Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Die Rolle des Vitamin-D-Rezeptors für UVB-induzierte Hautveränderungen bei der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Birte Kortendieck
aus München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1.	**EINLEITUNG**	1
2.	**LITERATURÜBERSICHT**	3
2.1	**Einführung**	3
2.2	**Vitamin-D: chemische Struktur**	3
2.3	**Metabolismus und Transport**	4
2.4	**Regulation der Biosynthese**	6
2.5	**Physiologische Funktionen des Vitamin-D**	6
2.5.1	Funktionen des Vitamin-D im Darm	7
2.5.2	Funktionen von Vitamin-D in der Niere	8
2.5.3	Vitamin-D-Effekte am Knochen	9
2.6	**Rolle des Vitamin-D in der Haut**	9
2.6.1	Vitamin-D Stoffwechsel in der Haut	9
2.6.2	Biologische Wirkungen von Vitamin-D in der Haut	11
2.6.2.1	Antiproliferative und prodifferenzierende Wirkung auf Keratinozyten	11
2.6.2.2	Immunmodulierende Effekte in der Haut	11
2.6.2.3	Regulation der Apoptose von Keratinozyten	12
2.6.2.4	Antioxidative Wirkung von Vitamin-D	13
2.6.2.5	Vitamin-D Versorgung und Sonnenschutz	14
2.6.2.6	Vitamin-D und Alopezie	16
2.7	**Die Bedeutung verschiedener Tiermodelle für die Vitamin-D Forschung**	17

Seite

3.	**MATERIAL UND METHODEN**	19
3.1	**Tiermaterial**	19
3.2	**Tierhaltung**	20
3.3.	**Methoden**	20
3.3.1	Enthaaren der Mäuse	20
3.3.2	Messen der Hautfaltendicke	21
3.3.3	Bestrahlung mit UV-Licht	21
3.4	**Versuchsdurchführung**	21
3.4.1	UV induzierte Karzinogenese	21
3.4.2	Entzündungsreaktion der Haut nach UV Kurzeitexposition	23
3.4.3	Veränderungen der Haut nach UV Langzeitexposition	24
3.5	**Histologische Aufarbeitung der Hautproben**	26
3.5.1	Präparation, Fixierung und Entwässerung	26
3.5.2	Einbettung	26
3.5.3	Herstellung von Paraffinschnitten	26
3.5.4	Färbung der Hautschnitte	27
3.6	**Histologische Messungen**	28
3.7	**Statistik**	28
4.	**ERGEBNISSE**	30
4.1	**UV induzierte Karzinogenese**	30

Seite

4.2	**Vergleich der Entzündungsreaktionen der Haut nach UV-Kurzzeitexposition**	31
4.2.1	Ergebnis der faktoriellen Varianzanalyse	31
4.2.2	Entwicklung des Körpergewichts	31
4.2.3	Entwicklung der Hautfaltendicke	33
4.2.4	Entwicklung der Epidermisdicke	35
4.3	**Auswirkungen mehrwöchiger Bestrahlung mit UV Licht**	38
4.3.1	Ergebnis der faktoriellen Varianzanalyse	38
4.3.2	Entwicklung des Körpergewichts	38
4.3.3	Entwicklung der Hautfaltendicke	39
4.3.4	Entwicklung der Epidermisdicke	40
5	**DISKUSSION**	44
5.1	**Der Phänotyp von VDR-Knockout Mäusen**	44
5.2	**UVB-induzierte Hautkarzinogenese**	45
5.3	**UVB-induzierte Keratinozytenproliferation und Entzündungsreaktion der Haut**	46
5.4	**Ausblick**	48
6.	**Zusammenfassung**	49
7.	**Literaturverzeichnis**	53
8.	**Danksagung**	67
9.	**Lebenslauf**	68

1. EINLEITUNG

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass das Vitamin-D-Hormon 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3 ($1\alpha,25(OH)_2D_3$) im Organismus für die Aufrechterhaltung eines stabilen Plasma-Kalzium-Spiegels und für die Regulation des Knochenstoffwechsels durch Bereitstellung von Kalzium für die Knochenmineralisation essentiell ist. Das Vitamin-D-Hormon wird durch eine hepatische und eine renale Hydroxylierung aus Vitamin D gebildet, das seinerseits in der Haut unter UV-Bestrahlung synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen werden kann. Ein genuiner Vitamin-D-Mangel oder eine verminderte endogene renale Produktion von $1\alpha,25(OH)_2D_3$ gehen mit sekundärem Hyperparathyreoidismus und mit Knochenmineralisations-Störungen einher (Holick, 2003). Neben diesen „calcämischen" Wirkungen von $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ist in den letzten Jahren eine Reihe von Wirkungen dieses Steroidhormons in anderen Organsystemen entdeckt worden. Epidemiologische Untersuchungen haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass ein über längere Zeit bestehender Vitamin D-Mangel das Risiko systemischer Erkrankungen wie z.B. Bluthochdruck, diverse Krebserkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und Typ I-Diabetes erhöht (Holick, 2003).

Wie alle Steroidhormone wirkt $1\alpha,25(OH)_2D_3$ über ein intrazelluläres Rezeptorprotein, den Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der von einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Eine starke Expression von VDR findet sich zum Beispiel auch in der Haut (Milde et al., 1991; Holick et al., 1987; Feldman et al., 1980). Vitamin-D-Metaboliten hemmen in höheren Konzentrationen die Proliferation von Keratinozyten und sind deshalb mittlerweile eines der Standardtherapeutika bei Hautkrankheiten, die mit einer gesteigerten Keratinozyten-Proliferation, wie zum Beispiel Psoriasis, einhergehen (Gniadecki, 1996). In der Haut wird der Vitamin-D-Rezeptor jedoch nicht nur in den epidermalen Keratinozyten exprimiert, sondern auch in Keratinozyten des äußeren Haarschafts und in der Papille des Haarfollikels (Stumpf et al., 1984; Berger et al., 1988; Reichrath et al., 1994). In neueren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass für die pränatale Entwicklung der Epidermis und den erste Haarzyklus kein Vitamin-D-Rezeptor benötigt wird (Xie et al., 2002), anders als für die Entwicklung der postnatalen Haut und das Einsetzen des zweiten Haarzyklus. Diese Erkentnisse lassen den Schluss zu, dass der Vitamin D-Rezeptor – interessanterweise unabhängig von seinem Liganden $1\alpha,25(OH)_2D_3$ - in einer kritische Phase im zweiten Haarzyklus für die Entwicklung der Haarfollikel Voraussetzung ist (Xie et al., 2002; Kong et al., 2002). Deshalb führen genetische Defekte des VDR,

nicht jedoch Vitamin-D-Mangel oder Vitamin-D-Hormonmangel, bei Mensch und Maus zu einer generalisierten Alopezie (Yoshizawa et al, 1997; Li et al., 1997; Erben et al., 2002).

Hinzu kommt, dass in jüngster Zeit sowohl in vitro (Schuessler et al., 2001) als auch in vivo (Lehmann et al., 2003) der Nachweis gelang, dass humane Keratinozyten über einen autonomen Vitamin D-Stoffwechsel verfügen. Dieser neue Stoffwechselweg, auf dem substantielle Mengen Vitamin-D-Hormon gebildet werden können, umfasst sowohl die lang bekannte UV-induzierte Synthese von Vitamin D_3, als auch dessen weitere Metabolisierung zu aktivem Vitamin-D-Hormon. Damit ist die Haut das einzige menschliche Organ, das in der Lage ist, unabhängig die Synthese, Aktivierung und Deaktivierung von Vitamin-D durchzuführen, d.h. epidermale Keratinozyten sind sowohl Syntheseort als auch pharmakologische Zielzellen von Vitamin-D (Schuessler et al., 2001).

Neben der antiproliferativen Wirkung von Vitamin-D-Metaboliten auf Keratinozyten werden auch immunomodulatorische (Adorini et al., 2003; Griffin et al., 2003; Van Etten et al., 2003) und antioxidative Wirkungen dieser Substanzklasse auf die Haut diskutiert. Letztere Wirkung wird möglicherweise durch eine Stimulation der Synthese von Metallothionein (MT) durch Vitamin-D in der Haut vermittelt. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass Vitamin-D die Fähigkeit hat, über die gesteigerte Synthese von MT und dessen antioxidativen Effekt einen photoprotektiven Effekt auf Keratinozyten auszuüben (Lee, 1998). Um diese potenzielle Wirkung des Vitamin-D-Hormons in der Haut näher zu untersuchen, war es das Ziel dieser Arbeit, die Reaktion der Haut auf UVB-Bestrahlung bei Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten VDR-Knockout-Mäusen zu untersuchen. Die für diese Versuche von uns verwendeten VDR-Knockout-Mäuse exprimieren einen funktionell inaktiven VDR ohne DNA-Bindungsdomäne (Erben et al., 2002).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Einführung

Heutzutage ist allgemein bekannt, dass für eine normale Körperentwicklung und einen gesunden Organismus neben den eigentlichen Nahrungsbestandteilen (Eiweiß, Fett, Kohlehydrate) auch viele Vitamine und Spurenelemente essentiell sind. Diese Erkenntnis führte Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Entdeckung der Vitamine zu völlig neuen Therapieansätzen bei Krankheiten, die jetzt als Vitamin-Mangelerscheinung erkannt wurden. Insbesondere die in den Industrieländern weit verbreitete Rachitis war jetzt durch die Einnahme von Lebertran heilbar (Mellanby, 1918). Zeitgleich mit der Entdeckung der eigentlich wirksamen Substanz, die 1921 erstmals als Vitamin-D benannt wurde (McCollum et al., 1921), stellte man fest, dass der gleiche therapeutische Effekt, der durch Behandlung mit Lebertran erreicht werden konnte, auch durch eine Bestrahlung mit UV-Licht möglich war (Huldschinsky, 1919). Durch diese Erkenntnis war es möglich, die Rachitis in den Industrieländern nahezu vollständig zu beseitigen. Zugleich wurde auch klar, dass das Vitamin-D eine Sonderstellung unter den Vitaminen einnimmt. Anders als essentielle Vitamine kann das Vitamin-D sowohl mit der Nahrung aufgenommen werden, als auch – unter dem Einfluß von UV-Licht - im Körper selbst synthetisiert werden.

2.2 Vitamin-D: chemische Struktur

Das Vitamin-D oder Calciferol gehört seiner chemischen Struktur nach zu der Gruppe der Steroide. Durch diese Steroidstruktur und aufgrund anderer typischer Eigenschaften (z.B. Fähigkeit zur Eigensynthese, endokrine Kontrolle der Eigensynthese) werden biologisch aktive Metabolite der Calciferole heute als Hormone bezeichnet.

Wichtigster Vertreter der Calciferole ist das Cholecalciferol (Vitamin-D_3), das selbst nicht biologisch aktiv ist. Vitamin-D_3 wird entweder nach oraler Aufnahme im Dünndarm resorbiert oder unter der Einwirkung von UV-Licht in der Haut synthetisiert (Holick et al., 1980; Milde, 1991; Bikle & Pillai, 1993).

2.3 Metabolismus und Transport

Ursprung der Synthese ist das Cholesterol, das durch das Enzym Cholesteroldehydrogenase in den Hepatozyten zu 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) umgebaut wird. Das 7-DHC gelangt, gebunden an Transportproteine, aus den Hepatozyten über das Blut zu den Keratinozyten der Haut. Die Vitamin-D-Synthese findet in allen Schichten der Haut statt, vor allem aber im Stratum basale und Stratum spinosum der Epidermis (Holick et al., 1980). Unter Einfluß von UV-Licht bestimmter Wellenlänge (UVB, 290-315 nm) (MacLaughlin et al., 1982) bildet das 7-DHC Isomere (Windaus et al., 1936; Esvelt et al., 1978). Dabei kommt es am Steoridgerüst des Moleküls zu einer Ringöffnung (am B-Ring zwischen C9 und C10). Durch diese photochemische Isomerisierung entsteht zuerst das rotationsinstabile ProVitamin-D (Windaus et al., 1936; Esvelt et al., 1978), das in einem zweiten, temperaturabhängigen Schritt durch eine Verschiebung der Doppelbindung zum stabilen Vitamin-D isomerisiert. Dieser Prozeß ist eine Gleichgewichtsreaktion (Velluz & Amiard, 1949), die nur so lang abläuft, wie das Produkt Vitamin-D aus der Zelle ausgeschleust wird. Für den Abtransport des Vitamin-D scheinen Vitamin-D Bindungsproteine eine Rolle zu spielen (Haddad et al., 1993). Der genaue Ausschleusungsmechanismus in den Extrazellularraum ist noch nicht im Detail geklärt. Durch den zügigen Mechanismus ist es möglich, dass über die gesamte Zeit der UV Exposition Vitamin-D gebildet werden kann, um vor allem bei limitierter Sonneneinstrahlung (Jahreszeit, Tageszeit, Sonnenschutzmaßnahmen, geographische Lage, Pigmentierung der Haut u.a.) den maximalen Nutzen aus der UV-Strahlung zu ziehen (Webb et al., 1988; Matsuoko et al., 1992; Lu et al., 1992).

Das in der Epidermis gebildete Vitamin-D besitzt selbst noch keine biologische Aktivität, erst in der Leber findet der erste Schritt der Aktivierung statt. Beim Transport der inaktiven Vorstufe zur Leber spielen neben Albumin und Lipoproteinen v.a. Vitamin-D-Bindungsproteine eine Rolle. Diese Bindungsproteine liegen im hohen Überschuß frei im Plasma vor. Sie werden in der Leber synthetisiert (Haddad, 1987 und 1992; Cooke & Haddad, 1989; Braun et al., 1992) und bestehen aus einer Gruppe mehrerer sehr ähnlicher Polypetide (α-Globuline, ca. 58 kDa). Aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität sind diese Proteine in der Lage, freies Vitamin-D und seine Metaboliten fast vollständig einzufangen. Ihre Funktion als Kurzzeitspeicher für Vitamin-D (Langzeitspeicher ist das Fettgewebe im Säuger bzw. die Leber bei manchen Fi-

schen) wird diskutiert. Hauptsächlich dienen sie aber dem Plasmatransport der hydrophoben Vitamin-D-Metaboliten.

Der erste Schritt zur Aktivierung des Vitamin-D findet in den Hepatozyten der Leber statt. Durch eine Cytochrom P450-abhängige mitochondriale Hydroxylase (Andersson et al., 1989; Okuda et al., 1995) wird das Molekül an Position 25 hydroxyliert. Ob an diesem Prozeß auch andere Enzyme beteiligt sind, konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Geregelt wird der Prozeß der Hydroxylierung zu 25-Hydroxycholecalciferol ($25(OH)D_3$) über einen Produkthemmungsmechanismus.

Der zweite Schritt zur Aktivierung des Vitamin-D erfolgt in der Niere, wo $25(OH)D_3$ durch eine 1αHydroxylierung zu 1α,25 Dihydroxycholecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$) biologisch aktiviert wird. An dieser Stelle greift auch der zentrale Regulationsmechanismus, der eine Überproduktion von biologisch aktivem Vitamin-D verhindert. Steuerungsfaktor der Regulation ist die 1α-Hydroxylase, die für diese Hydroxylierung notwendig ist. Auch dieses Enzym ist eine mitochondriale, Cytochrom P450-abhängige Monoxygenase. Dieser Vorgang der zweiten Hydroxylierung ist an die Niere gebunden (Fraser & Kodicek, 1970), daher kommt es bei schweren Nierenerkrankungen mit Funktionsverlust v.a. im Bereich des proximalen Tubulus (Holick et al., 1972) häufig zu Störungen des Vitamin-D-Haushalts.

Eine Deaktivierung des $25(OH)D_3$ erfolgt dann, wenn das Vitamin-D Hormon $1,25(OH)2OH_3$ im Überschuß vorliegt. In diesem Fall wird aus der Niere aus $25(OH)D_3$ durch eine Cytochrom P450-abhängige 24-Hydroxylase (Jones et al., 1987) vermehrt der Metabolit $24,25(OH)_2D_3$ gebildet. Dieser Metabolit hat eine 10.000 mal geringere biologische Aktivität als das Vitamin-D-Hormon. Daher gilt diese Hydroxylierung zu $24,25(OH)_2D_3$ als wichtigste Deaktivierung von $25(OH)D_3$. Ob $24,25(OH)_2D_3$ eine eigenständige Funktion besitzt wird diskutiert (Norman et al., 2002). Da der Metabolit selbst aber keiner strengen Regulation unterliegt ist es unwahrscheinlich, dass er eine zentrale Bedeutung im Bereich der Kalziumhomöostase-Regulation spielt (Jones et al., 1987).

Die Inaktivierung des Vitamin-D in den Zielzellen erfolgt in der ersten und wichtigsten Stufe ebenfalls über eine 24-Hydroxylierung (Lohnes & Jones, 1992). Der dabei entstehende Metabolit 1,24,25-Trihydroxycholecalciferol hat eine 5mal geringere biologische Aktivität als das $1,25(OH)_2D_3$. Der Katabolismus von Vitamin-D ist nicht an ein bestimmtes Organsystem

gebunden, wahrscheinlich sind alle Vitamin-D-Zielgewebe dazu in der Lage. Das Endprodukt des Vitamin-D-Stoffwechsels ist die Calcitronsäure, die in der Leber in die Gallenflüssigkeit sezerniert wird (Jones, 1999).

2.4 Regulation der Biosynthese

Die Biosynthese des aktiven Vitamin-D unterliegt im Organismus einer strengen Regulation. Als wichtigstes Element zur Aktivierung der $1,25(OH)_2D_3$-Biosynthese gilt das Parathormon (PTH), das beim Absinken des Kalziumspiegels im Blut vermehrt ausgeschüttet wird (Brown et al., 1993). Das PTH bewirkt über einen nicht näher bekannten Mechanismus, dass die Synthese der renalen 1α-Hydroxylase stimuliert und die Synthese der 24-Hydroxylase gehemmt wird. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Bildung von $1,25(OH)_2D_3$. Die negative Rückkopplung erfolgt über eine Erhöhung des Plasmakalziumspiegels, der Folge der kalzämischen Effekte des $1,25(OH)_2D_3$ in Darm und Niere ist.

Vermutlich wird dieser Regulationsmechanismus auch noch von anderen Faktoren beeinflusst. So scheint z.B. $1,25(OH)_2D_3$ selbst in der Lage zu sein, die Synthese der 24-Hydroxylase zu stimulieren (Zierold et al., 1994; Ohyama et al., 1994). Auch der Plasmaphosphatspiegel spielt eine Rolle bei der Synthese des $1,25(OH)_2D_3$. Hypophosphatämie scheint ebenso wie PTH die 1α-Hydroxylase zu stimulieren und die 24-Hydroxylase zu hemmen (Baxter & DeLuca, 1976; Wu et al., 1996). Der molekulare Mechanismus dieser Effekte ist noch nicht geklärt.

2.5 Physiologische Funktionen des Vitamin-D

Die wichtigste Funktion des $1,25(OH)_2D_3$ im Organismus ist die Aufrechterhaltung eines stabilen Plasma-Kalzium-Spiegels (bei Säugetieren ca. 2,5 mmol/l) und die Regulation des Knochenstoffwechsels durch Bereitstellung von Kalzium für die Knochenmineralisation. Miteinbezogen in dieses komplexe Regulationssystem sind vor allem der Dünndarm als Ort der enteralen Kalzium- und Phosphorabsorption, die Nieren als Ort der renalen Kalzium- und Phosphorexkretion bzw. Reabsorption sowie der $1,25(OH)_2D_3$-Biosynthese und die Nebenschilddrüse als Bildungsort des regulatorischen PTH. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Fä-

higkeit des Knochengewebes, durch ständig möglichen Knochenabbau oder Knochenneusynthese dem Organismus einen flexiblen Kalziumspeicher zur Verfügung zu stellen. Allerdings ist das Knochengewebe längerfristig auf eine ausreichende Versorgung mit Kalzium und Phosphor angewiesen, um stabile, belastbare Knochensubstanz zu bilden.

Aber auch in anderen Geweben, in denen VDR exprimiert wird (z.B. Herz, Magen, Pankreas, Gehirn, Haut, Gonaden, aktivierte T- und B-Lymphozyten) (Holick, 2003), besitzt $1.25(OH)_2D_3$ wahrscheinlich eine Vielzahl weiterer pysiologischer Funktionen, die zwar nur zum Teil aufgeklärt sind, aber in den letzten Jahren für die Forschung immer mehr an Bedeutung gewinnen.

2.5.1 Funktionen des Vitamin-D im Darm

Nach heutigem Kenntnisstand sind zwei voneinander unabhängige Transportmechanismen für die Kalziumresorption im Darm verantwortlich. Der erste, ein sättigbarer, transzellulärer Mechanismus ist vor allem bei niedrigen Konzentrationen (bis 10 mM) im proximalen Teil des Dünndarms von Bedeutung (Johnson & Kumar, 1994; Wassermann & Fullmer, 1995). Dabei werden Kalziumionen am Bürstensaum der Enterozyten dem elektrochemischen Gradienten folgend resorbiert, transzellulär transportiert und an der basolateralen Zellmembran mit Hilfe eines energieverbrauchenden Prozesses gegen den Konzentrationsgradienten in die extrazelluläre Flüssigkeit abgegeben. Der intrazelluläre Transport erfolgt bei Säugetieren durch das Kalziumbindungsprotein Calbindin D9K, dessen Synthese durch Vitamin-D induziert wird (Feher et al., 1992).

Der zweite Mechanismus zur Kalziumresorption ist ein passiver, sättigbarer, interzellulärer Vorgang, der bei Konzentrationen zwischen 10 mM und 50 mM im gesamten Dünndarm vonstatten geht (Johnson & Kumar, 1994; Wasserman & Fullmer, 1995).

Im Falle eines Vitamin-D Mangels kommt es zwar zur Resorption von Kalzium am lumenseitigen Bürstensaum, allerdings wird dieses dann im Mikrovillibereich an Calmodulin gebunden. Man nimmt an, dass es zu einer Komplexbildung mit Myosin I (ATPase) und Actin (Bikle et al., 1989; Chandra et al., 1990; Kaune et al., 1994) und daraus resultierend zum irreversiblen Verschluß der Kalziumkanäle kommt.

Bei Kalziummangel kommt es im Organismus zu einer gesteigerten Sekretion von Parathormon, wodurch die Biosynthese von Vitamin-D induziert wird, was zur Steigerung der enterale Kalziumaufnahme führt. Die Resorption von Phosphat erfolgt im gesamten Jejunum und Ileum. Sie kann zwar durch Vitamin-D stimuliert werden, ist aber primär von der Phosphatkonzentration im Darmlumen abhängig (Lemann, 1993).

2.5.2 Funktionen von Vitamin-D in der Niere

Die Niere spielt in zweifacher Hinsicht eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Kalziumhomöostase, das sie sowohl Syntheseort von Vitamin-D ist, als auch wichtigstes Regulativ der Kalzium- und Phosphatexkretion bzw. –reabsorption. Bis zu 98% des im Primärharn abgegebenen Kalzium werden in der Niere reabsorbiert. Die wichtigsten endokrinen Faktoren in der Regulation der renalen Kalziumreabsorption sind vermutlich PTH und Vitamin-D (Friedman & Gesek, 1995).

Auch wenn viele Mechanismen der renalen Kalzium- und Phosphat-Reabsorption noch nicht im Detail geklärt sind, so lässt sich doch ein Grundprinzip beobachten, bei dem PTH wohl den aktiven Übertritt von Kalzium apikal durch die Membran ermöglicht. Dieser Prozess ist eventuell Vitamin-D gesteuert über eine Induktion der Synthese von PTH-Rezeptormolekülen (Friedman & Gesek, 1993). Für den basolateralen Übertritt aus den Tubuluszellen in die Blutbahn werden verschiedene Transportsysteme vermutet, von zentralen Bedeutung scheint jedoch eine Plasmamembran-Kalziumpumpe (PMCA) zu sein (Friedman & Gesek, 1995). Eine weitere entscheidende Rolle bei der renalen Kalziumrückersorption spielt vermutlich auch die Fähigkeit von Vitamin-D, die Syntheserate der beiden wichtigsten intrazellulären Kalziumbindungsproteinen in der Niere, Calbindin D28K und Calbindin D9K positiv zu beeinflussen (Bouhtiay et al., 1994, Koster et al., 1995; Liu et al., 1996).

Aufgrund der Tatsache, dass der Vitamin-D Rezeptor im gesamten Tubulusbereich, vom Glomerulum bis zum Sammelrohr exprimiert wird (Liu et al., 1996), liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere, unentdeckte Vitamin-D Effekte in der Niere existieren.

2.5.3 Vitamin-D-Effekte am Knochen

Wie bereits erwähnt, stellt die mineralische Knochensubstanz über die Fähigkeit zum ständigen Auf- und Abbau von Knochengewebe (bone remodeling) einen wichtigen Kalziumspeicher für den Organismus dar. Reguliert wird der Knochenturnover hauptsächlich durch PTH. Ob auch Vitamin-D dabei eine Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Fest steht, dass der Vitamin-D Rezeptor sowohl in Osteoblasten als auch in Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird und dass viele osteoblastäre Matrixproteine durch Vitamin-D reguliert werden (Boyen et al., 1992; Lian & Stein, 1993). Auch auf resorptive Prozesse, wie z.B. die Osteoklastenreifung scheint Vitamin-D Einfluß zu haben. Die hochdosierte, pharmakologische Gabe von Vitamin-D-Metaboliten induziert eine direkte Stimulation der Knochenresorption (Holtrop et al., 1981; Erben et al., 1997). Ob dieser Effekt allerdings von physiologischer Bedeutung ist, ist unklar.

Aus Untersuchungen der letzten Jahre geht allerdings hervor, dass die knochenprotektive Wirkung von Vitamin-D in vivo vor allem seinen kalzämischen Effekten in Darm und Niere, also der Regulation des Plasmakalziumspiegels zuzuschreiben ist. So ist bei Mäusen mit inaktiviertem Vitamin-D Rezeptor die Fütterung einer speziell mit Kalzium, Phosphat und Lactose angereicherten Diät ausreichend, um den Plasmakalziumspiegel und die Knochenmineralisierung zu normalisieren (Li et al., 1998). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Vitamin-D keine physiologisch relevante, direkte Funktion am Knochen besitzt.

2.6 Rolle des Vitamin-D in der Haut

2.6.1 Vitamin-D Stoffwechsel in der Haut

Wie bereits beschrieben, ist die Haut unter dem Einfluß von UVB-Strahlung in der Lage, aus 7-DHC Prävitamin-D_3 zu bilden, das anschließend zu Vitamin-D isomerisiert und über Leber und Niere zum hormonell aktiven $1,25(OH)_2D_3$ umgebaut wird.

Dieser Stoffwechselweg ist seit langer Zeit bekannt, und so ging man davon aus, dass die Leber der wichtigste Ort für die 25-Hydroxylierung und die Niere der wichtigste Ort für die 1α-Hydroxylierung wäre (Jones et al., 1998). Allerdings haben experimentelle und klinische Untersuchungen gezeigt, dass die über den Stoffwechselweg Leber-Niere produzierte Serumkonzentration von $1,25(OH)_2D_3$ zu niedrig ist, um VDR-vermittelte hormonelle Effekte in der Haut auslösen zu können (Matsumoto et al., 1991). Andererseits verfügt die Haut als eines der Zielgewebe des Vitamin-D über die 1α-Hydroxylase und die 24–Hydroxylase, beides mitochondriale Cytochrom P450-Enzyme (Bikle et al., 1986). Sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten, die beiden wichtigsten Zelltypen der Haut, exprimieren den Vitamin-D-Rezeptor (Milde et al., 1991; Holick et al., 1987; Feldman et al., 1980). Damit wäre die Grundvoraussetzung für die Regulation der genomischen Effekte durch $1,25(OH)_2D_3$ oder Analoga prinzipiell erfüllt. Dennoch wurde die in vivo Metabolisierung von $25(OH)D_3$ zu $1,25(OH)_2D_3$ in der Haut als unbedeutend eingestuft, da über die systemische Versorgung zu wenig ungebundenes $25(OH)D_3$ in die Keratinozyten gelangt (Ishizuka, 1996; Bikle et al., 1994). Andererseits können Keratinozyten, denen $25(OH)D_3$ zugeführt wurde, in vitro eine substanzielle Menge $1,25(OH)_2D_3$ produzieren (Bikle et al., 1986). Es herrschte zunächst die Auffassung, dass die 25-Hydroxylase im Gegensatz zu 1α-Hydroxylase in Keratinozyten nicht exprimiert wird. Daher ging man davon aus, dass Keratinozyten nicht in der Lage sind, Vitamin-D_3 über $25(OH)D_3$ in $1,25(OH)_2D_3$ umzuwandeln (MacLaughlin et al., 1991).

Mittlerweile gelang aber sowohl in vitro (Schuessler et al., 2001) als auch in vivo (Lehmann et al., 2003) der Nachweis, dass humane Keratinozyten über einen autonomen Vitamin-D-Stoffwechsel verfügen. Dieser neue Stoffwechselweg, auf dem substantielle Mengen Vitamin-D gebildet werden können, umfasst sowohl die lang bekannte UV-induzierte Synthese von Vitamin-D_3, als auch dessen weitere Metabolisierung zu aktivem Vitamin-D. Damit ist die Haut das einzige menschliche Organ, das in der Lage ist, unabhängig die Synthese, Aktivierung und Deaktivierung von Vitamin-D durchzuführen, d.h. epidermale Keratinozyten sind sowohl Syntheseort als auch pharmakologische Zielzellen von Vitamin-D (Schuessler et al., 2001). In neueren Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass dermale Fibroblasten zwar in vitro die 25-Hydroxylase, nicht aber die 1α-Hydroxylase exprimieren; somit spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Vitamin-D Präkursoren (Vitamin-D_3 und $25(OH)D_3$) sowohl für Kerationozyten als auch systemisch via Blut (Vatieghem et al., 2003).

2.6.2 Biologische Wirkungen von Vitamin-D in der Haut

2.6.2.1 Antiproliferative und prodifferenzierende Wirkung auf Keratinozyten

Eine der wichtigsten biologischen Funktionen des Vitamin-D ist die Fähigkeit, hypertrophes Zellwachstum zu regulieren (Holick, 2003) und Zelldifferenzierung zu induzieren. Dabei ist die Wirkung des Vitamin-D stark dosisabhängig. Niedrig dosiert fördert es die Proliferation von Kerationozyten in vitro, bei höheren pharmakologischen Dosen ($\geq 10^{-8}$ M) wird deren Proliferation dagegen gehemmt (Gniadecki, 1996). Diese antiproliferative und Differenzierung induzierende Wirkung ist sowohl in gesunden Zellen, als auch in erkrankten bzw. Krebszellen zu beobachten, sofern sie einen Vitamin-D-Rezeptor besitzen.

Der Mechanismus der antiproliferativen und prodifferenzierenden Wirkung von Vitamin-D-Metaboliten auf Krebszellen ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings konnte nachgewiesen werden, dass in den meisten Krebszellen eine Blockierung des Zellzyklus stattfindet und zwar beim Übergang von der G_1 zur S-Phase. Diese Blockierung erfolgt, indem bei Zellen in der G_1-Phase Transkriptionsfaktoren inaktiviert werden. Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F sind essentiell für die DNA-Synthese in der S-Phase und notwendig für die Regulation anderer wichtiger Proteine (Osborne et al., 2002).

Der klinische Nutzen dieser Entdeckung ist sehr vielfältig. So ist die Behandlung mit Vitamin-D oder Analoga schon seit Jahren etablierte Therapie bei der Behandlung hyperproliferativer Hauterkrankungen (Holick, 1998). Auch für verschiedene Tumorzellen (Brustkrebs, Osteosarkom, Melanom) wurde die antiproliferative Wirkung von Vitamin-D bereits nachgewiesen.

2.6.2.2 Immunmodulierende Effekte in der Haut

Wie in neueren Studien veröffentlicht, hat Vitamin-D und seine Analoga auch auf zahlreiche immunkompetente Zellen der Haut modulatorische Wirkung (Adorini et al., 2003; Griffin et al., 2003; Van Etten et al., 2003). So konnte nachgewiesen werden, dass sich in verschiedenen immunkompetenten Zellen (z.B. Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Langerhanszellen) nicht nur Rezeptoren für Vitamin-D befinden, sondern dass diese Zellen darüber hinaus auch

die enzymatische Ausstattung (1α-Hydroxylase) zur lokalen Synthese von Vitamin-D aus $25(OH)D_3$ besitzen (Van Etten et al., 2003).

Die lokale Vitamin-D-Synthese in immunkompetenten Zellen scheint eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle und Regulation von Immunantworten zu spielen. So hemmt $1,25(OH)_2D_3$ die T-Zell Aktivierung und induziert in unterschiedlichen Modellsystemen die Generation von regulatorischen $CD25^+/CD4^+$-T-Zellen (Adorini et al., 2003). In dendritischen Zellen verhindert Vitamin-D die Ausreifung und bewirkt einen Phänotyp, der nach Antigenkontakt die Toleranzentwicklung fördert und die Immunitätsentwicklung hemmt (Adorini et al., 2003; Griffin et al., 2003).

Durch aktuelle Studien ist belegt, dass Patienten, die an atopischer Dermatitis erkrankt sind im Durchschnitt deutlich geringere Mengen an Vitamin-D einnehmen als eine Kontrollgruppe (Solvoll et al., 2000). Auch für verschiedene andere Autoimmunerkrankungen (z.B. Typ I Diabetes, rheumatische Arthritis, Multiple Sklerose) konnte am Mausmodell nachgewiesen werden, dass durch die frühzeitige Verabreichung von Vitamin-D-Hormon ein Ausbrechen der Krankheit erfolgreich verhindert wird (DeLuca et al., 2001; Gregori et al., 2002; Cantorna et al., 1998; Cantorna et al., 1996; Mathieu et al., 1994).

2.6.2.3 Regulation der Apoptose von Keratinozyten

Neben den bereits besprochenen Funktionen hat Vitamin-D auch die Fähigkeit, einerseits die Apoptose bestimmter Zellen einzuleiten, andererseits aber auch eine Apoptoseresistenz zu erzeugen. Die zugrunde liegenden zellulären Prozesse sind noch wenig erforscht, es wurden aber verschiedene Mechanismen beschrieben. Sie können eingeteilt werden in indirekte Mechanismen, die über eine Beeinflussung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder deren Rezeptoren wirken und direkte Mechanismen, bei denen ein Molekül eines Stoffwechselweges beeinflusst wird, der zur Apoptose führt (Osborne et al., 2002); z.B. verstärkt $1,25(OH)_2D_3$ die bekannte proapoptotische Wirkung von TNFα (Rocker et al., 1994).

Außerdem ist Vitamin-D in der Lage, als Agonist den Sphingomyelin-Ceramid-Gangliosid GD3 Stoffwechselweg zu beeinflussen, der zur Apoptoseinduktion führt (Bektas et al., 2000; Müller-Wieprecht, 2000). Dabei induziert Vitamin-D die neutrale Mg^{2+}-abhängige Sphingomyelinase; diese hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid (Okasaki et al., 1989). Letzteres

führt bei einer Vielzahl von Zellen, einschließlich Keratinozyten zur Induktion der Apoptose (Geilen et al., 1997). Außerdem hat Ceramid die Fähigkeit, den prodifferenzierenden Effekt von Vitamin-D auf Keratinozyten zu stimulieren (Bielawska et al., 1992).

Ähnlich wie bei den bereits beschriebenen proliferativen bzw. anitproliferativen Effekten ist die Wirkung des $1,25(OH)_2D_3$ auch hier dosisabhängig. So konnte gezeigt werden, dass physiologische Konzentrationen von $1,25(OH)_2D_3$ in Keratinozytenkulturen nicht die Apoptose der Zellen einleiten, sondern im Gegenteil eine Apoptoseresistenz gegenüber Ceramiden, ultravioletten Strahlen und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) erzeugen (Manggau et al., 2001). Dies wurde vor allem beobachtet in Form von erhöhter Zellresistenz gegen Apoptose nach UV-Trauma (Lee & Youn, 1998; Manson & Holliday, 2000) und beim Schutz vor apoptotischen Wirkungen der Zytotoxine in Krebszellkulturen (Ketley et al., 1997). Dieser zytoprotektive bzw. antiapoptotische Effekt von $1,25(OH)_2D_3$ auf Keratinozyten ist offensichtlich mit der Entstehung von Sphingosin-1-phosphat gekoppelt. Das zeigt sich auch darin, dass die antiapoptotische Wirkung von $1,25(OH)_2D_3$ durch exogene Zugabe des Sphingosinkinase-Inhibitors N,N-Dimethylsphingosin vollständig unterdrückt werden kann (Manggau et al., 2001).

Dagegen haben pharmakologische Konzentrationen von $1,25(OH)_2D_3$ ($\geq 10^{-6}$ M) einen proapoptotischen Einfluß auf Keratinozyten.

2.6.2.4 Antioxidative Wirkung von Vitamin-D

Vitamin-D per se hat keinen antioxidativen Effekt im Zellstoffwechsel (Lee, 1998).

Neueren Untersuchungen zufolge scheint Vitamin-D aber die Fähigkeit zu besitzen, die Synthese von Metallothionein (MT) in der Haut zu induzieren (Lee, 1998). MT ist ein intrazelluläres Protein, dessen Synthese auch durch viele Metalle (z.B. Cd, Zn, Hg, Au, Ag) und auch durch IL-1, INF-α beeinflusst wird (Brenner, 1991; Koizumi et al., 1985; Liebermann et al., 1983; Durnam et al., 1984). Die intrazellulären Funktionen von MT sind noch nicht im Detail geklärt (Karin, 1985). Allerdings ist beschrieben, dass es ein potenter Radikalfänger insbesondere gegen Hydroxyradikale ist (Thornalley & Vasak, 1985), die in der Haut u.a. durch Bestrahlung mit UV-Licht entstehen. Damit scheint Vitamin-D die Fähigkeit zu haben, über

die Synthese von MT und dessen antioxidativen Effekt einen photoprotektiven Effekt auf die Keratinozyten auszuüben (Lee, 1998).

2.6.2.5 Vitamin-D Versorgung und Sonnenschutz

Es ist allgemein bekannt, dass übermäßige Sonnenbestrahlung für die Haut schädlich ist und eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von epidermalem Hautkrebs spielt (Osterlind et al., 1988). Daher wurde von Dermatologen lange Zeit empfohlen, das direkte Sonnenlicht zu meiden oder einen UV-Schutz in Form von Sonnencremes, schützender Kleidung oder Sonnenschirmen zu benutzen. In neueren Untersuchungen wurde allerdings festgestellt, dass die völlige Vermeidung von Sonneneinstrahlung auf die Haut ebenfalls gesundheitliche Risiken birgt (Holick, 2002), denn Sonnenlicht ist für die meisten Menschen mit Abstand die beste und verlässlichste Quelle für Vitamin-D. Dabei hängt die Wirkung des Lichtes in entscheidendem Maße von Qualität und Quantität der UV-Strahlung ab (Holick, 2002; Holick 2004). So ist seit langer Zeit bekannt, dass der UVB Anteil des Lichts für die Synthese von Vitamin-D_3 in der Haut essentiell ist. Diese Tatsache hat umso mehr Bedeutung, da Vitamin-D in der menschlichen Nahrung rar ist und daher das Sonnenlicht die hauptsächliche Vitamin-D Quelle für die meisten Menschen darstellt (Holick, 2001)

Nach dem heutigen wissenschaftlichen Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass bei einer maßvollen, nicht intensiven Sonnenlichteinstrahlung die protektiven gegenüber den mutagenen Effekten überwiegen. Es wurde sogar postuliert, dass in letzter Konsequenz auch die Zahl der Krebstodesfälle durch vorsichtige Sonnenlichtexposition oder sicherer durch orale Gabe von Vitamin-D reduziert werden könnte (Grant, 2002). Dabei ist in den meisten Regionen eine kurzzeitige Sonnenlichtexposition ausreichend, um einen genügend hohen Vitamin-D Spiegel zu erzielen (Reichrath, 2003). So ist eine Sonnenlichtexposition in Badekleidung bis zum erreichen einer minimalen Erytehmdosis (MED; d.h. leichte Rötung der Haut) vergleichbar mit der oralen Einnahme von 10.000 – 25.000 IU Vitamin-D (Holick, 2003). Das bedeutet, die Sonnenlichtexposition von Händen, Gesicht, Armen und Beinen über 25 % der Zeit, die nötig wäre, um einen mittleren Sonnenbrand auszulösen (= 1 MED), zwei- bis dreimal die Woche ist im Frühjahr, Sommer und Herbst völlig ausreichend, um den Vitamin-D Bedarf des Körpers zu decken und überschüssiges Vitamin-D_3 im Körperfett zu speichern (Holick, 2002). Anschließend sollte bei andauernder Sonnenlichtexposition ein ausreichender Sonnen-

schutz durchgeführt werden, um einen Sonnenbrand und weiteren schädlichen Folgen dauernder Sonnenlichtexposition vorzubeugen (Reichrath, 2003; Holick, 2002).

Eine andere Situation herrscht während der Wintermonate. In dieser Zeit wird der Zenith-Winkel der Sonne so flach, dass nur wenige UVB-Photonen die Erdoberfläche erreichen. Daher kann im Winter, wenn überhaupt, nur sehr wenig Vitamin-D_3 in der Haut produziert werden. Davon sind vor allem Regionen überhalb 35º N und 35º S betroffen (Webb et al., 1988).

Ein sehr effektiver Selbstschutz der Haut gegen die schädigende Wirkung von UV-Strahlen ist die Einlagerung von Melanin in die Epidermis. Das Absorptionsspektrum dieses Hautpigments reicht von UVC-Licht (200-280 nm) bis in sichtbare Wellenlängen (>700 nm); damit „schützt“ es auch 7-Dehydrocholesterol vor der Bestrahlung mit UVB-Photonen (Holick, 2004). Daher können dunkelhäutige Personen, in deren Epidermis viel Melanin eingelagert ist, weniger Vitamin-D produzieren als hellhäutige (Holick, 1994; Clemens et al., 1982). So braucht eine Person mit Hauttyp 5/6 (dunkle Haut, entwickelt keinen Sonnenbrand) die 10-50fach Dosis an UV-Strahlung, um die gleiche Menge Vitamin-D zu produzieren wie eine Person mit Hauttyp 2 oder 3 (Clemens et al., 1982). Möglicherweise wirkt sogar Vitamin-D selbst auf Melanozyten, indem es die Synthese von Melanin induziert (Tomita et al., 1988).

Ein Mangel an Vitamin-D ist aber nicht nur ein Problem dunkelhäutiger Menschen oder bestimmter Risikogruppen (z.B. bettlägerige Pflegeheimbewohner, Menschen mit Hauttyp I oder Patienten unter konsequentem Sonnenschutz bei immunsuppressiver Therapie). Selbst bei jungen, aktiven Erwachsenen ist ein Vitamin-D Mangel weit verbreitet. So wurde festgestellt, dass 36 % des medizinischen Personals in Boston im Alter zwischen 18 und 29 Jahren am Ende des Winters einen Vitamin-D Mangel zeigen (Holick, 2003).

Die Folgen eines Vitamin-D Mangels sind sehr vielseitig. So kann es zu einer Demineralisierung des Skeletts mit den Folgen der Osteomalazie, sekundärem Hyperparathyreoidismus und daraus resultierender Osteoporose kommen (Holick, 2003). Aber auch Knochenschmerzen, Muskelschwäche und Muskelschmerzen sind Symptome eines Vitamin-D-Mangels (Gelrup et al., 2000; Semba et al,. 2001, Holick, 2002). Zusätzlich ist bei manifestem Vitamin-D-Mangel über längere Zeit das Risiko systemischer Erkrankungen wie z.B. Bluthochdruck, diverse Krebserkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und Typ-I-Diabetes erhöht (Holick, 2003).

2.6.2.6 Vitamin-D und Alopezie

Bereits aus der Anfangzeit der gezielten Rachitisbekämpfung sind Fälle von Patienten bekannt, die auf eine Therapie mit Vitamn-D nicht ansprachen. Zusätzlich konnte bei manchen Fällen als zusätzliches Symptom eine ebenfalls therapieresistente, totale Alopezie beobachtet werden (Demay, 1999; Malloy & Feldmann, 1999).

Anders als beim Typ I der Vitamin-D abhängigen Rachitis (VDDR I), der durch einen Funktionsdefekt der renalen 1α-Hydroxylase (Labuda et al,. 1992; Fu et al,. 1997) ausgelöst wird und durch eine lebenslange Therapie mit physiologischen Dosen Vitamin-D-Hormon (0,25 – 1 μg/Tag) erfolgreich behandelt werden kann (Malloy & Feldmann, 1999), handelt es sich bei den therapieresistenten Fällen um den Typ II der Vitamin-D abhängigen Rachitis. Hier liegt eine Mutation im VDR-Gen vor, die immer in einer mehr oder minder vollständigen Geweberesistenz gegenüber Vitamin-D resultiert (Brooks et al., 1978). Eine Therapie mit Vitamin-D-Metaboliten ist daher nur sehr eingeschränkt möglich. Gute Erfolge wurden mit einer hochdosierten, oralen Supplementierung von Kalzium erreicht (Balsan et al., 1986).

Auch bei VDR-Knockout Mäusen, die hinsichtlich der Mutation homozygot sind, ist neben anderen Veränderungen (Hypocalzämie, Hyperparathyreoidismus, Rachitis, Osteomalazie) eine totale Alopezie zu beobachten (Li et al., 1997). Vergleichbar mit VDDR II erkrankten Patienten besteht die Alopezie nicht von Geburt an, sondern entwickelt sich während des Heranwachsens (Beer et al., 1981).

In der Haut wird der Vitamin-D Rezeptor nicht nur in den epidermalen Keratinozyten exprimiert, sondern auch in Keratinozyten des äußeren Haarschafts und in der Papille des Haarfollikels (Stumpf et al., 1984; Berger et al., 1988; Reichrath et al., 1994). In neueren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass für die pränatale Entwicklung der Epidermis und den erste Haarzyklus kein Vitamin-D-Rezeptor benötigt wird (Xie et al., 2002), anders als für die Entwicklung der erwachsenen Haut und das Einsetzen des zweiten Haarzyklus. Diese Erkentnisse lassen den Schluß zu, dass der Vitamin-D-Rezeptor in einer kritische Phase im zweiten Haarzyklus für die Entwicklung der Haarfollikel Voraussetzung ist (Xie et al., 2002; Kong et al., 2002). Allerdings bleibt die Frage offen, warum sich Alopezie in Abwesenheit des Vitamin-D Rezeptors, nicht aber bei manifestem Mangel an Vitamin-D entwickelt.

2.7 Die Bedeutung verschiedener Tiermodelle für die Vitamin-D-Forschung

Vor der Entwicklung spezifischer Tiermodelle in der zweiten Hälfte der 90er Jahre hatte man nur zwei Möglichkeiten, in vivo Studien über die Wirkung von Vitamin-D im Organismus durchzuführen; induzierte Vitamin-D Mangelsituationen oder VDDR II-Humanstudien (Balsan et al., 1986; Beer et al., 1981). Da es sich bei den VDDR II Patienten um einen sehr begrenzten Personenkreis (seit 1978 ca. 40 Familien dokumentiert) mit meist uneinheitlichem Geno- und Phänotyp handelt, ist die Zahl der vergleichbaren Probanden klein. Darüber hinaus gehören die Patienten oft unterschiedlichen Rassen und Kulturkreisen an, so dass weder der genetische Hintergrund, noch die Lebensbedingungen einheitlich sind.

Einblicke in die physiologische Wirkung des Vitamin-D in vivo stammen vor allem aus Studien mit Vitamin-D defizienten Ratten (z.B. Dostal & Toverud, 1984; Halloran & DeLuca, 1981; Mathews et al., 1986; Miller et al., 1983; Underwood & DeLuca, 1984). An diesen Tiermodellen ließen sich zwar die Wechselwirkungen des Vitamin-D-Stoffwechsels beobachten, über die molekularen Grundlagen der beteiligten Prozesse sagen sie aber oft nur wenig aus. Ein weiteres Problem bestand darin, dass sich die Vitamin-D-Spiegel im zirkulierenden Blut aufgrund der äußerst effektiven kutanen Synthese von Vitamin-D oder Restgehalten in der Mangel Diät nicht unter ein bestimmtes Niveau drücken ließen. Außerdem ließen sich trotz diätetischer Korrekturmaßnahmen subtile Veränderungen der Kalziumhomöostase nicht regulieren (Walters et al., 1992).

Neben dem Tiermodell Ratte ist seit einigen Jahren auch ein durch Zufall entstandenes Schweinemodell bekannt, das aufgrund einer genetisch bedingten Funktionsstörung der renalen Vitamin-D-Metabolisierung der VDDR I des Menschen ähnelt (Kaune & Harmeyer, 1987). Dieses Modell wurde allerdings nur für wenige Bereiche der Vitamin-D-Forschung eingesetzt, da der molekulare Defekt in diesen Tieren nach wie vor ungeklärt ist (Axen et al., 1998) und die Tiere nur sehr limitiert verfügbar sind.

Um dieses Dilemma zu beseitigen, wurde daher versucht, Mausmodelle des VDDR II mit Hilfe embryonaler Stammzelltechnologie zu entwickeln. Dies gelang zuerst im Jahr 1997 in Form eines Mausmodells, bei dem durch Mutation des ersten Zinkfingers der Vitamin-D-Rezeptor gezielt inaktiviertem wurde. Allerdings unterschied sich diese VDR-Knockout Maus

in einigen grundlegenden Merkmalen vom Phänoty der VDDR II des Menschen, da homozygote Tiere zusätzlich zu Rachitis und Alopezie Infertilität aufgrund von Uterushypoplasie und eine stark erniedrigte Lebenserwartung zeigten (Yoschizawa et al., 1997). Das nur wenig später entwickelte, zweite Mausmodell (Li et al., 1997) entspricht im Phänotyp weitgehend der VDDR II des Menschen. So zeigen diese Tiere Rachitis und Alopezie bei normaler Lebenserwartung und ungestörter Fertilität. Bei diesem Mausmodell wird durch eine gezielte Mutation im Sequenzbereich des zweiten Zinkfingers der DNA-Bindungsregion eine Leserasterverschiebung verursacht, was zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führt.

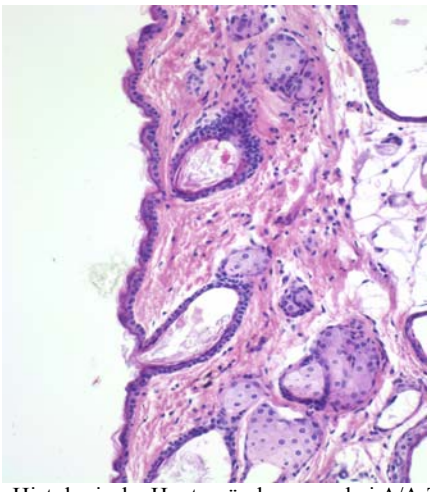
Unabhängig von den beiden bestehenden Modellen wurde im Jahr 2002 ein weiteres Mausmodell mit inaktiviertem VDR beschrieben (Erben et al., 2002). Bei diesen Tieren wurde durch homologe Rekombination das für den ersten Zinkfinger codierende Exon 2 des VDR deletiert. Anders als in den beiden zuvor beschriebenen Modellen wurde anstelle des Exon 2 eine bakterielle β-Galaktosidase (LacZ) als Reportergen eingefügt. Dieses Reportergen, das unter Transkriptionskontrolle des endogenen VDR-Promoters steht macht es möglich, das VDR-Expressionsmuster in der Maus während der Ontogenese und in der postnatalen Entwicklung gewebespezifisch darzustellen.

3. MATERIAL UND METHODEN

Obwohl immer mehr neue Erkentnisse über die Rolle des Vitamin D in der Haut gewonnen werden, sind zu diesem Thema noch viele Fragen offen. In dieser Studie soll geklärt werden, welche Folgen die Bestrahlung mit UVB-Licht auf die Haut von Tieren mit inaktiviertem Vitamin-D-Rezeptor hat. Dazu wurden Vitamin-D-Rezeptor defiziente homozygote Tiere vergleichend zu Wildtyp- und heterozygoten Tieren mit UVB-Licht bestrahlt und die Hautreaktionen dokumentiert. Die im Versuch verwendeten homozygoten Mäuse zeigen ab einem Alter von ca. sieben Wochen einen sehr speziellen Phänotyp; sie entwickeln neben einer vollständigen Alopezie auch histologische Hautveränderungen in Form epidermaler Zysten (Abbildung 1).

Abbildung 1

Phänotypausprägung
von links nach rechts: Δ/Δ, WT/Δ, WT/WT



Histologische Hautveränderungen bei Δ/Δ-Tieren

3.1 Tiermaterial

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden Wildtyp und VDR-Knockout-Mäuse (Erben, 2002) verwendet. Sowohl die Wildtyp- als auch die VDR-Knockout-Mäuse stammen aus Anpaarungen von heterozygoten Tieren. Die für diese Anpaarungen verwendeten heterozygoten Tiere waren über fünf bis sechs Generationen auf den genetischen Hintergrund C57BL/6 zurückgekreuzt.

Im ersten Versuch wurden 80 weibliche Tiere eingesetzt. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn sechs Monate alt. Die im zweiten Versuch (kurzzeitige UV-Exposition) verwendeten Tiere

waren bei Versuchsbeginn sechs Monate (27 Tiere), sechs Wochen (13 Tiere) und drei Wochen (26 Tiere) alt. Insgesamt wurden für die Kurzzeitversuche 62 Tiere verwendet, davon 47 weibliche und 15 männliche. Für den dritten Versuch (Langzeitexposition) wurden insgesamt 42 weibliche Tiere im Alter von sechs Monaten (27 Tiere) und sechs Wochen (15 Tiere) eingesetzt.

3.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden bei konstant 24 ºC Raumtemperatur und einem Lichtprogramm von je 12 Stunden Licht/ 12 Stunden Dunkelheit gehalten. Sie hatten freien Zugang zu handelsüblichem Alleinfutter oder Rescue Diet und Leitungswasser. Das handelsübliche Alleinfutter (Altromin 1314, Altromin, Lage, Deutschland) enthielt 0,9% Kalzium, 0,7% Phosphor, 0% Lactose und 600 IU Vitamin-D/kg. Die Rescue Diet (Altromin) enthielt 2% Kalzium, 1,25% Phosphor, 20% Lactose und 600 IU Vitamin-D/kg. Bei den Tieren auf Rescue Diet wurde diese Diät ab dem 16. Lebenstag gefüttert.

3.3 Methoden

3.3.1 Enthaaren der Mäuse

Die Narkose erfolgte durch Injektion von Domitor (Medetomidinhydrochlorid, Fa. Pfizer, Karlsruhe). Die Injektion wurde s.c. am Bauch in einer Dosierung von 0,25 mg/ kg verabreicht. Am sedierten Tier erfolgte zunächst eine Schur des Rückenfells, anschließend wurde Pilca Enthaarungsmousse auf die geschorenen Stellen aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von vier Minuten konnten die Haarreste mit der Creme trocken abgewischt werden. Um die Creme restlos zu entfernen wurde die enthaarte Rückenhaut der Tiere mit lauwarmem Wasser abgewaschen und abgetrocknet. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte durch Injektion von Antisedan (Atipamezolhydrochlorid, Fa. Pfizer, Karlsruhe) in einer Dosierung von 1,5 mg/ kg s.c. in die Nackenfalte.

Die bereits haarlosen VDR-Knockout-Mäuse wurden analog sediert und mit Enthaarungscreme behandelt.

Für den Versuch II (mehrwöchige UV-Exposition) wurden die Tiere einmal pro Woche enthaart. Die Enthaarung erfolgte einen Tag vor Beginn des nächsten Bestrahlungszyklus.

3.3.2 Messen der Hautfaltendicke

Zur Messung der Hautfaltendicke wurde am sedierten Tier eine ca. 2 cm große Hautfalte aus der Rückenhaut nach oben gezogen und die Dicke gemessen. Die Messung wurde mit dem Dickenmessgerät J 50 mit Abhebevorrichtung (Käfer Messuhren) durchgeführt. Das Gerät war mit einem 3 mm Messeinsatz ausgestattet, der Anpressdruck betrug 0,6 N.

3.3.3 Bestrahlung mit UV-Licht

Die im Versuch eingesetzten Tiere wurden UVB-Strahlung ausgesetzt. Als Strahlungsquelle diente eine Philips TL 20 W/12 Röhre, die Bestrahlung erfolgte von oben. Der vertikale Abstand zwischen der Strahlungsquelle und den Tieren betrug 30 cm, die Bestrahlung wurde mit einer oder zwei Röhre durchgeführt, die zentral über den jeweils bestrahlten Tieren angebracht waren. Die Intensität der Strahlung war an allen Stellen des bestrahlten Bereichs gleich hoch. Die Bestrahlungsanlage wurde uns nach Messung der Strahlungsintensität von Professor Dr. Dr. Gniadecki, Kopenhagen zur Verfügung gestellt. Jede Gruppe wurde in einem separaten Käfig bestrahlt, in dem sich die Tiere während der Bestrahlung frei bewegen konnten.

3.4 Versuchsdurchführung

Sämtliche Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter dem Aktenzeichen 211-2531-53/98 geführt.

3.4.1 UV-induzierte Karzinogenese

Die Langzeit-Bestrahlung (4-9 Monate) mit UVB-Licht mit Wellenlängen zwischen 281-320 nm führt bei haarlosen Mäusen zur Karzinogenese (Cole et al., 1986). Ziel unseres Versuchs war es, Daten über die UVB-induzierte Karzinogenese bei Mäusen mit inaktiviertem Vitamin-D-Rezeptor zu erhalten. Im Versuch wurden homozygote, heterozygote und Wildtyp-Tiere eingesetzt. Die UV-Dosis wurde beginnend mit 1,2 B-MED (1 B-MED=825 J/m^2) pro Be-

handlung so gewählt, dass die Tiere ein geringes Erythem entwickeln sollten (Wulf et al., 1994). Im Verlauf des Versuchs sollte die Dosis wöchentlich gesteigert werden, bis in der achten Bestrahlungswoche eine Dosis von 2,4 B-MED erreicht ist. Diese Dosis wird für den Rest des Versuchs beibehalten. Die Bestrahlung sollte an vier aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche nach folgendem Schema durchgeführt werden:

Tabelle 1: UV-induzierte Karzinogenese: zunächst geplante Versuchdurchführung

Bestrahlungswoche	Dosis (B-MED)	min/ B-MED 1 Lampe	Zeit (min) 1 Lampe	min/ B-MED 2 Lampen	Zeit (min) 1 Lampen
Woche 1	1,2	5,61683	6,74		
Woche 2	1,5	5,61683	8,43		
Woche 3	1,6	5,61683	8,99		
Woche 4	1,7			2,83798	4,82
Woche 5	1,8			2,83798	5,11
Woche 6	2			2,83798	5,68
Woche 7	2,2			2,83798	6,24
Woche 8	2,4			2,83798	6,81
ab Woche 9	2,4			2,83798	6,81

Für diesen Versuch war eine Gruppe von 80 Tieren vorgesehen, davon 20 Wildtyp-Tiere, 20 heterozygote Tiere, 20 homozygote Tiere auf Normal Diät, außerdem 20 homozygote Tiere, die mit Rescue Diet gefüttert wurden. Alle in diesem Versuch verwendeten Tiere waren weiblich.

Zu Beginn des Versuchs wurden alle Tiere wie beschrieben enthaart. Da über die UV-Toleranz von normalerweise behaarten Wildtyp- und heterozygoten Tieren keine Daten vorlagen, begannen wir die Bestrahlung probehalber mit einer Röhre über eine Dauer von 3 min. (=0,5357 B-MED). Schon nach zwei Bestrahlungstagen mussten wir feststellen, dass Wildtyp- und heterozygote Tiere selbst bei dieser niedrigen Strahlungsintensität auf die Bestrahlung mit einem hochgradigem Erythem, vergleichbar einem mittleren Sonnenbrand reagierten. Die haarlosen homozygoten Tiere sowohl auf Normal-Diät als auch auf Rescue Diet zeigten auf die Bestrahlung mit 0,5357 B-MED keinerlei Hautreaktion.

Um den Versuch dennoch durchführen zu können, reduzierten wir die Anfangsdosis auf 0,2679 B-MED, was einer Bestrahlungsdauer von 1,5 min entspricht. Auch die wöchentliche Steigerung musste reduziert werden. Der Versuch wurde nach folgendem, modifiziertem Schema durchgeführt.

Tabelle 2: UV-induzierte Karzinogenese: Modifizierte Versuchsdurchführung

Bestrahlungswoche	Dosis (B-MED)	min/ B-MED 1 Lampe	Zeit (min) 1 Lampe	min/ B-MED 2 Lampen	Zeit (min) 1 Lampen
Woche 1	0,27	5,61683	1,5		
Woche 2	0,36	5,61683	2,0		
Woche 3	0,45	5,61683	2,5		
Woche 4	0,53	5,61683	3,0		
Woche 5	0,62	5,61683	3,5		
Woche 6	0,71	5,61683	4,0		
Woche 7	0,80	5,61683	4,5		
Woche 8	0,89	5,61683	5,0		
Woche 9	0,98	5,61683	5,5		
Woche 10	1,07	5,61683	6,0		
Woche 11	1,16	5,61683	6,5		
Woche 12	1,25	5,61683	7,0		
Woche 13	1,34	5,61683	7,5		
Woche 14	1,42	5,61683	8,0		
Woche 15	1,51			2,83798	4,3
Woche 16	1,60			2,83798	4,5
Woche 17	1,69			2,83798	4,8
Woche 18	1,78			2,83798	5,1
Woche 19	1,87			2,83798	5,3
Woche 20	1,96			2,83798	5,6
Woche 21	2,05			2,83798	5,8
Woche 22	2,14			2,83798	6,1
Woche 23	2,23			2,83798	6,3
Woche 24	2,31			2,83798	6,6
Woche 25	2,40			2,83798	6,8
ab Woche 26	2,40			2,83798	6,8

Auf die in diesem modifizierten Schema dargestellte Bestrahlungsdosis reagierten die heterozygoten und Wildtyp- Tiere wie gewünscht nach viertägiger Bestrahlung mit leichtem Erythem. Die homozygoten Tiere zeigten keinerlei Hautreaktion.

3.4.2 Entzündungsreaktion der Haut nach UV-Kurzzeitexposition

Der Versuch wurde insgesamt dreimal mit Tieren verschiedener Altersgruppen (sechs Monate, sechs Wochen, drei Wochen) durchgeführt.

Zu Beginn des Versuchs mit sechs Monate alten Tieren wurden die Tiere zunächst entsprechend ihres Genotyps in drei Gruppen zu je neun Tieren eingeteilt. Innerhalb dieser Gruppen wurden jeweils sechs Tiere mit Rescue Diet und jeweils drei Tier mit normaler Diät gefüttert.

Bei den Versuchen mit 6 Wochen alten bzw. 3 Wochen alten Tieren erhielten alle verwendeten Tiere die Rescue Diet. Auch hier wurden die Tiere entsprechend ihres Genotyps in drei Gruppen aufgeteilt. Die einzelnen Gruppen bestanden im Versuch mit sechs Wochen alten Tieren aus vier Wildtyp- Mäusen, vier heterozygoten Mäusen und fünf homozygoten Mäusen, insgesamt 13 Tiere. Im Versuch mit drei Wochen alten Tieren waren es insgesamt 26 Tiere, davon zehn Wildtyp-Tiere, zehn heterozygote Tiere und sechs homozygote Tiere.

Tabelle 3: Versuchsanordnung UV-Kurzzeitexposition

Versuch	**Alter**	**n**	**WT/ WT**	**WT/Δ**	**Δ/Δ**	**RD**	**ND**	**weibl.**	**männ**
I	6 Mo.	27	9	9	9	18	9	27	
II	6 Wo.	13	4	4	5	9		9	
III	3 Wo	26	10	10	6	26		11	15

Am Tag 1 wurden alle Tiere wie beschrieben enthaart, fotografiert und die Hautfaltendicke gemessen. An Tag 2, 3 und 4 erfolgte die Bestrahlung der Tiere mit einer B-MED von 0,45 (2,5 min mit einer Röhre).

Am Tag fünf wurden alle Tiere durch cervikale Dislokation schmerzlos getötet. Am toten Tier wurde jeweils die Hautfaltendicke gemessen, Proben der Ohrmuschel und der Rückenhaut entnommen. Die Proben wurden für histologische Schnitte in 4 % PFA fixiert. Zusätzlich wurden Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren, um für eventuell später auftretende Fragestellungen Material für Kryoschnitte, RNA-Extraktion oder Proteinextraktion zur Verfügung zu haben.

3.4.3 Veränderungen der Haut nach mehrwöchiger UV-Exposition

Dieser Versuch wurde insgesamt zweimal mit Tieren verschiedenen Altersgruppen (sechs Monate, sechs Wochen) durchgeführt. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Tiere zunächst entsprechend ihrem Genotyp in drei Gruppen (homozygote-, heterozygote-, WT) eingeteilt. Bei den insgesamt 27 Tieren im Alter von 6 Monaten umfasste jede Gruppe neun Tiere. Innerhalb dieser Gruppen wurden jeweils sechs Tiere mit Rescue Diet (RD) und jeweils drei Tiere mit normaler Diät (ND) gefüttert.

Für die Versuchsdurchführung mit sechs Wochen alten Tieren standen insgesamt 18 Tiere zur Verfügung. Davon sechs Wildtyp-Tiere, sechs heterozygote Tiere und sechs homozygote Tiere. Alle Tiere wurden ausschließlich mit Rescue Diet gefüttert.

Tabelle 4: Versuchsanordnung UV-Langzeitexposition

Versuch	**Alter**	**n**	**WT/WT**	**WT/Δ**	**Δ/Δ**	**RD**	**ND**
I	6 Mo.	27	9	9	9	18	6
II	6 Wo.	18	6	6	6	18	

Am Tag nach der Enthaarung begann die Bestrahlung mit UV-Licht, beginnend mit 0,27 B-MED pro Bestrahlung (eine Röhre, Bestrahlungszeit 1,5 min) an vier aufeinander folgenden Tagen (Tag 2-5). Nach einem Tag Regeneration wurden die Tiere an Tag 7 wieder wie beschrieben enthaart, fotografiert und die Hautfaltendicke gemessen. In jeder weiteren Bestrahlungswoche erhöhte sich die Bestrahlungsdauer um jeweils 30 sec (0,09 B-MED) Dieser Zyklus wurde mit den sechs Monate alten Tieren zweimal, mit den drei Wochen alten Tieren viermal wiederholt, bis eine deutliche Änderung der Pigmentierung zu beobachten war.

Tabelle 5. :Mehrwöchige UV-Exposition: Versuchsdurchführung sechs Monate alte Tiere

Bestrahlungswoche	**Dosis (B-MED)**	**min/ B-MED 1 Lampe**	**Zeit (min) 1 Lampe**
Woche 1	0,27	5,61683	1,5
Woche 2	0,36	5,61683	2,0

Tabelle 6. :Mehrwöchige UV-Exposition: Versuchsdurchführung sechs Wochen alte Tiere

Bestrahlungswoche	**Dosis (B-MED)**	**min/ B-MED 1 Lampe**	**Zeit (min) 1 Lampe**
Woche 1	0,27	5,61683	1,5
Woche 2	0,36	5,61683	2,0
Woche 3	0,45	5,61683	2,5
Woche 4	0,53	5,61683	3,0

Um mit dem Versuch zur UV-Kurzzeitexposition vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurde bezüglich Tötung, Hautfaltendickenmessung und Probennahme von Ohr- und Rückenhaut analog verfahren.

Die Baseline-Kontrolltiere (n = 13) wurden zu Versuchsbeginn getötet, Körpergewicht und Hautfaltendicke gemessen. Anschließend wurden Proben von Ohren und Rückenhaut genommen und wie beschrieben konserviert.

3.5 Histologische Aufarbeitung der Hautproben

3.5.1 Präparation, Fixierung und Entwässerung

Die 1 x 1 cm großen Hautproben der Rückenhaut und Proben der Ohrmuscheln wurden in gekennzeichnete Histologiekörbchen gegeben und über Nacht bei 4 ºC in 4 % Paraformaldehyd (PFA, in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4) fixiert. Um eine optimale Durchmischung der Fixationslösung zu erreichen, wurde ein Magnetrührer verwendet. Nach Auswaschen des Fixans mit Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,4) erfolgte die Entwässerung der Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei die Proben zunächst für 48 h in 70%igen Ethanol verbracht wurden, anschließend wurden sie in der Histokinette Hypercenter 2 (Firma Shandon) zunächst für 1 h in 96%igen Ethanol und anschließend ebenfalls für 1 h in 99%igen Ethanol eingelegt.

3.5.2 Einbettung

Im Anschluß an die Entwässerung wurden die Hautproben für 1 h bei 56-58ºC in ein Paraffinbad I gegeben, danach bei gleicher Temperatur in frisches Paraffin II. Nach Abkühlung und Aushärtung wurde die Paraffinmasse wieder erwärmt und die Hautproben einzeln in durch Histologiekörbchen gekennzeichnete Paraffinblöcke eingebettet.

3.5.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach Abkühlung und vollständiger Aushärtung wurde das überschüssige Paraffin an den Seiten der Blöcke mit einem scharfen Messer schichtweise entfernt. Anschließend wurden von den eingebetteten Hautproben mittels eines HM 360 Mikrotoms (Fa. Microm, Walldorf) 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Dabei wurden die ersten 15-20 Schnitte verworfen, die nachfolgenden Schnitte wurden im Wasserbad (35 ºC) geglättet und auf Objektträger aufgezogen, welche mit 3-Amino-Propyltriethoxysilan (APES, Sigma) vorbehandelt wurden. Diese

Behandlung dient der Aufrauung der Oberfläche und führt zur besseren Haftung der Schnitte auf dem Objektträger. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mehrere Stunden luftgetrocknet.

3.5.4 Färbung der Hautschnitte

Nach Auswahl der qualitativ besten Schnitte wurden diese nach folgendem Färbeprotokoll gefärbt:

In der Hämalaun-Eosin-Färbung färbt Hämalaun Chromatin blau, Eosin Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rosa. Die so gefärbten Präparate wurden später für die Messung der Epidermisdicken verwendet.

Zunächst mussten die Schnitte nach folgendem Schema entparaffiniert werden:

Xylol	2 x 15 min nacheinander
100% Ethanol	5 min
40% Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min

Anschließend durchliefen die Schnitte folgende Färbeschritte:

Hämalaun	3,5 min
Abspülen in fließendem Leitungswasser	10 min
1% Eosin (wässrig)	3.5 min
70% Ethanol	10 sec
98% Ethanol	3 min
100% Ethanol	5 min
Xylol	5 min

Zuletzt erfolgte das Eindecken der Präparate mit DePex (Fa. Boehringer, Ingelheim).

Herstellung der Hämalaun-Lösung: 1 g Hematoxylin (Merck), 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 1 g Zitronensäure-Monohydrat und 50 g Chloralhydrat in 1.000 ml aqua dest.

Herstellung der Eosin-Lösung: 10 g gelbes Eosin in 1.000 ml aqua dest.

Liste der verwendeten Reagentien und Farben

Aluminiumkaliumsulfat	Merck Art. Nr.	1.01047
APES	Sigma	A-3648
Chloralhydrat	Merck Art. Nr.	1.02425
DePex	Boehringer-Ingelheim	001824302
Eosin G	Merck Art. Nr.	1.15935
Ethanol	Merck Art. Nr.	TC 212-9025
Haematoxylin	Merck Art. Nr.	1.04302
Natriumjodat	Merck Art. Nr.	1.06525
Paraffin	MEDITE	40.0021-00
Xylol	Merck Art. Nr.	TC 912-9025
Zitronensäure Monohydrat	Merck Art. Nr.	1.00244

3.6 Histologische Messungen

Die Messung der Epidermisdicke wurde mit einem halbautomatischen Bildanalysesystem (VIDEOPLAN, Fa. C. Zeiss, Oberkochen) und einem Zeiss Axioskop-Mikroskop mit Zeichentubus an HE-gefärbten Schnitten durchgeführt. Es wurde ein Schnitt von jedem Tier gemessen. Die Dicke der Rückenhaut-Epidermis wurde bei jedem Tier in interfollikulären Regionen an mindestens 20 Messpunkten bei 20facher Vergrößerung bestimmt, wobei die Messpunkte gleichmäßig über das ganze Präparat verteilt waren. Die Epidermisdicke wurde als Mittelwert über alle Messungen ermittelt.

3.7 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS für Windows (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Bei den Versuchen, in denen sowohl Tiere auf Normaldiät wie auch auf Rescue diet verwendet wurden, wurde zunächst eine faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren *Genotyp* und *Diät* durchgeführt. Da sich bei diesen Experimenten keinerlei Einfluss des Faktors *Diät* auf Hautparameter bzw. auf die Hautreaktion auf UV-Bestrahlung zeigte, wurden die Daten von Tieren auf Normaldiät und Rescue diet zusammen-

gefasst und mittels einfacher ANOVA analysiert. Falls die einfache ANOVA ergab, dass sich die Mittelwerte der einzelnen Gruppen signifikant unterschieden, diente der Dunnett-Test als Post hoc-Test, um individuelle Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen. Dabei wurden die Wildtyp-Tiere als jeweilige Kontrollgruppe verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1 UV induzierte Karzinogenese

Erwartungsgemäß entwickelte sich bei den Wildtyp- und heterozygoten Tieren nach viertägiger Bestrahlung ein leichtes Erythem, das sich an den bestrahlungsfreien Tagen zurückentwickelte, so dass die Tiere bei Beginn des nächsten Strahlungsintervalls unbeschädigte Rückenhaut zeigten. In diesen Gruppen war eine steigende Toleranz gegenüber der Bestrahlung mit UVB-Licht zu beobachten. Die am Versuch beteiligten Tiere zeigten in allen Gruppen unverändertes Verhalten.

In der achten Bestrahlungswoche, bei einer B-MED von 0,89 begannen sich Verhaltensveränderungen zu manifestieren. Eines der Wildtyp-Tiere zeigte starken Juckreiz und Automutilation durch Kratzen als Folge der Bestrahlung. Trotz Aussetzen der Bestrahlung und Behandlung mit Bepanthen Wundsalbe (Roche, Grenzach-Wyhlen) konnte bei diesem Tier keine Heilung herbeigeführt werden. Das Tier wurde daraufhin schmerzlos getötet. Zwei Wochen später entwickelte sich bei drei weiteren Tieren (ein Wildtyp-, zwei heterozygote Tiere) die gleiche Symptomatik. In der darauf folgenden Woche erkrankten zwei weitere Wildtyp-Tiere. Da die durch den Juckreiz verursachen Hautverletzungen bei keinem der Tiere zur Abheilung zu bringen waren und in den folgenden Wochen immer mehr Wildtyp- und heterozygote Tiere starken Juckreiz entwickelten, musste der Versuch nach 25 Wochen aufgrund mangelnder Tierzahl abgebrochen werden. Bei den homozygoten Tieren zeigten sich keine Anzeichen von Juckreiz.

Die verbliebenen Tiere wurden schmerzlos getötet, es wurden Proben von Ohr und Rückenhaut entnommen.

Obwohl dieser Versuch das gewünschte Ergebnis nicht erbringen konnte, lieferte er zwei interessante Beobachtungen:

1. Homozygote Mäuse zeigen eine hohe Resistenz gegen die Bestrahlung mit UVB Licht. Bei Bestrahlung mit einer Dosis, die bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren

zu einem Erythem führt, ist bei homozygoten Tieren keinerlei Einzündungsreaktion an der Haut zu beobachten.

2. Nach mehrwöchiger UV-Exposition fand bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren durch Verdickung der Haut eine langsame Adaptation an die Bestrahlung statt. Bei homozygoten Tieren waren keine Hautveränderungen zu beobachten.

4.2 Vergleich der Entzündungsreaktion der Haut nach UV-Kurzzeitexposition

4.2.1 Ergebnis der faktoriellen Varianzanlyse

Für den zuerst durchgeführten Versuch mit sechs Monate alten Tieren wurden die verwendeten Tiere zum Teil mit normalem Alleinfutter und zum Teil mit Rescue Diet gefüttert. Da sich in der faktoriellen Varianzanalyse kein signifikanter Einfluß hinsichtlich des Parameters Diät feststellt ließ, wurden die Daten von Tieren auf Normal- und Rescue Diet zusammengefasst. In den folgenden Versuchen kamen ausschließlich mit Rescue Diet ernährte Tiere zum Einsatz.

Tabelle 7: faktorielle Varianzananlyse UV Kurzzeitexposition

	Genotyp	Diät	Interaktion Genotyp * Diät
Hautfaltendicke VB	p = 0,033	n.s.	n.s.
Hautfaltendicke Δ	p = 0,019	n.s.	n.s.
Epidermisdicke	p < 0,0001	n.s.	n.s.

VB = Versuchsbeginn, Δ = Veränderung Versuchsbeginn-Versuchsende

4.2.2 Entwicklung des Körpergewichts

Im ersten Kurzzeitversuch mit sechs Monate alten Tieren zeigten sich weder zu Versuchsbeginn, noch bei Versuchsende signifikanten Differenzen bezüglich des Körpergewichts. Anders als in den danach durchgeführten Versuchen kam es allerdings bei allen drei Genotypen zu einer negativen Gewichtsentwicklung über die Dauer des Versuchs.

Bei den jungen Tieren aus den Kurzzeitversuchen II und III waren nach der dreitägigen intensiven Bestrahlung mit UVB-Licht, mit Ausnahme der homozygoten Tiere aus Kurzzeitversuch III, durchgängig Gewichtszunahmen zu verzeichnen. In der Gruppe der sechs Wochen alten Tiere bestanden weder bei Versuchsbeginn, noch nach dreitägiger Bestrahlung signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen. Obwohl sich die Genotypen im Hinblick auf das Körpergewicht deutlich unterschiedlich entwickelten (Gewichtszunahmen zwischen 0,02 +/- 0,15 g und 0,47 +/- 0,18 g), erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz. In der Gruppe der drei Wochen alten Tiere zeigte sich trotz vergleichbaren Anfangs- und Endgewichten eine konträre Entwicklung der Körpergewichte. Während die Wildtyp- und heterozygoten Tiere an Körpergewicht zulegten (Wildtyp-Tiere 1,89 +/- 0,25, heterozygote Tiere 2,64 +/- 0,52), war bei den homozygoten Tieren eine Gewichtsreduktion zu beobachten, wodurch die Gewichtsdifferenz am Versuchsende statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,002$, Tabelle 8).

Da in keiner der Versuchsgruppen während der Versuchsdauer eine deutliche Änderung der Körpergewichte festzustellen war, scheint die dreitägige UV-Bestrahlung keinen Einfluß auf die körperliche Gesamtkonstitution und das Allgemeinbefinden der Tiere zu haben.

Tabelle 8: UV Kurzzeitexposition: Entwicklung des Körpergewichts

Gruppe	**n**	**Körpergewicht**		**Differenz**
		Versuchsbeginn (g)	**Versuchsende (g)**	**(g)**
I (Alter 6 Mo.)				
I (WT/WT)	9	28,42 +/- 1,90	27,97 +/- 1,72	-0,46 +/- 0,38
II (WT/Δ)	9	29,00 +/- 1,36	28,71 +/- 1,24	-0,29 +/- 0,38
III (Δ/Δ)	9	26,21 +/- 1,18	25,72 +/- 1,08	-0,50 +/- 0,28
One-way ANOVA		n.s.	n.s.	n.s.
II (Alter 6 Wo.)				
I (WT/WT)	4	18,67 +/- 1,54	19,13 +/- 1,68	0,47 +/- 0,18
II (WT/Δ)	4	18,63 +/- 0,91	18,73 +/- 0,90	0,10 +/- 0,14
III (Δ/Δ)	5	18,44 +/- 1,07	18,42 +/- 1,15	0,02 +/- 0,15
One-way ANOVA		n.s.	n.s.	n.s.
III (Alter 3 Wo.)				
I (WT/WT)	10	9,35 +/- 0,52	11,24 +/- 0,75	1,89 +/- 0,25
II (WT/Δ)	10	10,04 +/- 1,65	12,68 +/- 2,07	2,64 +/- 0,52
III (Δ/Δ)	6	12,80 +/- 1,32	12,29 +/- 1,08	-0,50 +/- 0,55*
One-way ANOVA		n.s.	n.s.	p = 0,002

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardfehler
* $p < 0,05$ gegen Wildtyp

4.2.3 Entwicklung der Hautfaltendicke (Abb. 2-9; 14-16)

Im zuerst durchgeführten Kurzzeitversuch I mit 6 Monate alten Tieren zeigten sich zu Versuchsbeginn signifikante Unterschiede (p = 0,007, Tabelle 9) im Hinblick auf den Parameter Hautfaltendicke. Die größte Hautfaltendicke wurde bei den homozygoten Tieren ermittelt (Hautfaltendicke Versuchsbeginn: Wildtyp-Tiere 0,75 +/- 0,04, heterozygote Tiere 0,78 +/- 0,04, homozygote Tiere 0,98 +/- 0,07). Nach 3-tägiger Bestrahlung (B-MED 0,45) mit UVB Licht hatten sich die Hautfaltendicken angleichend entwickelt, so dass bei Versuchsende nur noch geringe Differenzen zwischen den Genotypen bestanden. Allerdings dokumentierte sich in der Entwicklung der Hautfaltendicke während der dreitägigen Bestrahlung ein signifikanter Unterschied (p = 0,006, Tabelle 9) zwischen den einzelnen Genotypen. Erwartungsgemäß entwickelten die homozygoten Tiere den geringsten Zuwachs hinsichtlich des Parameters Hautfaltendicke, bei den Wildtyp- und heterozygoten Tieren war ein vergleichbarer Zuwachs zu verzeichnen (Differenz Hautfaltendicke: Wildtyp-Tiere 0,31 +/- 0,03; heterozygote Tiere 0,37 +/- 0,09, homozygote Tiere 0,11 +/- 0,02).

Um einen Einfluß des Tieralters, bzw. den damit verbundenen Hautveränderungen bei den homozygoten Tieren auszuschließen, führten wir zwei Versuche mit deutlich jüngeren (sechs Wochen bzw. drei Wochen alt) Tieren durch. Diese Gruppe der sechs Wochen alten Tiere zeigte nach Enthaarung eine äußerlich identische Hautstruktur. Dennoch war die Reaktion auf die dreitägige UVB Bestrahlung sehr unterschiedlich. Wie auch im Kurzzeitversuch I zeigten im Kurzzeitversuch II die homozygoten Tiere zu Versuchsbeginn die höchsten Werte bei der Messung der Hautfaltendicke. Die Unterschiede vor Bestrahlung erreichten allerdings keine statistische Signifikanz. Durch dreitätige Bestrahlung mit UVB Licht war bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren eine signifikante Zunahme der Hautfaltendicke festzustellen (Zunahme Hautfaltendicke: Wildtyp-Tiere 0,31 +/- 0,03, heterozygote Tiere 0,37 +/- 0,09; homozygote Tiere 0,11 +/- 0,02)), so dass auch bei den Hautfaltendicken am Versuchsende eine Differenz nachweisbar war, die statistisch signifikant war (p = 0,003, Tabelle 9).

Die Ergebnisse aus Kurzzeitversuch I und II geben keinen Hinweis darauf, dass bei homozygoten Tieren die altersbedingten Hautveränderungen einen Einfluß auf die UV Resistenz haben. Um dieses Ergebnis zu überprüfen wurde der Versuch mit jüngeren, drei Wochen alten Tieren, wiederholt. Bei dieser Altersgruppe kann man davon ausgehen, dass die Tiere sich noch im ersten Haarzyklus befinden, Hautveränderungen durch den VDR-Mangel können

hier ausgeschlossen werden. Anders als in den vorangegangenen Versuchen zeigten hier bei Versuchsbeginn nicht die homozygoten, sondern die heterozygoten Tiere die signifikant stärkste Hautfaltendicke (Hautfaltendicke Versuchsbeginn: Wildtyp-Tiere 0,40 +/- 0,03, heterozygote Tiere 0,64 +/- 0,06, homozygote Tiere 0,48 +/- 0,03). Dieses Ergebnis änderte sich durch die UVB Bestrahlung nicht, so dass bei Versuchsende noch immer signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und heterozygoten Tieren bzw. homozygoten und heterozygoten Tieren bestanden (Hautfaltendicke Versuchsende Wildtyp-Tiere 0,89 +/- 0,06, heterozygote Tiere 1,13 +/- 0,07, homozygote Tiere 0,90 +/- 0,09). Der bestrahlungsbedingte Zuwachs der Hautfaltendicke erreichte im Vergleich der Genotypen keine statistische Signifikanz.

Damit ließ sich die sechs Monaten bzw. sechs Wochen alten Tieren beobachtete, gesteigerte UV Resistenz der homozygoten Tiere bei einer Versuchswiederholung mit drei Wochen alten Tieren nicht bestätigen. Während bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren die Hautreaktionen auf eine Bestrahlung mit UV-Licht in allen drei Altersgruppen ähnlich waren, scheint bei den homozygoten Tieren das Alter einen wesentlichen Einfluß auf die UV-Resistenz der Haut zu haben.

Tabelle 9: UV Kurzzeitexposition: Entwicklung der Hautfaltendicke

Gruppe	n	Hautfaltendicke Versuchsbeginn (mm)	Hautfaltendicke Versuchsende (mm)	Differenz (mm)
I (Alter 6 Mo.)				
I (WT/WT)	9	0,75 +/- 0,04	1,06 +/- 0,04	0,31 +/- 0,03
II (WT/Δ)	9	0,78 +/- 0,04	1,16 +/- 0,09	0,37 +/- 0,09
III (Δ/Δ)	9	0,98 +/- 0,07	1,09 +/- 0,07	0,11 +/- 0,02
One-way ANOVA		p = 0,007	n.s.	p = 0,006
II (Alter 6 Wo.)				
I (WT/WT)	4	0,69 +/- 0,09	1,47 +/- 0,06	0,78 +/- 0,07
II (WT/Δ)	4	0,70 +/- 0,06	1,25 +/- 0,07	0,55 +/- 0,03*
III (Δ/Δ)	5	0,84 +/- 0,06	0,90 +/- 0,09*	0,05 +/- 0,03*
One-way ANOVA		n.s.	p = 0,003	p < 0,0001
III (Alter 3 Wo.)				
I (WT/WT)	10	0,40 +/- 0,03	0,89 +/- 0,06	0,49 +/- 0,04
II (WT/Δ)	10	0,64 +/- 0,06*	1,13 +/- 0,07*	0,49 +/- 0,07
III (Δ/Δ)	6	0,48 +/- 0,03	0,90 +/- 0,09	0,32 +/- 0,02
One-way ANOVA		p = 0,004	p = 0,035	n.s.

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardfehler
* $p < 0,05$ gegen Wildtyp

4.2.4 Entwicklung der Epidermisdicke (Abb. 2-9, 17-19)

In der Baseline Kontrollgruppe zeigten weder die sechs Monate alten Tiere noch die drei Wochen alten Tiere signifikante Unterschiede hinsichtlich der Epidermisdicke.

Im ersten Versuch mit sechs Monate alten Tieren war nach dreitägiger Bestrahlung mit UVB-Licht eine signifikante Verdickung ($p < 0{,}0001$, Tabelle 10) der Epidermis in der Gruppe der Wildtyp- und der heterozygoten Tiere zu beobachten (Epidermisdicke: Wildtyp-Tiere 55,48 +/- 4,39; heterozygote Tiere 49,69 +/- 6,83, homozygote Tiere 25,00 +/- 1,69). Damit zeigten die homozygoten Tiere bei gleicher Strahlungsdosis eine deutlich geringere Hautreaktion.

Die Versuchswiederholung mit sechs Wochen alten Tieren erbrachte hinsichtlich der Entwicklung der Epidermisdicken ein vergleichbares Ergebnis. Zwar fielen die Unterschiede etwas geringer aus, aber auch hier zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p = 0{,}023$, Tabelle 10) bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren (Epidermisdicke: Wildtyp-Tiere 74,13 +/- 8,93; heterozygote Tiere 65,65 +/- 4,73; homozygote Tiere 47,74 +/- 4,37).

Dieses Ergebnis ließ sich bei Versuchswiederholung mit drei Wochen alten Tieren nicht bestätigen. Hier entwickelten die homozygoten Tiere eine deutlich stärkere Proliferation der Epidermis nach UV-Bestrahlung. Zwar liegt der Wert 50,92 +/- 3,97 µm auch in dieser Altersgruppe unter dem der Wildtyp-Tiere mit 59,85 +/- 6,37 µm und dem der heterozygoten Tiere mit 66,47 +/- 10,15 µm, dennoch ist die Differenz zwischen den UV-provozierten Reaktionen an der Epidermis deutlich geringer und erreichte keine statistische Signifikanz.

Auch bei der Epidermisproliferation nach UV-Bestrahlung scheint das Alter der Tiere eine wesentliche Rolle zu spielen. Obwohl in allen drei Altersgruppen die Reaktion der homozygoten Tiere am schwächsten ausgeprägt war, sind in der Gruppe der drei Wochen alten Tiere die geringsten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen festzustellen. Dies entspricht auch den Ergebnissen über die Entwicklung der Hautfaltendicke.

Tabelle 10: UV Kurzzeitexposition: Entwicklung der Epidermisdicke

Gruppe	Epidermisdicke	
	Baseline (µm)	Versuchsende (µm)
I (Alter 6 Mo.)		
I (WT/WT)	14,49 +/- 0,03	55,48 +/- 4,39
II (WT/Δ)	14,20 +/- 0,79	49,69 +/- 6,83
III (Δ/Δ)	18,10 +/- 2,91	25,00 +/- 1,69
One-way ANOVA	n.s.	p < 0,0001
II (Alter 6 Wo.)		
I (WT/WT)		74,14 +/- 8,93
II (WT/Δ)		65,65 +/- 4,73
		p = 0,041 (3/2)
III (Δ/Δ)		47,74 +/- 4,37*
One-way ANOVA	n.s.	p = 0,023
III (Alter 3 Wo.)		
I (WT/WT)	10,91 +/- 0,16	59,85 +/- 6,37
II (WT/Δ)	11,04 +/- 0,18	66,47 +/- 10,15
III (Δ/Δ)	10,86 +/- 0,23	50,92 +/- 3,97
One-way ANOVA	n.s.	n.s.

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardfehler
* p < 0,05 gegen Wildtyp

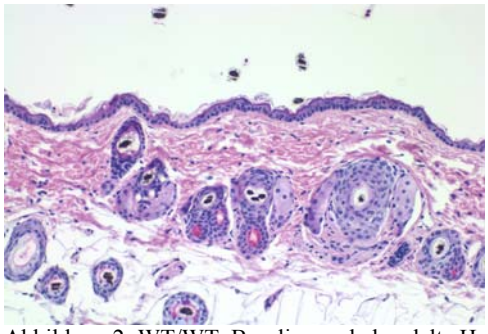


Abbildung 2: WT/WT, Baseline, unbehandelte Haut

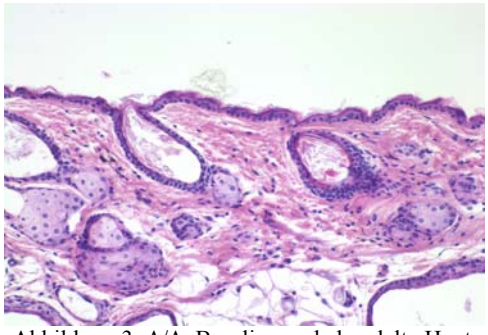


Abbildung 3: Δ/Δ, Baseline, unbehandelte Haut

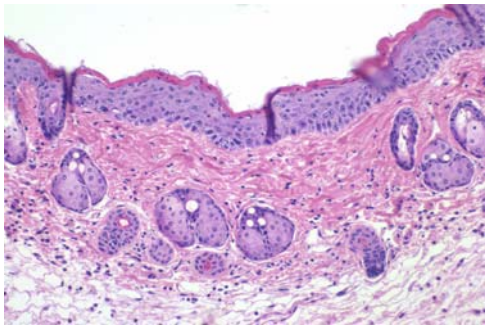


Abbildung 4: WT/WT, Alter 6 Mo., 3 Tg. Bestrahlung

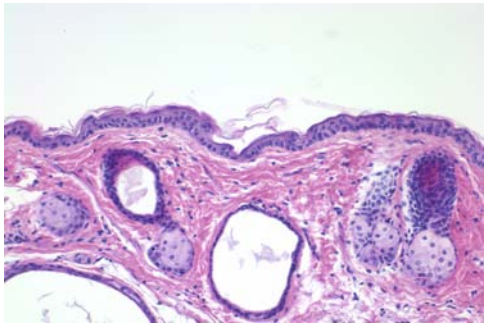


Abbildung 5: Δ/Δ, Alter 6 Mo., 3 Tg. Bestrahlung

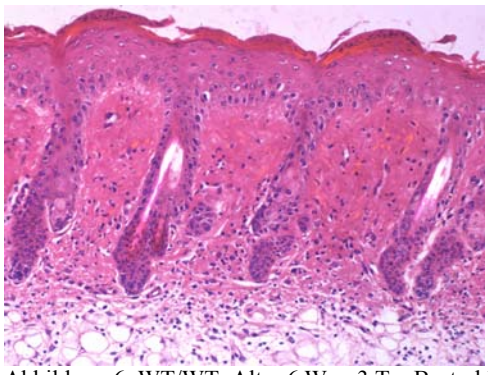


Abbildung 6: WT/WT, Alter 6 Wo., 3 Tg. Bestrahlung

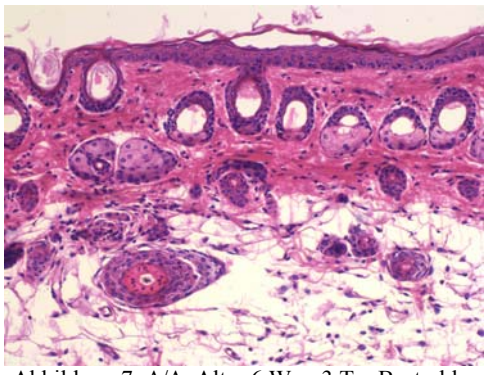


Abbildung 7: Δ/Δ, Alter 6 Wo., 3 Tg. Bestrahlung

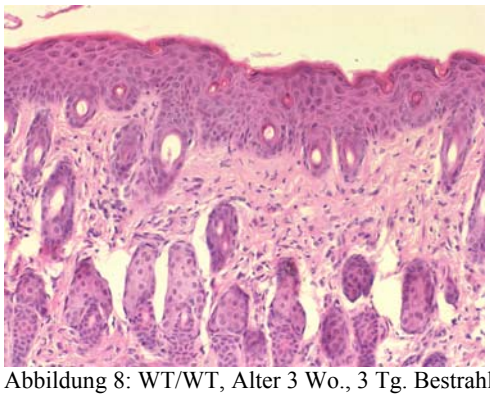


Abbildung 8: WT/WT, Alter 3 Wo., 3 Tg. Bestrahlung

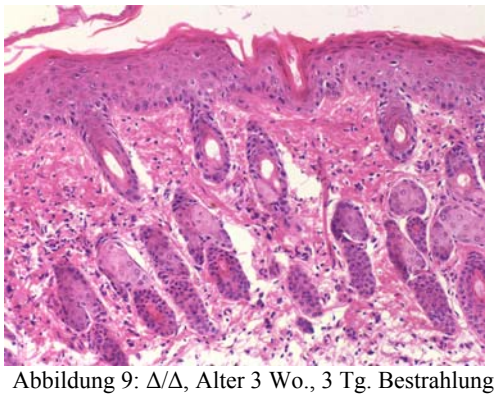


Abbildung 9: Δ/Δ, Alter 3 Wo., 3 Tg. Bestrahlung

Abbildungen 2-9: Originalvergrößerung 200fach
HE-Färbung

4.3 Auswirkungen mehrwöchiger Bestrahlung mit UV Licht

4.3.1 Ergebnis der faktoriellen Varianzanlyse

Wie auch im ersten Kurzzeitversuch wurden die hier im zweiwöchigen Versuch verwendeten, sechs Monate alten Tiere zum Teil mit normalem Alleinfutter und zum Teil mit Rescue Diet gefüttert. Da sich in der faktoriellen Varianzanalyse kein signifikanter Einfluß hinsichtlich des Parameters Diät feststellt ließ, wurden die Daten von Tieren auf Normal- und Rescue Diet zusammengefasst. In den folgenden Versuchen kamen ausschließlich mit Rescue Diet ernährte Tiere zum Einsatz.

Tabelle 11: faktorielle Varianzananlyse zweiwöchige Bestrahlung

	Genotyp	Diät	Interaktion Genotyp * Diät
Hautfaltendicke VB	p = 0,025	n.s.	n.s.
Hautfaltendicke Δ	n.s.	n.s.	n.s.
Epidermisdicke	n.s.	n.s.	n.s.

VB = Versuchsbeginn, Δ = Veränderung Versuchsbeginn-Versuchsende

4.3.2 Entwicklung des Körpergewichts

Die im ersten Langzeitversuch eingesetzten sechs Monate alten Tiere zeigten weder zu Versuchsbeginn noch bei Versuchsende signifikante Differenzen hinsichtlich des Körpergewichts (Tabelle 12). Während des zweiwöchigen Versuchs war bei allen drei Genotypen ein Verlust an Körpergewicht zu beobachten. Die bei Versuchsbeginn gewichtsmäßig schwächste Gruppe der homozygoten Tiere verlor im Verhältnis am wenigsten an Gewicht, so dass sich die Werte bei Versuchende aneinander angeglichen hatten.

Anders entwickelten sich die Körpergewichte in dem Versuch mit sechs Wochen alten Tieren. Zwar hatten auch hier zu Versuchsbeginn die homozygoten Tiere das niedrigste durchschnittliche Körpergewicht, nach der vierwöchige Bestrahlung mit UV Licht war allerdings in dieser Gruppe die größte Gewichtszunahme zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes waren die durchschnittlichen Körpergewichte nahezu identisch.

Da in keiner der Versuchsgruppen während der Versuchsdauer eine deutliche Änderung der Körpergewichte festzustellen war, scheint auch die zweiwöchige UV-Bestrahlung keinen Einfluß auf die körperliche Gesamtkonstitution und das Allgemeinbefinden der Tiere zu haben.

Tabelle 12: Mehrwöchige UV-Bestrahlung: Entwicklung des Körpergewichts

Gruppe	n	Körpergewicht		Differenz
		Versuchsbeginn (g)	Versuchsende (g)	(g)
LZ I (Alter 6 Mo)				
I (WT/WT)	9	32,81 +/- 3,26	31,20 +/- 2,57	-1,61 +/- 0,94
II (WT/Δ)	9	30,55 +/- 1,23	27,56 +/- 1,01	-1,75 +/- 0,63
III (Δ/Δ)	9	28,77 +/- 0,69	27,37 +/- 0,82	-1,40 +/- 0,37
One-way ANOVA		n.s.	n.s.	n.s
LZ II (Alter 6 Wo)				
I (WT/WT)	6	19,08 +/- 1,43	22,43 +/- 0,83	3,36 +/- 1,40
II (WT/Δ)	6	17,19 +/- 1,13	21,90 +/-1,06	4,72 +/- 1,01
III (Δ/Δ)	5	15,44 +/-1,60	22,64 +/- 0,57	5,65 +/- 0,80
One-way ANOVA		n.s.	n.s.	n.s.

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardfehler

4.3.3 Entwicklung der Hautfaltendicke (Abb. 10-13; 14-16)

Im ersten Versuch mit sechs Monate alten Tieren waren bei Versuchsbeginn deutliche Unterschiede in der Dicke der Rückenhautfalte nachzuweisen. Dabei zeigten die homozygoten Tiere vor Bestrahlungsbeginn eine signifikant dickere Hautfalte ($p = 0,009$, Tabelle 13) als die Vergleichsgruppen (Hautfaltendicke Versuchsbeginn: Wildtyp-Tiere 0,86 +/- 0,06; heterozygote Tiere 0,78 +/- 0,05; homozygote Tiere 1,01 +/- 0,04). Nach zweiwöchiger UV-Bestrahlung (B-MED 0,27; 0,36) war bei allen drei Genotyen eine Zunahme der Hautfaltendicke nachzuweisen. Obwohl die Wildtyp-Tiere mit einer Zunahme von 0,18 +/- 0,06 µm und heterozygoten Tiere mit einer Zunahme von 0,22 +/- 0,07 µm deutlich stärker reagierten als die homozygoten Tiere (Differenz Hautfaltendicke 0,09 +/- 0,04) erreichte der Unterschied der Werte bei Versuchsende keine statistische Signifikanz.

In der Versuchswiederholung mit sechs Wochen alten Tieren wurde die Bestrahlung wie beschrieben über vier Wochen durchgeführt (B-MED 0,27; 0,36; 0,45; 0,53). Weder bei Versuchsbeginn, noch am Versuchsende zeigten die Hautfaltendicken signifikante Differenzen. Allerdings war nach der vierwöchigen Bestrahlung ein deutlicher Unterschied in der Hautreaktion von Wildtyp- bzw. heterozygoten Tieren und homozygoten Tieren nachzuweisen. Den

geringsten Zuwachs der Hautfalte entwickelten die homozygoten Tiere (Differenz Hautfaltendicke: Wildtyp-Tiere 0,18 +/- 0,10, heterozygote Tiere 0,07 +/- 0,05, homozygote Tiere -0,18 +/- 0,03).

Tabelle 13: Mehrwöchige UV Exposition: Entwicklung der Hautfaltendicke

Gruppe	n	Hautfaltendicke		Differenz
		Versuchsbeginn (mm)	Versuchsende (mm)	(mm)
LZ I (Alter 6 Mo)				
I (WT/WT)	9	0,86 +/- 0,06	1,04 +/- 0,04	0,18 +/- 0,06
II (WT/Δ)	9	0,78 +/- 0,05	0,99 +/- 0,03	0,22 +/- 0,07
III (Δ/Δ)	9	1,01 +/- 0,04	1,10 +/- 0,06	0,09 +/- 0,04
One-way ANOVA		p =0,009	n.s.	n.s
LZ II (Alter 6 Wo)				
I (WT/WT)	6	0,78 +/- 0,06	0,96 +/- 0,09	0,18 +/- 0,10
II (WT/Δ)	6	0,83 +/- 0,06	0,89 +/- 0,07	0,07 +/- 0,05
III (Δ/Δ)	5	0,81 +/- 0,07	0,70 +/- 0,02	-0,18 +/- 0,03*
One-way ANOVA		n.s.	n.s.	p = 0,01

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardfehler
* $p < 0,05$ gegen Wildtyp

4.3.4 Entwicklung der Epidermisdicke (Abb. 10-13; 17-19)

In der Baseline Kontrollgruppe zeigten weder die sechs Monate alten Tiere noch die drei Wochen alten Tiere signifikante Unterschiede hinsichtlich der Epidermisdicke. Auf die mehrwöchige UV-Bestrahlung reagierten die Tiere deutlich geringer mit Verdickung der Epidermis als in den vorangegangenen dreitägigen Versuchen. Weder bei den sechs Monate alten Tieren, noch bei den sechs Wochen alten Tieren waren statistisch signifikante Veränderungen festzustellen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Mehrwöchige UV-Bestrahlung: Entwicklung der Epidermisdicke

Gruppe	Epidermisdicke	
	Baseline (µm)	Versuchsende (µm)
LZ I (Alter 6 Mo.)		
I (WT/WT)	14,49 +/- 0,03	25,58 +/- 5,90
II (WT/Δ)	14,20 +/- 0,79	14,35 +/- 0,38
III (Δ/Δ)	18,10 +/- 2,91	18,26 +/- 0,80
One-way ANOVA	n.s.	n.s.
LZ II (Alter 6 Wo.)		
I (WT/WT)		21,77 +/- 3,29
II (WT/Δ)		22,20 +/- 2,31
III (Δ/Δ)		22,41 +/- 0,90
One-way ANOVA	n.s.	n.s.

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardfehler

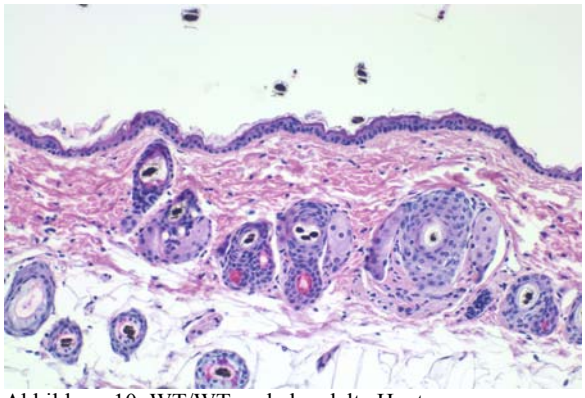


Abbildung 10: WT/WT, unbehandelte Haut

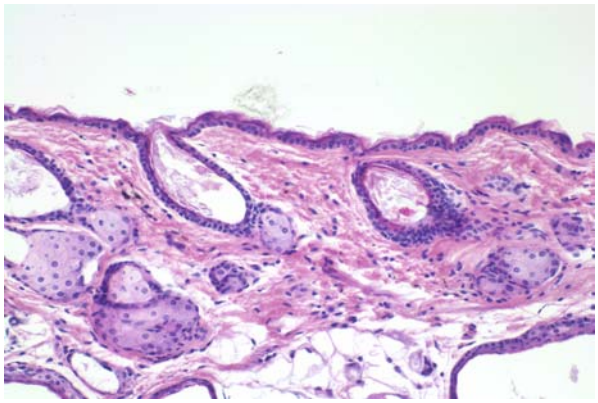


Abbildung 11: Δ/Δ, Baseline, unbehandelte Haut

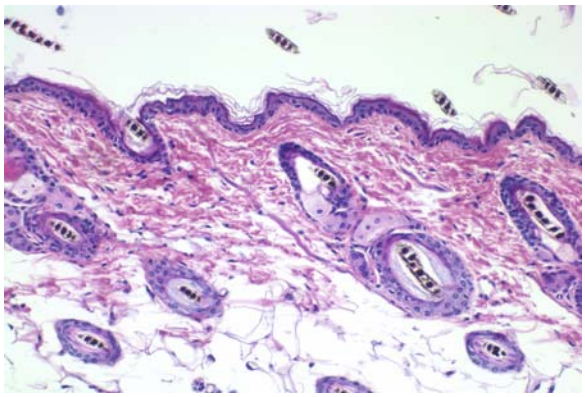


Abbildung 12: WT/WT, Alter 6 Mo., 2 Wo. Bestrahlung

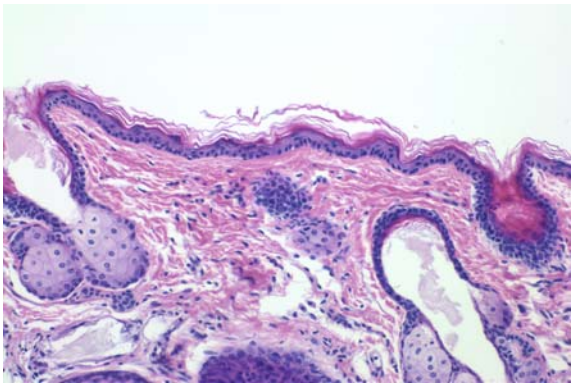


Abbildung 13: Δ/Δ, Alter 6 Mo., 2 Wo. Bestrahlung

Abbildung 10-13: Originalvergrößerung 200fach
HE-Färbung

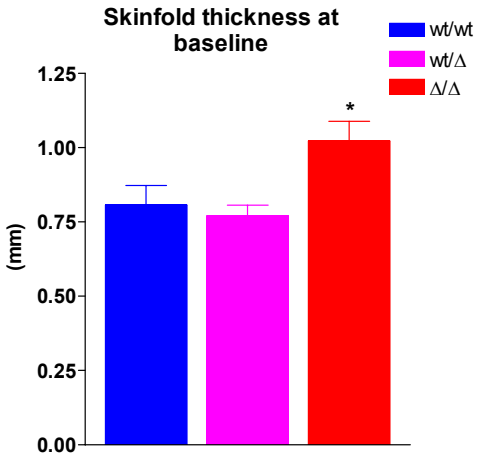


Abbildung 14: Hautfaltendicke, Baseline

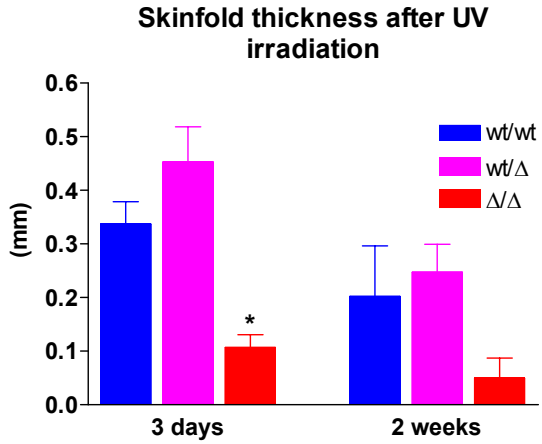


Abbildung 15: Differenz der Hautfaltendicke, 6 Mo. alte Mäuse

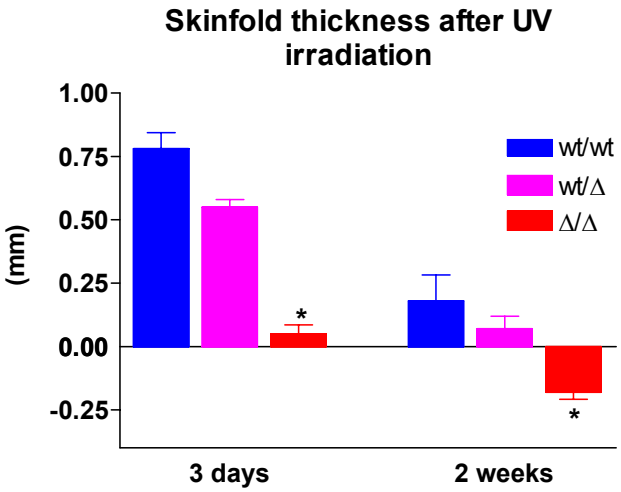


Abbildung 16: Differenz der Hautfaltendicke, 6 Wo. alte Mäuse

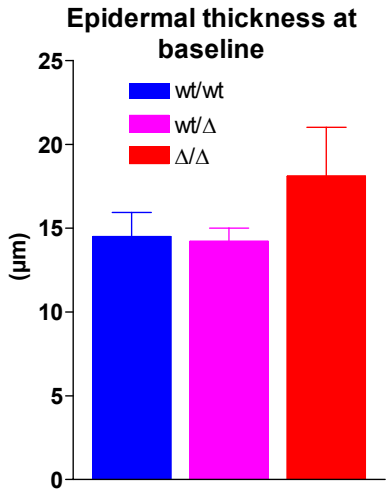


Abbildung 17: Epidermisdicke, Baseline

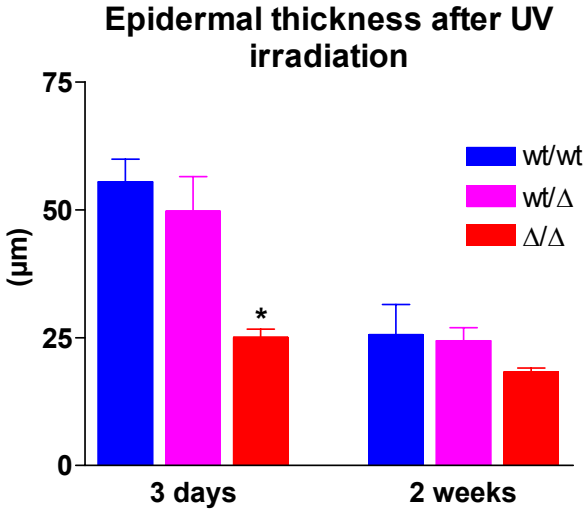


Abbildung 18. Veränderung der Epidermisdicke, 6 Mo. alte Mäuse

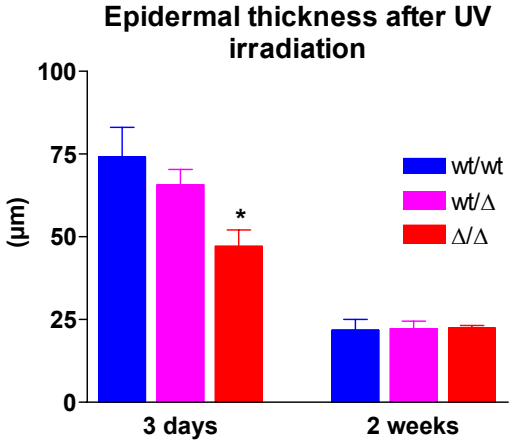


Abbildung 19: Veränderung der Epidermisdicke, 6 Wo. alte Mäuse

5. DISKUSSION

In der hier beschriebenen Studie sollte erstmals die Auswirkung von UVB-Strahlung auf die Haut von Vitamin-D-Rezeptor-defizienten Mäusen verschiedener Altersstufen untersucht werden. Die vorliegenden Daten haben überraschenderweise gezeigt, dass 6 Wochen und 6 Monate alte VDR-Mutanten eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegenüber UVB-Strahlung aufweisen als Wildtyp- oder heterozygote Tiere. Drei Wochen alte VDR-Mutanten mit noch weitgehend unveränderter Haut zeigten jedoch im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen eine sehr ähnliche Empfindlichkeit gegenüber UVB-Bestrahlung.

5.1 Der Hautphänotyp von VDR-Knockout-Mäusen

Ähnlich wie Menschen mit einem Gendefekt des VDR (Beer et al., 1981; Demay, 1999; Malloy & Feldmann, 1999) zeigen auch VDR-Knockout-Mäuse eine progrediente Alopezie, die bei Mäusen im Alter von 4 bis 6 Wochen beginnt und mit ca. 4 Monaten in eine generalisierte, totale Alopezie einmündet (Yoshizawa et al., 1997; Li et al., 1997; Erben et al., 2002). Im Gegensatz zu Hypokalzämie, sekundärem Hyperparathyreoidismus und rachitischem Knochenphänotyp lässt sich der Hautphänotyp von VDR-Knockout-Mäusen nicht durch Füttern der Rescue diet, also durch die Normalisierung der Kalziumhomöostase, beeinflussen (Li et al., 1998). Der in Keratinozyten des äußeren Haarschafts und in der Papille des Haarfollikels exprimierte VDR (Stumpf et al., 1984; Berger et al., 1988; Reichrath et al., 1994) ist für die Entwicklung der Haarfollikel in einer kritischen Phase im zweiten Haarzyklus essentiell (Xie et al., 2002; Kong et al., 2002). Es ist momentan unklar, warum der VDR nicht für die pränatale Entwicklung der Epidermis und für den ersten Haarzyklus notwendig ist, und warum die essentielle Funktion des VDR für die Haarbildung unabhängig vom Liganden, also dem Vitamin-D-Hormon, ist. Vitamin-D-Mangel oder Vitamin-D-Hormon-Mangel ist nicht mit einer Alopezie assoziiert (Demay, 1999; Malloy & Feldmann, 1999).

Neben der Alopezie weist die Haut von VDR-Knockout-Mäusen jedoch noch weitere Veränderungen auf. Ein typisches Merkmal der Epidermis von VDR-Knockout-Mäusen ist die Entwicklung von Epidermalzysten (Li et al., 1997; Erben et al., 2002). Wie die vorliegende Studie gezeigt hat, beginnt die Entwicklung dieser Zysten bereits im Alter von ca. 3 Wochen (Abb. 21). Zu späteren Zeitpunkten findet sich in der Haut von VDR-Mutanten bereits eine

Vielzahl dieser Zysten. Heterozygote Tiere sind nicht betroffen. Die Pathogenese dieser Epidermalzysten bei VDR-Knockout-Mäusen ist unbekannt. Einige dieser Zysten sind dunkel pigmentiert, was insbesondere bei alten VDR-Mutanten zu einem „gesprenkelten“ Aussehen der Haut führt. Zusätzlich zur Entwicklung der Epidermalzysten kommt es insbesondere bei Tieren, die älter als ca. 4 – 6 Monate sind, zu deutlichen Veränderungen der Hautstruktur. Die Haut wird faltig, fühlt sich teigig an und verliert an Elastizität (Abb. 3). Durch diese Veränderungen kommt es, wie in dieser Arbeit gezeigt, bei 6 Monate alten VDR-Knockout-Mäusen zu einer deutlichen Zunahme der Hautfaltendicke. Die Dicke des Hautoberflächen-Epithels ist davon allerdings nicht betroffen. Ältere VDR-Mutanten neigen auch zur Entwicklung von lokalen Dermatitiden, was möglicherweise mit der veränderten Hautstruktur zusammenhängt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch der Wegfall der in einer Reihe von Experimenten (Adorini et al., 2003; Griffin et al., 2003; Van Etten et al., 2003) nachgewiesenen, immunomodulatorischen Wirkungen von $1\alpha,25(OH)_2D_3$ zur Entwicklung der gehäuften Dermatitiden bei VDR-Mutanten beiträgt. Über die molekularen Grundlagen der strukturellen Hautveränderungen bei VDR-Knockout-Mäusen ist derzeit noch wenig bekannt. Die phänotypischen Veränderungen der Haut bei VDR-Mutanten sprechen somit nicht nur für eine molekulare Rolle des VDR in der Haarbildung, sondern auch in der Erhaltung der Elastizität der Haut. Möglicherweise hemmt $1\alpha,25(OH)_2D_3$ auch die Entwicklung von Dermatitiden, was für die dermatologische Forschung in der Human- und Tiermedizin von großer Bedeutung wäre.

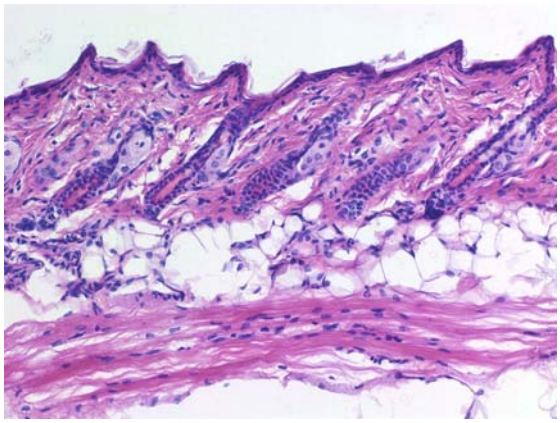


Abbildung 20: WT/WT, Alter 3 Wochen, unbehandelte Haut

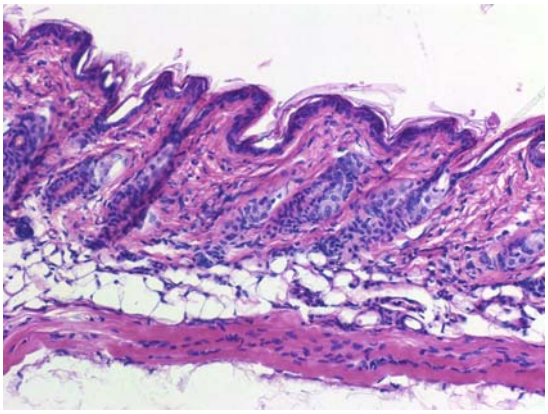


Abbildung 21: Δ/Δ, Alter 3 Wochen, unbehandelte Haut

5.2 UVB-induzierte Hautkarzinogenese

Um Aussagen über die karzinogene Wirkung von UVB-Strahlung bei VDR-Knockout-Mäusen machen zu können, wurde ein UVB-Hautkarzinogenese-Versuch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die karzinogene Wirkung von UVB-Strahlung ist in Langzeit-

Experimenten mit Mäusen bereits mehrfach nachgewiesen (Wulf et al., 1994; Bech-Thomsen et al., 1994). Im Laufe von mehreren Monaten UVB-Exposition entstehen dabei zunächst Papillome und später dann vor allem Plattenepithelkarzinome. Das initial geplante Versuchsdesign hinsichtlich Bestrahlungsintensität und –dauer stellt ein in der Literatur häufig verwendetes Standard-Vorgehen dar (Wulf et al., 1994; Bech-Thomsen et al., 1994). Für diese Versuche wurden jedoch bisher aus praktischen Gründen stets Nacktmäuse verwendet. Daher konnten wir auf keinerlei Erfahrungen zur UVB-Bestrahlung von C57BL/6-Mäusen zurückgreifen. Zu Beginn dieses Versuchs stellte sich heraus, dass C57BL/6-Mäuse wesentlich empfindlicher als Nacktmäuse auf UVB-Strahlung reagieren. Deshalb musste die UVB-Dosis um ca. das 5fache gegenüber Nacktmäusen reduziert werden. Dies zeigt unter anderem, dass unterschiedliche Mausstämme sehr unterschiedlich auf UVB-Strahlung reagieren, und dass für bestimmte Mausstämme etablierte Verfahren nicht vorbehaltslos auf andere Stämme übertragen werden können.

Leider hat sich dieser Versuch dann im weiteren Verlauf als undurchführbar erwiesen, weil sich bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren, nicht jedoch bei homozygoten Mutanten, nach ca. 8 Wochen Versuchsdauer häufig starker Juckreiz entwickelte, was dann den Abbruch des Versuches notwendig machte. Obwohl der Versuch somit keine Daten bezüglich potentieller Unterschiede der UVB-induzierten Hautkarzinom-Entwicklung bei Wildtyp- und VDR-Knockout-Mäusen lieferte, zeigte sich als interessantes Teilergebnis doch im Vergleich zu Wildtyp- und heterozygoten Tieren eine wesentlich geringere Empfindlichkeit der Haut von 6 Monate alten VDR-Knockout-Mäusen gegenüber akuter und chronischer UVB-Exposition. Damit in Zusammenhang steht möglicherweise auch die Resistenz der VDR-Mutanten gegenüber der Entwicklung von Juckreiz.

5.3 UVB-induzierte Keratinozytenproliferation und Entzündungsreaktion in der Haut

Um die lokale Entzündungsreaktion der Haut und die gesteigerte Proliferation von Keratinozyten als Antwort auf UVB-Exposition zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit mehrere Versuche durchgeführt, in denen nach 3tägiger oder mehrwöchiger UVB-Bestrahlung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten VDR-Mutanten die Hautfaltendicke mit einem Hautfaltendickenmessgerät und die Epidermisdicke histologisch quantifiziert wurden. In sehr guter Übereinstimmung mit den Daten aus dem Hautkarzinogenese-Versuch zeigte sich, dass 6 Monate und 6 Wochen alte homozygoten Tiere eine deutlich höhere UVB-Resistenz als die

Wildtyp- und heterozygoten Tiere aufwiesen. Die Zunahme der Hautfaltendicke als Maß für die entzündliche Reaktion und die nachfolgende Bindegewebszubildung war bei VDR-Knockout-Mäusen dieser Altersstufen nach 3 Tagen und nach 2 - 4 Wochen UVB-Exposition wesentlich geringer ausgeprägt als bei heterozygoten und Wildtyp-Tieren. Die Art der Diät (Rescue oder Normaldiät) hatte keinen Einfluß auf die UVB-induzierte Hautreaktion. Nach 3 Tagen UVB-Exposition kam es bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren zu einer starken Steigerung der Epidermisdicke als Maß für die UVB-induzierte Keratinozytenproliferation. Bei 6 Wochen und 6 Monate alten homozygoten VDR-Mutanten war dieser Anstieg der Epidermisdicke signifikant reduziert.

Aus diesen Ergebnissen ließe sich schließen, dass der vollständige Verlust der VDR-Rezeptorfunktion einen photoprotektiven Einfluß auf die Haut hat. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse zweier Studien (Hanadan et al., 1995; Lee & Youn, 1998) in denen sowohl in vitro als auch in vivo die photoprotektive Wirkung von Vitamin-D gegen UVB-Strahlung nachgewiesen werden konnte. Bei den dort verwendeten Mäusen führte die systemische Behandlung mit Vitamin-D zu einer deutlichen Verringerung der UVB-verursachten Hautläsionen bei Einsatz niedriger UV-Dosen. Auch in der Zellkultur ließ sich in diesen Studien die photoprotektive Wirkung von Vitamin-D nachweisen. Allerdings wird beschrieben, dass bei Bestrahlung mit höheren UVB-Dosen (50 mJ/cm^2) dieser protektive Effekt nicht mehr wirksam ist. Auch die in Keratinozyten beobachtete Steigerung der Synthese von Metallothionein durch Vitamin-D würde eher für einen photoprotektiven Effekt von Vitamin D sprechen (Lee, 1998) und steht somit in Widerspruch zu den hier vorgestellten Versuchsergebnissen.

Aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen der Haut bei älteren VDR-Mutanten war es jedoch nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Hautreaktionen bei VDR-Knockout-Mäusen durch die bereits bestehenden Hautveränderungen bei den VDR-Mutanten bedingt waren. Deshalb wurde ein Versuch mit 3tägiger UVB-Exposition auch mit 3 Wochen alten Tieren durchgeführt. In diesem Alter haben homozygote VDR-Mutanten noch normales Fell und nur sehr dezente Veränderungen der Epidermis-Histologie. Interessanterweise zeigte dieser Versuch, dass die Zunahme von Hautfaltendicke und Epidermisdicke bei Wildtyp-, heterozygoten und VDR-Knockout-Mäusen in dieser Altersstufe vergleichbar war. Dieses Ergebnis zeigt klar, dass es keine direkte molekulare Rolle des VDR in der UVB-induzierten Entzündungsantwort der Haut gibt. Vielmehr beruht die bei älteren VDR-Knockout-Tieren gefundene UVB-Resistenz sehr wahrscheinlich auf präexistenten Hautveränderungen bei diesen

Tieren. Es ist derzeit völlig unklar, auf welchen strukturellen oder biochemischen Veränderungen diese verminderte Reaktion der Haut von älteren VDR-Knockout-Mäusen gegenüber UVB-Exposition beruht. Möglicherweise ließen sich jedoch durch eine Aufklärung der zugrunde liegenden Veränderungen sehr wertvolle Hinweise auf die zellulären Vorgänge gewinnen, die zu den UVB-induzierten Hautläsionen führen.

5.4 Ausblick

Eine Fülle von Daten aus der Humanmedizin und insbesondere der experimentellen Biomedizin hat in den letzten Jahren gezeigt, dass der Vitamin-D-Rezeptor eine Reihe von wichtigen Funktionen in der Haut innehat. So ist der Vitamin-D-Rezeptor essentiell für die Haarbildung und hat eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen Ergebnisse lassen vermuten, dass es auch eine - allerdings wohl nur indirekte - Beteiligung des Vitamin-D-Rezeptors an der Reaktion der Haut auf physikalische Noxen geben könnte. Möglicherweise könnte Vitamin D auch eine Rolle spielen in der Erhaltung der Haut-Elastizität und in der Pathogenese von Dermatitiden. Es ist zu hoffen, dass eine weitere Aufklärung dieser Zusammenhänge zu wesentlichen Verbesserungen in der Therapie von Hautkrankheiten in der Human- und Tiermedizin führen wird.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) für die Entstehung UVB-induzierter Hautkarzinome und für die Entzündungsreaktion der Haut auf kurzzeitige (3 Tage) und mehrwöchige (2 – 4 Wochen) UVB-Bestrahlung zu erforschen. Im Versuch wurden Wildtyp-, heterozygote und homozygote VDR-Knockout Mäuse verwendet.

Für die Untersuchung der UV-induzierten Karzinogenese wurde 80 weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten VDR-Knockout Mäusen (n = 20 pro Gruppe) mit genetischem Hintergrund C57BL/6 einmal wöchentlich die Rückenhaut enthaart, anschließend wurden die Tiere an vier aufeinander folgenden Tagen mit wöchentlich steigenden Dosen UVB-Licht bestrahlt. Eine Gruppe der homozygoten VDR-Knockout Mäuse (n = 20) wurde mit einer speziellen Diät ernährt, die mit Kalzium, Phosphat und Laktose angereichert war (Rescue Diet), die restlichen Tiere erhielten normales Alleinfutter. Der Versuch musste nach 25 Wochen abgebrochen werden, da die Wildtyp- und heterozygoten Tiere nichtheilende Hautläsionen entwickelten. Obwohl der Versuch vorzeitig beendet werden musste, zeigte er doch deutlich, dass homozygote VDR-Mutanten eine wesentlich höhere Toleranz gegen Bestrahlung mit UVB-Licht haben als Wildtyp- und heterozygote Tiere.

Um die Entzündungsreaktion der Haut nach 3tägiger UVB-Bestrahlung zu ermitteln wurden 6 Monate, 6 Wochen und 3 Wochen alte Wildtyp-, heterozygote und homozygote VDR-Knockout Mäuse (n = 27, 13, 26 pro Versuch) enthaart und an drei aufeinander folgenden Tagen mit UVB-Licht (0,45 B-MED) bestrahlt. Nach dreitägiger Bestrahlung wurden alle Tiere getötet. Die Entzündungsreaktion der Haut und die Proliferation der Keratinozyten wurde durch Messen der Hautfaltendicke vor Versuchsbeginn und am Tag 4 und durch histomorphometrische Messung der Epidermisdicke im histologischen Schnitt ermittelt. Dabei zeigte sich, dass im Verhältnis zu Wildtyp- und heterozygoten Tieren der Zuwachs der Hautfaltendicke und der Epidermisdicke bei homozygoten Tieren im Alter von 6 Monaten und 6 Wochen, nicht aber für die Tiere im Alter von 3 Wochen siginifikant niedriger war.

Zur Untersuchung der Hautreaktion auf mehrwöchige UVB-Bestrahlung wurden 6 Monate alte und 6 Wochen alte Wildtyp-, heterozygote und homozygote VDR-Knockout Mäuse (n = 27, 15 pro Versuch) einmal pro Woche enthaart und für 2 – 4 Wochen (4 Tage pro Woche)

mit steigenden UVB-Dosen bestrahlt. Die Tiere wurden nach einer Bestrahlungsdauer von 2 Wochen (6 Monate alte Tiere) und 4 Wochen (6 Wochen alte Tiere) am Tag nach der letzten Bestrahlung getötet. Die Entzündungsreaktion der Haut und die Intensität der Keratinozytenproliferation wurde wie bereits beschrieben ermittelt. Vergleichbar mit den Ergebnissen der 3tägigen UVB-Bestrahlung war bei 6 Monate und 6 Wochen alten homozygoten VDR-Mutanten die UVB-induzierte Dickenzunahme der Hautfalte signifikant niedriger als bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass 6 Monate und 6 Wochen alte homozygote VDR-Mutanten im Vergleich zu gleichalten Wildtyp- und heterozygoten Tieren eine deutlich höhere Resistenz gegen UVB-Strahlung besitzen. Allerdings war die Entzündungsreaktion der 3 Wochen alten VDR-Knockout Mäuse vergleichbar mit der von Wildtyp-und heterozygoten Tieren. Daraus kann man schließen, dass die UVB-Resistenz dieser Tiere sehr wahrscheinlich auf präexistenten Hautveränderungen beruht. Durch eine Aufklärung der zugrunde liegenden Veränderungen ließen sich möglicherweise wertvolle Hinweise auf die zellulären Vorgänge gewinnen, die zu den UVB-induzierten Hautläsionen führen.

6 SUMMARY

The role of the vitamin D receptor for UVB-induced skin lesions in mice

It was the aim of this study to elucidate further the role of the vitamin D receptor (VDR) in UVB-induced skin carcinogenesis, and in the inflammatory skin response following short-term (3 days) and long-term (2 – 4 weeks) UVB irradiation, using wild-type, heterozygous and homozygous VDR-ablated mice.

For the study of UV-induced carcinogenesis, 80 female wild-type, heterozygous and homozygous VDR mutant mice (n = 20 each) on C57BL/6 background were weekly epilated at the back, and were treated 4 times per week with increasing doses of UVB irradiation. One group of homozygous VDR mutant mice (n = 20) was kept on a diet enriched with calcium, phosphate, and lactose (rescue diet), the other animals received normal mouse chow. This experiment had to be prematurely terminated 25 weeks after start of UVB irradiation due to severe itching in wild-type and heterozygous mice. Although the experiment could not be completed, it clearly showed that homozygous VDR mutants tolerated distinctly higher UVB doses compared with wild-type and heterozygous mice.

To examine the inflammatory skin response after a 3-day UVB exposure, 6-month-old, 6-week-old, and 3-week-old wild-type, heterozygous and homozygous VDR mutant mice (n = 27, 13, 26 to each) were epilated, and were subsequently irradiated on three consecutive days with 0,45 B-MED of UVB light. All animals were killed on the day after the last UVB irradiation. The inflammatory skin response and keratinocyte proliferation was assessed by measurement of skin fold thickness at baseline and at day 4, and by histomorphometric measurement of epidermal thickness in histological skin sections after necropsy. The results showed that relative to wild-type and heterozygous mice the increase in skin fold thickness and in epidermal thickness was significantly reduced in 6-month-old and in 6-week-old homozygous VDR mutants, but not in 3-week-old VDR mutants.

To investigate the skin response to long-term UVB exposure, 6-month-old and 6-week-old wild-type, heterozygous and homozygous VDR mutant mice (n = 27,15 to each) were weekly epilated, and were subsequently irradiated for 2 – 4 weeks (4 days per week) with increasing doses of UVB light. All animals were killed after 2 (6-month-old mice) or 4 weeks (6-week-

old mice) of UVB irradiation, on the day after the last UV irradiation. The inflammatory skin response and keratinocyte proliferation was assessed as described above. Similar to the results after 3-day UVB irradiation, the increase in skin fold thickness induced by UVB was significantly less pronounced in 6-month-old and in 6-week-old homozygous VDR mutants compared with wild-type and heterozygous mice.

Our data show that 6-month-old and 6-week-old homozygous VDR mutant mice are resistant to UVB irradiation, relative to age-matched wild-type and heterozygous mice. However, the response of 3-week-old VDR mutants to 3-day irradiation was indistinguishable from wild-type and heterozygous mice, suggesting that the resistance to UVB in 6-week-old and older homozygous VDR mutants is caused by pre-existing changes in the skin. Elucidation of the factors causing resistance of the skin to UVB in older VDR mutant mice might provide important insights into the pathogenesis of UV-induced skin lesion.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by Vitamin-D receptor ligands enhance regulators T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. J Cell Biochem 2003; 88:227-233

Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW. Cloning, structure and expression of the mitochondrial cytochrome P450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. J Biol Chem 1989; 246:8222-8229

Axen E, Harmeyer J, Wikvall K. Renal and hepatic 1alpha-hydroxylation of 25-hydroxyVitamin-D_3 in piglets suffering from pseudo Vitamin-D-deficiency rickets, type I. Biochem Biophys Acta 1998; 1407:234-42

Balsan S, Garabedian M, Larchet M et al.. Lang-term nocturnal calcium infusions can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to 1,25-dihydroxyVitamin-D. J Clin Invest 1986; 77:1661-1667

Baxter LA, DeLuca HF. Stimulation of 25-hydroxyVitamin-D_3-1-hydroxylase by phosphate depletion. J Biol Chem 1976; 251:3158:3161

Bech-Thomsen N, Poulsen T, Christensen FG, Lundgren K and Wulf HC. Near-visible-UV radiation delays UVB tumorigenesis. J Photochem Photobiol B: Biol 1994; 22:119-123

Beer S, Tieder M, Kohelet D, Liberman OA, Vure E, Bar-Joseph G, Gabizon D, Borochowitz ZU, Varon M, Modai D. Vitamin-D resistant rickets with alopecia: a form of end organ resistance to 1,25 dihydroxyVitamin-D. Clin Endocrinol 1981; 14:395-402

Bektas M, Orfanos CE, Geilen CC. Different Vitamin-D analouges induce sphingomyelin hydrolysis and apoptosis in the human keratinocyte cell line HaCaT. Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand) 2000; 46:111-19

Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyVitamin-D receptors in normal humen tissues. J Clin Endocinol Metab 1988; 67:607-613

Bielawska A, Linardic CM, Hannun YA. Modulation of cell growth and differentiation by ceramide. FEBS Lett 1992; 307:211-214

Bikle DD, Nemanic MK, Gee E, Elias P. 1,25-DihydroxyVitamin-D_3 production by human keratinocytes. J Clinic Invest 1986; 78:557-566

Bikle DD, Munson S, Christakos SC, Kumar R, Buckendahl P. Calmodulin binding to the intestinal brush-border membrane: comparison to other calcium binding proteins. Biochem Biophys Acta 1989; 1010:122-127

Bikle DD and Pillai S. Vitamin-D, calcium and epidermal differentiation. Endocrine Rev 1993; 14:3-19

Bikle DD, Halloran BP, Riviere JE. Production of 1,25-dihydroxyVitamin-D_3 by perfused pig skin. J Clin Invest 1994; 102:796-8

Bouhtiay I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG. Two Vitamin-D-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II: Effect of CaBP28k. Kidney Int 1994; 45:461-468. II: Effect of CaBP9k. Kidney Int 1994; 45:469-474

Boyen BD, Schwartz Z, Swain LD. In vitro studies on the regulation of endochondral ossification by Vitamin-D. Crit Rev Oral Biol Med 1992; 3:15-30

Braun A, Bichlmaier R, Cleve H. Molecular analysis of the gene for the human Vitamin-D-binding protein (Gc): allelic differences of the common genetic Gc types. Hum Genet 1992; 89:401-406

Bremner I. Nutritional and physiological significance of metallothionein. In: Riordan JF, Vallee BL, editors. Methods in Enzymology; Metallochemistry, Part B, Metallothionein and Related Molecules, vol. 205. San Diego; Academic Press; 1991:25-35

Brooks MH, Bell NH, Love L et al.. Vitamin-D-dependent rickets type II: resistance of target organs to 1.25-dihydroxyVitamin-D. N Engl J Med 1978; 298:996-999

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hedinger MA, Lutton J, Hebert SC. Cloning and characterisation of an extracellular Ca^{2+}-sensing receptor from bovine parathyroid. Nature 1993; 366:575-580

Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-DihydroxyVitamin-D_3 reversibly blocks the progression of elapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:7861-4

Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. J Nutr 1998; 128:68-72

Chandra S, Fullmer CS, Smith CA, Wasserman RH, Morrrison GH. Ion microscopic imagin of calcium transport in the intestinal tissue of Vitamin-D-deficient and Vitamin-D replete chicks: a ^{44}Ca stable isotope study. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:5715-5719

Clemens TL, Henderson SL, Adams JS, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesis Vitamin-D_3. Lancet 1982; 1:74-6

Cole CA, Forbes PD, Davies RE. An action spectrum for UV photocarcinogenesis. Photochem Photobiol 1986; 43:275-284

Cooke NE, Haddad JG. Vitamin-D binding protein (Gc-globulin). Endocr Rev 1989; 10:294-307

DeLuca HF, Cantorma MT. Vitamin-D: its role and uses in immunology. FASEB J 2001; 15:2579:85

Demay M. Inherited Defects of Vitamin-D Metabolism. In: Vitamin-D – Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications. Holick MF ed. Humana Press Totowa, N J 1999, pp 307-316

Dostal LA & Toverud SU. Effect of Vitamin-D3 on duodenal calcium absorption in vivo during early development. Am J Physiol 1984; 246;G528-G534

Durnam DM, Hoffman JS, Quaife CJ, Benditt EP, Chen HY, Brinster RL, Palmiter RD. Induction of mouse metallothionein-1 mRNA by bacterical endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:1052-6

Erben RG, Scutt AM, Miao DS, Kollenkirchen U, Haberey M. Short term treatment of rats with high dose 1,25 dihydroxyVitamin-D_3 stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. Endocrinology 1997; 138:4629-4635

Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Möller G, Adamski J, Balling R. Deletion of Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of the Vitamin-D Receptor Abrogates Genomic and Nongenomic Functions of Vitamin-D. Mol Endocrionol 2002; 16(7):1524-1537

Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF. Vitamin-D_3 from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. Arch Biochem Biophys 1978; 188:282-286

Feher JJ, Jullmer CS, Wasserman RH. The role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. Am J Physiol 1992; 262:517-526

Feldman D, Chen T, Hurst M, Colston K, Karasek M, Cone C. Demonstration of 1α,25$(OH)_2$-DihydroxyVitamin-D_3 receptors in human skin biopsies. J Clin Endocrinol Metab 1980; 51:1463-5

Fraser DR, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active Vitamin-D metabolite. Nature 1970; 228:764:766

Friedman PA, Gesek FA. Vitamin-D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tuble cells. Am J Physiol 1993; 265:F300-F308

Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms and regulations. Physiol Rev 1995; 75:429-471

Fu GK, Lin D, Zhang MYH et al.. Cloning of human 25-hydroxyVitamin-D-1α-hydroxylase and mutations causing Vitamin-D-dependent rickets type I. Mol Endocrinol 1997; 11:1961-1970

Geilen CC, Bektas M, Wieder T, Orfanos CR. 1α,25-DihydroxyVitamin-D_3 induces sphingomyelin hydrolysis in HaCaT cells via tumor necrosis factor α. J Biol Chem 1997; 272:8997-9001

Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, Hass E, Overbeck S, Thomesen J, Charles P, Eriksen EF. Commonly recommended daily intake of Vitamin-D is not sufficient if sunlight exposure is limited. J Intern Med 2000; 247:260:268

Gniadecki R. Stimulation versus inhibition of kerationcytes growth by 1,25-DihydroxyVitamin-D3: dependence on cell culture conditions. J Invest Dermatol 1996; 106:510-516

Grant WB. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B-radiation. Cancer 2002; 94:1867-1875

Gray RW, Omdahl JL, Ghazarian JG, DeLuca HF. 25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: subcellular location and properties. J Biol Chem 1972; 247:7528:7532

Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1α,25-hydroxyVitamin-D_3 analog enhances regulatory t-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. Diabetes 2002; 51:1367-74

Griffin M, Kumar R. Effects of 1α,25-DihydroxyVitamin-D_3 and its analogs on dendritic cell function. J Cell Biochem 2003; 88:323-326

Haddad JG. Traffic, binding and cellular access of Vitamin-D sterols. In: Bone and Mineral Research, vol.5 Peck WA, ed. New York: Elsevier, 1987; pp 281-308

Haddad JG. Clinical aspects of measurements of plasma Vitamin-D sterols and the Vitamin-D binding protein. In: Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Coe F:, Favus MJ eds. New York Raven 1992; pp 195-216

Haddad JG, Matsuoko LJ, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of Vitamin-D after its endogenos synthesis. J Clin Invest 1993; 91:2552:2555

Halloran BP & DeLuca HF. Effect of Vitamin-D deficiency on skeletal development during early growth in the rat. Arch Biochem Biophys; 209:7-14

Hanada K, Sawamura D, Hajime N, Haschimoto I. Possible role of 1,25-dihydroxyVitamin-D_3-induced metallothionein in photoprotection against UVB injury in mouse skin and cultured rat keratinocytes. J Dermatol Sci 1995; 9:203:208

Henry HL. Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyVitamin-D_3 in vivo and in primary cultures of chick kidney cells. J Biol Chem 1979; 254:2722-2729

Hess AF, Weinstock M. Antirachitic properties imparted to inert fluids and green vegetables by ultraviolet irradiation. J Biol Chem 1924; 62:301-313

Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF, Gray RW, Bayle ET, Suda T. Isolation and identification of 24,25-dihydrocycholecalciferol, a metabolite of Vitamin-D_3 made in kidney. Biochemistry 1972; 11:4251:4255

Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Anderson RR, Blank IH, Parrisch JA and Elias P. Photosynthesis of preVitamin-D_3 in human skin and the physiologic consequences. Science 1980; 210:203-205

Holick MF, Smith E, Pincus S. Skin as a site of Vitamin-D synthesis and target tissue for 1α, 25-dihydroxyVitamin-D_3. Arch Dermatol 1987; 123:1677-83

Holick MF, McCollum Award Lecture, 1994: Vitamin-D – new horizonts for the 21st century. Am J Clin Nutr 1994; 60;619-30

Holick MF. Clinical efficacy of 1,25-dihydroxyVitamin-D_3 and its analogues in the treatment of psoriasis. Retinoids 1998; 14:12-7

Holick MF. Sunlight "D"ilemma: risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. Lancet 2001; 357; 4-6

Holick MF. Vitamin-D: The underappreciated D-lightfl hormone that is important for skeletal and cellular health. Curr Opin Endocrinol Diabetes 2002; 9:87:98

Holick MF. Vitamin-D: A Millenium Perspective. J Cell Bioch 2003; 88:296-307

Holick MF. Vitamin-D: photobiology, metabolism, mechanism of action, an clinical applications. In: Favus MJ, ed. Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 5th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003:129-37

Holick FM. Vitamin-D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis. Am J Clin Nutr 2004; 79:362:71

Holtrop ME, Cox KA, Clark MB, Holick MF, Anast CS. 1.25-dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone, Endocrinology 1981; 108:2293-301

Huldschinsky K. Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. Dtsch Med Wochenschr 1919; 45:712:713

Ishizuka S. In: Metabolism of Vitamin-D_3. Tokyo: Hachioji Press Co. Ltd, 1996; pp. 367-82

Jones G, Vriezen D, Lohnes D, Palda V, Edwards NS. Side chain hydroxylation of Vitamin-D_3 and its physiological implications. Steroids 1987; 49:29:55

Jones G, Strugnell AS, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of Vitamin-D. Physiol Rev 1998; 78:1193-231

Jones G. Metabolism and Catabolism of Vitamin-D, Its Metabolites and Clinically Relevant Analogs. In: Vitamin-D Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications. Holick MF ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 57-84

Johnson JA, Kumar R. Renal and intestinal calcium transport: roles of Vitamin-D and Vitamin-D dependent calcium binding proteins. Sem Nephrol 1994; 14:119-128

Karin M. Metallothioneins. Proteins in search of function. Cell 1985; 41:9-10

Kaune R, Harmeyer J. Vitamin-D_3 metabolism in a pig strain with pseudo Vitamin-D-deficiency rickets, type I. Acta Endocrinol (Copenh.) 1987; 115:345-52

Kaune R, Munson S, Bikle DD. Regulation of Calmodulin binding to the ATP extractable 110kDa protein (myosin I) from chicken duodenal brusch-border by $1,25(OH)_2D_3$. Biochem Biophys Acta 1994; 1190:329-336

Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC. Modulation of idarubicin-induced apoptosis in human acute myeloid leukaemia blasts by all-trans retinoic acid, 1,25(OH) Vitamin-D_3, and grandolocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1997; 90:4578-87

Koizumi S, Sone T, Otaki N, Kimura M. Cd^{2+} induced synthesis of metallothionein in HeLa cells. Biochem J 1985; 227:879-86

Kong J, Li XJ, Gavin D, Jiang Y, Li YC. Targeted expression of human Vitamin-D receptor in the skin promotes the initiation of the postnatal hair follicle cycle and rescues the alopecia in Vitamin-D receptor null mice. J Invest Dermatol 2002; 118:631-638

Koster HPG, HartogA, VanOs CN, Bindels RJM. Calbindin D28k facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. Cell Calcium 1995; 18:187-196

Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV et al.,. Two hereditary defects related to Vitamin-D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. Bone Miner Res 1992; 7:1447-1453

Lee J, Youn JI. The photoprotective effect of 1,25-dihydroxyVitamin-D_3 on ultraviolet light B-induced damage in keratinocyte and its mechanism of action. J Dermatol Sci 1998; 18:11-18

Lehmann B, Querings K, Reichrath J. Neue Aspekte zur Bedeutung des Vitamin-D_3-Stoffwechsels in der Haut. Hautarzt 2004; 55:446-452

Lehmann B, Sauter W, Knuschke P, Dreßler S, Meurer M. Demonstration of UVB-induced synthesis of 1α,25-dihydroxyVitamin-D_3 (calcitriol) in human skin by microdialysis. Arch Dermatol Res 2003; 295:24-28

Lemann J. Intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphorus. In: Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 2nd ed. Favus MJ, ed. New York, Raven Press 1993; pp 46-50

Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R and Demay MB. Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:9831-9835

Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, and Demay M. Normalization of Mineral Ion Homeostasis by Dietary Means Prevents Hyperparathyroidism, Rickets, and Osteomalacis, But Not Alopecia in Vitamin-D Receptor-Ablated Mice. Endocrinology 1998; 139:4391-4396

Lian JB, Stein GS. Vitamin-D regulation of osteoblast growth and differentiation. In: Nutrition and Gene Expression. Berdanier CD, Hargrove JL, eds. Boca Raton, FL; CRC Press, 1993; pp 391-429

Liebermann MW, Beach LR, Palmiter RD. Ultraviolet radiation induced metallothionein-I gene activation is associated with extensive DNA demythelation. Cell 1983; 35:207-14

Liu L, Khastigir A, VcCauley J, Dunn ST, Morrissey JH, Christakos S, Hughes MR, Bordeau JE. RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin-D28k and Vitamin-D receptor in murine nephron. Am J Physiol 1996; 270:F677-F681

Lohnes D, Jones G. Further metabolism of 1α,25-dihydroxyVitamin-D_3 in target cells. J Nutr Sci Vitam Special Issue. 1992; 75-78

Lu Y, Chen TC, Holick MF. Influence of season and time of day on the synthesis of Vitamin-D_3. In: Bioligical Effects of Light. Holick MF, Klingman AM eds. Berlin Walter de Gruyter, 1992; pp 57-61

MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of preVitamin-D_3 and its photoisomers in human skin. Science 1982; 216:1001-1003

MacLaughlin JA, Castonguay MA, Holick MF. Cultured human keratinocytes cannot metabolize Vitamin-D_3 to 25-hydroxyVitamin-D_3. FEBS 1991; 282(2):409-11

Malloy PJ, Feldman D. Molecular Defects in the Vitamin-D Receptor Associated with Hereditary 1,25-DihydroxyVitamin-D-Resistant Ricktes. In: Vitamin-D, Physiology, Molecular Biology und Clinical Applications. Holick MF ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 317-336

Manggau M, Kim DS, Ruwisch L et al.. 1α,25-DihydroxyVitamin-D_3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosin-1-phosphate. J Invest Dermatol 2001; 117:1241-1249

Mason RS, Holliday CJ. 1,25 DihydroxyVitamin-D contributes to photoprotection in skin cells. In: Vitamin-D Endocrine System. Structural, Biological, Genetic and Clinical Aspects (Norman AE, Bouillon R, Thomasset M eds.) Riverside, CA: University of California; 2000:605-8

Mathews CHE, Brommage R, DeLuca HF. Role of Vitamin-D in neonatal skeletal development in rats. Am J Physiol 1986; 250:E725-E730

Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyVitamin-D_3. Diabetologia 1994; 37:552-8

Matsumoto K, Azuma Y, Kiyoki M et al.. Involvement of endogenously produced 1,25-hydroxyVitamin-D-3 in the growth and differentiation of human ceratinocytes. Biochim Biophys 1991; 1092:311-318

Matsuoko LY, Wortsman J, Dannenberg MJ, HollisB, Lu Z, Holick MF. Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of Vitamin-D_3. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:1099-1103

McCollum EF, Simmonds N, Kinney M, Shipley PG and Park EA. Studies on experimental rickets. XVII. The effects of diets deficient in calcium and in fat soluble A in modifying the histological structure of the bones. Am J Epidemiol 1921; 141:280-296

Mellanby T. The part played by an “accessory factor” in the production of experimental rickets. J Physiol 1918; 52:11-14

Milde P, Hauser U, Simon T, Mall G, Ernst V, Haussler MR, Frosch P, Rautenberg EW. Expression of 1,25-dihydroxyVitamin-D_3 receptors in normal and psoriatic skin. J Invest Dermatol 1991; 97:230-6

Milde P. Vitamin-D und die Haut: neue Aspekte und die Perspektiven. Hautarzt 1991; 42:671:676

Miller SC, Halloran BP, DeLuca HF, Lee WSS. Studies on the Role of Vitamin-D in early skeletal development, mineralization, and growth in rats. Calcif Tissue Int; 35:455-460

Muller-Wieprecht V, Riebeling C, Stooss A, Orfanos CE. Bcl-2 transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tumor necrosis factor alpha and 1alpha, 25-dihydroxyVitamin-D. Arch Dermatol Res 2000; 292:455-62

Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1α,25$(OH)_2$-vitaminD_3 (rapid effects) and 24R,25$(OH)_2$-vitaminD_3. Moll Cell Endocrinol 2002; 197:1-13

Ohyama Y, OzonoK, Uchida M, Shinki T, Klato S, Suda T, Yamamoto O, Noshiro M, Kato Y. Identification of Vitamin-D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyVitamin-D_3 24-hydroxylase gene. J Biol Chem 1994; 269:545-550

Okasaki T, BellRM, HannunYA. Sphingomyelin turnover induced by Vitamin-D_3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. J Biol Chem 1989; 264:19076-19080

Okuda KI, Usui E, Ohyama Y. Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in Vitamin-D metabolism. J Lipid Res 1995; 36:1641-1652

Osborne JE, Hutchinson PE. Vitamin-D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? British Journal of Dermatology 2002; 147:197:213

Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II Importance of UV-light exposure. Int J Cancer 1988; 42:319:324

Reichrath J, Schilli M, Kerber A, Bahmer FA, Czarnetzki BM, Paus R. Hair follicle expression of 1,25-dihydroxyVitamin-D3 receptors during the murine haircycle. Br. J. Dermatol. 1994; 131:477-482

Reichrath J. Protecting against adverse effects of sun protection? Jam Acad Dermatol 2003; 49:1204-1206

Rocker D, Ravid A, Liberman UA et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 potentiates the cytotoxic effect of TNF on human bresast cancer cells. Mol Cell Endocrinol 1994; 106:157-62

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; 66:399-408

Semba RD, Garrett E, Johnson BA. Vitamin-D deficiency among older women with and without disability. Am J Clin Nutr 2001; 72:1529-1534

Solvoll K, Soyland E, Sandstad B, Drevon CA. Dietrary habits among patients with atopic dermatits. Eur J Clin Nutr 2000; 54:93:97

Steenbock H, Black A. The induction of growth promoting and calcifying properties in a ration by exposure to ultraviolet light. J Biol Chem 1924; 61:408:422

Stumpf WE, Clark SA, Sar M, DeLuca HF. Topographigal and developmental studies on target sites of 1,25(OH)2 Vitamin-D3 in skin. Cell Tissue Res 1984; 238:489-496

Thornalley PJ, Vasak M. Possible role of metallothionein in protection against radiation induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim Biophys Acta 1985; 827:36-44

Tomita Y, Torinuki W, Tagami H. Stimulation of human keratinocytes by Vitamin-D3 possibly mediates skin pigmentation after sun exposure. J Invest Dermatol 1988; 90:882-884

Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin-D is not directly necessary for bone growth and mineralization. Am J Physiol 1984; 246:E493-498

Van Etten E, Decallone B, Verlinden L et al.. Analogs of 1α,25-DihydroxyVitamin-D_3 as pluripontent immunmodulators. J Cell Biochem 2003; 88:223:226

Vatieghem K, Dehaes P, Bouillon R, Segaert S. Cultures fibroblasts produce non-active Vitamin-D metabolites that can be activated by cultured keratinocytes. In: Abstracts twelfth workshop on Vitamin-D, July 6-10, 2003, Maastricht, The Netherlands, p27 (Poster Board 37)

Velluz L, Amiard G. Chimie organique – le precalciferol. Compt Rend 1949; 228:692:694

Walters MR, Kollenkirchen U, Fox J. What is Vitamin-D deficiency? Proc Soc Exp Biol Med 1992; 199:385-393

Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin-D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypothesis. J Nutr 1995; 125:S1971-1979

Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of Vitamin-D_3; exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote Vitamin-D synthesis in human skin. J Clin Endocrinol Metab 1988; 67:373-378

Windaus A, Schenck F, Weder FV. Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-Cholesterin. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 1936; 241:100-103

Wu SX, Finch J, Zhong M, Slatoposky E, Grieff M, Brown AJ. Expression of the renal 25-hydroxyVitamin-D-24-hydroxylase gene-regultion by dietary phosphate. Am J Phys 1996; 40:F203-F208

Wulf HC, Hansen AB, Bech-Thomsen N. Differences in narrow-band ultraviolet B and broad-spectrum ultraviolet photocarcinogenesis in lightly pigmented hairless mice. Photo-dermatol Photoimmunol Photomed 1994; 10:192-197

Xie Z, Komuves L, Yu QC, Elalieh H, Ng DC, Leary C, Chang S, Crumrine D, Yoshizawa T, Kato S, Bikle D. Lack of Vitamin-D Receptor is Associated with Reduced Epidermal Differ-entiation and Hair Follicle Growth. J Invest Dermatol 2002; 118:11-16

Yan CL, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB. Targeted abla-tion of the Vitamin-D receptor: An animal model of Vitamin-D-dependent rickets type II with alopecia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:9831-9835

Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S. Mice lacking the Vitamin-D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retarda-tion after weaning. Nature Genetics 1997; 16:391-396

Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF. Identification of a Vitamin-D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyVitamin-D_3) 24-hydroxylase gene. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:900-902

8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die mir während der letzten Jahre mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere möchte ich danken:

Für die Überlassung des Themas und für seine hervorragende Betreuung und außergewöhnliche Unterstützung gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben.

Dank gebührt auch allen Doktoranten und Mitarbeitern der AG Erben für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche. Insbesondere gilt mein herzlicher Dank Frau Karin Begsteiger, Frau Siglinde Lutz und Frau Claudia Bergow, für ihre stetige Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft.

Besonders herzlich danke ich meinem Freund Dierk für die intensive Betreuung während des Abgabe-Countdowns, sowie meiner Freundin Babsi für ihren Wochenendeinsatz während der Versuchsdurchführung.

9 LEBENSLAUF

Birte Kortendieck

Geburtsdatum:	13. September 1974
Geburtsort:	München
Eltern:	Klaus-Dieter Kortendieck, Bankkaufmann Gisela Kortendieck, Bankkauffrau
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
1980-1984	Besuch der Grundschule in Puchheim
1985-1993	Besuch des Gymnasiums in Puchheim Abitur im Mai 1993
1993-1995	Studium der Rechtswissenschaften an der LMU München
1993-2001	Studium der Tiermedizin an der LMU München III. Staatsexamen im Oktober 2001
November 2001	Approbation Beginn der Doktorarbeit
seit Mai 2003	tierärztliche Tätigkeit als Assistentin in einer Gemischtpraxis