

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Diedrich

**Einfluss von Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der
Vitamin D metabolisierenden Hydroxylasen in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und
der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Martin Kloß

aus Geesthacht

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Köster

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Christina Zechel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.03.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....III

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Vitamin D</i>	1
1.1.1	Vitamin D-Metabolismus und Calciumhomöostase.....	2
1.1.2	Genomische und nicht genomische Effekte des Calcitriols	4
1.1.3	Vitamin D und Krebserkrankungen.....	6
1.1.4	Molekulare Mechanismen der Calcitriolwirkung.....	7
1.1.5	Therapieoptionen maligner Erkrankungen mit Calcitriol.....	9
1.1.6	Einfluss von Calcitriol auf das Zervix- und Ovarialkarzinom	9
1.2	<i>Zielsetzung</i>	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	<i>Material</i>	13
2.1.1	Zelllinien.....	13
2.1.2	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Enzyme und Kits	14
2.1.4	Zellkulturmedien und -zusätze	14
2.1.5	Sonstige Substanzen für RNA-Isolierung, Gelelektrophorese und Polymerase-Kettenreaktion	14
2.2	<i>Methoden</i>	15
2.2.1	Zellkultur	15
2.2.2	Stimulation mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol	16
2.2.3	RNA-Isolierung	17
2.2.4	cDNA-Synthese	18
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	18
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	20
2.2.7	Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.2.8	Validierung und Auswertung der Ergebnisse der real-time PCR.....	25

3	Ergebnisse	28
3.1	<i>Nachweis der mRNA-Expression des Vitamin D-Rezeptors.....</i>	<i>28</i>
3.2	<i>Regulation der mRNA-Expression Vitamin D metabolisierender Hydroxylasen durch Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol</i>	<i>29</i>
3.2.1	HeLa-Zellen.....	29
3.2.2	OVCAR-3-Zellen	33
3.2.3	Zusammenfassende Betrachtung der Expressionsergebnisse.....	36
4	Diskussion	38
4.1	<i>Zellkultur und Expression des Vitamin D-Rezeptors.....</i>	<i>39</i>
4.2	<i>Expression der 25-Hydroxylase</i>	<i>40</i>
4.3	<i>Expression der 1α-Hydroxylase</i>	<i>41</i>
4.4	<i>Expression der 24-Hydroxylase</i>	<i>42</i>
4.5	<i>Fazit und Ausblick.....</i>	<i>44</i>
5	Zusammenfassung.....	48
6	Literaturverzeichnis.....	50
7	Danksagung	62
8	Lebenslauf.....	63
9	Publikationsliste	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
C/EBPbeta	CCAAT/enhancer-binding protein beta
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
C _t , C(T)	Schwellenwert-Zykluszahl
CYP2R1	Cytochrom P450 2R1, 25-Hydroxylase
CYP24A1	Cytochrom P450 24A1, 24-Hydroxylase
CYP27A1	Cytochrom P450 27A1, 25-Hydroxylase
CYP27B1	Cytochrom P450 27B1, 1 α -Hydroxylase
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBP	Vitamin D bindendes Protein
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor

EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
<i>et al.</i>	et alii, et aliae
FBS	fetal bovine serum
G	Guanin
G ₀ -Phase	Ruhephase
G ₁ -Phase	postmitotische Phase
G ₂ -Phase	prämitotische Phase
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
h	Stunde
HeLA	„Henrietta Lacks“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	housekeeping Gen
HPLC	high pressure liquid chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HPV	humane Papillomaviren
IGF	insuline-like growth factor
IGFBP-3	insuline-like growth factor binding protein 3
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kap.	Kapitel
LED	Licht emittierende Diode
M	Marker
MAPK	mitogen-activated protein-kinase
MARRS	membrane associated rapid response steroid binding receptor
min	Minute
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
M-Phase	Mitosephase
mRNA	messenger RNA
NK	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
OVCAR-3	ovarian carcinoma cell line 3
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p70S6k	p70S6 kinase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PK	Positivkontrolle
PP	Polypropylen
PTH	Parathormon
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkriptase
RXR	Retinoid X Rezeptor
s.	siehe
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
s. o.	siehe oben
S-Phase	Synthesephase
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF-alpha	transforming growth factor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	enzyme unit; Umdrehung
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil DNA Glycosylase
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	vitamin D responsive element
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol	Volumen
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

ZG	Zielgen
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 *Vitamin D*

Vitamin D ist das fettlösliche Prohormon des Secosteroidhormons Calcitriol. Calcitriol nimmt unter anderem eine wichtige Rolle in der Calciumhomöostase ein. Es werden unterschiedliche Substanzen unter dem Überbegriff „Vitamin D“ subsumiert, von denen für den Menschen vor allem zwei Substanzen wesentlich sind: Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol). Das Provitamin des Ergocalciferols ist Ergosterol, ein chemisch dem Cholesterin verwandtes Steroid, das sich in Pflanzen und Pilzen findet (Holick, 2004). Ergosterol kann nicht vom Menschen synthetisiert werden, sondern muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Das Provitamin des Cholecalciferols ist 7-Dehydrocholesterol, welches vom Menschen aus Cholesterol gebildet werden kann. Sowohl Ergosterol als auch 7-Dehydrocholesterol können unter UV-Bestrahlung (Ultraviolett) der Haut in die Prohormone Ergocalciferol bzw. Cholecalciferol umgewandelt werden. Die weitere Metabolisierung erfolgt analog. Die biologische Aktivität des Vitamin D₂ beträgt allerdings nur ca. ein Drittel der des Vitamin D₃ (Norman, 2008). Die Klassifikation als Vitamin, also als lebenswichtige Substanz, die mit der Nahrung zugeführt werden muss, ist historisch bedingt und unter Berücksichtigung der vollständigen endogenen Synthetisierbarkeit des Vitamin D₃ nicht korrekt. Aufgrund der Möglichkeit zur Eigensynthese und der daraus resultierenden besonderen Bedeutung des Vitamin D₃ für den Menschen beschränkt sich die vorliegende Arbeit in ihrer Betrachtung auf das Vitamin D₃, welches im Folgenden mit Vitamin D synonym verwendet werden wird.

Die Entdeckung des Vitamin D ist eng mit der Suche nach einem Mittel zur Behandlung der Rachitis vergesellschaftet. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnte von Sir Edward Mellanby gezeigt werden, dass es möglich war, Rachitis mithilfe eines fettlöslichen Nahrungsbestandteils zu kurieren und mit Lebertran adäquat zu behandeln (Mellanby und Cantag, 1919; Mellanby, 1921). Kurze Zeit später gelang es, das Vitamin D vom bekannten Vitamin A, welches ursprünglich von Mellanby als antirachitischer Nahrungsbestandteil angesehen worden war, zu differenzieren und seine Rolle für die Calciumhomöostase zu belegen (McCollum *et al.*, 1922). Zeitgleich stellte sich heraus, dass Rachitis durch Sonnenlichtexposition verhindert bzw. behandelt werden konnte (Hess,

1922). Im Folgejahr konnten Goldblatt und Soames zeigen, dass eine Bestrahlung von Ratten mit künstlichem UV-Licht dazu in der Lage war, eine Rachitisentwicklung abzuwenden oder aber eine manifeste Erkrankung zu heilen (Goldblatt und Soames, 1923). 1936 entdeckte man Vitamin D₃ als Bestrahlungsprodukt des 7-Dehydrocholesterols und es gelang erstmalig, Vitamin D₃ aus Thunfischleberöl zu isolieren (Brockmann, 1936; Windaus *et al.*, 1936).

1.1.1 Vitamin D-Metabolismus und Calciumhomöostase

Vitamin D und seine Metaboliten gehören zur Substanzklasse der Secosteroide, die durch einen aufgespaltenen B-Ring charakterisiert sind (Holick, 2004). Vitamin D ist nur in wenigen Nahrungsmitteln des Menschen wie Lebertran, Lachs, Sardine oder Makrele in signifikanten Mengen enthalten (Holick, 2004; Hollis, 2005). Ein Großteil des menschlichen Vitamin D-Bedarfs wird in gemäßigten Klimazonen durch Eigensynthese bei Sonnenlichtexposition gedeckt (Boscoe und Schymura, 2006). Dennoch ist davon auszugehen, dass in den Wintermonaten nördlich des 35. Breitengrades kaum bzw. keine endogene Vitamin D-Produktion möglich ist (Webb *et al.*, 1988; Holick *et al.*, 2007). Es existiert eine Anzahl weiterer Faktoren, welche die Vitamin D-Synthese limitieren, wie eine stärkere Pigmentierung der Haut, Sonnencremes und Kleidungsstücke (Clemens *et al.*, 1982; Matsuoka *et al.*, 1990; Matsuoka *et al.*, 1991; Matsuoka *et al.*, 1992). Außerdem sinkt mit zunehmendem Alter der 7-Dehydrocholesterol-Gehalt der Haut, so dass das Risiko, ein Vitamin D-Defizit zu entwickeln, steigt (Lawson *et al.*, 1979; MacLaughlin und Holick, 1985). 7-Dehydrocholesterol wird in relativ großer Menge in den Zellen der Dermis und Epidermis produziert. Hauptsächlich findet es sich im Stratum basale und Stratum spinosum (Holick, 1981). Unter dem Einfluss von UV-B-Strahlen mit Wellenlängen im Bereich von 280 bis 315 nm wird eine Ringöffnung des B-Ringes des 7-Dehydrocholesterols induziert, es entsteht das thermodynamisch instabile Prävitamin D. Der optimale Wellenlängenbereich zur Produktion des Prävitamin D liegt zwischen 295 und 300 nm (MacLaughlin *et al.*, 1982). Prävitamin D isomerisiert temperaturabhängig zum stabilen Vitamin D. Bei exzessiver Bestrahlung werden Prävitamin D und Vitamin D teilweise zu Lumisterol, Tachysterol, Suprasterol und Toxisterol umgewandelt, so dass keine Vitamin D-Intoxikation zu befürchten ist (Holick, 2004). Während intestinal resorbiertes Vitamin D durch Chylomikronen transportiert wird, gelangt das in der Haut synthetisierte Vitamin D hauptsächlich mittels eines speziellen Transportproteins, des

Vitamin D bindenden Proteins (DBP), und zu einem geringeren Teil an Albumin gebunden über die Blutbahn zur Leber (Haddad *et al.*, 1993). In der Leber erfolgt der erste Schritt der metabolischen Aktivierung des Vitamin D. Durch Cytochrom P450 27A1, ein mitochondriales Enzym, und Cytochrom P450 2R1, ein mikrosomales Enzym, wird Vitamin D am Kohlenstoffatom C-25 hydroxyliert (Cheng *et al.*, 2003). Für beide Enzyme wird auch der Begriff 25-Hydroxylase verwendet. Das entstandene 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) stellt aufgrund seiner hohen Affinität zum DBP den hauptsächlich im Blut zirkulierenden Vitamin D-Metaboliten dar (Jones *et al.*, 1998). Die Calcidiolkonzentration im Blut kann als Indikator des Vitamin D-Status bestimmt werden (Holick, 2004). Eine zweite Hydroxylierung durch das mitochondriale Enzym Cytochrom P450 27B1 (1α -Hydroxylase) in der Niere führt zur Bildung von $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol), welches eine deutlich höhere biologische Aktivität als Calcidiol aufweist (Holick *et al.*, 1971; Cheng *et al.*, 2003). Die mitochondriale 24-Hydroxylase (Cytochrom P450 24A1) verstoffwechselt sowohl Calcitriol als auch Calcidiol, über mehrere Intermediärprodukte entsteht als inaktives Endprodukt Calcitroinsäure, die biliär eliminiert wird (Makin *et al.*, 1989).

Die Regulation des extrazellulären Calcium- und Phosphatspiegels ist maßgeblich mit der des Vitamin D-Stoffwechsels verbunden (s. Abb. 1). Ein Absinken der Calciumkonzentration im Blut führt zu einer gesteigerten Parathormonsekretion (Brown *et al.*, 1993). Das Parathormon induziert die renale 1α -Hydroxylase, es resultiert eine gesteigerte Calcitriolsynthese. Umgekehrt führt Calcitriol im Sinne einer negativen Rückkopplung zu einer Inhibition der 1α -Hydroxylase und hemmt sowohl die PTH-Expression als auch die PTH-Sekretion (Demay *et al.*, 1992; Brenza *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Hypocalcämie, Hypophosphatämie und Calcitonin führen unabhängig vom Parathormon zu einer gesteigerten Expression der 1α -Hydroxylase (Murayama *et al.*, 1998; Bland *et al.*, 1999). Ein Regulationsmechanismus, der eine überschießende Calcitriolsynthese verhindert, besteht in der Induktion der 24-Hydroxylase durch Calcitriol (Zierold *et al.*, 1994). Somit induziert Calcitriol das Enzym, welches maßgeblich an der Degradation von Vitamin D-Metaboliten beteiligt ist. Die Aktivität und Expression der 24-Hydroxylase wird weitgehend reziprok zu der der 1α -Hydroxylase reguliert, hohe Serumphosphatspiegel steigern sie, Parathormon und Calcitonin hingegen vermindern sie (Beckman *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Zierold *et al.*, 2000).

Calcitriol führt durch seine Wirkung in unterschiedlichen Zielgeweben zu einer Erhöhung

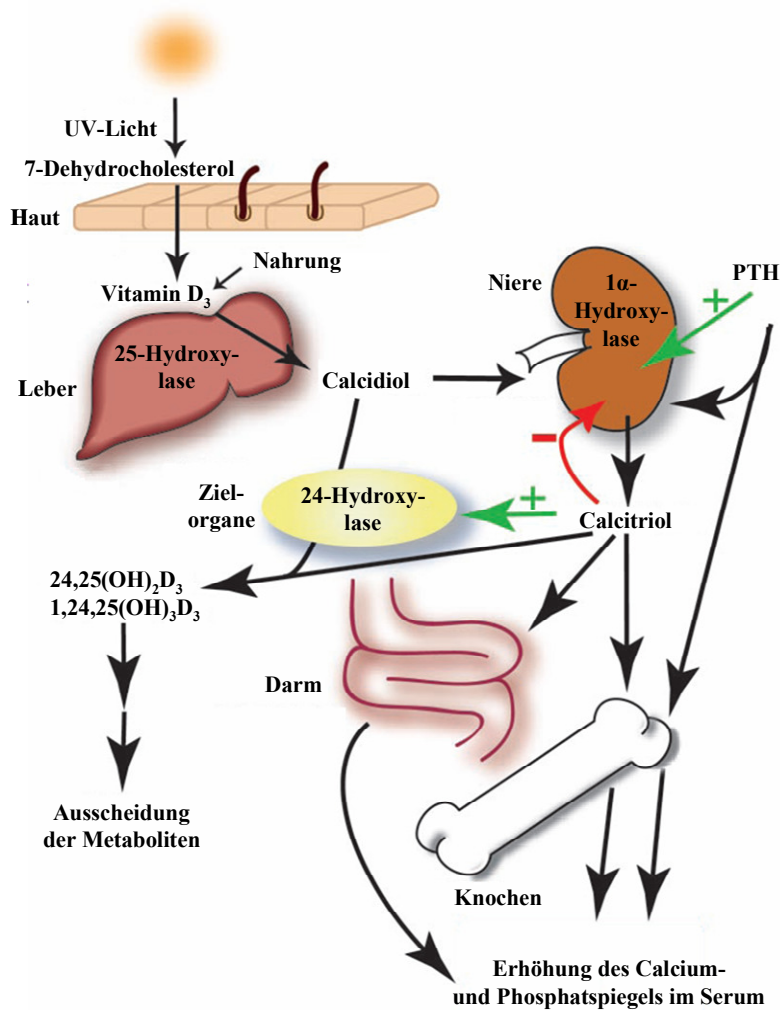


Abb. 1: Metabolismus des Vitamin D und Calciumhomöostase nach Sutton und MacDonald, 2003.

des Calcium- und Phosphatspiegels im Serum. Es fördert die enterale Calcium- und Phosphatabsorption sowie die renale Calciumreabsorption (Friedman und Gesek, 1993; Katai *et al.*, 1999; van Cromphaut *et al.*, 2001; van Abel *et al.*, 2003).

Vitamin D/Calcitriol ist von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines ausreichend mineralisierten Skelettsystems. Es wirkt modulierend auf die Osteoblasto- und Osteoklastogenese. Vitamin D-Mangel führt in der Kindheit zu Rachitis und im Erwachsenenalter zu Osteomalazie. Im Zusammenwirken mit Parathormon führt Calcitriol zu einer Calciummobilisation aus dem Knochen und somit zu einem Anstieg des Serumcalciumspiegels (Jones *et al.*, 1998; Panda *et al.*, 2004).

1.1.2 Genomische und nicht genomische Effekte des Calcitriols

Calcitriol entfaltet seine genomischen Effekte durch Interaktion mit dem spezifischen, nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR), einem intrazellulären, aus 427 Aminosäuren

bestehenden Protein (Baker *et al.*, 1988). Es handelt sich um einen ligandenaktivierbaren Transkriptionsfaktor, der an spezifische DNA-Erkennungssequenzen (vitamin D responsive elements, VDRE) im Promotorbereich von Zielgenen bindet und auf diese Art und Weise die Expression der Zielgene reguliert. Je nach Gen kann die Transkription aktiviert oder reprimiert werden. Gegenüber Calcitriol besteht eine sehr hohe Ligandenbindungsaffinität, die Affinität gegenüber anderen Vitamin D-Metaboliten, wie beispielsweise Calcidiol, wird in der Literatur als annähernd fünfhundertmal schwächer angegeben (Hughes *et al.*, 1976).

Calcitriol beeinflusst die Genexpression Vitamin D responsiver Gene bevorzugt durch ein Heterodimer, das aus dem VDR und dem Retinoid X Rezeptor (RXR) besteht. Zwar kann der VDR auch als Homodimer an VDRE binden, jedoch führt die Heterodimerisierung des VDR mit dem RXR zu einer erhöhten Affinität zu den VDRE (Thompson *et al.*, 1998). Die intrazelluläre Konzentration an Vitamin D-Rezeptoren kann sowohl durch Calcitriol (homologe Regulation) als auch durch andere hormonelle Einflüsse (heterologe Regulation) gewebe- und speziesspezifisch reguliert werden (Hirst und Feldman, 1982; Costa und Feldman, 1986; Pols *et al.*, 1988a; Pols *et al.*, 1988b). In Abwesenheit von Calcitriol befindet sich der überwiegende Anteil der Vitamin D-Rezeptoren im Zytosol (Barsony *et al.*, 1997). Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht somit die VDR-RXR-Heterodimerisierung sowie die anschließende Translokation des Heterodimers in den Zellkern mithilfe von Mikrotubuli (Barsony und McKoy, 1992; Racz und Barsony, 1999). Im Zellkern bindet das VDR-RXR-Heterodimer an VDRE in Promotorbereichen Vitamin D regulierter Gene.

Von den genomischen Effekten des Calcitriols lassen sich Calcitriol vermittelte Effekte unterscheiden, die bereits nach Sekunden bis Minuten messbar sind, die also zu früh auftreten, um durch eine Beeinflussung der Genexpression erklärbar zu sein. Zu den Soforteffekten des Calcitriols zählt beispielsweise die schnelle Calciumabsorption aus dem Darmlumen des Dünndarms (Norman *et al.*, 2002). Auch in anderen Geweben bzw. Zellkulturen konnten Effekte, die sehr wahrscheinlich durch eine Beeinflussung transmembranärer Signaltransduktionswege hervorgerufen werden, beobachtet werden. Hierzu zählen die Öffnung spannungsgesteuerter Calcium- und Chloridkanäle in Osteoblasten, die Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogen-activated protein-kinases) bzw. die Beeinflussung dieser Phosphorylierungskaskaden in Leukämiezellen, die erhöhte Insulinfreisetzung aus Betazellen des Pankreas, veränderte Aktivitäten der Phospholipase C, der Phospholipase A₂, der Proteinkinase C, des Prostaglandinstoffwechsels und der

ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) in Chondrozyten sowie die Induktion zellulärer Differenzierungsvorgänge, vermittelt durch Proteinkinase C-alpha und JNK (c-Jun N-terminal kinase) in humanen Kolonkarzinomzellen (Chen *et al.*, 1999; Boyan *et al.*, 2002; Norman *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2002).

Die Bedeutung des „klassischen“ VDR für die Aktivierung transmembranärer Signaltransduktionswege wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In Studien an Zellen von VDR-knockout Mäusen bzw. Zellen mit bekanntem VDR-Defekt konnte gezeigt werden, dass in diesen keine Soforteffekte durch Calcitriolstimulation initiiert werden können, was für eine Beteiligung des „klassischen“ VDR an der Vermittlung von Soforteffekten spricht (Barsony und Marx, 1988; Erben *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2004; Zanello und Norman, 2004). Außerdem konnte der „klassische“ VDR in Caveolae, dabei handelt sich um sack- bzw. flaschenförmige Einbuchtungen an der Oberfläche von Plasmamembranen, unterschiedlicher Zelltypen nachgewiesen werden (Huhtakangas *et al.*, 2004). Capiati *et al.* konnten zeigen, dass es in Myoblasten durch Calcitriol zu einer Translokation nukleärer Vitamin D-Rezeptoren zur Zellmembran kommt (Capiati *et al.*, 2002). Andererseits fanden andere Forschergruppen einen membranären Rezeptor für Vitamin D (1,25D(3)-MARRS, membrane associated rapid response steroid binding receptor), der zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt und andere Bindungsaffinitäten für Vitamin D-Analoga aufweist als der nukleäre VDR (Nemere *et al.*, 1998; Farach-Carson und Nemere, 2003; Nemere *et al.*, 2004; Rohe *et al.*, 2005).

1.1.3 Vitamin D und Krebserkrankungen

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass Inzidenz und Mortalität einzelner Krebserkrankungen in einem reziproken Verhältnis zur UV-Exposition durch Sonnenlicht stehen. Beispielsweise ist die Mortalität des Kolonkarzinoms im Nordosten der USA deutlich höher als im vergleichsweise sonnigeren Südwesten (Garland und Garland, 1980). Auch für das Mamma-, Prostata-, Ovarial- und Zervixkarzinom konnte ein gleichartiger Zusammenhang nachgewiesen werden (Garland *et al.*, 1990; Hanchette und Schwartz, 1992; Lefkowitz und Garland, 1994; Grant und Garland, 2006). Als ursächlich wird die in sonnigeren Regionen erhöhte endogene Vitamin D-Synthese diskutiert. Hiermit im Einklang ließ sich in unterschiedlichen Studien ein inverses Verhältnis zwischen dem Calcidiol- bzw. Calcitriolblutspiegel und der Mortalität oder dem Erkrankungsrisiko des Kolon-, Mamma und Prostatakarzinoms beobachten (Garland *et al.*, 1989; Tangrea *et al.*,

1997; Janowsky *et al.*, 1999; Ahonen *et al.*, 2000a). Allerdings konnte in anderen Studien eine derartigen Assoziation nicht bestätigt werden (Braun *et al.*, 1995; Gann *et al.*, 1996; Hiatt *et al.*, 1998). Bezüglich des Ovarial- und Zervixkarzinoms fanden Boscoe und Schymura keinen Zusammenhang zwischen UV-Exposition und Inzidenz oder Mortalität des Ovarialkarzinoms, jedoch eine positive Assoziation für das Zervixkarzinom (Boscoe und Schymura, 2006).

Parallel zu den epidemiologischen Untersuchungen konnten Vitamin D-Rezeptoren in unterschiedlichen Organen, Geweben und Zellarten nachgewiesen werden. Hierzu zählen Gehirn, Dünndarm, Kolon, Magen, Schilddrüse, Prostata, Thymus, endokrines Pankreas, Nebennierenmark, Herz, Skelettmuskulatur, Brustgewebe, Monozyten, aktivierte B- und T-Lymphozyten sowie Zervix und Ovar (Stumpf *et al.*, 1979; Bhalla *et al.*, 1983; Dokoh *et al.*, 1983; Provvedini *et al.*, 1983; Simpson *et al.*, 1985; Stumpf, 1988; Friedrich *et al.*, 1998; Reichrath *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1998; Fraga *et al.*, 2002). Zahlreiche Zellen exprimieren auch die 1α - und die 24-Hydroxylase und können somit Calcitriol synthetisieren und katabolisieren. Im Gegensatz zum in der Niere produzierten Calcitriol wirkt extrarenal gebildetes Calcitriol ausschließlich lokal in auto- oder parakriner Weise und trägt unter physiologischen Bedingungen nicht zur Regulation der Calciumhomöostase bei (Welsh *et al.*, 2003; Norman, 2008). Außerdem ist bekannt, dass auch maligne Zellen den VDR, die 1α - und die 24-Hydroxylase exprimieren. Der VDR und die Hydroxylasen konnten unter anderem in Kolon-, Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Zervixkarzinomen nachgewiesen werden (Bareis *et al.*, 2002; Friedrich *et al.*, 2003; Cross *et al.*, 2004).

1.1.4 Molekulare Mechanismen der Calcitriolwirkung

Calcitriol beeinflusst malignes Zellwachstum durch differenzierungs- und apoptoseinduzierende Effekte, es wirkt regulierend auf den Zellzyklus und inhibiert die Angiogenese und Metastasierung (van den Bemd und Chang, 2002). Die molekularen Mechanismen sind am ausführlichsten anhand des Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinoms erforscht, gelten z. T. aber auch für andere Tumorentitäten.

Calcitriol führt zu einer Hemmung des Übertritts der G₁-Phase (postmitotische Phase) in die S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus, es resultiert eine Zellzyklusarretierung in der G₀-Phase (Ruhephase). Dies geschieht unter anderem durch eine gesteigerte Expression der Cyclin-abhängigen Kinasen-Inhibitoren (cyclin-dependent kinase inhibitors) p21 und p27. Konsekutiv kommt es zu einer verringerten Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen

(cyclin-dependent kinases, CDK) und somit zum Zellzyklusstillstand (Hager *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2005). Außerdem scheinen p21 und p27 an Differenzierungsvorgängen beteiligt zu sein, die unter Calcitrioltherapie zu beobachten sind (Liu *et al.*, 1996; Muto *et al.*, 1999). Calcitriol führt zu einer Inaktivierung der p70S6 Kinase (p70S6k), die ihrerseits für den Übertritt der G₁- in die S-Phase erforderlich ist (Bettoun *et al.*, 2002). Ferner konnte in mit Calcitriol behandelten Tumorzellen eine Akkumulation eines Tumorsuppressorproteins gefunden werden, welches durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F-1 die G₁/S-Phasentransition inhibiert (Bratland *et al.*, 2000; Hager *et al.*, 2001; Gedlicka *et al.*, 2006). In unterschiedlichen Studien konnte eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 (activator protein 1) und C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein beta) im Zusammenhang mit Zelldifferenzierungsvorgängen und Zellzyklusarretierungen beobachtet werden, wobei die ERK- und JNK-Module der MAPK Signalkaskaden diese Effekte zu vermitteln scheinen (Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Ji und Studzinski, 2004; Marcinkowska *et al.*, 2006). In Tumorzellen, deren Wachstum durch die Ligandenbindung des epidermal growth factor (EGF) und/oder des transforming growth factor alpha (TGF-alpha) an den EGF-Rezeptor (EGFR) stimuliert wird, wurde eine reduzierte EGFR-Aktivierung und -Expression durch Calcitrioleinwirkung beschrieben (Koga *et al.*, 1988; Tong *et al.*, 1999; Cordero *et al.*, 2002). Außerdem wurden in Studien eine verringerte Aktivität des antiapoptotischen und mitogenen insuline-like growth factor (IGF) und eine gesteigerte Expression des apoptotisch und antiproliferativ wirksamen IGF binding protein 3 (IGFBP-3) gefunden (Huynh *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1999; Krishnan *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2004). Calcitriol steigert die Genexpression des Tumorsuppressorproteins E-Cadherin, inhibiert die Signalkaskade des Protoonkogens Beta-Catenin und wirkt somit antiproliferativ und differenzierend (Gottardi *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 2001; Larriba *et al.*, 2007). Durch eine erhöhte Aktivität der Proteasen Micro-Calpain und Caspase-12 und durch Aktivierung des „death receptor“ Fas kann Calcitriol die Induktion der Apoptose beeinflussen. Durch Inhibition von Serin- und Metalloproteasen sowie Reduktion des angiogenen Angiopoetin-2 und der VEGF (vascular endothelial growth factor) vermittelten Endothelzellproliferation wirkt es zusätzlich dem invasiven Wachstum, der Metastasierung und der Angiogenese maligner Tumoren entgegen (Mantell *et al.*, 2000; Bernardi *et al.*, 2002; Osborne und Hutchinson, 2002; Sergeev, 2004).

1.1.5 Therapieoptionen maligner Erkrankungen mit Calcitriol

Die therapeutische Wirksamkeit von Calcitriol konnte *in vitro* in unterschiedlichen Studien belegt werden (s. o.). Die Anwendbarkeit *in vivo* wird durch die calcämischen Effekte deutlich limitiert. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Analoga synthetisiert mit dem Ziel, die antikanzerogene Wirksamkeit zu erhalten und die calcämischen Effekte zu minimieren. Hierzu zählt beispielsweise EB 1089, welches *in vivo* wachstumshemmend wirkt (Lokeshwar *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005). In Zellen mit 1 α -Hydroxylaseaktivität konnte gezeigt werden, dass Calcidiol eine dem Calcitriol vergleichbare antiproliferative Wirksamkeit aufweist, jedoch weniger calcämisch als Calcitriol wirkt (Schwartz *et al.*, 1998; Barreto *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit könnte in der tumorlokalen Blockierung der 24-Hydroxylase bestehen. In Mamma- und Prostatakarzinomzellen wurde eine hohe 24-Hydroxylaseexpression nachgewiesen. Durch Calcitriolbehandlung konnte eine zusätzliche Induktion der 24-Hydroxylaseexpression beobachtet werden (Hedlund *et al.*, 1996; Diesing *et al.*, 2006). Phytoöstrogene wie Genistein und Azolderivate wie Liarozol, Ketoconazol oder VID400 erwiesen sich als effektive 24-Hydroxylaseinhibitoren, wobei die wachstumshemmende Aktivität von Calcitriol oder EB 1089 in Kombination mit einem 24-Hydroxylaseinhibitor gesteigert werden konnte (Ly *et al.*, 1999; Peehl *et al.*, 2002; Cross *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Swami *et al.*, 2005).

Ein anderer Therapieansatz besteht in der Kombination von Calcitriol mit konventionellen Tumorthérapien. Calcitriol kann die Wirksamkeit von Platinderivaten, Paclitaxel und Adriamycin verstärken (Wang *et al.*, 2000; Hershberger *et al.*, 2001). Glucocorticoide können die Calcitriolwirkung erhöhen und dessen calcämische Effekte reduzieren (Trump *et al.*, 2004). Für die Radiatio konnte in Kombination mit EB 1089 eine stärkere Tumolvolumenreduktion gezeigt werden als für die alleinige Strahlentherapie (Sundaram *et al.*, 2003).

1.1.6 Einfluss von Calcitriol auf das Zervix- und Ovarialkarzinom

Weltweit erkranken jährlich ca. 529 000 Frauen an einem Zervixkarzinom und ca. 225 000 Frauen an einem malignen Tumor der Eierstöcke. Im Gegensatz zum Ovarialkarzinom zeigen sich bezüglich des Zervixkarzinoms höhere altersstandardisierte Inzidenzen und Mortalitäten in den weniger stark entwickelten Ländern. Pro Jahr sterben

global ca. 274 000 Patientinnen an einem Zervixkarzinom und ca. 140 000 Frauen an einem Ovarialkarzinom (Ferlay *et al.*, 2010).

Seit den 1970er Jahren kann in Deutschland aufgrund des Anspruchs auf eine jährliche gynäkologische Früherkennungsuntersuchung, welche u. a. die zytologische Abstrichuntersuchung der Cervix uteri (Papanicolaou-Test) umfasst, eine rückläufige Inzidenz des Zervixkarzinoms beobachtet werden, da die präkanzerösen, dysplastischen Veränderungen des Epithels der Cervix uteri (CIN) suffizient therapiert werden können. Da als notwendige Bedingung der malignen Transformation des Zervixepithels eine persistierende Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) angesehen wird, wird für Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren seit März 2007 eine generelle Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV 16, 18) empfohlen (Hudelist *et al.*, 2004; RKI, 2007). Nichtsdestotrotz erkranken pro Jahr ca. 5 470 Frauen an einem Zervixkarzinom und es versterben ca. 1 490 Patientinnen an eben dieser Erkrankung. Bezogen auf die Häufigkeit aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland steht das Zervixkarzinom an zwölfter Stelle.

Das Ovarialkarzinom ist das fünfhäufigste Malignom der Frau in Deutschland. Unter den gynäkologischen Malignomen ist es nach dem Mammakarzinom und dem Uteruskarzinom das dritthäufigste. Jährlich treten bei ca. 9 670 Frauen Krebserkrankungen der Eierstöcke auf, die Mortalität beträgt mit annähernd 5 640 Fällen pro Jahr ca. 5,7 % (RKI und GEKID, 2010).

Die Beeinflussbarkeit des Zervix- und Ovarialkarzinoms durch Calcitriol und dessen Analoga ist weniger erforscht als die des Kolon-, Mamma- oder Prostatakarzinoms. Folgendes ist über den Zusammenhang zwischen Vitamin D und diesen Tumorentitäten bekannt:

Vitamin D-Rezeptoren, die 25-Hydroxylase, die 1 α -Hydroxylase und die 24-Hydroxylase werden auf RNA-Ebene in malignem Ovarialgewebe stärker exprimiert als in gesundem (Friedrich *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2009c). Calcitriol hemmt die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen durch Zellzyklusarretierung an den G₁/S- und G₂ (prämitotische Phase)/M (Mitosephase)-Kontrollpunkten. Die G₁-Phasenarretierung wird durch eine erhöhte p27-Stabilität bedingt (Li *et al.*, 2004). Außerdem induziert Calcitriol das nukleäre Protein GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha), welches eine Aktivitätsabnahme der CDK1 und somit eine Arretierung des Zellzyklus in der G₂-Phase bewirkt (Jiang *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte kürzlich durch Behandlung mit Vitamin D eine verringerte Expression des apoptosehemmenden Proteins Survivin und

eine Reexpression des prostate-derived Ets factor, eines Transkriptionsfaktors, der mit einer günstigeren Prognose des Ovarialkarzinoms zu korrelieren scheint, gefunden werden (Ghadersohi *et al.*, 2008). Calcitriol kann durch eine Inhibition der Telomeraseaktivität zu einer Apoptoseinduktion in Ovarialkarzinomzellen führen (Jiang *et al.*, 2004). In einem Mausmodell konnte die antiproliferative und apoptoseinduzierende Wirkung von EB 1089 belegt werden, welches im Gegensatz zu Calcitriol nicht zu Hypercalcämien führte (Zhang *et al.*, 2005).

Für das Zervixkarzinom ist die Studienlage begrenzter als für das Ovarialkarzinom. Es ist bekannt, dass Zervixkarzinomzellen in ihrem Wachstum durch Calcitriol beeinflussbar sind (Kholodova *et al.*, 1997). Der VDR, die 25-, 1 α - und 24-Hydroxylase wurden in malignem Zervixgewebe nachgewiesen. Die Expression des Rezeptors und der Enzyme ist stärker ausgeprägt als in vergleichbarem gesundem Gewebe (Reichrath *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2003).

1.2 Zielsetzung

Calcitriol ist als potentiell Therapeutikum maligner Tumoren einzustufen. Seine antikanzerogenen Eigenschaften wurden an Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten in zahlreichen Studien belegt. Der VDR und die drei Vitamin D metabolisierenden Enzyme 25-Hydroxylase, 1α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase konnten in malignen Tumoren der Zervix und des Ovars nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die Transkription der 25-, 1α - und 24-Hydroxylase in Ovarial- und Zervixkarzinomzellen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde(n):

- in den Karzinomzelllinien HeLa und OVCAR-3 die mRNA-Expression des Vitamin D-Rezeptors in der Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen.
- die Zelllinien HeLa und OVCAR-3 mit Vitamin D und seinen Metaboliten Calcidiol und Calcitriol über unterschiedliche Zeiträume inkubiert.
- von den inkubierten Zellen die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.
- in der real-time quantitativen Polymerase-Kettenreaktion die mRNA-Expression der Gene für die 25-, die 1α - und die 24-Hydroxylase nach der Inkubation mit Vitamin D und seinen Metaboliten analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
HeLa	ATCC/LGC Standards, Wesel
OVCAR-3	

2.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Bright-Line Hemacytometer	Sigma-Aldrich, Seelze
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Glasmaterial	Schott, Mainz
Sanyo CO ₂ Incubator	Sanyo Electric, Japan
Lichtmikroskop: Wilovert A	Hund, Wetzlar
Mikrotiterplatten: 96 well Multiply PCR plate with skirt	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrowelle: Sharp R-210A	Sharp, Hamburg
Photometer: Helios Gamma	Unicam, USA
Pipetten: Research und Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen (PP)-Röhrchen (steril)	Greiner, Frickenhausen
Präzisionsküvette	Hellma, Müllheim
Präzisionswaage SBA/SBC	Scaltec, Göttingen
Real-time PCR-Gerät: Opticon 2	MJ Research, USA
Spannungsgeber: Typ Power Pac 300	Bio-Rad, München
Stabpipetten (steril, graduiert)	Greiner, Frickenhausen
Thermocycler : PTC-200	MJ Research, USA
Vortex: Genie 7	Scientific Industries, USA
Wasserbad: Isotemp 202	Thermo Fisher Scientific, USA
Zellkulturflaschen: T75 (cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (94 mm)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugen: Hettich Universal 32 R Sigma2K15	Hettich, Tuttlingen Sigma-Aldrich, Seelze

2.1.3 Enzyme und Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
M-MLV reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	
RNaseOUT™ (40 U/μl)	
Taq DNA Polymerase (5 000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
1α,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol)	Sigma-Aldrich, Seelze
10x Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca & Mg (DPBS)	PAA Laboratories, Cölbe
Fetal bovine serum (FBS): Typ Mycoplex	
25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol)	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin from bovine pancreas	
RPMI-1640 + 10 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin	ATCC/LGC Standards, Wesel
RPMI-1640 + 25 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Seelze
Vitamin D ₃ (Cholecalciferol)	

2.1.5 Sonstige Substanzen für RNA-Isolierung, Gelelektrophorese und Polymerase-Kettenreaktion

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) (0,1 %)	Serva, Heidelberg
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Mix (10 mM)	
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	
1x Gel Loading Dye, Blue	New England Biolabs, Frankfurt am Main
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt
Random Primer (3 μg/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol® Reagenz	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden an der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 durchgeführt.

HeLa-Zellen wurden im Jahr 1951 aus einem Adenokarzinom der Cervix uteri einer einunddreißigjährigen afroamerikanischen Patientin („Henrietta Lacks“) isoliert und kultiviert. Sie sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente aneuploide Zelllinie etabliert werden konnte (Jones *et al.*, 1971). OVCAR-3-Zellen (ovarian carcinoma cell line 3) wurden aus malignem Aszites einer sechzigjährigen kaukasischen Patientin mit fortgeschrittenem Adenokarzinom des Ovars etabliert und 1983 erstmalig beschrieben (Hamilton *et al.*, 1983).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellkulturschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre aus Luft mit 5 % CO₂-Anteil. Zur Anzucht wurden 75 cm²-Zellkulturflaschen verwendet. Die HeLa-Zellen wurden in 15 ml RPMI-1640 Medium mit 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin und 10 % FBS angezüchtet (s. Abb. 2). Die OVCAR-3-Zellen wurden in 15 ml RPMI-1640 Medium mit 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 20 % FBS und 0,01 mg/ml Insulin kultiviert (s. Abb. 3). Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer Klasse-II-Sicherheitsarbeitsbank für steriles Arbeiten durchgeführt. Zur Bearbeitung der Zellen kamen ausschließlich sterile Materialien zur Anwendung. In Abhängigkeit von der erreichten Zelldichte und dem daraus resultierenden Mediumverbrauch wurde alle 2-3 d ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 15 ml frischem Nährmedium versehen. Bei ca. 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen entweder subkultiviert oder für einen Stimulationsversuch ausgesät. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden zum Ablösen der Zellen 5 ml Accutase hinzugefügt und die Zellen bis zu 10 min im Brutschrank inkubiert, bis die vollständige Ablösung der Zellen vom Flaschenboden im Lichtmikroskop beobachtet werden konnte. Die abgelöste Zellsuspension wurde mit 10 ml Medium in ein 50 ml (PP)-Röhrchen überführt, bei 1 600 U/min für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

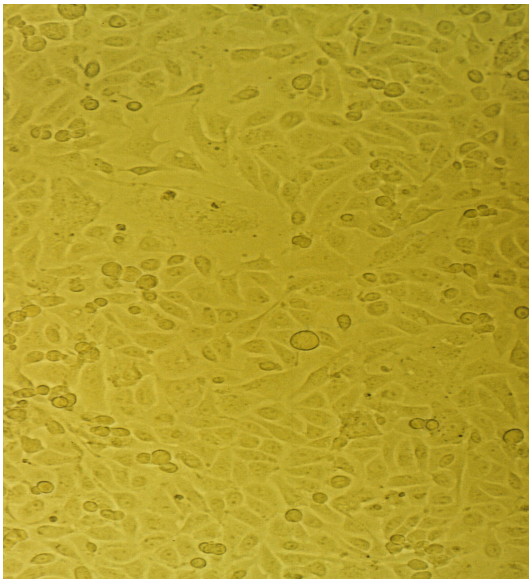


Abb. 2: HeLa-Zellen.
Vergrößerung: 400-fach.

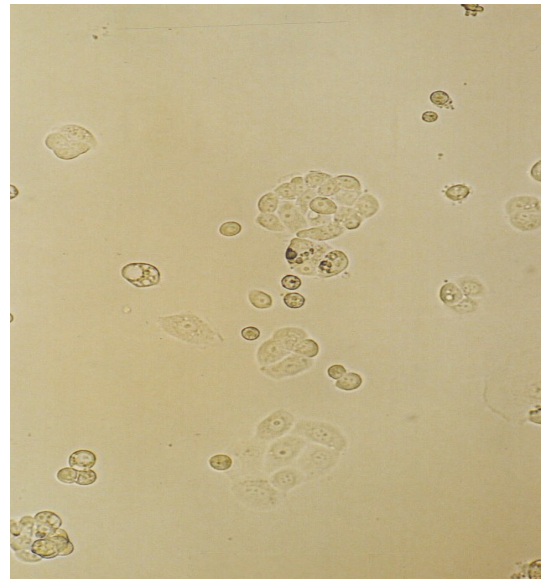


Abb. 3: OVCAR-3-Zellen.
Vergrößerung: 400-fach.

Zur Subkultivierung wurden zunächst neue Zellkulturflaschen mit jeweils 15 ml frischem Nährmedium befüllt und bei 37 °C begast. Anschließend wurde die Zellsuspension anteilig auf die Zellkulturflaschen verteilt. Die Aussaat der Zellen zur Stimulation erfolgte pro Stimulationszeitraum in sieben Zellkulturschalen mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in 6 ml Medium pro Zellkulturschale.

2.2.2 Stimulation mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol

Die Zellen wurden mit Vitamin D, Calcidiol oder Calcitriol in den Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-7} M stimuliert. Alle Substanzen wurden als Stammlösung in einer Konzentration von 10^{-3} M in 100 % Ethanol gelöst. Als Kontrollgruppe wurde jeweils ein Ansatz mit Alkohol mitgeführt, dessen Ethanolkonzentration derjenigen in den 10^{-7} M Behandlungsgruppen entsprach. Für jeden Stimulationsversuch wurden pro Zelllinie sieben Zellkulturschalen benötigt, die zu ca. 80 % konfluent bewachsen waren. Die Stimulationszeiträume betrugen 24, 48, 72 oder 96 h. Für jeden Zeitraum wurden insgesamt drei Stimulationsversuche durchgeführt.

Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Dann wurden in 6 ml Medium die jeweiligen Konzentrationen der Substanzen auf die Zellen gegeben. Nach 24, 48, 72 oder 96 h wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen.

2.2.3 RNA-Isolierung

Die RNA wurde nach dem Prinzip der Guanidinthiozyanat-Phenol-Chloroform Extraktion mit TRIzol[®] Reagenz isoliert. Diese Methode ermöglicht eine hohe Ausbeute an RNA und eignet sich zur RNA-Isolierung aus kleinsten Mengen biologischen Materials (Chomczynski und Sacchi, 1987). TRIzol[®] Reagenz ist eine monophasische Lösung, die sich aus Guanidinisothiozyanat und Phenol zusammensetzt. Das enthaltene Guanidinisothiozyanat ist ein chaotropes Salz, welches sehr effektiv die Zellen lysiert, Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation erfolgt eine Phasentrennung in eine obere wässrige Phase, eine Interphase und eine untere organische Phase. Die RNA verbleibt in der wässrigen Phase, DNA und Proteine befinden sich in der Interphase und der organischen Phase (Chomczynski, 1993; Chomczynski und Sacchi, 2006).

Jede Kultur wurde mit 1 ml TRIzol[®] Reagenz unter Bewegung der Schale lysiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur, um eine komplette Dissoziation der Nukleoproteine zu erlangen. Das Zelllysat wurde in ein autoklaviertes 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 0,2 ml Chloroform versetzt und 20 s von Hand stark geschüttelt. Nach erneuter Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß zur Phasentrennung bei 12 000 U/min und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein neues autoklaviertes 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, zur Fällung der RNA mit 0,5 ml 100 % Isopropylalkohol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde abermals bei 12 000 U/min und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 7 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die RNA wurde nun getrocknet, in 30 µl 0,1 % DEPC-Wasser gelöst und 10 min im Wasserbad bei 60 °C inkubiert.

Zur photometrischen Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA wurde eine 1: 50 Verdünnung mit DEPC-Wasser hergestellt. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm, als Leerwert diente 0,1 % DEPC-Wasser. Die Konzentration der RNA wurde mit der Formel berechnet:

$$1 \times \text{OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ µg/ml RNA}$$

Der Quotient aus $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ ist ein Maß für die Reinheit der isolierten RNA. Proben mit einer unzureichenden Reinheit ($< 1,5$) wurden verworfen. Abschließend wurde die gewonnene RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.4 cDNA-Synthese

Um cDNA zu schreiben, wurden 2 µg der RNA in die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) eingebracht. Als Enzym wurde die rekombinante M-MLV reverse Transkriptase (Moloney murine leukemia virus), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus *E. coli* eingesetzt (Kotewicz *et al.*, 1985). Die gewonnene cDNA diente als Template für die Polymerase-Kettenreaktion und die real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion. 2 µg RNA wurden mit dem entsprechenden Vol HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht und in ein PCR-Gefäß pipettiert. Nach der Zugabe von 250 ng Random-Primer (3 µg/µl) pro PCR-Gefäß wurden die Proben gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 65 °C für 5 min im Thermocycler inkubiert, um eine Aufschmelzung der Sekundärstruktur der RNA zu erreichen. Daraufhin wurden die Proben auf Eis abgekühlt, um die Primer hybridisieren zu lassen. Während dieser Zeit wurde pro Ansatz ein RT-Mix von 8 µl wie folgt erstellt:

<i>Substanz</i>	<i>Volumen</i>
5x First Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
40 U/µl RNaseOUT™	1 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>8 µl</i>

Pro Probe wurden jetzt 8 µl des RT-Mix hinzupipettiert, nach vorsichtigem Mischen wurde außerdem noch jeweils 1 µl M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugefügt. Eine Negativkontrolle erfolgte unter Verwendung von HPLC-Wasser anstelle der reversen Transkriptase.

Die Ansätze wurden nun 50 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurden die Proben anschließend 15 min auf 70 °C erhitzt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde von Kary B. Mullis entwickelt und Mitte der achtziger Jahre erstmalig veröffentlicht (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1992). Heutzutage

stellt sie die mit am häufigsten verwendete Standardmethode der Molekularbiologie dar (Schutzbank und Stern, 1993; Erlich, 1999). Durch mehrfache Wiederholung von Reaktionszyklen, bestehend aus den drei Teilschritten Denaturierung, Annealing und Elongation, bietet die PCR die Möglichkeit zur exponentiellen Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments *in vitro*.

Die Amplifikation einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges wird eingeleitet durch eine Temperaturerhöhung auf 90-95 °C, durch die die DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge getrennt werden, was als Denaturierung bezeichnet wird. Anschließend wird die Temperatur soweit gesenkt, dass es zur spezifischen Hybridisierung der im Reaktionsansatz vorhandenen Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge kommt. Dieser Vorgang wird Annealing genannt und führt aufgrund der Primer zu einer sequenzspezifischen Amplifikation, da nur der durch die Primer begrenzte Bereich der DNA, der als Matrize fungiert, amplifiziert wird. Danach wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Dabei handelt es sich um das Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq-Polymerasen, die nun die jeweils komplementären Stränge synthetisieren. Man spricht von der Elongation. Am Ende des letzten Zyklus schließt sich die finale Elongation an, während der die DNA-Polymerasen unvollständig replizierte DNA-Moleküle komplettieren sollen.

Jeder Reaktionsansatz enthält neben DNA, Primern und DNA-Polymerasen auch Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) als Substrat der Polymerasen sowie Puffer, die einen für die Funktion der Polymerasen optimalen pH-Wert gewährleisten. Von essentieller Bedeutung ist außerdem die Konzentration an freien Magnesiumionen, welche von den DNA-Polymerasen als Kofaktoren für ihre Funktion benötigt werden.

Für die PCR zum Nachweis des Vitamin D-Rezeptors wurde folgendes spezifische Primerpaar konstruiert und von der Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert:

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz 5'→ 3'
VDR	forward	CCA GTT CGT GTG AAT GAT GG
	reverse	GTC GTC CAT GGT GAA GGA

Pro Ansatz wurde ein Master Mix nach folgendem Schema erstellt:

<i>Substanz</i>	<i>Volumen</i>
10x ThermoPol Buffer	5 µl
4 µM VDR Primerpaar (forward/reverse)	5 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
5 000 U/ml Taq DNA Polymerase	0,2 µl
HPLC-Wasser	37,8 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>49 µl</i>

Für jeden PCR-Reaktionsansatz wurden die einzelnen Komponenten des Master Mix zunächst auf Eis zu einem 49 µl Gesamtansatz pipettiert. Anschließend wurde pro Ansatz 1 µl cDNA hinzugefügt. Im Reaktionsansatz des Leerwertes wurde ein äquivalentes Volumen HPLC-Wasser anstelle der cDNA eingesetzt. Folgendes Thermocyclerprogramm wurde benutzt:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Denaturierung	95,0 °C	1 min	1
Denaturierung	94,0 °C	30 s	40
Annealing	60,0 °C	30 s	
Elongation	72,0 °C	30 s	
Finale Elongation	72,0 °C	10 min	1
Kühlung	4,0 °C	∞	

Nach Beendigung des Thermocyclerprogramms wurde das PCR-Produkt bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren, um DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose. Sie dient als Matrix, in der die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Phosphatgruppen zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Molekülgröße, der

Agarosekonzentration und der angelegten Gleichspannung. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid können die DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert unspezifisch in die DNA der Proben, durch seine fluoreszierenden Eigenschaften werden die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar. Um die Größe eines PCR-Produktes zu bestimmen, werden die Banden der Proben mit den Banden eines DNA-Größenstandards verglichen.

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE Puffer (90 mM TRIS, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH= 8,3) in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 60 °C wurden 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei in einen mit Kämmen versehenen Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Kämmen entfernt, der Gelträger wurde in eine Pufferkammer eingesetzt und mit 1x TBE Puffer überschichtet. 25 µl eines PCR-Produktes wurden mit je 5 µl 1x Ladepuffer (Gel Loading Dye, Blue) vermischt, anschließend wurden die Taschen des Gels mit den cDNA-Proben beladen. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde 60 min eine Spannung von 100 V angelegt. Anhand der 100-Basenpaar-DNA-Leiter konnte die Größe der PCR-Produkte beurteilt werden. Die einzelnen Banden wurden unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera fotografiert.

2.2.7 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Um den Einfluss der Vitamin D-Metaboliten auf die mRNA-Expression der 25-Hydroxylase, der 1 α -Hydroxylase und der 24-Hydroxylase in Tumorzellen zu untersuchen, wurde eine real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR) mit der hergestellten cDNA durchgeführt.

Die real-time PCR basiert auf dem Prinzip einer konventionellen PCR (s. Kap. 2.2.5) und bietet zusätzlich die Möglichkeit einer zuverlässigen Quantifizierung. Zwar ist es möglich, aus einer konventionellen PCR-Reaktion die anfängliche Menge eines Templates durch eine Endpunktanalyse zu errechnen, allerdings bleibt dabei unberücksichtigt, dass mit fortschreitender Dauer die PCR unter suboptimalen Reaktionsbedingungen abläuft. Die Menge an verfügbaren Nukleotiden sinkt, Produktfragmente hybridisieren und die Aktivität der Polymerasen nimmt ab. Eine zuverlässige Aussage lässt sich schwer treffen, da die PCR aus den genannten Gründen nicht durchweg exponentiell verläuft. Bei der real-time PCR erfolgt die Quantifizierung mithilfe von Fluoreszenzsignalen, die während der

exponentiellen Phase der Amplifikation nach jedem Zyklus der PCR bestimmt werden (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Prinzipiell stehen unterschiedliche Detektionssysteme für die PCR-Produkte zur Verfügung. Zum einen finden Fluoreszenzfarbstoffe Verwendung, zum anderen spezifische Sonden. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Durch eine Lichtquelle in Form eines Lasers, einer UV-Lampe oder einer Licht emittierenden Diode (LED) wird der Fluoreszenzfarbstoff mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlt im Anschluss die aufgenommene Energie als Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Das emittierte Licht wird von einem Fluoreszenzdetektionssystem erfasst. SYBR Green I besitzt im Komplex mit DNA eine Anregungsschwelle von 497 nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm. SYBR Green I interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA und ermöglicht eine sensitive Detektion (Morrison *et al.*, 1998). In Anwesenheit von einzelsträngiger DNA ist die Intensität der Fluoreszenzemission äußerst gering. Erst durch die Interkalation in doppelsträngige DNA wird die Intensität der Fluoreszenz derart erhöht, dass sie messbar wird. Die Messung wird nach jedem Syntheseschritt durchgeführt. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge der PCR-Produkte (Kubista *et al.*, 2006). Schließlich wird eine Aussage über die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge eines spezifischen DNA-Abschnitts ermöglicht. Die real-time PCR stellt gegenwärtig die sensitivste Methode zur Quantifizierung von mRNA dar (Bustin, 2002; Nolan *et al.*, 2006). Die Quantifizierung der Expression der 25-, 1 α - und 24-Hydroxylase basiert auf der Zyklus-Schwellenwert-Methode (Higuchi *et al.*, 1993). Die Berechnungen erfolgten anhand der Schwellenwert-Zykluszahl, dem threshold cycle oder C_t-Wert. Bei dem C_t-Wert einer Probe handelt es sich um denjenigen Zyklus einer real-time PCR, bei dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert übersteigt (Gibson *et al.*, 1996). Der C_t-Wert liegt in der exponentiellen Phase der PCR. Ein hoher C_t-Wert spricht für eine geringe Templateausgangsmenge, ist der C_t-Wert niedrig, so ist die Templateausgangsmenge hoch (Heid *et al.*, 1996). Parallel zu den Proben wurde bei jeder real-time PCR als Standard eine Verdünnungsreihe von cDNA-Proben der zu untersuchenden Enzyme mit bekannten Konzentrationen amplifiziert (50-5 x 10⁶ Moleküle/2 μ l). Anhand der Verdünnungsreihe konnte eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Molekülzahl gegen den C_t-Wert erstellt werden. Mithilfe der Standardkurve konnte für jede Probe der Logarithmus der Molekülzahl über den C_t-Wert bestimmt werden und folglich die Ausgangsmenge an cDNA-Molekülen.

Diese Menge entspricht der eingesetzten mRNA-Menge bei vollständig abgelaufener RT-Reaktion.

Neben den zu untersuchenden Hydroxylasen wurde für jede Bedingung außerdem ein housekeeping Gen (konstitutiv exprimiertes Gen) als interner Standard amplifiziert. Um Variationen der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen, wurde mithilfe des housekeeping Gens eine Normalisierung durchgeführt.

Housekeeping Gene gehören zu einer großen Gruppe von Genen, die für die Aufrechterhaltung grundlegender Zellfunktionen verantwortlich sind und konstant exprimiert werden. Sie kodieren beispielsweise für Anteile des Zytoskeletts (β -Aktin) oder Enzyme der Glykolyse (GAPDH). Als housekeeping Gen wurde in dieser Arbeit die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) gewählt, die eine Rolle im Nukleotidstoffwechsel spielt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde HPLC-Wasser anstelle der cDNA verwendet.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde jeweils durch eine Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats bestätigt. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung wurde der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen. Währenddessen wurde die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen. Da die unterschiedlichen PCR-Produkte aufgrund ihrer Länge und Sequenz spezifische Schmelzpunkte aufweisen, konnten sie anhand der Schmelzkurve differenziert werden (Ririe, *et al.*, 1997).

Die spezifische Primerpaare für die cDNA-Abschnitte der Enzyme 25-, 1 α - und 24-Hydroxylase sowie des housekeeping Gens HPRT wurden konstruiert und abermals von der Firma Metabion synthetisiert:

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz 5'→3'
25-Hydroxylase	forward	GGC AAG TAC CCA GTA CGG
	reverse	AGC AAA TAG CTT CCA AGG
1α-Hydroxylase	forward	TGT TTG CAT TTG CTC AGA
	reverse	CCG GGA GAG CTC ATA CAG
24-Hydroxylase	forward	GCA GCC TAG TGC AGA TTT
	reverse	ATT CAC CCA GAA CTG TTG
HPRT	forward	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT
	reverse	CCA GCA GGT CAG CAA AGA ATT TA

Für jeden Ansatz wurde folgender Master Mix hergestellt:

<i>Substanz</i>	<i>Volumen</i>
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	12,5 µl
4 µM Primerpaar (forward/reverse)	2,5 µl
HPLC-Wasser	8 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>23 µl</i>

Zunächst wurden in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte 2 µl cDNA, 2 µl HPLC-Wasser für den Blankwert oder 2 µl des Standards vorgelegt. Anschließend wurden pro well 23 µl des Master Mix hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie luftdicht verschlossen. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 1 000 U/min, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Die real-time PCR wurde daraufhin unter Verwendung der OpticonMonitor™ Analysis Software, Version 2.02, der Firma MJ Research durchgeführt.

Für die Amplifikation der 25-Hydroxylase, 1 α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase wurde folgendes real-time PCR-Programm verwendet:

Schritt:

1. 2 min Aktivierung der Polymerase bei 50,0 °C
2. 2 min Aufschmelzen der cDNA bei 95,0 °C
3. 15 s Aufschmelzen der cDNA bei 95,0 °C
4. 15 s Annealing bei 57,3 °C
5. 15 s Polymerisierung bei 72,0 °C
6. Messung der Amplifikate
44 Zyklen der Schritte 3-6
7. Schmelzkurve von 65-95 °C, Messung in Schritten von 0,3 °C → Ende

Für die Amplifikation der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) wurde ein leicht verändertes real-time PCR-Programm verwendet:

Schritt:

4. 15 s Annealing bei 60,0 °C
39 Zyklen der Schritte 3-6

2.2.8 Validierung und Auswertung der Ergebnisse der real-time PCR

Um auf die Anzahl der mRNA-Moleküle der 25-, 1 α - und 24-Hydroxylase und des housekeeping Gens HPRT in den untersuchten Proben schließen zu können, wurden in jeder real-time PCR Standardproben bekannter Ausgangskonzentration in einer 1:10 Verdünnungsreihe amplifiziert ($50-5 \times 10^6$ Moleküle/2 μ l). In Abb. 4 ist dargestellt, nach

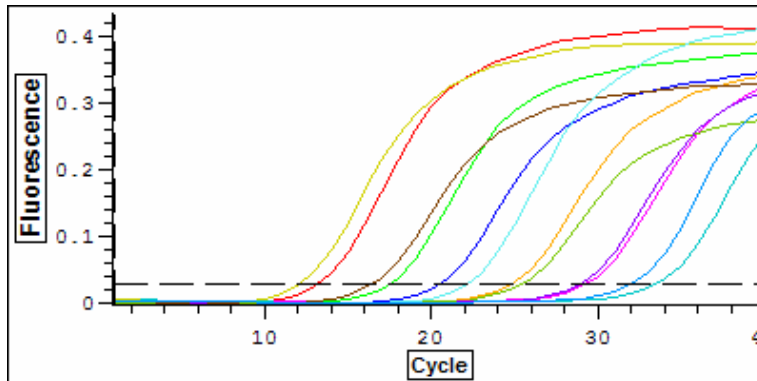


Abb. 4: Amplifikationsprofil der HPRT-cDNA-Standardproben.

wie vielen Zyklen das Fluoreszenzsignal der einzelnen HPRT-cDNA-Standardproben den manuell festgelegten Schwellenwert (threshold) von 0,03 erreichte. Mithilfe dieser C_t -Werte wurde eine HPRT-cDNA-Standardkurve, die sich in Form einer linearen Gleichung ($y = m \cdot x + b$) darstellen lässt, erstellt (s. Abb. 5). Hierbei ist eine idealtheoretische Verdoppelung der Amplifikate von Zyklus zu Zyklus durch eine Steigung von $m = -0,30$ gekennzeichnet. Der r-Quadrat-Wert (r^2 , r-square) gibt an, wie nahe die einzelnen

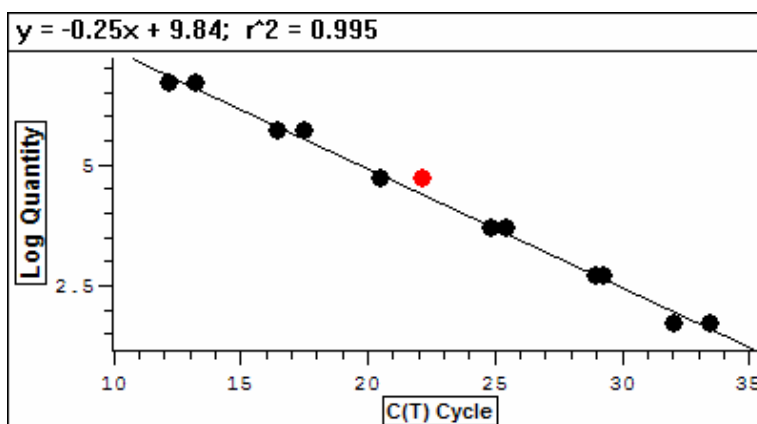


Abb. 5: HPRT-cDNA-Standardkurve.

Datenpunkte des Standards an der von der Software errechneten Regressionsgerade liegen und ist somit ein Maß der Genauigkeit, mit der diese die Datenpunkte abbildet. Er kann Werte zwischen 0 (0 %) und 1 (100 %) annehmen.

Aus den C_t -Werten der untersuchten Proben konnten anhand der Standardkurven die Molekülzahlen ermittelt werden, die theoretisch in der cDNA des Ausgangsmaterials vorhanden waren. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung in der real-time PCR gemessen. Die Molekülzahlen wurden gemittelt und mit den Molekülzahlen für das housekeeping Gen HPRT normalisiert. Hierzu wurde für jede Probe der Quotient aus gemittelter Molekülanzahl des Zielgens und gemittelter Molekülanzahl des housekeeping Gens berechnet (Ratio (ZG/HG)). Aus drei unabhängigen Versuchen wurden die normalisierten Werte der Proben jeweils ins Verhältnis zum Gesamtmittelwert der Kontrollen, der als 100 %-Wert diente, gesetzt. Aus den so errechneten Expressionsveränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (n-fache Expression) wurden die arithmetischen Mittelwerte (mean) gebildet, welche im Folgenden mit den entsprechenden mittleren Fehlern des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben sind (mean $\pm$ SEM).

Um die Spezifität der Amplifikate zu zeigen, wurde für jede Probe eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die Proben kontinuierlich erhitzt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Infolge des Schmelzens der DNA in Einzelstränge nimmt die Fluoreszenzintensität ab, da das SYBR Green vermehrt von der DNA dissoziiert. Die spezifische Schmelztemperatur einer Nukleinsäure lässt sich in der Funktion $-dI/dT$ als stärkste Veränderung der Fluoreszenzintensität (dI) in Relation zur Temperaturänderung (dT) darstellen. Für jedes Primerpaar konnte die Spezifität der Amplifikate in der Schmelzkurvenanalyse bestätigt werden, wie z. B. für HPRT in Abb. 6.

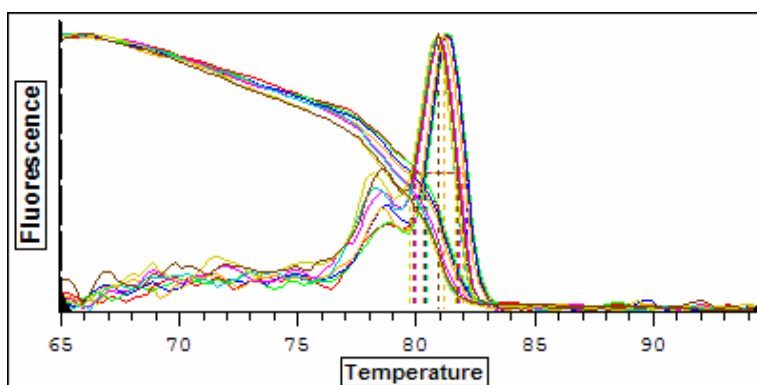


Abb. 6: Schmelzkurve der HPRT-cDNA-Standardproben.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden bezüglich ihrer statistischen Aussagekraft beurteilt. Hierzu wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni Post-hoc Test durchgeführt. Die beiden untersuchten Faktoren waren hierbei einerseits die Behandlung und andererseits die Zeit. Konnte die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) verworfen werden, so wurde der jeweilige Unterschied als statistisch signifikant angesehen.

Die Datenanalyse wurde mit der OpticonMonitor™ Analysis Software, Version 2.02 (MJ Research, USA), Microsoft Excel (Microsoft Technologies, USA) und der GraphPad Prism 4 Software (GraphPad Software, USA) durchgeführt. Die GraphPad Prism 4 Software wurde zur statistischen Auswertung und Erstellung sämtlicher Graphen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 *Nachweis der mRNA-Expression des Vitamin D-Rezeptors*

Voraussetzung für ein Ansprechen der zu untersuchenden Zellen auf Vitamin D und dessen Metaboliten ist der Nachweis des VDR in diesen Zellen. Zu diesem Zweck wurde die RNA aus unbehandelten HeLa- und OVCAR-3-Zellen isoliert und mittels RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend als Template in der PCR verwendet. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung in beiden Zelllinien eine spezifische Bande für den VDR mit einer Länge von 383 bp detektiert werden. Des Weiteren wurden zu Vergleichszwecken eine Positivkontrolle (MCF-7-Zellen) sowie zwei Negativkontrollen (NK1: PCR mit HPLC-Wasser anstelle von cDNA; NK2: cDNA-Synthese ohne M-MLV Reverse Transkriptase) mitgeführt.

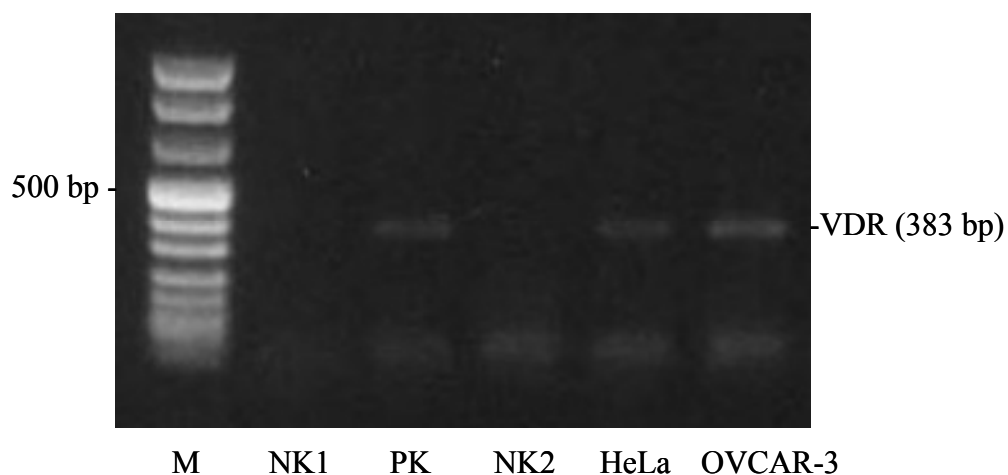


Abb. 7: Agarosegel (1,5 %) der PCR-Produkte mit den Primern für den VDR. cDNA der isolierten RNA aus HeLa-, OVCAR-3- und MCF-7-Zellen. M: 100 bp Marker; NK1 und NK2: Negativkontrollen 1 und 2 (NK1: PCR mit HPLC-Wasser anstelle von cDNA; NK2: cDNA-Synthese ohne M-MLV Reverse Transkriptase); PK: Positivkontrolle (MCF-7); VDR: Vitamin D-Rezeptor.

3.2 *Regulation der mRNA-Expression Vitamin D metabolisierender Hydroxylasen durch Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol*

3.2.1 HeLa-Zellen

In HeLa-Zellen wurde die mRNA-Expression der 25-Hydroxylase zu allen Zeitpunkten durch keine der Behandlungen signifikant beeinflusst. Nach 24 h führte die Inkubation mit 10^{-9} M Calcitriol zu einer tendenziellen Expressionssteigerung auf ca. das Doppelte ($2,10 \pm 0,99$ vs. $1,0 \pm 0,32$). Es fand sich eine annähernde Expressionsvervierfachung unter der

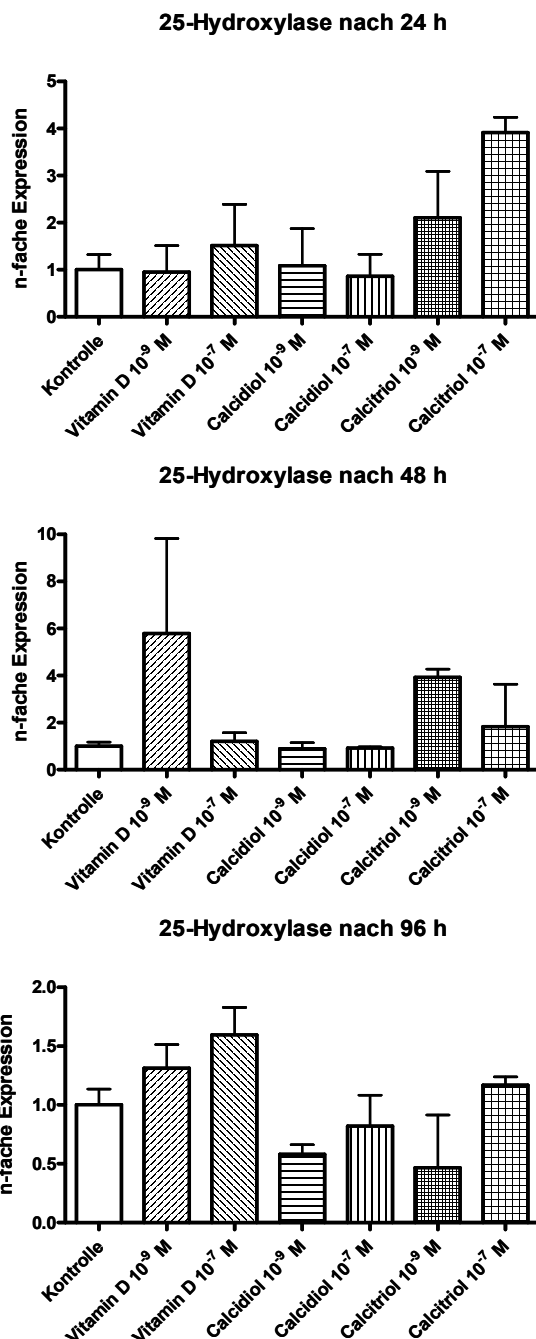


Abb. 8: Einfluss der Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der 25-Hydroxylase in HeLa-Zellen nach 24, 48 und 96 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an.

Behandlung mit 10^{-7} M Calcitriol ($3,91 \pm 0,32$ vs. $1,0 \pm 0,32$) (s. Abb. 8). Nach 48 h führte die niedrigere Konzentration von 10^{-9} M zu einer ungefähren Vervierfachung der Expression ($3,93 \pm 0,35$ vs. $1,0 \pm 0,18$) und die höhere Konzentration von 10^{-7} M zu einer annähernd verdoppelten Expression ($1,83 \pm 1,81$ vs. $1,0 \pm 0,18$) (s. Abb. 8). Nach 72 h Calcitriolbehandlung zeigte sich ein der Kontrollgruppe vergleichbares Expressionsniveau (nicht abgebildet). Nach 96 h ließ sich unter der Behandlung mit Calcitriol 10^{-9} M eine um ca. 53 % reduzierte Expression ($0,47 \pm 0,45$ vs. $1,0 \pm 0,13$) beobachten (s. Abb. 8).

Außerdem fand sich nach 48 h eine ca. sechsfach erhöhte Expression ($5,78 \pm 4,03$ vs. $1,0 \pm 0,18$) der 25-Hydroxylase unter der Behandlung mit 10^{-9} M Vitamin D (s. Abb. 8). Nach 72 h zeigte sich bei gleicher Behandlung kein Unterschied zur Kontrollgruppe (nicht abgebildet), während sich nach 96 h Inkubation mit Vitamin D erneut eine tendenziell erhöhte Expression beobachten ließ (s. Abb. 8).

Auch die mRNA-Expression der 1α -Hydroxylase wurde nach allen Inkubationsintervallen durch keine Behandlung signifikant verändert. Nach allen vier Inkubationszeiträumen konnte unter der Behandlung mit Calcitriol ein Trend zur Expressionsreduktion beobachtet

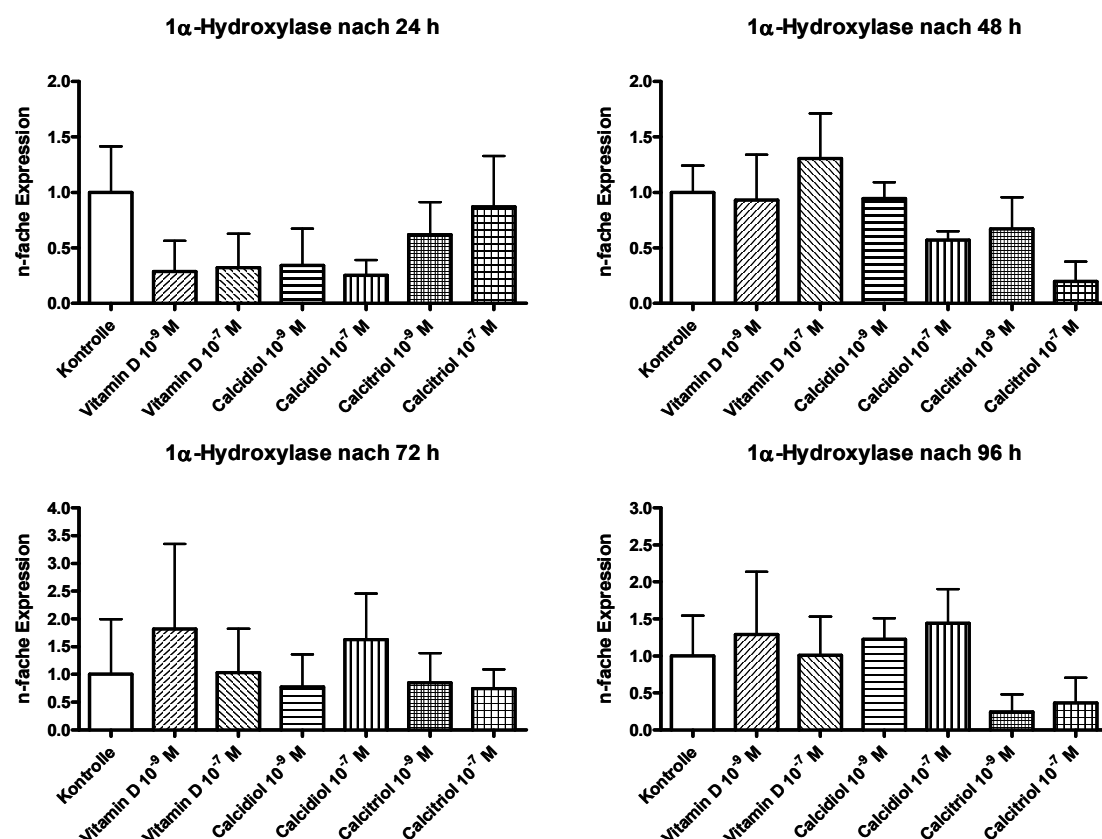


Abb. 9: Einfluss der Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der 1α -Hydroxylase in HeLa-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an.

werden (s. Abb. 9). Nach 48 h führte die Inkubation mit 10^{-7} M Calcitriol zu einer Expressionsreduktion um ca. 80 % ($0,20 \pm 0,18$ vs. $1,0 \pm 0,24$) gegenüber der Kontrollgruppe, während unter der Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol eine ca. 33-prozentige Reduktion ($0,67 \pm 0,29$ vs. $1,0 \pm 0,24$) registriert werden konnte (s. Abb. 9). Nach 96 h Inkubation fand sich unter der Behandlung mit Calcitriol 10^{-9} M eine Abnahme der Expression um annähernd 76 % ($0,24 \pm 0,24$ vs. $1,0 \pm 0,55$). Die Behandlung mit Calcitriol 10^{-7} M führte nach 96 h zu einer Expressionsreduktion um ca. 64 % ($0,36 \pm 0,35$ vs. $1,0 \pm 0,55$) (s. Abb. 9).

Die Behandlung mit Calcitriol 10^{-7} M führte nach 24 h zu einer signifikanten Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase um annähernd den Faktor 13 ($12,54 \pm 0,21$ vs. $1,0 \pm 0,50$; $p < 0,001$) (s. Abb. 10). Auch nach 48 und 72 h ließen sich bei gleicher Behandlung signifikante Zunahmen der Expression beobachten. So zeigte sich nach 48 h unter der Behandlung mit 10^{-7} M Calcitriol eine ca. zehnfach gesteigerte Expression ($10,23 \pm 2,57$ vs. $1,0 \pm 0,38$; $p < 0,001$), nach 72 h war die Expression ca. 13-fach ($12,76 \pm 5,22$

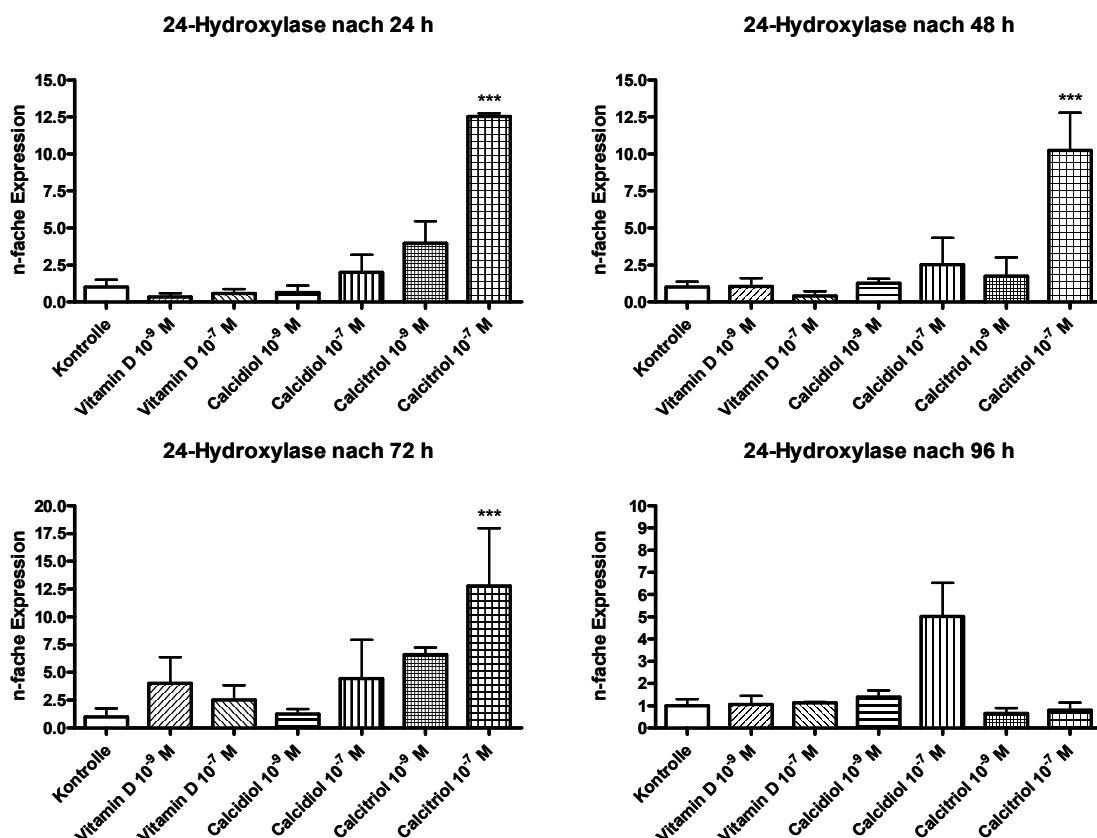


Abb. 10: Einfluss der Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der 24-Hydroxylase in HeLa-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

vs. $1,0 \pm 0,76$; $p < 0,001$) erhöht (s. Abb. 10). Nach 96 h lag die Expression der 24-Hydroxylase in der Behandlungsgruppe Calcitriol 10^{-7} M ungefähr auf dem Niveau der Kontrollgruppe (s. Abb. 10).

Die Behandlungen mit 10^{-7} M Calcitriol über 24, 48 und 72 h führten im Vergleich zu der Behandlung über 96 h zu signifikant höheren Induktionen der 24-Hydroxylase (s. Abb. 11). Auch unter der Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol ließ sich nach 24, 48 und 72 h ein Trend zur Expressionssteigerung ausfindig machen (s. Abb. 10). Allerdings kam es im Vergleich zur höher konzentrierten Behandlung nach keinem der Inkubationszeiträume zu einem signifikanten Expressionsunterschied gegenüber der Kontrollgruppe.

Vergleich der Expressionsveränderungen der mit Calcitriol 10^{-7} M behandelten Proben nach 24, 48, 72 und 96 h

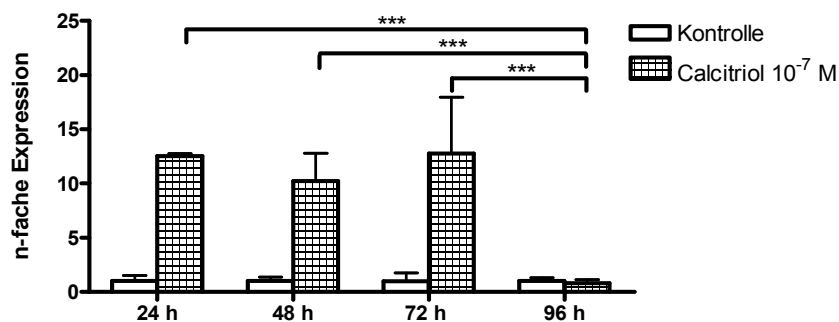


Abb. 11: Vergleich der Expressionsveränderungen der 24-Hydroxylase in der Behandlungsgruppe Calcitriol 10^{-7} M in HeLa-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an; *** $p < 0,001$ vs. Calcitriol 10^{-7} M nach 96 h.

Nach einem Zeitraum von 96 h zeigte sich eine annähernde Expressionsverfünffachung ($5,01 \pm 1,52$ vs. $1,0 \pm 0,30$) durch die Inkubation mit 10^{-7} M Calcidiol (s. Abb. 10). Ebenso nach 24, 48 und 72 h wurde die 24-Hydroxylase durch 10^{-7} M Calcidiol tendenziell höher exprimiert als in den entsprechenden Kontrollgruppen (s. Abb. 10). Eine statistische Signifikanz war jedoch nach keinem der Inkubationsintervalle nachzuweisen.

In Abbildung 12 sind die Expressionen der 25-Hydroxylase, der 1α -Hydroxylase und der 24-Hydroxylase in den Kontrollgruppen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Nach allen vier Inkubationszeiträumen wurde die 24-Hydroxylase deutlich höher exprimiert als die 25- oder die 1α -Hydroxylase.

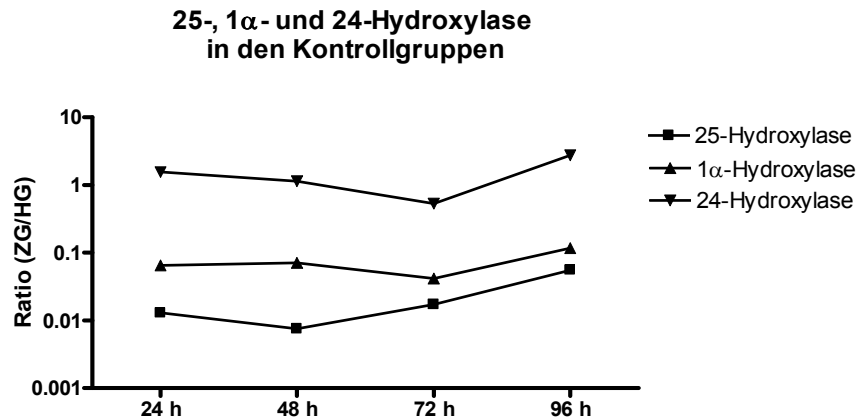


Abb. 12: Vergleich der mRNA-Expression der 25-, der 1 α - und der 24-Hydroxylase in den Kontrollgruppen in HeLa-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte Ratio ist das Verhältnis der ermittelten Molekülmengen der mRNA vom Zielgen (ZG) 25-Hydroxylase, 1 α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase zum housekeeping Gen (HG) HPRT. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an.

3.2.2 OVCAR-3-Zellen

In OVCAR-3 Zellen führte keine der Behandlungen nach den untersuchten Inkubationszeiträumen zu einer signifikanten Veränderung der mRNA-Expression der 25-Hydroxylase. Nach 24 h fand sich unter der Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol eine um ca. 79 % erniedrigte Expression ($0,21 \pm 0,08$ vs. $1,0 \pm 0,09$), unter der Behandlung mit 10^{-7} M Calcitriol zeigte sich eine um ca. 71 % verringerte Expression ($0,29 \pm 0,22$ vs. $1,0 \pm 0,09$) gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 13). Nach 48 h unterschied sich die Expression der 25-Hydroxylase bei gleicher Behandlung lediglich geringfügig von der der Kontrollgruppe (nicht abgebildet). Nach 72-stündiger Behandlung mit Calcitriol zeigte sich eine

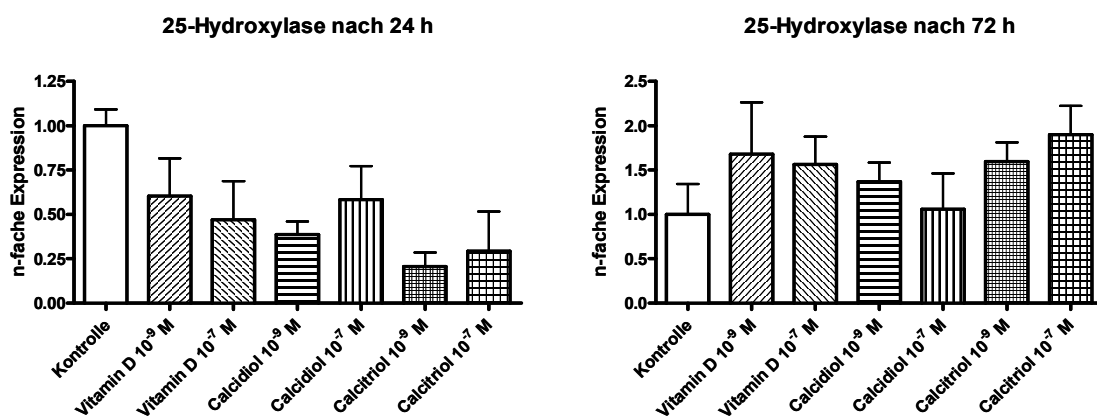


Abb. 13: Einfluss der Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der 25-Hydroxylase in OVCAR-3-Zellen nach 24 und 72 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an.

tendenziell erhöhte Expression der 25-Hydroxylase (s. Abb. 13). So führte die Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol zu einer Expressionssteigerung um ca. 60 % ($1,60 \pm 0,21$ vs. $1,0 \pm 0,34$) und die mit 10^{-7} M Calcitriol zu einer Expressionszunahme um ca. 90 % ($1,90 \pm 0,33$ vs. $1,0 \pm 0,34$). Zum selben Zeitpunkt führten auch die Behandlungen mit Vitamin D 10^{-9} M ($1,68 \pm 0,58$ vs. $1,0 \pm 0,34$) und 10^{-7} M ($1,56 \pm 0,31$ vs. $1,0 \pm 0,34$) zu Expressionssteigerungen, während sich nach 24 h eine tendenziell erniedrigte Expression der 25-Hydroxylase unter der Behandlung mit Vitamin D feststellen ließ (s. Abb. 13).

Nach allen Inkubationsintervallen wurde die 1α -Hydroxylase durch keine der Behandlungen signifikant in ihrer mRNA-Expression beeinflusst. Nach einem Zeitraum von 24 h fand sich eine Tendenz zur Expressionsabnahme durch die Behandlung mit Calcitriol. Es ließ sich eine um ca. 77 % reduzierte Expression ($0,23 \pm 0,08$ vs. $1,0 \pm 0,38$) in der Behandlungsgruppe Calcitriol 10^{-9} M feststellen (s. Abb. 14). Nach einem Inkubationszeitraum von 48 h führte die Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol zu einer Expressionsabnahme ($0,73 \pm 0,45$ vs. $1,0 \pm 0,43$), die mit Calcitriol 10^{-7} M zu einer

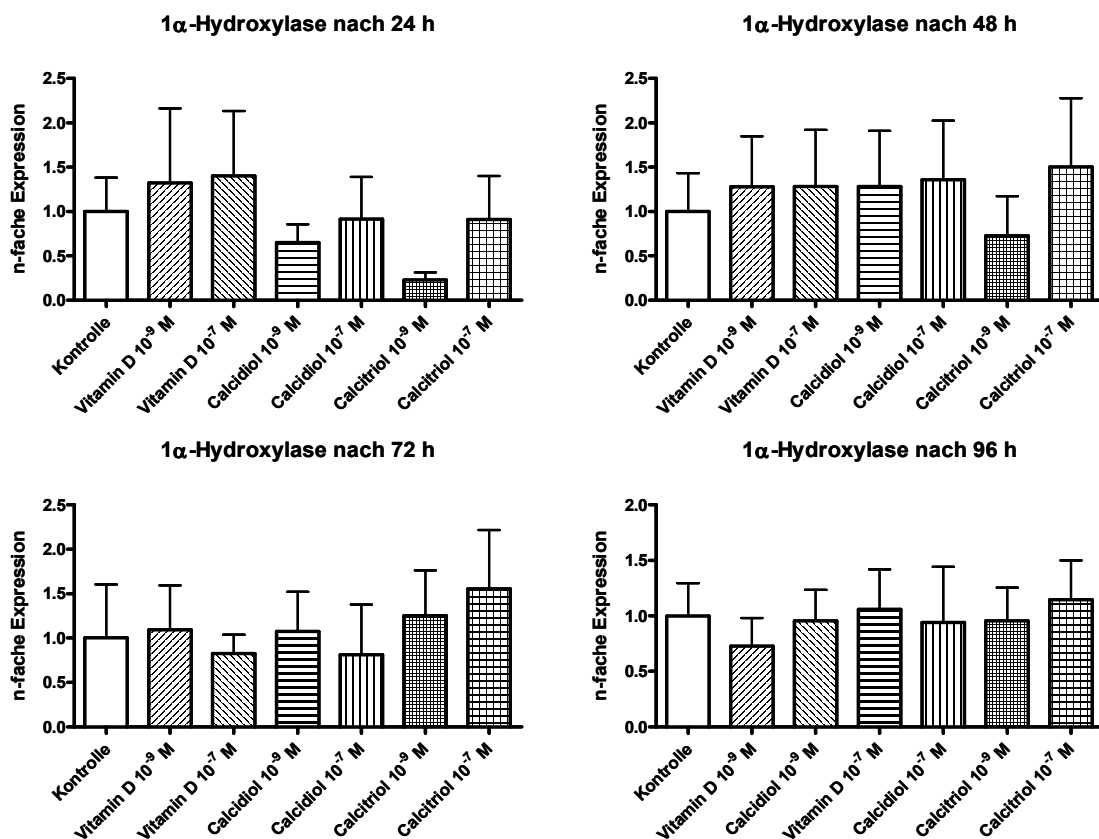


Abb. 14: Einfluss der Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der 1α -Hydroxylase in OVCAR-3-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an.

Steigerung der Expression um annähernd 50 % ($1,50 \pm 0,77$ vs. $1,0 \pm 0,43$) (s. Abb. 14). Nach 72 h ließ sich sowohl durch die Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol ($1,25 \pm 0,51$ vs. $1,0 \pm 0,60$) als auch durch die mit 10^{-7} M Calcitriol ($1,56 \pm 0,66$ vs. $1,0 \pm 0,60$) eine erhöhte Expression der 1α -Hydroxylase im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten (s. Abb. 14). Nach 96 h unterschied sich die Expression der 1α -Hydroxylase nach Inkubation mit Calcitriol nur äußerst gering von der der Kontrollgruppe (s. Abb. 14).

Die 24-Hydroxylase wurde nach 24-stündiger Inkubation mit 10^{-7} M Calcitriol ca. 176-fach ($176,40 \pm 73,18$ vs. $1,0 \pm 0,69$) höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 15). Dieses Ergebnis war bei einer festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch signifikant ($p < 0,05$). Ebenso ließ sich nach 48-stündiger Inkubation mit 10^{-7} M Calcitriol eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression um ungefähr den Faktor 341 ($340,70 \pm 217,80$ vs. $1,0 \pm 0,68$; $p < 0,001$) beobachten (s. Abb. 15). Nach 72 und 96 h zeigte sich erneut eine Induktion der 24-Hydroxylase durch Calcitriol 10^{-7} M. Nach 72 h war die Expression ca. 68-fach ($67,91 \pm 1,27$ vs. $1,0 \pm 0,64$), nach 96 h ungefähr 131-fach

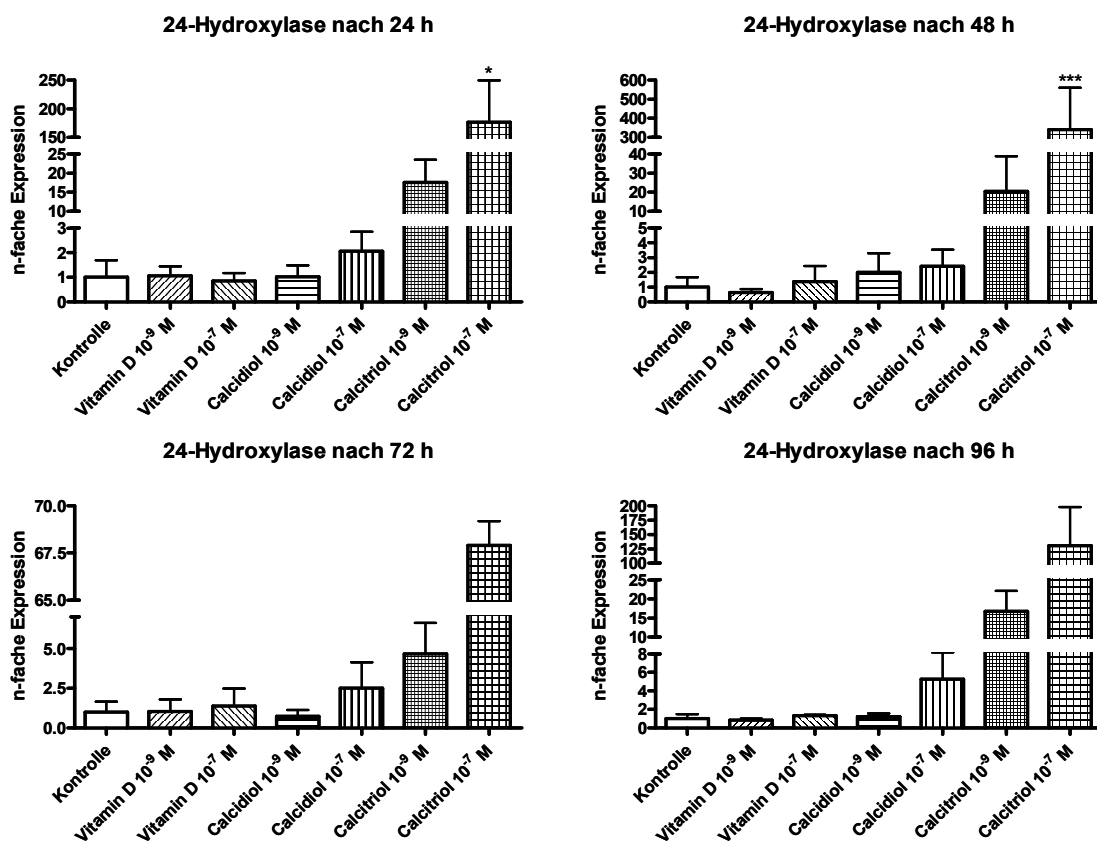


Abb. 15: Einfluss der Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol auf die mRNA-Expression der 24-Hydroxylase in OVCAR-3-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte n-fache Expression ist die Expressionsveränderung einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

($130,50 \pm 67,14$ vs. $1,0 \pm 0,51$) erhöht (s. Abb. 15). Beide Expressionssteigerungen waren allerdings statistisch nicht signifikant. Auch die Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol führte nach 24, 48, 72 und 96 h zu einer gesteigerten Expression der 24-Hydroxylase, die sich je nach Inkubationszeit zwischen einer ungefähren Verfünffachung der Expression ($4,67 \pm 1,95$ vs. $1,0 \pm 0,65$) nach 72 h und einer ca. 20-fach erhöhten Expression ($20,47 \pm 18,32$ vs. $1,0 \pm 0,68$) nach 48 h befand (s. Abb. 15). Eine statistische Signifikanz war jedoch nach keinem dieser Inkubationszeiträume nachzuweisen. Unter der Behandlung mit 10^{-7} M Calcidiol ließ sich ebenfalls nach allen vier Inkubationsintervallen ein Trend zur Steigerung der mRNA-Expression der 24-Hydroxylase erkennen, der allerdings auf einem Signifikanzniveau von 5 % statistisch nicht gesichert werden konnte (s. Abb. 15).

Abbildung 16 stellt die Expressionen der 25-, der 1α - und der 24-Hydroxylase in den Kontrollgruppen im zeitlichen Verlauf dar. Die 25-Hydroxylase wurde stets höher als die 1α - und die 24-Hydroxylase exprimiert.

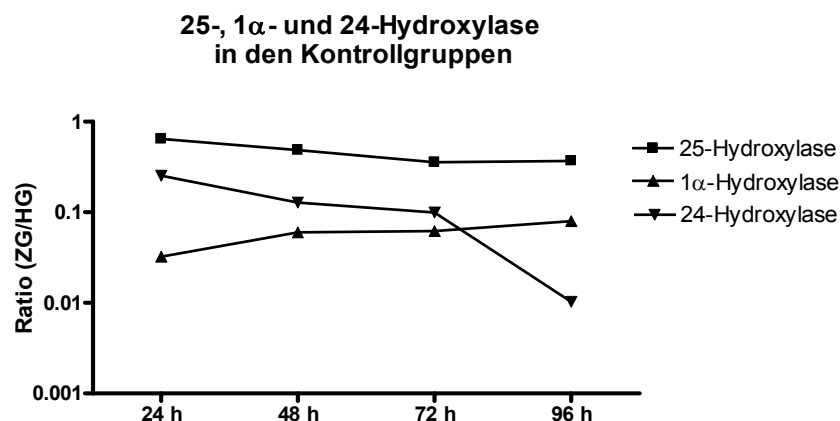


Abb. 16: Vergleich der mRNA-Expression der 25-, der 1α - und der 24-Hydroxylase in den Kontrollgruppen in OVCAR-3-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. Die angezeigte Ratio ist das Verhältnis der ermittelten Molekülmengen der mRNA vom Zielgen (ZG) 25-Hydroxylase, 1α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase zum housekeeping Gen (HG) HPRT. Die Werte zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Versuchsreihen an.

3.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der Expressionsergebnisse

Sowohl in den HeLa- als auch in den OVCAR-3-Zellen konnte weder die Expression der 25-Hydroxylase noch die Expression der 1α -Hydroxylase durch die Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol oder Calcitriol signifikant beeinflusst werden. In beiden Zelllinien zeigte sich durch die Behandlung mit Calcitriol in einer Konzentration von 10^{-7} M nach 24 und 48 h eine signifikante Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase gegenüber der

jeweiligen Kontrollgruppe. In HeLa-Zellen führte die genannte Behandlung zusätzlich nach 72 h zu einer signifikanten Expressionssteigerung.

Während in den HeLa-Zellen die 24-Hydroxylase in den Kontrollen nach allen vier Inkubationszeiträumen höher exprimiert wurde als die 25- oder die 1 α -Hydroxylase, fanden sich in den Kontrollgruppen der OVCAR-3-Zellen durchweg höhere Expressionswerte der 25-Hydroxylase. Jedoch war die Differenz der Grundexpressionen der drei Hydroxylasen in den OVCAR-3-Zellen deutlich geringer ausgeprägt als in den HeLa-Zellen.

4 Diskussion

Calcitriol ist der aktive Metabolit des Vitamin D. In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass Calcitriol nicht nur an der Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels beteiligt ist, sondern zusätzliche biologische Funktionen erfüllt. Zu diesen Funktionen zählen die Beeinflussung der Zellproliferation und –differenzierung unterschiedlicher Gewebe (Feldman *et al.*, 1995). Diese genomischen Effekte des Calcitriols werden über den spezifischen VDR vermittelt. Neben Darm, Knochen, Nebenschilddrüse und Niere, den „klassischen“ Zielorganen des Calcitriols, wird der VDR in diversen weiteren Organen, Geweben und Zellen, die nicht an der Regulation der Calciumhomöostase beteiligt sind, exprimiert. Hierzu zählen beispielsweise Gehirn, Dünndarm, Kolon, Magen, Schilddrüse, Prostata, Thymus, endokrines Pankreas, Herz, Brustgewebe sowie auch Zervix und Ovar (Stumpf *et al.*, 1979; Dokoh *et al.*, 1983; Stumpf, 1988; Feldman *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1998; Reichrath *et al.*, 1998; Fraga *et al.*, 2002). Zahlreiche Zellen exprimieren auch die 1α - und die 24-Hydroxylase und können somit Calcitriol synthetisieren und katabolisieren. Im Gegensatz zum in der Niere produzierten Calcitriol wirkt extrarenal gebildetes Calcitriol ausschließlich lokal in auto- oder parakriner Weise und trägt unter physiologischen Bedingungen nicht zur Regulation der Calciumhomöostase bei (Welsh *et al.*, 2003; Norman, 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass nicht nur benigne Zellen den VDR, die 1α - und die 24-Hydroxylase exprimieren, sondern auch maligne. Der VDR und die Hydroxylasen konnten unter anderem in Kolon-, Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Zervixkarzinomen nachgewiesen werden (Bareis *et al.*, 2002; Friedrich *et al.*, 2003; Cross *et al.*, 2004). Calcitriol hat auf maligne Zellen eine antiproliferative sowie apoptose- und differenzierungsinduzierende Wirkung. Es inhibiert die tumorbedingte Angiogenese und senkt die Metastasierungsrate (van den Bemd und Chang, 2002). Die antikanzerogene Anwendbarkeit des Calcitriols *in vivo* ist allerdings aufgrund seiner calcämischen Wirkung limitiert. Unter den unphysiologisch hohen Konzentrationen, die für eine antineoplastische Wirkung nötig sind, ist regelmäßig mit schweren Hypercalcämien zu rechnen (Mehta und Mehta, 2002). Daher wurden geringer calcämisch wirkende Analoga wie beispielsweise EB 1089 synthetisiert (Lokeshwar *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005).

Eine andere Strategie auf dem Weg zu einer Calcitriol basierten Therapie maligner Tumoren berücksichtigt, dass viele Tumorzellen den VDR und die Vitamin D

metabolisierenden Hydroxylasen exprimieren. Systemisch verabreichtes Calcidiol, welches eine deutlich geringere calcämische Wirkung als Calcitriol aufweist, kann intrazellulär zu Calcitriol metabolisiert werden, autokrin wirken und anschließend durch die 24-Hydroxylase degradiert werden. Allerdings werden in der Literatur auch Tumoren und Tumorzelllinien beschrieben, die nicht auf Calcidiol oder Calcitriol reagieren, obwohl sie den VDR und die am Vitamin D-Stoffwechsel beteiligten Enzyme exprimieren (Skowronski *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2004).

Um Erkenntnisse über die Regulation des Vitamin D-Stoffwechsels in Ovarial- und Zervixkarzinomen zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 und der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa zunächst die mRNA-Expression des VDR untersucht. Daraufhin wurden die Zellen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol in den Dosierungen 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Die Auswirkungen der Behandlungen auf die mRNA-Expression der 25-, der 1α - und der 24-Hydroxylase wurden nach 24, 48, 72 und 96 h mittels real-time PCR quantitativ analysiert.

4.1 Zellkultur und Expression des Vitamin D-Rezeptors

Zellkulturen bieten die Möglichkeit, Zellen unter kontrollierten Bedingungen zu züchten und frei von systemischen Einflüssen zu studieren. Einzelne Faktoren können exakt reguliert werden und ihre jeweiligen Einflüsse auf zelluläre Funktionen werden unabhängig voneinander quantifizierbar. Die vielfältigen Wechselwirkungen unterschiedlicher Faktoren, die in die homöostatische Regulation *in vivo* involviert sind, können in der Zellkultur jedoch nicht simuliert werden. Dennoch ist die Zellkultur für die Forschung unabdingbar, da sie Einblicke ermöglicht, die *in vivo* nicht realisierbar wären.

Da Zellen in Kultur durch Mutationen substantielle Veränderungen erfahren können und somit die Entstehung VDR-negativer Klone denkbar ist, musste vor Beginn der Stimulationsexperimente die VDR-Expression in den verwendeten Karzinomzelllinien bestätigt werden (Paul, 1980). Übereinstimmend mit den Angaben in der Literatur wurde auch in unseren Experimenten die Expression des VDR sowohl in HeLa- als auch in OVCAR-3-Zellen mittels RT-PCR und nachfolgender Gelelektrophorese nachgewiesen (Ahonen *et al.*, 2000b; Narayanan *et al.*, 2004). Anschließend konnten die Stimulationen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol durchgeführt werden.

4.2 *Expression der 25-Hydroxylase*

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die mRNA-Expression der 25-Hydroxylase weder in HeLa- noch in OVCAR-3-Zellen nach den ausgewählten Inkubationszeiträumen signifikant durch die Behandlungen beeinflusst.

In HeLa-Zellen zeigte sich nach 48- und 96-stündiger Inkubation mit Vitamin D ein Trend zur Expressionssteigerung. Zudem ließ sich nach 24 und 48 h eine tendenziell erhöhte Expression durch die Behandlung mit Calcitriol beobachten.

In OVCAR-3-Zellen ließ sich nach 24 h sowohl durch die Behandlung mit Vitamin D als auch durch die mit Calcitriol ein Trend zur Expressionsminderung der 25-Hydroxylase registrieren. Nach 72 h fand sich eine tendenzielle Expressionssteigerung der 25-Hydroxylase nach Inkubation mit Vitamin D sowie unter der Behandlung mit Calcitriol.

Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen an HeLa-Zellen nach 96 h und an OVCAR-3-Zellen nach 72 h, konnten Tokar und Webber an benignen und malignen humanen Prostatazellen eine Induktion der 25-Hydroxylase durch die Behandlung mit Vitamin D nachweisen (Tokar und Webber, 2005a; Tokar und Webber, 2005b). Auch Diesing *et al.* fanden in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eine Expressionsinduktion durch die Behandlung mit Vitamin D in den Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-7} M (Diesing *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu dem im Rahmen dieser Arbeit in HeLa-Zellen gefundenen Trend zur Expressionssteigerung durch Calcitriol wurde in Zellen des menschlichen fetalen Dünndarms nach 24 und 48 h Behandlung mit 10^{-7} M Calcitriol eine reduzierte Expression der 25-Hydroxylase beobachtet (Theodoropoulos *et al.*, 2003a). Auch in Rattenhepatozyten wurde eine Minderung der Expression durch Calcitriol beschrieben, wie sie in den OVCAR-3-Zellen tendenziell nach 24 h festgestellt werden konnte (Theodoropolous *et al.*, 2003b). In Enterozyten der Ratte wurde eine verminderte Expression durch die Behandlungen mit Vitamin D, Calcidiol oder Calcitriol beschrieben (Theodoropoulos *et al.*, 2001). Aufgrund der divergierenden Ergebnisse in den wenigen Studien über die extrahepatische Regulation der 25-Hydroxylase, die in der Literatur beschrieben werden, lassen sich die in dieser Arbeit beobachteten Effekte nur schwer interpretieren. Auch in unseren Versuchen wurden keine übereinstimmenden, über die Zeit konstanten Tendenzen in HeLa- oder OVCAR-3-Zellen gefunden. Deshalb kann an dieser Stelle lediglich eine zelltypspezifische Regulation und Beeinflussbarkeit der 25-Hydroxylase postuliert werden. In nachfolgenden Studien sollte untersucht werden, ob die Expression der 25-Hydroxylase

in malignen Zellen des Ovars und der Zervix einer Regulation durch Vitamin D und dessen Metaboliten unterliegt.

4.3 *Expression der 1 α -Hydroxylase*

In beiden Karzinomzelllinien wurde die mRNA-Expression der 1 α -Hydroxylase nach den untersuchten Inkubationsintervallen durch keine der Behandlungen signifikant beeinflusst. Tendenziell zeigte sich in HeLa-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h eine Abnahme der mRNA-Expression unter der Behandlung mit Calcitriol in den Konzentrationen 10⁻⁹ M und 10⁻⁷ M.

In OVCAR-3-Zellen konnte nach 24-stündiger Calcitriolinkubation für beide verwendeten Konzentrationen ein Trend zur Expressionsminderung gezeigt werden. Die gleiche Behandlung führte nach 72-stündiger Inkubation zu einer tendenziellen Expressionszunahme. Nach 48 und 96 h fand sich eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Expression. Die höher dosierte Behandlung führte jeweils zu einer tendenziellen Induktion und die niedriger dosierte Behandlung zu einer tendenziellen Inhibition der mRNA-Expression der 1 α -Hydroxylase.

An Zellen des menschlichen fetalen Dünndarms konnte eine reduzierte Expression der 1 α -Hydroxylase durch die Behandlung mit Calcitriol beobachtet werden (Theodoropoulos *et al.*, 2003a). Auch an Enterozyten und Mammaepithelzellen wurden Expressionsminderungen durch Calcitriol vergleichbar der renalen negativen Feedbackregulation beschrieben (Kemmis *et al.*, 2006; Lechner *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Beobachtungen an HeLa- und OVCAR-3-Zellen konnten Diesing *et al.* in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eine erhöhte Expression der 1 α -Hydroxylase nach Behandlung mit Vitamin D oder Calcidiol nachweisen (Diesing *et al.*, 2006). Murillo *et al.* fanden eine gesteigerte Expression der 1 α -Hydroxylase in Kolonkarzinomzellen, nachdem diese mit Calcidiol oder Calcitriol inkubiert worden waren (Murillo *et al.*, 2007).

Bareis *et al.* kamen in Studien an humanen Kolonkarzinomzellen zu interessanten Ergebnissen. Hoch differenzierte, niedrig proliferative Zellen reagierten mit einer Induktion der Expression und weniger differenzierte, hoch proliferative Zellen mit einer Inhibition der Expression auf die Behandlung mit Calcitriol (Bareis *et al.*, 2002). Ähnlich den Beobachtungen von Bareis *et al.* an entdifferenzierten Kolonkarzinomzellen zeigte

sich in den von uns untersuchten Zelllinien auch ein Trend zur Expressionsminderung durch Calcitriol, dieser war in HeLa-Zellen deutlicher als in OVCAR-3-Zellen zu registrieren. Es ist zu mutmaßen, dass die Zellen hierdurch einen Weg gefunden haben, um *in vivo* einer weiteren Synthese des antimitotisch aktiven Calcitriols aus Calcidol entgegenzuwirken.

4.4 *Expression der 24-Hydroxylase*

Die Behandlung mit Calcitriol 10^{-7} M führte in den HeLa-Zellen nach 24, 48 und 72 h zu einer signifikanten Expressionssteigerung um den Faktor 10 bis 13 gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Dabei führte die Behandlung über 96 h im Vergleich zu den Behandlungen über 24, 48 und 72 h zu einer signifikant niedrigeren Induktion der 24-Hydroxylase. Unter der Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol zeigten sich im Einklang mit den Ergebnissen unter der Behandlung mit der höheren Konzentration tendenzielle Expressionszunahmen nach 24, 48 und 72 h. Allerdings war zu keinem der drei Zeitpunkte eine statistische Signifikanz nachzuweisen. Nach 24, 48, 72 und 96 h führte Calcidol 10^{-7} M zu einer tendenziellen Erhöhung der mRNA-Expression der 24-Hydroxylase, jedoch waren diese Expressionssteigerungen bei einer festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch nicht signifikant. Ferner konnte in der Kontrollgruppe nach allen vier Inkubationszeiträumen ein bereits ca. 100-fach höheres Grundexpressionsniveau der 24-Hydroxylase im Vergleich zur Expression der 25- oder der der 1α -Hydroxylase gemessen werden.

In den OVCAR-3-Zellen wurde die 24-Hydroxylase durch die Behandlung mit 10^{-7} M Calcitriol nach 24 h ca. 176-fach und nach 48 h ca. 341-fach höher exprimiert als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Zu beiden Zeitpunkten war der jeweilige Unterschied statistisch signifikant. Nach 72 und 96 h konnten bei gleicher Behandlung tendenzielle Expressionszunahmen nachgewiesen werden. Diese waren im Bonferroni Post-hoc Test gleichwohl nicht signifikant. Nach allen Inkubationszeiträumen zeigte sich unter der Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol ein Trend zur Expressionssteigerung, der jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant war. Wie auch in den HeLa-Zellen führte die Inkubation mit Calcidol 10^{-7} M nach 24, 48, 72 und 96 h zu einem tendenziellen Anstieg der Genexpression der 24-Hydroxylase. Eine Signifikanz lag allerdings nicht vor. Im Gegensatz zu den HeLa-Zellen fand sich in den Kontrollgruppen der OVCAR-3-Zellen

keine erhöhte Grundexpression der 24-Hydroxylase gegenüber den mRNA-Expressionen der beiden anderen Hydroxylasen. Da die basale Expression der 24-Hydroxylase nach 96 h deutlich unter den Expressionswerten nach 24, 48 und 72 h lag, ist die Interpretation der Expressionsänderungen durch die Behandlungen zu diesem Zeitpunkt insgesamt erschwert. Möglicherweise hat sich an dieser Stelle die Versuchsdauer negativ auf die Zellqualität ausgewirkt und somit auch das weitere methodische Prozedere nachteilig beeinflusst.

Eine Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase durch Calcitriol wird in der Literatur für unterschiedliche humane Karzinomzelllinien beschrieben. So konnte in Prostatakarzinomzellen eine gesteigerte mRNA-Synthese der 24-Hydroxylase sowie eine erhöhte Enzymaktivität unter Calcitriolbehandlung ausfindig gemacht werden (Skowronski *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1995; Ly *et al.*, 1999; Peehl *et al.*, 2004; Alagbala *et al.*, 2007). Auch in Kolonkarzinomzellen wurde eine Steigerung der Transkription der 24-Hydroxylase durch Calcitriol beobachtet (Anderson *et al.*, 2006). Dabei fanden Bareis *et al.* in Caco-2/15-Zellen unter der Behandlung mit Calcitriol 10^{-8} M einen maximalen Anstieg der mRNA-Expression der 24-Hydroxylase nach 8 h und eine konsekutive Expressionsabnahme bis zum Zeitpunkt 48 h (Bareis *et al.*, 2002). Ferner ließ sich in Mammakarzinomzellen die Hochregulation der 24-Hydroxylase durch Calcitriol zeigen (Townsend *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006; Kemmis *et al.*, 2006). In MCF-7-Zellen konnte durch die Behandlungen mit Calcitriol 10^{-9} M und 10^{-7} M nach 24 h eine deutliche Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase nachgewiesen werden, gefolgt von einer sukzessiven Expressionsabnahme nach 48 und 72 h (Diesing *et al.*, 2006).

Christopherson *et al.* konnten nach 18 bis 24 h Behandlung mit Calcitriol in der Konzentration 10^{-8} M sowohl an Ovarial- als auch an Zervixkarzinomzellen eine erhöhte Aktivität der 24-Hydroxylase nachweisen (Christopherson *et al.*, 1986). Die Arbeitsgruppe um Miettinen *et al.* hat in einer Studie die Auswirkungen der Behandlungen mit Calcitriol, Calcidiol oder dem Calcitriolanalogen EB 1089 auf die mRNA-Expression der 24-Hydroxylase in OVCAR-3-Zellen untersucht. Sie fanden nach 6 h Inkubation mit Calcitriol 10^{-7} M eine Expressionssteigerung um den Faktor 650 gegenüber der Kontrollgruppe. Nach 24 h war die Expression weiter angestiegen und lag 1100-fach über der der Kontrollgruppe. Ähnliche Expressionssteigerungen ließen sich unter der Behandlung mit EB 1089 feststellen. Calcidiol führte in der Konzentration von 10^{-7} M nach 6 h zu einer Verdreifachung der 24-Hydroxylaseexpression. Nach 24 h zeigte sich hingegen eine Abnahme der Expression gegenüber der Kontrollgruppe um 50 % (Miettinen *et al.*, 2004).

Übereinstimmend mit den Angaben in der Literatur ließ sich die Induktion der 24-Hydroxylase durch Calcitriol in malignen Zellen auch in HeLa- und OVCAR-3-Zellen nachweisen bzw. bestätigen. Die Zellen scheinen auf diese Weise einen Mechanismus entwickelt zu haben, das Calcitriol schnellstmöglich zu katabolisieren und somit dessen antikanzerogene Wirksamkeit zu reduzieren.

4.5 *Fazit und Ausblick*

In der vorliegenden Arbeit konnte auf RNA-Ebene die Expression der drei am Vitamin D-Metabolismus maßgeblich beteiligten Enzyme 25-Hydroxylase, 1α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase mithilfe der real-time PCR in den Karzinomzelllinien HeLa und OVCAR-3 nachgewiesen werden. Die Expression der Hydroxylasen befähigt die Zellen zur autonomen Verstoffwechselung des Vitamin D und seiner Metaboliten und daher wahrscheinlich auch zur Kontrolle von Wachstum und Differenzierung im Sinne von auto- und parakrinen Mechanismen. Ferner zeigte sich, dass die Inkubation mit unterschiedlichen Vitamin D-Metaboliten zu einem alterierten Expressionsmuster der Hydroxylasen führte. Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit fand sich in beiden Zelllinien eine signifikante Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase durch die Behandlung mit Calcitriol in der Konzentration von 10^{-7} M. Dieses Ergebnis bestätigt die Rolle des Calcitriols als Induktor der 24-Hydroxylase in malignen Zellen. Ob die Expression der 25-Hydroxylase in malignen Zellen des Ovars und der Zervix durch Vitamin D und dessen Metaboliten reguliert werden kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachhaltig geklärt werden. Für die 1α -Hydroxylase hat sich eine Tendenz zur Expressionsinhibition durch Calcitriol in beiden Zelllinien abgezeichnet.

An Kolonkarzinomzellen ließ sich eine Veränderung des Expressionsmusters der Vitamin D metabolisierenden Hydroxylasen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad finden. In gut differenzierten Karzinomen wurden die 1α -Hydroxylase und der VDR stärker exprimiert als in gesundem Gewebe, während mit zunehmender Entdifferenzierung die Expression der 1α -Hydroxylase und die des VDR sank und die Expression der 24-Hydroxylase deutlich hochreguliert wurde (Cross *et al.*, 2001; Bises *et al.*, 2004; Cross *et al.*, 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass gut differenzierte Zellen mit einer Induktion und schlecht differenzierte Zellen mit einer Inhibition der Expression des VDR und der 1α -Hydroxylase auf die Behandlung mit Calcitriol reagierten (Bareis *et al.*, 2002). Da bei

erhöhter Expression der 1α -Hydroxylase einerseits eine gesteigerte intrazelluläre Synthese des antikanzerogenen Calcitriols aus Calcidiol erfolgen kann, andererseits mehrere Studien existieren, die eine positive Korrelation zwischen der VDR-Konzentration und der biologischen Reaktivität einer Zielzelle belegen, können die Expressionssteigerungen der 1α -Hydroxylase und des VDR als physiologische, gegenregulative Maßnahme zur Abwehr einer malignen Erkrankung gewertet werden (Chen *et al.*, 1986; Krishnan und Feldman, 1992; Jensen *et al.*, 2002). Während der Entdifferenzierung scheint jedoch dieser Mechanismus zunehmend zu versagen und die pro-proliferativen Signale scheinen zu überwiegen. Hierzu tragen die erhöhte Expression der Calcitriol inaktivierenden 24-Hydroxylase und/oder die Expressionsreduktion der Calcitriol synthetisierenden 1α -Hydroxylase bei. Eine dysregulierte bzw. gesteigerte Expression der 24-Hydroxylase im Vergleich zu den jeweiligen benignen Zellen konnte auch an Mamma-, Prostata-, Ovarial- und Zervixkarzinomzellen demonstriert werden (Friedrich *et al.*, 2003; Lou *et al.*, 2004; Townsend *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2009c). Die in HeLa-Zellen beobachtete tendenzielle Inhibition der 1α -Hydroxylaseexpression durch Calcitriol nach allen vier Inkubationszeiträumen ist mit den genannten Beobachtungen gut zu vereinbaren. In OVCAR-3-Zellen war die Tendenz zur Expressionsminderung der 1α -Hydroxylase unter Calcitriolbehandlung weniger deutlich erkennbar. Ob dies in einem höheren Differenzierungsgrad der Zellen begründet lag, bleibt fraglich.

Beide Zelllinien reagierten auf die Behandlung mit Calcitriol mit einer Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase, wie sie in der Literatur für diverse maligne Zelllinien beschrieben worden ist. Dieses Phänomen ließ sich unter der Behandlung mit Calcitriol 10^{-9} M als Tendenz beobachten und war unter der Behandlung mit der höheren Konzentration von 10^{-7} M stärker ausgeprägt sowie statistisch signifikant. Aus Untersuchungen an unterschiedlichen Prostatakarzinomzellen ist bekannt, dass die Stärke der Induktion der 24-Hydroxylase und die antiproliferative Wirksamkeit des Calcitriols in einem umgekehrten Verhältnis zueinander stehen (Miller *et al.*, 1995; Ly *et al.*, 1999). Von den beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien ließ sich eine ausgeprägtere Induktion der 24-Hydroxylase in den OVCAR-3-Zellen ausfindig machen. Dennoch werden OVCAR-3-Zellen durch Calcitriol in der Konzentration 10^{-7} M in ihrem Wachstum gehemmt (Ahonen *et al.*, 2000b; Jiang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Miettinen *et al.*, 2004). Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass die reine Substratmenge hoch genug ist, um hierfür verantwortlich zu sein. Andererseits bleibt in zukünftigen Studien zu klären, ob die gesteigerte Expression der 24-Hydroxylase, die auf

RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, sich auch auf Proteinebene bestätigen lässt. Zusätzlich sollten Aktivitätsmessungen der 24-Hydroxylase durchgeführt werden, da es durch alternatives Splicen zur Bildung dysfunktionaler Proteine kommen kann. Diese konnten sowohl in Mamma- als auch in Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden (Muindi *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009a). Interessanterweise konnten Fischer *et al.* mögliche Splicevarianten der 24-Hydroxylase auch in Primärkulturen aus Ovarialkarzinomen nachweisen (Fischer *et al.*, 2009c). Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Beeinflussbarkeit einer Zielzelle durch Calcitriol im Wesentlichen von dessen intrazellulärer Konzentration und somit von der Expression und Funktionalität der synthetisierenden 1α - und der katabolisierenden 24-Hydroxylase sowie der VDR-Menge pro Zelle abhängig ist.

Die Inkubation mit Calcidiol führte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in beiden verwendeten Karzinomzelllinien zu einer tendenziellen Expressionszunahme der 24-Hydroxylase. Diese war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. In unterschiedlichen Studien konnte demonstriert werden, dass die biologische Wirksamkeit des Calcidiols maßgeblich von der Expression und Funktionalität der 1α -Hydroxylase abhängt. In Studien an Prostatakarzinomzellen, die eine sehr geringe Expression der 1α -Hydroxylase aufwiesen, ließ sich teilweise keine Abnahme der Proliferation bei Behandlung mit Calcidiol nachweisen, während andere maligne Zelllinien mit einer höheren Expression der 1α -Hydroxylase durch die Behandlung mit Calcidiol in ihrem Wachstum gehemmt wurden (Hsu *et al.*, 2001). Der Grund hierfür ist, dass Calcitriol im Gegensatz zum Calcidiol eine ca. 500-fach höhere Affinität zum VDR aufweist (Hughes *et al.*, 1976). Somit ist davon auszugehen, dass Calcidiol zunächst durch die 1α -Hydroxylase in Calcitriol überführt werden muss, um anschließend durch Interaktion mit dem VDR wirksam zu werden. Übereinstimmend hiermit ließ sich in 1α -Hydroxylase-defizienten Mäusen feststellen, dass Calcidiol nicht dazu in der Lage war, die 24-Hydroxylase zu induzieren (Kemmis *et al.*, 2006). In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnten hingegen trotz Expression der 1α -Hydroxylase keine antiproliferativen Effekte durch Calcidiolbehandlung erreicht werden (Welsh *et al.*, 2003). Da Splicevarianten der 1α -Hydroxylase in MCF-7-Zellen nachgewiesen wurden, wird angenommen, dass diese für die mangelnde Funktionalität der 1α -Hydroxylase in dieser Zelllinie mitverantwortlich sind (Cordes *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2007). Da in unseren Versuchen Calcidiol sowohl in HeLa- als auch in OVCAR-3-Zellen zu einer tendenziellen Expressionserhöhung der 24-Hydroxylase führte, ist für beide Zelllinien die Expression einer funktionalen 1α -

Hydroxylase vorauszusetzen. Dies ist unter anderem deshalb interessant, weil auch in malignen Zelllinien des Ovars Splicevarianten der 1α -Hydroxylase nachgewiesen werden konnten (Fischer *et al.*, 2009b). Außerdem lässt sich hieraus für die HeLa-Zellen schlussfolgern, dass trotz hoher basaler Expression der auch Calcidiol katabolisierenden 24-Hydroxylase noch immer eine biologisch effektive Umwandlung von Calcidiol in Calcitriol erfolgen konnte. Im Hinblick hierauf sollten in weiteren Studien die Expression und Funktionalität der 1α -Hydroxylase in Ovarial- und Zervixkarzinomen untersucht werden und auch, inwieweit sich diese durch Calcidiol in ihrem Wachstum beeinflussen lassen. Neben einer gesteigerten Expression der 24-Hydroxylase konnte für maligne Zellen des Ovars und der Zervix auch eine Expressionszunahme der 1α -Hydroxylase und des VDR im Vergleich zu benignen Zellen beschrieben werden (Friedrich *et al.*, 2003). Unter Berücksichtigung der an Kolonkarzinomzellen beschriebenen Beobachtung des sich verändernden Expressionsmusters der Vitamin D metabolisierenden Hydroxylasen in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad ließen sich hieraus bei dessen Bestätigung für Ovarial- und Zervixkarzinome präventive und therapeutische Konsequenzen ableiten. Calcidiol bietet gegenüber Calcitriol bei systemischer Anwendung den großen Vorteil, hoch dosiert werden zu können, ohne calcämische Nebenwirkungen zu provozieren. Im Falle einer gesteigerten Expression der 1α -Hydroxylase in den Tumorzellen könnte ein erhöhtes Angebot an Calcidiol zu einer tumorlokalen Akkumulation von Calcitriol führen. Somit ließen sich möglicherweise frühzeitig die Tumorprogression oder sogar -entstehung in Ovar und Zervix verhindern.

5 Zusammenfassung

Das Secosteroidhormon Calcitriol ist der aktive Metabolit des Vitamin D. Nach neueren Erkenntnissen hat Calcitriol neben der Beteiligung an der endokrinen Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels auch Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung unterschiedlicher Zellen. Dies hat eine besondere Bedeutung für Tumoren, da es auf maligne Zellen über die Aktivierung des intrazellulären Vitamin D-Rezeptors (VDR) eine antiproliferative sowie apoptose- und differenzierungsinduzierende Wirkung ausübt. Zwei Enzyme sind maßgeblich an der Calcitriolsynthese beteiligt. Durch CYP27A1 (25-Hydroxylase) wird Vitamin D am Kohlenstoffatom C-25 hydroxyliert und somit zu Calcidiol konvertiert. Eine zweite Hydroxylierung durch CYP27B1 (1 α -Hydroxylase) führt zur Bildung von Calcitriol. Calcitriol und Calcidiol werden durch CYP24A1 (24-Hydroxylase) inaktiviert. Sowohl in Ovarial- als auch in Zervixkarzinomen konnten der VDR und die für den Vitamin D-Stoffwechsel erforderlichen Hydroxylasen nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Einblicke in die Regulationsmechanismen der 25-, der 1 α - und der 24-Hydroxylase in den genannten Tumorentitäten zu gewinnen. Hierzu wurde zunächst die Expression des VDR in der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa mittels RT-PCR nachgewiesen. Anschließend wurden die Zellen mit Vitamin D, Calcidiol und Calcitriol in den Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-7} M über 24, 48, 72 und 96 h inkubiert. Die durch die Substanzen veränderte mRNA-Expression der Hydroxylasen wurde nach den genannten Inkubationsintervallen mittels real-time PCR quantifiziert.

Sowohl in HeLa- als auch in OVCAR-3-Zellen fand sich eine signifikante Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase um das bis zu 341-fache der Kontrollgruppe durch die Inkubation mit 10^{-7} M Calcitriol. Unter der Behandlung mit 10^{-9} M Calcitriol wurde ebenfalls ein deutlicher Trend zur Expressionssteigerung beobachtet, der allerdings keine statistische Signifikanz erreichte. Die Expression der 1 α -Hydroxylase wurde in beiden Zelllinien tendenziell durch Calcitriol inhibiert. Ob die Expression der 25-Hydroxylase in malignen Zellen des Ovars und der Zervix durch Vitamin D und dessen Metaboliten reguliert werden kann, konnte nicht nachhaltig geklärt werden.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass in HeLa- und OVCAR-3-Zellen ein lokaler Vitamin D-Metabolismus existiert. Die Expression der Hydroxylasen kann *in vitro* durch

die Applikation von Vitamin D-Metaboliten reguliert werden. Es ist zu mutmaßen, dass Vitamin D und seine Stoffwechselintermediate, Vitamin D-Analoga oder Inhibitoren der 24-Hydroxylase eine Rolle in der Prophylaxe und Therapie des Ovarial- und Zervixkarzinoms spielen könnten.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P: Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control* 11, 847-852 (2000a)
- (2) Ahonen MH, Zhuang YH, Aine R, Ylikomi T, Tuohimaa P: Androgen receptor and vitamin D receptor in human ovarian cancer: growth stimulation and inhibition by ligands. *Int J Cancer* 86, 40-46 (2000b)
- (3) Alagbala AA, Moser MT, Johnson CS, Trump DL, Foster BA: Characterization of Vitamin D insensitive prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 712-716 (2007)
- (4) Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR: Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 234-240 (2006)
- (5) Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW: Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3294-3298 (1988)
- (6) Bareis P, Kallay E, Bischof MG, Bises G, Hofer H, Potzi C, Manhardt T, Bland R, Cross HS: Clonal differences in expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1 α -hydroxylase, of 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase, and of the vitamin D receptor in human colon carcinoma cells: effects of epidermal growth factor and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Exp Cell Res* 276, 320-327 (2002)
- (7) Barreto AM, Schwartz GG, Woodruff R, Cramer SD: 25-Hydroxyvitamin D₃, the prohormone of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits the proliferation of primary prostatic epithelial cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 265-270 (2000)
- (8) Barsony J, Marx SJ: Receptor-mediated rapid action of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol: increase of intracellular cGMP in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1223-1226 (1988)
- (9) Barsony J, McKoy W: Molybdate increases intracellular 3',5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments. *J Biol Chem* 267, 24457-24465 (1992)
- (10) Barsony J, Renyi I, McKoy W: Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. *J Biol Chem* 272, 5774-5782 (1997)
- (11) Beckman MJ, Goff JP, Reinhardt TA, Beitz DC, Horst RL: In vivo regulation of rat intestinal 24-hydroxylase: potential new role of calcitonin. *Endocrinology* 135, 1951-1955 (1994)
- (12) Bernardi RJ, Johnson CS, Modzelewski RA, Trump DL: Antiproliferative effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology* 143, 2508-2514 (2002)
- (13) Bettoun DJ, Buck DW, Lu J, Khalifa B, Chin WW, Nagpal S: A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. *J Biol Chem* 277, 24847-24850 (2002)
- (14) Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM: Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 1308-1310 (1983)

- (15) Bises G, Kallay E, Weiland T, Wrba F, Wenzl E, Bonner E, Kriwanek S, Obrist P, Cross HS: 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase expression in normal and malignant human colon. *J Histochem Cytochem* 52, 985-989 (2004)
- (16) Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M: Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* 140, 2027-2034 (1999)
- (17) Boscoe FP, Schymura MJ: Solar ultraviolet-B exposure and cancer incidence and mortality in the United States, 1993-2002. *BMC Cancer* 6, 264 (2006)
- (18) Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Schwartz Z: Membrane mediated signaling mechanisms are used differentially by metabolites of vitamin D(3) in musculoskeletal cells. *Steroids* 67, 421-427 (2002)
- (19) Bratland A, Risberg K, Maelandsmo GM, Gutzkow KB, Olsen OE, Moghaddam A, Wang MY, Hansen CM, Blomhoff HK, Berg JP, Fodstad O, Ree AH: Expression of a novel factor, com1, is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells. *Cancer Res* 60, 5578-5583 (2000)
- (20) Braun MM, Helzlsouer KJ, Hollis BW, Comstock GW: Colon cancer and serum vitamin D metabolite levels 10-17 years prior to diagnosis. *Am J Epidemiol* 142, 608-611 (1995)
- (21) Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF: Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1387-1391 (1998)
- (22) Brockmann H: Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Thunfischleberöl. *Z Physiol Chem* 241, 104-115 (1936)
- (23) Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC: Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575-580 (1993)
- (24) Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39 (2002)
- (25) Capiati D, Benassati S, Boland RL: 1,25(OH)2-vitamin D3 induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *J Cell Biochem* 86, 128-135 (2002)
- (26) Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, Hendy GN, Appelman H, Varani J: Calcium sensing receptor in human colon carcinoma: interaction with Ca(2+) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cancer Res* 65, 493-498 (2005)
- (27) Chen A, Davis BH, Bissonnette M, Scaglione-Sewell B, Brasitus TA: 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) stimulates activator protein-1-dependent Caco-2 cell differentiation. *J Biol Chem* 274, 35505-35513 (1999)
- (28) Chen TL, Li JM, Ye TV, Cone CM, Feldman D: Hormonal responses to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in cultured mouse osteoblast-like cells--modulation by changes in receptor level. *J Cell Physiol* 126, 21-28 (1986)
- (29) Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW: De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem* 278, 38084-38093 (2003)
- (30) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987)
- (31) Chomczynski P: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-537 (1993)

- (32) Chomczynski P, Sacchi N: The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1, 581-585 (2006)
- (33) Christopherson WA, Porter JC, MacDonald PC, Casey ML: Responsiveness of human carcinoma cells of gynecologic origin to 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Am J Obstet Gynecol* 155, 1293-1296 (1986)
- (34) Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF: Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet* 1, 74-76 (1982)
- (35) Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A: 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 277, 38965-38971 (2002)
- (36) Cordes T, Diesing D, Becker S, Fischer D, Diedrich K, Friedrich M: Expression of splice variants of 1 α -hydroxylase in mcf-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 326-329 (2007)
- (37) Costa EM, Feldman D: Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)₂ vitamin D3 receptor in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 137, 742-747 (1986)
- (38) Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M: 25-Hydroxyvitamin D(3)-1 α -hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66, 287-292 (2001)
- (39) Cross HS, Kallay E, Farhan H, Weiland T, Manhardt T: Regulation of extrarenal vitamin D metabolism as a tool for colon and prostate cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 164, 413-425 (2003)
- (40) Cross HS, Kallay E, Lechner D, Gerdenitsch W, Adlercreutz H, Armbrecht HJ: Phytoestrogens and vitamin D metabolism: a new concept for the prevention and therapy of colorectal, prostate, and mammary carcinomas. *J Nutr* 134, 1207S-1212S (2004)
- (41) Cross HS, Bises G, Lechner D, Manhardt T, Kallay E: The Vitamin D endocrine system of the gut--its possible role in colorectal cancer prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 121-128 (2005)
- (42) Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM: Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8097-8101 (1992)
- (43) Diesing D, Cordes T, Fischer D, Diedrich K, Friedrich M: Vitamin D--metabolism in the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 26, 2755-2759 (2006)
- (44) Dokoh S, Donaldson CA, Marion SL, Pike JW, Haussler MR: The ovary: a target organ for 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 112, 200-206 (1983)
- (45) Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller 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 Endocrinol* 16, 1524-1537 (2002)
- (46) Erlich HA: Principles and applications of the polymerase chain reaction. *Rev Immunogenet* 1, 127-134 (1999)
- (47) Farach-Carson MC, Nemere I: Membrane receptors for vitamin D steroid hormones: potential new drug targets. *Curr Drug Targets* 4, 67-76 (2003)
- (48) Feldman D, Skowronski RJ, Peehl DM: Vitamin D and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 375, 53-63 (1995)

- (49) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr> (Tag des Zugriffs: 15.09.10)
- (50) Fischer D, Seifert M, Becker S, Ludders D, Cordes T, Reichrath J, Friedrich M: 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase splice variants in breast cell lines MCF-7 and MCF-10. *Cancer Genomics Proteomics* 4, 295-300 (2007)
- (51) Fischer D, Becker S, Cordes T, Bucker B, Diedrich K, Friedrich M, Salehin D, Thill M: Vitamin D-24-hydroxylase in benign and malignant breast tissue and cell lines. *Anticancer Res* 29, 3641-3645 (2009a)
- (52) Fischer D, Thome M, Becker S, Cordes T, Diedrich K, Friedrich M, Thill M: 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase splice variants in benign and malignant ovarian cell lines and tissue. *Anticancer Res* 29, 3627-3633 (2009b)
- (53) Fischer D, Thome M, Becker S, Cordes T, Diedrich K, Friedrich M, Thill M: Expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase in benign and malignant ovarian cell lines and tissue. *Anticancer Res* 29, 3635-3639 (2009c)
- (54) Fraga C, Blanco M, Vigo E, Segura C, Garcia-Caballero T, Perez-Fernandez R: Ontogenesis of the vitamin D receptor in rat heart. *Histochem Cell Biol* 117, 547-550 (2002)
- (55) Friedman PA, Gesek FA: Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* 265, F300-F308 (1993)
- (56) Friedrich M, Rafi L, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J: Expression of 1,25-dihydroxy vitamin D3 receptor in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 46, 1335-1337 (1998)
- (57) Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J: Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res* 164, 239-246 (2003)
- (58) Gann PH, Ma J, Hennekens CH, Hollis BW, Haddad JG, Stampfer MJ: Circulating vitamin D metabolites in relation to subsequent development of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 121-126 (1996)
- (59) Garland CF, Garland FC: Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 9, 227-231 (1980)
- (60) Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED: Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 2, 1176-1178 (1989)
- (61) Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF: Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 19, 614-622 (1990)
- (62) Gedlicka C, Hager G, Weissenbock M, Gedlicka W, Knerer B, Kornfehl J, Formanek M: 1,25(OH)₂Vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 35, 472-478 (2006)
- (63) Ghadersohi A, Odunsi K, Zhang S, Azrak RG, Bundy BN, Manjili MH, Li F: Prostate-derived Ets transcription factor as a favorable prognostic marker in ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 123, 1376-1384 (2008)
- (64) Gibson UE, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6, 995-1001 (1996)
- (65) Goldblatt H, Soames KM: A Study of Rats on a Normal Diet Irradiated daily by the Mercury Vapour Quartz Lamp or kept in Darkness. *Biochem J* 17, 294-297 (1923)

- (66) Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM: E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153, 1049-1060 (2001)
- (67) Grant WB, Garland CF: The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res* 26, 2687-2699 (2006)
- (68) Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J: Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 91, 2552-2555 (1993)
- (69) Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J: 1,25(OH)₂ vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 121, 103-109 (2001)
- (70) Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 43, 5379-5389 (1983)
- (71) Hanchette CL, Schwartz GG: Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* 70, 2861-2869 (1992)
- (72) Hedlund TE, Moffatt KA, Miller GJ: Stable expression of the nuclear vitamin D receptor in the human prostatic carcinoma cell line JCA-1: evidence that the antiproliferative effects of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ are mediated exclusively through the genomic signaling pathway. *Endocrinology* 137, 1554-1561 (1996)
- (73) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994 (1996)
- (74) Hersherberger PA, Yu WD, Modzelewski RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL: Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 7, 1043-1051 (2001)
- (75) Hess AF: The Prevention and Cure of Rickets by Sunlight. *Am J Public Health (N Y)* 12, 104-107 (1922)
- (76) Hiatt RA, Krieger N, Lobaugh B, Drezner MK, Vogelmann JH, Orentreich N: Prediagnostic serum vitamin D and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90, 461-463 (1998)
- (77) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-417 (1992)
- (78) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030 (1993)
- (79) Hirst M, Feldman D: Glucocorticoid regulation of 1,25(OH)₂vitamin D₃ receptors: divergent effects on mouse and rat intestine. *Endocrinology* 111, 1400-1402 (1982)
- (80) Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF: Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D₃ metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 803-804 (1971)
- (81) Holick MF: The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 77, 51-58 (1981)
- (82) Holick MF: Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79, 362-371 (2004)
- (83) Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E: Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res* 22 Suppl 2, V28-V33 (2007)
- (84) Hollis BW: Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 135, 317-322 (2005)

- (85) Hsu JY, Feldman D, McNeal JE, Peehl DM: Reduced 1 α -hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D₃-induced growth inhibition. *Cancer Res* 61, 2852-2856 (2001)
- (86) Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF: Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 92, 873-880 (2004)
- (87) Hughes MR, Baylink DJ, Jones PG, Haussler MR: Radioligand receptor assay for 25-hydroxyvitamin D₂/D₃ and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₂/D₃. *J Clin Invest* 58, 61-70 (1976)
- (88) Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW: The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 18, 2660-2671 (2004)
- (89) Huynh H, Pollak M, Zhang JC: Regulation of insulin-like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1,25(OH)₂D₃ and its analog EB1089. *Int J Oncol* 13, 137-143 (1998)
- (90) Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS: Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Public Health Nutr* 2, 283-291 (1999)
- (91) Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Bartek J, Binderup L: Sensitivity to growth suppression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ among MCF-7 clones correlates with Vitamin D receptor protein induction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81, 123-133 (2002)
- (92) Ji Y, Studzinski GP: Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res* 64, 370-377 (2004)
- (93) Jiang F, Li P, Fornace AJ Jr, Nicosia SV, Bai W: G₂/M arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in ovarian cancer cells mediated through the induction of GADD45 via an exonic enhancer. *J Biol Chem* 278, 48030-48040 (2003)
- (94) Jiang F, Bao J, Li P, Nicosia SV, Bai W: Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through the down-regulation of telomerase. *J Biol Chem* 279, 53213-53221 (2004)
- (95) Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF: Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78, 1193-1231 (1998)
- (96) Jones HW Jr, McKusick VA, Harper PS, Wu KD: George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* 38, 945-949 (1971)
- (97) Katai K, Miyamoto K, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, Tani Y, Arai H, Tatsumi S, Morita K, Taketani Y, Takeda E: Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 343 Pt 3, 705-712 (1999)
- (98) Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J: Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D-3, the major circulating form of vitamin D-3. *J Nutr* 136, 887-892 (2006)
- (99) Kholodova Y, Bondar OP, Melnykovych G: Effect of vitamin D₃ and 1,25(OH)₂D₃ on growth of neoplastically derived cell lines and their alkaline phosphatase activity. *Ukr Biokhim Zh* 69, 17-24 (1997)
- (100) Koga M, Eisman JA, Sutherland RL: Regulation of epidermal growth factor receptor levels by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human breast cancer cells. *Cancer Res* 48, 2734-2739 (1988)

- (101) Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF: Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35, 249-258 (1985)
- (102) Krishnan AV, Feldman D: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate up-regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene expression and enhances hormone action. *Mol Endocrinol* 6, 198-206 (1992)
- (103) Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D: Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J Cell Biochem* 88, 363-371 (2003)
- (104) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N: The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125 (2006)
- (105) Larriba MJ, Valle N, Palmer HG, Ordonez-Moran P, Alvarez-Diaz S, Becker KF, Gamallo C, de Herreros AG, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A: The inhibition of Wnt/beta-catenin signalling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 14, 141-151 (2007)
- (106) Lawson DE, Paul AA, Black AE, Cole TJ, Mandal AR, Davie M: Relative contributions of diet and sunlight to vitamin D state in the elderly. *Br Med J* 2, 303-305 (1979)
- (107) Lechner D, Kallay E, Cross HS: 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells. *Mol Cell Endocrinol* 263, 55-64 (2007)
- (108) Lefkowitz ES, Garland CF: Sunlight, vitamin D, and ovarian cancer mortality rates in US women. *Int J Epidemiol* 23, 1133-1136 (1994)
- (109) Li P, Li C, Zhao X, Zhang X, Nicosia SV, Bai W: p27(Kip1) stabilization and G(1) arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279, 25260-25267 (2004)
- (110) Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP: Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10, 142-153 (1996)
- (111) Lokeshwar BL, Schwartz GG, Selzer MG, Burnstein KL, Zhuang SH, Block NL, Binderup L: Inhibition of prostate cancer metastasis in vivo: a comparison of 1,23-dihydroxyvitamin D (calcitriol) and EB1089. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 241-248 (1999)
- (112) Lou YR, Qiao S, Talonpoika R, Syvala H, Tuohimaa P: The role of Vitamin D₃ metabolism in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 317-325 (2004)
- (113) Ly LH, Zhao XY, Holloway L, Feldman D: Liarozole acts synergistically with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ to inhibit growth of DU 145 human prostate cancer cells by blocking 24-hydroxylase activity. *Endocrinology* 140, 2071-2076 (1999)
- (114) MacLaughlin J, Holick MF: Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest* 76, 1536-1538 (1985)
- (115) MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF: Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science* 216, 1001-1003 (1982)
- (116) Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G: Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem J* 262, 173-180 (1989)
- (117) Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE: 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 87, 214-220 (2000)

- (118) Marcinkowska E, Garay E, Gocek E, Chrobak A, Wang X, Studzinski GP: Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp Cell Res* 312, 2054-2065 (2006)
- (119) Matsuoka LY, Wortsman J, Hollis BW: Use of topical sunscreen for the evaluation of regional synthesis of vitamin D3. *J Am Acad Dermatol* 22, 772-775 (1990)
- (120) Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Kolm P, Hollis BW: Racial pigmentation and the cutaneous synthesis of vitamin D. *Arch Dermatol* 127, 536-538 (1991)
- (121) Matsuoka LY, Wortsman J, Dannenberg MJ, Hollis BW, Lu Z, Holick MF: Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D3. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1099-1103 (1992)
- (122) McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG: Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 53, 293-312 (1922)
- (123) Mehta RG, Mehta RR: Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem* 13, 252-264 (2002)
- (124) Mellanby E, Cantag MD: Experimental investigation on rickets. *Lancet* 196, 407-412 (1919)
- (125) Mellanby E: Experimental rickets. Medical Research Council Special Report Series 61, 1-78 (1921)
- (126) Miettinen S, Ahonen MH, Lou YR, Manninen T, Tuohimaa P, Syvala H, Ylikomi T: Role of 24-hydroxylase in vitamin D3 growth response of OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 108, 367-373 (2004)
- (127) Miller GJ, Stapleton GE, Hedlund TE, Moffat KA: Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in seven human prostatic carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 1, 997-1003 (1995)
- (128) Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-8, 960, 962 (1998)
- (129) Muindi JR, Nganga A, Engler KL, Coignet LJ, Johnson CS, Trump DL: CYP24 splicing variants are associated with different patterns of constitutive and calcitriol-inducible CYP24 activity in human prostate cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 334-337 (2007)
- (130) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27 (1992)
- (131) Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S: The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)2D3. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 11-16 (1998)
- (132) Murillo G, Matusiak D, Benya RV, Mehta RG: Chemopreventive efficacy of 25-hydroxyvitamin D3 in colon cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 763-767 (2007)
- (133) Muto A, Kizaki M, Yamato K, Kawai Y, Kamata-Matsushita M, Ueno H, Ohguchi M, Nishihara T, Koeffler HP, Ikeda Y: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Blood* 93, 2225-2233 (1999)
- (134) Narayanan R, Sepulveda VA, Falzon M, Weigel NL: The functional consequences of cross-talk between the vitamin D receptor and ERK signaling pathways are cell-specific. *J Biol Chem* 279, 47298-47310 (2004)
- (135) Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD: Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 which mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Miner Res* 13, 1353-1359 (1998)

- (136) Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD, Safford SE: Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D₃-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7392-7397 (2004)
- (137) Nguyen TM, Lieberherr M, Fritsch J, Guillozo H, Alvarez ML, Fitouri Z, Jehan F, Garabedian M: The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *J Biol Chem* 279, 7591-7597 (2004)
- (138) Nolan T, Hands RE, Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1, 1559-1582 (2006)
- (139) Norman AW, Bishop JE, Bula CM, Olivera CJ, Mizwicki MT, Zanello LP, Ishida H, Okamura WH: Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃. *Steroids* 67, 457-466 (2002)
- (140) Norman AW: From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 88, 491S-499S (2008)
- (141) Osborne JE, Hutchinson PE: Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *Br J Dermatol* 147, 197-213 (2002)
- (142) Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Munoz A: Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 154, 369-387 (2001)
- (143) Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, Goltzman D: Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 279, 16754-16766 (2004)
- (144) Paul J: Zell- und Gewebekulturen. 5. Aufl., 9-121, de Gruyter, Berlin, 1980
- (145) Peehl DM, Seto E, Hsu JY, Feldman D: Preclinical activity of ketoconazole in combination with calcitriol or the vitamin D analogue EB 1089 in prostate cancer cells. *J Urol* 168, 1583-1588 (2002)
- (146) Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, Seto E, Krishnan AV, Brooks JD, Feldman D: Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 131-141 (2004)
- (147) Peng L, Malloy PJ, Feldman D: Identification of a functional vitamin D response element in the human insulin-like growth factor binding protein-3 promoter. *Mol Endocrinol* 18, 1109-1119 (2004)
- (148) Pols HA, Birkenhager JC, Schilte JP, Visser TJ: Evidence that the self-induced metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 limits the homologous up-regulation of its receptor in rat osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 970, 122-129 (1988a)
- (149) Pols HA, van Leeuwen JP, Schilte JP, Visser TJ, Birkenhager JC: Heterologous up-regulation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by parathyroid hormone (PTH) and PTH-like peptide in osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 588-594 (1988b)
- (150) Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* 221, 1181-1183 (1983)
- (151) Racz A, Barsony J: Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem* 274, 19352-19360 (1999)

- (152) Reichrath J, Rafi L, Muller SM, Mink D, Reitnauer K, Tilgen W, Schmidt W, Friedrich M: Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in cervical carcinoma. *Histochem J* 30, 561-567 (1998)
- (153) Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-160 (1997)
- (154) RKI (Robert Koch-Institut): Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren – Empfehlung und Begründung. *Epidemiologisches Bulletin* 12, 2007. <http://www.rki.de/> (Tag des Zugriffs: 03.12.08)
- (155) RKI, GEKID (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe, Berlin, 2010
- (156) Rohe B, Safford SE, Nemere I, Farach-Carson MC: Identification and characterization of 1,25D₃-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D₃-MARRS)-binding protein in rat IEC-6 cells. *Steroids* 70, 458-463 (2005)
- (157) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354 (1985)
- (158) Schuster I, Egger H, Reddy GS, Vorisek G: Combination of vitamin D metabolites with selective inhibitors of vitamin D metabolism. *Recent Results Cancer Res* 164, 169-188 (2003)
- (159) Schutzbank TE, Stern HJ: Principles and applications of the polymerase chain reaction. *J Int Fed Clin Chem* 5, 96-105 (1993)
- (160) Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF: Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-hydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 391-395 (1998)
- (161) Schwartz GG, Eads D, Rao A, Cramer SD, Willingham MC, Chen TC, Jamieson DP, Wang L, Burnstein KL, Holick MF, Koumenis C: Pancreatic cancer cells express 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and their proliferation is inhibited by the prohormone 25-hydroxyvitamin D₃. *Carcinogenesis* 25, 1015-1026 (2004)
- (162) Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, Larsson D, Hardin RR, Bingham V, Lopez D, Dean DD, Boyan BD: 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 143, 2775-2786 (2002)
- (163) Sergeev IN: Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 419-425 (2004)
- (164) Simpson RU, Thomas GA, Arnold AJ: Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and activities in muscle. *J Biol Chem* 260, 8882-8891 (1985)
- (165) Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D: Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D₃ receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 132, 1952-1960 (1993)
- (166) Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF: Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 206, 1188-1190 (1979)
- (167) Stumpf WE: Vitamin D--solitrol the heliogenic steroid hormone: somatotrophic activator and modulator. Discoveries from histochemical studies lead to new concepts. *Histochemistry* 89, 209-219 (1988)

- (168) Sundaram S, Sea A, Feldman S, Strawbridge R, Hoopes PJ, Demidenko E, Binderup L, Gewirtz DA: The combination of a potent vitamin D3 analog, EB 1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 9, 2350-2356 (2003)
- (169) Sutton AL, MacDonald PN: Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 17, 777-791 (2003)
- (170) Swami S, Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D: Genistein potentiates the growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in DU145 human prostate cancer cells: role of the direct inhibition of CYP24 enzyme activity. *Mol Cell Endocrinol* 241, 49-61 (2005)
- (171) Tangrea J, Helzlsouer K, Pietinen P, Taylor P, Hollis B, Virtamo J, Albanes D: Serum levels of vitamin D metabolites and the subsequent risk of colon and rectal cancer in Finnish men. *Cancer Causes Control* 8, 615-625 (1997)
- (172) Theodoropoulos C, Demers C, Mirshahi A, Gascon-Barre M: 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) downregulates the rat intestinal vitamin D(3)-25-hydroxylase CYP27A. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E315-E325 (2001)
- (173) Theodoropoulos C, Demers C, Delvin E, Menard D, Gascon-Barre M: Calcitriol regulates the expression of the genes encoding the three key vitamin D3 hydroxylases and the drug-metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58, 489-499 (2003a)
- (174) Theodoropoulos C, Demers C, Petit JL, Gascon-Barre M: High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E138-E147 (2003b)
- (175) Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR: Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions. *J Biol Chem* 273, 8483-8491 (1998)
- (176) Tokar EJ, Webber MM: Chemoprevention of prostate cancer by cholecalciferol (vitamin D3): 25-hydroxylase (CYP27A1) in human prostate epithelial cells. *Clin Exp Metastasis* 22, 265-273 (2005a)
- (177) Tokar EJ, Webber MM: Cholecalciferol (vitamin D3) inhibits growth and invasion by up-regulating nuclear receptors and 25-hydroxylase (CYP27A1) in human prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 22, 275-284 (2005b)
- (178) Tong WM, Hofer H, Ellinger A, Peterlik M, Cross HS: Mechanism of antimitogenic action of vitamin D in human colon carcinoma cells: relevance for suppression of epidermal growth factor-stimulated cell growth. *Oncol Res* 11, 77-84 (1999)
- (179) Townsend K, Banwell CM, Guy M, Colston KW, Mansi JL, Stewart PM, Campbell MJ, Hewison M: Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin Cancer Res* 11, 3579-3586 (2005)
- (180) Trump DL, Hershberger PA, Bernardi RJ, Ahmed S, Muindi J, Fakhri M, Yu WD, Johnson CS: Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 519-526 (2004)
- (181) van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ: Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G78-G85 (2003)
- (182) Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G: Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13324-13329 (2001)

- (183) van den Bemd GJ, Chang GT: Vitamin D and vitamin D analogs in cancer treatment. *Curr Drug Targets* 3, 85-94 (2002)
- (184) Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Wieder R: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 60, 2040-2048 (2000)
- (185) Wang Q, Wang X, Studzinski GP: Jun N-terminal kinase pathway enhances signaling of monocytic differentiation of human leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Cell Biochem* 89, 1087-1101 (2003)
- (186) Webb AR, Kline L, Holick MF: Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 373-378 (1988)
- (187) Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ: Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 133, 2425S-2433S (2003)
- (188) Windaus A, Schenk F, Werder FV: Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydrocholesterol. *Z Physiol Chem* 241, 100-103 (1936)
- (189) Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ: Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol* 271, F203-F208 (1996)
- (190) Xie SP, Pirianov G, Colston KW: Vitamin D analogues suppress IGF-I signalling and promote apoptosis in breast cancer cells. *Eur J Cancer* 35, 1717-1723 (1999)
- (191) Zanello LP, Norman AW: Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1589-1594 (2004)
- (192) Zhang X, Jiang F, Li P, Li C, Ma Q, Nicosia SV, Bai W: Growth suppression of ovarian cancer xenografts in nude mice by vitamin D analogue EB1089. *Clin Cancer Res* 11, 323-328 (2005)
- (193) Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF: Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 900-902 (1994)
- (194) Zierold C, Reinholz GG, Mings JA, Prahl JM, DeLuca HF: Regulation of the porcine 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase (CYP24) by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone in AOK-B50 cells. *Arch Biochem Biophys* 381, 323-327 (2000)

7 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Klaus Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Arbeitsmaterialien und -geräte.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Privat-Dozent Dr. rer. nat. Frank Köster für die große Hilfsbereitschaft und die fachlich kompetente Betreuung während aller Phasen der Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. med. Michael Friedrich gebührt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas. Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei ihm und Frau Privat-Dozentin Dr. med. Dagmar Diesing für die gute Zusammenarbeit während der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit bedanken.

Zu ganz besonderem Dank bin ich Frau Privat-Dozentin Dr. med. Dorothea Fischer für die stets unverzügliche, zuverlässige und akkurate Hilfe während der Abfassung der Dissertation verpflichtet. Durch ihren geduldigen Beistand hat sie maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Frauenklinik für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei der praktischen Arbeit bedanken, dies gilt insbesondere für Frau Birte Münchow.

In Dankbarkeit verbunden bin ich meinen Eltern, sie haben mir alles ermöglicht.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Kloß
Geburtsdatum	30.04.1980
Geburtsort	Geesthacht
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch



Schulische Ausbildung

08/86 - 06/90	Grundschule Schwarzenbek
08/90 - 06/99	Gymnasium Schwarzenbek
06/99	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/99 - 06/00	Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus Hamburg
---------------	--

Studium und Promotion

10/00 - 12/07	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
02/03	Ärztliche Vorprüfung, Note: 2,66
02/06 - 01/07	Praktisches Jahr
12/07	Ärztliche Prüfung, Note: 2,0
seit 01/06	Promotion

Berufliche Tätigkeit

seit 10/10	Assistenzarzt, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
------------	---

9 Publikationsliste

Kloss M, Fischer D, Thill M, Friedrich M, Cordes T, Salehin D, Diedrich K, Köster F: Vitamin D, calcidiol and calcitriol regulate vitamin D metabolizing enzymes in cervical and ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 30, 4429-4434 (2010)