

**Etablierung eines *in-vitro* Modells zur Untersuchung von  
Arzneistoffeffekten an putativen epidermalen Stammzellen  
und deren transient amplifizierenden Tochterzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

**Frau Dipl. Pharm. Karin Rzepka**

geb. am: 22. August 1976

in: Halle (Saale)

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. J. Wohlrab
2. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Neubert
3. Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder

Halle (Saale), 29. April 2010



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theorie</b>	<b>5</b>
2.1 Epidermale Stammzellen.....	5
2.1.1 Lokalisation und Organisation von Stammzellen der interfollikulären Epidermis.....	6
2.1.2 Stammzellnische .....	7
2.1.3 <i>In-vivo</i> Eigenschaften des epidermalen Stammzellkompartiments .....	8
2.1.4 <i>In-vitro</i> Eigenschaften des epidermalen Stammzellkompartiments.....	9
2.1.5 Stammzellmarker.....	9
2.1.5.1 $\beta$ 1-Integrin.....	10
2.1.5.2 Zellgröße und Zellgranularität.....	11
2.1.5.3 Zytokeratin 14 (CK14).....	11
2.1.6 Assays zur Isolierung interfollikulärer Stammzellen .....	11
2.1.6.1 Grundlagen der Kollagen-IV-Adhärenz.....	12
2.2 Epidermis-basierte Hauterkrankungen und epidermale Stammzellen.....	13
2.2.1 Stammzellen als Targetzellen der Hautkarzinogenese .....	13
2.2.2 Stammzellen bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen .....	14
2.3 Vitamin D in der Haut .....	14

2.3.1	Vitamin-D3-Synthese.....	14
2.3.2	Der Vitamin-D-Rezeptor und seine Regulation .....	15
2.3.3	Vitamin-D-Rezeptor und Stammzellen .....	15
2.3.4	Molekulare Wirkmechanismen von Calcitriol .....	16
2.3.4.1	Genomisch.....	16
2.3.4.2	Nicht-genomisch .....	16
2.3.5	Effekte von Vitamin-D3-Analoga auf Keratinozyten .....	17
2.3.5.1	Antiproliferativ-prodifferenzierend.....	17
2.3.5.2	Immunsuppressiv, antiinflammatorisch.....	18
2.3.5.3	Apoptotisch-antiapoptotisch.....	18
2.4	Vitamin D3 und seine Derivate in der Psoriasis­therapie.....	19
2.4.1	Calcipotriol.....	19
2.4.2	Tacalcitol .....	19
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Material.....	21
3.1.1	Zellmaterial .....	21
3.1.2	Medien, Supplements .....	21
3.1.3	Enzyme und andere Biotechprodukte .....	22
3.1.4	Fertiglösungen.....	22
3.1.5	Chemikalien.....	23
3.1.6	Lösungen und Puffer .....	25
3.1.7	Antikörper .....	28
3.1.8	Geräte.....	28
3.1.9	Verbrauchsmaterialien .....	30
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	Isolierung nativer humaner Keratinozyten aus juveniler Vorhaut .....	31
3.2.2	Kultivierung basaler nativer humaner Keratinozyten .....	32
3.2.3	Beschichtung der KulturgefäÙe mit Kollagen Typ IV .....	33

3.2.4	Methode der Kollagen-IV-Adhäsion.....	33
3.2.5	Zelleinsaat und Konfluenzgrad .....	35
3.2.6	Zellzahlbestimmung.....	36
3.2.7	Durchflusszytometrie .....	36
3.2.7.1	Prinzip.....	37
3.2.7.2	Herstellung einer Einzelzell-Suspension .....	37
3.2.7.3	Nachweis von $\beta 1$ - <i>Integrin</i> .....	38
3.2.7.4	Nachweis von Zytokeratin 14.....	39
3.2.7.5	Apoptose-Test .....	39
3.2.7.6	Zellzyklus-Analyse .....	40
3.2.8	Westernblot .....	41
3.2.9	Vitalfärbung mit Gentianaviolett.....	45
3.2.10	[ $^3$ H]-Thymidin-Einbau.....	46
3.2.11	Koloniebildungseffizienz .....	47
3.2.12	Statistik .....	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1	Optimierung der Kollagen-IV-Adhärenz-Isolierung.....	49
4.1.1	Einfluss der Adhäsionszeit an Kollagen IV auf die schnell-adhärenzte Zellfraktion .....	49
4.1.2	$\beta 1$ -Integrin-Expression der Zellfraktionen der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode .....	50
4.1.3	Annexin/Propidium-Messung bei den Zellfraktionen der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode .....	51
4.1.4	Proportionen der Zellfraktionen der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode.....	52
4.2	Proliferationsverhalten schnell- und langsam-adhärenter Zellen.....	52
4.2.1	Zellzyklusanalyse .....	53
4.2.2	Bestimmung des Zellwachstums mittels Vitalfärbung .....	53
4.2.3	[ $^3$ H]-Thymidin-Einbau.....	54
4.2.4	Koloniebildungseffizienz und Koloniegröße.....	55

4.3	Phänotypische Eigenschaften schnell- und langsam-adhärenter Zellen.....	56
4.3.1	Zytokeratin 14.....	56
4.3.2	Zellgröße und Zellgranularität.....	57
4.3.3	Nachweis des Vitamin-D-Rezeptors.....	58
4.4	Toxizität der Vitamin-D3-Analoga auf epidermale Stammzellen und deren transient amplifizierende Tochterzellen.....	59
4.4.1	Untersuchung der Toxizität mittels Vitalfärbung.....	59
4.4.2	Untersuchung der Toxizität mittels Annexin V/PI-Messung.....	62
4.5	Proliferationsverhalten unter Vitamin-D3-Analoga.....	65
4.5.1	Bestimmung des Zellwachstums mittels Vitalfärbung.....	65
4.5.2	[ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau.....	68
4.5.3	Zellzyklusanalyse.....	71
4.5.4	Koloniebildungseffizienz.....	75
4.6	Einfluss der Vitamin-D3-Analoga auf Stammzellmarker.....	77
4.6.1	β1-Integrin.....	77
4.6.2	Cytokeratin 14.....	78
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
5.1	Umsetzung und Optimierung der Methode der Kollagen-IV-Adhärenz zur Separation putativer epidermaler Stammzellen und deren determinierten Tochterzellen aus einer Basalzellkultur.....	81
5.2	Vergleich der Kollagen-IV-adhärenten Zell-fractionen hinsichtlich des Proliferations-verhaltens sowie des Phänotyps.....	83
5.2.1	Vergleich des Proliferationsverhaltens.....	83
5.2.2	Phänotypischer Vergleich.....	85
5.3	Vergleich von Effekten der dermatologisch relevanten Arzneistoffgruppe der Vitamin-D3- Analoga auf epidermale Stammzellen und deren transient amplifizierenden Tochterzellen.....	87
5.3.1	Toxizität der Vitamin-D3-Analoga.....	87
5.3.2	Proliferationsverhalten unter Vitamin-D3-Analoga.....	88
5.3.3	Phänotyp unter Vitamin-D3-Analoga.....	91

5.4	Schlussfolgerungen .....	93
5.4.1	Wie lässt sich die Methode der Kollagen-IV-Adhärenz- Anreicherung epidermaler Stammzellen optimieren und charakterisieren? .....	93
5.4.2	Handelt es sich bei den isolierten Zellfraktionen um Keratino-zyten unterschiedlichen Reifegrades entsprechend der Klassifizierung in epidermale Stammzellen und transient amplifizierende Tochterzellen?...93	93
5.4.3	Wie wirken sich die Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol hinsichtlich Toxizität, Proliferationsverhalten und Phänotyp auf epidermale Stammzellen und determinierte Tochterzellen aus?.....	94
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Fazit</b>	<b>95</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>123</b>
	<b>Veröffentlichungen, Vorträge, Poster</b>	<b>125</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>129</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>131</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>133</b>



# Abkürzungsverzeichnis

[ <sup>3</sup> H]	Tritium
Abb.	Abbildung
<u>ABC</u> - Efflux-Pumpen	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat- <u>B</u> inding <u>C</u> assette
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
Bax	<u>B</u> cl-2 <u>A</u> ssociated <u>X</u> protein
Bcl-2	( <u>B</u> - <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma- <u>2</u>
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein 1
BPE	Bovine Pituitary Extract
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Calcitriol
CaR	Calciumrezeptor
CdK	cyclin dependent kinase
CFE	Colony forming efficiency
Ci	Curie
CK	Zytokeratin
Cp	Calcipotriol
DMF,	Dimethylformamid
d-MFI	Delta Mean Fluorescence Intensity
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
Dsg-3	Desmoglein 3
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
eSZ	Epidermale Stammzelle
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

## VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

FL-1	Fluoreszenzkanal 1
FSC	Forward scatter
G0-Phase	Ruhephase
G1-Phase (Growth1)	Wachstumsphase 1
G2-Phase (Growth2)	Wachstumsphase 2
G-GL	Gentamycin-Gebarcuhslösung
HaCaT	human adult low calcium high temperature
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure )
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
INN	International Nonproprietary Name
kDa	Kilodalton
KIV	Kollagen IV
I-ad	Langsam-adhärent
LEF	lymphoid enhancing factor
LRC	Label-Retaining-Cell
MAPC	multipotent adult progenitor cell
MCSP	Melanom-assoziiertes Chondroitinsulfat-Proteoglykan
MDR	Multi drug resistance
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRP	Multidrug-Resistance-related Protein
MTP	Mikrotiterplatten
NHEK	Native humane epidermale Keratinozyten
PA-FABP	Psoriasisassoziiertes, fettsäurebindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-ABC	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
PBS-S	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Saponin
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	Phospho-Glykoprotein
PI	Propidiumiodid
PLC	Phospholipase C
PMZ	Postmitotische Zelle
PUCK-EDTA	EDTA-Lösung modifiziert nach PUCK
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rh123	Rhodamin 123
RIPA-Puffer	radio immunoprecipitation assay-Puffer
s-ad	Schnell-adhärent
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SFM	Serumfreies Medium
SSC	side scatter
T	Tacalcitol
Tab.	Tabelle
TAZ	Transient amplifizierende Zellen
TCF	T-cell factor
TEMED	Tetramethyldiamin
Th1,	T-Helferzellen
THF	Tetrahydrofuran
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D-Responsive Element
WNT	zusammengesetzt aus den zwei homologen Genen „ <u>w</u> ingless“ und „ <u>i</u> nt1“



# 1 Einleitung

Die schützende, äußere Gewebeschicht der Haut, die Epidermis, unterliegt einem ständigen Erneuerungsprozess. Die Existenz und der Erhalt ihrer Funktionalität als mehrschichtiges Plattenepithel beruht auf der Homöostase zwischen Zellproliferation und -differenzierung. Essentiell für die extensive Selbsterneuerung und Regenerationsfähigkeit der Epidermis sind epidermale Stammzellen. Einerseits generiert dieser Zelltyp zur Gewährleistung spezialisierter Zellen für die Gewebeerneuerung Tochterzellen (transient amplifizierende Zellen), die nach einigen Zellteilungen die terminale Differenzierung durchlaufen [1, 2]. Andererseits sind epidermale Stammzellen auch in der Lage, sich selbst zu reproduzieren. Sie besitzen ein enormes Proliferationspotential und bleiben so als Zellreservoir ein Leben lang erhalten [3]. Diese Eigenschaften machen die epidermale Stammzelle zu einem bedeutenden Forschungsobjekt in den Bereichen Tissue Engineering (Gewebezüchtung) [4-7], Transplantationsmedizin [8] sowie stammzellspezifischer Gentherapie [6][9].

Neben der physiologischen wird für epidermale Stammzellen auch eine pathogenetische Bedeutung postuliert. Seit einigen Jahren werden Fehlregulationen dieses Zelltyps als Ursache für verschiedene Hauterkrankungen diskutiert. Dabei stehen sowohl die hyperproliferative als auch die kanzerogene Prägung von Stammzellen im Vordergrund [10-15]. Für chronische Hauterkrankungen, z.B. bei der Psoriasis, besteht meist nur die Möglichkeit einer symptomatischen Langzeitbehandlung. Dies stellt in Bezug auf Spezifität und Sicherheit besonders hohe Ansprüche an die Pharmakotherapie. Eine wichtige Fragestellung in diesem Zusammenhang ist insbesondere die nach der Selektivität pharmakodynamischer oder pharmakokinetischer Arzneistoffwirkungen auf das epidermale Stammzellkompartiment und die davon abgeleiteten, reiferen Tochterzellen. Eng damit verbunden ist die Bewertung der Toxizität neuer, aber auch konventioneller Therapeutika auf diese speziellen Zellsysteme, da eine Schädigung des Stammzellkompartimentes weitreichende Folgen für die Geweberegeneration haben kann.

Der Nachweis von Arzneistoffwirkungen auf epidermale Stammzellen erfordert zunächst deren Isolierung von ihren determinierten Nachkommen. Eine Separation der Stammzellen von transient amplifizierenden Tochterzellen unter *in-vitro* Bedingungen wurde erstmalig 1993 durch die Arbeitsgruppe um Fiona Watt publiziert [16]. Die Problematik der Identifizierung und selektiven Isolierung dieser Zellen liegt dabei in der Diversität ihrer *in-vivo* und *in-vitro* Eigenschaften. Während epidermale Stammzellen im Zellverband eindeutig identifizierbar sind, ist mit der Entfernung der Stammzelle aus ihrer Nische auch ihr Phänotyp verändert [17,18]. Potentielle Stammzellmarker wie  $\beta$ 1-Integrin [16][19] oder auch p63 [20] sind keine absoluten Parameter für den Phänotyp Stammzelle, da die Expression dieser Merkmale auch bei deren Tochterzellen erfolgt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Unterschiede in der Intensität der Expression für die Diskriminierung von Stammzelle und Tochterzelle genutzt werden können [16][19-21]. Für die Anreicherung epidermaler Stammzellen wurde in den letzten Jahren hauptsächlich die Methode der Kollagen-IV-Adhäsion favorisiert [16][21-29]. Sie basiert auf der im Vergleich zu allen anderen Basalzellen stärkeren Affinität zu Kollagen IV. Als Alternative zur durchflusszytometrischen Zellsortierung anhand putativer, oberflächenspezifischer Stammzellmarker [16][28][30, 31] bietet diese Methode neben dem geringeren präparativen Aufwand den Vorteil der „Unversehrtheit“ der Zellen nach dem Trennvorgang. Für die Kollagen-IV-Adhärenz als Isolierungsmethode ist eine Beladung der Zellen mit oberflächenspezifischen Antikörpern nicht erforderlich. So stehen die fraktionierten Zellen für weitere Untersuchungen unmittelbar nach dem Trennvorgang zur Verfügung. Aufgrund dessen sollte in dieser Arbeit die Methode der Kollagen-IV-Adhäsion zur Anreicherung epidermaler Stammzellen etabliert werden.

Als Modell-Arzneistoffe wurden in dieser Arbeit die Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol ausgewählt. Aufgrund der antiproliferativen [32, 33] und differenzierungsfördernden Eigenschaften [34, 35] dieser Arzneistoffgruppe ist die Untersuchung der Wirksamkeit auf das epidermale Stammzellkompartiment als wesentlicher Regulator der Epidermishomöostase von besonderem Interesse.

Insgesamt ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Schwerpunkte:

1. Umsetzung und Optimierung der Methode der Kollagen-IV-Adhärenz zur Separation putativer epidermaler Stammzellen und deren determinierter Tochterzellen aus einer Basalzellkultur,
2. Vergleich der Kollagen-IV-adhärenenten Zellfraktionen hinsichtlich des Proliferationsverhaltens sowie des Phänotyps,

3. Vergleich von Effekten der dermatologisch relevanten Arzneistoffgruppe der Vitamin-D3-Analoga auf epidermale Stammzellen und deren transient amplifizierenden Tochterzellen.



## 2 Theorie

### 2.1 Epidermale Stammzellen

Die Funktionalität der Haut als physiologische Barriere, Thermoregulator, Verdunstungsschutz sowie Sinnes- und Ausscheidungsorgan ist für das Überleben des gesamten Organismus essentiell und setzt eine konstante, lebenslange Selbsterneuerung des intakten Organs und den Ersatz geschädigter Zellen voraus. Dafür sind epidermale Stammzellen verantwortlich [3]. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um unspezialisierte, unreife Zellen, die in der Lage sind, sich unbegrenzt selbst zu reproduzieren, daneben aber auch durch asymmetrische Zellteilung determinierte Nachkommen zu generieren [1, 2]. Die Erneuerung des Hautorgans geht dabei von drei verschiedenen Stammzellkompartimenten in den folgenden Regionen aus (Abb. 1): in der Basalschicht der interfollikulären Epidermis, der Balgregion des Haarfollikels sowie der Talgdrüse [36-41].

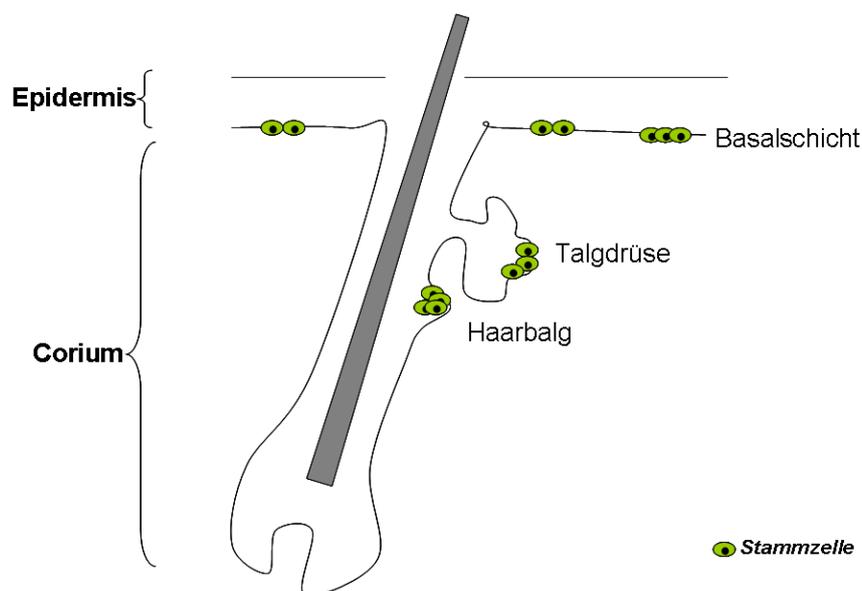
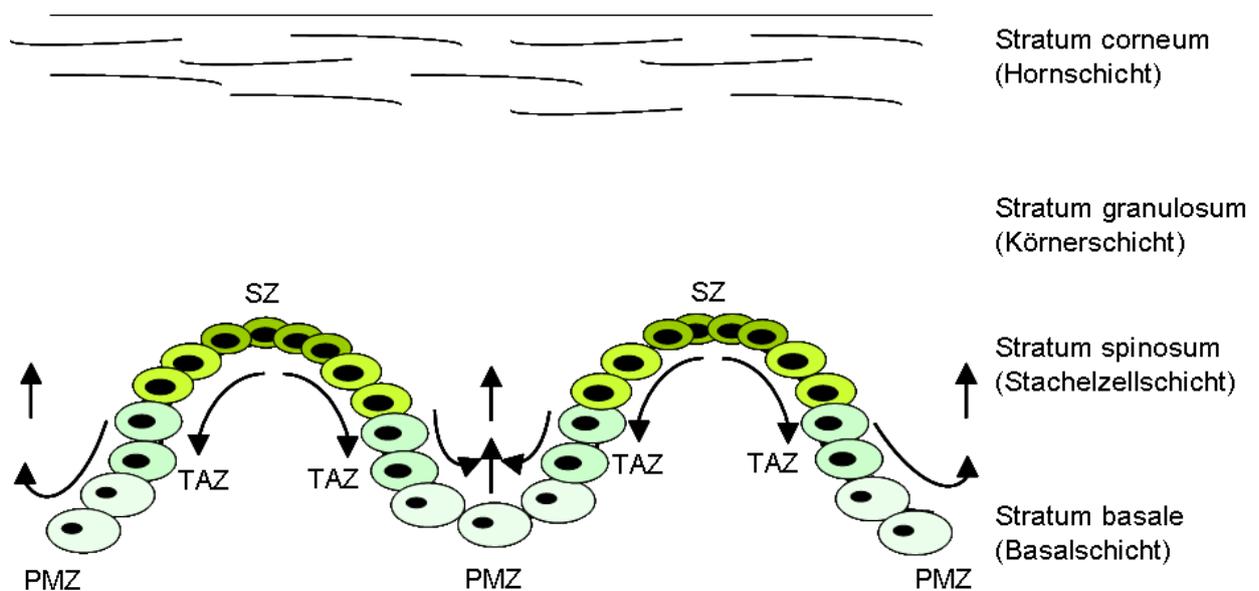


Abb. 1: Stammzellkompartimente der Haut, adaptiert von Braun und Prowse [42].

Für die vorliegende Arbeit wurden Keratinozyten aus juvenilen Vorhäuten verwendet. Dieses epidermale Gewebe ist histologisch mit interfollikulärer Epidermis aus adulter Felderhaut vergleichbar [43]. Im Gegensatz zu letzterer zeichnen sich Vorhaut-Keratinozyten durch eine hohe *in-vitro* Proliferationsaktivität aus [44-46] und werden sehr häufig als *in-vitro* Modell für dermatologische Fragestellungen genutzt. Aufgrund der hohen Proliferationskapazität wird eine höhere Anzahl an Stammzellen in juveniler Vorhaut vermutet [18][47].

### 2.1.1 Lokalisation und Organisation von Stammzellen der interfollikulären Epidermis

Epidermale Stammzellen der interfollikulären Epidermis befinden sich im Stratum basale und sind an der Basallamina fixiert. Die Stammzellen formieren sich in Clustern von ca. 40 Zellen in den Spitzen der dermalen Papillen [48, 49]. Durch den Proliferationsprozess schieben sich die Nachkommen der SZ abwärts in Richtung der so genannten Reteregionen und lösen sich dort in beginnender Differenzierung von der Basalmembran ab [48]. Aus der asymmetrischen Zellteilung gehen die transient amplifizierenden Zellen als direkte Nachkommen der Stammzellen hervor. Charakteristisch für die transient amplifizierenden Zellen ist ihre hohe Teilungsrate. Ihr Proliferationspotential erschöpft sich jedoch nach zwei bis fünf durchlaufenen Zellzyklen. Die Tochterzellen der transient amplifizierenden Zellen wiederum, die postmitotischen Zellen, haben den Zellzyklus bereits verlassen und stehen kurz vor der Enddifferenzierung. Damit verbunden ist ihre Ablösung von der Basalmembran und die Migration in die suprabasalen Schichten [50-52].



**Abb. 2:** Lokalisation und Organisation interfollikulärer epidermaler Stammzellen (eSZ), transient amplifizierender Tochterzellen (TAZ) sowie postmitotischer Zellen (PMZ), adaptiert von Potten und Booth [53].

### 2.1.2 Stammzellnische

Schicksal sowie Phänotyp von epidermalen Stammzellen sind von ihrer unmittelbaren Mikroumgebung abhängig. Stammzellmodulierende Prozesse zellautonom wie extrinsischen Ursprungs werden durch die Summe der Umgebungsfaktoren, der so genannten Stammzellnische, gesteuert [54]. Funktion dieser Nische ist der Erhalt und Schutz des Stammzellkompartiments innerhalb des Gewebes [2]. Als Nischenfaktoren werden u.a. Nachbarzellen, die extrazelluläre Matrix und diffusionsfähige Faktoren angesehen [3].

Interzellulär sezernierte Signalproteine, wie z.B. Zytokine oder WNTs, bilden einen Nischenbaustein. WNTs sind Glykoproteine, die den WNT-Signalweg aktivieren, in dem  $\beta$ -Catenin das zentrale Effektorprotein darstellt. Über die Bildung eines  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF-Transkriptionskomplexes werden Zielgene des WNT-Signalwegs aktiviert, welche die Proliferation und Differenzierung regulieren [55-57]. Eines der Zielgene des Wnt-Signalwegs ist das Protoonkogen c-Myc [58, 59]. Im Zellzyklus wird c-Myc für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase benötigt und fördert die Proliferation von transient amplifizierenden Tochterzellen [60]. C-Myc ist jedoch nicht ausschließlich ein Proliferationspromotor. In Abhängigkeit von seiner Expressionsstärke sowie des Expressionsmusters von Co-Faktoren kann c-Myc entweder die Differenzierung von epidermalen Stammzellen fördern oder als Onkogen agieren [61].

Teil der Mikroumgebung sind auch integrale Membranproteine wie der Notchrezeptor und sein Ligand Delta 1. Über diese transmembranären Moleküle finden Zell-Zell-Interaktionen statt. Durch die Notch-Delta-1-Interaktion von Nachbarzellen wird die Größe des jeweiligen Stammzellkompartiments beeinflusst [62]. Gleichzeitig ist die Notch-Signalkaskade ein negativer Regulator des WNT- Signalweges [63].

Neben Zell-Zell-Interaktionen spielen auch Zell-Matrix-Interaktionen eine bedeutende Rolle für das Schicksal der epidermalen Stammzellen. Hier sind Integrine wichtige Anker -und Signalproteine zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix. Diese Adhäsionsmoleküle besitzen die Fähigkeit, Signale von der Zelloberfläche zum Zellkern weiterzuleiten und spielen dabei für Lokalisation und Proliferationsstatus der basalen Keratinozyten eine große Rolle. Keratinozyten, die dazu bestimmt sind, in der Basalschicht zu persistieren, zeigen auch die stärkste Adhäsivität zur Basalmembran [43][64]. Durch ihre hohe basale sowie laterale  $\beta$ 1-Integrin-Expression sind epidermale Stammzellen „unbeweglicher“ als transient amplifizierende Tochterzellen. So entstehen stabile Stammzellcluster mit einer hohen Affinität zur Basalmembran [48]. Ruhende, G0-arretierte, basale Keratinozyten können durch die Interaktion von Integrinen und extrazellulärer Matrix wieder in den Zellzyklus eintreten

[65-67]. Mit der extrazellulären Matrix interagieren auch sezernierte Zytokine und können so Einfluss auf das Nischenmilieu nehmen [68, 69].

Nachbarzellen wie dermale Fibroblasten sind wahrscheinlich für die Abschirmung vor antiproliferativen Einflüssen, für die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren sowie Faktoren, die für den Fortbestand des Phänotyps Stammzelle wichtig sind, verantwortlich [70]. Es wurde gezeigt, dass einige Fibroblasten die Fähigkeit besitzen, den Wachstumsinhibitor TGF  $\beta$  abzubauen [70]. Andere wiederum sezernieren den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) [71].

Die Gesamtheit der hier genannten Nischenfaktoren definiert den Phänotyp Stammzelle. Es wird klar, dass durch Umgebungsveränderungen, z.B. Gewebetraumatisierung, auch Einfluss auf die Stammzellen genommen wird. Im Fall einer Verletzung der Haut erfolgt eine Aktivierung der Proliferation der Stammzellen, um den Zellersatz zu gewährleisten [17][72, 73].

Neuere Bestrebungen zur Transdifferenzierung von adulten Stammzellen bestätigen den engen Zusammenhang zwischen Nische und Erscheinungsbild Stammzelle. Untersuchungen von Stern et al. [74] an Maus-Stammzellen zeigten, dass sich durch gezielte Kokultur mit S17-Knochenmarkbindegewebszellen und Zytokin-supplementiertem Medium das Expressionsmuster der Oberflächenproteine vom epidermalen zum b-lymphozytären Stammzellphänotyp verschieben lässt.

### **2.1.3 *In-vivo* Eigenschaften des epidermalen Stammzellkompartiments**

Ausgehend von Potten et al. [75], basiert die Charakterisierung von epidermalen Stammzellen auf kinetischen Studien anhand von kurzzeitiger [ $^3$ H]-Thymidinexposition an muriner Epidermis, 1981 wurde durch Bickenbach et al. die Retention von inkorporiertem [ $^3$ H]-Thymidin bzw. BrdU in den basalen Keratinozyten untersucht [76]. Dabei korrelierte die Persistenz der DNA-Markierung mit der Zellzyklusrate der einzelnen Basalkeratinozyten. So konnten Zellen, deren DNA-Markierung aufgrund ihrer geringen Zellzyklusrate länger erhalten blieb, als epidermale Stammzellen identifiziert werden. In der Literatur werden epidermale Stammzellen daher auch als „Label retaining cells“ bezeichnet [7][77, 78]. Sie befinden sich in adultem Gewebe hauptsächlich in der G0-Phase [1][6]. Daraus resultiert eine genetische Stabilität (Mutationsschutz), welche die Funktionalität der Stammzelle über den gesamten Zeitraum der Existenz des Organismus unterstützt [79].

Die Charakterisierung *humaner*, epidermaler Stammzellen beschränkt sich im Gegensatz zu murinen epidermalen Stammzellen hauptsächlich auf *in-vitro* Untersuchungen. So war

aufgrund des kanzerogenen Potentials der DNA-Markierung die Erzeugung von humanen Label retaining Cells in vivo ethisch nicht vertretbar. Erst in neueren Studien konnte mit der erfolgreichen Transplantation humaner Epidermis auf Mäuserücken die Möglichkeit für ein humanes in-vivo Modell geschaffen werden [80].

#### **2.1.4 *In-vitro* Eigenschaften des epidermalen Stammzellkompartiments**

Auf das Herauslösen aus dem Gewebeverband reagieren die Zellen wie auf eine Verletzung der Haut: Es findet eine Proliferationsaktivierung (siehe auch Kapitel 2.1.2) statt. Erfolgreiche autologe Transplantationsversuche von kultivierter Epidermis bei Brandopfern [5][81, 82] zeigten, dass *in-vitro* Bedingungen nicht zum Verlust von Stammzellen führen. In der Zellkultur lassen sich Holoklone, Meroklone und Paraklone klassifizieren. Holoklone besitzen die höchste Reproduktionskapazität und repräsentieren damit die Stammzell-/Progenitor-Fraktion. Paraklone durchlaufen nach einigen Zellteilungen die terminale Differenzierung wie transient amplifizierende Zellen. Meroklone bilden eine Zellklasse zwischen Holo- und Paraklonen. Ein Surrogat-Parameter für die extensive Selbsterneuerungskapazität sowie das enorme Proliferationspotential der Stammzellen in vitro ist die Fähigkeit der Einzelzellen, Kolonien zu bilden (Colony forming Efficiency, CFE) [16][83-85].

#### **2.1.5 Stammzellmarker**

Um den Phänotyp Stammzelle näher untersuchen zu können, war und ist es notwendig, potentielle Markerproteine zur Identifizierung dieses Zelltyps zu finden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über in der Literatur beschriebene Marker zur Identifizierung von Stammzellen der *interfollikulären* Epidermis.

Tab. 1: Übersicht interfollikuläre Stammzellmarker

Marker	Expression bei SZ	Funktion	Literatur
<b>Oberflächenmarker</b>			
$\beta$ 1-Integrin (CD 29)	↑	Zell-Matrix-Adhäsion	[16][19][86]
$\alpha$ 6 $\beta$ 4-Integrin (CD 49f)/Transferrinrezeptor (CD71)	↑ ↓	Zell-Matrix-Adhäsion/ Zellproliferation	[87-90]
Melanom-assoziierte Chondroitinsulfat-Proteoglykan (MCSP)	↑	Zell-Matrix-Adhäsion	[85][91]
Delta 1	↑	Zell-Zell-Adhäsion	[92,93]
E-Cadherin	↓	Zell-Zell-Adhäsion	[94]
CD 98	↓	Aminosäure-Transport, Zellproliferation	[95]
Psoriasisassoziiertes, fettsäurebindendes Protein (PA-FABP)	↓	Zelldifferenzierung	[96]
Desmoglein 3 (Dsg-3)	↓	Zell-Zell-Adhäsion	[84]
<b>Intrazelluläre Marker</b>			
p63	↑	Transkriptionsfaktor	[20]
$\gamma$ -Catenin	↑	Zell-Zell-Adhäsion Transkriptionsfaktor	[94]
Nicht Cadherin-assoziiertes $\beta$ -Catenin	↑	Zell-Zell-Adhäsion, Transkriptionsfaktor	[97]
K15	↑	Zytoskelettprotein	[11][89]

Die für die vorliegende Arbeit genutzten Charakterisierungsparameter werden nun im Folgenden näher beschrieben.

### 2.1.5.1 $\beta$ 1-Integrin

Humane Keratinozyten exprimieren verschiedene Adhäsionsproteine aus der Familie der Integrinrezeptoren. Physiologisch beschränkt sich die Expression auf die Basalschicht mit den proliferationsfähigen Keratinozyten der Epidermis [98-101]. Jedes Integrin ist ein transmembranäres Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Bei beiden Untereinheiten handelt es sich um Glykoproteine [102]. Die Ligandenspezifität eines Integrins hängt von der Kombination der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ab [103-105]. Die  $\beta$ 1-Integrine mit den Untereinheiten  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 5 bilden die fokale transmembranäre Adhäsionskomponente. Als Signalüberträger sind diese Proteine in die regulativen Prozesse von Proliferation, Differenzierung und Migration involviert [106]. Die Expression dieser Adhäsionsproteine ist innerhalb der Basalzellschicht verschieden. Im Bereich der dermalen Papillen entstehen durch eine verstärkte laterale sowie apikale Expression die typischen Stammzell-Cluster [43][48]. Die  $\beta$ 1-integrinexpression sinkt jedoch mit zunehmender Differenzierungsstufe der basalen Keratinozyten [106]. Aufgrund dessen wird die

$\beta$ 1-Integrin-Expression als Maß für die Immaturität der Keratinozyten genutzt. Nach immunzytologischer Markierung der Zellen mit einem  $\beta$ 1-Integrin-Antikörper können die Keratinozyten mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung (FACS) anhand ihrer Expressionsstärke isoliert werden. Die  $\beta$ 1-integrinreichsten Keratinozyten zeigen eine sehr hohe Proliferationskapazität und werden als epidermale Stammzellen definiert [16][19].

### **2.1.5.2 Zellgröße und Zellgranularität**

In Abhängigkeit von ihrer Zellgröße zeigen basale Keratinozyten eine unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit zur Proliferation. In vitro generieren Basalzellen bis zu einem Durchmesser von 11  $\mu$ m größere Kolonien in größerer Anzahl als Basalzellen mit einem Durchmesser > 11  $\mu$ m. Ab einem Zelldurchmesser von 20  $\mu$ m sind die Basalzellen nicht mehr proliferationsfähig [108]. Untersuchungen von Bindegewebszellen sowie hämatopoetischen Zellen demonstrierten, dass nicht nur die Zellgröße einen Hinweis auf den Differenzierungsgrad der Zellen gibt, sondern auch die Granularität der Zelle. Zellen mit einer geringen Zellgröße und einer niedrigen zytoplasmatischen Granularität zeigten stammzelltypische Eigenschaften [109][110].

### **2.1.5.3 Zytokeratin 14 (CK14)**

CK14 ist ein proliferationsassoziiertes Zytoskelettprotein der Basalmembran und gehört zur Familie der Intermediärfilamente [111]. Diese Proteine werden aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung in die Klassen Typ I (saure) und Typ II (basische und neutrale) unterteilt. CK 14 ist ein Typ-I-Keratin und bildet mit dem Typ-II-Keratin CK5 ein obligates Heterodimer [112]. Wenn die basalen Keratinozyten den Zellzyklus verlassen und beginnen zu differenzieren, wird die Expression dieser beiden Keratine herunterreguliert. Mit dem Übertritt der Zellen in die suprabasale Stachelzellschicht werden Keratin 1 und Keratin 10 als neues Keratinpaar exprimiert [113]. Es wird vermutet, dass CK14 eine entscheidene Rolle für den Erhalt der basalen, epidermalen Zellform sowie für die Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Traumen spielt und dadurch vor Zellyse schützt. Mäuse, die eine K14-Null-Mutation besitzen, produzieren phänotypische Eigenschaften einer Epidermolysis bullosa, einer verstärkten Neigung der Haut zur Blasenbildung [114].

## **2.1.6 Assays zur Isolierung interfollikulärer Stammzellen**

Die ersten Ansätze zur Separation humaner, epidermaler Stammzellen von ihren transient amplifizierenden Tochterzellen wurden 1993 von Jones und Watt publiziert [16]. Sie isolierten die epidermalen Stammzellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung

(FACS) anhand der  $\beta$ 1-Integrin-Expression der Zellen sowie durch *in-vitro* Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine. In nachfolgenden Arbeiten wurden weitere oberflächenspezifische, putative Stammzellmarker wie z.B. die Kombination von  $\alpha$ 6-Integrin und Transferrinrezeptor durch Li et al. [87] als durchflusszytometrische Selektionsparameter genutzt. Auch über die Exposition der Zellen mit Substratfarbstoffen membranständiger Effluxpumpen wie Hoechst oder Rhodamin 123 wurde eine durchflusszytometrische Separation durchgeführt. Die nachfolgende Tab. 2 gibt einen Überblick zu den präferierten Isolierungsmethoden epidermaler Stammzellen. Für alle genannten Methoden müssen die Zellen aus dem Gewebeverband herausgelöst werden und in einer Suspension vorliegen.

**Tab. 2:** Methoden zur Isolierung epidermaler Stammzellen

Methode		Publikation
<i>Adhärenz an Kollagen IV</i>		[16][21-26]
<i>Durchfluss-zytometrische Sortierung</i>	$\beta$ 1-Integrin	[16][19][27][43][86]
	$\alpha$ 6-Integrin und Transferrinrezeptor	[28][87]
	CD34	[30][115]
	$\beta$ 1-Integrin und MCSP	[91]
	Rhodamin 123 als Substrat von Effluxpumpen	[31]
Hoechst als Substrat von Effluxpumpen		[80][115-117]

Nachfolgend wird die in dieser Arbeit verwendete Methode der Kollagen-IV-Adhärenz näher erläutert.

### 2.1.6.1 Grundlagen der Kollagen-IV-Adhärenz

Das Prinzip dieser Adhäsionsmethode beruht auf der hohen Affinität epidermaler Stammzellen an das basale Matrixprotein Kollagen IV. Diese Bindungsaffinität ist wiederum durch die hohe  $\beta$ 1-Integrin-Expression von epidermalen Stammzellen begründet (siehe Kapitel 2.1.5.1).  $\beta$ 1-Integrine vermitteln neben interzellulären Kontakten auch die fokale Adhäsion zur Basalmembran und sind damit an der Verankerung von Epidermis und Corium beteiligt. Hauptkomponente dieser Basalmembran ist das Faserprotein Kollagen IV. Da der Kollagen-IV-Rezeptor  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 gegenüber den Rezeptoren für Laminin und Fibronectin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 deutlich stärker von den Basalzellen exprimiert wird [118, 119], basiert die fokale Adhäsion zwischen Basalzellen und Basalmembran hauptsächlich auf der Rezeptor-Liganden-Bindung von  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Integrin und Kollagen IV [120, 121]. Diese Eigenschaft wird zur Separation der epidermalen Stammzellen von anderen mitotisch aktiven Keratinozyten genutzt. So binden epidermale Stammzellen aufgrund ihrer hohen  $\beta$ 1-Integrin-Expression in einem kürzeren Zeitraum an das Kollagen IV als determinierte

Keratinocyten mit einem geringeren  $\beta$ 1-Integrin-Level [16][22-24][26]. Damit lassen sich potentielle epidermale Stammzellen in vitro als schnell-adhärenente Fraktion isolieren. Keratinocyten in beginnender Differenzierung mit geringerer Expression des Oberflächenrezeptors adhärenente dagegen erst nach längerer Inkubation an Kollagen IV. Mit weiter absinkender  $\beta$ 1-Integrin-Expression und Verlust der Ligandenbindungsfähigkeit der Rezeptoren [122] sind die Keratinocyten nicht mehr in der Lage, an Kollagen IV zu binden. Aus der Kollagen-IV-Fraktionierung ergeben sich damit drei Zellfraktionen: schnell-adhärenent (s-ad), langsam-adhärenent (l-ad) sowie nicht-adhärenent (n-ad) [24].

## 2.2 Epidermis-basierte Hauterkrankungen und epidermale Stammzellen

Die in Kapitel 2.1.2 beschriebene starke Abhängigkeit des Phänotyps Stammzelle von ihrer unmittelbaren Umgebung, der sogenannten Nische, bietet Angriffspunkte für pathologische Fehlregulationen. Tatsächlich gibt es mittlerweile zahlreiche Hinweise darauf, dass eine Fehlregulation des Stammzellkompartiments Ursache einiger pathogenetischer Prozesse ist (siehe Kapitel 2.2.1; 2.2.2). Das histologische Bild epidermaler Hauterkrankungen weist häufig Veränderungen in der Basalschicht der Epidermis auf. Die Veränderungen reichen dabei von gestörter Zelldifferenzierung, atypischen Keratinocyten, Hyperproliferation (Akanthose), suprabasalen Mitosen bis hin zu basaloiden Tumorzellen. In Abhängigkeit vom Krankheitsbild können auch Infiltrationen des Gewebes mit Zytokinen oder anderen Entzündungsmediatoren einhergehen [123].

### 2.2.1 Stammzellen als Targetzellen der Hautkarzinogenese

Für Targetzellen der Hautkarzinogenese wird eine konstante Teilungsrate vorausgesetzt. Dies ist ein Charakteristikum der meisten epidermalen Basalzellen. Des Weiteren müssen sie eine hohe Wachstumskapazität besitzen, die sie zur Tumorgewebsbildung befähigt. Aufgrund dessen ist für Stammzellen die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, Ausgangspunkt der Karzinogenese zu sein [10][12][79][124]. Versuche an Mäusen zeigten, dass nach Applikation des Tumorpromotors TPA (Tetradecanoyl-12,13-phorbolacetat) die als Label Retaining Cells (LRC) identifizierten Stammzellen (siehe Kapitel 2.1.3) in der Epidermis verblieben und weiter teilungsfähig waren, während reifere Zellen nach Inkubation mit TPA relativ schnell die Basalschicht verließen und mitotisch kaum noch aktiv waren. Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass Stammzellen karzinogene DNA-Addukte wie  $[^3\text{H}]$ benzo[a]pyrene speichern können. Tumor-iniziierte Zellen zeigten, ähnlich zu den LRC, stammzelltypische

Eigenschaften wie z.B. die höchste Koloniebildungseffizienz (Colony Forming Efficiency) [125]. In Vorstufen von Hauttumoren wie z.B. aktinischen Keratosen konnten Veränderungen des stammzellregulierenden Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin gezeigt werden. Das Molekül ist in die Zell-Zell-Adhäsion sowie in die Signaltransduktion involviert und könnte dadurch die invasiven und proliferativen Kapazitäten maligner Tumoren fördern [13].

### **2.2.2 Stammzellen bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen**

Histologische und molekularbiologische Untersuchungen chronisch entzündlicher Erkrankungen von Haut und Schleimhaut zeigen Veränderungen in stammzelltypischen Expressionsmustern. Bei hyperkeratotischen Erkrankungen der Mundschleimhaut wurden histologisch Veränderungen in der Expression von Stammzellmarkern wie MCSP,  $\alpha$ 6- und  $\beta$ 1-Integrin dokumentiert [126]. Ein Beispiel chronisch entzündlicher Krankheitsbilder der Haut ist die autoimmunologische, Th1-Lymphozyten-vermittelte Systemerkrankung Psoriasis. Typisch dafür sind dermale und epidermale Veränderungen mit entzündlichen Zellinfiltraten ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-19 und IL-8), vaskulärer Dysregulation sowie Hyperproliferation und abnormer keratinozytärer Differenzierung [127]. Beim Vergleich von gesunder und psoriatischer Epidermis zeigen sich auch hier Abweichungen bei der Expression von stammzelltypischen Markern wie p63, CK15 und  $\beta$ 1-Integrin in der Basalschicht [11][14, 15]. Untersuchungen zeigten eine Verschiebung der p63-Expression aus den dermalen Papillen in Richtung der Reteleisten [14]. Die Expression des Zytoskelettproteins Zytokeratin 15 wird in proliferationsaktivierten Keratinozyten (z.B. in vitro) und in psoriatischen Läsionen stark reduziert bis hin zum Verlust des Proteins [11][15]. Typisch für psoriatische Läsionen ist u.a. auch eine Ausweitung der Expression des  $\beta$ 1-Integrins in suprabasale Schichten, wobei die gesamte Expressionsintensität des Markers vermindert ist [128-130].

## **2.3 Vitamin D in der Haut**

### **2.3.1 Vitamin-D3-Synthese**

Die hormonell aktive Form des Vitamin D 3, Calcitriol ( $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3), wird über photochemische Vitamin-D3-Synthese in der Haut und nachfolgende hepatische sowie renale Hydroxylierung an C-25 und an C-1 in  $\alpha$ -Stellung produziert. Experimentelle und klinische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Serumkonzentration von Calcitriol zu niedrig ist, um Vitamin-D-Rezeptor vermittelte hormonelle Effekte in der Haut zu induzieren [131, 132]. Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors in nahezu allen Zelltypen der Haut

(Keratinocyten, Melanozyten, Langerhanszellen, Fibroblasten, Endothelzellen, dermale Dendrozyten/Monozyten sowie T- und B-Lymphozyten) [133-138] suggerierte jedoch einen genregulativen Effekt von Calcitriol in diesem Organ. Schließlich konnte für Keratinocyten in vitro [139] als auch in vivo [140] eine autonome Synthese nachgewiesen werden. Dieser Syntheseweg beinhaltet nicht nur die bekannte UV-Induktion von Vitamin D<sub>3</sub> sondern auch den weiteren enzymatisch regulierten Metabolismus zur aktiven Form. Aufgrund dessen können in der Epidermis substantielle Mengen an hormonell wirksamem Calcitriol entstehen. Auch Fibroblasten sind in die Calcitriolsynthese involviert. Sie sind jedoch nur in der Lage, die enzymatische Hydroxylierung von Vitamin D<sub>3</sub> an C-25 zu vollziehen. Damit könnten sie aber als Lieferant von Calcitriol-Vorstufen eine wichtige Rolle für die keratinozytäre Calcitriolsynthese spielen [141].

### 2.3.2 Der Vitamin-D-Rezeptor und seine Regulation

Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) ist Mitglied einer Superfamilie von strukturell ähnlichen nukleären Rezeptoren, die als Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren agieren können [142]. Zu den verschiedenen Subklassen dieser Familie gehören u.a. auch die Rezeptoren weiterer Steroidhormone wie Estrogen (ER), Progesteron (PR), Glucocorticoide (GR), Mineralocorticoide (MR) und Androgene (AR) sowie Rezeptoren für das Thyroidhormon und Vitamin-A-Derivate (RAR, RXR) [143-145].

Für die Regulation der VDR Expression werden verschiedene Faktoren beschrieben. Die keratinozytäre Expression ist vom Grad der Differenzierung der Zellen und deren Teilungsrate abhängig. So wird in der Basalmembran die höchste VDR-Expression nachgewiesen [146-147]. Eine Hochregulation erfährt der Rezeptor auch durch seine Liganden. Kultivierte Keratinocyten zeigten nach Stimulation von VDR durch Calcitriol eine Erhöhung der Expression innerhalb von 24 h mit einem Maximum nach 8 h. Der Abfall von VDR nach 2 bis 4 Tagen unterhalb des Ausgangswertes ist möglicherweise das Resultat der beginnenden Differenzierung der Zellen [148]. Psoriatische Haut zeigt *keine relevanten* Unterschiede zur gesunden Haut. Im Vergleich lassen sich nur eine *geringfügig* stärkere basale und suprabasale VDR-Expression in läsionaler Haut erkennen [149-150].

### 2.3.3 Vitamin-D-Rezeptor und Stammzellen

Es wird vermutet, dass der VDR in die Regulation von epidermalen Stammzellen involviert ist. In Studien an Mäusen konnte demonstriert werden, dass VDR durch das WNT-Effektor-Protein  $\beta$ -Catenin aktiviert werden kann. Die Aktivierung des VDR unter Bildung eines VDR- $\beta$ -Catenin-Komplexes sowie die Aktivierung des WNT-Signalwegs durch

Bildung des Transkriptionskomplexes TCF/LEF1/ $\beta$ -Catenin induzieren Differenzierungsgene für die Keratinozyten [151]. Des Weiteren zeigten VDR-defiziente Mäuse eine Verminderung von Stammzellen in der Epidermis [152].

## **2.3.4 Molekulare Wirkmechanismen von Calcitriol**

### **2.3.4.1 Genomisch**

Bei Calcitriol handelt es sich um eine lipophile Substanz, die leicht zelluläre Membranen überwinden und so mit dem nukleären Vitamin-D-Rezeptor (VDR) interagieren kann. Durch die Komplexbildung mit dem Rezeptor erfolgt eine ligandeninduzierte Transkription sensibler Gene. Essentiell für die Vermittlung der Transaktivierung ist die spezifische Bindung des nukleären Rezeptor-Ligand-Komplexes an DNA-Bindungsdomänen, auch bezeichnet als Vitamin-D-Responsive-Elements (VRDE). Zur Bildung einer stabilen Protein-DNA-Bindung komplexiert VDR mit einem weiteren VDR-Komplex oder einem Vitamin-A-Rezeptor (RXR-retinoid X receptor) zu Homo- bzw. Heterodimeren. Nach Interaktion der Dimere mit den VRDEs an den Promotorstellen verschiedener Gene wird die Transkription des einzelnen Gens durch die RNA-Polymerase II gestartet [153].

### **2.3.4.2 Nicht-genomisch**

Neben den genomischen Effekten, die durch den intrazellulären VDR vermittelt werden, gibt es auch nicht-genomische Vitamin-D-induzierte Regulationsmechanismen, die durch einen schnellen Wirkungseintritt gekennzeichnet sind. Zu Effekten dieser Art gehören die Stimulation verschiedener Second Messenger Systeme wie der Phosphatidylinositol-Metabolismus, die Calciummobilisation und die Proteinkinase C-Aktivität [154]. Studien zeigten, dass Calcitriol die keratinozytäre Signaltransduktion durch die Induktion von Phospholipase-C-Isoenzymen modulieren kann [155]. Die Initiierung dieser Signalwege findet dabei über Plasmamembranrezeptoren statt. Dafür werden zwei Möglichkeiten diskutiert:

- 1) Der klassische VDR fungiert als membranständiger Rezeptor und ist dabei an Second Messenger Systeme gekoppelt.
- 2) Es existiert ein membranassoziertes Rezeptorprotein (membrane-associated rapid response steroid binding protein (MARRS)), welches separat vom VDR Calcitriol binden kann und ebenfalls an Second-Messenger-Signale gekoppelt ist [154].

## 2.3.5 Effekte von Vitamin-D3-Analoga auf Keratinozyten

### 2.3.5.1 Antiproliferativ-prodifferenzierend

Der zentrale Angriffspunkt von Calcitriol ist der G1/S-Kontrollpunkt des Zellzyklus. Eine proliferierende Zelle muss diesen Kontrollpunkt erfolgreich passieren, um in die S-Phase eintreten zu können. Dies ist abhängig von der Komplexbildung zwischen Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen (CdK-cyclin dependent kinase). Durch die Komplexbildung aktivierte CdKs können Tumorsuppressorproteine (z.B. Retinoblastomprotein Rb) phosphorylieren und bewirken die Aufhebung der Zellzyklusblockade. Die CdK-Aktivierung kann jedoch durch sogenannte CdK-Inhibitoren blockiert werden: CdK-Inhibitoren wie p16 und p15 lösen Cyclin aus der Komplexbindung heraus, während Proteine der Cip/Kip-Familie wie p21 und p27 mit Cyclin und CdK einen ternären Komplex bilden und auf diese Weise zur Inaktivierung der CdKs führen.

Der Haupteffekt von Calcitriol beruht auf der Induktion der CdK-Inhibitoren sowie der Reduktion von CdK-Aktivatoren. Es konnte gezeigt werden, dass die p21- sowie p27-Transkription unter Calcitriol hochreguliert wird, während die Expression von Cyclin D1 inhibiert wird [156-159].

Die Calcitriol-induzierte Differenzierung ist eng mit den antiproliferativen Effekten verbunden und u.a. durch den Anstieg von p21 gekennzeichnet [160-163]. Über die Aktivierung von second messenger Systemen (siehe Kapitel 2.3.4.2) potenziert das Hormon die calciumabhängige Differenzierung. Die extrazelluläre Calciumkonzentration und Calcitriol interagieren dabei in ihrer Fähigkeit, die keratinozytäre Proliferation zu hemmen und die Genexpression von Involucrin und Transglutaminase zu stimulieren [164]. In Studien konnte demonstriert werden, dass mit steigendem Calciumspiegel auch der antiproliferative, prodifferenzierende Effekt von Calcitriol verstärkt wurde [165]. Teil dieses Synergismus könnte die Calcitriol-induzierte Expression eines intrazellulären Calciumrezeptors (CaR) sein, welcher, in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration, die initiale Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern reguliert. So sensitiviert Calcitriol die Keratinozyten für Ca [166]. Durch die Aktivierung und Induktion von Phospholipase C (PLC) sowie die Öffnung verschiedener Calciumkanäle besitzt der akute intrazelluläre Calciumanstieg eine verlängerte Wirkung. Calcitriol potentiert diesen Effekt durch Induktion der Expression der Phospholipase-Protein-Familie [155][167, 168].

### 2.3.5.2 Immunsuppressiv, antiinflammatorisch

In vitro konnte gezeigt werden, dass Calcitriol die Antigen-induzierte T-Zell-Proliferation sowie die Zytokinproduktion inhibiert [169]. Die Behandlung von dendritischen Zellen mit Calcitriol verringert die Expression co-stimulierender Marker und reduziert die T-Zell-Aktivierung durch Expressionshemmung der MHC-II-Moleküle der dendritischen Zellen [170]. Calcitriol supprimiert die Bildung von lymphozytärem Interleukin 2 (IL-2) und 6 (IL-6). Des Weiteren vermindert Calcitriol die Freisetzung von TNF  $\alpha$  und IL-1 im entzündlichen Infiltrat von psoriatischen Hautläsionen [171]. Resultat dieser Effekte ist eine Reduktion der Th1-Immunreaktivität. Experimentelle Daten zeigen außerdem, dass Calcitriol in vitro sowohl die IgE-Produktion als auch die IgE-vermittelten Hautreaktionen unterdrücken kann [172, 173].

### 2.3.5.3 Apoptotisch-antiapoptotisch

Die Induktion der Apoptose durch Calcitriol wurde u.a. an Brust-, Kolon- und Prostatakrebszelllinien gezeigt [174-176]. Die Studien berichten dabei über eine Erhöhung des Bax/Bcl-2-Ratios durch Reduktion des antiapoptotischen Protoonkogens Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2). Des Weiteren förderte Calcitriol durch vermehrte Translokation des proapoptotischen Tumorsuppressor-Co-Faktors Protein Bax (Bcl-2 Associated X protein) die Freisetzung von Cytochrom C, welches ein Signalmolekül der apoptoseaktivierenden Caspase-Signalkette darstellt [176]. Der apoptotische Effekt tritt hier bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 nM auf. Auch bei Keratinozyten sowie bei HaCaT ließ sich der apoptotische Effekt von Calcitriol nachweisen. Dabei wurde eine Hydrolyse von Sphingomyelin zu proapoptotischem Ceramid [177, 178] als Apoptose-Auslöser detektiert. Allerdings waren hier deutlich höhere Wirkstoffkonzentrationen (ab 5000 nM) oder längere Inkubationszeiten (mehr als 3 d) [177][179, 180] für diesen Effekt erforderlich. Im Gegensatz dazu zeigten Keratinozyten bei niedrigeren Calcitriolkonzentrationen (100 nM) eine Apoptoseresistenz gegenüber Ceramiden, ultravioletten Strahlen und TNF  $\alpha$  [180]. Dieser zytoprotektive bzw. antiapoptotische Effekt beruht dabei offensichtlich auf der weiteren Metabolisierung der Ceramide zu Sphingosin-1-phosphat. Dieses Molekül antagonisiert den apoptotischen Effekt der Ceramide [180]. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass nach Vorbehandlung von Keratinozyten mit Calcitriol keine Apoptose durch Cisplatin und/oder Doxyrubicin induziert werden konnte. Dafür wurde die Aktivierung zweier antiapoptotischer Signalwege, Phosphoinositol-3-Kinase(PI-3)/Akt-Signalweg und MEK/extracellular signal regulated kinase (ERK)-Signalweg, verantwortlich gemacht. Beide sind in die Regulation von Bcl-2 und Bad/Bax involviert. Die protektive Wirkung von Calcitriol

resultiert dabei aus der Induktion von Bcl-2, welche zu einer Erniedrigung des Bax/Bcl-2-Ratios führt [181].

## 2.4 Vitamin D3 und seine Derivate in der Psoriasisstherapie

Neben der Normalisierung der Keratinozytendifferenzierung, der Hemmung der T-Lymphozytenproliferation sowie der Zytokin-Sekretion beruht die antipsoriatische Wirkung des biologisch aktiven Vitamins D3 und seiner Derivate vor allem auf der starken Hemmung der Keratinozytenproliferation. Zunächst war das physiologische Calcitriol Ausgangspunkt für die Therapie der hyperproliferativen Hauterkrankung. Begründet durch sein relativ hohes calceotropes Nebenwirkungspotential (Hyperkalziämiegefahr!) wurde jedoch nach Wirkstoffen gesucht, die ein günstigeres Wirkung-Nebenwirkungsprofil besitzen [182].

### 2.4.1 Calcipotriol

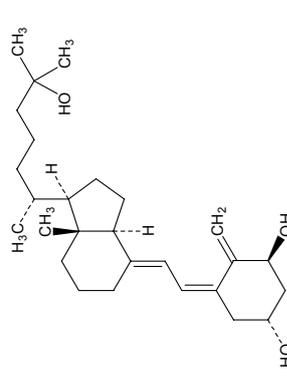
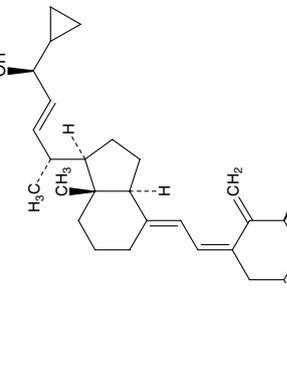
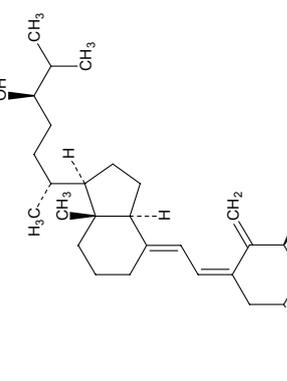
Calcipotriol ist ein synthetisches Vitamin-D3-Analogon. Der Unterschied zu Calcitriol liegt in der Modifikation der Seitenkette durch Inkorporierung eines Cyclopropanringes. Calcitriol und Calcipotriol besitzen in vitro ähnliche Effekte auf die Zellwachstumsregulation von Keratinozyten, Tumorzellen und Immunzellen. In vivo besitzt Calcipotriol einen 100-200mal geringeren calceotropen Effekt als Calcitriol. Diese niedrige calceotrope Aktivität beruht auf dem raschen systemischen Metabolismus in nicht aktive Abbauprodukte. In Keratinozyten verläuft dieser Metabolismus jedoch langsam. So hat Calcipotriol einen großen Effekt auf das Zielgewebe Epidermis, aber nur geringe systemische Nebenwirkungen [183].

### 2.4.2 Tacalcitol

Tacalcitol unterscheidet sich von Calcitriol durch Hydroxylierung an Position 24 anstelle Position 25. Auch Tacalcitol inhibiert die Zellproliferation, Entzündung sowie immunologische Mediatoren in der Haut und induziert die Keratinozytendifferenzierung. In vivo wird Tacalcitol in nicht aktive Metaboliten umgewandelt. Der rasche Metabolismus bewirkt geringere systemische calceotrope Effekte als bei Calcitriol [184].

Tab. 3 gibt einen Überblick über die physikochemischen Eigenschaften, Strukturformeln, Indikationsgebiete sowie Fertigpräparate von Calcitriol und seiner Derivate.

Tab. 3: Daten zu den Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol [185, 186].

Name(INN)	Calcitriol	Calcipotriol	Tacalcitol
<b>Synonyme</b>	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol; (5Z, 7E)-9, 10-Seco-cholesta-5, 7, 10(19)-trien-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,25-triol; 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3	(1S,1'E,3R,5Z,7E,20R)-9,10-seco-20-(3'-cyclopropyl-3'-hydroxyprop-1'-enyl)-1,3-dihydroxyprogna-5,7,10(19)-trien; Calcipotrien	1 $\alpha$ ,24(R)-Dihydroxycholecalciferol; 1 $\alpha$ ,24R-Dihydroxyvitamin D3
<b>Molekulare Masse</b>	416,63 g/mol	412,60 g/mol	416,63 g/mol
<b>Aussehen</b>	geruchloses, weißes kristallines Pulver	weiße kristalline Substanz	weiße kristalline Substanz
<b>Löslichkeit</b>	<i>löslich:</i> fette Öle, DMSO <i>wenig löslich:</i> Methanol, Ethanol, Ethylacetat, THF <i>praktisch unlöslich:</i> H <sub>2</sub> O	<i>leicht löslich:</i> Ethanol, <i>löslich:</i> DMF, DMSO <i>schwer löslich:</i> Dichlormethan <i>praktisch unlöslich:</i> H <sub>2</sub> O	<i>sehr leicht löslich:</i> Methanol, Ethanol <i>löslich:</i> Chloroform, Ether, DMSO <i>sehr schwer löslich:</i> Hexan, H <sub>2</sub> O
<b>Strukturformel</b>			
<b>Lagerung</b>	luft-und lichtgeschützt	luft-und lichtgeschützt	luft-und lichtgeschützt
<b>Indikationsgebiete</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zur topischen Behandlung von leichter bis mittelschwerer Psoriasis</li> <li>Renale Osteodystrophie</li> <li>Unterfunktion der Nebenschilddrüse</li> <li>Pseudohypoparathyreoidismus</li> <li>Hypophosphatämische Rachitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zur topischen Behandlung von leichter bis mittelschwerer Psoriasis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zur topischen Behandlung von leichter bis mittelschwerer Psoriasis</li> </ul>
<b>Fertigarzneimittel</b>	Silkis (3 µg/g) Salbe Rocaltrol 0,25 µg/0,5 µg (Kapseln) Decostriol 0,25 µg/0,5 µg (Kapseln) Renatriol 0,25 µg/0,5 µg (Kapseln) Calcijex 1 µg/2 µg (Ampullen) Calcijex 2 µg (Ampullen)	Daivonex (50 µg/g) Psorcutan (50 µg/g) als Salbe/Creme/Lotion/Lösung	Curatoderm (4 µg/g) Bonalfa (2 µg/g) Apsor (4 µg/g) Ticlapsor (4 µg/g) Vellutan (4 µg/g) als Salbe/Creme/Lotion/Lösung

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zellmaterial

Ausgangspunkt für die Gewinnung primärer Keratinozyten waren juvenile Spendervorhäute. Das juvenile Vorhautgewebe wurde aus Zirkumzisionen generiert. Das Spenderalter lag zwischen 1 bis 8 Jahren. Aus dem epidermalen Vorhautgewebe erfolgte die Isolierung von Keratinozyten (siehe Kapitel 3.2.1). Durch die anschließende Kultivierung (siehe Kapitel 3.2.2) wurden nicht proliferations- und adhärenzfähige Keratinozyten höherer Differenzierungsstufen eliminiert.

#### 3.1.2 Medien, Supplements

Keratinocyte-SFM (1X)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Keratinocyte-SFM Supplement Human recombinant Epidermal Growth Factor (EGF 1-53; 0,1-0,2 µg/ml) and Bovine Pituitary Extract (BPE; 25 µg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic (100X), liquid 10.000 IE Penicillin G, 10.000 µg Streptomycin, 25 µg Amphotericin B /ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (1X), liquid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### 3.1.3 Enzyme und andere Biotechprodukte

Trypsin, 0.05 % (1X) with EDTA 4Na, liquid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin, 0.5 % (10x) with EDTA 4Na, liquid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNAse	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gentamycin 10 mg/ml, lyophilisiert (mit 5 ml sterilem Aqua purificata rekonst.)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dispase® II (neutral protease, grade II)	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Collagen Type IV from human placenta	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kollagenase I	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 3.1.4 Fertiglösungen

Coulter Clenz	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Szintillator (4 g 2,5-Diphenyloxazole; 0,1 g 1,4-bis 2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzen auf 1 L Toluol)	Ultima Gold Cammberra Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Soluene 350	Packard Bioscience Company, Groningen, Niederlande
[6- <sup>3</sup> H] Thymidin 60,3 Ci/mol	American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, USA
Hionic-Fluor	Packard Bioscience Company, Groningen, Niederlande
ISOTON II	Beckmancoulter GmbH, Krefeld, Deutschland
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
GBX developer/replenisher P7042	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
GBX fixer/replenisher P7167	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

### 3.1.5 Chemikalien

Ethanol 96 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat-Dinatrium, EDTA – Na <sub>2</sub>	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure) HEPES	Calbiochem-Novabiochem, Darmstadt Deutschland
Natriumhydroxid, NaOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	Calbiochem-Novabiochem, Darmstadt Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Annexin V FLUOS	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Molecular Weight Marker (M.W. 30.000-200.000)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-desoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100, Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether,	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumdodecylsulfat, SDS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tricin, 2-[[1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Polyacryamid (30%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Glücksklee Nestlé, Frankfurt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tri-Na-citrat-dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentianaviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Calcitriol	Intendis Dermatologie GmbH, Berlin, Deutschland
Calcipotriol	Intendis Dermatologie GmbH, Berlin, Deutschland
Tacalcitol	Intendis Dermatologie GmbH, Berlin, Deutschland

### 3.1.6 Lösungen und Puffer

Die Lösungen wurden nach Herstellung bei 2 bis 8 °C bzw. -20 °C aufbewahrt.

Gentamycin-Gebrauchslösung (G-GL)	1 mg/ml (Aqua purificata)
Gentamycin-Transportlösung/Dispaselösung	25 µl G-GL ad 5 ml SFM
Gentamycin-Waschlösung	100 µl G-GL ad 5 ml HBSS
PUCK-EDTA	0,4 g KCl 8,0 g NaCl 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> 1,0 g D-Glucose 0,25 g EDTA – Dinatrium 0,005 g Phenolrot zu 1000.0 ml Aqua purificata (steril)
Tyrode-Eosin-Lösung	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g CaCl <sub>2</sub> 0,1 g MgCl <sub>2</sub> 0,05 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,0 g NaHCO <sub>3</sub> 1,0 g Glucose 0,625 g Eosin zu 1000.0 ml Aqua purificata (steril)
Kollagen-IV-Stammlösung	2,5 ml 20 mM Essigsäure auf 5 mg Kollagen IV
Kollagen-IV-Gebrauchslösung (Beschichtung)	25 µl Kollagen-IV-Stammlösung auf 1 ml PBS-ABC
Phosphate buffered solution PBS (pH 7,4)	16,0 g NaCl 0,4 g KCl 2,88 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> zu 2000 ml Aqua purificata; auf pH 7,4 einstellen mit NaHCO <sub>3</sub>
PBS-B	PBS mit 2 % FKS bzw. mit 1 % BSA
PBS-ABC	PBS mit 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub>
PBS-S	PBS-B + 0,2 % Saponin (zur Permeabilisierung) PBS-B + 0,1 % Saponin (während AK-Inkubation, Waschschrte)

Kollagenase-I-Trypsin-Mischung 1:1 0,1 %	20 ml 100 mg 80 ml	Trypsin 0,5 % Kollagenase I PBS
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung 2 %	0,5g PFA in 25 ml PBS (ca.1 hin Wasserbad bei 58 °C)	
Inkubationspuffer für Annexin-V-Messung	10 mM 140 mM 5 mM mit NaOH auf pH 7,4	HEPES NaCl CaCl <sub>2</sub>
Propidiumiodid (PI)-Lösung (50µg/ml)	5 mg PI in 100 ml PBS	
Propidiumiodid (PI)-Lösung (100µg/ml)	10 mg PI in 100 ml PBS	
HEPES Puffer	16,364 g 0,806 g 0,222 g 0,19 g 4,766 g 3,604 g	NaCl KCl CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub> Hepes D-Glucose zu 2000 ml Aqua purificata
Zitronensäure/Tween20-Lösung	2,1 g 0,5 g	Zitronensäure Tween 20 zu 100 ml Aqua purificata
0,5% Tween 20/PBS	1,0 g	Tween 20 zu 200 ml Aqua purificata
RNase-Lösung	1 mg RNase/1 ml PBS	
Ethanol 70 V/V	665 g 335 g	Ethanol 96 % Aqua purificata
RIPA-Puffer	20 mM 0,3 M 1,0 % 1,0 % 0,1 %	TRIS pH 7,4 NaCl Na-desoxycholat Triton X-100 SDS
Protein-Probenpuffer	4 % 125 mM 23,25 % 0,01 %	SDS TRIS pH 6,8 Glycerol Bromphenolblau
Anodenpuffer 10x	2 M	Tris Base pH 8,9

Kathodenpuffer 5x	0,5 M	Tris Base
	0,5 M	Tricin
	0,5 %	SDS
Gelpuffer	3 M	Tris Base
	0,3 %	SDS
Trenngel	8 ml	Polyacryamid (30%)
	1 ml	Aqua purificata
	150 µl	Ammoniumpersulfat (APS)
	20 µl	Tetramethyldiamin (TEMED)
Sammelgel	2,6 ml	Polyacryamid (30%)
	5,0 ml	Gelpuffer
	12,4 ml	Aqua purificata
	150 µl	Ammoniumpersulfat (APS)
	20 µl	Tetramethyldiamin (TEMED)
Waschpuffer	200 ml	PBS
	0,1 %	Tween
		zu 2000 ml Aqua purificata
Blockpuffer	5 g	Milchpulver
	100 ml	Waschpuffer
Blotpuffer	50 mM	TRIS-Salz
	40 mM	Glycin
	3,7 %	SDS
	20 %	Methanol
Stripp-Puffer	2 %	SDS
	62,5 mM	TRIS-Salz
	100 mM	Mercaptoethanol
Gentianaviolettlösung	0,1 % in Ethanol/Wasser 1:50	
Natriumcitratlösung	29,41 g	Tri-Na-citrat-dihydrat
	500 ml	Ethanol, absolut
	500 ml	Aqua purificata
Calcitriol-Stammlösung (-20 °C, Lichtschutz!)	10 mM in DMSO	
Calcipotriol-Stammlösung (-20 °C, Lichtschutz!)	10 mM in DMSO	
Tacalcitol-Stammlösung (-20 °C, Lichtschutz!)	10 mM in DMSO	

### 3.1.7 Antikörper

#### *Durchflusszytometrie*

Anti human Integrin beta 1 antibody, mouse-IgG1	Abcam, Art.-Nr. ab 3167; 200 µg/ml
Isotype control, mouse-IgG1	DAKO, Art.-Nr. X 0931; 100 µg/ml
Anti Mouse IgG (H+L), FITC (goat)	CALTAG, Art.-Nr. M35001; 700 µg/ml
Anti Human Integrin beta 1 FITC mouse-IgG1	Abcam, Art.-Nr. ab 217; 100µg/ml
Isotype control FITC, mouse-IgG1	DAKO, Art.-Nr. X 0927; 100 µg/ml
Anti Human monoclonal Cytokeratin 14 antibody [LL002] (FITC) , mouse-IgG3	Abcam, Art.-Nr. ab 9280; 1000 µg/ml
Isotype control FITC, mouse-IgG3	Abcam, Art.-Nr. ab 18391; 500 µg/ml

#### *Westernblot*

Anti Human polyclonal Vitamin D Receptor (goat )	Abcam, Art.-Nr. ab 39990; 0,50 mg/ml
Anti Goat IgG (H+L), Peroxidase labelled (horse)	Vector Laboratories, Art.-Nr. PI-9500; 1 mg
Anti Human monoclonal $\beta$ -Actin (mouse)	Sigma-Aldrich, Art.-Nr., A1978
Anti Mouse IgG, Peroxidase conjugate (sheep)	Sigma-Aldrich, Art.-Nr., A 6782

### 3.1.8 Geräte

Absorptionsreader FluoStar Galaxy	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland
Analysenwaage, Typ MC5-OCE, Beckman Coulter Z2	Satorius AG, Göttingen, Deutschland Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Brutschrank I , Vitromat Typ sbs-11 Brutschrank II, INCO 2	Mytron, Heiligenstadt, Deutschland Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Cell-Harvester	Inotech, Wohlen, Schweiz
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Flüssigkeitsszintillationszähler, WINSPECTRAL 1414	WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland
Wasserbad, Thermostat B3-DC1	Haake, Karlsruhe, Deutschland

---

Laminarbox, HS 12	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop, Olympus CK2-TR	Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
Mikroskopkamera, Olympus SC 35	Olympus Inc., Tokyo, Japan
pH-Meter, Digital pH-Meter pH 525	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage, Typ 870-13	Gottl. Kern & Sohn, Alberstadt, Deutschland
Vortex genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge, Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Hettich Universal 30 F	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer	MLW Rührgerätewerk Medingen, Sitz Freital, Deutschland Typ R3T Variomag Elektronorührer Poly15, Laborbedarf K.J. Werner GmbH, Leipzig, Deutschland
Mikrowelle, Typ M 633,	Samsung electronics GmbH, Steinbach, Deutschland
Owl Panther™ semi dry electroblotter	Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
P9DS Emperor Penguin™ Dual Gel Vertical Electrophoresis System	Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
Hybridisierungsflaschen	Ochs GmbH Glasgerätebau & Laborfachhandel, Bovenden /Lenglern, Deutschland
Expositionskassette	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Rollenmischgerät RM5	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Netzgerät E831	Consort nv, Turnhout, Belgien
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin M	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland

### 3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Combitips, versch. Größen	Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland
Kulturschalen	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kulturplatten	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland
Szintillationsmeßgefäße	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Glasfiberfilter, Typ G-7	INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
Sterilfilter, Sartorius Minisart (600kPa max, 0,22 µm)	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich
Zellsieb, 100 µm	Becton Dickinson, NJ, USA
Gel Blotting Paper GB003	Schleicher & Schnell BioScience, Dassel, Deutschland
PARAFILM® M	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Millipore Immobilon P (PVDF-Membran)	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Saran-wrap (Folie)	The Dow Chemical Company, Midland, MI, USA
Kodak BioMax Light Film (Light 1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung nativer humaner Keratinozyten aus juveniler Vorhaut

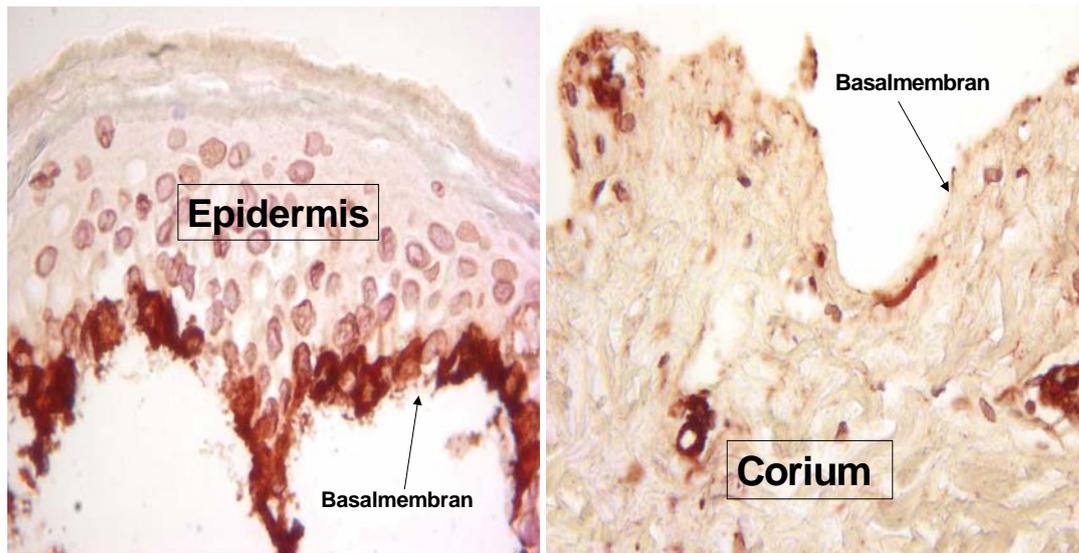
Wie in Kapitel 2.1.1 dargestellt, bilden die interfollikulären epidermalen Stammzellen und deren transient amplifizierende Tochterzellen, auf der Basalmembran haftend, die Grenzschicht zwischen Epidermis und Corium. Voraussetzung für eine erfolgreiche und effektive Gewinnung dieser proliferativen Basalzellen war also eine sanfte und sichere Methode für die Abtrennung des Coriums von der Epidermis. Durch die Dispase-Behandlung erfolgt der Abbau der Basalmembrankomponenten Kollagen IV und Fibronectin. Dadurch wird eine Abtrennung des Coriums unterhalb der Basalschicht möglich [187]. Die Zellen der Basalschicht bleiben bei dieser Trennung als äußerste Zellschicht an der Epidermis haften und lassen sich somit durch die anschließende Trypsinierung aus dem Gewebeverband leicht herauslösen.

#### *Durchführung*

Juvenile Spendervorhäute wurden in 0,5-cm-große Stücke zerkleinert und in einer Dispaselösung (2 mg/ml in HBSS gelöst mit 25 µg Gentamycin) für 18 h im Kühlschrank inkubiert. Danach ließ sich die Epidermis vom Corium durch einfaches Ziehen leicht abtrennen.

Die nachfolgende Abb. 3 zeigt das Ergebnis der Dispase-Behandlung. Die beiden separierten Hautschichten, Epidermis und Corium, wurden immunhistochemisch mit dem Basalschicht-Marker  $\beta$ 1-Integrin gefärbt. Es wird ersichtlich, dass die Zellen der Basalschicht nahezu vollständig an der Epidermis haften. Somit ist diese enzymatische Methode für die Generierung von Basalzellen aus Epidermisgewebe geeignet.

Im Anschluss erfolgte eine Behandlung der zerkleinerten Epidermis mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA, um die Zellen aus dem Verband herauszulösen. Die gewonnene Zellsuspension wurde durch ein 100 µm Zellsieb gegeben, um Restgewebe abzutrennen. Danach wurden die Zellen in serumfreiem Medium (SFM) aufgenommen und bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Medium wurde abgegossen und die Trypsinreste damit entfernt.



**Abb. 3:** Immunhistochemische  $\beta$ 1-Integrin-Färbung an juveniler Vorhaut nach Dispasebehandlung.

### 3.2.2 Kultivierung basaler nativer humaner Keratinozyten

Basierend auf der Arbeit von Rheinwald und Green [44] nutzen viele Forschungsgruppen die Feederlayertechnik zur Kultivierung der primären nativen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) [16][20][47][188]. Die Kokultivierung der NHEK mit einer Feederzellschicht aus postmitotischen Fibroblasten in konditioniertem serumhaltigen Medium hat vor allem den Vorteil eines sehr guten Zellwachstums der Primärkultur und verzögert zugleich die Differenzierung [189]. Dennoch kann das Vorhandensein der Feederzellen und des Serums eine große Beeinträchtigung darstellen: Metabolische Vorgänge von Fibroblasten sowie unbekanntem Serumbestandteilen können die metabolischen Aktivitäten der NHEK maskieren oder die Effekte applizierter Substanzen behindern bzw. modifizieren [190]. Aus diesen Gründen wurde eine serumfreie Kultivierung ohne Feederzellen bevorzugt, da in dieser Arbeit die Untersuchung von Wirkungseffekten im Vordergrund stand. Durch Einsatz eines serumfreien Keratinozytenproliferationsmediums konnte eine Kultivierung unter kontrollierten Bedingungen erfolgen. Um differenzierende Einflüsse zu minimieren, wurden für die Versuche nur NHEK der ersten Passage eingesetzt. Durch den Einsatz des serumfreien Keratinozytenproliferationsmediums wurde die Zelldifferenzierung ebenfalls reduziert [191].

#### *Durchführung*

Die Kultivierung erfolgte in 250-ml-Kulturflaschen mit einer Aussaatmenge von  $3 \times 10^6$  vitaler frisch-isolierter Keratinozyten (siehe Kapitel 3.2.1) in 20 ml serumfreiem Medium (Keratinozyten-SFM). Die in diesem Medium enthaltenen Supplemente wie Spurenelemente,

Ethanolamin, Phosphethanolamin, Trijodthyronin, Hydrokortison und der nachfolgende Zusatz von epidermalem Wachstumsfaktor (0,2 ng/ml) und Rinderhypophysenextrakt (25µg/ml) machte eine Kultivierung ohne Feederlayer möglich [191]. Bei klimatischen Bedingungen von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % im Brutschrank wurden die Zellen unter regelmäßigem Mediumwechsel (alle 3 Tage) bis zu einer Konfluenz von max. 70 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zur Vorratshaltung im Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei -160 °C kryokonserviert. Diese vorkultivierte Keratinozytenpopulation war Ausgangspunkt für die Anreicherung von epidermalen Stammzellen.

### 3.2.3 Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen Typ IV

Die Anreicherung von epidermalen Stammzellen durch Adhäsion an das basale Matrixprotein Kollagen IV erfolgte in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm. Dazu wurden diese zunächst mit Kollagen IV wie folgt beschichtet.

#### *Durchführung*

Von einem sterilen Kollagen-IV-Puder aus humaner Plazenta wurde mit 20 mM Essigsäure eine Stammlösung (2,5 mg Kollagen IV/ml) hergestellt. Diese war bei 2 bis 8 °C bis zu vier Wochen haltbar. Kurz vor Gebrauch wurde diese mit PBS-ABC 1:50 verdünnt und damit der Boden der 60-mm-Kulturschalen vollständig bedeckt. Für eine maximale Zelladhäsion wird ein Konzentrationsbereich von 50-100 µg/ml Kollagen IV angegeben [192]. Pro Schale wurde dabei 1 ml einer 50 µg/ml Kollagen-IV-Lösung aufgetragen. Nach dem Verschließen der Kulturschalen mit Parafilm erfolgte die Inkubation über Nacht bei 2 bis 8 °C. Anschließend wurde die restliche Lösung abgesaugt und die Schalen mit je 2 ml 10 % fötalem Kälberserum (FKS) in PBS 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken und so zu vermeiden, dass Inhaltsstoffe des Keratinozyten-Mediums durch das Kollagen IV gebunden werden. Danach wurde das überschüssige FKS mit 2 ml PBS abgespült. Diese beschichteten Schalen wurden entweder sofort zur Zellauftrennung weiter verwendet oder zur Vorratshaltung eine Woche bei 2 bis 8 °C bzw. bis zu vier Wochen bei -80 °C gelagert.

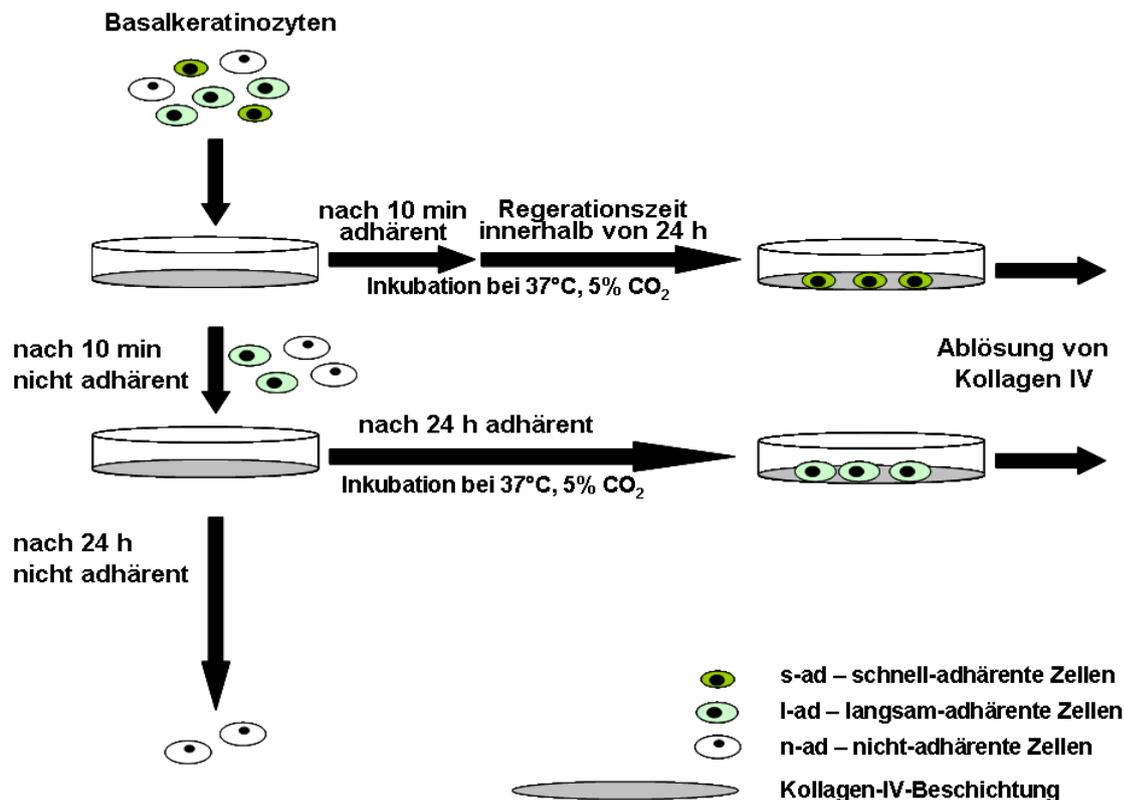
### 3.2.4 Methode der Kollagen-IV-Adhäsion

Die Anreicherung von epidermalen Stammzellen beruht auf schneller Bindung an Kollagen IV. Determinierte Tochterzellen adhäreren langsamer [16] und können dadurch separiert werden. Avitale und nicht adhärenzfähige Zellen bilden eine dritte Zellpopulation. Diese Zellen waren auch nach einer Zeit > 24 h nicht in der Lage, zu adhäreren (in Vorversuchen getestet).

Ergebnis dieser Methode sind drei Zellfraktionen:

**Tab. 4:** Zellfraktionen der Kollagen-IV-Isolierung, adaptiert von Kim et al. [24]

<i>Fraktion</i>	<i>Adhärenz an Kollagen IV</i>	<i>Zelltyp</i>
schnell-adhären (s-ad)	innerhalb von 10 min	epidermale Stammzellen
langsam-adhären (l-ad)	innerhalb von 24 h	transient amplifizierende Zellen
nicht-adhären (n-ad)	keine	postmitotische Zellen



**Abb. 4:** Kollagen-IV-Isolierung zur Separation epidermaler Stammzellen als schnell-adhärenente Zellen (s-ad), transient amplifizierender Tochterzellen als langsam-adhärenente Zellen (l-ad) und postmitotischer Zellen als nicht-adhärenente Zellen (n-ad)

#### Durchführung

Für die Auftrennung wurden kryokonservierte Zellen der ersten Passage verwendet. Nach dem Auftauen wurde mit SFM eine Zellsuspension von  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ml hergestellt. Für die Isolierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kollagen-IV-beschichtete Kulturschale aufgegeben und im Brutschrank für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die nach 10 min nicht adhärenenten Zellen mit SFM abgespült und auf ein neues Kollagen-IV-beschichtetes Kulturgefäß überführt. Die nach 10 min anhaftenden Zellen (schnell-adhärenent) wurden mit 5 ml SFM gefüttert und zusammen mit den nach 10 min noch nicht adhärenenten Zellen (langsam-adhärenent und nicht-adhärenent) 24 h im Brutschrank belassen. Dabei bewirkte diese Regenerationszeit von 24 h eine größere Zell-Stabilität gegenüber der anschließenden enzymatischen Ablösung von Kollagen IV und führte so zu einer hohen Anzahl vitaler Zellen.

Nach 24 h wurden zunächst die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrmaliges Spülen mit PBS von der Fraktion der langsam-adhärenenten Zellen abgetrennt. Diese Zellen konnten auch nach einem Zeitraum von > 24 h nicht adhären. Die beiden anhaftenden Zellpopulationen, schnell- und langsam-adhärenent, wurden mit PBS abgespült und vom Kollagen IV abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml einer 0,1 %igen Trypsin/EDTA-Collagenase-I-Lösung (1:1) inkubiert. Der Collagenase-Anteil dieses Enzym-Gemischs ermöglicht durch den Abbau des Kollagens IV eine effektivere Trennung der Zellen von Kollagen IV. Der unspezifische Protein-Abbau durch Trypsin unterstützt die Ablösung der Zellen und verkürzt so die Ablösedauer. Die Zellschädigung beim Abtrennen konnte dadurch minimiert werden. Nach max. 5 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank konnte die Aktivität der Enzymlösung mit 10 % FKS in PBS blockiert werden. Die nach der Ernte erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei 1500 U/min zentrifugiert und danach mit SFM gewaschen, um Reste der Enzymlösung zu entfernen. Anschließend konnten schnell-adhärenente und langsam-adhärenente Zellen für die Versuche präpariert bzw. in Kulturgefäße ausgesät werden.

Jede verwendete Zellcharge wurde vor ihrer Nutzung auf Fibroblasten getestet. Dazu wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen pro kryokonservierte Zell-Charge mit Kollagen IV aufgetrennt. Nach 24 h hatten die Zellen ihre typische Morphologie und wurden visuell unter dem Mikroskop kontrolliert. Dabei konnte auch gleichzeitig das Mengenverhältnis von schnell-adhärenenten und langsam-adhärenenten Zellen der jeweiligen Charge abgeschätzt werden, da es durch unterschiedliche Proliferationskapazität sowie Vitalität der Spenderzellen einer natürlichen Schwankungsbreite unterliegt.

Die Alterung der Zellen wurde eingeschränkt, indem für die Untersuchungen nur NHEK der ersten Passage verwendet wurden.

### **3.2.5 Zelleinsaat und Konfluenzgrad**

Da durch die Kollagen-IV-Isolierung nicht proliferationsfähige NHEK (entspricht nicht-adhärenenter Fraktion) diskriminiert wurden, konnte die Zelleinsaat für die schnell-adhärenente und langsam-adhärenente Zellfraktion reduziert werden.

Tab. 5 auf der nächsten Seite zeigt die genutzten Kulturgefäße und die entsprechenden Einsaatmengen von fraktionierten und unfraktionierten NHEK.

Tab. 5: Zelleinsaat

Kulturgefäß	Zellzahl-unfraktioniert	Zellzahl – fraktioniert (KIV)	Medium-Menge
48 MTP	10.000 Zellen	<b>7.000 Zellen</b>	0,5 ml
24 MTP	25.000 Zellen	<b>10.000 Zellen</b>	1,0 ml
60-mm-Kulturschalen	300.000 Zellen	<b>75.000 Zellen</b>	5,0 ml
250-ml-Kulturflaschen	1000.000 Zellen	<b>175.000 Zellen</b>	15,0 ml

In vitro sind sowohl die Proliferationsaktivität als auch der Differenzierungsprozess vom Konfluenzgrad der Zellen abhängig [193]. Das bedeutet, mit wachsendem Konfluenzgrad sinkt die proliferative Aktivität bzw. beginnt der Differenzierungsprozess. Da sich epidermale Stammzellen und transient amplifizierende Tochterzellen hauptsächlich in Reifegrad und Proliferationsverhalten unterscheiden [16][43], wurde bei den Versuchen darauf geachtet, dass die Zellen bei Versuchsende max. eine Konfluenz von 70-80 % erreichten. Auch der antiproliferative Effekt von Calcitriol, Calcipotriol sowie Tacalcitol ist vom Konfluenzgrad abhängig [148]. Die Wirkstoffexposition erfolgte deshalb stets bei niedrigen Zelldichten von etwa 30-40 %.

### 3.2.6 Zellzahlbestimmung

Für die Zelleinsaat erfolgte die Ermittlung der Lebendzellzahl, da sich die Einsaatmenge natürlich nur auf die vitalen Zellen bezieht. Die Zellzählung wurde mikroskopisch nach dem Anfärben membrangeschädigter avitaler Zellen durch Eosin (Plasmafarbstoff) durchgeführt. Dazu wurde physiologische Tyrode-Eosin-Lösung genutzt. Unter Verwendung einer geeichten Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-Kammer) und unter Berücksichtigung eines definierten Verdünnungsfaktors (abhängig von Zählkammer; hier Verdünnungsfaktor 5) wurde die Konzentration vitaler sowie avitaler NHEK ermittelt. Für durchflusszytometrische Experimente und Westernblotmessungen wurde die Gesamtzahl der Zellen (vital + avital) mittels Coulter Counter ermittelt.

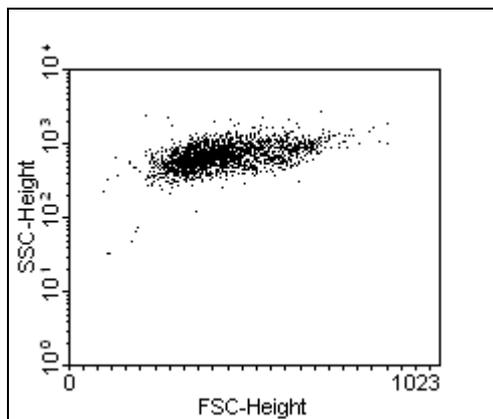
### 3.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Analyse von Oberflächenantigenen, intrazellulären Strukturen, DNA-Gehalt und zur Untersuchung von Efflux-Eigenschaften der beiden untersuchten Zellpopulationen genutzt.

Für die Messung der entsprechend präparierten Zellsuspensionen wurde das Durchflusszytometer FACScan der Firma Becton Dickinson mit der Software CELLQuest™ verwendet. Die Detektion der Fluoreszenzen erfolgte im Fluoreszenzkanal 1 mit einem Bandpassfilter (BP430/30) und in Fluoreszenzkanal 3 mit einem Langpassfilter (LP650). Die Auswertung der Rohdaten unter Windows erfolgte mit Hilfe von WinMDI 2.8.

### 3.2.7.1 Prinzip

Voraussetzung für die durchflusszytometrische Messung ist dabei eine Einzelzellsuspension. Die Zellen werden je nach Präparation mit spezifischen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bzw. mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach der Anregung durch den Laserstrahl emittieren die Zellen Licht, das proportional zur Menge ihrer gebundenen Antikörper bzw. zum zellassoziierten Farbstoff ist. Zur Bestimmung und Korrektur nicht-spezifischer Bindungen der eingesetzten Primär-Antikörper werden geeignete Isotypkontrollen derselben Immunglobulinklasse in gleicher Antikörperkonzentration bzw. nicht-markierte Zellen verwendet. Für die Datenanalyse wird die Differenz zwischen den Fluoreszenz-Mittelwerten der Isotypkontrolle und der antikörpermarkierten Probe berechnet (d-MFI). Weitere Zusatzparameter sind Seitwärts- und Vorwärtssreuung des Laserlichts (SSC und FSC). Sie lassen eine Aussage zur Zellgranularität und Zellgröße zu. Diese Parameter werden zur Diskriminierung von distinkten Zellpopulationen und Zellfragmenten genutzt (Abb. 5).



**Abb. 5: Dotplot der Streulichtparameter Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsscatter (FSC).**

*Definition distinkter Zellpopulationen; Durchflusszytometrie*

### 3.2.7.2 Herstellung einer Einzelzell-Suspension

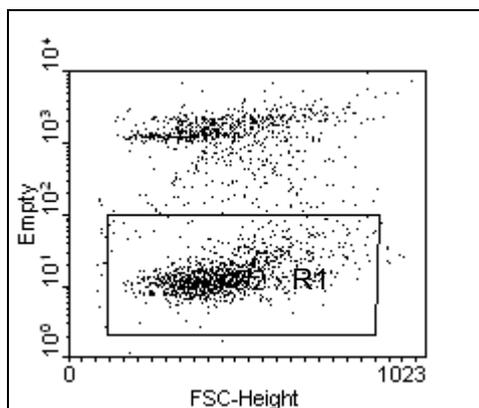
Für die einzelnen Untersuchungen mussten zunächst die adhärent wachsenden, nativen Keratinozyten abgeerntet werden. Dies erfolgte durch einen kurzen enzymatischen Andau der Zell-Zellkontakte mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA bzw. speziell bei der Ablösung von Kollagen IV mit einem 0,1 % Kollagenase-I/0,1 % Trypsin-Gemisch bei 37 °C (siehe Kapitel

3.2.4). Besonders bei der Bestimmung von Oberflächenantigenen wurde auf eine sehr kurze Inkubationszeit (<5 min) mit den Enzymen geachtet, um eine Zerstörung dieser Oberflächen-Strukturen zu verhindern. Nach dem Block der enzymatischen Aktivität durch 10 % FKS in PBS wurde mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellzähler (Coulter Counter) gezählt und mit PBS-B eine Zelldichte von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt. Davon wurden jeweils 0,5 ml Zellsuspension in Falcon-Tubes pipettiert und 2 min mit 1300 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert, ca. 100  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit wurden belassen und das Zellpellet gut aufgeklopft. Für jede Probe wurden mindestens 10.000 Zellen vermessen.

### 3.2.7.3 Nachweis von $\beta 1$ -Integrin

Der Zellsuspension wurden 10  $\mu\text{l}$  Anti-Integrin beta 1 FITC-konjugiert (ab 217, abcam) bzw. 10  $\mu\text{l}$  Isotyp FITC-konjugiert (X0927, DAKO) hinzugefügt (AK-Mengen laut Herstellerangaben), gevortext und 20 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS-B wurden die Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und innerhalb 1 h unter Lichtausschluss mittels Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) vermessen.

Bei der durchflusszytometrischen Messung von Oberflächenantigenen erfolgte gleichzeitig eine Färbung mit dem DNS-Interkalator Propidiumiodid (PI), um avitale Zellen diskriminieren zu können und damit unspezifische, intrazelluläre Bindungen des Antikörpers von der Auswertung auszuschließen. Dazu wurden nach dem Auswaschen des jeweiligen Antikörperüberschusses, 10  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) PI-Lösung/Probe hinzugegeben und nach 10 min Inkubation zum Vermessen mit PBS aufgefüllt.



**Abb. 6: Dotplot aus Vorwärtsstreulicht (FSC-Height) und Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid im Fluoreszenzkanal 3 (Empty).**

*Definition einer Region vitaler, Propidiumiodid-negativer Zellen (= R1); Durchflusszytometrie*

### 3.2.7.4 Nachweis von Zytokeratin 14

Zur durchflusszytometrischen Messung intrazellulärer Strukturen erfolgte zunächst eine Fixierung der Zellen mit 0,2 ml 2 % PFA/Probe für 15 min bei 2 bis 8 °C. Durch Zugabe von 2 ml 0,2 % PBS-S/Probe und Vortexen konnten die Zellmembranen sanft permeabilisiert werden. Anschließend wurden die Zellen 2x in 2 ml 0,1 % PBS-S gewaschen. Danach wurde der Überstand dekantiert, ca. 100 µl Flüssigkeit wurden im Falcon belassen und das Zellpellet gut aufgeklopft.

Für die Anfärbung des intrazellulären Zytokeratin 14 wurden je Probe 20 µl 1:10 vorverdünnter Anti-Cytokeratin 14-FITC (ab 9280) (2 µl Antikörper + 18 µl 0,1 % PBS-S) bzw. 20 µl Isotyp (ab18391) zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation von 30 min bei RT unter Lichtausschluss. Anschließend wurde mit 2 ml 0,1 % PBS-S gewaschen und zur Messung in 0,5 ml PBS resuspendiert.

Die Berechnung der spezifischen Antikörperbindung erfolgt wie in Kapitel 3.2.7.3

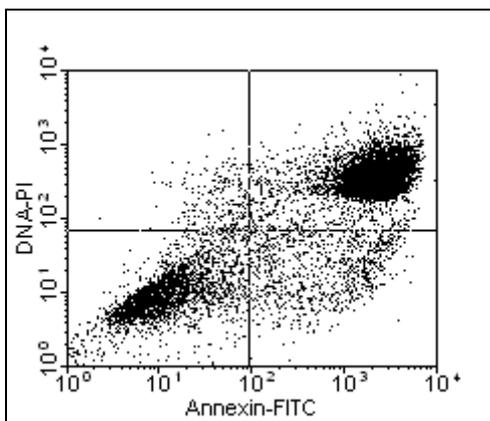
### 3.2.7.5 Apoptose-Test

Während die Nekrose von Zellen zu Entzündungsreaktionen führt, stellt die Apoptose die physiologische Form des Zelltods dar. Im Frühstadium der Apoptose bleibt die Zellmembran zwar noch intakt, jedoch die Phospholipidverteilung ändert sich. Phosphatidylserin (PS), das sich auf der Innenseite der Plasmamembran befindet, wird an die Zelloberfläche transportiert und lässt sich dort mittels Annexin V ( $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein) nachweisen. Durch Zweiparameter-Messung mit FITC-konjugiertem Annexin V und dem rot fluoreszierenden DNA-Interkalator Propidiumiodid (PI) kann zwischen vitalen, apoptotischen und zellmembrangeschädigten (nekrotischen) Zellen unterschieden werden. Die Methode wurde für die Charakterisierung der drei Zellfraktionen, schnell-, langsam- und nicht-adhärenz, und für die vergleichenden Untersuchungen zur Toxizität von Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol bei schnell-adhärenz und langsam-adhärenz Zellen genutzt. Die drei Zellfraktionen aus der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode wurden wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben isoliert.

Für die Versuche zur Toxizität der Vitamin-D3-Analoga wurden schnell-adhärenz und langsam-adhärenz Zellen in 60-mm-Kulturschalen eingesät und bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert. Die Zellen wurden mit Calcipotriol, Calcitriol und Tacalcitol (0 nM; 1 nM; 100 nM; 10.000 nM) versetzt, für 12 h, 24 h und 48 h inkubiert und anschließend für die weitere Präparation abgeerntet.

### Durchführung

Zunächst wurde der Überstand vollständig von den Zellen abgenommen und bei 1300 U/min 3 min zentrifugiert, um die darin enthaltenen Zellen zu gewinnen. Anschließend erfolgte die Trypsinierung der adhären wachsenden Zellen. Diese Zellen wurden zusammen mit den Zellen des Überstandes in 2 ml PBS suspendiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspendierung in Inkubationspuffer. Nach der Zellzahlbestimmung mittels Beckman Coulter Z2 (Zellzähler) wurden die jeweiligen Zellsuspensionen auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml mit Inkubationspuffer verdünnt. Je  $1 \times 10^5$  Zellen wurden dann mit je 5  $\mu$ l Annexin V und 10  $\mu$ l Propidiumiodid (50 $\mu$ g/ml) versetzt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Zur Vermessung der Proben wurde mit 400  $\mu$ l Inkubationspuffer/Probe aufgefüllt und bis zur durchflusszytometrischen Zweiparameter-Messung unter Lichtausschluss aufbewahrt. Abb. 7 zeigt beispielhaft die Annexin- und PI-Signale der vermessenen Zellpopulation in einem Dotplot mit logarithmischen Achsen. Die Auswertung erfolgte mittels Quadrantenanalyse.



**Abb. 7: Dotplot mit Quadrantenanalyse Annexin V (Annexin-FITC) und Propidiumiodid (DNA-PI).**

*A(-)/PI(-): vitale Zellen*

*A(-)/PI(+): nekrotische Zellen*

*A(+)/PI(-): apoptotische Zellen*

*A(+)/PI(+): spätapoptotisch/nekrotische Zellen*

*Durchflusszytometrie*

### 3.2.7.6 Zellzyklus-Analyse

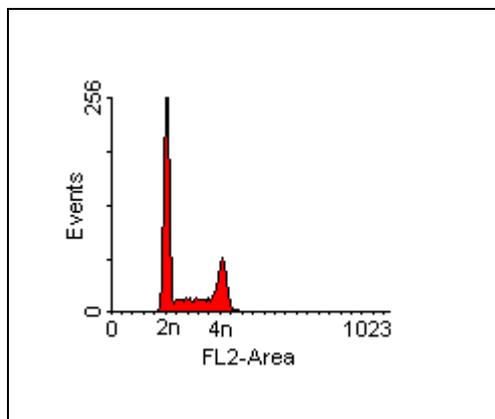
Die Untersuchung beruht auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zelle in den einzelnen Zellzyklusphasen G0/G1, S, G2/M. Sowohl in der G1-Phase (Wachstumsphase) als auch in der G0-Phase (Ruhephase) besitzen die Zellen einen diploiden Chromosomensatz (2n). In der S-Phase (Synthesephase) variiert der DNA-Gehalt zwischen 2n und 4n. Durch die Verdopplung des diploiden Chromosomensatzes bis zur G2 (Postsynthesephase)-Phase, ist diese nicht von der M-Phase (Mitosephase) zu unterscheiden. Mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid lässt sich die DNA anfärben und ihr Gehalt ist dabei proportional der Propidiumiodid-Fluoreszenz.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der beiden Zellfraktionen (schnell-adhären und langsam-adhären Zellen) erfolgte von unbehandelten Zellen als Kontrolle und unter dem Einfluss von Calcitriol, Calcipotriol sowie Tacalcitol. Dazu wurden die Zellen mit der

untoxischen Konzentration von 100 nM Substanz (siehe Kapitel 4.4) für 24 h und 48 h inkubiert und anschließend für die Präparation abgeerntet.

### Durchführung

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von schnell-adhärenenten und langsam-adhärenenten Zellen waren je Probe  $0,5 - 1 \times 10^6$  Zellen für die Messung notwendig. Diese wurden bei 1300 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Zitronensäure/Tween-Lösung resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Überführung des Überstandes in verschraubbare Zentrifugenröhrchen wurden diese 3 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Kern-Pellet aufgeklopft. Unter sanftem Vortexen erfolgte die tropfenweise Zugabe von 2 ml  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  kaltem Ethanol. Nach luftdichtem Verschluss mussten die Proben bis zur weiteren Präparation mindestens 24 h bei 2 bis  $8\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden. Danach wurden die Zellkerne im Ethanol aufgeklopft und wieder in Falcon Tubes überführt. Nach 3-min-Zentrifugieren bei 1500 U/min wurde der Überstand dekantiert, kurz aufgeklopft und 2x mit 2 ml 0,5 % Tween in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,3 ml auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  temperierte RNase-Lösung (1 mg/ml) bei RT. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden 0,3 ml PI-Lösung (100  $\mu\text{g/ml}$ ) dazugegeben und bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  unter Lichtausschluss nochmals 10 min inkubiert. Danach erfolgte die Probenvermessung (Abb. 8).



**Abb. 8: Beispiel-Histogramm des relativen DNA-Gehaltes als FL2-Area (Impuls-Fläche des Fluoreszenzsignals) anhand der Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid.**

*diploider Chromosomensatz = 2n, doppelter diploider Chromosomensatz = 4n; Durchflusszytometrie*

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Modfit LT (Verity Software House Inc).

### 3.2.8 Westernblot

Gegenüber der Durchflusszytometrie bietet diese Methode den Vorteil, nukleäre Proteine besser bestimmen zu können. Während bei der Durchflusszytometrie die komplette Zelle nur permeabilisiert wird, erfolgt beim Westernblot die Bestimmung aus Proteinlysaten. Nach der Denaturierung erfolgt dann die Separierung nach Molekulargewicht durch Gelelektrophorese. Dadurch sind die Proteine, vor allem auch nukleäre, für Antikörper leichter zugänglich.

Aufgrund dieses Vorteils wurde der Vitamin-D-Rezeptor mit Hilfe der Westernblot-Methode nachgewiesen.

#### *Probenmaterial*

Für die Versuche wurden drei verschiedene Zellchargen in schnell-adhärente und langsam-adhärente Zellen aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.4). Zur Entfernung von etwaigen Enzymresten der Ablöseprozedur wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Coulter Counter gezählt und die Zellsuspension auf  $1 \times 10^6$  Zellen /ml eingestellt. Nach Überführung von je 1 ml Zellsuspension in ein Eppendorff-Gefäß wurden diese bei 4000 U/min 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit Pipette vollständig abgesaugt und das Zellpellet ( $1 \times 10^6$  Zellen/Probe) bis zur Präparation bei -80 °C tiefgefroren.

#### *Herstellung der Proteinlysate*

Nach dem raschen Auftauen des Zellpellets erfolgte die Resuspendierung in RIPA-Puffer (100 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen) in einem 1-ml-Eppendorffgefäß. Das Zell-RIPA-Puffer-Gemisch wurde für 15 bis 20 min auf Eis inkubiert und alle 5 min gevortext. Anschließend wurde bei 4 °C 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1-ml-Eppendorffgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin wieder in ein neues 1-ml-Eppendorffgefäß gegeben und 1:1 mit Probenpuffer aufgefüllt und gut gevortext, danach im Wasserbad bei 94 °C 5 bis 10 min erhitzt. Vom gewonnenen Proteinlysat wurden 20 µl abgenommen und der Rest bei -80 °C tiefgefroren.

#### *Proteinmenge/Zellzahl*

Die Bestimmung der Proteinmenge der schnell-adhärenten und langsam-adhärenten Zellen erfolgte mit der Methode nach LOWRY mit dem Protein-Assay-Kit von Sigma Aldrich. Dabei wurde die Proteinmenge der beiden Zellpopulationen für  $1 \times 10^6$  Zellen bestimmt (ca. 160-170 µg/ $1 \times 10^6$  Zellen).

#### *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

In der SDS-Elektrophorese werden Proteine ausschließlich auf der Basis ihrer Molmasse voneinander getrennt. Die Inkubation mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Kompensation der unterschiedlichen Eigenladungen der einzelnen Proteine und zur Denaturierung. Die resultierenden Komplexe zwischen Protein und SDS erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Thiolreagenzien reduzieren die Disulfidbrücken der Proteine und führen so zu langgestreckten

Proteinmolekülen, wodurch die Unterschiede in der Tertiärstruktur der Proteine ausgeglichen werden.

Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel das Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Darin wandern die Proteine schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit drastisch, und nun abhängig von der Größe, verringert.

### *Durchführung*

Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Aufgrund der Molmasse von 48 kDa für den Vitamin-D-Rezeptor wurde ein 12 %iges Trenngel gewählt. Dieses wurde nach kurzem Schwenken Luftblasen-frei zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde direkt über das Trenngel 500 µl 0,1 % SDS gleichmäßig geschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min konnte die SDS-Lösung entfernt, das bereitete Sammelgel vorsichtig bis zum Rand aufgegossen und der Kamm für die Probentaschen eingesetzt werden.

Zwischenzeitlich wurde die Elektrophoresekammer mit dem Anodenpuffer (ca. 500 ml) befüllt und nach der Polymerisationszeit von 30 min konnte das Gel in der Elektrophoresekammer platziert werden. Die innere Kammer wurde dann mit Kathodenpuffer (ca. 400 ml) befüllt und vorsichtig der Kamm entfernt. Anschließend konnten 5 µl Sigmamarker (31,2; 35,8; 56,8; 65,1; 93,1; 115,6; 174,6 kDa) sowie 20 µl der jeweiligen Proben mit einer geeigneten Pipette in die Geltaschen gefüllt werden. Die Trennung erfolgte über Nacht bei 25 mA für 17 h.

**Tab. 6:** Zusammensetzung der Gele

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel 12 %</b>
PAA 30 % (37,5:1)	2,6 ml	8 ml
Gelpuffer	5,0 ml	-
Aqua purificata	12,4 ml	1 ml
APS 10 %	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl

### *Westernblot (semidry – „Sandwich“-Verfahren)*

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe SDS-PAGE) aus einem Trenngel über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine an Nitrocellulose durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden.

Zunächst wurden Kathode und Anode des Elektrobloppers gut mit Blotpuffer benetzt und die PVDF-Membran mit Methanol 3 bis 4 min vorbehandelt. Nach kurzem Abspülen der Membran mit Aqua purificata wurde diese bis zum Blotten einige Minuten in Blotpuffer eingeweicht. Nachdem auf die Kathode drei Schichten Blotpuffer-durchtränktes Gel-Blotting-Papier luftblasenfrei aufgebracht wurde, konnte das Trenngel der SDS-PAGE aufgelegt und die PVDF-Membran ohne Luftblasen auf das Gel aufgelegt werden. Den Abschluss der Blotanordnung bildeten drei Schichten mit Blotpuffer benetztes Gel-Blotting-Papier. Nach Anschluss der Anode erfolgte der Transfer bei 150 mA innerhalb von 2,5 h. Anschließend wurde die Membran kurz mit Waschpuffer abgespült und die Markerbanden nachgezeichnet. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran 1 h bei RT in Blockpuffer unter Schütteln inkubiert. Danach wurde sie innerhalb von 15 min mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Für die Antikörperinkubation wurden entsprechende Mengen des Primär-Antikörpers in 6 ml Blockpuffer verdünnt und die Membran mit dieser Lösung über Nacht (< 18 h) bei 4 °C in einer Hybridierungsflasche inkubiert. Danach wurde 2x 10 min mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) bei RT für 1 h erfolgte. Nach drei Waschschritten erfolgte die Detektion der Enzym-markierten Immunkomplexe. Dazu wurde die Membran nach Entfernung des überschüssigen Waschpuffers auf einer Saran-Folie platziert und das Substrat (ECL+) luftblasenfrei auf die Protein-Membran pipettiert. Nach 1 min Inkubation konnte die überschüssige (ECL+)-Lösung entfernt und die Membran mit einer zweiten Saran-Folie ohne Lufteinschlüsse abgedeckt werden. Die Membran wurde dann sofort in die Expositionskassette eingelegt und nach Auflegen des Films (unter Lichtausschluss) 10 min (Vitamin-D-Rezeptor) inkubiert. Anschließend erfolgte die Filmentwicklung.

#### *Strippen der PVDF-Membran*

Da VDR (48 kDa) und die Ladekontrolle  $\beta$ -Actin (42 kDa) ein ähnliches Molekulargewicht besitzen, mussten VDR und der entsprechende Sekundär-Antikörper von der Membran wieder entfernt werden (Strippen), um Überlagerungen zu vermeiden. Hierzu wurde die Membran mit einem Mercaptoethanol-haltigen Stripp-Puffer ½ h im Wasserbad bei 50 °C inkubiert und dabei alle 10 min geschüttelt. Anschließend wurde 3x mit Waschpuffer gewaschen und nach einer Inkubation von 30 min mit Blockpuffer konnte die Antikörperinkubation beginnen (siehe Westernblot). Jeder Blot wurde nacheinander mit zwei Antikörpern inkubiert (VDR, Housekeeping-Protein Actin).

Tab. 7: Antikörper-Verdünnungen

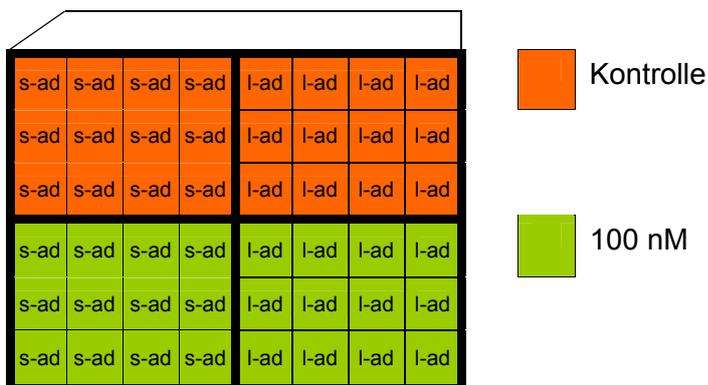
Antikörper	Verdünnung/Konzentration
Primär-Ak Ziege-anti-Human Vitamin-D-Rezeptor (polyklonal)	1:500 (1 µg/ml)
Sekundär-Ak Pferd-anti-Ziege, Peroxidase-konjugiert	1:10.000
Primär-Ak Maus-anti-Human Actin (monoclonal)	1:20.000
Sekundär-Ak Schaf-anti-Maus Peroxidase-konjugiert	1:4.000

### 3.2.9 Vitalfärbung mit Gentianaviolett

Die Diskriminierung zwischen vitalen und avitalen Zellen beruht bei dieser Methode auf der Fähigkeit lebender Zellen, adhärent zu wachsen. Während avitale Zellen im Medium flotieren und sich vom Kulturgefäßboden ablösen, haften vitale Zellen fest am Gefäßboden. Dieser Versuch wurde für die Erstellung von Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen schnell-adhärenent und langsam-adhärenent genutzt. Des Weiteren wurde diese Methode für die Untersuchung zur Toxizität der Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol an den beiden Zellfraktionen genutzt.

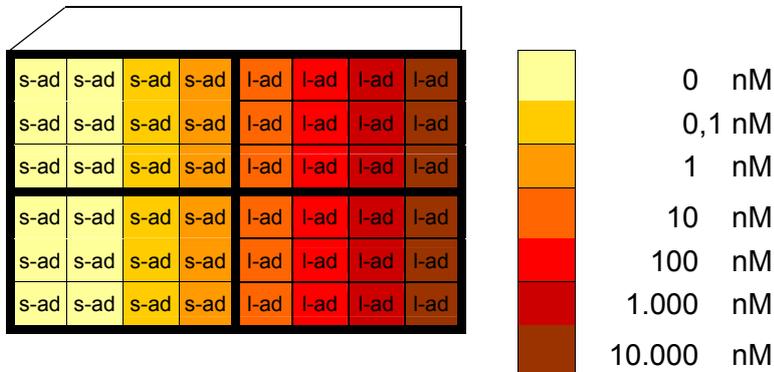
#### Kulturbedingungen

Für die Wachstumskurven wurden in eine 48er MTP je 24 Wells schnell-adhärenente Zellen bzw. langsam-adhärenente Zellen mit 7000 Zellen/Well eingesät. Die Messwertaufzeichnungen erfolgten mit je einer MTP alle 24 h vom zweiten bis zum siebten Kulturtag. Zunächst wurden 24 Einzelwerte je Zellfraktion pro Messung ermittelt. Unter Zugabe von Wirkstoff wurden je 12 Einzelwerte pro Zellfraktion mit und ohne Zugabe von 100 nM der einzelnen Wirkstoffe bestimmt (Abb. 9).



**Abb. 9:** Inkubationsplan 48er Mikrotiterplatte Vitalfärbung zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens unter 100 nM Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol bei schnell- (s-ad) und langsam-adhärenenten (l-ad) Zellen

Zur Untersuchung der Toxizität der drei Wirkstoffe wurden schnell-adhärenente und langsam-adhärenente Zellen in 48er MTPs eingesät. Bei einem Konfluenzgrad von 40-50 % erfolgte die Applikation von Calcipotriol, Calcitriol und Tacalcitol (0 nM; 0,1 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM; 1.000 nM; 10.000 nM) und anschließende Inkubation (12 h; 24 h; 48 h) (Abb. 10).



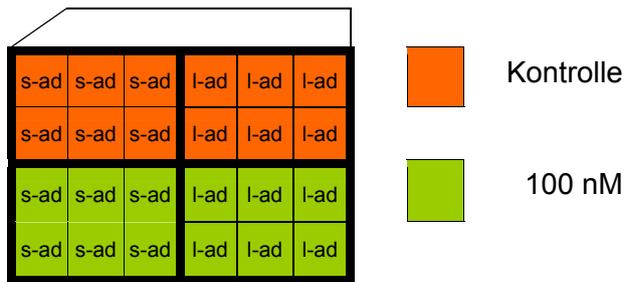
**Abb. 10:** Inkubationsplan 48er Mikrotiterplatte zur Toxizitätsbestimmung Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol bei schnell- (s-ad) und langsam-adhärenenten (l-ad) Zellen

### Durchführung

Zunächst erfolgte die Methanolfixierung der vitalen Zellen mit 400 µl/Well. Avitale, nicht adhärenente Zellen wurden nach 20 min vorsichtig mit Leitungswasser abgespült. Danach konnten die adhärenent wachsenden Zellen innerhalb von 10 min mit 200 µl 0,1%ige ethanolscher Gentianaviolettlösung pro Well angefärbt werden. Nach Entfernung des überschüssigen Farbstoffs erfolgte die Zugabe von 200 µl 0,1 M Natriumcitratlösung pro Well, um eine homogenisierte Farblösung für die Messung zu erhalten. Die Messung der Absorption erfolgte bei 620 nm im Absorptionsreader.

### 3.2.10 [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau

Als DNA-Baustein wird radioaktiv markiertes Thymidin zur Bestimmung der Zellwachstumsrate eingesetzt. Der Einbau von radioaktiv markierten Komplementärbasen dient als Maß für die Proliferation der Zellkultur. Für diesen Versuch wurden in eine 24er MTP je 12 Wells mit je 10.000 schnell-adhärenenten bzw. langsam-adhärenenten Zellen pro Well eingesät. Durch die Bestimmungsgrenze dieser Methode war die Erfassung des [<sup>3</sup>H]-Thymidins erst ab einer Konfluenz von ca. 30 % möglich. Aufgrund dessen erfolgten die Messungen erst ab dem dritten Kulturtag. Die Messungen wurden alle 24 h über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt. Zunächst wurden 12 Einzelwerte je Zellfraktion pro Messung ermittelt. Die Bestimmung erfolgte mit je 6 Einzelwerten pro Zellfraktion unter Zugabe von 100 nM Wirkstoff bzw. ohne Wirkstoff (Abb. 11).



**Abb. 11:** Inkubationsplan 24iger Mikrotiterplatte zur Bestimmung des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus unter 100 nM Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol bei schnell- (s-ad) und langsam-adhärenenten (l-ad) Zellen

Zur Detektion der Proliferation wurden dann je 0,5 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro Well appliziert. Nach 1 h wurden das Medium abgesaugt, die Zellen gespült, trypsiniert und mittels „Cell-Harvester“ geerntet. Die auf Filterblättchen haftenden Zellen wurden in Szintillatortröhrchen überführt und nach 24 h konnte mit Hilfe von Szintillatorlösung ihre Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen werden.

### 3.2.11 Koloniebildungseffizienz

Unter Koloniebildungseffizienz, auch als Colony forming efficiency (CFE) bezeichnet, versteht man die Fähigkeit einzelner Zellen, Zellklone hervorzubringen. Nach Rheinwald und Green [44] ist die Koloniebildungseffizienz die Ratio der Koloniezahl zur eingesäten Zellzahl. Dieser Assay dient der Bestimmung der Proliferationskapazität der einzelnen Zellen. Durch eine sehr geringe, klonogene Zelleinsaat zeigt sich, welcher Prozentsatz der Zellen der eingesetzten Zellpopulation in der Lage ist, zu proliferieren und Kolonien zu bilden. Dabei sind die Anzahl und die Größe der Kolonie maßgeblich für die Beurteilung der Proliferationskapazität.

#### *Kulturbedingungen*

Für die Untersuchungen wurden je 100 schnell-adhärenente bzw. langsam-adhärenente Zellen pro 60-mm-Kulturschale mit 4 ml Medium eingesät. Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage und nach 14 Tagen wurde die Kultivierung beendet und die Kolonien wie folgt angefärbt.

#### *Durchführung*

Zunächst wurde das Medium abgegossen und die vitalen Zellen mit 2 ml Methanol/Schale 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Methanol abgegossen und Reste mit Leitungswasser sanft abgespült und ausgeklopft. Zur Anfärbung der Zellen wurden je 2 ml 0,1%ige ethanolische Gentianaviolettlösung/Schale aufgegeben. Nach 10 min wurde die überschüssige Farblösung vorsichtig, aber gründlich mit Leitungswasser heruntergespült. Im Anschluss wurden die Schalen getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt. Zur Auswertung wurden die Kolonien ausgezählt und vermessen. Um für die Bestimmung der CFE mit

einbezogen werden zu können, mussten die Zellkolonien einen Mindestdurchmesser von 2 mm aufweisen (< 2mm = abortive Kolonien) [16].

Dazu wurden die Schalen mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Vermessung der Koloniegröße und die Zählung der Kolonien erfolgten mit Hilfe der Cell<sup>^</sup>R Imaging Software for Life Science Microscopy (Olympus).

### **3.2.12 Statistik**

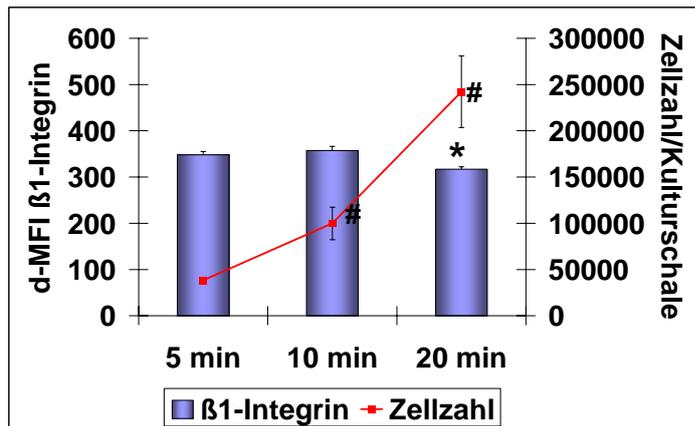
Für die statistische Ergebnisauswertung wurde SigmaStat 3.1 für Windows verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden die Unterschiede als statistisch signifikant bezeichnet. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte anhand des Mittelwertes und der Standardabweichung. Die Ergebniserzeugung erfolgte anhand von mind. drei unabhängigen Stichproben. Normalverteilte Populationen mit gleicher Varianz wurden mit der einfachen Varianzanalyse getestet (post-hoc Vergleich mit dem Dunn-Test). Bei Varianzhomogenität wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test (post-hoc mit dem Dunnett-Test) angewendet. Zum Vergleich zweier Mittelwerte wurde der t-Test herangezogen. Konnte dabei keine Normalverteilung bei beiden Datenreihen festgestellt werden, wurde der parameterfreie Rangordnungstest nach Mann-Whitney durchgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Optimierung der Kollagen-IV-Adhärenz-Isolierung**

#### **4.1.1 Einfluss der Adhäsionszeit an Kollagen IV auf die schnell-adhärenzte Zellfraktion**

Für die Anreicherung putativer epidermaler Stammzellen durch Adhäsion an Kollagen IV ist die Zeit, in der die Zellen an Kollagen IV binden können, der selektive Schritt der Methode. Zur Isolierung dieser Zellen als schnell-adhärenzte Zellfraktion wurden drei Adhärenzzeiten und zwar 5, 10 und 20 min untersucht. Dazu erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression des Stammzellmarkers (siehe Kapitel 2.1.5.1, 3.2.7.3) nach der jeweiligen Inkubationszeit. Gleichzeitig wurde die Zahl der jeweils adhärierenden Zellen erfasst. Abb. 12 zeigt Zellzahl und  $\beta 1$ -Integrinsignal der schnell-adhärenzten Fraktion nach den einzelnen Adhäsionszeiten. Mit zunehmender Adhäsionszeit steigt die Zahl adhärrender Zellen nahezu linear an. Im Vergleich zu 5 min hat nach 10 min schon die 2,6-fache Zahl Zellen an Kollagen IV gebunden. In dem nachfolgenden Zeitraum bis zur Adhäsionszeit von 20 min steigt die Zahl der Kollagen-IV-adhärenzten Zellen nochmals um den Faktor 2,4. Zellen, die innerhalb von 20 min adhäreren, zeigen im Vergleich zu Zellen, die innerhalb von 5 bzw. 10 min an Kollagen IV adhäreren können, eine signifikante Verminderung der Intensität des  $\beta 1$ -Integrinsignals. Zwischen den Adhärenzzeiten 5 und 10 min besteht kein signifikanter Unterschied. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für alle weiteren Versuche zur Gewinnung schnell-adhärenzter Zellen als Stammzellfraktion 10 min als Adhäsionszeit definiert.



**Abb. 12: Einfluss der Adhäsionszeit an Kollagen IV auf Anzahl und  $\beta$ 1-Integrin-Expression schnell-adhärenter Zellen.**

Nach 5, 10 min und 20 min Adhäsionszeit an Kollagen IV: Zellzahlbestimmung pro Kulturschale (Fuchs-Rosenthal-Kammer) sowie durchflusszytometrische Messung des  $\beta$ 1-Integrinsignals (d-MFI) der Kollagen-IV-adhärenter Zellen.

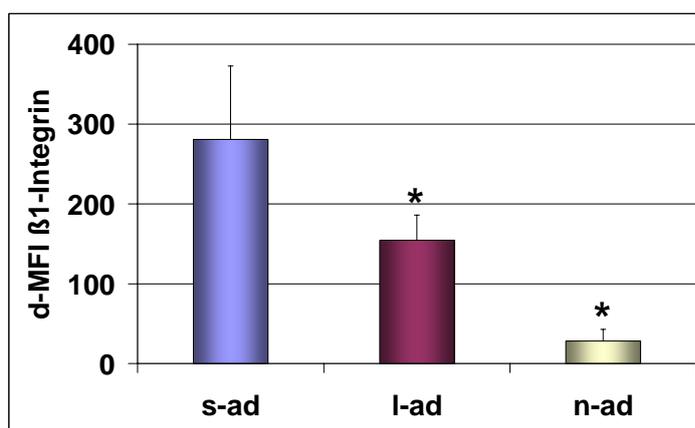
*$\beta$ 1-Integrinsignal:* \* signifikant vs. 5 min Adhäsionszeit;

*Zellzahl:* # signifikant vs. 5 min Adhäsionszeit,  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ ; einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

#### 4.1.2 $\beta$ 1-Integrin-Expression der Zellfraktionen der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode

Nach der Abtrennung der schnell-adhärenter Zellfraktion wurden als zweite und dritte Zellfraktion nach 24 h langsam- und nicht-adhärenter Keratinozyten isoliert (siehe Kapitel 3.2.4). Mittels Durchflusszytometrie erfolgte dann die Erfassung der  $\beta$ 1-Integrin-Expression dieser drei Zellfraktionen (siehe Kapitel 3.2.7.3).

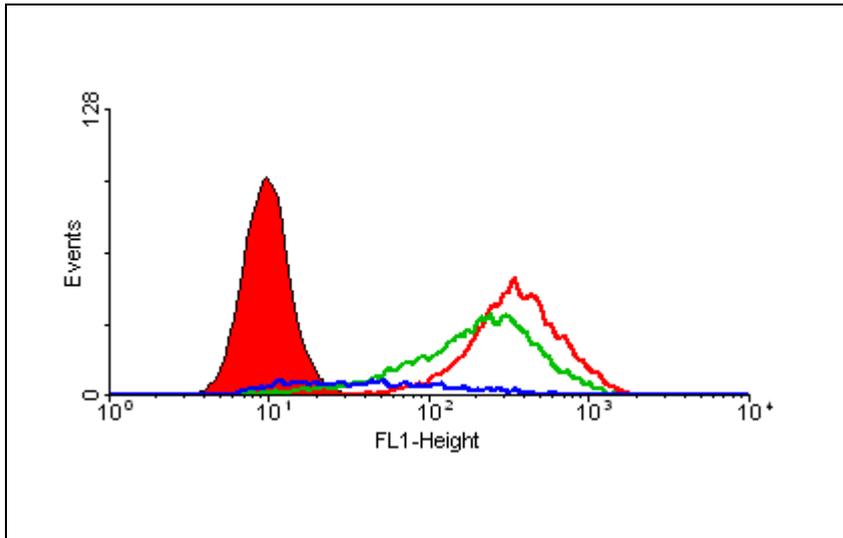
Abb. 13 zeigt die  $\beta$ 1-Integrinsignale der drei Fraktionen als d-MFI-Wert. Die schnell-adhärentere Fraktion (d-MFI =  $281 \pm 92$ ) besitzt ein fast doppelt so großes  $\beta$ 1-Integrinsignal wie die langsam-adhärentere (d-MFI =  $155 \pm 31$ ), während die Fraktion nicht-adhärenter Zellen nur eine sehr geringe Expression von  $\beta$ 1-Integrin (d-MFI =  $28 \pm 15$ ) aufweist.



**Abb. 13: Durchflusszytometrische Bestimmung der  $\beta$ 1-Integrin-Expression (d-MFI) von schnell- (s-ad), langsam- (l-ad) und nicht-adhären (n-ad) Zellen nach der Kollagen-IV-Isolierung.**

\* = signifikant vs. s-ad;  $p = 0,05$ ;  $n = 3$ ; einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

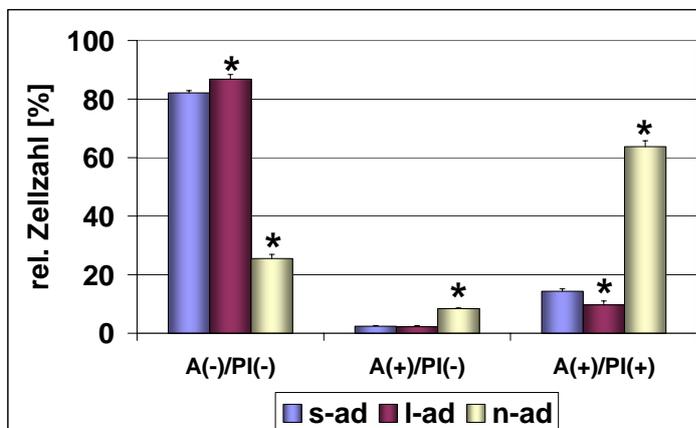
Abb. 14 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die deutliche Verschiebung der Maxima der  $\beta$ 1-Integrin-Expression zwischen den einzelnen Zellfraktionen. Dabei ist erkennbar, dass die Streuung des  $\beta$ 1-Integrin-Signals der langsam- und schnell-adhärenter Zellen im Gegensatz zur schnell-adhärenter Zellfraktion breiter ist.



**Abb. 14:** Repräsentativer Histogramm-Overlay einer durchflusszytometrischen Messung der  $\beta 1$ -Integrin-Intensität (FL1-Height) der drei Zellfraktionen nach der Kollagen-IV-Isolierung. *schnell-adhärent* (rote Linie), *langsam-adhärent* (grüne Linie) *nicht-adhärent* (blaue Linie) Isotyp-Kontrolle (rote Fläche).

### 4.1.3 Annexin/Propidium-Messung bei den Zellfraktionen der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode

Die hier aufgeführten durchflusszytometrischen Daten zeigen die Verteilung von vitalen und avitalen Zellen in der jeweiligen Fraktion nach der Kollagen-IV-Isolierung. Dabei kann mittels Zwei-Parameter-Messung mit Annexin V und Propidiumiodid bei den avitalen Zellen zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden (siehe Kapitel 3.2.7.5).



**Abb. 15:** Durchflusszytometrische Messung von Annexin V (A) und Propidiumiodid (PI) an der schnell- (s-ad), langsam- (l-ad) und nicht-adhären (n-ad) Zellfraktion nach der Isolierung mit Kollagen-IV.

Relative Werte entsprechen dem Anteil an der Gesamtpopulation. Werte wurden mittels Quadratanalyse ermittelt.

A(-)/PI(-): vitale Zellen  
 A(+)/PI(-): apoptotische Zellen  
 A(+)/PI(+): spätapoptotisch/nekrotische Zellen

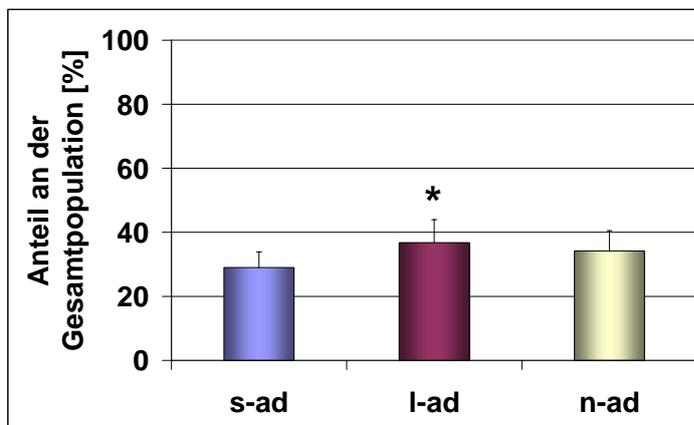
\* = signifikant vs.s-ad;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ ; einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

In Abb. 15 werden die drei gewonnenen Zellfraktionen schnell-, langsam- und nicht-adhären in Bezug auf den prozentualen Anteil vitaler [A(-)/PI(-)], apoptotischer [A(+)/PI(-)] sowie nekrotisch/spätapoptotischer Zellen [A(+)/PI(+)] einander gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass rein apoptotische [A(+)/PI(-)] Zellen generell nur einen sehr geringen Teil ausmachen. Allein die nicht-adhären Zellfraktion besitzt mit 8 % apoptotischen Zellen einen signifikant erhöhten Anteil gegenüber den beiden anderen Fraktionen. Das Diagramm zeigt auch, dass die nicht-adhären Zellfraktion größtenteils (64 %) avitale Zellen in der

Spätapoptose bzw. Nekrose enthält. Nur 26 % der Fraktion sind vital. Die schnell-adhärenente und langsam-adhärenente Zellpopulation bestehen dagegen zu über 80 % aus vitalen Zellen.

#### 4.1.4 Proportionen der Zellfraktionen der Kollagen-IV-Adhärenz-Methode

Für die Planung der nachfolgenden Untersuchungen war es notwendig, die Ausbeute der jeweiligen Zellpopulation nach der Kollagen-IV-Adhärenz-Isolierung zu ermitteln. Hierfür wurden die avitalen Zellen mittels der Lebend-Tot-Färbung (mit Tyrode-Eosin-Lösung) diskriminiert.



**Abb. 16: Prozentualer Anteil der drei Kollagen-IV-isolierten Zellfraktionen schnell-adhärenent (s-ad), langsam-adhärenent (l-ad) und nicht-adhärenent (n-ad) an der vitalen Gesamtpopulation.**

*Nach der Kollagen-IV-Isolierung erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Fuchs-Rosenthal-Kammer unter Diskriminierung avitaler Zellen mittels Tyrode-Eosin-Färbung. Die relativen Werte beziehen sich auf die vitale Gesamtpopulation basaler Keratinozyten (entspricht 100 %). \* signifikant vs. s-ad;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 17$ ; einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)*

Abb. 16 zeigt den Anteil der drei Zellfraktionen von der vitalen Gesamtpopulation der basalen Keratinozyten. Dabei entsprechen schnell-adhärenente Zellen durchschnittlich 29 % der Gesamtpopulation. Die zweite proliferationsfähige langsam-adhärenente Zellfraktion weist eine signifikant höhere Ausbeute von durchschnittlich 37 % auf. Nicht-adhärenente Zellen liegen bei 34 % Ausbeute. Diese Daten wurden aus Kollagen-IV-Isolierungen mit 17 verschiedenen Zellchargen generiert. Die Zellchargen selbst wurden meist aus mehreren Spendervorhäuten gepoolt. Trotz dieser Variation trat zwischen den Chargen teilweise eine relative hohe Differenz bei der Zellausbeute der einzelnen Zellfraktionen auf. Dies spiegelt sich in den relativ hohen Standardabweichungen wieder. Bei schnell-adhärenenten Zellen zeigten sich dabei beispielsweise Schwankungen zwischen 20-35 % in Abhängigkeit vom Zellpool.

## 4.2 Proliferationsverhalten schnell- und langsam-adhärenenter Zellen

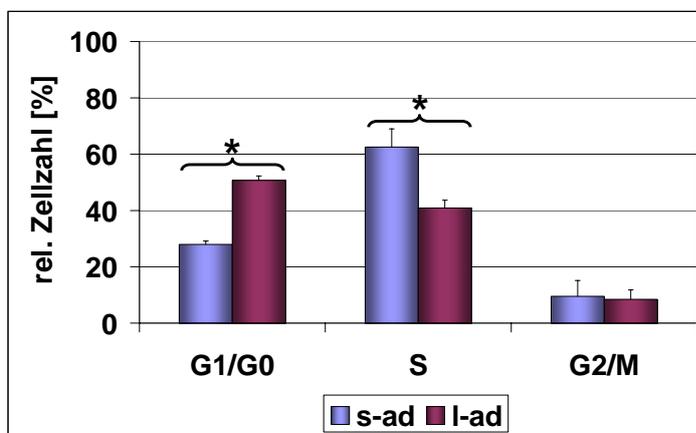
Da die Adhärenzfähigkeit eine Voraussetzung für die Kultivierbarkeit von Keratinozyten ist, wurde die dritte, nicht-adhärenente Zellfraktion der Kollagen-IV-Isolierung für weitere Versuche

ausgeschlossen. Nachfolgend wurden ausschließlich die schnell- und die langsam-adhärenente Zellfraktion untersucht.

### 4.2.1 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse der schnell- und der langsam-adhärenenten Zellfraktion erfolgte unmittelbar nach der Kollagen-IV-Auftrennung. Damit wurde der Proliferationsstatus der Zellen detektiert, von dem aus sie zu Beginn der Versuche Vitalfärbung mit Gentianaviolett (siehe Kapitel 4.2.2), [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau (siehe Kapitel 4.2.3) und Fähigkeit zur Koloniebildung (siehe Kapitel 4.2.4) starteten.

Abb. 17 zeigt den jeweiligen prozentualen Anteil der schnell-adhärenenten bzw. langsam-adhärenenten Fraktion in den Zellzyklusphasen G1/G0, S und G2/M. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Zellfraktionen sind in der Ruhephase (G1/G0) sowie in der Synthese-Phase (S) zu erkennen. Die langsam-adhärenente Fraktion weist in der G1/G0-Phase im Vergleich zur schnell-adhärenenten einen um ca. 20 % höheren Zellanteil auf. Die schnell-adhärenente Fraktion zeigt hingegen die entsprechend größere Zellzahl in der S-Phase. Die Mitose-Phase (G2/M) ist bei beiden Zellfraktionen gleich gering ausgeprägt.



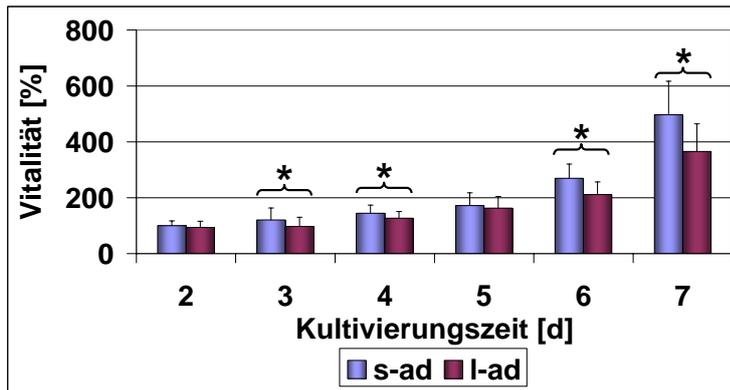
**Abb. 17: Zellzyklusanalyse von schnell-adhärenenten (s-ad) und langsam-adhärenenten (l-ad) Zellen nach Kollagen-IV-Isolierung.** Durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts durch Färbung mit Propidiumiodid; relative Werte zeigen prozentualen Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase. \* = signifikant s-ad vs. l-ad in der jeweiligen Zellzyklusphase;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ ; Test nach Mann-Whitney

### 4.2.2 Bestimmung des Zellwachstums mittels Vitalfärbung

Über die Färbung des Gesamtproteins adhärenent wachsender Zellen mit Gentianaviolett kann indirekt eine Aussage über die Proliferation der Zellen getroffen werden (siehe Kapitel 3.2.9). Diese Methode wurde hier genutzt, um sich einen ersten Überblick über das Wachstum von schnell-adhärenenten und langsam-adhärenenten Zellen zu verschaffen.

Die dargestellten relativen Werte in Abb. 18 beziehen sich auf den absoluten Ausgangswert der schnell-adhärenenten Zellfraktion von der ersten Messung (am zweiten Kulturtag). Dieser wurde 100 % gesetzt.

Für diesen Versuch wurden in eine 48er MTP in je 24 Wells schnell-adhärenente Zellen bzw. langsam-adhärenente Zellen eingesät. Bei gleicher Zelleinsaatmenge zeigt die schnell-adhärenente Fraktion im Vergleich zur langsam-adhärenenten jedoch schon ab dem dritten Kulturtag eine signifikant höhere Zellzunahme. Im gesamten Versuchszeitraum lag die Zahl der langsam-adhärenenten Zellen 5-26 % unter der der schnell-adhärenenten Zellen. Bei Versuchsende war die Differenz am größten. Zu diesem Zeitpunkt (Kulturtag 7) hatte die schnell-adhärenente Zellfraktion einen Konfluenzgrad von etwa 90-100 % erreicht.



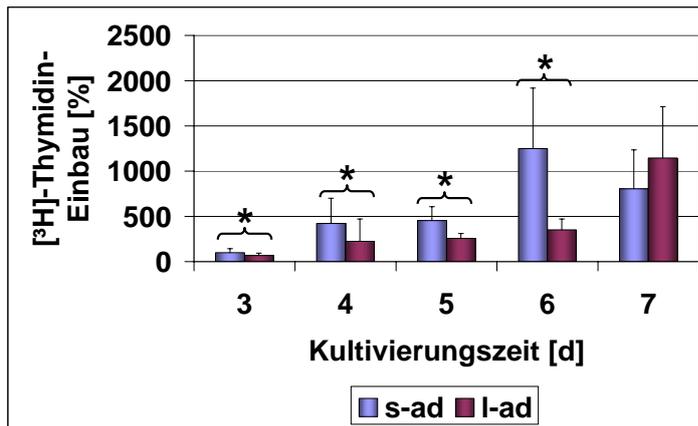
**Abb. 18: Wachstumskurven von schnell-adhärenenten (s-ad) und langsam-adhärenenten (l-ad) Zellen mittels Vitalfärbung mit Gentianaviolett innerhalb von 7 d.**

Nach Kollagen-IV-Isolierung Einsaat von  $7 \times 10^3$  Zellen/Well in 48er Mikrotiterplatten, erste Messung am zweiten Tag der Kultur, relative Werte bezogen auf Absolutwert der schnell-adhärenenten Fraktion am ersten Messtag (entspricht 100 %).

\* signifikant s-ad vs. l-ad;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 24 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney

#### 4.2.3 [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau

Im Gegensatz zur Vitalfärbung kann über die Inkorporierung von DNA-Bausteinen eine direkte Aussage zur DNA-Synthese-Aktivität (S-Phase) gemacht werden (siehe Kapitel 3.2.10). Für diesen Versuch erfolgte die Einsaat pro Zellfraktion in je 12 Wells einer 24er MTP. Abb. 19 zeigt relative Werte bezogen auf den Absolutwert der schnell-adhärenenten Fraktion an Kulturtag 3. Schon bei dieser ersten Messung lässt sich zwischen schnell-adhärenenter und langsam-adhärenenter Zellfraktion ein signifikanter Unterschied erkennen, welcher mit steigender Kulturdauer wächst. Im Versuchszeitraum liegt der Einbau der DNA-Base der langsam-adhärenenten nur 32-72 % unter der DNA-Synthese-Aktivität der schnell-adhärenenten Fraktion. Am sechsten Kulturtag ist dieser Unterschied am größten. Am Versuchsende (Kulturtag 7) jedoch ist keine signifikante Differenz mehr zwischen beiden Zellfraktionen vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt hatte die schnell-adhärenente Zellfraktion einen Konfluenzgrad von etwa 90-100 % erreicht.



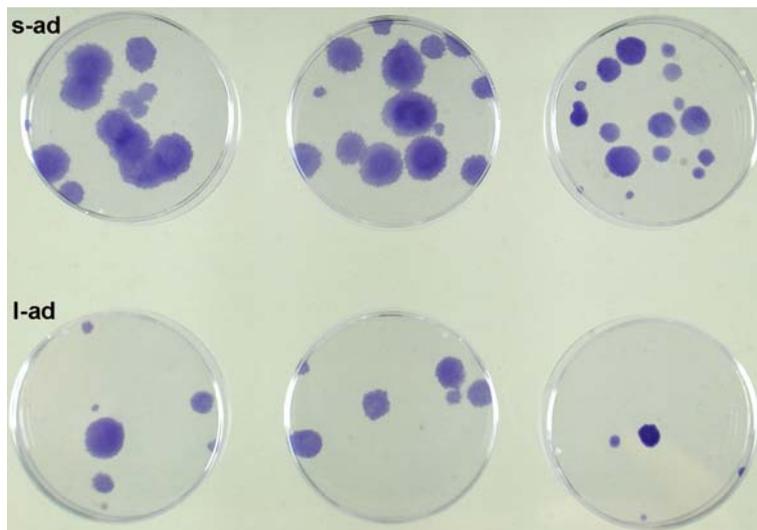
**Abb. 19: Wachstumskurven von schnell-adhären (s-ad) und langsamadhären (l-ad) Zellen mittels <sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau innerhalb von 7 d.**

Nach Kollagen-IV-Isolierung Einsaat von 10x 10<sup>3</sup> Zellen/Well in 24er Mikrotiterplatten, erste Messung am dritten Tag der Kultur, relative Werte bezogen auf Absolutwert der schnell-adhären Fraktion am ersten Messtag (entspricht 100 %).

\* signifikant s-ad vs. l-ad, p ≤ 0,05; n = 3 (jeweils 12 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney

#### 4.2.4 Koloniebildungseffizienz und Koloniegröße

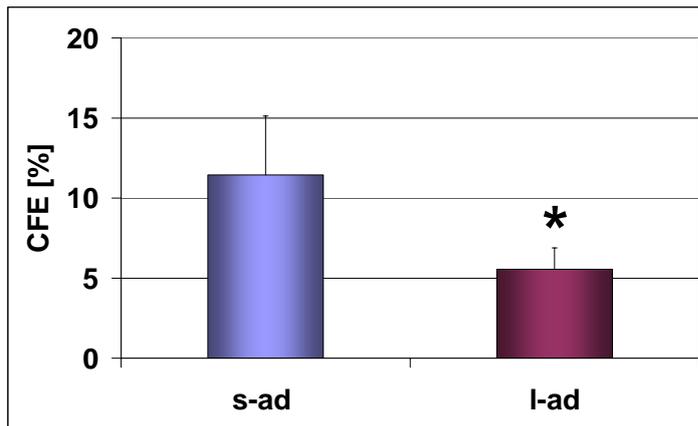
Die Bestimmung der Koloniebildungseffizienz (Colony forming efficiency-CFE) ermöglicht Aussagen über Regenerationsfähigkeit und Proliferationskapazität einer Einzelzelle. Abb. 20 zeigt das Kolonienwachstum der beiden Zellfraktionen nach 14 Tagen. Es ist deutlich zu erkennen, dass schnell-adhären Zellen größere Kolonien in höherer Zahl erzeugen.



**Abb. 20: Repräsentative Darstellung von Zellkolonien schnell-adhären (s-ad) und langsam-adhären (l-ad) Zellen.**

Nach Kollagen-IV-Isolierung Einsaat 100 Zellen/Kulturschale; nach 14 d Kultur Vitalfärbung mit Gentanviolett, Ergebnis eines Versuchs mit je 3 Einzelwerten.

Abb. 21 zeigt die relativen Werte der Koloniebildungseffizienz. Es ist ersichtlich, dass von 100 schnell-adhären Zellen durchschnittlich elf in der Lage waren, eine Kolonie zu bilden. Dagegen besitzen von der langsam-adhären Fraktion nur durchschnittlich sechs von 100 Zellen diese Fähigkeit. Die Koloniebildungseffizienz von schnell-adhären Zellen ist demnach im Mittel fast doppelt so hoch wie bei langsam-adhären Zellen.



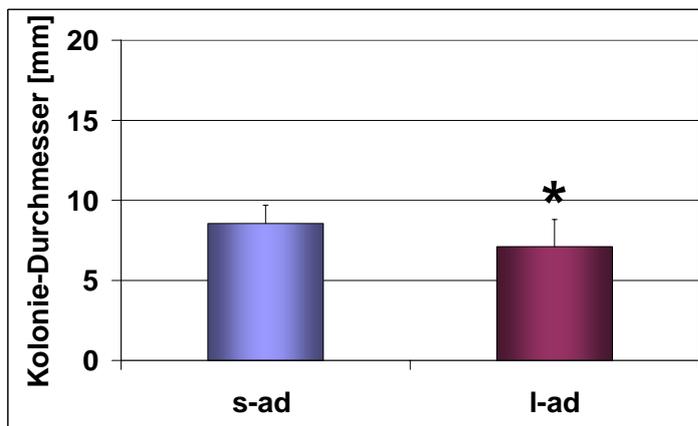
**Abb. 21: Koloniebildungseffizienz (CFE %) von schnell-adhären (s-ad) und langsam-adhären (l-ad) Zellen nach 14 d.**

Vermessung und Zählung der Kolonien anhand digitaler Aufnahmen mit Hilfe Cell<sup>^</sup>R Imaging-Software. Berechnung der Koloniebildungseffizienz unter Ausschluss abortiver Kolonien (Durchmesser < 2 mm).

CFE = Ratio aus Koloniezahl und eingesäter Zellzahl x 100 % [44].

\* signifikant vs. s-ad;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 5$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); t-Test

Die Koloniegröße bietet ebenfalls eine Möglichkeit zur Einschätzung der Proliferationskapazität der Einzelzelle. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl der möglichen Zellteilungen pro Einzelzelle ziehen. Abb. 22 zeigt den durchschnittlichen Durchmesser pro Kolonie. Schnell-adhären Zellen besitzen im Mittel eine Größe von 9 mm und langsam-adhären von 7 mm. Dies entspricht einem Unterschied im durchschnittlichen Kolonie-Durchmesser von ca. 20 %. Im Vergleich zur Koloniebildungseffizienz ist hier der Unterschied zwischen beiden Zellfraktionen nicht so stark ausgeprägt.



**Abb. 22: Koloniedurchmesser (mm) von schnell-adhären (s-ad) und langsam-adhären (l-ad) Zellen nach 14 d.**

Vermessung der Kolonien anhand digitaler Aufnahmen mit Hilfe Cell<sup>^</sup>R Imaging-Software, Berechnung der Koloniebildungseffizienz unter Ausschluss abortiver Kolonien (Durchmesser < 2 mm).

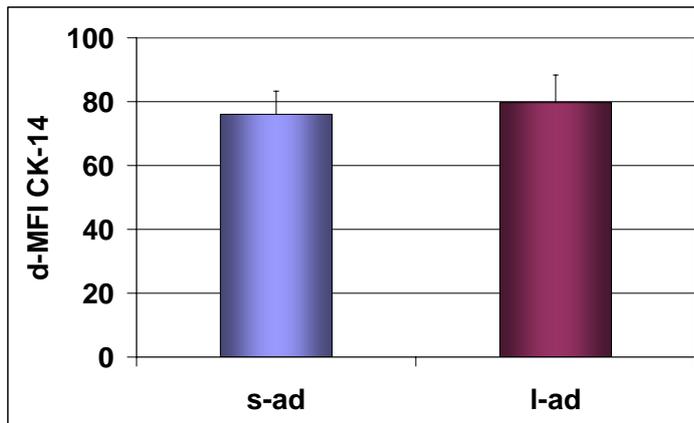
\* signifikant vs. s-ad;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 5$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); t-Test

## 4.3 Phänotypische Eigenschaften schnell- und langsam-adhären Zellen

### 4.3.1 Zytokeratin 14

Als weiteren Marker zur Charakterisierung der beiden Zellpopulationen wurde Zytokeratin 14 (CK-14), das Zytoskelettprotein basaler Zellen, genutzt. Die Bestimmung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 3.2.7.4). Die hier dargestellten d-MFI-Werte des basalen Zytoskelettproteins wurden aus drei unabhängigen Messungen generiert. Abb. 23 zeigt, dass

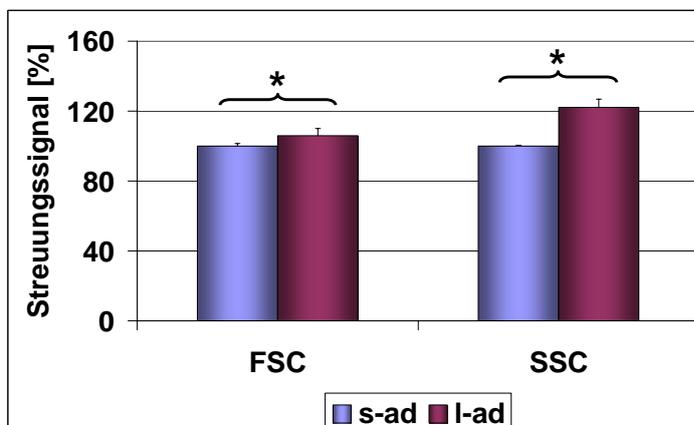
beide Zellpopulationen dieses Zytokeratin besitzen, allerdings bestehen zwischen schnell- und langsam-adhärennten Zellen keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 23: Durchflusszytometrische Bestimmung des Zytokeratin-14-(CK14)-Signals (d-MFI) bei schnell-adhärennten (s-ad) und langsam-adhärennten (l-ad) Zellen nach Kollagen-IV-Isolierung.**  
*nicht signifikant,  $p \leq 0,097$ ,  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); t-Test*

### 4.3.2 Zellgröße und Zellgranularität

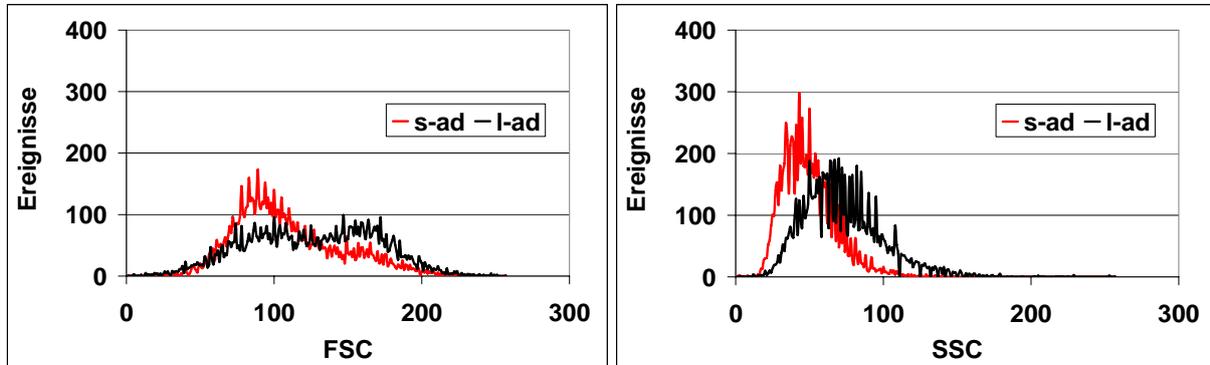
Größe und Granularität einer Zelle können Hinweise auf ihren Reifegrad bzw. ihre Proliferationskapazität geben (siehe Kapitel 2.1.5.2). Aufgrund dessen wurden die durchflusszytometrischen Daten von Forward scatter (FSC) und Sideward scatter (SSC) zum Vergleich der beiden Zellpopulationen, schnell-adhärennt und langsam-adhärennt, als Parameter herangezogen (siehe Kapitel 3.2.7). Hierbei handelt es sich um relative Werte, bezogen auf den Absolutwert der schnell-adhärennten Zellfraktion (entspricht 100 %). Die in Abb. 24 dargestellten relativen Werte wurden aus vier unabhängigen Messungen generiert. Bei FSC (Zellgröße) und SSC (Zellgranularität) zeigt die Darstellung zwischen schnell- und langsam-adhärennten Zellen signifikante Unterschiede. Die Differenz zwischen langsam- und schnell-adhärennter Zellfraktion beträgt bei der Zellgranularität ca. 20 %, während bei der Zellgröße der Unterschied zwischen beiden Zellpopulationen nur bei 8 % liegt.



**Abb. 24: Durchflusszytometrische Bestimmung von Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC) bei schnell-adhärennten (s-ad) und langsam-adhärennten (l-ad) Zellen nach Kollagen-VI-Isolierung.**  
*Relative Werte bezogen auf Absolutwert der schnell-adhärennten Fraktion (entspricht 100 %).*  
*\* signifikant vs. s-ad;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 4$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); t-Test*

Abb. 25 zeigt die lineare Häufigkeitsverteilung der FSC- und SSC-Signale beider Fraktionen. Das FSC-Signal lässt bei langsam-adhärennten Zellen eine bimodale Verteilung erkennen, während schnell-adhärennte Zellen eine eher gleichförmige Streuung bei kleineren Werten

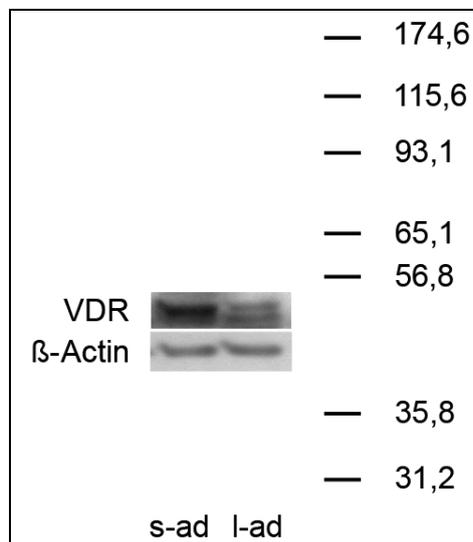
aufweist. Aufgrund dieser abweichenden Verteilungsmuster ist der Unterschied zwischen schnell- und langsam-adhärenen Zellen bei FSC nicht so groß. Das SSC-Signal zeigt bei beiden Zellpopulationen ein ähnlich geringes Streuungsverhalten bei unterschiedlichen Maxima. Hier tritt dadurch ein größerer Unterschied hervor.



**Abb. 25:** Repräsentative histogrammische Darstellung von FSC- und SSC-Signal bei schnell-adhärenen (s-ad) (rot) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen (schwarz).  
*Durchflusssyztometrie*

### 4.3.3 Nachweis des Vitamin-D-Rezeptors

Die Voraussetzung für die nachfolgenden Untersuchungen war der Nachweis des nukleären Vitamin-D-Rezeptors. Die Hauptwirksamkeit von Calcitriol, Calcipotriol sowie Tacalcitol beruht auf der Existenz dieses Rezeptors.



**Abb. 26:** Nachweis der Vitamin-D-Rezeptor-(VDR)-Expres-sion bei schnell-adhärenen (s-ad) und langsam-adhärenen Zellen (l-ad) nach der Kollagen-IV-Isolierung mittels Westernblot.

*Nach der Detektion des Vitamin-D-Rezeptors wurde die PVDF-Membran gestrippt (Entfernung des Antikörpers). Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit Ladekontrolle  $\beta$ -Actin; VDR ca. 48 kDa,  $\beta$ -Actin ca. 42 kDa, Detektion mit ECL-Reagenz.*

*n = 3*

Abb. 26 zeigt repräsentativ eine von drei unabhängigen Westernblotanalysen. Als Ladekontrolle diente das Housekeeping-Protein  $\beta$ -Actin. VDR und  $\beta$ -Actin wurden aufgrund ähnlichen Molekulargewichts nacheinander auf identischer Membran nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.8). In Abb. 26 wurden die beiden Banden nun zusammen dargestellt. Der Blot des Vitamin-D-Rezeptors präsentiert eine stärkere Bande bei schnell-adhärenen Zellen im Vergleich zur langsam-adhärenen Zellfraktion.

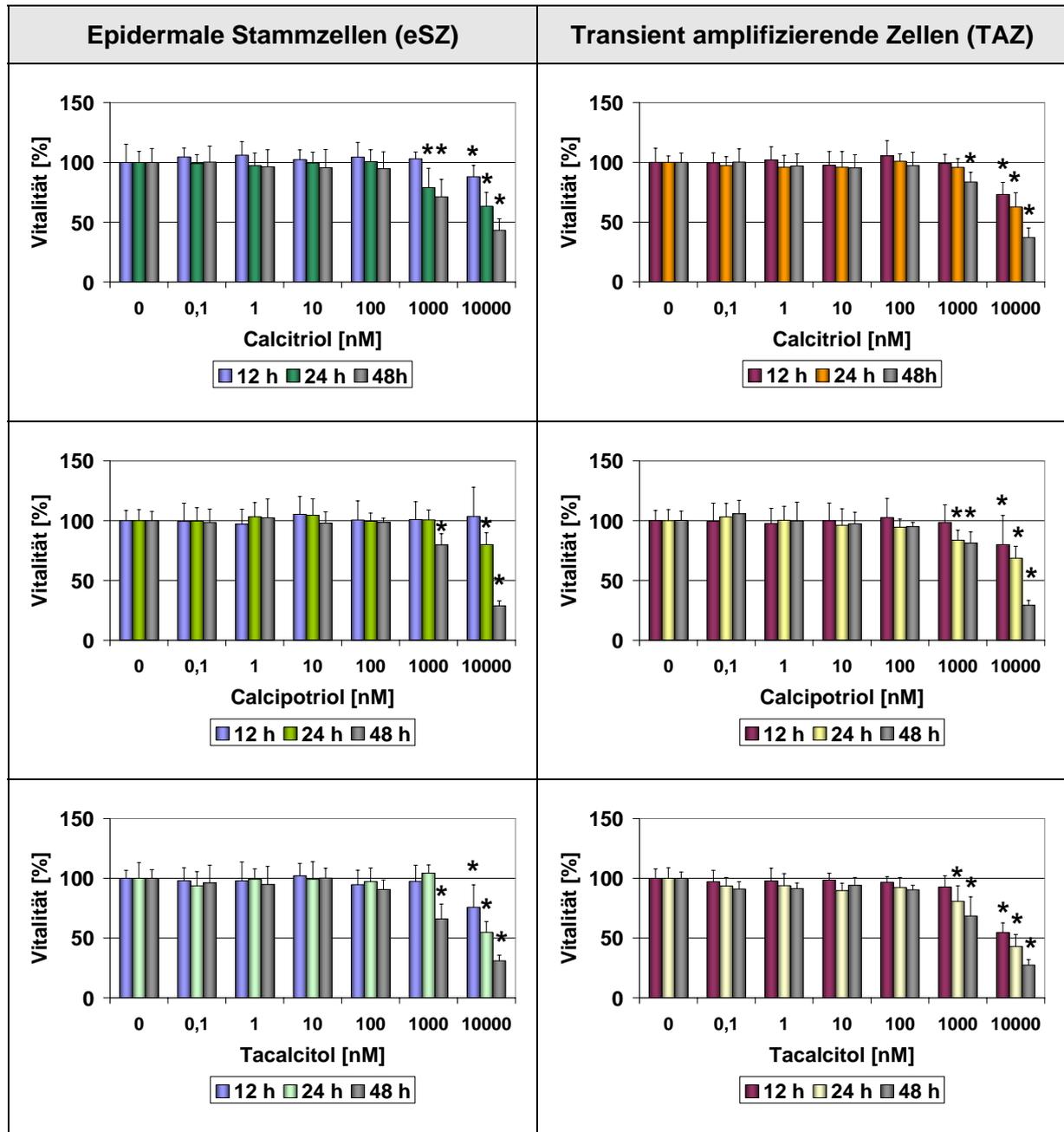
## 4.4 Toxizität der Vitamin-D3-Analoga auf epidermale Stammzellen und deren transient amplifizierende Tochterzellen

Basierend auf der verwendeten anerkannten Isolierungsmethode mit Kollagen IV (Kapitel 4.1) sowie der Analyse der beiden Zellfraktionen (Kapitel 4.2 und 4.3) kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der schnell-adhärenenten Fraktion um Zellen des Stammzellphänotyps handelt und die langsam-adhärenente Fraktion Tochterzellen mit höherem Reifegrad repräsentiert. Daher werden in den nun folgenden Kapiteln die Termini „epidermale Stammzelle (eSZ)“ und „transient amplifizierende Tochterzelle (TAZ)“ verwendet.

Um eine nicht zellschädigende Wirkstoffkonzentration für die weiterführenden Versuche auswählen zu können, wurde für Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol ein breites Konzentrationsspektrum (0,1 bis 10.000 nM) untersucht. Mit Hilfe der Vitalfärbung mit Gentianaviolett (siehe Kapitel 3.2.9) und der durchflusszytometrischen Bestimmung von Annexin V und PI (siehe Kapitel 3.2.7.5) wurden der toxische und nicht toxische Bereich für die drei Wirkstoffe bestimmt. Dabei erfolgte auch ein Vergleich der Vitalität der beiden Zellfraktionen im toxischen Bereich.

### 4.4.1 Untersuchung der Toxizität mittels Vitalfärbung

Wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben, erfolgte die Wirkstoffinkubation für diesen Test bei epidermalen Stammzellen (eSZ) sowie transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) bei einer 40-50 %igen Konfluenz. Sowohl bei eSZ als auch bei TAZ zeigt der Vitaltest in Abb. 27 bei allen drei Wirkstoffen ab einer Konzentration von 1.000 nM ein signifikantes Absinken der vitalen adhärenent wachsenden Zellen. Die toxischen Effekte treten dabei in Abhängigkeit von Wirkstoff und Zellfraktion zwischen Inkubationszeiten von 24 und 48 h auf.



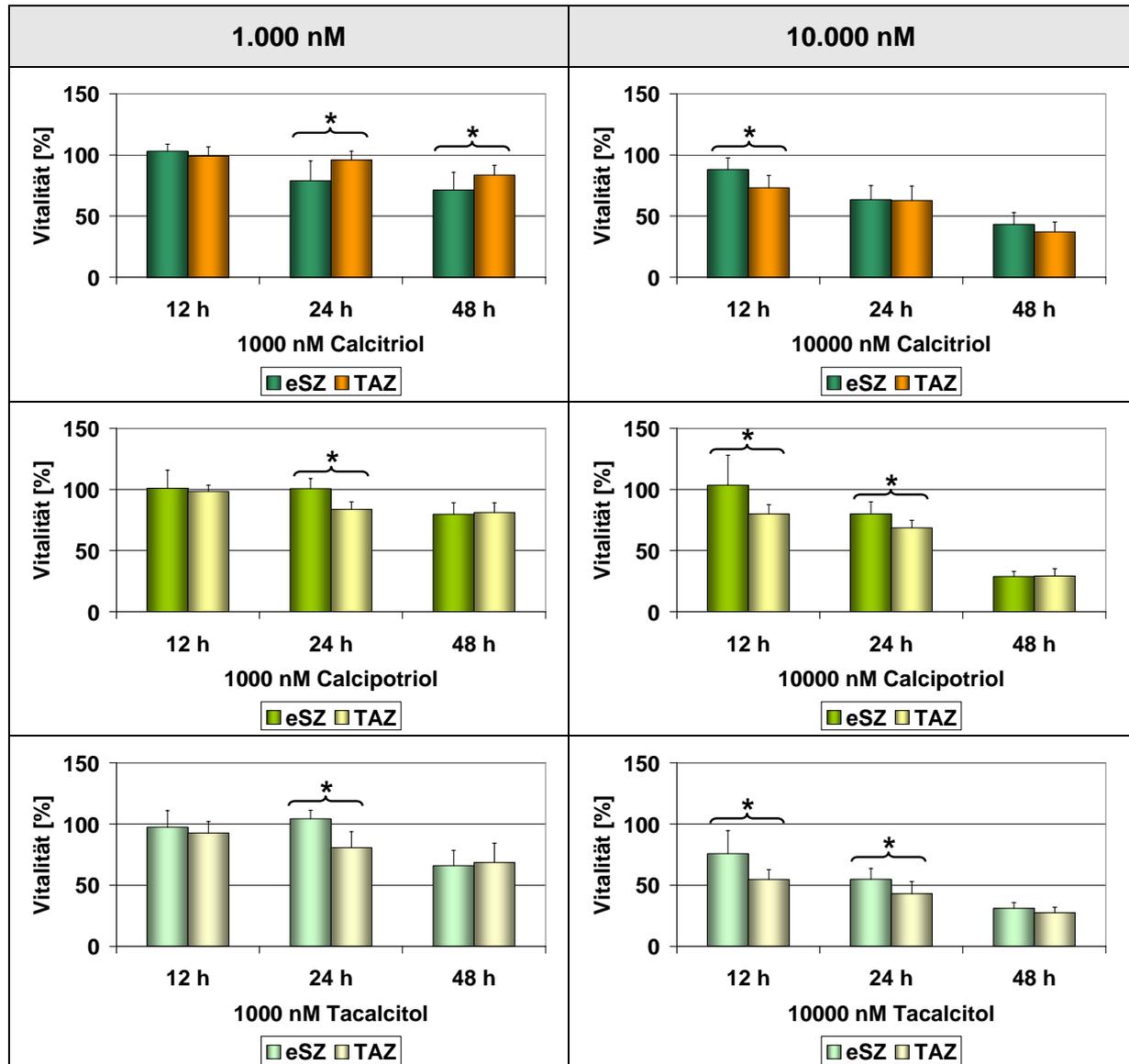
**Abb. 27:** Vitalität von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol (0,1; 1; 10;100; 1.000 und 10.000 nM) nach 12, 24 und 48 h im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).

Die Wirkstoffinkubation erfolgte bei 40-50 % Konfluenz. Relative Werte beziehen sich auf den Absolutwert der Kontrolle der jeweiligen Zellfraktion zum jeweiligen Inkubationszeitraum. Bezugswert wurde gleich 100 % gesetzt. Vitalfärbung mit Gentianaviolett.

\* signifikant vs. 0 nM eSZ bzw. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 6 Einzelwerte pro Konzentration); einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

In der weiteren Auswertung erfolgte der direkte Vergleich der Vitalität der beiden Zellfraktionen unter Exposition der zellschädigenden Konzentrationen 1.000 nM und 10.000 nM Wirkstoff. Außer bei 1.000 nM Calcitriol zeigt sich in Abb. 28 deutlich, dass eSZ unter Wirkstoffexposition eine signifikant höhere Vitalität besitzen als TAZ. Dieser

Unterschied ist zeitabhängig. Die toxischen Effekte sind bei Calcitriol nach 24 h, bei Tacalcitol und Calcipotriol nach 48 h in beiden Zellfraktionen gleich.



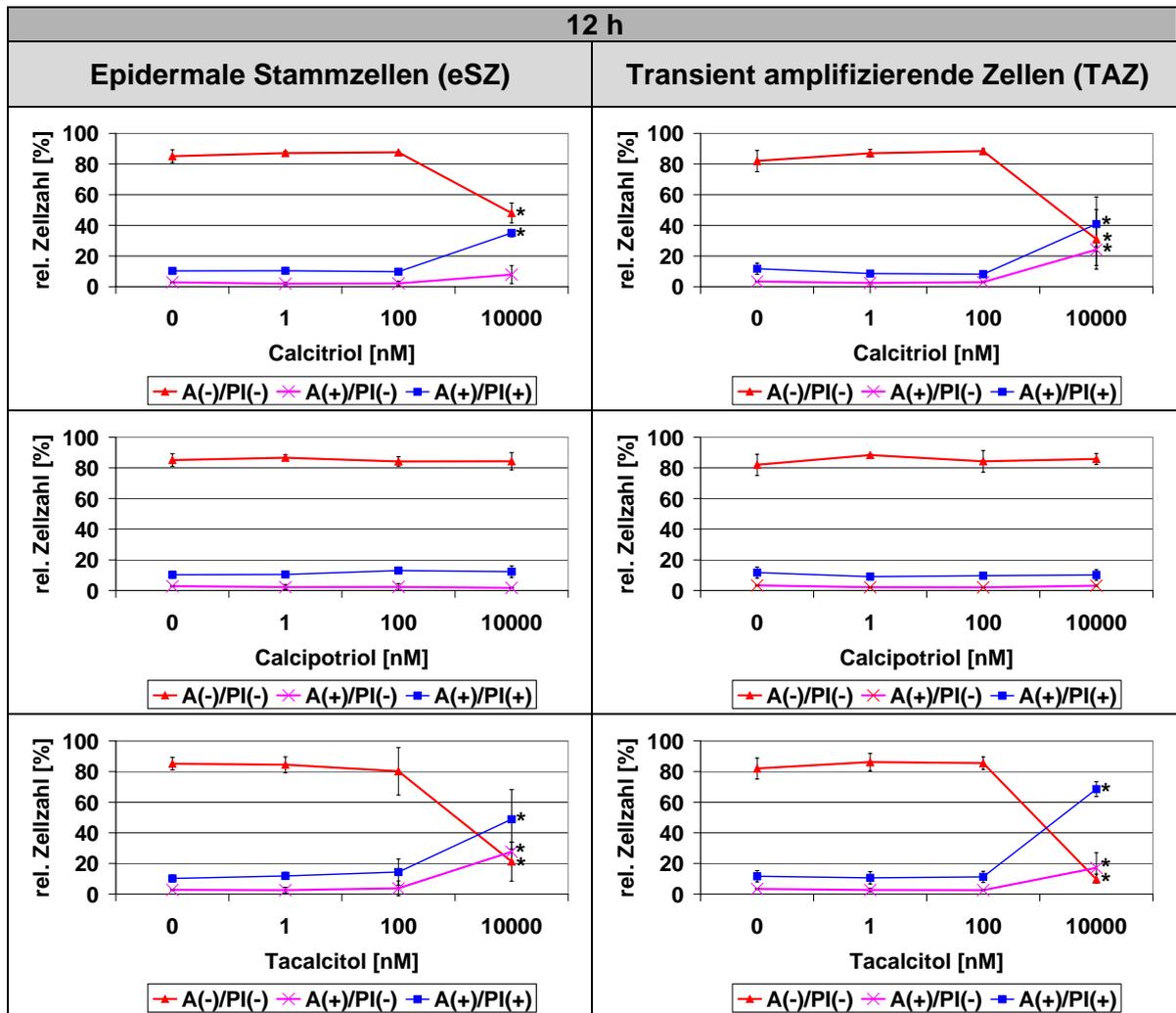
**Abb. 28: Vergleich der Vitalität von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1.000 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 12, 24 und 48 h.**

Die Wirkstoffinkubation erfolgte bei 40-50 % Konfluenz. Relative Werte beziehen sich auf den Absolutwert der Kontrolle der jeweiligen Zellfraktion zum jeweiligen Inkubationszeitraum. Bezugswert wurde gleich 100 % gesetzt. Vitalfärbung mit Gentianaviolett.

\* signifikant eSZ vs. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$   $n = 3$  (jeweils 6 Einzelwerte pro Konzentration); t-Test

#### 4.4.2 Untersuchung der Toxizität mittels Annexin V/PI-Messung

Die Zelltodcharakterisierung mit Hilfe der Annexin V/PI-Messung erfolgte nach Exposition von 1, 100 und 10.000 nM Wirkstoff im Vergleich zur Kontrolle (0 nM). Der jeweilige Wirkstoff wurde bei einer Konfluenz von 40-50% appliziert. Nach 12 h Wirkstoffinkubation (Abb. 29) ist bei eSZ und TAZ unter 10.000 nM Calcitriol sowie Tacalcitol schon ein signifikanter Anstieg spätapoptotisch/nekrotischer Zellen zu erkennen.



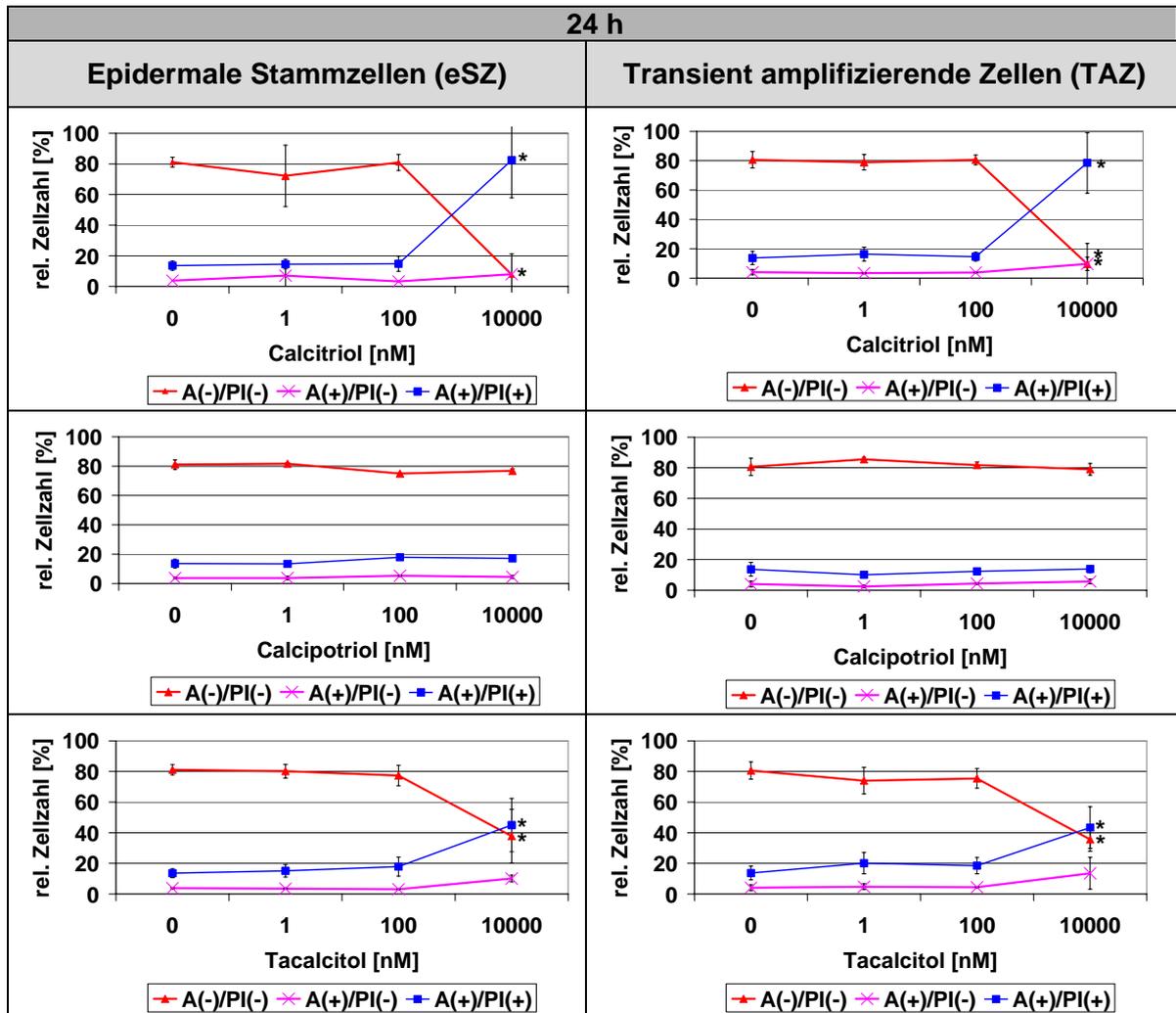
**Abb. 29:** Zweiparameter-Messung Annexin V und Propidiumiodid nach 12 h zur Zelltodcharakterisierung von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1, 100 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).

Die Wirkstoffinkubation erfolgte bei 40-50 % Konfluenz. Relative Werte entsprechen dem Anteil an der Gesamtpopulation. Werte wurden mittels Quadratenanalyse ermittelt. Durchflusszytometrie.

A(-)/PI(-): vitale Zellen; A(+)/PI(-): apoptotische Zellen, A(+)/PI(+): spätapoptotisch/nekrotische Zellen

\* signifikant vs. 0 nM eSZ bzw. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Konzentration); Kruskal-Wallis-Test (Dunnett-Test)

Des Weiteren zeigt sich unter 10.000 nM eine Erhöhung apoptotischer Zellen durch diese beiden Substanzen. Mit Ausnahme der Calcitriol-behandelten eSZ-Fraktion ist diese Erhöhung signifikant zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu lassen sich unter Calcipotriol weder bei eSZ noch bei TAZ zellschädigende Effekte erkennen. Auch nach einer Inkubationszeit von 24 h (Abb. 30) und 48 h (Abb. 31) zeigt Calcipotriol auf eSZ und TAZ keinen signifikant toxischen Einfluss.



**Abb. 30:** Zweiparameter-Messung Annexin V und Propidiumiodid nach 24 h zur Zelltodcharakterisierung von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1, 100 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).

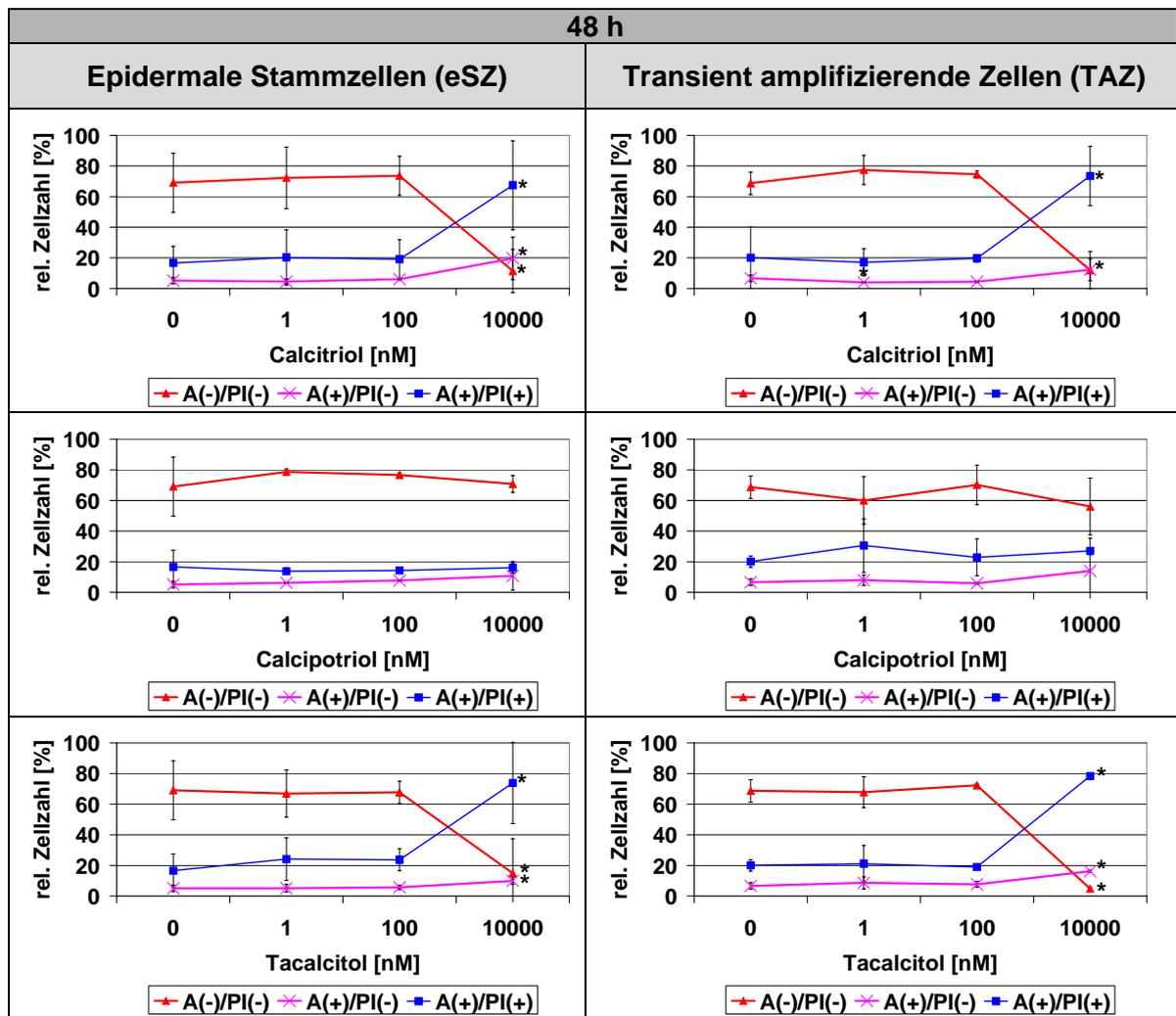
Die Wirkstoffinkubation erfolgte bei 40-50 % Konfluenz. Relative Werte entsprechen dem Anteil an der Gesamtpopulation. Werte wurden mittels Quadratenalyse ermittelt. Durchflusszytometrie.

A(-)/PI(-): vitale Zellen; A(+)/PI(-): apoptotische Zellen, A(+)/PI(+): spätapoptotisch/nekrotische Zellen

\* signifikant vs. 0 nM eSZ bzw. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Konzentration); Kruskal-Wallis-Test (Dunnnett-Test)

Innerhalb des gesamten Inkubationszeitraums von 48 h beschränkt sich die Zellschädigung durch Calcitriol und Tacalcitol bei beiden Zellfraktionen ausschließlich auf die Konzentration

von 10.000 nM. Dabei nimmt der Anteil spätapoptotisch/nekrotischer Zellen im zeitlichen Verlauf leicht zu, während der apoptotische Anteil der Zellen leicht absinkt.



**Abb. 31: Zweiparameter-Messung Annexin V und Propidiumiodid nach 48 h zur Zelltodcharakterisierung von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1, 100 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).**

Die Wirkstoffinkubation erfolgte bei 40-50 % Konfluenz. Relative Werte entsprechen dem Anteil an der Gesamtpopulation. Werte wurden mittels Quadratenanalyse ermittelt. Durchflusszytometrie.

A(-)/PI(-): vitale Zellen; A(+)/PI(-): apoptotische Zellen, A(+)/PI(+): spätapoptotisch/nekrotische Zellen

\* signifikant vs. 0 nM eSZ bzw. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Konzentration); Kruskal-Wallis-Test (Dunnett-Test)

Ein Vergleich der toxischen Wirkungseffekte zwischen eSZ und TAZ wurde aufgrund der hohen Standardabweichungen bei der toxischen Konzentration von 10.000 nM nicht durchgeführt. Ein Grund für diese starke Streuung könnten Zellfragmente sein, die als Endergebnis des Zelltods entstanden sind. Damit ist das zu untersuchende Zellmaterial weniger homogen und dies beeinflusst das Messergebnis.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass alle drei Wirkstoffe bei einer Konzentration von 100 nM keinerlei zellschädigende Effekte aufweisen. Aufgrund dessen konnte diese Wirkstoffkonzentration für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

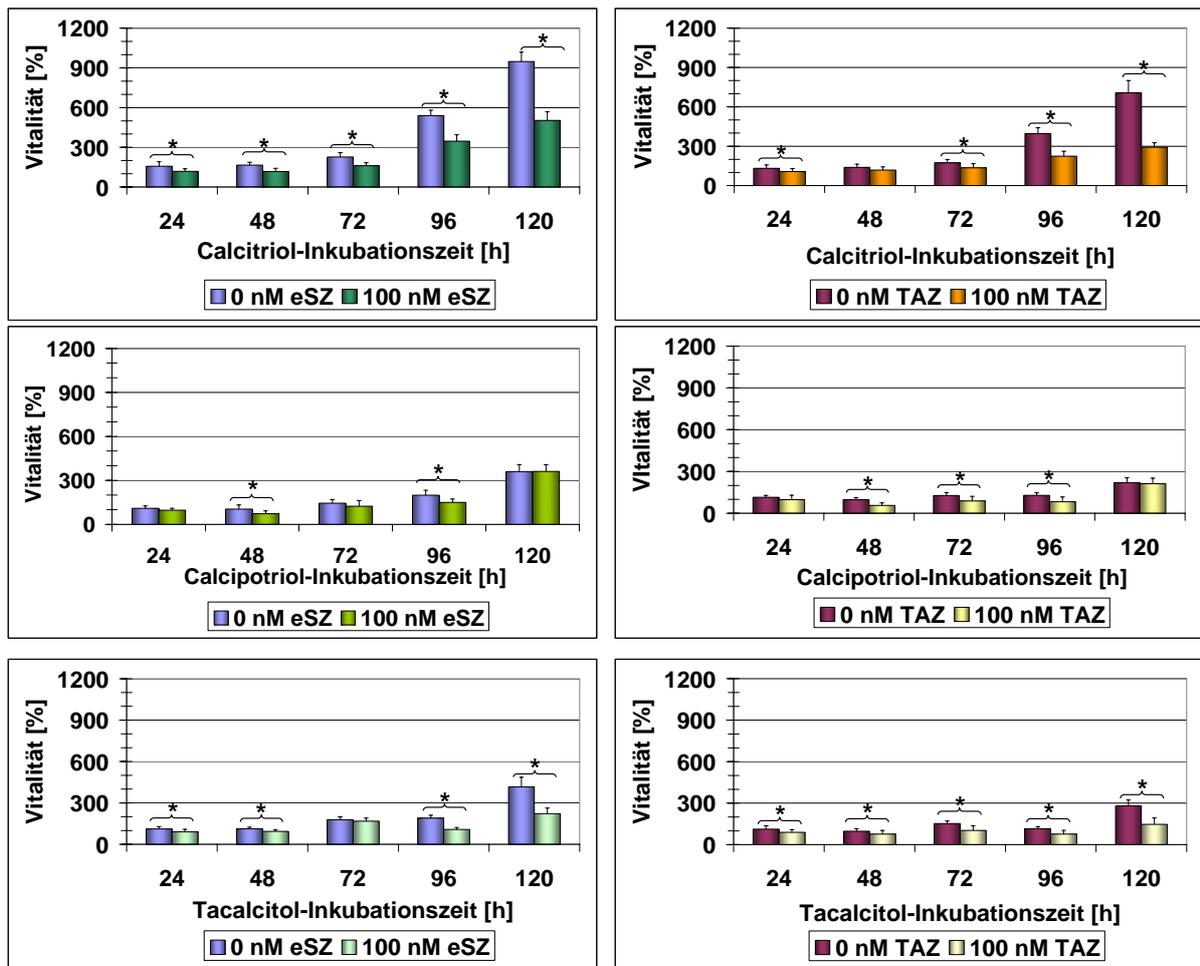
## **4.5 Proliferationsverhalten unter Vitamin-D3-Analoga**

Mit den nachfolgenden Experimenten sollte nun der Einfluss von Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol in einer Konzentration von 100 nM auf das Proliferationsverhalten von eSZ und TAZ vergleichend untersucht werden. Dazu wurden die gleichen Methoden wie aus Kapitel 4.2 genutzt.

### **4.5.1 Bestimmung des Zellwachstums mittels Vitalfärbung**

Diese Untersuchung wurde in 48er MTP durchgeführt. Wie bei der Vitalfärbung in Kapitel 4.2.2 wurde die Kulturdauer auch für diesen Versuch auf insgesamt sieben Tage beschränkt. Am zweiten Kulturtag erfolgte die Wirkstoffinkubation (siehe Kapitel 3.2.9) sowie die erste Vitalitätsmessung als Bezugswert für die nachfolgenden Messdaten. Der Bezugswert der jeweiligen Zellfraktion wurde gleich 100 % gesetzt.

Schon nach 24 h Inkubationszeit lässt sich bei Calcitriol sowie Tacalcitol ein signifikanter Unterschied zwischen exponierten Zellen (100 nM) und der Kontrolle (0 nM) erkennen. Im Verlauf des Experiments nimmt die Zahl der unbehandelten Zellen kontinuierlich zu, bei eSZ stärker als bei TAZ. Aber auch die behandelten Zellen zeigen im Vergleich zu ihrem Ausgangswert eine höhere Zellzahl. Bei beiden Zellfraktionen ist der Unterschied zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen am Ende des Experiments am größten. Calcipotriol hingegen nimmt eine Sonderstellung ein. Unter Exposition dieses Wirkstoffs zeigt sich der Unterschied zwischen exponierten Zellen und der Kontrolle erst nach 48 h. Unter Calcipotriol ist am Ende des Versuchs nach 120 h Wirkstoffexposition kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Kontrolle und 100 nM Calcipotriol nachweisbar. Beide Zellfraktionen zeigen ein adäquates Bild.



**Abb. 32: Relative Zellzahl von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) innerhalb von 120 h.**

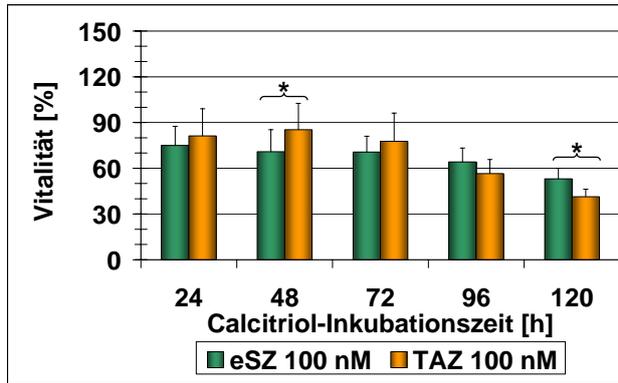
Wirkstoffinkubation am zweiten Tag der Zellkultur Vitalfärbung mit Gentianaviolett; nach Kollagen-IV-Isolierung Einsaat von  $7 \times 10^3$  Zellen/Well in 48er Mikrotiterplatten; erste Messung und Wirkstoffinkubation am zweiten Kulturtag; relative Werte bezogen auf Absolutwert unbehandelter Zellen am ersten Messtag (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant 0 nM vs. 100 nM;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 12 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney

Um die prozentuale Wachstumsreduktion der behandelten eSZ und TAZ direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die unbehandelten Zellen jedes Messzeitpunktes jeweils gleich 100 % gesetzt. Abb. 33 zeigt, dass das Wachstum der beiden Populationen durch die drei Vitamin-D3-Analoga um ca. 10-60 % reduziert wird. Calcitriol und Tacalcitol zeigen ähnliche Dimensionen bei der Wachstumsreduktion. Hier lassen sich zwar signifikante Unterschiede zwischen eSZ und TAZ erkennen, aber diese beruhen wahrscheinlich auf ungleichmäßig bewachsenen Wells. Hieraus lässt sich keine valide Aussage ableiten.

Unter Calcipotriol findet eine Wachstumsreduktion von maximal 40 % statt. Der wachstumsreduzierende Effekt erscheint damit gering im Vergleich zu Tacalcitol und

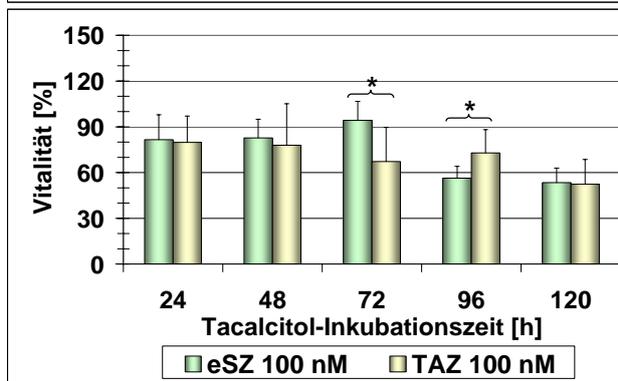
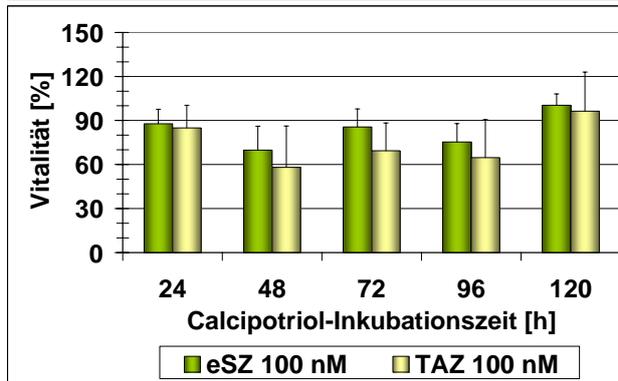
Calcitriol. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen eSZ und TAZ zu erkennen.



**Abb. 33:** Vergleich der relativen Zellzahl von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol innerhalb von 120 h.

Relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ); Vitalfärbung mit Gentianaviolett

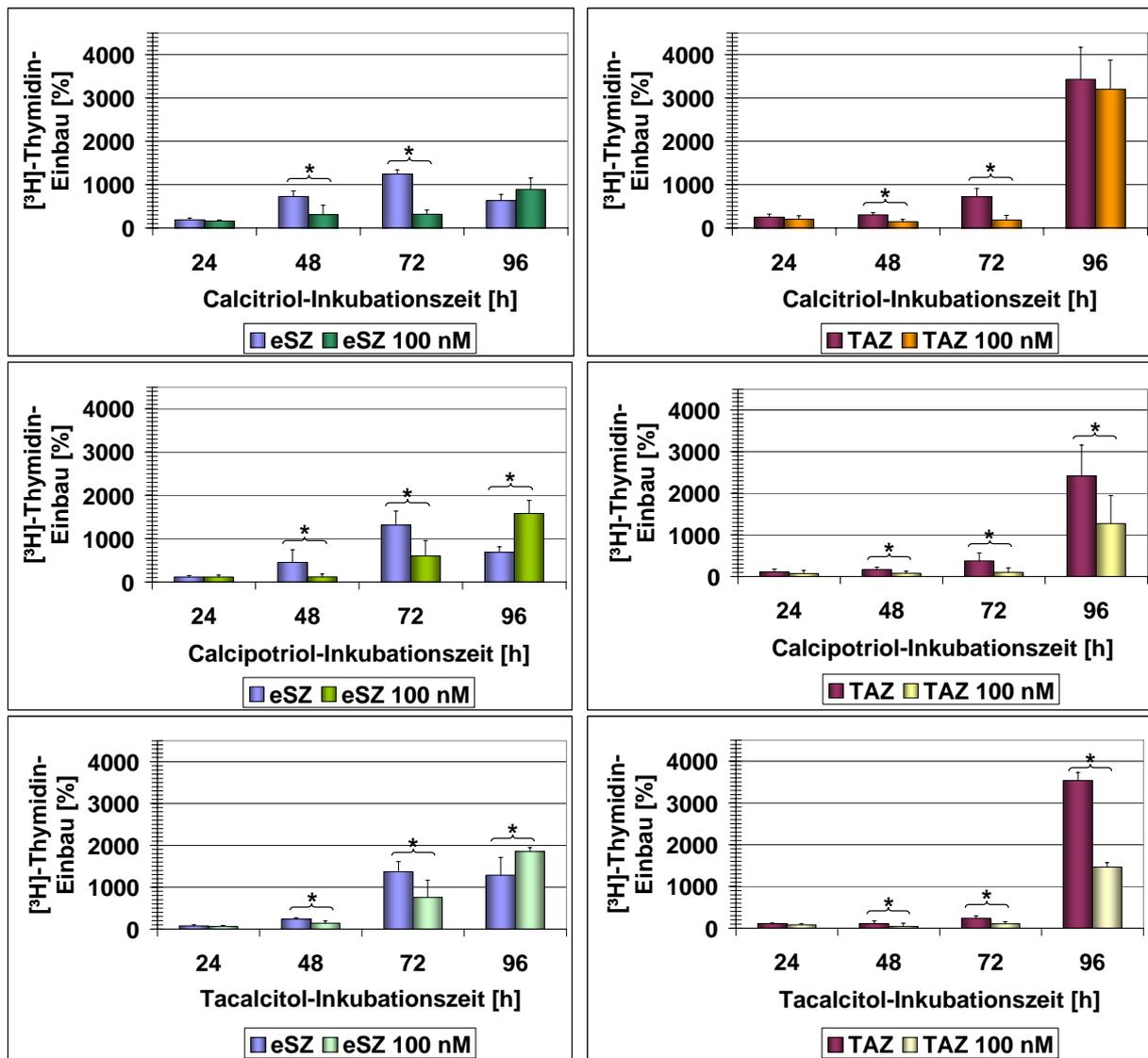
\* signifikant eSZ vs. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 12 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney



## 4.5.2 [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau

Für diesen Versuch wurden die Zellen in 24er MTP ausgesät. Die Messung von nukleärem [<sup>3</sup>H]-Thymidin erfolgte analog Kapitel 4.2.3 innerhalb der ersten sieben Kulturstage. Die Wirkstoffinkubation mit jeweils 100 nM fand am dritten Kulturtag statt (Kapitel 3.2.10). An diesem Tag erfolgte auch die erste Messung unbehandelter Zellen als Bezugswert für die nachfolgend gewonnenen Messwerte. Der Bezugswert für die jeweilige Zellfraktion wurde gleich 100 % gesetzt.

Im Zeitraum von 48 h bis 72 h ist der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin unter Wirkstoffexposition bei eSZ und TAZ bei allen drei Wirkstoffen signifikant geringer als bei der jeweiligen Kontrolle (Abb. 34). Die Reduktion des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus ist bei eSZ bis zu 72 h signifikant, bei TAZ, mit Ausnahme bei Calcitriol, bis zu 96 h. Während die DNA-Synthese der unbehandelten Zellen der Fraktion der eSZ von 24 h bis 72 h kontinuierlich zunimmt, sinkt diese Synthese nach 96 h bei Versuchsende stark ab. Die DNA-Syntheseleistung wirkstoffinkubierter Zellen wird zwar reduziert, aber nicht vollständig gestoppt. Im zeitlichen Verlauf steigt auch hier die Syntheserate im Vergleich zum Ausgangswert an. Dadurch ist bei der eSZ-Fraktion nach 96 h die DNA-Synthese unbehandelter Zellen sogar signifikant geringer als unter Wirkstoffexposition, mit Ausnahme bei Calcitriol. Bei den unbehandelten Zellen der TAZ-Fraktion ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Hier steigt die S-Phase-Aktivität von unbehandelten sowie behandelten Zellen nach 96 h im Vergleich zu 72 h sehr stark an.



**Abb. 34:** [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau bei epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) innerhalb von 96 h.

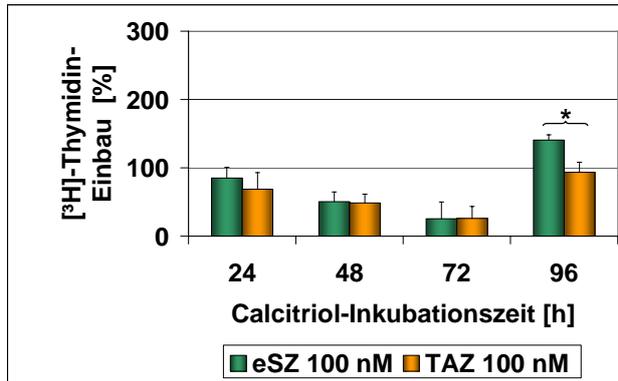
Nach Kollagen-IV-Isolierung Einsaat von 10x 10<sup>3</sup> Zellen/Well in 24er Mikrotiterplatten; erste Messung sowie Wirkstoffinkubation am dritten Kulturtag; relative Werte bezogen auf Absolutwert unbehandelter Zellen am ersten Messtag (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant 0 nM vs. 100 nM; p ≤ 0,05; n = 6 (jeweils 1 Einzelwert pro Messung); Test nach Mann-Whitney

Um das Ausmaß der Reduktion des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus von eSZ und TAZ direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Kontrolle zum jeweiligen Messzeitpunkt gleich 100 % gesetzt (siehe Vitalfärbung 4.3.3.1).

In Abb. 35 lässt sich erkennen, dass es in der Reduktion des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus innerhalb von 72 h zwischen eSZ und TAZ keinen Unterschied gibt. Beide Zellfraktionen werden gleichermaßen durch die drei Wirkstoffe in ihrer DNA-Synthese um ca. 15-70 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Vergleicht man beide Zellpopulationen nach 96 h

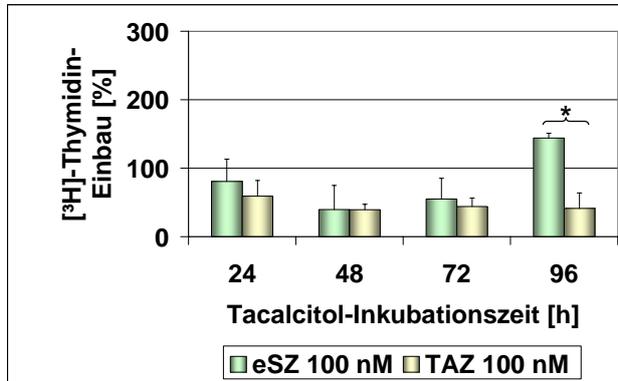
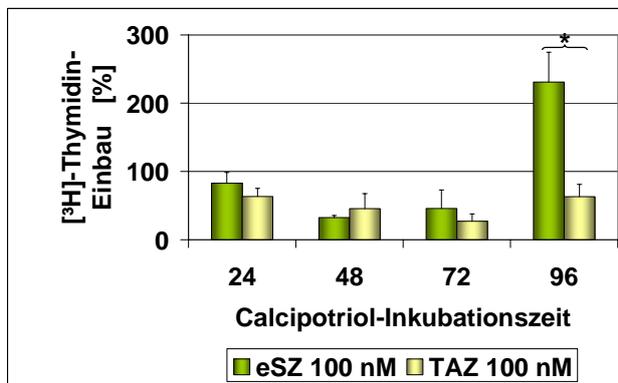
miteinander, so lässt sich ein signifikanter Unterschied erkennen. Bei den behandelten eSZ zeigt sich eine signifikant höhere S-Phase-Aktivität als bei den behandelten TAZ.



**Abb. 35: Vergleich des  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaus von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol innerhalb von 96 h.**

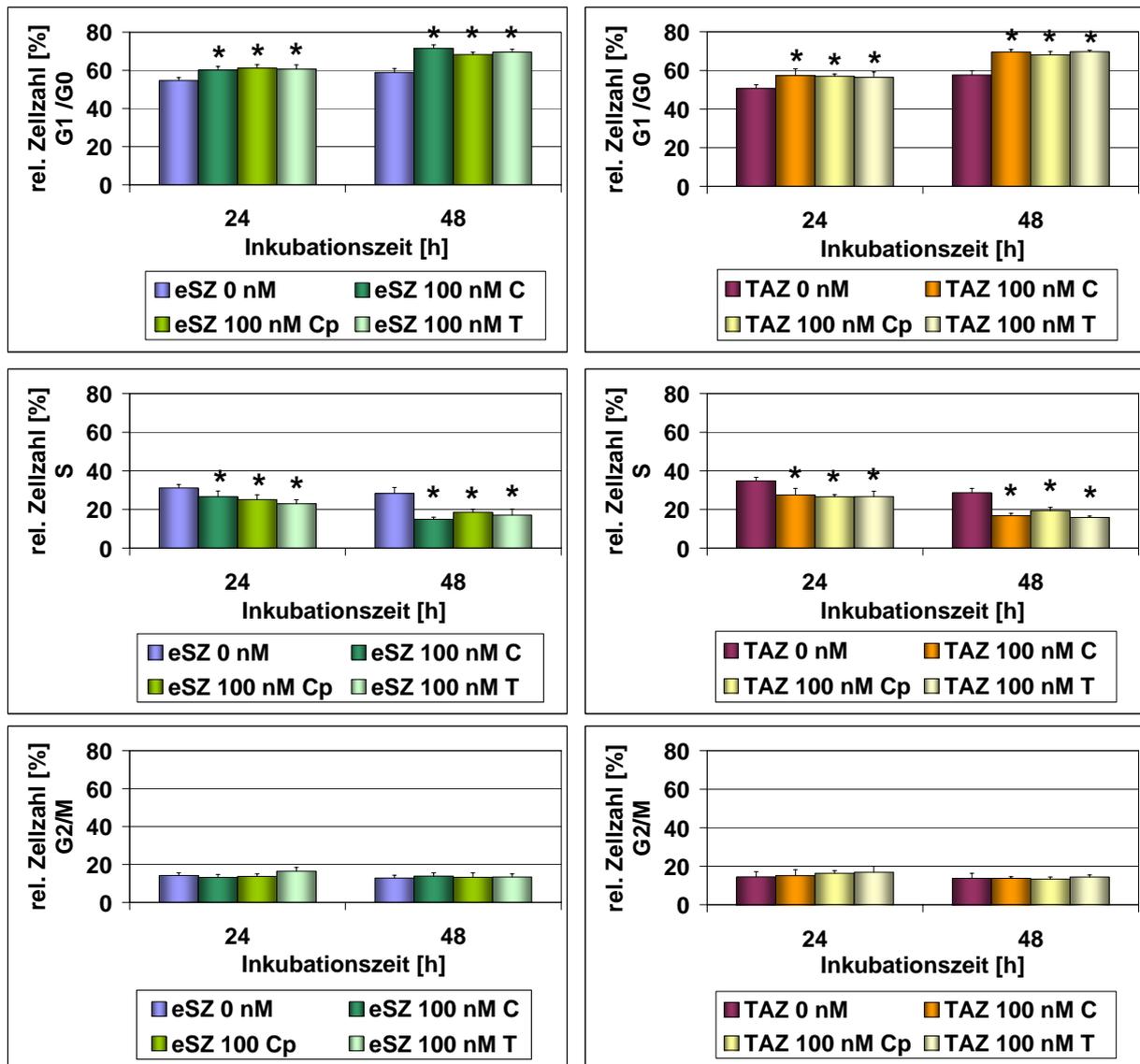
Relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant eSZ vs. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  (jeweils 1 Einzelwert pro Messung); Test nach Mann-Whitney



### 4.5.3 Zellzyklusanalyse

Für diese Untersuchung wurden die beiden Zellfraktionen in 250-ml-Kulturflaschen kultiviert. Die Wirkstoffinkubation erfolgte am vierten Kulturtag bei einer Konfluenz von ca. 30-40 %. Nach 24 und 48 h wurde die Zellzyklusanalyse durchgeführt. Exponierte Zellen und Kontrolle der jeweiligen Zellfraktion wurden miteinander verglichen (Abb. 36). Die dargestellten Werte zeigen die prozentuale Verteilung der Zellen in G1/G0-, S- und G2/M-Phase.



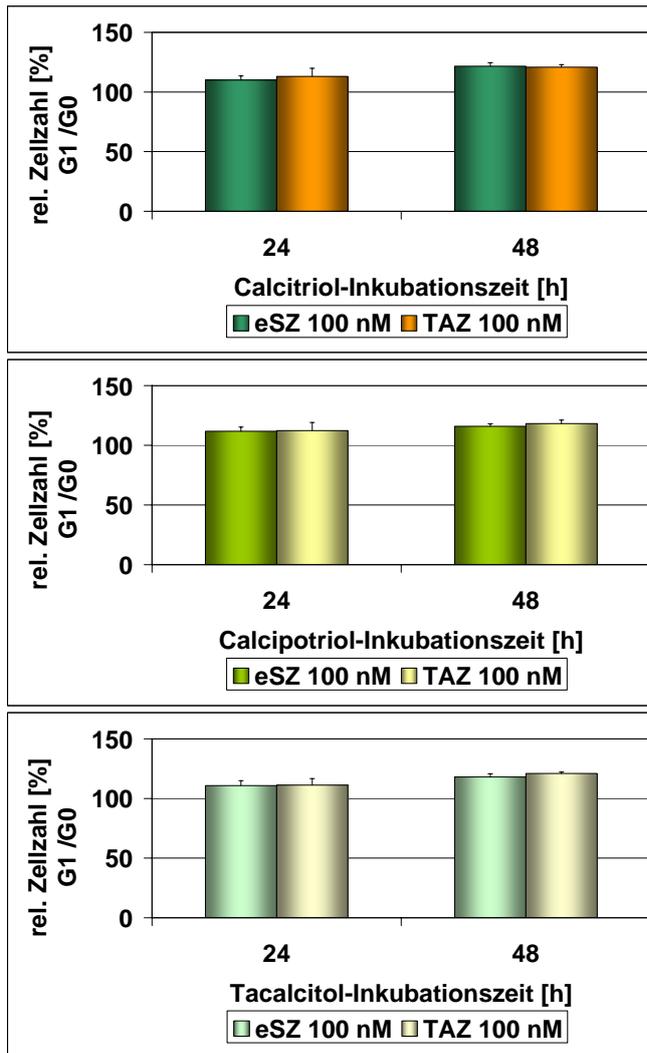
**Abb. 36: Zellzyklus-Analyse epidermaler Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierender Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).**

Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz; durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts durch Färbung mit Propidiumiodid; relative Werte zeigen prozentualen Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase.

\* signifikant 0 nM vs. 100 nM;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung), einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

In der G1/G0-Phase (Ruhephase) und in der S-Phase (Synthesephase) zeigen sich bei beiden Zellfraktionen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und exponierten Zellen (Abb. 36). In der G2/M-Phase (Mitosephase) ist während des gesamten Untersuchungszeitraums kein signifikanter Wirksamkeitseffekt festzustellen. Alle drei Substanzen sind im Ausmaß ihrer Wirkung vergleichbar.

Die Wirkstoffexposition für 24 h und 48 h zeigt eine signifikante Akkumulation von 9-22 % in der G1/G0-Phase sowie die signifikante Reduktion der S-Phase-Aktivität von 14-47 %.



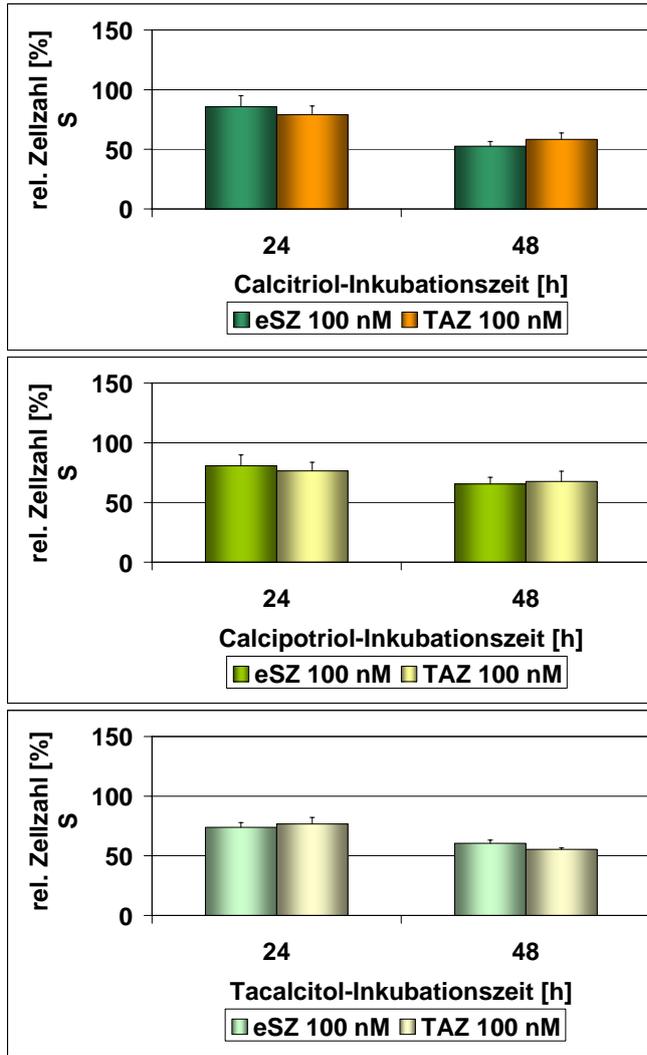
**Abb. 37: Vergleich von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) in der G0/G1-Phase unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h.**

Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz); durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts durch Färbung mit Propidiumiodid; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

nicht signifikant eSZ vs. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \geq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney bzw. t-Test

Um den Effekt auf G0/G1-, S- sowie G2/M-Phase von eSZ und TAZ direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Kontrollwerte zum jeweiligen Messzeitpunkt gleich 100 % gesetzt (Abb. 37, Abb. 38, Abb. 39).

Zwischen den beiden Zellfraktionen wurden keine signifikanten Unterschiede in der G0/G1- und S-Phase ermittelt. Nur unter Calcipotriol zeigen sich nach 24 h in der TAZ-Fraktion signifikant mehr Zellen in der G2/M-Phase als in der eSZ-Fraktion (Abb. 39).



**Abb. 38:** Vergleich von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) in der S-Phase unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h.

Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz); durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts durch Färbung mit Propidiumiodid; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

nicht signifikant eSZ vs. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \geq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney bzw. t-Test

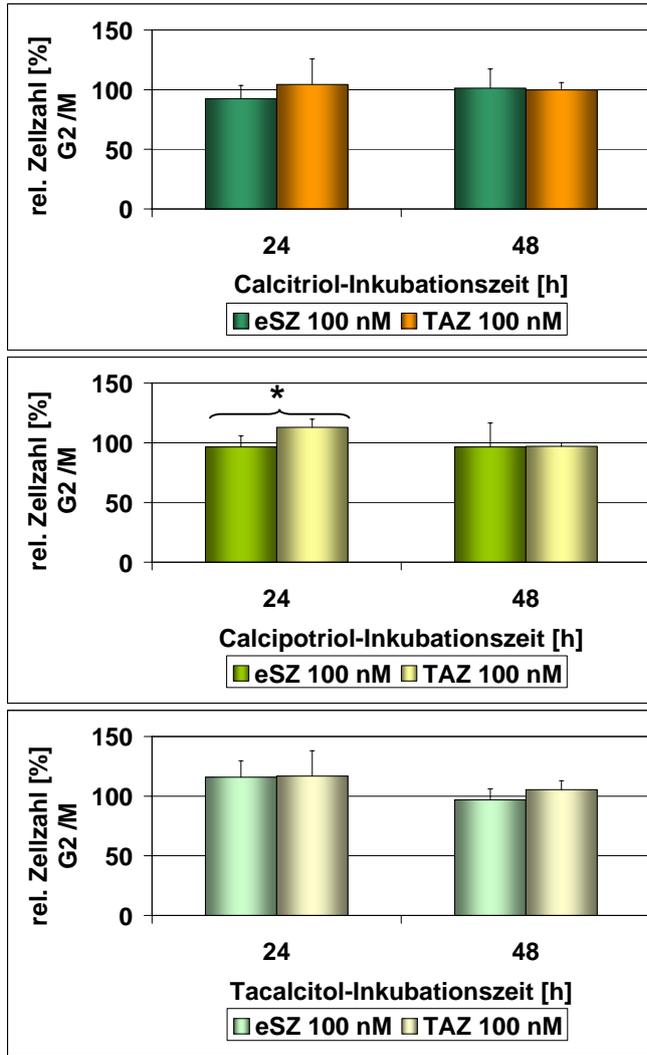


Abb. 39: Vergleich von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) in der G2/M-Phase unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h.

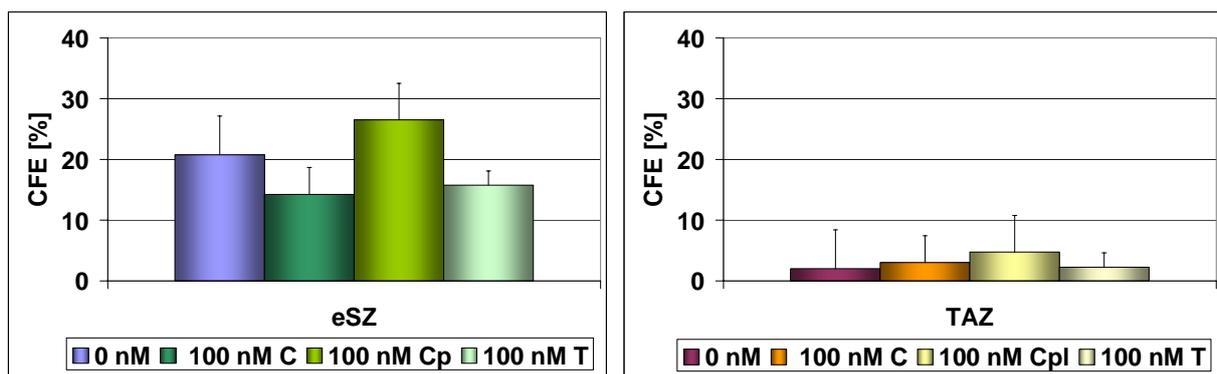
Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz); Durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts durch Färbung mit Propidiumiodid; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant eSZ vs. TAZ zur jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney bzw. t-Test

### 4.5.4 Koloniebildungseffizienz

Um den Einfluss der Vitamin-D3-Analoga auf die Regenerationskapazität sowie Proliferationskapazität von eSZ und TAZ zu testen, wurde die Koloniebildungseffizienz als Methode genutzt (siehe Kapitel 3.2.11). Die Exposition der Zellen erfolgte am siebten Kulturtag mit je 100 nM Wirkstoff. Nach sieben Tagen Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde der Versuch beendet und die Kolonien pro Kulturschale erfasst.

Abb. 40 zeigt die Koloniebildungseffizienz von eSZ und TAZ unter Stoffeinfuss im Vergleich zur Kontrolle. Die jeweilige Anzahl der Kolonien unterlag einer großen Streuung. So konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen exponierten Zellen einer Fraktion und ihrer Kontrolle gefunden werden. Bei eSZ sind unter Calcitriol sowie Tacalcitol die Tendenz zu einer reduzierten Anzahl an Kolonien zu erkennen, währenddessen Calcipotriol sogar tendenziell höhere Werte als die Kontrolle zeigt. Bei TAZ liegt die Kontrolle unter den Werten der exponierten Zellen.

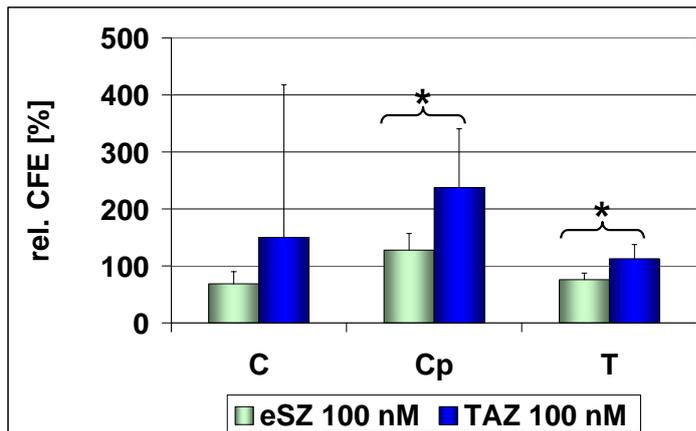


**Abb. 40: Koloniebildungseffizienz (CFE %) von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle nach 14 d.**

*Wirkstoffinkubation am siebten Kulturtag; Vitalfärbung der Kolonien mit Gentianaviolett; Vermessung und Zählung der Kolonien anhand digitaler Aufnahmen mit Hilfe Cell<sup>R</sup> Imaging-Software; Berechnung der CFE unter Ausschluss abortiver Kolonien (Durchmesser < 2 mm); CFE = Ratio aus Koloniezahl und eingesäter Zellzahl x 100 % [44].*

*nicht signifikant, n = 3 (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); p ≥ 0,05; Kruskal-Wallis-Test (Dunnnett-Test)*

Werden die Werte der Koloniebildungseffizienz unter Stoffexposition als Prozentsatz der Kontrolle (0 nM=100%) berechnet (Abb. 41), lassen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen erkennen. Hier zeigt sich ein stärkerer proliferationsreduzierender Stoffeinfuss auf eSZ. Bei Calcipotriol und Tacalcitol sind diese Unterschiede signifikant. Bei Calcitriol lassen sich ähnliche Tendenzen erkennen, doch aufgrund der hohen Standardabweichung ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

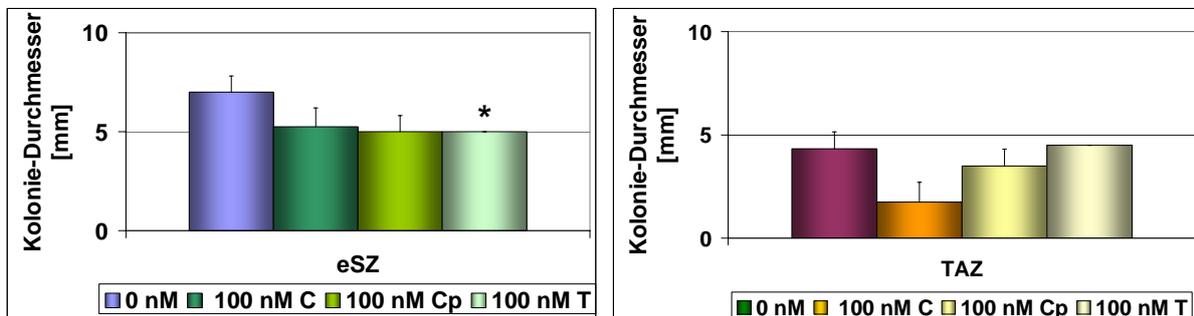


**Abb. 41:** Vergleich der Koloniebildungseffizienz von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 14 d.

Wirkstoffinkubation am siebten Kulturtag; Vitalfärbung der Kolonien mit Gentianaviolett; Vermessung und Zählung der Kolonien anhand digitaler Aufnahmen mit Hilfe Cell<sup>^</sup>R Imaging-Software; Berechnung der Koloniebildungseffizienz unter Ausschluss abortiver Kolonien (Durchmesser < 2 mm); CFE = Ratio aus Koloniezahl und eingesäter Zellzahl x 100 % [44], relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant eSZ vs. TAZ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); Test nach Mann-Whitney

Bei der Betrachtung der Größe der Kolonien unter Stoffeinfluss (Abb. 42) ist eine Tendenz zur Verringerung des Kolonie-Durchmessers bei beiden Zellfraktionen zu erkennen. Bei eSZ ist der Unterschied zur Kontrolle bei Tacalcitol signifikant. Jedoch ist auch hier die Streuung z.T. so groß, dass sich keine Signifikanz ergibt.



**Abb. 42:** Koloniedurchmesser (mm) von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle nach 14 d.

Wirkstoffinkubation am siebten Kulturtag; Vitalfärbung der Kolonien mit Gentianaviolett; Vermessung und Zählung der Kolonien anhand digitaler Aufnahmen mit Hilfe Cell<sup>^</sup>R Imaging-Software.

\* signifikant 0 nM vs. 100 nM;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  (jeweils 3 Einzelwerte pro Messung); einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

Der direkte Vergleich der exponierten eSZ und TAZ (Abb. 43) zeigt nur bei Tacalcitol einen signifikanten Unterschied. eSZ werden stärker in ihrem Wachstum gehemmt als TAZ.

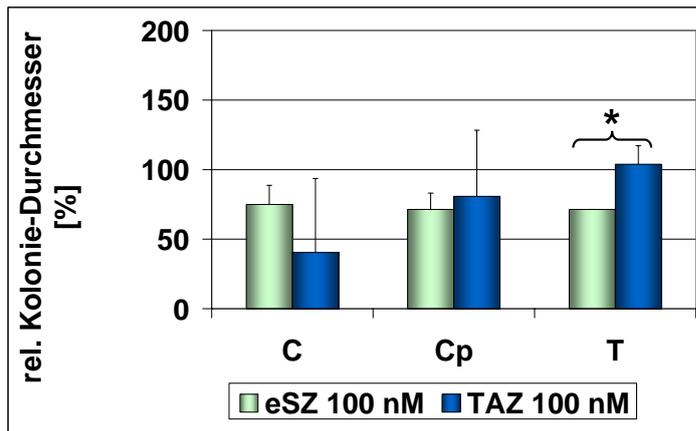


Abb. 43: Vergleich des Koloniedurchmessers exponierter epidermaler Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierender Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 14 d.

Wirkstoffinkubation am siebten Kulturtag; Vitalfärbung der Kolonien mit Gentianaviolett; Vermessung der Kolonien anhand digitaler Aufnahmen mit Hilfe Cell<sup>^</sup>R Imaging-Software, relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle (entspricht 100 % eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant eSZ vs. TAZ;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ ; Test nach Mann-Whitney

## 4.6 Einfluss der Vitamin-D3-Analoga auf Stammzellmarker

### 4.6.1 $\beta$ 1-Integrin

Eine der interessantesten Untersuchungen lag in der Bestimmung des etablierten Stammzellmarkers  $\beta$ 1-Integrin nach Exposition mit den drei Vitamin-D3-Analoga. Die Kultivierung erfolgte wie bei der Zellzyklusanalyse (Kapitel 4.5.3) in 250-ml-Kulturflaschen. Die Wirkstoffinkubation erfolgte am vierten Kulturtag bei einer Konfluenz von ca. 30-40 %. Die  $\beta$ 1-Integrin-Expression wurde nach 24 h und 48 h Wirkstoff-Inkubation (100 nM) durchflusszytometrisch bestimmt. Für den direkten Vergleich wurden die Kontrollwerte der einzelnen Messpunkte gleich 100 % gesetzt.

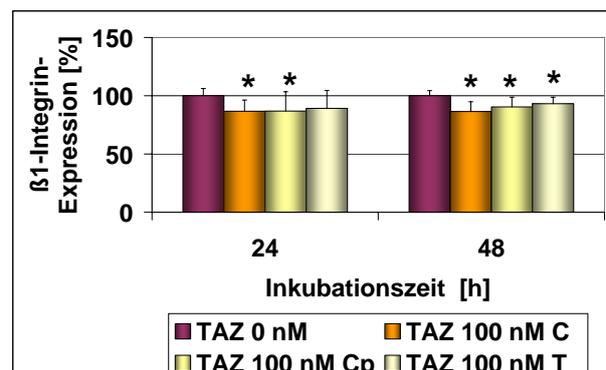
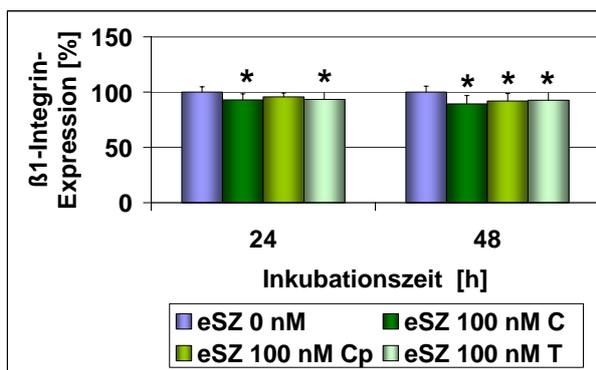
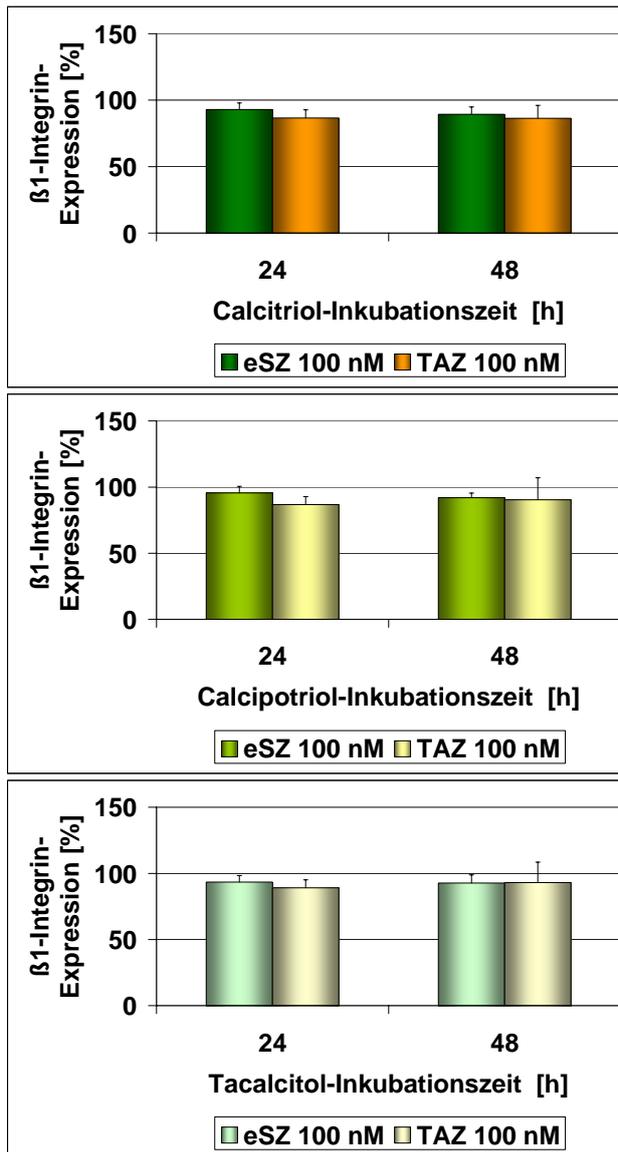


Abb. 44:  $\beta$ 1-Integrin-Expression bei epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).

Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz]; durchflusszytometrische Messung; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ). \* signifikant 0 nM vs. 100 nM nach der jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ ; einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

Abb. 44 stellt die relative  $\beta 1$ -Integrin-Expression von eSZ und TAZ in je einem Diagramm dar. In beiden Diagrammen zeigt sich eine signifikante Reduktion der  $\beta 1$ -Integrin-Expression der exponierten Zellen nach 24 h und 48 h. Das Ausmaß der Reduktion ist relativ gering und liegt zwischen 7-14 %.

Der direkte Vergleich von eSZ und TAZ (Abb. 45) zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der Reduktion des Oberflächenmarkers. Diese Wirkung scheint zwischen beiden Zellpopulationen ähnlich stark ausgeprägt zu sein.



**Abb. 45: Vergleich der  $\beta 1$ -Integrin-Expression von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 und 48 h.**

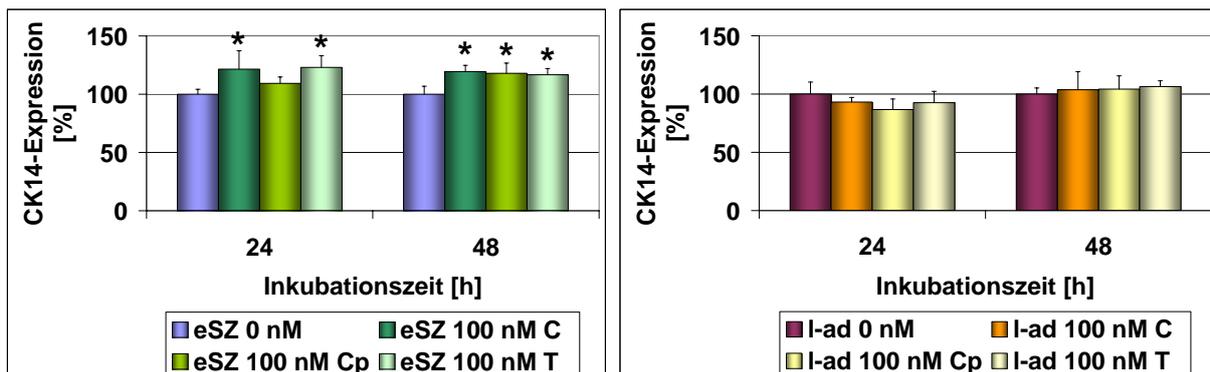
Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz); durchflusszytometrische Messung; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ). nicht signifikant eSZ vs. TAZ;  $p \geq 0,05$ ;  $n = 3$ , Test nach Mann-Whitney

#### 4.6.2 Cytokeratin 14

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Wirkung der Vitamin-D3-Analoga auf die beiden Zellpopulationen eSZ und TAZ war die Untersuchung der Expression von Zytoskelettproteinen. Die Kultivierung erfolgte auch hier in 250-ml-Kulturflaschen. Bei einer

Konfluenz von ca. 30-40 % wurden die Zellen mit Wirkstoff inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurde das intrazelluläre CK14 durchflusszytometrisch vermessen. Auch hier wurden zum direkten Vergleich die jeweiligen Kontrollwerte gleich 100 % gesetzt.

Das Diagramm der eSZ in Abb. 46 zeigt, mit Ausnahme des 24 h-Wertes von Calcipotriol, einen signifikanten Anstieg der CK14-Expression über den gesamten Messzeitraum von 48 h im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte der exponierten eSZ zeigen dabei einen CK14-Anstieg von bis zu 23 % gegenüber der Kontrolle. TAZ dagegen weisen ein konstantes Level an CK14 im Vergleich zur Kontrolle auf.



**Abb. 46: Relative CK14-Expression in % bei epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM).**

Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz); durchflusszytometrische Messung; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant 0 nM vs. 100 nM nach der jeweiligen Inkubationszeit;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ ; einfache Varianzanalyse (Dunn-Test)

Beim Vergleich der beiden Zellfraktionen zeigen sich in Abb. 47 nach 24 h bei allen drei Wirkstoffen signifikante Unterschiede in der CK14-Expression zwischen eSZ und TAZ. Mit Ausnahme von Tacalcitol sind diese signifikanten Differenzen in einem geringeren Ausmaß auch noch nach 48 h vorhanden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass eSZ unter den Vitamin-D3-Analoga signifikant mehr Zytoskelettprotein exprimiert, während bei TAZ diese Erhöhung nicht einsetzt.

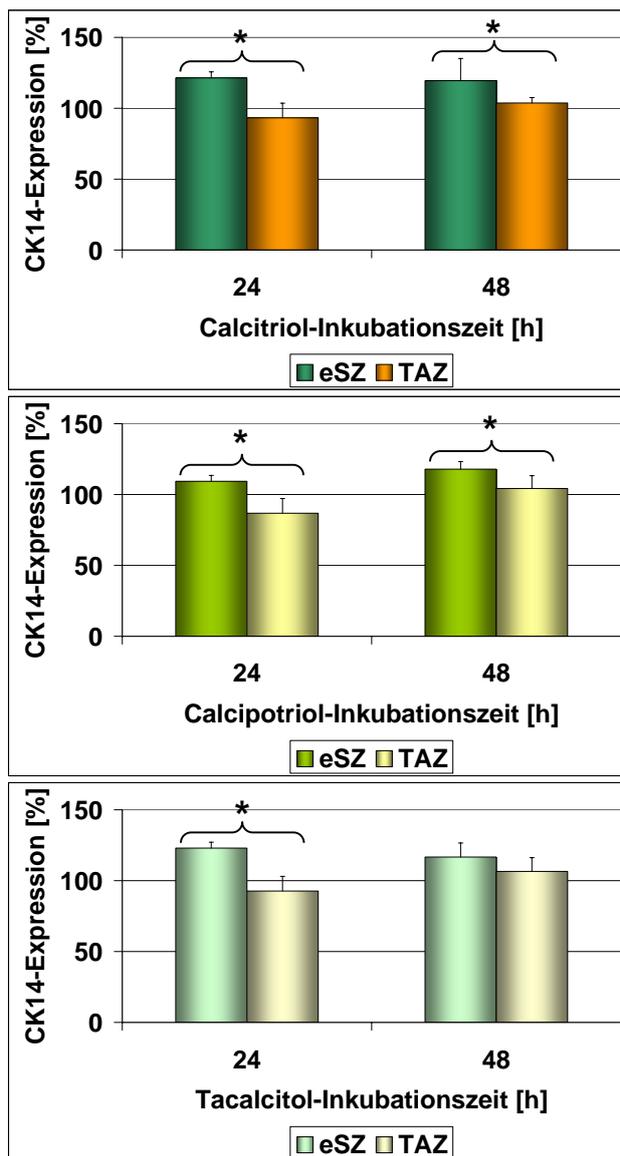


Abb. 47: Vergleich der CK14-Expression von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 und 48 h.

Wirkstoffinkubation am vierten Kulturtag (30-40% Konfluenz); durchflusszytometrische Messung; relative Werte bezogen auf Absolutwert der Kontrolle jedes Messzeitpunktes (entspricht 100 % für eSZ bzw. TAZ).

\* signifikant eSZ vs. TAZ zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt;  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  Test nach Mann-Whitney bzw. t-Test

## 5 Diskussion

### 5.1 Umsetzung und Optimierung der Methode der Kollagen-IV-Adhärenz zur Separation putativer epidermaler Stammzellen und deren determinierten Tochterzellen aus einer Basalzellkultur

Basis der vorliegenden Arbeit war die Definition von validen Parametern für die Kollagen-IV-Isolierung zur Separation epidermaler Stammzellen sowie proliferativer Keratinozyten höherer Differenzierungsstufe. Ziel war es zunächst, aus einer Basalzellkultur eine Fraktion epidermaler Stammzellen anzureichern. Resultierend aus der starken Kollagen-IV-Affinität epidermaler Stammzellen (siehe Kapitel 2.1.6.1) war dafür die *Adhäsionszeit* zur Gewinnung dieses Zelltyps der entscheidende Parameter für die Selektivität und die Qualität dieser Methode. In der Literatur variieren die Adhäsionszeiten zur Diskriminierung der Stammzellpopulation, der so genannten schnell-adhärenen Fraktion (s-ad) zwischen 5 [194], 10 [23, 24] und 20 min [16][195]. Um festzustellen, welchen Einfluss die unterschiedlichen Adhäsionszeiten auf die Stammzell-Selektivität der Methode haben, wurde in Abhängigkeit von der Adhäsionszeit die Expression des basalen Oberflächenmarkers  $\beta$ 1-Integrin gemessen, wobei epidermale Stammzellen die höchste  $\beta$ 1-Integrin-Expression aufweisen [16][23, 24][194, 195]. Bei dem Versuch 4.1.2 zeigte sich zwischen den Adhäsionszeiten 5 min und 10 min kein signifikanter Unterschied in der  $\beta$ 1-Integrin-Expression der jeweiligen Zellfraktion. Dagegen war bei einer Adhäsionszeit von 20 min das  $\beta$ 1-Integrin-Signal der Zellpopulation signifikant geringer als bei 5 min und 10 min und lässt vermuten, dass innerhalb dieses Zeitraumes vermehrt auch Zellen mit weniger

$\beta$ 1-Integrin binden können. Daraus resultiert eine insgesamt geringere mittlere Fluoreszenzintensität und somit eine Verringerung der Selektivität der Methode nach 10 min.

Im zeitlichen Verlauf war die Zunahme der adhärenierenden Zellen nahezu konstant. Dies zeigt, dass die Kollagen-IV-Schicht nach 20 min noch ausreichend Zellbindungskapazitäten besitzt. Die aufgetragene Zellmenge mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro 60-mm-Kulturschale (siehe Kapitel 3.2.4) führt demzufolge nicht zu einer zellulären Übersättigung der Kollagen-IV-Schicht. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu unspezifischen Bindungen kommt.

Analog zur Literatur [23-24][195] erfolgte die weitere Auftrennung der Basalzellkultur in langsam-adhärente (l-ad) und nicht-adhärente (n-ad) Zellen (siehe Kapitel 3.2.4). Aus Voruntersuchungen (nicht gezeigt) war bekannt, dass nach einer Inkubationszeit von 24 h keine Zelladhärenz an Kollagen IV mehr stattfindet. Deshalb wurde zur Diskriminierung von langsam- und nicht-adhärenenten Zellen eine Adhäsionszeit von 24 h gewählt. Die Untersuchung der  $\beta$ 1-Integrin-Expression unter 4.1.2 zeigt deutlich, dass aus dieser Isolierung drei differente Zellpopulationen resultieren. Dabei besitzt die schnell-adhärente Fraktion die höchste Expression des Oberflächenproteins. Die hier gemessenen Integrinlevel beschreiben auch andere Arbeitsgruppen für ihre Stammzellisolierung mit Kollagen IV [16][43][194]. Die geringste Expression besitzt die nicht-adhärente Zellfraktion. Das  $\beta$ 1-Integrin-Signal dieser Fraktion entspricht nur noch etwa ein Zehntel des  $\beta$ 1-Integrinsignals der schnell-adhärenenten Fraktion. Dies kennzeichnet den hohen Differenzierungsgrad dieser Zellen [16][19], der mit dem Verlust der Bindungsfähigkeit des  $\beta$ 1-Integrins einhergeht [122]. Des Weiteren zeigt die durchflusszytometrische Zelltodcharakterisierung in 4.1.2, dass der Hauptteil der nicht-adhärenenten Zellen avital ist. Bei dem hohen Anteil an spätapoptotisch/nekrotischen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Zellen, die schon vor der Kollagen-IV-Isolierung als Folge der Präparation geschädigt und aufgrund dessen nicht mehr adhärenzfähig waren. Dieser Zellanteil kann aber z.T. auch Endergebnis des fortschreitenden Differenzierungsprozesses sein [196]. Darauf weist auch der signifikant höhere apoptotische Zellanteil der nicht-adhärenenten Zellfraktion hin und ist neben dem Verlust von ligandenbindungsfähigen Adhäsionsproteinen sowie Zellzyklusarrest [16][122] Ausdruck des Differenzierungsprozesses dieser Zellen. Da für die Kultivierbarkeit nativer Keratinozyten die Adhärenzfähigkeit der Zellen Voraussetzung ist, schied die nicht adhärenzfähige dritte Zellfraktion für weitere Untersuchungen aus.

Die schnell- und die langsam-adhärente Zellfraktion zeigen im Vergleich zur nicht-adhärenenten Zellfraktion einen sehr hohen Anteil vitaler Zellen. Während Apoptose bei den beiden Zellfraktionen keine Rolle spielt, beträgt der nekrotisch/spätapoptotische Zellanteil der schnell-adhärenenten Fraktion ca. 14 % und ist auch signifikant höher als bei der

langsam-adhärenenten Fraktion mit 9,7 % nekrotisch/spätapoptotischen Zellen. Jedoch kann auf Grund der Zahlen trotz Signifikanz von einem vergleichbaren Anteil ausgegangen werden.

Die für die weitere Versuchsplanung erfassten Proportionen der vitalen Zellmengen der isolierten drei Fraktionen unter 4.1.2 sind mit der Literatur vergleichbar. So fanden z.B. Jones und Watt 1993 [16] anhand der  $\beta$ 1-Integrin-Expression gekoppelten durchflusszytometrischen Sortierung ähnliche Relationen.

## **5.2 Vergleich der Kollagen-IV-adhärenenten Zellfraktionen hinsichtlich des Proliferationsverhaltens sowie des Phänotyps**

Zur Identifizierung der schnell-adhärenenten Zellen als putative Stammzellfraktion erfolgte in diesem Abschnitt eine vergleichende Charakterisierung der beiden Kollagen-IV-isolierten Zellfraktionen schnell- und langsam-adhärenent. Hier sollte dokumentiert werden wie sich das *in-vitro* Verhalten unter den gewählten Kulturbedingungen (siehe Kapitel 3.2.2) darstellt.

### **5.2.1 Vergleich des Proliferationsverhaltens**

Ein Hauptmerkmal von epidermalen Stammzellen ist ihre hohe Proliferationskapazität im Vergleich zu anderen Keratinozyten höherer Differenzierungsstufe [16][19]. Die Untersuchungen mit den hier verwendeten vier proliferationsindizierenden Methoden dokumentieren die Proliferation der schnell- sowie der langsam-adhärenenten Zellfraktion in einem Zeitfenster von insgesamt 14 Tagen Kulturdauer. Langzeitproliferationsuntersuchungen wurden nicht durchgeführt, um Effekte der Zelldifferenzierung zu minimieren. Aufgrund dessen wurden die Experimente ausschließlich mit Zellen der ersten Passage durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2).

Als Momentaufnahme der Zellproliferation erfolgte die Zellzyklusanalyse (siehe Kapitel 4.2.1) direkt nach der Auftrennung in schnell-adhärenente und langsam-adhärenente Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich zunächst bei der mutmaßlich stammzelltypischen, schnell-adhärenenten Fraktion mehr Zellen in der Synthesephase befinden als bei der langsam-adhärenenten. Dies steht konträr zu publizierten Daten, bei denen Zellen des Stammzellphänotyps vermehrt in der Ruhephase zu finden sind [7][29][87, 88]. Ein möglicher Erklärungsansatz sind die hier verwendeten serumfreien Kultivierungsbedingungen ohne Feederzellen. Im Gegensatz dazu wurden die publizierten Resultate jedoch meist mit

Keratinocyten in Feederzellkultur erzielt. Bei diesen Feederzellen handelt es sich meist um Mausfibroblasten, mit Hilfe derer das Umgebungsmilieu der epidermalen Stammzellen in der Haut stärker imitiert wird als es unter den hier gewählten mitogenen Bedingungen (niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und EGF, BPE im Medium) ohne Feederzellen erfolgt. Die stärkere Proliferationsaktivierung der schnell-adhärenenten Zellen könnte die Stammzellaktivierung nach Gewebetraumatisierung als Reaktion der Zellen auf die „fremden“ Kulturbedingungen (siehe Kapitel 2.1.2.) widerspiegeln. Eine weitere Variante der Erklärung für dieses Verhalten liegt in der Kollagen-IV-Isolierung. Dabei triggert die  $\beta 1$ -Integrin-vermittelte Adhäsion an Kollagen IV die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors. Das führt zu einer Aktivierung des MAPKinase-Signalwegs und fördert so das Voranschreiten des Zellzyklusses [197, 198]. Da die schnell-adhärenente Fraktion die höchste  $\beta 1$ -Integrin-Expression besitzt, kann hier die Zellzyklusprogression stärker induziert werden als bei langsam-adhärenenten Zellen. Diese Aktivierung bleibt initial auch in der Zellkultur erhalten. Die aufgezeichneten Wachstumskurven von Vitalfärbung (4.2.2) und [ $^3\text{H}$ ] Thymidin-Einbau (4.2.3) zeigen bei gleicher Einsaatmenge eine signifikant stärkere Proliferationsaktivität bei schnell-adhärenenten Zellen. In Abhängigkeit von der Messmethode sind die Differenzen zwischen schnell-adhärenenten und langsam-adhärenenten Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt. Während bei der Vitalfärbung für die langsam-adhärenente Zellfraktion eine bis zu 26 % geringere Proliferation im Vergleich zur schnell-adhärenenten Fraktion gemessen wurde, konnte beim [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau für diese Zellfraktion eine bis zu 70 % geringere Proliferation detektiert werden. Warum die detektierten Unterschiede zwischen den beiden Zellfraktionen bei Vitalfärbung und [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau verschieden stark ausgeprägt sind, könnte durch die unterschiedliche Wachstumskinetik beider Zellklassen begründet sein. Auffällig bei der Wachstumskurve mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin ist, dass bei der schnell-adhärenenten Fraktion die Menge an [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin über den Versuchszeitraum kontinuierlich ansteigt, während bei der langsam-adhärenenten Zellfraktion der Einbau des DNA-Bausteins zunächst nur geringfügig zunimmt und erst am siebten Kulturtag der [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau stark ansteigt. Daraus resultieren die größeren Unterschiede zwischen schnell- und langsam-adhärenenten Zellen im Vergleich zu den Ergebnissen der Vitalfärbung. In der Literatur wird für die Population der transient amplifizierenden Zellen das Maximum der Proliferation nach 7 bis 9 Tagen bei einem Konfluenzgrad von 50-75 % beschrieben [199]. Dies entspricht den Daten des [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbaus für die langsam-adhärenente Fraktion.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Wachstumskurven von Vitalfärbung und [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau besteht zum Versuchsende am siebten Kulturtag. Die Vitalfärbung zeigt bei schnell- sowie langsam-adhärenenter Zellfraktion eine Zellzunahme. Dagegen lässt sich im [ $^3\text{H}$ ] Thymidin-Einbau bei der schnell-adhärenenten Zellfraktion bei Versuchsende ein Absinken der DNA-Synthese erkennen. Dies beruht wahrscheinlich auf einer

konfluenzbedingten Wachstumshemmung der schnell-adhärenenten Zellfraktion als Folge der schneller eintretenden höheren Zelldichte [200]. Dadurch wird die Proliferationsaktivität der Zellen stark abgebremst und so gleichen sich die Syntheserate schnell- und langsam-adhärenenter Zellen zum Versuchsende an. Allerdings gibt es in der Literatur auch Hinweise für ein unterschiedliches Verhalten der beiden Zellfraktionen unter konfluenten Bedingungen. In einer Studie wurde dokumentiert, dass die Population der epidermalen Stammzellen nach Erreichen der Konfluenz arretiert und in die Ruhephase eintritt. Im Gegensatz dazu bleiben die transient amplifizierenden Tochterzellen auch unter postkonfluenten Bedingungen im Zellzyklus aktiv, bis die Enddifferenzierung einsetzt [199].

Dieser Einfluss wurde bei anschließenden Versuchen berücksichtigt, indem der Konfluenzgrad bei Versuchsende maximal 80 % betragen durfte.

Bei der vierten proliferationsindizierenden Methode, der Bestimmung der Koloniebildungseffizienz (CFE), kann ein Einfluss durch Kontakthemmung ausgeschlossen werden. Dies gelingt durch den Einsatz von sehr geringen, so genannten klonalen, Einsaatmengen (siehe Kapitel 3.2.11). Damit kann davon ausgegangen werden, dass die entstehenden Zellkolonien jeweils aus *einer* Einzelzelle hervorgehen. Die Koloniebildungseffizienz wird daher in der Literatur auch als Surrogatparameter für die Proliferationskapazität herangezogen und dient *in vitro* zur Stammzellcharakterisierung [16][43][83, 85][195]. Die Bestimmung der Koloniebildungseffizienz in 4.2.4 zeigt, dass die schnell-adhärenente Fraktion die höchste Proliferationskapazität aufweist. Des Weiteren besitzen die Kolonien der schnell-adhärenenten Fraktion einen signifikant größeren Durchmesser als die der langsam-adhärenenten Fraktion und demonstrieren damit ihre längere Teilungs- und damit auch Regenerierungsfähigkeit. Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal die Stammzell-Charakteristik der schnell-adhärenenten Zellfraktion.

## 5.2.2 Phänotypischer Vergleich

Als Marker für das Zytoskelett wurde das ausschließlich basal exprimierte Zytokeratin 14 ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen Marker für proliferierende Basalzellen [201]. Da der Stammzellmarker Zytokeratin 15 nur *in vivo* in vitaler Vollhaut nachweisbar ist [11] und aus Voruntersuchungen (nicht gezeigt) hervorging, dass der Differenzierungsmarker Zytokeratin 10 nur sehr gering bzw. gar nicht in der Basalzellkultur exprimiert wird, wurde Zytokeratin 14 als typische Gerüstsubstanz der Basalzellschicht ausgewählt. Seine Expression ist an die Aktivierung des Zellzyklus gekoppelt und wird stark reduziert, wenn die Zelle den Zellzyklus verlässt und beginnt, sich von der Basalschicht zu lösen [201, 202]. So zeigen postmitotische Basalzellen eine verminderte Expression, während Stammzellen und ihre transient amplifizierenden Tochterzellen ein vergleichbares, höheres

Zytokeratin-14-Level aufweisen [203]. Somit ist die Zytokeratin-14-Expression zwar an den Zellzyklus gebunden, wird aber anscheinend nicht von der Stärke der Zellzyklusaktivität beeinflusst. Die in Kapitel 4.3.1 detektierte Expression des Proteins zeigt analog zur Literatur [203] zwischen schnell- und langsam-adhärenenten Zellen keinen signifikanten Unterschied.

Als weitere Parameter zur Differenzierung zwischen schnell- und langsam-adhärenenten Zellen wurden die Streuungseigenschaften der beiden Zellfraktionen verglichen. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Keratinozyten, die eine geringe Zellgröße und Zellgranularität aufweisen, stammzelltypische Eigenschaften besitzen [24][77][108][204-206]. Die durchflusszytometrische Analyse in 4.3.2 demonstriert, dass die schnell-adhärenente Fraktion im Vergleich zur langsam-adhärenenten durch eine geringere Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC) gekennzeichnet ist. Dies weist auf den geringeren Reifegrad dieser Zellfraktion hin. Allerdings zeigen die beiden Streuungsparameter bei der langsam-adhärenenten Fraktion unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen. Während das Histogramm der SSC-Werte eine homogene Verteilung bei beiden Zellfraktionen aufweist, lassen die FSC-Werte eine Zweiteilung der langsam-adhärenenten Fraktion erkennen. Das erste Maximum liegt bei ähnlichen Werten wie die schnell-adhärenente Fraktion. Das zweite Maximum hat höhere Werte, kennzeichnend für einen höheren Grad an Differenzierung [207]. Das könnte bedeuten, dass die Größe der Zelle erst ab einem höheren Reifegrad zunimmt oder noch andere Faktoren auf das FSC-Signal Einfluss nehmen.

Als weiterer phänotypischer Marker wurde der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) zur Charakterisierung der beiden Zellfraktionen herangezogen. In der Literatur wird die höchste VDR-Expression in den Keratinozyten der epidermalen Basalschicht beschrieben. Die Expression von VDR ist u.a. an die Proliferationsaktivität bzw. den Differenzierungsgrad der Keratinozyten gekoppelt [146, 147]. In Kapitel 4.3.3 konnte mittels Westernblot eine erhöhte Expression des VDR bei schnell-adhärenenten im Vergleich zu langsam-adhärenenten Zellen nachgewiesen werden. Damit wird noch einmal gezeigt, dass die schnell- und die langsam-adhärenente Zellfraktion hinsichtlich Proliferationsaktivität und Reifegrad unterschiedlichen Zellklassen zuzuordnen sind.

## **5.3 Vergleich von Effekten der dermatologisch relevanten Arzneistoffgruppe der Vitamin-D3-Analoga auf epidermale Stammzellen und deren transient amplifizierenden Tochterzellen**

Basierend auf der verwendeten anerkannten Isolierungsmethode mit Kollagen IV (Kapitel 4.1) sowie der Analyse der beiden Zellfraktionen (Kapitel 4.2 und 4.3) kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der schnell-adhärenenten Fraktion um Zellen des Stammzellphänotyps handelt und die langsam-adhärenente Fraktion Tochterzellen mit höherem Reifegrad repräsentiert. In den nun folgenden Diskussionsabschnitten werden daher die Termini „epidermale Stammzelle (eSZ)“ und „transient amplifizierende Tochterzelle (TAZ)“ verwendet.

### **5.3.1 Toxizität der Vitamin-D3-Analoga**

Die Testung der Toxizität der drei Wirkstoffe Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol erfolgte durch Bestimmung der vitalen, adhärenent wachsenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kapitel 4.4.1). Ergänzend dazu wurden durchflusszytometrische Apoptose-Messungen mittels Annexin V/PI durchgeführt (Kapitel 4.4.2).

Während bei der Vitalfärbung die Reduktion vitaler Zellen bei allen drei Wirkstoffen im gleichen Konzentrationsbereich erfolgte, zeigte Calcipotriol im Gegensatz zu den beiden anderen Substanzen bei der Apoptosemessung auch bei einer Konzentration von 10.000 nM keine signifikanten toxischen Effekte.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Ergebnisse ist zu beachten, dass mit jeder der verwendeten Methoden unterschiedliche Parameter erfasst werden. Bei der Vitalfärbung handelt es sich um eine indirekte Bestimmung der Vitalität. Sie kann nur an adhärenent wachsenden Zellkulturen angewendet werden. Dabei ist letztendlich die Anzahl adhärenenter Zellen Parameter für die Vitalität (siehe Kapitel 3.2.9). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Ergebnisse der Vitalfärbung nicht nur die toxischen Effekte der Wirkstoffe widerspiegeln, sondern auch eine Änderung im Adhärenenzverhalten aufzeigen können. Eine Unterscheidung dieser beiden Effekte ist dabei allerdings nicht möglich. Im Gegensatz zur Vitalfärbung werden bei der durchflusszytometrischen Zwei-Parameter-Messung der Zelltodmarker Annexin V und PI sowohl die adhärenenten als auch die nicht mehr adhärenenzfähigen Zellen erfasst (siehe Kapitel 3.2.7.5). Mit dieser Messung konnte nun bestätigt werden, dass

Calcitriol und Tacalcitol in ähnlichen Konzentrationsbereichen toxische Effekte besitzen. Nach 12 h lassen sich sowohl apoptotische als auch spätapoptotische/nekrotische Effekte bei 10.000 nM Tacalcitol und Calcitriol messen. Calcipotriol hingegen induziert auch bei 10.000 nM keine Zellschädigung. Toxizitätsversuche an Ratten belegen den Unterschied zwischen den Wirkstoffen [208]. Sie zeigten zwischen Calcitriol und Calcipotriol den größten Unterschied, während Tacalcitol nur geringfügig weniger toxisch war als Calcitriol.

Bei eSZ sowie TAZ sind nach 12 h unter Exposition von 10.000 nM Calcitriol bzw. Tacalcitol schon 40-60 % der Zellen spätapoptotisch/nekrotisch. Der apoptotische Prozess wird demzufolge schon bei geringeren Wirkstoffkonzentrationen induziert. Voruntersuchungen mit 1.000 nM Calcitriol (nicht dargestellt) zeigten allerdings bis zu einer Inkubationszeit von 48 h keine stärkeren apoptotischen Effekte als die unbehandelte Kontrolle. Bektas et al. [177] detektierte einen Anstieg apoptotischer Zellen ab einer Konzentration von 5.000 nM und konnte nachweisen, dass der apoptotische Effekt von Calcitriol und seinen Derivaten durch Sphingomyelin-Hydrolyse induziert wird. Beim Vergleich der Effekte auf die beiden Zielzellpopulationen zeigen sich bei der Zelltodcharakterisierung keine Unterschiede. Bei der Methode der Vitalfärbung lässt sich bei eSZ unter Exposition von 10.000 nM Wirkstoff im Zeitraum von 12 h bis 24 h eine höhere Vitalität/Adhärenz feststellen als bei TAZ. Hier scheinen eSZ widerstandsfähiger als TAZ. Ein möglicher Grund dafür wäre die bessere Adhärenzfähigkeit der eSZ-Fraktion aufgrund der hohen  $\beta$ 1-Integrin-Expression (siehe Kapitel 4.1.2). Der hier detektierte Unterschied zwischen den beiden Zellfraktionen ist jedoch nicht stabil. Nach 48 h ist er nicht mehr nachzuweisen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass es bei allen drei Substanzen bis zu einer Konzentration von 100 nM zu keiner Abnahme der Adhärenzfähigkeit kam. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher die Konzentration 100 nM gewählt.

### **5.3.2 Proliferationsverhalten unter Vitamin-D3-Analoga**

Die antiproliferativen Effekte der Vitamin-D3-Analoga auf die Gesamtpopulation humaner nativer Keratinozyten wurden schon von verschiedenen Arbeitsgruppen publiziert [34][32][209].

Mit fortschreitendem wissenschaftlichen Kenntnisstand über Physiologie und Pathophysiologie epidermaler Stammzellen stellte sich jedoch auch die Frage, in welcher Weise unterschiedliche Subpopulationen der proliferativen Keratinozyten, eingeschlossen epidermale Stammzellen sowie ihre transient amplifizierenden Tochterzellen, beeinflusst werden. Gniadecki untersuchte als Erster den Einfluss von Vitamin-D3-Analoga auf epidermale Stammzellen [210]. Er stellte in seinen Versuchen an nativen

Vorhautkeratinozyten fest, dass die Vitamin-D3-Analoga durch Induktion von Differenzierung klonales Wachstum unterdrücken und postulierte, dass der differenzierende Effekt auf die eSZ einer der Hauptwirkmechanismen der Vitamin-D3-Analoga in der Psoriasisbehandlung ist.

In dieser Arbeit erfolgte zunächst die Betrachtung der antiproliferativen Wirkstoffeffekte. Um Einflüsse auf Proliferationsaktivität sowie Proliferationskapazität unterscheiden zu können, wurden die Versuche unter präkonfluenten (Vitalfärbung, [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau, Zellzyklusanalyse, siehe Kapitel 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3) sowie klonalen Wachstumsbedingungen (Koloniebildungseffizienz, siehe Kapitel 4.2.4) durchgeführt.

Die Ergebnisse aus Vitalfärbung, [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau sowie Zellzyklusanalyse zeigen innerhalb von 24 h bis 48 h die antiproliferative Wirksamkeit der Vitamin-D3-Analoga bei eSZ sowie TAZ. Diese Wachstumsreduktion, die u.a. eine Verminderung der DNA-Synthese zeigt, nimmt zeitabhängig zu und liegt bei allen drei Versuchen in vergleichbaren Bereichen. Der antiproliferative Wirkmechanismus der Vitamin-D3-Analoga basiert u.a. auf der Induzierung der Transkriptionsfaktoren p21 und p27. Die Zellzyklusblockade mündet dadurch in eine Akkumulation der Zellen in der G1/G0- Phase [156-159]. Dies zeigen auch die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (siehe Kapitel 4.5.3). Die Reduktion der Zellen in der S-Phase stellt demzufolge nur einen sekundären Effekt dar. Jedoch ist der Akkumulationsprozess in G1/G0-Phase hier nicht mit einer vollständigen Zellzyklusblockade verbunden.

Unter präkonfluenten Bedingungen spielt der Konfluenzgrad eine Rolle, wie auch schon in Kapitel 5.2.1. diskutiert. Zugrunde liegt hier für kultivierte native Keratinozyten ein grundsätzlich geltender Zusammenhang zwischen der Zunahme des Konfluenzgrades und der Abnahme der proliferativen Aktivität [200]. Auch die antiproliferative Wirkung der Vitamin-D3-Analoga wird durch den Konfluenzgrad beeinflusst. Bei hohem Konfluenzgrad sinkt die antiproliferative Wirkung der drei Substanzen [148]. Dieser Effekt lässt sich bei den Untersuchungen des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus erkennen (Kapitel 4.5.2.). Die 96 h-Werte (Abb. 34) zeigen eine erhöhte Proliferation wirkstoffexponierter eSZ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Gegen Versuchsende ist die Kontakthemmung der unbehandelten eSZ auf Grund des höheren Konfluenzgrades stärker als die Wachstumshemmung durch den Wirkstoff. Es entsteht somit fälschlich der Eindruck einer schwächeren antiproliferativen Wirksamkeit auf die eSZ, da die letzten Messdaten nicht mehr nur den Wirkstoffeffekt widerspiegeln. Aufgrund dessen wurde die letzte Messung von Vitalfärbung (120 h, siebter Kulturtag) und [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau (96 h, siebter Kulturtag) bei der Bewertung ausgeklammert. Letztendlich lassen sich sowohl bei der Vitalfärbung als auch beim [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau und der Zellzyklusanalyse keine Unterschiede zwischen eSZ und TAZ

erkennen. Das bedeutet, bei kurzfristiger Anwendung der Vitamin-D3-Analoga unter präkonfluenten Wachstumsbedingungen werden beide Zellfraktionen gleich stark beeinflusst.

Unter den klonalen Wachstumsbedingungen bei der Bestimmung der Koloniebildungseffizienz (siehe Kapitel 4.5.4) lassen sich nach 14 Tagen Unterschiede zwischen eSZ und TAZ nachweisen. Unter Exposition von Calcitriol und Tacalcitol waren weniger Zellen der eSZ-Fraktion in der Lage, als Einzelzelle eine Kolonie zu bilden. Calcipotriol scheint keinen negativen Einfluss auf die Koloniebildungseffizienz der eSZ zu haben. In der Fraktion der TAZ lässt sich im Vergleich zur Kontrolle sogar eine Steigerung der Proliferationskapazität erkennen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aber zeigen beide Zellfraktionen aufgrund der Streuung keine signifikanten Unterschiede. Beim Vergleich der relativen Werte von eSZ und TAZ ergeben sich jedoch Signifikanzen. Dabei weisen die TAZ unter Wirkstoffeinfluss im Vergleich zu eSZ eine Erhöhung der Proliferationskapazität auf. Nur Calcitriol zeigt aufgrund der großen Streuung keine Signifikanz. Gniadecki [210] testete Calcitriolkonzentrationen von 100, 1.000 und 10.000 nM und stellt fest, dass Holoklone (Phänotyp epidermale Stammzellen) in ihrem Wachstum gehemmt wurden, während Paraklone (Phänotyp transient amplifizierende Tochterzellen) unter Wirkstoffexposition eine höhere Koloniebildungseffizienz aufwiesen. Er postulierte die Stammzellen als Targetzellen für Calcitriol und seine Derivate. Dieser Effekt könnte möglicherweise mit der Induzierung des Transkriptionsfaktors p21 durch Vitamin-D3-Analoga in Zusammenhang stehen [163]. Über stammzellassozierten den Notchsignalweg ist dieser Transkriptionsfaktor u.a. auch in die Regulation des epidermalen Stammzellkompartimentes involviert. P21 spielt bei der Stammzellrestriktion eine bedeutende Rolle. Mit der Hochregulation seiner Expression fördert p21 den Transit vom Stammzellkompartiment zur determinierten Tochterzelle hin bis zum Verlassen des Zellzyklusses [211]. Die Exposition von eSZ mit Vitamin-D3-Analoga könnte deren Transit hin zu TAZ verstärken. Neben der Reduktion der Proliferationskapazität wäre somit auch eine Reduktion des Stammzellkompartimentes denkbar. Calcipotriol aber zeigt hier eine Sonderstellung, da es keinen negativen Einfluss auf die Koloniebildungseffizienz von eSZ und TAZ hat.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass unter Einfluss der Vitamin-D3-Analoga einerseits die Proliferationsaktivität kurzfristig sowohl bei eSZ als auch bei TAZ stark herabgesetzt wird. Andererseits gibt es Hinweise, dass die Proliferationskapazität der Fraktion des Stammzellphänotyps im Vergleich zu deren Tochterzellen eingeschränkt wird.

### 5.3.3 Phänotyp unter Vitamin-D3-Analoga

#### *β1-Integrin*

Proliferations-, Adhäsions- sowie Migrationsfähigkeit der basalen Keratinozyten werden über die  $\beta 1$ -Integrin-Expression reguliert. In vivo als auch in vitro geht der Differenzierungsprozess von Basalzellen mit einem Verlust von  $\beta 1$ -Integrin einher [16][122]. Die Vitamin-D3-Analoga sind potente Mediatoren der keratinozytären Differenzierung (siehe Kapitel 2.3.5). Wirkstoff-induzierte Veränderungen der  $\beta 1$ -Integrin-Expression in vivo werden in der Literatur hauptsächlich nach einer längerfristigen Behandlung beschrieben. Histologische Untersuchungen an läsionaler psoriatischer Haut mit suprabasaler  $\beta 1$ -Integrin-Expression zeigen nach 4 bis 8 Wochen topischer Behandlung mit Calcitriol eine Normalisierung des  $\beta 1$ -Integrins auf ausschließlich basale Expression [212]. In vitro jedoch ist der prodifferenzierende Effekt der Vitamin-D3-Analoga u.a. vom Serum- und Calciumgehalt des Mediums abhängig [148]. In dieser Arbeit lag das Augenmerk darauf, unter Kulturbedingungen zu arbeiten, die mögliche differenzierende Einflüsse auf die Stammzellen minimieren, um den Stammzellphänotyp über die gesamte Kulturdauer zu erhalten. So wurde in einem serumfreien Medium und mit niedrigem Calciumgehalt (Kapitel 3.2.2) gearbeitet. Unter diesen Bedingungen war eine Änderung in der Involucrinexpression als Marker der Differenzierung durch Vitamin-D3-Analoga nicht nachweisbar [209]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich in Hinsicht auf die  $\beta 1$ -Integrin-Expression unter Wirkstoffexposition (Kapitel 4.6.1) bei eSZ sowie TAZ zumindest eine schwache Reduktion der  $\beta 1$ -Integrin-Expression zur Kontrolle nach 24 und 48 h nachweisen. Beim direkten Vergleich von eSZ und TAZ zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Wirkstoff-assoziierten Reduktion von  $\beta 1$ -Integrin.

In Zusammenhang mit der Reduktion von  $\beta 1$ -Integrin gäbe es möglicherweise auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Toxizitätsdaten von Calcipotriol aus Vitalfärbung (Kapitel 4.4.1) und Annexin-V/PI-Messung (Kapitel 4.4.2). Hier gab es bei der Annexin-V/PI-Messung keinerlei Hinweis auf toxische Effekte für Calcipotriol, während bei einer Konzentration von 1.000 und 1.0000 nM eine signifikante Verminderung in der Vitalfärbung zu sehen war. Wie in Kapitel 5.3.1 schon diskutiert, könnte eine Verminderung der Adhärenzfähigkeit der Zellen für die Daten der Vitalfärbung in Frage kommen. Möglicherweise ist die Reduktion des Adhäsionsproteins  $\beta 1$ -Integrin unter 1.000 und 10.000 nM um einiges stärker und ist einer geringeren Bodenhaftung der Zellen [122] verbunden. Anders als bei Calcitriol und Tacalcitol führt die, auch bei Calcipotriol verminderte Expression von  $\beta 1$ -Integrin wahrscheinlich nicht direkt zum Eintritt in den Apoptoseprozess.

### Zytokeratin 14

Die Ergebnisse der CK14-Bestimmung in Kapitel 4.6.2 zeigen bereits nach 24 h Inkubation mit Vitamin-D3-Analoga bei eSZ eine signifikante Zunahme der Expression des Zytoskelettproteins im Vergleich zur Kontrolle, während CK14 bei TAZ unbeeinflusst bleibt. Der Unterschied zwischen eSZ und TAZ ist mit ca. 20 % ebenfalls signifikant. Der Effekt auf die CK14-Expression der eSZ scheint selektiv zu sein. Bei Untersuchungen an der *organotypischen* ("Raft") Kultur einer Basalzellkarzinom-Zelllinie konnte ebenfalls bei basalen Zellen eine Erhöhung von CK14 unter dem Vitamin-D3-Analogen Calcipotriol detektiert werden, während in suprabasalen Schichten die Induzierung von Differenzierungsmarkern wie Involucrin und Filaggrin erfolgte [213]. Die Aktivierung der CK14-Expression scheint konträr zur proliferationshemmenden und prodifferenzierenden Wirkung der Vitamin-D3-Analoga zu sein. Wie jedoch kürzlich Untersuchungen an HaCaT zeigten, induzierten 100 nM Calcitriol  $\Delta$ Np63, eine verkürzte Isoform von p63 [214]. Dieser Transkriptionsfaktor wird in der Literatur als Marker für epidermale Stammzellen beschrieben [20], besitzt antiapoptotische Eigenschaften und ist wiederum ein Aktivator der CK14-Genexpression [215]. Dieser selektive Wirkstoffeffekt auf die eSZ könnte die Integrität des Stammzellkompartiments stärken. CK14 interagiert mit dem basalen Adhäsionsprotein  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-Integrin, einem Bestandteil der Hemidesmosomen, und unterstützt damit die extrazelluläre Adhäsionsfähigkeit der Stammzellen [216] [217]. Dies weist auf einen protektiven Einfluss auf die epidermale Stammzellpopulation im Vergleich zu ihren determinierten Tochterzellen hin. In der Literatur gibt es weitere Hinweise auf die protektive Wirkung der Vitamin-D3-Analoga. So schützt die Vorinkubation von Keratinozyten mit Calcitriol vor der Induzierung apoptotischer Effekte durch (UV)B-Strahlung [218] oder durch Zytostatika wie Cisplatin und Doxorubicin [181]. Gemeinsam ist diesen Ergebnissen der schnelle Eintritt der protektiven Wirkung. Die Autoren schlussfolgern, dass diese protektiven Effekte durch rasche, nicht-genomische Signaltransduktion (siehe Kapitel 2.3.4.2), vermittelt werden. Da der in dieser Arbeit detektierte Anstieg von CK14 schon bei der ersten Messung nach 24 h auftritt, ist für die Übermittlung dieses Effektes ebenfalls ein nicht-genomischer Signalweg denkbar.

## 5.4 Schlussfolgerungen

### 5.4.1 Wie lässt sich die Methode der Kollagen-IV-Adhärenz-Anreicherung epidermaler Stammzellen optimieren und charakterisieren?

Eine hohe Selektivität konnte anhand der Adhäsionszeit von 10 min für die Fraktion der epidermalen Stammzellen erzielt werden. Die  $\beta$ 1-Integrin-Expression eignete sich dabei als Validierungsparameter für die Klassifizierung vitaler Zellen nach der Isolierung. Im Gegensatz zu nicht-adhärenenten Zellen war auch die langsam-adhärenente Fraktion noch in der Lage zu proliferieren und so für weitere Versuche zugänglich.

### 5.4.2 Handelt es sich bei den isolierten Zellfraktionen um Keratinozyten unterschiedlichen Reifegrades entsprechend der Klassifizierung in epidermale Stammzellen und transient amplifizierende Tochterzellen?

Die *in-vitro* Bedingungen entsprechen denen einer Verletzung der Haut. Dies hat eine Proliferationsaktivierung der Stammzellen zur Folge. Diese ist wahrscheinlich aufgrund der vorliegenden serum- und feederzellfreien Kultivierungsbedingungen stärker ausgeprägt. Dadurch besitzt die schnell-adhärenente Fraktion (Stammzellphänotyp) im Gegensatz zu *in-vivo* Bedingungen bzw. zur Feederzellkokultivierung eine höhere Proliferationsaktivität als die langsam-adhärenente (Phänotyp determinierte Tochterzelle). Jedoch zeigt die hohe Proliferationskapazität der schnell-adhärenenten Fraktion klar deren Stammzellcharakter. Der Stammzellphänotyp wird zudem durch eine im Vergleich zu langsam-adhärenenten Zellen geringere Zellgröße und Zellgranularität deutlich. Des Weiteren zeigen auch die Unterschiede bei der Expression des Stammzellmarkers  $\beta$ 1-Integrin, dass es sich bei der schnell-adhärenenten Zellfraktion um Keratinozyten mit stammzelltypischen Eigenschaften und bei der langsam-adhärenenten, proliferationsfähigen Zellfraktion um transient amplifizierende Tochterzellen handelt.

### **5.4.3 Wie wirken sich die Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol hinsichtlich Toxizität, Proliferationsverhalten und Phänotyp auf epidermale Stammzellen und determinierte Tochterzellen aus?**

Calcitriol und Tacalcitol zeigen bei einer Konzentration von 10.000 nM toxische Effekte und besitzen auch eine vergleichbare Toxizitätskinetik. Die Toxizitätsdaten zeigen apoptotische Effekte. Calcipotriol weist hingegen in den getesteten Konzentrationsbereichen keine signifikante toxische Wirkung auf.

Sowohl bei eSZ als auch bei TAZ wird die Proliferationsaktivität unter Einfluss der Vitamin-D3-Analoga einerseits rasch stark herabgesetzt. Andererseits gibt es Hinweise, dass die Proliferationskapazität der epidermalen Stammzellen im Vergleich zu deren Tochterzellen eingeschränkt wird.

Die Vitamin-D3-Analoga unterscheiden sich in der Expression des Stammzellmarkers  $\beta$ 1-Integrin nicht in ihrer Wirkung auf epidermale Stammzellen und transient amplifizierende Tochterzellen. Jedoch differieren beide Zellfraktionen unter Wirkstoffeinfluss in der Expression von Zytokeratin 14 (eSZ: Hochregulation; TAZ: keine Änderung). Diese selektive und schnell detektierbare Änderung der Zytokeratin-14-Expression bei eSZ könnte aufgrund einer zytoprotektiven Wirkung der Vitamin-D3-Analoga zustande kommen.

## 6 Zusammenfassung und Fazit

Die Eigenschaften von epidermalen Stammzellen wie z.B. ihr enormes Proliferationspotential, die Fähigkeit zur Selbstreproduktion sowie zur Generierung determinierter Tochterzellen machen sie zum Regulator der Homöostase der Epidermis, die eine Balance zwischen Differenzierung und Proliferation erfordert. Aufgrund dessen bilden epidermale Stammzellen eine interessante Targetstruktur für die Pharmakotherapie epidermaler Hauterkrankungen.

Ziel dieser Arbeit war es, Wirkstoffeffekte auf den Phänotyp „epidermale Stammzelle“ zu identifizieren. Dazu wurden die Stammzellen mit ihren determinierten, noch mitotisch-aktiven Tochterzellen verglichen. Zunächst erfolgte auf der Basis der Zelladhäsivität an Kollagen IV die erforderliche Auftrennung einer Basalzellpopulation in die schnell-adhärente und die langsam-adhärente Zellfraktion. Die genutzte Methode wurde mittels des Stammzellmarkers  $\beta 1$ -Integrin optimiert und parametrisiert. Anschließend erfolgten Untersuchungen der proliferativen und phänotypischen Eigenschaften der zwei isolierten Zellfraktionen zur Dokumentation ihrer Diversität. Die schnell-adhärente Fraktion zeigte dabei die höhere Proliferationsaktivität (S-Phase-Aktivität,  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau, Vitalität) sowie das höhere Proliferationspotential (Koloniebildungsfähigkeit). Die Ergebnisse des Zellphänotyps charakterisieren die schnell-adhärente Fraktion in Analogie zur Literatur als die immature Zellfraktion mit stammzelltypischen Eigenschaften. Der Stammzellmarker  $\beta 1$ -Integrin zeigt eine signifikant stärkere Expression in schnell-adhärenten Zellen. Auch bei der Untersuchung von Zellgröße und Zellgranularität besitzt die schnell-adhärente Fraktion die höhere Immaturität. Diese Ergebnisse zeigen die Diversität der beiden Kollagen-IV-isolierten Zellfraktionen, wobei die schnell-adhärente Zellfraktion Eigenschaften des Stammzellphänotyps aufweist und die langsam-adhärente einen höheren

Differenzierungsgrad besitzt. Diese Ergebnisse rechtfertigten nun die Verwendung der Begrifflichkeiten „epidermale Stammzelle“ sowie „transient amplifizierende Tochterzelle“.

Unter Einfluss der Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol wurden epidermale Stammzellen und determinierte Tochterzellen hinsichtlich Toxizität, Proliferation und Phänotyp untersucht. Die Ergebnisse der Vitalfärbung zeigen bei den epidermalen Stammzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit geringere toxische bzw. adhäsionsvermindernde Effekte als bei den transient amplifizierenden Tochterzellen, während die Proliferationsaktivität (S-Phase-Aktivität, [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbau, vitales Zellwachstum) bei beiden Zellklassen gleich stark inhibiert wird. Dagegen zeigt sich bei der Proliferationskapazität (Koloniebildungseffizienz), dass diese bei den epidermalen Stammzellen im Vergleich zu deren Tochterzellen vermindert wird.

Der Effekt von Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol auf den Phänotyp der Zellen wurde anhand des Stammzellmarkers  $\beta$ 1-Integrin und des basalen Zytoskelettproteins CK14 untersucht. Dabei zeigt sich eine leichte Reduktion der  $\beta$ 1-Integrin-Expression. Zwischen Stammzelle und transient amplifizierender Tochterzelle bestehen dabei aber keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu weist die Untersuchung der CK14-Expression interessante Unterschiede zwischen beiden Zellklassen auf. Bereits innerhalb von 24 h steigt die Expression von CK 14 in epidermalen Stammzellen an, während bei den Tochterzellen keine Änderung sichtbar ist. Dieser Effekt könnte für die selektive Induzierung protektiver antiapoptotischer Prozesse bei epidermalen Stammzellen sprechen, da CK14-Expression von dem antiapoptotischen Marker p63 abhängig ist.

Die Wirkstofftherapie hyperproliferativer, chronischer Hauterkrankungen ist eine Langzeittherapie und muss ein hohes Maß an Sicherheit bieten. Da die epidermalen Stammzellen als Gewebegenerator fungieren und für die lebenslange Erneuerung der Haut verantwortlich sind, können Wirkstoff-bedingte Veränderungen wie z.B. die Reduktion des Langzeitproliferationspotentials auf die Regenerationsfähigkeit der Haut Einfluss nehmen. Mit der Identifizierung von stammzellspezifischen Effekten können in der Zukunft besser Aussagen zu Langzeiteffekten der Arzneistoffe gemacht werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] Lajtha LG. Stem cell concepts. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1979;21(1):59-65.
- [2] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
- [3] Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development.* 1989 Aug;106(4):619-33.
- [4] Pellegrini G, Bondanza S, Guerra L, De Luca M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput.* 1998 Nov;36(6):778-90.
- [5] Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, Bondanza S, Guerra L, Zambruno G, Micali G, De Luca M. The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation.* 1999 Sep 27;68(6):868-79.
- [6] Bickenbach JR, Dunnwald M. Epidermal stem cells: characteristics and use in tissue engineering and gene therapy. *Adv Dermatol.* 2000;16:159-83;
- [7] Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, Fishbaugh J, Bickenbach JR. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol.* 2001 Feb;10(1):45-54.
- [8] Terskikh VV, Vasiliev AV. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int Rev Cytol.* 1999;188:41-72.
- [9] Dellambra E, Pellegrini G, Guerra L, Ferrari G, Zambruno G, Mavilio F, De Luca M. Toward epidermal stem cell-mediated ex vivo gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther.* 2000 Nov 1;11(16):2283-7.

- [10] Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest.* 1994 Jan;70(1):6-22.
- [11] Waseem A, Dogan B, Tidman N, Alam Y, Purkis P, Jackson S, Lalli A, Machesney M, Leigh IM. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999 Mar;112(3):362-9.
- [12] Potten CS. Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2004 Sep;9(3):183-95.
- [13] Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2005 Dec;153(6):1166-75.
- [14] Shen CS, Tsuda T, Fushiki S, Mizutani H, Yamanishi K. The expression of p63 during epidermal remodeling in psoriasis. *J Dermatol.* 2005 Apr;32(4):236-42
- [15] Körver JE, van Duijnhoven MW, Pasch MC, van Erp PE, van de Kerkhof PC. Assessment of epidermal subpopulations and proliferation in healthy skin, symptomless and lesional skin of spreading psoriasis. *Br J Dermatol.* 2006 Oct;155(4):688-94
- [16] Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 1993;73:713-24.
- [17] Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13473-5
- [18] Kaur P, Li A, Redvers R, Bertoncello I. Keratinocyte stem cell assays: an evolving science. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2004 Sep;9(3):238-47.
- [19] Zhou JX, Chen SY, Liu WM, Cao YJ, Duan EK. Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells. *Hum Reprod.* 2004 Apr;19(4):968-74. Epub 2004 Mar 11.
- [20] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3156-61.
- [21] Islam MS, Zhou H. Isolation and characterization of putative epidermal stem cells derived from Cashmere goat fetus. *Eur J Dermatol.* 2007 Jul-Aug;17(4):302-8. Epub 2007 Jun 1.

- [22] Bickenbach JR, Roop DR. Transduction of a preselected population of human epidermal stem cells: consequences for gene therapy. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999 May-Jun;111(3):184-9.
- [23] Radu E, Simionescu O, Regalia T, Dumitrescu D, Popescu LM. Stem cells (p63(+)) in keratinocyte cultures from human adult skin. *J Cell Mol Med*. 2002 Oct-Dec;6(4):593-8.
- [24] Kim DS, Cho HJ, Choi HR, Kwon SB, Park KC. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Nov;61(21):2774-81.
- [25] Spichkina OG, Kalmykova NV, Kukhareva LV, Voronkina IV, Blinova MI, Pinaev GP. Isolation of human basal keratinocytes by selective adhesion to extracellular matrix proteins. *Tsitologiya*. 2006;48(10):841-7
- [26] Hu K, Dai Y, Li J. Separation and culture of human epidermal stem cells in vitro *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2006 Dec;20(12):1244-7
- [27] Jones PH. Isolation and characterization of human epidermal stem cells. *Clin Sci (Lond)*. 1996 Aug;91(2):141-6.
- [28] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol*. 2000 Mar;114(3):413-20.
- [29] Li J, Miao C, Guo W, Jia L, Zhou J, Ma B, Peng S, Liu S, Cao Y, Duan E. Enrichment of putative human epidermal stem cells based on cell size and collagen type IV adhesiveness. *Cell Res*. 2008 Mar;18(3):360-71.
- [30] Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol*. 2003 Apr;120(4):501-11.
- [31] Jahoda CA, Whitehouse J, Reynolds AJ, Hole N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol*. 2003 Dec;12(6):849-59.
- [32] Matsumoto K, Hashimoto K, Nishida Y, Hashiro M, Yoshikawa K Growth-inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on normal human keratinocytes cultured in serum-free medium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jan 30;166(2):916-23.
- [33] Kitano Y, Ikeda N, Okano M. Suppression of proliferation of human epidermal keratinocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Analysis of its effect on psoriatic lesion

- and of its mechanism using human keratinocytes in culture. *Eur J Clin Invest.* 1991 Feb;21(1):53-8.
- [34] Smith EL, Walworth NC, Holick MF. Effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. *J Invest Dermatol.* 1986 Jun;86(6):709-14.
- [35] Bikle DD, 1,25(OH)2D3-modulated calcium induced keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1996 Apr;1(1):22-7.
- [36] Ghazizadeh S, Taichman LB. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* 2001 Mar 15;20(6):1215-22.
- [37] Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol.* 2002 Apr;12(4):185-92
- [38] Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell.* 2005 Dec;9(6):855-61
- [39] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:339-73.
- [40] Cotsarelis G Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol.* 2006 Jul;126(7):1459-68.
- [41] Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol.* 2006 Jul;126(7):1450-8.
- [42] Braun KM, Prowse DM. Distinct epidermal stem cell compartments are maintained by independent niche microenvironments. *Stem Cell Rev.* 2006;2(3):221-31.
- [43] Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell.* 1995 Jan 13;80(1):83-93.
- [44] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975 Nov;6(3):331-43.
- [45] Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature.* 1977 Feb 3;265(5593):421-4.
- [46] Gilchrist BA. In vitro assessment of keratinocyte aging. *J Invest Dermatol.* 1983 Jul;81(1 Suppl):184s-9s.
- [47] Michel M, Török N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19

- expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 1996 May;109 ( Pt 5):1017-28.
- [48] Jensen UB, Lowell S, Watt FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development.* 1999 Jun;126(11):2409-18
- [49] Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol.* 2002 Jul;197(4):479-91.
- [50] Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:45-62.
- [51] Jones PH. Epithelial stem cells. *Bioessays.* 1997 Aug;19(8):683-90.
- [52] Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998 Jun 29;353(1370):831-7
- [53] Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol.* 2002 Oct;119(4):888-99.
- [54] Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1427-30
- [55] Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E: De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell.* 1998 Nov 25;95(5):605-14
- [56] Kishimoto J, Burgeson RE, Morgan BA:Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.* 2000 May 15;14(10):1181-5
- [57] Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 2005 Jul 1;19(13):1596-611. Epub 2005 Jun 16
- [58] He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.
- [59] Koster MI, Huntzinger KA, Roop DR. Epidermal differentiation: transgenic/knockout mouse models reveal genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2002 Dec;7(1):41-5.
- [60] Gandarillas A, Watt FM. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev.* 1997 Nov 1;11(21):2869-82

- [61] Watt FM, Frye M, Benitah SA. MYC in mammalian epidermis: how can an oncogene stimulate differentiation? *Nat Rev Cancer*. 2008 Mar;8(3):234-42].
- [62] Savill NJ, Sherratt JA. Control of epidermal stem cell clusters by Notch-mediated lateral induction. *Dev Biol*. 2003 Jun 1;258(1):141-53
- [63] Devgan V, Mammucari C, Millar SE, Brisken C, Dotto GP. p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev*. 2005 Jun 15;19(12):1485-95
- [64] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):11-25.
- [65] Schwartz MA, Lechene C, Ingber DE. Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1;88(17):7849-53.
- [66] McNamee HP, Ingber DE, Schwartz MA. Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J Cell Biol*. 1993 May;121(3):673-8.
- [67] Hansen LK, Mooney DJ, Vacanti JP, Ingber DE. Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. *Mol Biol Cell*. 1994 Sep;5(9):967-75.
- [68] Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves MF. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature*. 1987 Mar 26-Apr 1;326(6111):403-5.
- [69] Roberts R, Gallagher J, Spooner E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature*. 1988 Mar 24;332(6162):376-8.
- [70] Rollins BJ, O'Connell TM, Bennett G, Burton LE, Stiles CD, Rheinwald JG. Environment-dependent growth inhibition of human epidermal keratinocytes by recombinant human transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol*. 1989 Jun;139(3):455-62.
- [71] Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*. 1989 Aug 18;245(4919):752-5.
- [72] Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Jul;19(4):405-13.

- [73] Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, Merchant A, Galiano RD, Tomic-Canic M. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing *Am J Pathol.* 2005 Jul;167(1):59-69.
- [74] Stern MM, Tygrett LT, Waldschmidt TJ, Bickenbach JR. Cells isolated from the epidermis by Hoechst dye exclusion, small size, and negative selection for hematopoietic markers can generate B lymphocyte precursors. *J Invest Dermatol.* 2008 Jun;128(6):1386-96. Epub 2007 Dec 20.
- [75] Potten CS. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* 1974 Jan;7(1):77-88.
- [76] Bickenbach JR. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res.* 1981 Aug;60 Spec No C:1611-20.
- [77] Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp Cell Res.* 1998 Oct 10;244(1):184-95.
- [78] Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004 Jan 16;303(5656):359-63. Epub 2003 Dec 11.
- [79] Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature.* 1975 May 15;255(5505):197-200.
- [80] Terunuma A, Jackson KL, Kapoor V, Telford WG, Vogel JC. Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J Invest Dermatol.* 2003 Nov;121(5):1095-103.
- [81] Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 1984 Aug 16;311(7):448-51.
- [82] Compton CC, Nadire KB, Regauer S, Simon M, Warland G, O'Connor NE, Gallico GG, Landry DB. Cultured human sole-derived keratinocyte grafts re-express site-specific differentiation after transplantation. *Differentiation.* 1998 Nov;64(1):45-53.
- [83] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Apr;84(8):2302-6
- [84] Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, Hodivala-Dilke KM, Eady RA. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel

- negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116(Pt 20):4239-48. Epub 2003 Sep 2.
- [85] Ghali L, Wong ST, Tidman N, Quinn A, Philpott MP, Leigh IM. Epidermal and hair follicle progenitor cells express melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan core protein. *J Invest Dermatol.* 2004 Feb;122(2):433-42.
- [86] van Rossum MM, Schalkwijk J, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Immunofluorescent surface labelling, flow sorting and culturing of putative epidermal stem cells derived from small skin punch biopsies. *J Immunol Methods.* 2002 Sep 15;267(2):109-17.
- [87] Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3902-7.
- [88] Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):10960-5.
- [89] Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation.* 2004 Oct;72(8):387-95
- [90] Li A, Kaur P. FACS enrichment of human keratinocyte stem cells. *Methods Mol Biol.* 2005;289:87-96.
- [91] Legg J, Jensen UB, Broad S, Leigh I, Watt FM. Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development.* 2003 Dec;130(24):6049-63. Epub 2003 Oct 22.
- [92] Lowell S, Jones P, Le Roux I, Dunne J, Watt FM. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol.* 2000 May 4;10(9):491-500
- [93] Savill NJ, Sherratt JA. Control of epidermal stem cell clusters by Notch-mediated lateral induction. *Dev Biol.* 2003 Jun 1;258(1):141-53
- [94] Molès JP, Watt FM. The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J Histochem Cytochem.* 1997 Jun;45(6):867-74
- [95] Lemaître G, Gonnet F, Vaigot P, Gidrol X, Martin MT, Tortajada J, Waksman G. CD98, a novel marker of transient amplifying human keratinocytes. *Proteomics.* 2005 Sep;5(14):3637-45.

- [96] O'Shaughnessy RF, Seery JP, Celis JE, Frischauf A, Watt FM. PA-FABP, a novel marker of human epidermal transit amplifying cells revealed by 2D protein gel electrophoresis and cDNA array hybridisation. *FEBS Lett.* 2000 Dec 8;486(2):149-54
- [97] Zhu AJ, Watt FM. Beta catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development.* 1999 May;126(10):2285-98.
- [98] Fradet Y, Cordon-Cardo C, Thomson T, Daly ME, Whitmore WF Jr, Lloyd KO, Melamed MR, Old LJ. Cell surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Jan;81(1):224-8.
- [99] Wayner EA, Carter WG, Piotrowicz RS, Kunicki TJ. The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J Cell Biol.* 1988 Nov;107(5):1881-91.
- [100] De Strooper B, Van der Schueren B, Jaspers M, Saison M, Spaepen M, Van Leuven F, Van den Berghe H, Cassiman JJ. Distribution of the beta 1 subgroup of the integrins in human cells and tissues. *J Histochem Cytochem.* 1989 Mar;37(3):299-307.
- [101] Peltonen J, Larjava H, Jaakkola S, Gralnick H, Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM, Uitto J. Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas. *J Clin Invest.* 1989 Dec;84(6):1916-23.
- [102] Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 1987 Feb 27;48(4):549-54.
- [103] Cheresh DA, Smith JW, Cooper HM, Quaranta V. A novel vitronectin receptor integrin (alpha v beta x) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. *Cell.* 1989 Apr 7;57(1):59-69.
- [104] Bodary SC, McLean JW. The integrin beta 1 subunit associates with the vitronectin receptor alpha v subunit to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line. *J Biol Chem.* 1990 Apr 15;265(11):5938-41.
- [105] Vogel BE, Tarone G, Giancotti FG, Gailit J, Ruoslahti E. A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition (alpha v beta 1). *J Biol Chem.* 1990 Apr 15;265(11):5934-7.

- [106] Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol.* 2008 Jan 28;180(2):273-84. Epub 2008 Jan 21
- [107] Hotchin NA, Gandarillas A, Watt FM. Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol.* 1995 Mar;128(6):1209-19.
- [108] Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Aug;82(16):5390-4.
- [109] Sehmi R, Howie K, Sutherland DR, Schragge W, O'Byrne PM, Denburg JA. Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Nov;15(5):645-55
- [110] Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood.* 1997 Nov 1;90(9):3471-81
- [111] Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:345-82
- [112] Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Feb;14(1):110-22
- [113] Byrne C, Tainsky M, Fuchs E Programming gene expression in developing epidermis. *Development.* 1994 Sep;120(9):2369-83
- [114] Lloyd C, Yu QC, Cheng J, Turksen K, Degenstein L, Hutton E, Fuchs E. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. *J Cell Biol.* 1995 Jun;129(5):1329-44.
- [115] Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells.* 2005 Jun-Jul;23(6):834-41.
- [116] Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res.* 2004 Apr 15;295(1):79-90.
- [117] Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):965-74. Epub 2005 Nov 10.
- [118] Marwa MA. Abdallah, Integrins in Dermatology, *Egyptian Dermatology Online Journal* 1 (1): 2, June 2005

- [119] Parks WC. What is the alpha2beta1 integrin doing in the epidermis? *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):264-6.
- [120] Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell.* 2000 Feb;11(2):453-66
- [121] Zweers MC, Davidson JM, Pozzi A, Hallinger R, Janz K, Quondamatteo F, Leutgeb B, Krieg T, Eckes B. Integrin alpha2beta1 is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):467-78. Epub 2006 Sep 14.
- [122] Adams JC, Watt FM. Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature.* 1989 Jul 27;340(6231):307-9.
- [123] Schubert C. Entzündliche Dermatosen Eine Auswahl klinisch wichtiger Krankheitsbilder. *Der Pathologe Springer Berlin / Heidelberg* Volume 23, Number 1 / Januar 2002.9-19
- [124] Buick RN, Pollak MN. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes *Cancer Res.* 1984 Nov;44(11):4909-18.
- [125] Morris RJ. A perspective on keratinocyte stem cells as targets for skin carcinogenesis. *Differentiation.* 2004 Oct;72(8):381-6
- [126] Köse O, Lalli A, Kutulola AO, Odell EW, Waseem A. Changes in the expression of stem cell markers in oral lichen planus and hyperkeratotic lesions. *J Oral Sci.* 2007 Jun;49(2):133-9.
- [127] Ghoreschi K, Röcken M. Immunpathogenese der Psoriasis: *JDDG;* 2003 1:524-532
- [128] Hertle MD, Kubler MD, Leigh IM, Watt FM. Aberrant Integrin Expression during Epidermal Wound Healing and in Psoriatic Epidermis. *J Clin Invest.* 1992 Jun;89(6):1892-901
- [129] Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 2002 Aug 1;21(15):3919-26.
- [130] van Duijnhoven MW, van de Kerkhof PC, Pasch MC, Muys L, van Erp PE. The combination of the Zenon labeling technique and microscopic image analysis to study cell populations in normal and psoriatic epidermis. *J Cutan Pathol.* 2005 Mar;32(3):212-9.

- [131] Matsumoto K, Azuma Y, Kiyoki M, Okumura H, Hashimoto K, Yoshikawa K. Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in the growth and differentiation of human keratinocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1991 May 17;1092(3):311-8
- [132] Prystowsky JH, Muzio PJ, Sevrans S, Clemens TL. Effect of UVB phototherapy and oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) on vitamin D photosynthesis in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Nov;35(5 Pt 1):690-5.
- [133] Feldman D, Chen T, Hirst M, Colston K, Karasek M, Cone C. Demonstration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human skin biopsies. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1463-1465
- [134] Dam TN, Møller B, Hindkjaer J, Kragballe K. The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1996 Apr;1(1):72-7.
- [135] Ranson M, Posen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones: in vitro studies with 1 alpha-25, dihydroxyvitamin D3, alpha-melanocyte stimulating hormone, and beta-estradiol. *J Invest Dermatol*. 1988 Dec;91(6):593-8.
- [136] Eil C, Marx SJ. Nuclear uptake of 1,25-dihydroxy[3H]cholecalciferol in dispersed fibroblasts cultured from normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Apr;78(4):2562-6.
- [137] Merke J, Milde P, Lewicka S, Hügel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. 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*. 1989 Jun;83(6):1903-15.
- [138] Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983 Dec;57(6):1308-10.
- [139] Schuessler M, Astecker N, Herzig G, Vorisek G, Schuster I. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids*. 2001 Mar-May;66(3-5):399-408
- [140] Lehmann B, Meurer M. Extrarenal sites of calcitriol synthesis: the particular role of the skin. *Recent Results Cancer Res*. 2003;164:135-45.

- [141] Vantieghem K, De Haes P, Bouillon R, Segaert S. Dermal fibroblasts pretreated with a sterol Delta7-reductase inhibitor produce 25-hydroxyvitamin D3 upon UVB irradiation. *J Photochem Photobiol B*. 2006 Oct 2;85(1):72-8. Epub 2006 Jul 7
- [142] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono L, Blumberg B, Kastner P, Mark M Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835-839
- [143] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988,240:889-895
- [144] Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcriptional regulation. *Trend Genet* 1988;4:309-314
- [145] O' Malley BW. The steroid superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* 1990;4:363-369
- [146] Pillai S, Bikle DD, Elias PM. 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J Biol Chem*. 1988 Apr 15;263(11):5390-5.
- [147] Sølvsten H, Svendsen ML, Fogh K, Kragballe K. Upregulation of vitamin D receptor levels by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 1997 May;289(6):367-72.
- [148] Svendsen ML, Daneels G, Geysen J, Binderup L, Kragballe K. Proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes is modulated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and synthetic vitamin D<sub>3</sub> analogues in a cell density-, calcium- and serum-dependent manner. *Pharmacol Toxicol*. 1997 Jan;80(1):49-56.
- [149] Sølvsten H, Fogh K, Svendsen M, Kristensen P, Aström A, Kumar R, Kragballe K. Normal levels of the vitamin D receptor and its message in psoriatic skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1996 Apr;1(1):28-32.
- [150] Jensen T, Sørensen S, Sølvsten H, Kragballe K. The vitamin D<sub>3</sub> receptor and retinoid X receptors in psoriatic skin: the receptor levels correlate with the receptor binding to DNA. *Br J Dermatol*. 1998 Feb;138(2):225-8.
- [151] Pálmer HG, Anjos-Afonso F, Carmeliet G, Takeda H, Watt FM. The vitamin D receptor is a Wnt effector that controls hair follicle differentiation and specifies tumor type in adult epidermis. *PLoS ONE*. 2008 Jan 23;3(1):e1483

- [152] Cianferotti L, Cox M, Skorija K, Demay MB. Vitamin D receptor is essential for normal keratinocyte stem cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 29;104(22):9428-33. Epub 2007 May 17
- [153] Ozono K, Sone T, Pike JW. The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Bone Miner Res*. 1991 Oct;6(10):1021-7.
- [154] Fleet JC. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr*. 2004 Dec;134(12):3215-8
- [155] Pillai S, Bikle DD, Su MJ, Ratnam A, Abe J. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates the phosphatidylinositol signaling pathway in human keratinocytes by increasing phospholipase C levels. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):602-9.
- [156] Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. Action of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1998 Jul 25;142(1-2):57-65.
- [157] Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D<sub>3</sub> leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996 Jan 15;10(2):142-53.
- [158] Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol*. 2001 Jan;121(1):103-9.
- [159] Osborne JE, Hutchinson PE. Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *Br J Dermatol*. 2002 Aug;147(2):197-213.
- [160] Matsumoto T, Sowa Y, Ohtani-Fujita N, Tamaki T, Takenaka T, Kuribayashi K, Sakai T. p53-independent induction of WAF1/Cip1 is correlated with osteoblastic differentiation by vitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Lett*. 1998 Jul 3;129(1):61-8.
- [161] Muto A, Kizaki M, Yamato K, Kawai Y, Kamata-Matsushita M, Ueno H, Ohguchi M, Nishihara T, Koeffler HP, Ikeda Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Blood*. 1999 Apr 1;93(7):2225-33.
- [162] Scaglione-Sewell BA, Bissonnette M, Skarosi S, Abraham C, Brasitus TA. A vitamin D<sub>3</sub> analog induces a G1-phase arrest in CaCo-2 cells by inhibiting cdk2 and cdk6: roles of cyclin E, p21Waf1, and p27Kip1. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):3931-9.

- [163] Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.* 1996 Dec 1;10(23):3065-75.
- [164] Su MJ, Bikle DD, Mancianti ML, Pillai S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem.* 1994 May 20;269(20):14723-9.
- [165] McLane JA, Katz M, Abdelkader N. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human keratinocytes grown under different culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990 Apr;26(4):379-87.
- [166] Ratnam AV, Bikle DD, Cho JK. 1,25 dihydroxyvitamin D3 enhances the calcium response of keratinocytes. *J Cell Physiol.* 1999 Feb;178(2):188-96.
- [167] Xie Z, Bikle DD. Cloning of the human phospholipase C-gamma1 promoter and identification of a DR6-type vitamin D-responsive element. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6573-7.
- [168] Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2004 Jun 1;92(3):436-44
- [169] Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002; 8: 174–9.
- [170] Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 2003; 88: 227–33.
- [171] van de Kerkhof P C. An update on vitamin D3 analogues in the treatment of psoriasis. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1998 Jan-Feb;11(1):2-10.
- [172] Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1alpha,25- dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3395-404.
- [173] Katayama I, Minatohara K, Yokozeki H, Nishioka K. Topical vitamin D3 downregulates IgE-mediated murine biphasic cutaneous reactions. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996 Sep;111(1):71-6.
- [174] Díaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, Binderup L, Hague A. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.* 2000 Apr 15;60(8):2304-12.

- [175] Guzey M, Kitada S, Reed JC. Apoptosis induction by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2002 Jul;1(9):667-77.
- [176] Narvaez CJ, Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2001 Mar 23;276(12):9101-7. Epub 2000 Oct 26.
- [177] Bektas M, Orfanos CE, Geilen CC. Different vitamin D analogues induce sphingomyelin hydrolysis and apoptosis in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 Feb;46(1):111-9.
- [178] Müller-Wieprecht V, Riebeling C, Stooss A, Orfanos CE, Geilen CC. Bcl-2 transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tumor necrosis factor alpha and 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Arch Dermatol Res.* 2000 Sep;292(9):455-62.
- [179] Benassi L, Ottani D, Fantini F, Marconi A, Chiodino C, Giannetti A, Pincelli C. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, transforming growth factor beta1, calcium, and ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1997 Sep;109(3):276-82.
- [180] Manggau M, Kim DS, Ruwisch L, Vogler R, Korting HC, Schäfer-Korting M, Kleuser B. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. *J Invest Dermatol.* 2001 Nov;117(5):1241-9.
- [181] De Haes P, Garmyn M, Carmeliet G, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S. Molecular pathways involved in the anti-apoptotic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem.* 2004 Nov 15;93(5):951-67.
- [182] Wozel G, Jahn S. *Biologics in der Dermatologie*, UNI-MED Science, 2. Neubearb. Auflage 2006, 172 Seiten
- [183] Kissmeyer A, Calverley MJ, Binderup L; 2000; *Chemistry and Pharmacology of Calcipotriol*; Vitamin D in Dermatology; Marcel Dekker, Inc.; New York, Basel
- [184] Ohta T, Fufuoka M, Sato H, Komoriya K; 2000; *Chemistry and Pharmacology of Tacalcitol*; Vitamin D in Dermatology; Marcel Dekker, Inc.; New York, Basel
- [185] ABDA-Datenbank, Datenbank-Infosystem (DBIS) der Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt:  
<http://www.justscience.de/de/drugbase/abda-datenbank.html>

- [186] Carsten Carlberg; 2000; Molecular Mechanisms of Action of Vitamin D; 1-27; Vitamin D in Dermatology; Marcel Dekker, Inc.; New York, Basel
- [187] Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol.* 1989 Aug;93(2):287-90.
- [188] Estrach S, Legg J, Watt FM. Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. *J Cell Sci.* 2007 Aug 15;120(Pt 16):2944-52. Epub 2007 Jul 31.
- [189] Fu B, Quintero J; Baker CC. Keratinocyte growth conditions modulate telomerase expression, senescence, and immortalization by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7815-24
- [190] Tenchini ML, Ranzati C, Malcovati M. Culture techniques for human keratinocytes. *Burns.* 1992;18 Suppl 1:S11-6.
- [191] Gebrauchsinformation Serumfreies Medium für Keratinozyten, Firma GIBCO
- [192] Adams JC, Watt FM. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):425-35
- [193] Poumay Y, Pittelkow MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol.* 1995 Feb;104(2):271-6.
- [194] Tiberio R, Marconi A, Fila C, Fumelli C, Pignatti M, Krajewski S, Giannetti A, Reed JC, Pincelli C. Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner. *FEBS Lett.* 2002 Jul 31;524(1-3):139-44
- [195] Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, Hodivala-Dilke KM, Eady RA. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116(Pt 20):4239-48. Epub 2003 Sep 2.
- [196] Meredith JE Jr, Schwartz MA. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1997 Apr;7(4):146-50.
- [197] Zhu AJ, Haase I, Watt FM. Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8;96(12):6728-33.

- [198] Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, Tarone G, Defilippi P. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998 Nov 16;17(22):6622-32.
- [199] Staiano-Coico L, Carano K, Allan VM, Steiner MG, Pagan-Charry I, Bailey BB, Babaar P, Rigas B, Higgins PJ. PAI-1 gene expression is growth state-regulated in cultured human epidermal keratinocytes during progression to confluence and postwounding. *Exp Cell Res.* 1996 Aug 25;227(1):123-34.
- [200] Kino-Oka M, Umegaki R, Taya M, Tone S, Prenosil JE. Valuation of growth parameters in monolayer keratinocyte cultures based on a two-dimensional cell placement model. *J Biosci Bioeng.* 2000;89(3):285-7.
- [201] Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E. Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Mar;86(5):1563-7.
- [202] Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.* 1980 Apr;19(4):1033-42 [203] Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation.* 2004 Oct;72(8):387-95
- [204] Holbrook KA, Odland GF. The fine structure of developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm. *J Invest Dermatol.* 1975 Jul;65(1):16-38.
- [205] Bickenbach JR. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res.* 1981 Aug;60 Spec No C:1611-20.
- [206] Lavker RM, Sun T-T: Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science.* 1982 Mar 5;215(4537):1239-41.
- [207] Watt FM, Green H. Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J Cell Biol.* 1981 Sep;90(3):738-42.
- [208] Mortensen JT, Lichtenberg J, Binderup L. Toxicity of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, tacalcitol, and calcipotriol after topical treatment in rats. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1996 Apr;1(1):60-3.
- [209] Itin PH, Pittelkow MR, Kumar R. Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium. *Endocrinology.* 1994 Nov;135(5):1793-8.

- [210] Gniadecki R. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its 20-epi analogues (MC 1288, MC 1301, KH 1060), on clonal keratinocyte growth: evidence for differentiation of keratinocyte stem cells and analysis of the modulatory effects of cytokines. *Br J Pharmacol.* 1997 Mar;120(6):1119-27.
- [211] Okuyama R, LeFort K, Dotto GP. A dynamic model of keratinocyte stem cell renewal and differentiation: role of the p21WAF1/Cip1 and Notch1 signaling pathways. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2004 Sep;9(3):248-52.
- [212] Reichrath J, Horf R, Chen TC, Müller SM, Sanan D, Holick MF. Expression of integrin subunits and CD44 isoforms in psoriatic skin and effects of topical calcitriol application. *J Cutan Pathol.* 1997 Sep;24(8):499-506.
- [213] Cho KH, Son YS, Lee DY, Chung EK, Hur KC, Hong SI, Fuchs E. Calcipotriol (MC 903), a synthetic derivative of vitamin D<sub>3</sub> stimulates differentiation of squamous carcinoma cell line in the raft culture. *Anticancer Res.* 1996 Jan-Feb;16(1):337-47.
- [214] Langberg M, Rotem C, Fenig E, Koren R, Ravid A. Vitamin D protects keratinocytes from deleterious effects of ionizing radiation. *Br J Dermatol.* 2009 Jan;160(1):151-61. Epub 2008 Aug 19.
- [215] Romano RA, Birkaya B, Sinha S. A functional enhancer of keratin14 is a direct transcriptional target of deltaNp63. *J Invest Dermatol.* 2007 May;127(5):1175-86. Epub 2006 Dec 7.
- [216] Roop D. Defects in the barrier. *Science.* 1995 Jan 27;267(5197):474-5.
- [217] Reichelt J, Büssow H, Grund C, Magin TM. Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice. *Mol Biol Cell.* 2001 Jun;12(6):1557-68.
- [218] Wong G, Gupta R, Dixon KM, Deo SS, Choong SM, Halliday GM, Bishop JE, Ishizuka S, Norman AW, Posner GH, Mason RS. 1,25-Dihydroxyvitamin D and three low-calcemic analogs decrease UV-induced DNA damage via the rapid response pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 May;89-90(1-5):567-70.



# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Stammzellkompartimente der Haut, adaptiert von Braun und Prowse [42].	5
Abb. 2:	Lokalisation und Organisation interfollikulärer epidermaler Stammzellen (eSZ), transient amplifizierender Tochterzellen (TAZ) sowie postmitotischer Zellen (PMZ), adaptiert von Potten und Booth [53].	6
Abb. 3:	Immunhistochemische $\beta$ 1-Integrin-Färbung an juveniler Vorhaut nach Dispasebehandlung.	32
Abb. 4:	Kollagen-IV-Isolierung zur Separation epidermaler Stammzellen als schnell-adhärente Zellen (s-ad), transient amplifizierender Tochterzellen als langsam-adhärente Zellen (l-ad) und postmitotischer Zellen als nicht-adhärente Zellen (n-ad)	34
Abb. 5:	Dotplot der Streulichtparameter Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsscatter (FSC).	37
Abb. 6:	Dotplot aus Vorwärtstreulicht (FSC-Height) und Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid im Fluoreszenzkanal 3 (Empty).	38
Abb. 7:	Dotplot mit Quadrantenanalyse Annexin V (Annexin-FITC) und Propidiumiodid (DNA-PI).	40
Abb. 8:	Beispiel-Histogramm des relativen DNAGEhaltes als FL2-Area (Impuls-Fläche des Fluoreszenzsignals) anhand der Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid.	41
Abb. 9:	Inkubationsplan 48er Mikrotiterplatte Vitalfärbung zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens unter 100 nM Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol bei schnell- (s-ad) und langsam-adhärenenten (l-ad) Zellen	45

Abb. 10: Inkubationsplan 48er Mikrotiterplatte zur Toxizitätsbestimmung Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol bei schnell- (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen.	46
Abb. 11: Inkubationsplan 24iger Mikrotiterplatte zur Bestimmung des [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbaus unter 100 nM Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol bei schnell- (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen .....	47
Abb. 12: Einfluss der Adhäsionszeit an Kollagen IV auf Anzahl und β1-Integrin-Expression schnell-adhärenen Zellen. ....	50
Abb. 13: Durchflusszytometrische Bestimmung der β1-Integrin-Expression (d-MFI) von schnell- (s-ad), langsam- (l-ad) und nicht-adhärenen (n-ad) Zellen nach der Kollagen-IV-Isolierung. ....	50
Abb. 14: Repräsentativer Histogramm-Overlay einer durchflusszytometrischen Messung der β1-Integrin- Intensität (FL1-Height) der drei Zellfraktionen nach der Kollagen-IV-Isolierung. ....	51
Abb. 15: Durchflusszytometrische Messung von Annexin V (A) und Propidiumiodid (PI) an der schnell- (s-ad), langsam- (l-ad) und nicht-adhärenen (n-ad) Zellfraktion nach der Isolierung mit Kollagen-IV. ....	51
Abb. 16: Prozentualer Anteil der drei Kollagen-IV-isolierten Zellfraktionen schnell-adhären (s-ad), langsamadhären (l-ad) und nicht-adhären (n-ad) an der <i>vitalen</i> Gesamtpopulation. ....	52
Abb. 17: Zellzyklusanalyse von schnell-adhärenen (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen nach Kollagen-IV-Isolierung. ....	53
Abb. 18: Wachstumskurven von schnell-adhärenen (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen mittels Vitalfärbung mit Gentianaviolett innerhalb von 7 d. ....	54
Abb. 19: Wachstumskurven von schnell-adhärenen (s-ad) und langsamadhärenen (l-ad) Zellen mittels [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau innerhalb von 7 d. ....	55
Abb. 20: Repräsentative Darstellung von Zellkolonien schnell-adhärenen (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen. ....	55
Abb. 21: Koloniebildungseffizienz (CFE %) von schnell-adhärenen (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen nach 14 d. ....	56
Abb. 22: Koloniedurchmesser (mm) von schnell-adhärenen (s-ad) und langsam-adhärenen (l-ad) Zellen nach 14 d. ....	56

- Abb. 23: Durchflusszytometrische Bestimmung des Zytokeratin-14(CK14)-Signals (d-MFI) bei schnelladhärenten (s-ad) und langsamadhärenten (l-ad) Zellen nach Kollagen-IV-Isolierung..... 57
- Abb. 24: Durchflusszytometrische Bestimmung von Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC) bei schnell-ad-härenten (s-ad) und langsam-adhärennten (l-ad) Zellen nach Kollagen-VI-Isolierung..... 57
- Abb. 25: Repräsentative histogrammische Darstellung von FSC- und SSC-Signal bei schnell-adhärennten (s-ad) (rot) und langsam-adhärennten (l-ad) Zellen (schwarz). 58
- Abb. 26: Nachweis der Vitamin-D-Rezeptor-(VDR)Expres-sion bei schnell-adhärennten (s-ad) und langsam-adhärennten Zellen (l-ad) nach der Kollagen-IVIsolierung mittels Westernblot. .... 58
- Abb. 27: Vitalität von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol (0,1; 1; 10;100; 1.000 und 10.000 nM) nach 12, 24 und 48 h im Vergleich zur Kontrolle (0 nM). 60
- Abb. 28: Vergleich der Vitalität von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Expostion mit 1.000 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 12, 24 und 48 h. .... 61
- Abb. 29: Zweiparameter-Messung Annexin V und Propidiumiodid nach 12 h zur Zelltodcharakterisierung von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1, 100 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM)..... 62
- Abb. 30: Zweiparameter-Messung Annexin V und Propidiumiodid nach 24 h zur Zelltodcharakterisierung von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1, 100 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM)..... 63
- Abb. 31: Zweiparameter-Messung Annexin V und Propidiumiodid nach 48 h zur Zelltodcharakterisierung von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 1, 100 und 10.000 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacacitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM). .... 64
- Abb. 32: Relative Zellzahl von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) innerhalb von 120 h.66

- Abb. 33: Vergleich der relativen Zellzahl von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol innerhalb von 120 h. .... 67
- Abb. 34: [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau bei epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) innerhalb von 96 h.. 69
- Abb. 35: Vergleich des [<sup>3</sup>H]-ThymidinEinbaus von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol innerhalb von 96 h. .... 70
- Abb. 36: Zellzyklus-Analyse epidermaler Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierender Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h im Vergleich zur Kontrolle (0 nM). .... 71
- Abb. 37: Vergleich von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) in der G0/G1-Phase unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h..... 72
- Abb. 38: Vergleich von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) in der S-Phase unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h..... 73
- Abb. 39: Vergleich von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) in der G2/M-Phase unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 h und 48 h..... 74
- Abb. 40: Koloniebildungseffizienz (CFE %) von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle nach 14 d. .... 75
- Abb. 41: Vergleich der Koloniebildungseffizienz von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 14 d. .... 76
- Abb. 42: Koloniedurchmesser (mm) von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) unter Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle nach 14 d..... 76
- Abb. 43: Vergleich des Koloniedurchmessers exponierter epidermaler Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierender Tochterzellen (TAZ) unter Exposition von 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 14 d. .... 77

Abb. 44:  $\beta$ 1-Integrin-Expression bei epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM). ..... 77

Abb. 45: Vergleich der  $\beta$ 1-Integrin-Expression von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 und 48 h. .... 78

Abb. 46: Relative CK14-Expression in % bei epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol im Vergleich zur Kontrolle (0 nM). ..... 79

Abb. 47: Vergleich der CK14-Expression von epidermalen Stammzellen (eSZ) und transient amplifizierenden Tochterzellen (TAZ) nach Exposition mit 100 nM Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol nach 24 und 48 h. .... 80



# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht interfollikuläre Stammzellmarker .....	10
Tab. 2: Methoden zur Isolierung epidermaler Stammzellen .....	12
Tab. 3: Daten zu den Vitamin-D3-Analoga Calcitriol, Calcipotriol und Tacalcitol [185, 186].	20
Tab. 4: Zellfraktionen der Kollagen-IV-Isolierung, adaptiert von Kim et al. [24] .....	34
Tab. 5: Zelleinsaat .....	36
Tab. 6: Zusammensetzung der Gele .....	43
Tab. 7: Antikörper-Verdünnungen .....	45



# Veröffentlichungen, Vorträge, Poster

## Publikationen

Rzepka K, Schaarschmidt G, Nagler M, Wohlrab J

Epidermale Stammzellen

JDDG 2005 Dec;3(12):962-973

## Vorträge

Rzepka K, Klapperstück T, Wohlrab J

Epidermale Stammzellen als Zielstruktur der Pharmakotherapie

44. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 25.-28.April 2007, Dresden

JDDG 5, Suppl 2 (2007) S151

## Poster

Höche F, Rzepka K, Recker K, Wohlrab J

Beeinflussung der keratinozytären Harnstoffsynthese.

JDDG 1, Suppl 1 (2003) 169

Rzepka K, Höche F, Recker K, Wohlrab J

Untersuchungen zum Einfluss von Agmatinsulfat auf den Stoffwechsel humaner nativer Keratinozyten

JDDG 1, Suppl 1 (2003) 168

Steierhoffer F, Klapperstueck T, Nagler M, Rzepka K, Wohlrab J

Transfection of human keratinocytes in vitro using non-viral vectors and FuGENETM 6

Arch Dermatol Res. 2005 Mar;296:408

Nagler M, Steierhoffer F, Klapperstück T, Rzepka K, Wohlrab J

SKIN-HET-CAM: An in-vivo model, using perfused, living human skin

Arch Dermatol Res. 2005 Mar;296:386

Rzepka K, Klapperstück T, Nagler M, Steierhoffer F, Wohlrab J

Enrichment of stem cells from human native epidermal keratinocytes

Arch Dermatol Res. 2005 Mar;296:449

Steierhoffer F, Klapperstueck T, Nagler M, Rzepka K, Wohlrab J

In-vitro-Transfektion humaner Keratinozyten mittels nicht-viraler Vektoren

JDDG 2005 Apr;3(1):227

Rzepka K, Klapperstueck T, Nagler M, Steierhoffer F, Wohlrab J

Methodenvalidierung zur Gewinnung epidermaler Stammzellen

JDDG 2005 Apr;3(1):227

Nagler M, Klapperstueck T, Steierhoffer F, Rzepka K, Wohlrab J

Charakterisierung des Musters epidermaler Stammzellen im Hautorgan

JDDG 2005 Apr;3(1):228

Rzepka K, Klapperstück T, Nagler M, Steierhoffer F, Wohlrab J

Research of drug effects on epidermal stem cells in vitro

Exp Dermatol. 2006 Mar;15(3):251

Rzepka K, Klapperstück T, Wohlrab J

Epidermal stem cells as drug target

Exp Dermatol. 2007 Mar;16(3):242



# Danksagung

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von 04/2004 bis 06/2007 in der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Johannes Wohlrab, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erarbeitet.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Johannes Wohlrab für die Überlassung des interessanten Themas, die offene Atmosphäre für kritische und sachdienliche Diskussionen und vor allem für die motivierende Unterstützung während der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei Herrn Dr. rer. nat. Thomas Klapperstück für die Hilfestellung bei experimentellen Fragestellungen, für die wissenschaftliche Beratung sowie für die freundschaftlichen Ratschläge.

Sehr dankbar bin ich Frau Karin Hölsken und Frau Ursula Schramm für die stetige Hilfsbereitschaft und vor allem für die große Unterstützung bei der Zellisolierung sowie bei den radioaktiven Versuchen.

Bei Frau Dana Reinicke möchte ich mich für die fachliche Hilfestellung bei der Westernblotmethodik sehr bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Auch meinen Freunden möchte ich danken, die durch ihre moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt zuletzt meinem Freund Jan-Peter Hashagen, der immer für mich da war und mich während der gesamten Zeit liebevoll unterstützt hat.



# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 (2) b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 29. April 2010

Karin Rzepka



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Rzepka, Karin  
Straße: Ulestr. 13  
PLZ/Wohnort: 06114 Halle (Saale)  
Geburtsdatum/-ort: 22.08.1976; Halle (Saale)  
Familienstand: ledig  
Kinder: keine  
Nationalität/  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Schulbildung:

09/1983 – 02/1984 Polytechnische Oberschule  
(POS) Diemitz, Diemitz  
03/1984 – 07/1987 POS Theodor Neubauer;  
Halle/S.  
09/1987 – 07/1991 POS Berhard Koenen; Gleina  
09/1991 – 07/1995 Gymnasium Laucha; Laucha  
*Abitur*

## Berufsausbildung

08/1995 – 09/1998 Ausbildung zur Lorbeerbaum-Apotheke;  
Pharmazeutisch-kaufmännischen Angestellten Naumburg/Saale;  
*08/2008 Pharmazeutisch-kaufmännische Angestellte*

## Studium

10/1998 – 09/2002 Universitätsstudium Marthin-Luther-Universität;  
Pharmazie Halle/Saale

10/2002 – 04/2003	Diplom  22.08.2003 <i>Diplompharmazeutin</i>	Abt. der Experimentellen Dermatologie Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der MLU in Halle/Saale Abschluss:
05/2003 – 10/2003	Pharmaziepraktikum	Kurfürsten Apotheke; Bremen Inh. Klaus Anthes
20.11.2003	3. Staatsexamen 02.12.2003 <i>approbierte Apothekerin</i>	
<b>Beruflicher Werdegang / Weiterbildung</b>		
12/2003 – 03/2004	Angestellte Apothekerin	Pelikan-Apotheke, Dessau Inh. Kerstin Peter
04/2004 – 06/2007	Doktorandin	Abt. der Experimentellen Dermatologie Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der MLU in Halle/Saale Abschluss der praktischen Arbeit mit Ende des Doktorandenvertrages
07/2007 – 04/2009	Wissenschaftliche Angestellte in der Pharmazeutischen Industrie, Abteilung Arzneimittelzulassung	mibe GmbH Arzneimittel, Brehna
05/2009 – 09/2009	Angestellte Apothekerin	Steintor-Apotheke in Halle S., inkl. Filialen (Aurora-Apotheken in Büschdorf/Halle, Landsberg, Delitzsch) Inh. Barbara Langhans
10/2009 – 03/2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter	Abt. Experimentelle Dermatologie, Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie MLU in Halle/Saale
Halle (Saale), 29. April 2010		Karin Rzepka