafibrat	26,175	2,711	34,353	3,401	0,000	0,000	313,107	15,268	0,488	0,046
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +ALA	36,553	1,393	40,280	2,924	0,000	0,000	368,927	40,299	0,091	0,018
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +DHA	23,643	3,120	47,160	6,756	0,134	0,047	353,177	55,503	0,576	0,102
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +WY14643	25,547	1,711	17,477	1,416	0,000	0,000	428,720	34,817	0,363	0,006
24 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +GW501516	24,787	2,616	16,233	1,900	0,122	0,059	288,493	34,214	0,412	0,047
24 h Calcipotriol-ALA	27,867	2,339	78,653	6,766	0,000	0,000	254,500	42,858	0,000	0,000
24 h Calcipotriol-DHA	23,333	4,073	35,247	3,548	0,000	0,000	262,733	17,343	0,223	0,031
120 h ohne Behandlung (Probe 1)	30,910	3,609	44,323	3,671	0,000	0,000	115,360	14,337	0,000	0,000
120 h ohne Behandlung (Probe 2)	17,953	0,296	19,038	3,321	0,059	0,009	113,960	15,478	0,000	0,000
120 h ohne Behandlung (Probe 3)	21,863	3,904	31,897	5,603	0,637	0,201	112,653	5,402	0,000	0,000
120 h EtOH (Probe 1)	15,320	1,647	12,517	1,809	0,000	0,000	44,098	4,546	0,000	0,000
120 h EtOH (Probe 2)	17,543	0,682	16,357	0,803	0,060	0,016	82,113	12,729	0,000	0,000
120 h EtOH (Probe 3)	14,890	1,559	9,297	0,682	0,000	0,000	51,430	7,808	0,000	0,000
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Probe 1)	28,457	1,746	29,765	2,790	0,089	0,017	230,880	7,302	0,365	0,073
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Probe 2)	22,770	2,170	17,397	1,091	0,042	0,012	304,877	32,073	0,288	0,033
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Probe 3)	15,093	1,524	11,387	0,903	0,000	0,000	227,753	10,212	0,163	0,041
120 h Bezafibrat	53,650	5,651	36,667	1,376	0,000	0,000	69,957	10,534	0,000	0,000
120 h ALA	60,633	6,431	44,477	4,455	0,000	0,000	73,263	6,101	0,000	0,000
120 h DHA	39,603	3,521	44,285	5,786	0,000	0,000	85,147	8,078	0,000	0,000
120 h WY14643	20,240	1,447	16,830	1,361	0,038	0,026	132,963	1,601	0,000	0,000
120 h GW501516	13,667	1,622	15,475	2,177	0,054	0,027	155,393	9,839	0,000	0,000
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +Bezafibrat	10,620	0,815	13,450	0,9395	0,029	0,013	112,525	11,327	0,052	0,011
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +ALA	35,613	2,801	24,060	2,820	0,000	0,000	215,027	16,245	0,166	0,035
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +DHA	35,997	2,680	29,577	1,738	0,037	0,032	338,323	48,847	0,556	0,074
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +WY14643	23,953	1,681	17,433	0,167	0,065	0,009	271,827	24,619	0,362	0,018
120 h 1,25(OH) $_2$ D $_3$ +GW501516	21,053	1,363	18,270	2,271	0,049	0,015	319,587	21,084	0,150	0,030
120 h Calcipotriol-ALA	12,970	1,417	15,650	1,703	0,015	0,004	87,070	9,428	0,000	0,000
120 h Calcipotriol-DHA	20,273	3,280	21,493	0,549	0,066	0,017	263,613	20,521	0,330	0,082

- RT-PCR: 120 h Behandlung (1 Mittelwert = 4 Messungen):

	PPAR α		PPAR δ		PPAR γ		VDR		CYP24A1	
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA
NHM ohne Behandlung	4,323	0,653	5,610	0,492	0,998	0,264	0,593	0,067	0,001	0,001
NHM EtOH	5,135	0,803	4,110	0,680	1,263	0,087	1,360	0,115	0,162	0,015
NHM 1,25(OH) $_2$ D $_3$	5,150	0,687	8,390	0,749	1,550	0,243	25,167	3,824	1,720	0,254
SK-Mel-5 ohne Behandlung	4,507	0,306	5,733	0,712	0,000	0,000	4,870	0,235	0,000	0,000
SK-Mel-5 EtOH	3,593	0,264	7,350	0,758	0,033	0,004	3,573	0,657	0,001	0,000
SK-Mel-5 1,25(OH) $_2$ D $_3$	4,867	0,246	6,460	0,963	0,022	0,003	3,517	0,612	0,475	0,055
SK-Mel-25 ohne Behandlung	5,263	0,833	14,607	1,288	0,659	0,098	26,070	2,603	0,002	0,004
SK-Mel-25 EtOH	5,050	0,512	13,373	1,798	0,522	0,056	32,653	5,008	0,001	0,000
SK-Mel-25 1,25(OH) $_2$ D $_3$	6,287	0,478	14,443	1,109	0,891	0,073	36,683	2,742	0,282	0,023
SK-Mel-28 ohne Behandlung	36,837	1,909	13,583	1,608	0,000	0,000	269,603	26,382	0,000	0,000
SK-Mel-28 EtOH	5,043	0,594	8,130	0,688	0,217	0,027	105,040	6,306	0,002	0,001
SK-Mel-28 1,25(OH) $_2$ D $_3$	9,673	1,341	5,793	0,398	0,059	0,009	292,747	17,750	9,387	0,777
SCL-1 ohne Behandlung	7,638	0,906	14,460	1,695	15,503	0,967	28,997	2,253	0,034	0,007
SCL-1 EtOH	4,243	0,699	13,910	1,472	13,767	1,025	41,140	1,221	0,059	0,015
SCL-1 1,25(OH) $_2$ D $_3$	5,315	0,815	14,823	1,356	10,190	1,715	17,797	0,813	6,425	0,933
SZ95 ohne Behandlung	3,243	0,306	2,513	0,076	10,550	1,054	4,430	0,567	0,091	0,041
SZ95 EtOH	2,323	0,139	2,600	0,344	3,483	0,348	3,037	0,339	0,116	0,038
SZ95 1,25(OH) $_2$ D $_3$	2,980	0,144	2,860	0,311	2,958	0,272	6,270	0,448	3,977	0,458
HEK-293 ohne Behandlung	3,633	0,430	18,867	1,644	24,040	1,926	25,110	3,227	0,000	0,001
HEK-293 EtOH	6,488	0,984	21,597	2,597	12,450	1,306	45,573	2,208	0,000	0,000
HEK-293 1,25(OH) $_2$ D $_3$	3,320	0,500	21,480	1,936	13,347	1,046	34,563	3,850	0,680	0,125
LNCaP ohne Behandlung	14,830	1,990	106,523	13,184	13,100	2,406	256,963	24,475	0,000	0,000
LNCaP EtOH	19,270	1,602	58,157	6,761	8,373	1,099	73,907	6,988	0,000	0,000
LNCaP 1,25(OH) $_2$ D $_3$	65,803	5,250	71,357	4,786	13,040	2,032	104,103	18,231	3,737	0,510
MCF-7 ohne Behandlung	2,683	0,290	65,705	8,119	5,617	0,804	141,017	19,005	0,014	0,005
MCF-7 EtOH	4,430	0,279	72,640	11,713	15,500	1,311	290,430	36,232	0,034	0,013
MCF-7 1,25(OH) $_2$ D $_3$	6,190	0,997	49,003	0,577	9,767	1,309	276,600	12,291	776,313	127,063
HepG2 ohne Behandlung	53,997	2,3587	75,000	11,318	30,067	2,020	1,543	0,186	69,373	17,134

9. Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht bzw. auf Veranstaltungen präsentiert:

Publikationen:

1. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2007). Present concepts and future outlook: Function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Cell Physiol* 212: 1-12
2. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin. Importance of PPARs in Skin Physiology and Dermatologic Diseases. *Am J Clin Dermatol* 9: 15-31
3. Sertznig P, Dunlop T, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2009). Cross talk between vitamin D receptor (VDR)- and peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-signaling in melanoma cells. *Anticancer res* (in press)

Weiterhin werden 2 Publikationen mit Teilen der vorliegenden Arbeit demnächst veröffentlicht.

Kongressvorträge:

1. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2007). Present concepts and future outlook: Function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression and therapy of malignant melanoma. 6th Meeting of the German-Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN) together with the Study Group Dermato-Endocrinology (ADE) of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 05.-07. März 2007 Freiburg, Deutschland - Abstract: *Exp Dermatol* 16: 380
2. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2008). Cross-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- and vitamin D receptor (VDR)-signaling pathways in melanoma cells. 7. Treffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Endokrinologie (ADE), 27. Februar 2008 Erlangen, Deutschland
3. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2008). Treatment with peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)-ligands and/or 1,25(OH)2D3 in melanoma cells give hints for a cross-regulation of PPAR- and vitamin D receptor-signaling pathways. Third international symposium – Vitamin D analogs in cancer prevention and therapy. 17.-18. Mai 2008 Krefeld, Deutschland - Abstract: *Anticancer Res* 28: 1623

Postervorstellung:

1. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-ligands and/or calcitriol regulate proliferation of melanoma cells: an outlook in future melanoma therapy? 37th Annual European Society for Dermatological Research Meeting (ESDR), 05.-08. September 2007 Zürich, Schweiz - Abstract: *J Invest Dermatol* 127: 94
2. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- and vitamin D receptor (VDR)-signaling pathways in melanoma. XXXV. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) 28. Februar-01. März 2008 Erlangen, Deutschland - Abstract: *Exp Dermatol* 17: 268
3. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. (2009). Ligand-induced modulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- and vitamin D receptor (VDR)-signaling pathways in melanoma. XXXVI. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) 05.-07. März 2009 Heidelberg, Deutschland - Abstract: *Exp Dermatol* 18: 279

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Reichrath, der mir in der Klinik für Dermatologie das Themengebiet für diese Dissertation zur Verfügung gestellt hat. Über den gesamten Zeitraum der Arbeit stand Prof. Dr. Jörg Reichrath mir stets für anregende Diskussionen bereit und war eine unverzichtbare Unterstützung bei der Planung, Durchführung, Auswertung und Diskussion der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Tilgen danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor seiner Klinik durchführen zu können. Herrn Prof. Dr. Eckhart Meese (Institut für Humangenetik) danke ich für die freundliche Erlaubnis, einen Teil der Versuche in seinem Labor durchführen zu können. Herrn Prof. Dr. Michael Stöckle (Klinik für Urologie) danke ich für die Bereitstellung der Vorhüte.

Herrn Dr. Markus Seifert und allen Mitarbeitern des Labors, v.a. Frau Anne Kerber, Frau Heike Palm, Frau Alexandra Stark und Annett Weinhold danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der Methoden und die zuverlässige und schnelle Hilfe beim Auftauchen unvorhergesehener Probleme bei den Versuchen. Weiterhin danke ich ihnen für die gute Integration in ihr Laborteam. Vielen Dank auch an Herrn Dr. Bernd Nürnberg, Frau Dr. Batoool Shannan, Frau Hedwig Stanisz für die moralische Unterstützung. Als Mitdoktoranden halfen sie den Laboralltag aufzuheitern.

Ein spezieller Dank geht an meine Freundin Kerstin Mootz für die permanente, liebevolle Unterstützung und das Verständnis für meine (öfters auch nächtliche) Abwesenheit zur Durchführung der Versuche. Sie hat mir stets den Rücken gestärkt und hat mich in guten, wie in schlechten Tagen ertragen und begleitet.

Besonders dankbar bin ich meinen lieben Eltern Mathias Sertznig und Eugénie Zeimetz, die mich stets gefördert und motiviert haben. Sie haben mir mein Studium ermöglicht und waren immer für mich da. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Pit Sertznig
Geburtsdatum /-ort 04.05.1983 / Luxemburg
Staatsangehörigkeit luxemburgisch

Schulbildung

1989 - 1995 Grundschule Grevenmacher (Luxemburg)
1995 - 2002 Lycée classique Echternach (Luxemburg)
2002 Abschluss: Reifezeugnis – Abteilung: Latein, neue Sprachen,
Mathematik, Naturwissenschaften

Hochschulbildung

10/2002 Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der Universität
des Saarlandes (Homburg)
09/2004 Ärztliche Vorprüfung
10/2004 Fortsetzung des Hochschulstudiums an der Universität des Saarlandes
(Homburg)
09/2005 Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit in der Klinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität des
Saarlandes (Homburg) unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Reichrath
08/2007-07/2008 Praktisches Jahr: Universitätskliniken des Saarlandes (Homburg),
Wahlfach Dermatologie
11/2008 Ärztliche Prüfung
11/2008 Approbation als Arzt
seit 01/2009 Assistenzarzt in der Hautklinik des Universitätsklinikums Aachen