

**MDM2 (Murine Double Minute 2 homolog)
bindet und inhibiert den Vitamin D
Rezeptor**

von Tessa Carina Heil

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

MDM2 (Murine Double Minute 2 homolog) bindet
und inhibiert den Vitamin D Rezeptor

von Tessa Carina Heil
aus Saarbrücken

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der
kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Ralf Mueller

Angefertigt am José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar

Mentor: Professor Dr. Klaus Roemer

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Mueller

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertlböck

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Eltern und meine Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Vitamin D	3
1.1. Vitamin D: chemische Struktur und Eigenschaften	3
1.2. Vitamin D Synthese	5
1.3. Regulation der Vitamin D Synthese	10
1.4. Vitamin D Funktion im Darm	13
1.5. Vitamin D Funktion in der Niere	15
1.6. Vitamin D Funktion am Knochen	17
1.7. Abbau von Vitamin D	19
1.8. Vitamin D Synthese und Regulation bei Hunden	19
2. Der Vitamin D Rezeptor (VDR)	21
2.1. Aufbau des VDR	21
2.2. Aktivierung und Regulation des VDR	23
3. MDM2 (Murine Double Minute 2 homolog)	28
3.1. Struktur von MDM2	28
3.2. MDM2, eine E3-Ubiquitin-Ligase	30
3.3. Funktion von MDM2 im Kontext der p53 Familie von Transkriptionsfaktore	31
4. Zielsetzung der Arbeit	33
III. MATERIAL UND METHODEN	35
1. Material	35
1.1. Allgemeine Reagenzien und Lösungen	35
1.2. Arbeitspuffer	36
1.3. Enzyme für die Zellkultur und die qRT-PCR	37
1.4. Molekulargewichts- und Größenmarker	37
1.5. Zelllinien	39
1.6. Lösungen und Nährmedien für die Zellkultur	39
1.7. Arbeitsmaterialien für die Zellkultur	41

1.8.	Plasmide	41
1.9.	Small interfering RNA's (siRNA's)	41
1.10.	Synthetische Oligonukleotide („Primer“) für die qRT-PCR	42
2.	Methoden	43
2.1.	Zellkultur	43
2.1.1.	Kultivierung von H1299-Zellen	43
2.1.2.	Kultivierung von CaCo-Zellen	44
2.1.3.	Einfrieren und Auftauen der H1299- und der CaCo-Zellen	44
2.1.4.	Zellzahlbestimmung und Lebend-Tot-Differenzierung mittels Neubauer-Kammer	45
2.1.5.	Transiente Transfektion mit Hiperfect (Qiagen)	45
2.1.6.	Behandlung der Zellen mit dem Liganden 1,25 D	46
2.2.	Proteintechniken	47
2.2.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten und Bestimmung der Proteinkonzentration	47
2.2.1.1.	Zellernte und Zelllyse	47
2.2.1.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.2.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	49
2.2.2.1.	Herstellung eines SDS-Gels	50
2.2.3.	Western-Blot	51
2.2.3.1.	Proteintransfer und immunologischer Nachweis der übertragenen Proteine	52
2.2.3.1.	„Stripping“: Entfernung gebundener Antikörper	53
2.2.4.	In-vivo-Ubiquitinierung	54
2.2.5.	Co-Immunpräzipitation und sequentielle Immunpräzipitation	55
2.3.	RNA-Techniken	57
2.3.1.	RNA-Präparation als Vorbereitung für die Umschreibung in cDNA	57
2.3.2.	Umschreibung der RNA in cDNA mittels Reverser Transkription	58
2.4.	DNA-Techniken	59
2.4.1.	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	59
IV.	ERGEBNISSE	63
1.	Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) bindet an MDM2	63

2.	Antikörper-Spezifisierung zur Erkennung des endogenen VDR: Nachweisbarkeit des Rezeptors in H1299- & CaCo-Zellen	66
3.	Transfektion von VDR Plasmid in H1299 Zellen zur Expression des VDR	68
4.	Transfektion der si RNA's VDR8 & VDR9 in H1299 Zellen zur Identifizierung des VDR durch dessen Knockdown	71
5.	Auswirkungen eines MDM2-Knockdowns auf die VDR- Level	74
6.	Der proteasomale Abbau des Vitamin D-Rezeptors	77
7.	Die Ubiquitylierung des Vitamin D-Rezeptors	81
8.	Der VDR als Regulator für die Gene CYP24A1 und SOSTDC1	85
9.	Der VDR als Genregulator unter MDM2-Knockdown	89
V.	DISKUSSION	96
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	104
VII.	SUMMARY	105
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	106
IX.	ANHANG	128
1.	Abbildungsverzeichnis	128
2.	Tabellenverzeichnis	130
X.	DANKSAGUNG	131

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	„Bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaCo	humane Colonadenokarzinomzellen
cDNA	"complementary DNA", Komplementäre DNA
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
DBD	DNA-Bindedomäne
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"Desoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	"enhanced chemoluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol
For	Forward
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

H1299	humane Lungenadenokarzinomzellen
h	Stunde
HA-ub.	HA-Ubiquitin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
μ	Mikro
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli
M	Molar
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog
min	Minute
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N-	Amino-
NLS	Kernlokalisationsignal
nM	Nanomol
nm	Nanometer
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	"Phosphate buffered saline", Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	potentia Hydrogenii
PTH	Parathormon
Pox	Peroxidase
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion
Rev	Reverse

RNA	"Ribonucleic acid", Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin D Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
&	und

I. EINLEITUNG

Die Heilung der Rachitis wurde erstmals 1918 von Mellanby bei Hunden beschrieben. Er fütterte Hunde mit Haferflocken, bis diese klinische und radiologische Anzeichen einer Rachitis wie z.B gekrümmte, gebogene Knochen, dünne Kortexe und vergrößerte Epiphysenfugen entwickelten, ähnlich zur Rachitis bei Kindern (A).

Mc Collum et al. entdeckten 1922, dass diese Skeletterkrankung durch Lebertran, welcher eine Substanz enthält, die später als Vitamin D bekannt wurde, verhindert und sogar geheilt werden konnte (B). 1919 zeigte Huldshinsky mit einer unabhängigen Studie, dass Sonnenlicht Rachitis bei Kindern abwenden konnte und Steenbock und Hart demonstrierten 1913 die Heilung dieser Erkrankung durch die UV-Strahlen der Sonne bei Ziegen (C,D).

Diese Studien waren der Anstoß für die Erforschung von Vitamin D und seiner Beteiligung am Kalzium-Stoffwechsel und an der Skelettentwicklung bei den verschiedensten Spezies.

Die Entdeckung des endokrinen Vitamin D-Systems und des Vitamin D-Rezeptors (VDR) für das Hormon $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ führte zu einem neuen Verständnis der Beziehung zwischen Vitamin D und den metabolischen Knochenerkrankungen, der Rachitis bei Kindern bzw. der Osteomalazie bei Erwachsenen.

Viele wissenschaftliche Studien demonstrierten zwischenzeitlich die Interaktion dieses Hormons mit seinem nukleären Vitamin D-Rezeptor aus der Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren und zeigten, dass dieser Rezeptor auch in Geweben lokalisiert ist, welche keine ausschlaggebende Rolle im Knochen- & Mineralstoffwechsel des Organismus spielen.

Nach dem heutigen Stand der Forschung wird dem Vitamin D Hormon eine große Bedeutung bei der Unterdrückung und der Prävention zahlreicher Krankheiten zugeschrieben.

Ziel der Arbeit war es, grundlegende neue Erkenntnisse über den Zusammenhang von Vitamin D und der Inhibition der Entwicklung von Tumoren zu gewinnen. Eine vergleichsweise noch wenig verstandene der zahlreichen Funktionen des Vitamin D Rezeptors ist die eines Tumorsuppressors. Das der VDR aber als ein solcher wirkt und in dieser Funktion auch mit dem bekannten Tumorsuppressor p53 interagieren kann, ist unumstritten. Einer der bedeutendsten Negativ-regulatoren von p53 - und damit ein potentes Onkoprotein - ist MDM2. Es lag deshalb Nahe zu mutmaßen, dass MDM2 auch ein negativer Regulator des VDR sein könnte. Auf diese Weise würde es beide Tumorsuppressoren (p53 und VDR) inhibieren können. Darüber hinaus würde eine solche neue Interaktion auch einen neuen Signalweg identifizieren, über den die p53- und VDR-Signalwege miteinander kommunizieren, denn sowohl p53 als auch VDR vermögen das MDM2-Gen kontextabhängig zu stimulieren. Diese Interaktion nachzuweisen ist im Rahmen der vorliegenden Dissertation gelungen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Vitamin D

1.1. Vitamin D: chemische Struktur und Eigenschaften

Vitamine sind Verbindungen die der Körper nicht selbst synthetisieren kann, die aber zum Leben benötigt werden und daher mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Da die Vorstufe von Vitamin D, das 7-Dehydrocholesterol, jedoch vom Organismus selbst hergestellt wird und durch UVB - Strahlen des Sonnenlichts die endogene Synthese im Körper beginnt, wird Vitamin D nur aus historischen Gründen als Vitamin bezeichnet.

Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften wird die aktive Form von Vitamin D, $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃, auch Calciferol genannt, der Gruppe der Secosteroide zugeordnet. Sein Grundgerüst besteht aus drei Sechseringen und einem Fünfering mit jeweils unterschiedlichen Substituenten und ist daher strukturell den klassischen Steroidhormonen sehr ähnlich (Abb. 1).

Im Allgemeinen unterscheidet man 2 Vitamin D Typen: Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und Vitamin D₃ (1,25D oder Calciferol), die sich strukturell hinsichtlich ihres Sterolgerüsts unterscheiden. Ergocalciferol unterscheidet sich vom Cholecalciferol lediglich durch den Besitz einer Doppelbindung sowie einer zusätzlichen Methylgruppe in der Seitenkette (1).

Vitamin D₂ wird in Pflanzen durch Sonnenlicht aus der Vorstufe Ergosterol gebildet und gelangt durch pflanzliche Nahrungsaufnahme in den menschlichen und tierischen Organismus.

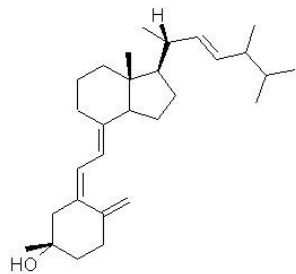
Vitamin D₃ hingegen kann entweder über die Nahrung aufgenommen und im Dünndarm resorbiert werden oder aber in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol, welches endogen aus Cholesterin synthetisiert wird, über eine nicht enzymatische UV-Licht abhängige Reaktion gebildet werden.

Beide, sowohl Ergocalciferol als auch Cholecalciferol, entstehen aus ihren Provitaminen Ergosterol bzw. 7-Dehydroxycholesterol durch eine durch die UV-Strahlung des Sonnenlichts katalysierte Spaltung des Ringes B des Steranskeletts (1).

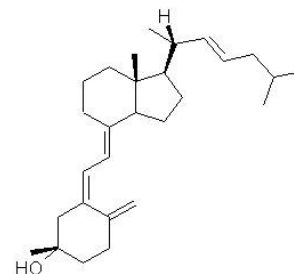
Vitamin D₂ und D₃ sind jedoch biologisch inaktiv und müssen zunächst über die 1 α -Hydroxylierung im Organismus aktiviert werden. Der anschließende Transport zu den verschiedenen Zielorganen über den Blutweg erfolgt gebunden an das sog. Vitamin D Bindungsprotein (DBP). Erst durch Enzym-katalysierte Hydroxylierungen in Leber und Niere wird aus dem biologisch inaktiven Vitamin D₃ der biologisch aktive Metabolit 1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol (1,25D) (2,3,4).

1,25 D zirkuliert, gebunden an das Vitamin D Bindungsprotein (DBP), zu verschiedenen Zielgeweben um seine endokrinen Wirkungen auszuüben, die durch den Vitamin D Rezeptor (VDR) vermittelt werden (5). Der VDR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren, welcher nach Bindung an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotor-Region von Zielgenen, die Expression dieser Gene reguliert und somit aktiv in Stoffwechselforgänge eingreift (6).

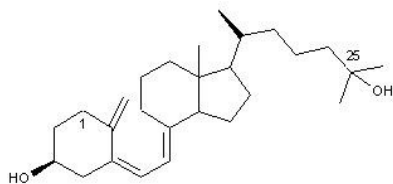
Aufgrund der zahlreichen Eigenschaften und Funktionen von Vitamin D im menschlichen und tierischen Stoffwechsel, wird Vitamin D auch als Hormon bezeichnet (2,7).



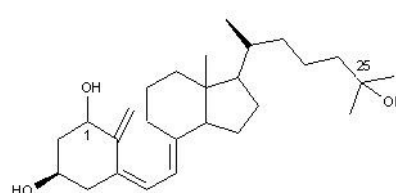
Vitamin D2



Vitamin D3



25D



1,25D

Abbildung 1: Metaboliten des Vitamin D Stoffwechsels und ihre strukturellen Unterschiede (8). 25D = 25(OH)2D3, 25-Dihydroxyvitamin D3, Calcidiol ; 1,25D = 1 α ,25D, 1,25(OH)2D3, 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol, 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3, Calcitriol ; Vitamin D2 = Ergocalciferol ; Vitamin D3 = Cholecalciferol

1.2. Vitamin D Synthese

1,25D wird in einem stark regulierten mehrstufigen Prozess synthetisiert (9). Der hormonelle Vorläufer Vitamin D3 (Cholecalciferol) kann entweder über die Nahrung aufgenommen werden z.B. aus angereicherten Milchprodukten und

Fischölen, oder aber in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol durch UV-Bestrahlung des Sonnenlichts synthetisiert werden (2,9,10) (Abb.2 a),b)). In Nordamerika und Europa deckt die Vitamin D3 Aufnahme über die Nahrung jedoch nur einen kleinen Teil des Vitamin D3 Bedarfs ab, da viele Lebensmittel wie Milchprodukte, Fische, Eier und auch angereicherte LM nur geringe Mengen an Vitamin D enthalten (11).

Des Weiteren hängt die Menge des aus 7-Dehydrocholesterol gebildeten Vitamin D in der Haut auch stark von der Intensität der UV-Bestrahlung ab, die jedoch mit der Jahreszeit und der geographischen Breite sehr stark variiert (12); wobei Sonnenschutzmittel und das Tragen von Kleidung die Umwandlung von 7-DHC zu Vitamin D3 verhindern (13,14).

Trotzdem ist die Vitamin D Hauptquelle des Menschen die UV-Licht abhängige Umwandlung von 7-DHC in der Epidermis, mit höchster Konzentration im Stratum spinosum und Stratum basale, zu Prävitamin D3, welches zu Vitamin D3 isomerisiert (15) (Abb.2 a)).

7-Dehydrocholesterol wird in der Leber mit Hilfe der Cholesterolhydrogenase aus Cholesterol synthetisiert und gelangt über den Blutstrom, aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften an Transportproteine gebunden, in die Keratinozyten der Haut. Durch die Einwirkung der UVB-Strahlung mit einer Wellenlänge von 290-315 nm kommt es zu einer photochemischen Reaktion, die die Umwandlung von 7-DHC zu Prävitamin D3 zur Folge hat (12,16). Diese Reaktion bewirkt den Aufbruch des B-Ringes des Sterangerüsts im 7-DHC zwischen dem Kohlenstoffatomen C9 & C10. Da Prävitamin D3 jedoch instabil ist, isomerisiert es innerhalb von wenigen Stunden zum stabilen Vitamin D3 (17).

Damit das in der Haut gebildete Vitamin D3 jedoch biologisch aktiv werden kann um zahlreiche Wirkungen auf diverse physiologische Funktionen auszuüben, wie z.B. die Wachstumshemmung von Krebszellen und der Schutz gegen bestimmte Autoimmunerkrankungen, muss es zunächst in seine aktive Form überführt werden (18,19).

Vitamin D wird, wie alle Vitamin D Metaboliten, im Plasma hauptsächlich an das Vitamin D Bindungsprotein (DBP), ein spezifisches Bindungsprotein für Vitamin D & seine Metaboliten, und an Albumin gebunden zur Leber transportiert (Abb. 2 c)).

In der Leber werden die D-Vitamine, entweder Vitamin D₃ das in der Haut gebildet wurde oder Vitamin D₂ & D₃ welche mit der Nahrung aufgenommen wurden, durch Enzyme mit 25-Hydroxylaseaktivität zu 25D hydroxyliert (Abb. 2 d)).

Vitamin D₃ wird am Kohlenstoffatom C₂₅ der Seitenkette hydroxyliert. Die für diese Hydroxylierung erforderlichen Enzyme sind die Vitamin D-25-Hydroxylase (25(OH)ase), ein mitochondriales Cytochrom P450 Enzym und das mikrosomale Enzym der P450 Gruppe, CYP2R1 (20-22, 25). Da jedoch eine homozygote Mutation des CYP2R1 Gen bei Patienten mit niedrigen 25D Blutspiegeln und klassischen Symptomen eines Vitamin D Mangels gefunden wurde, scheint das für diese Hydroxylierung entscheidende Schlüsselenzym CYP2R1 zu sein (23). Das in der Leber entstandene 25-Hydroxyvitamin D₃ (25 D) ist die wichtigste zirkulierende Form von Vitamin D₃ und wird im Leber-& Fettgewebe gespeichert oder gebunden an das DBP im Blut zur Niere transportiert (24).

Der letzte Schritt der Vitamin D Synthese findet hauptsächlich, aber nicht ausschließlich in der Niere über eine streng regulierte 1 α -Hydroxylierungsreaktion statt, wobei schließlich das biologisch aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25D) entsteht (Abb. 2 e)). Der Vorläufer dieses aktiven Vitamin D Hormons, also 25D, scheint in physiologischen Konzentrationen keine eigene Funktion zu besitzen, sondern dient vor allem in den proximalen tubulären Konvolutzellen der Niere zur Bildung von 1,25D (26).

Im proximalen Tubulus der Niere wird 25D an Position C₁ des A-Rings durch die mitochondriale 1 α -Hydroxylase (25-Hydroxyvitamin D-1-Hydroxylase, 1 α -OHase, CYP27B1) hydroxyliert (27), welche in der Niere streng durch den Bedarf an Kalzium und Phosphat geregelt wird (28). Die Cytochrom P450

Monooxygenase 25D 1 α -Hydroxylase, welche 25D zu 1,25D metabolisiert, wurde neben ihrer Lokalisation in der Niere auch in extrarenalen Geweben, einschließlich Plazenta, Makrophagen und Monozyten nachgewiesen (29-32).

1,25 Dihydroxyvitamin D₃ (1,25D) ist für die meisten, wenn auch nicht alle, der biologischen Wirkungen von Vitamin D im Organismus verantwortlich. Da die Vitamin D Metaboliten lipophil sind und eine geringe Löslichkeit im Blut besitzen, zirkuliert auch das gebildete 1,25D im Blutstrom gebunden zu 99% an Plasmaproteine, wobei zu 88% das DBP und zu 11-12% Albumin eine Rolle spielen, zu den verschiedenen Zielgeweben, um seine endokrinen Wirkungen, welche über den Vitamin D Rezeptor vermittelt werden, auszuüben.

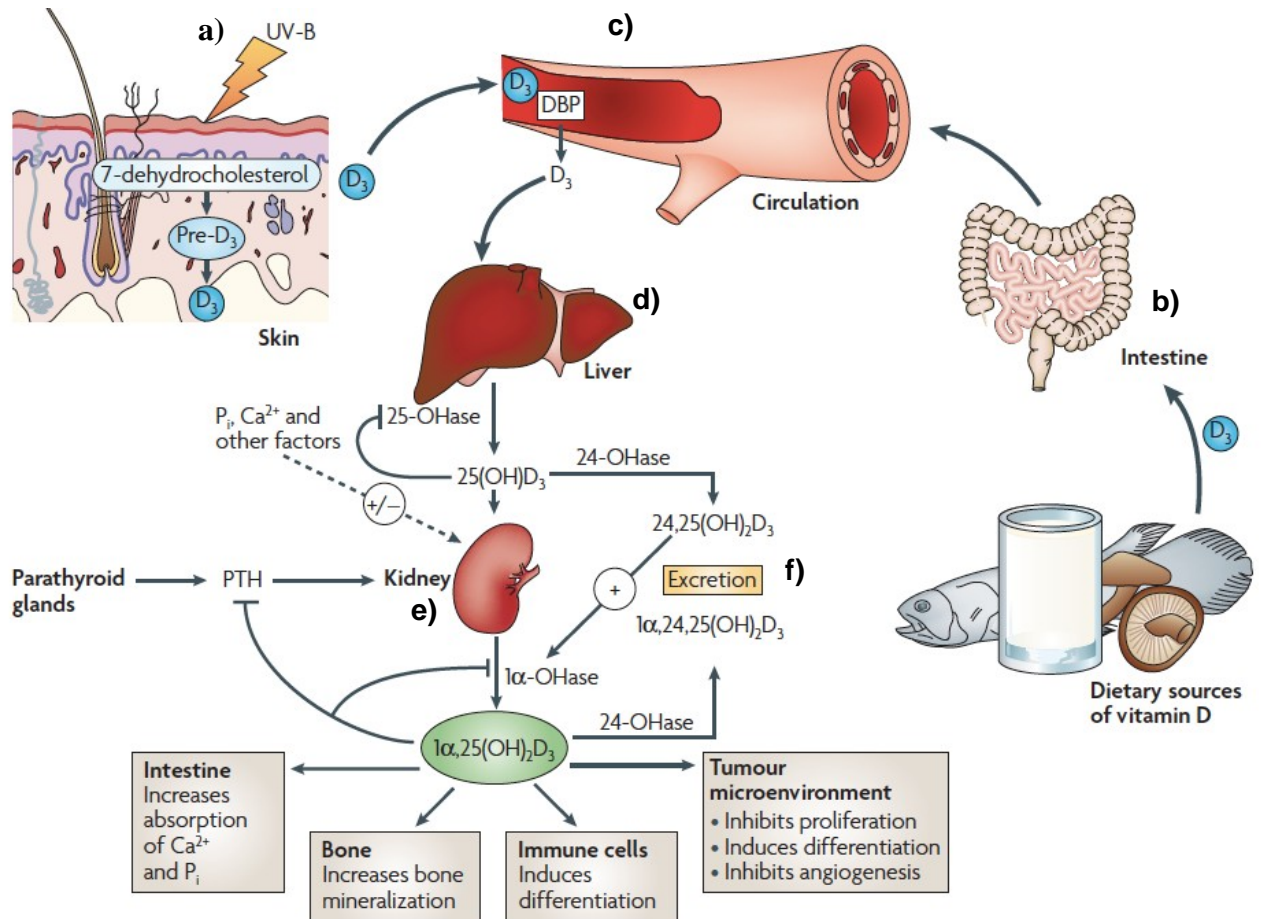


Abbildung 2: Vitamin D Metabolismus modifiziert (9).

- Photochemische Synthese von Vitamin D₃ in der Haut mit anschließender Isomerisierung von Prävitamin D₃ zum stabilen Vitamin D₃
- Intestinale Resorption von Vitamin D₃ aus natürlichen oder angereicherten Lebensmitteln
- Bindung und Transport von Vitamin D₃ ans das DBP in der Blutzirkulation
- C25-Hydroxylierung des Vitamin D₃ in der Leber durch die 25(OH)ase mit daraus resultierender Bildung von 25D
- 1α-Hydroxylierung von 25D in der Niere durch die 1α-OHase mit Entstehung des aktiven Metaboliten 1,25D, dessen Synthese durch PTH stimuliert und von Ca²⁺, Pi und 1,25D selbst unterdrückt wird
- Abbau von 25D und 1,25D zu 24,25(OH)D₃ und 1α,24,25(OH)₂D₃ durch eine 24-Hydroxylierung der 24-OHase, welche nun anschließend ausgeschieden werden

Pre-D₃ = Prävitamin D₃; D₃ = Vitamin D₃; DBP = Vitamin D-bindendes Protein; 25-OHase = 25-Hydroxylase, 25(OH)ase; 24-OHase = 24-Hydroxylase; 1α-OHase = 1α-Hydroxylase; 25(OH)D₃ = 25D; 1α,25(OH)₂D₃ = 1,25D; 24,25(OH)₂D₃ = 24,25D; Pi = Phosphat; PTH = Parathormon

1.3. Regulation der Vitamin D Synthese

Viele der seit langem bekannten Funktionen von 1,25D betreffen die Regulierung des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels, die Erhöhung dieser Ionen im Blut durch intestinale Absorption und renale Reabsorption um die Knochenmineralisation zu erleichtern, sowie die Aktivierung der Knochenresorption als Teil des Skelettaufbaus (33). Um einem Abfall des Plasma Ca^{2+} -Spiegels entgegenzuwirken, können die Calciferole auf verschiedene Art und Weise z.B. durch vermehrte intestinale Ca-Resorption, durch gesteigerte renale Ca-Reabsorption und/oder durch gesteigerte Mobilisation von Kalzium aus den Knochen eingreifen (6).

Die Regulation der renalen Vitamin D Synthese erfolgt vorwiegend durch Ca^{2+} , P, PTH (Parathormon) und 1,25D selbst (Abb. 3). Durch die im Organismus weit verbreiteten Wirkungen von 1,25D benötigt dieses eine strenge Regulierung seiner Bioverfügbarkeit und einen Prozess zur Aktivierung und Deaktivierung, welcher durch eine Reihe von negativen und positiven Feedbackmechanismen erfolgt. Diese bewirken wiederum ihrerseits eine Veränderung in der Expression der renalen Hydroxylaseenzyme in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand des Körpers (34,35).

Niedrige Ca^{2+} - & P-Spiegel führen zu einer verstärkten Aktivität der 1α -Hydroxylase (19) und ein erhöhter Parathormonspiegel ist ebenfalls ein Signal welches die Induktion der 1,25D Synthese in der Niere vermittelt (36-38), da auch dieses die Transkription der 1α -Hydroxylase stimuliert (39-41). Die Aktivierung der 1α -Hydroxylaseproduktion in der Niere wird somit auch durch PTH gesteuert.

Als Reaktion auf niedrige Serum- Ca^{2+} Spiegel sezerniert die Nebenschilddrüse PTH, welches die Transkription dieser renalen Hydroxylase stimuliert und somit die Produktion von 1,25D hervorruft (Abb.3). Auch sehr niedrige Blut-P Spiegel erhöhen die Expression der 1α -Hydroxylase (42). Niedrige Parathormonspiegel wiederum führen zu einem parallelen Abfallen der intrazellulären cAMP-

Konzentration, was die Bildung der 1α -Hydroxylase stoppt und den Abbau von $1,25D$ durch die 24 -Hydroxylase induziert (39,41).

Somit unterdrückt $1,25D$ die PTH-Produktion (43) und reguliert die 1α -Hydroxylase negativ (44,45,38). Ebenso hemmt $1,25D$ seine eigene Synthese über einen negativen Feedbackmechanismus (Abb.3).

Im Vergleich zur Regulierung der 1α -Hydroxylase, wird die 24 -Hydroxylase umgekehrt reguliert d.h. sie wird stimuliert durch $1,25D$ und inhibiert durch niedriges Ca^{2+} & PTH (19). Zusätzlich stimuliert $1,25D$ direkt die intestinale Ca^{2+} - & P-Absorption und ist zusammen mit dem Parathormon im distalen Nierentubulus erforderlich, um die Ca^{2+} -Reabsorption zu erhöhen.

Zusätzlich zu Ca^{2+} , P, PTH und $1,25D$ spielt auch der Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF23), ein phosphaturischer Faktor, der die renale Phosphatexkretion durch Senkung der Rückresorption im proximalen Tubulus begünstigt, eine entscheidende Rolle als physiologischer Regulator im Vitamin D Stoffwechsel (46). Durch seine Identifizierung als ursächlicher Faktor bei einer Reihe von Krankheiten wurde gezeigt, dass der FGF23 ein signifikanter Regulator der Phosphat-Homöostase und der Vitamin D Biosynthese ist (47-50). Er reguliert ebenfalls die Expression der Enzyme 1α -Hydroxylase und 24 -Hydroxylase (51).

$1,25D$ verursacht die Sekretion von FGF23 im Knochen (52,53) und stimuliert die Phosphatausscheidung, was wiederum aufgrund einer daraus resultierenden Erhöhung des Serum- Ca^{2+} Spiegels zur Unterdrückung der PTH-Produktion führt.

Erhöhtes FGF23 unterdrückt die Expression der 1α -Hydroxylase und induziert die 24 -Hydroxylase in der Niere (54). Durch Hemmung der Synthese und Förderung des $1,25D$ Katabolismus bewirkt der FGF23 eine Reduktion des $1,25D$ Spiegels, was die FGF23 Expression im Knochen reduziert und somit eine negative Rückkopplungsschleife zw. FGF23 und dem endokrinen Vitamin D System entsteht (54).

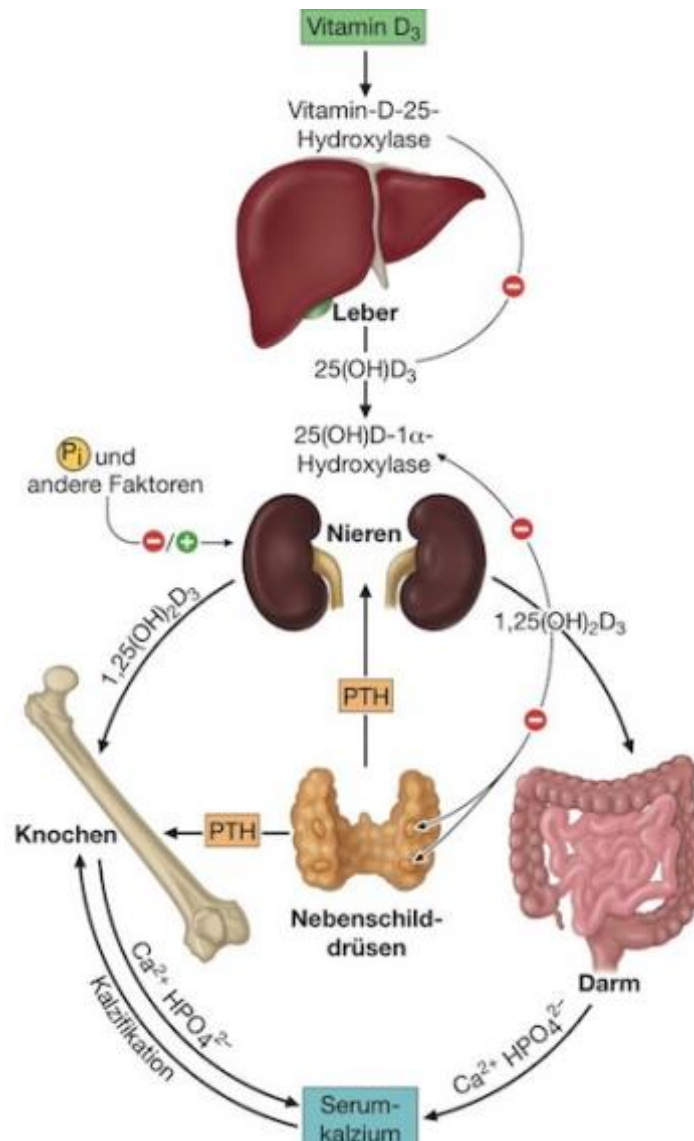


Abbildung 3: Regulation der Vitamin D Synthese durch Ca²⁺, P, PTH und 1,25D (55). Ein Abfall des Serum-Ca²⁺ Spiegels bewirkt einen Anstieg der PTH-Sekretion, wodurch zusätzliches Ca²⁺ aus dem Knochen mobilisiert wird. Außerdem steigert PTH die Synthese von 1,25D in der Niere, welches wiederum Ca²⁺ aus dem Knochen freisetzt, dessen Absorption aus dem Darm steigert und die Parathormonbildung durch eine negative Rückkopplung hemmt. Vitamin-D-25-Hydroxylase = 25(OH)ase, 25-Hydroxylase; 25(OH)D-1α-Hydroxylase = 1α-Hydroxylase; 25(OH)D₃ = 25D; 1,25(OH)₂D₃ = 1,25D; PTH = Parathormon; Pi = Phosphat; HPO₄²⁻ = Hydrogenphosphat

1.4. Vitamin D Funktion im Darm

Die Hautwirkung von 1,25D im Dünndarm ist die Stimulation bzw. Förderung der Ca^{2+} -Absorption, ein Vorgang der beim Tier transzellulär im Duodenum und parazellulär im distalen Jejunum und Ileum erfolgt. Der parazelluläre Transport von Ca^{2+} dominiert bei nicht abgesetzten Neonaten, bei alternden Tieren und bei hoher Ca^{2+} -Zufuhr mit der Nahrung (5). Somit dient der Dünndarm als Ort der enteralen Ca^{2+} -und Phosphatabsorption, welche durch aktive und passive Mechanismen bewerkstelligt wird.

Im proximalen Anteil des Dünndarms findet bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen ein sättigbarer, transzellulärer Transportmechanismus statt (56,57). Hierbei wandern die Ca^{2+} -Ionen aufgrund eines elektrochemischen Gradienten zur Bürstensaummembran (BSM) der Enterozyten und werden durch die Ca^{2+} -Kanäle derselben in das Zytoplasma resorbiert, in welchem die Ca^{2+} -Konzentration erniedrigt ist (Abb.4). Calbindin, ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das seine Lokalisation im Zytoplasma aufweist, bindet Ca^{2+} reversibel und transportiert dieses zur basolateralen Zellmembran, wo es unter Zuhilfenahme eines energieverbrauchenden Prozesses und gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle exportiert und ins Blut abgegeben wird (Abb.4).

Die Synthese des intrazellulären Ca^{2+} -bindenden Proteins Calbindin wird durch 1,25D induziert (58).

Die Abgabe von Ca^{2+} aus dem Zytoplasma an die extrazelluläre Flüssigkeit erfolgt mittels einer Ca^{2+} -ATPase (Ca^{2+} -Pumpe), sowie durch einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, welcher durch den transmembranalen Na^+ -Gradienten angetrieben wird (Abb.4). Auch die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase wird von 1,25D induziert und vom VDR vermittelt (59).

Beim sog. parazellulären Transport von Ca^{2+} handelt es sich um einen passiven, sättigbaren Mechanismus, welcher bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen vollzogen wird (56,57).

Da vorwiegend während der Wachstumsphase und der Laktation ein gesteigerter Ca^{2+} -Bedarf im Körper vorliegt, ist in dieser Zeitspanne auch eine gesteigerte Synthese von 1,25-D in der Niere vorhanden, was den Einbau von Ca^{2+} -Kanälen in die BSM und den Einbau von Ca^{2+} -Pumpen in die basolaterale Membran (BLM) fördert (6).

Durch eine gesteigerte Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters (NaPi-Kotransporter) und daraus resultierendem Einbau in die Bürstensaummembran der Enterozyten stimuliert 1,25D ebenfalls die aktive Phosphat-Absorption.

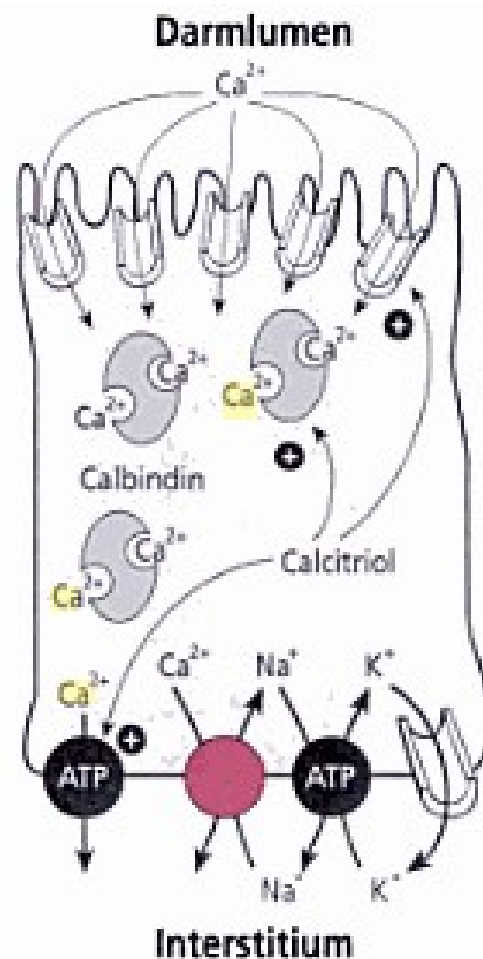


Abbildung 4: Mechanismen der aktiven Ca^{2+} -Resorption in Dünndarmepithelzellen (6). Aktive, transzelluläre Resorption von Ca^{2+} durch den Einstrom ins Zytoplasma über Ca^{2+} -Kanäle der Bürstensaummembran, vermittelt über 1,25D. Anschließend intrazelluläre Bindung an Calbindin und Transport durch die basolaterale Membran über Ca^{2+} -ATPasen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, ATP = Adenosintriphosphat; Calcitriol = 1,25D; Na^+ = Natrium; K^+ = Kalium

1.5. Vitamin D Funktion in der Niere

Im Bezug auf Vitamin D spielt die Niere als Ort der renalen Ca^{2+} - und Phosphatexkretion bzw. Reabsorption und der 1,25D-Synthese zwei entscheidende Rollen im Vitamin D Metabolismus und beteiligt sich somit an der Aufrechterhaltung eines stabilen Plasma- Ca^{2+} -Spiegels.

Im proximalen Tubulus der Niere erfolgt durch die katalytische Wirkung des Enzyms 1α -Hydroxylase (CYP27B1) die Synthese des Hormons 1,25D. Dieses renale Enzym wird unter niedrigen Ca^{2+} -Bedingungen durch PTH induziert und durch 1,25D und FGF23 über einen Feedbackmechanismus, unterdrückt. Die Transkription der 1α -Hydroxylase (CYP27B1) wird folglich in der Niere durch 1,25D gehemmt, gleichzeitig jedoch die 24-Hydroxylase induziert, welche aus 25D den inaktiven Metaboliten 24,25D synthetisiert. Diese 24-Hydroxylase (CYP24A1), ebenfalls ein mitochondriales P450 Enzym, kann sowohl 25D als auch 1,25D hydroxylieren (20). Ihr bevorzugtes Substrat scheint allerdings 1,25D zu sein (60).

Die 1α -Hydroxylase der proximalen Tubulusepithelien wird in Bezug auf die 1,25D-Synthese streng reguliert. Der von der Leber über den Blutweg zur Niere transportierte 25D-DBP-Komplex wird glomerulär filtriert und rückresorbiert. Megalin-Rezeptoren binden diesen Komplex, bestehend aus Transportprotein und 25D, bewirken eine intrazelluläre Freisetzung von 25D und eine daraus resultierende Bindung dessen an intrazelluläre Vitamin D-bindende Proteine (IDBP) und dadurch den anschließenden Transport zur Mitochondrienmembran, dem Verankerungsort der 1α -Hydroxylase, die im Anschluss die Hydroxylierung von 25D zu 1,25D vollzieht (Abb.5). Vitamin D beeinflusst die Synthese der beiden wichtigsten intrazellulären Ca^{2+} -Bindungsproteine, Calbindin D28k & Calbindin D9K positiv (61-63).

Die in den proximalen Tubulusepithelzellen lokalisierte 1α -Hydroxylase wird durch cAMP aktiviert und durch Phosphat, Ca^{2+} und den aktivierten VDR gehemmt (Abb.5). Das Parathormon, welches über einen PTH-Rezeptor wirkt, ist der wichtigste Aktivator der Adenylatcyclase und somit für erhöhte cAMP-

Spiegel verantwortlich (64) (Abb.5). Ca^{2+} -Sensorproteine in den proximalen Tubulusepithelien bewirken über entsprechende G-Proteine eine Hemmung der Adenylatcyclase und eine Zunahme der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was wiederum zur Inhibition der 1α -Hydroxylaseaktivität führt (64) (Abb.5). Auch eine Hemmung der PTH-Sekretion in der Nebenschilddrüse durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zieht eine Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach sich (64).

Im proximalen Tubulus sind für den transzellulären Transport von Ca^{2+} ein apikaler Ca^{2+} -Kanal ECaC1, ein basolateraler sekundär aktiver Antiporter NCX3, welcher 3 Na^{+} gegen 1 Ca^{2+} austauscht und eine Ca^{2+} -ATPase verantwortlich (6).

Die Phosphatreabsorption im proximalen Tubulus der Niere erfolgt hingegen gegen einen elektrochemischen Gradienten zusammen mit je 3 Na^{+} durch den Symporter NaPi-IIa (6). Über einen Antiporter mit Anionen und einen eventuell vorhandenen Kanal verlässt Phosphat (Pi) die Zelle auf der basolateralen Seite. Die Regelung des Phosphattransportes erfolgt neben der Phosphatkonzentration im Plasma vorwiegend durch die Hormone PTH und $1,25\text{D}$, wobei PTH die Phosphatresorption hemmt und somit die Exkretion erhöht und $1,25\text{D}$ den entgegengesetzten Effekt aufweist (6).

Die zentralen Wirkungen des Parathormons in der Niere im Rahmen der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Extrazellularraum sind folglich sowohl die Förderung der $1,25\text{D}$ -Synthese und Steigerung der tubulären Resorption von Ca^{2+} , als auch die Hemmung der $24,25\text{D}$ -Synthese und der tubulären Resorption von Phosphat, wodurch dieses, auch zusammen mit $1,25\text{D}$, für ein ausgewogenes Ca^{2+}/P -Verhältnis sorgt.

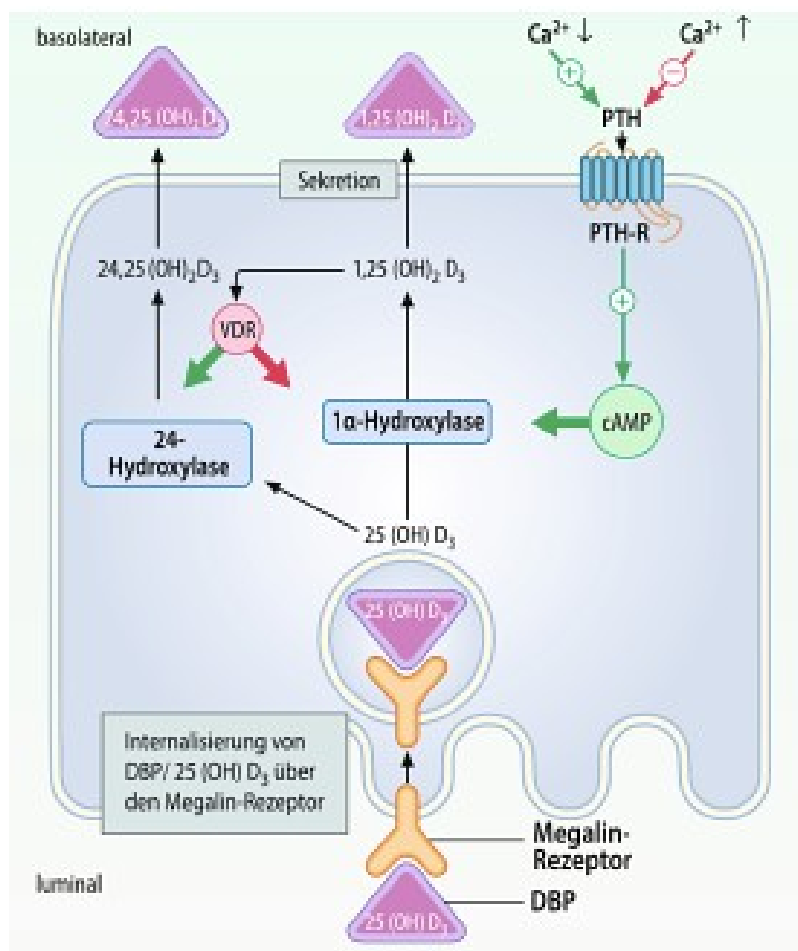


Abbildung 5: Regulation der 1,25D-Synthese in den renalen proximalen Tubulusepithelzellen (64). 1,25(OH)₂D₃ = 1,25D; 24,25(OH)₂D₃ = 24,25D; 25(OH)D₃ = 25D; VDR = Vitamin D Rezeptor; DBP = Vitamin D-bindendes Protein; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, PTH = Parathormon

1.6. Vitamin D Funktion am Knochen

Eine zentrale Aufgabe von 1,25 D betrifft die Regulation des Knochenstoffwechsels im Organismus. 1,25D hat durch die Bereitstellung von Ca²⁺ einen großen Einfluss auf die Knochenmineralisation. Durch einen ständigen Knochenabbau oder Knochenneusynthese dient das Knochengewebe als flexibler Ca²⁺Speicher im Körper. Ein Vitamin D-Mangel äußert sich während der Wachstumsphase des Skeletts als Rachitis und löst im adulten Skelett das Krankheitsbild der Osteomalazie aus. Beide Krankheiten folgen dem gleichen

pathophysiologischen Mechanismus, einer Störung der Mineralisation von neu gebildetem Knochengewebe und zeigen, dass 1,25D für die Mineralisierung des Skeletts, sowohl während der Entwicklung als auch zur Aufrechterhaltung, erforderlich ist.

Analog zu den Hauptzellen der Nebenschilddrüse, reagieren Osteozyten und Osteoblasten auf 1,25D-gebundenen VDR mit einer Expressierung und Freisetzung von FGF23, um eine Phosphatämie zu kontrollieren. Sie inhibieren die 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) und induzieren die 24-Hydroxylase (CYP24A1) als Feedback-Reduktion der 1,25D-Spiegel (5).

Niedrige Serum-Ca²⁺-Konzentrationen induzieren durch PTH, welches katabole Eigenschaften auf das Skelett ausübt, einen Knochenabbau, welcher über eine Osteoblasten-induzierte Osteoklastenaktivierung erfolgt. In den Osteoblasten erhöht 1,25D-gebundener VDR die Expression von RANKL (receptor activator of nuclear factor (NF) κ B ligand), ein Membranprotein auf der Zelloberfläche dieser Zellen, um die Knochenresorption durch die Osteoklastogenese zu stimulieren (5). RANKL bindet anschließend entweder an Osteoprotegerin (osteoblast - derived soluble decoy receptor = OPG), welches löslich ist und durch 1,25D in den Osteoblasten unterdrückt wird (33), oder an den RANK-Rezeptor der Osteoklasten, was zur Induktion der Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten und zu einem Zell-Zell Kontakt zwischen Osteoblasten und Osteoklasten führt. Eine Förderung der Osteoprotegerin-Synthese durch 1,25D mit daraus resultierender Bindung und Blockade des RANK-Rezeptors der Osteoklasten durch Osteoprotegerin bewirkt eine Inhibierung der Osteoklasten- Differenzierung, wodurch der Knochenabbau verhindert wird (22,59,65).

Durch eine Mobilisierung von Ca²⁺, aufgrund einer Zunahme des Ca²⁺-Ausstroms über ruhende Knochenoberflächen und einer Stimulation des osteoklastären Knochenabbaus, wirkt das Parathormon ebenfalls auf den Knochenstoffwechsel ein. Über einen indirekten, durch Osteoblasten vermittelten Vorgang erhöht PTH die Osteoklastenaktivität und steigert somit die Umwandlung von Präosteoklasten zu reifen Osteoklasten, mit der Folge, dass ein

PTH-Anstieg eine gesteigerte Ca^{2+} - & P-Freisetzung aus dem Skelett bewirkt. Die akuten katabolen Effekte von PTH auf den Knochen umfassen folglich die Stimulierung des osteoklastären Knochenabbaus und die Steigerung des Remodeling im trabeculären und corticalen Knochen.

1.7. Abbau von Vitamin D

Zusätzlich zu 1,25D kann die Niere auch 24,25D bilden, ein im Gegensatz zu 1,25D weitgehend inaktiver Metabolit. Die 25-Hydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase (24-Hydroxylase, 24(OH)ase, CYP24A1), ebenfalls ein mitochondriales P450 Enzym, kann sowohl 25D als auch 1,25D enzymatisch, durch Induktion der Spaltung der Seitenketten im Molekül, abbauen. Produkt dieser Reaktion ist die biologisch inaktive, wasserlösliche Calcitronsäure, welche über Zwischenprodukte u.a. 24R, 25(OH)₂D₃ entsteht.

Somit begrenzt die 24-Hydroxylase, deren Synthese durch die Anwesenheit von 1,25D induziert wird, die Menge an 1,25D im Zielgewebe, sowohl durch einen beschleunigten Abbau von 1,25D zu 24,25D, was zur Bildung der Calcitronsäure führt, oder durch Produktion von 24,25D und reduziert damit den Pool von 25D, welches für die 1 α -Hydroxylierung zur Verfügung steht. 1,25D induziert auf diesem Weg seinen eigenen Abbau (66,67,21).

1.8. Vitamin D Synthese und Regulation bei Hunden

Vögel, Amphibien und Reptilien können vermutlich ausreichend Cholecalciferol (Vitamin D₃) in ihrer Haut unter dem Einfluss von UV-Licht synthetisieren (68). Allesfresser (Omnivoren) und Pflanzenfresser (Herbivoren) bilden dieses in ihrer Kutis während des Sommers und nutzen Ergocalciferol (Vitamin D₂) oder das Vitamin D₃ aus der Nahrung um für den Rest des Jahres ihren Vitamin D-Haushalt zu decken (68).

Fleischfresser (Carnivoren), wie Hunde und Katzen sind allerdings ausschließlich

von einer oralen Aufnahme von Vitamin D abhängig, um ihre Vitamin D₃-Anforderungen im Organismus zu erfüllen, da sie nicht in der Lage sind, Vitamin D₃ in ihrer Haut, unter dem Einfluss von UV-Licht zu synthetisieren (69-71). Da jedoch natürliche LM als auch kommerziell erhältliches Hundefutter ausreichend 25D enthalten, um die Anforderungen des Hundes hinsichtlich dieses Hormons zu decken, wird das Krankheitsbild der Rachitis bei domestizierten Hunden nur unter extremen Umständen gesehen wie z.B. bei einer strengen vegetarischen Fütterung, bei Gallengangsatresie und bei angeborenen Störungen des Vitamin D₃-Stoffwechsels (72-75).

In den letzten 30 Jahren wurde die pathologische Rolle einer übermäßigen Mineralstoffaufnahme bei Skeletterkrankungen des Hundes ausgiebig untersucht (76-80). Anomalien in der Skelettentwicklung, wie beispielsweise der transiente juvenile Gigantismus, in Zusammenhang mit der Ernährung, werden vor allem bei großen Hunderassen z.B. Deutschen Doggen beobachtet, da die hohe Wachstumsgeschwindigkeit bei diesen Rassen auf einer transienten Hypersekretion von Wachstumshormonen (Growth Hormone, GH, Somatotropes Hormon, Somatotropin) und hohen Plasmakonzentrationen von IGF-I (Insulin-like growth factor I, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I) beruht (81).

Obwohl die Plasmakonzentrationen der Vitamin D₃-Metaboliten entscheidend sind für deren Synthese und den weiteren Metabolismus im Körper, gibt es *in vivo* - (82-83) und *in vitro*-Nachweise (84), dass GH die Hydroxylierung von 25D entweder direkt oder indirekt über IGF-I beeinflusst. Die Verabreichung von GH an Kinder mit GH-Mangel und an normale Ferkel erhöht die zirkulierende Plasma 1,25D-Konzentration, während die Plasma 24,25D-Konzentration abnimmt (85). Dementsprechend wird bei dem Krankheitsbild der Akromegalie, welches mit hohen Plasma-GH & IGF-I-Konzentrationen einhergeht, die Menge von 1,25D im Blut erhöht (83).

IGF-I fördert die 1,25D-Synthese in den Nierenzellen von Säugetieren, insbesondere unter hypophosphatämischen Bedingungen (84). Bei großen Hunderassen kann somit eine hohe Ca²⁺-Nachfrage für das wachsende Skelett und hohe GH- & IGF-I-Spiegel die Synthese von 1,25D auf Kosten von 24,25D

begünstigen (86). Da zusätzlich zu 1,25D auch 24,25D ein wichtiger Metabolit für eine optimale Skelettentwicklung und Mineralisation ist (87), stimulieren erhöhte Plasma 24,25D-Spiegel die Differenzierung und Reifung von Chondrozyten (88) und erhöhen die Knochenmineralisierung (89).

Ein Synergismus zwischen 1,25D und PTH induziert die Expression der 24-Hydroxylase, was eine erhöhte 24,25D-Synthese bewirkt und mit einer Mineralisierung des Knochens assoziiert ist, wohingegen es PTH-induziert zu einer Osteoklasie kommt (89). Das physiologische Gleichgewicht zwischen 24,25D und 1,25D ist somit eine Voraussetzung für eine ungestörte enchondrale Ossifikation (87).

2. Der Vitamin D Rezeptor (VDR)

2.1. Aufbau des VDR

1,25D übt seine Funktion überwiegend durch Bindung an den Vitamin D Rezeptor (VDR) aus (90), ein Mitglied der Kernrezeptorsuperfamilie (91-95), was zu einer transkriptionellen Regulation von Zielgenen führt (96). Viele Gene werden über die Aktivierung des VDR direkt hochreguliert, z.B. CYP24A1, CaBP-D9k, CaBP-D28k, Osteocalcin und RANKL, oder herunterreguliert wie z.B. PTH und CYP27B1 (97-105). Der VDR reguliert die Expression von zahlreichen Genen die an der Ca²⁺- & Phosphor-Homöostase, der zellulären Proliferation und Differenzierung und an der Immunantwort beteiligt sind, im Wesentlichen in einer Liganden-abhängigen Weise und spielt somit eine zentrale Rolle bei der biologischen Wirkung von Vitamin D im Organismus.

Das VDR-Gen, welches den Vitamin D Rezeptor kodiert, befindet sich beim Menschen auf Chromosom 12q und bei der Maus und der Ratte auf Chromosom 7 (106). Das humane VDR-Gen kodiert für 427 Aminosäurereste (AS) und ist

zusammengesetzt aus Promotor und Regulationsregionen (1a-1f) und den Exons 2-9, welche die 6 Domänen (A-F) des VDR-Proteins kodieren (20). Der VDR enthält einen N-terminalen Aktivierungsbereich (AF-1), eine DNA-Bindungsdomäne mit 2 Zinkfingern, wovon jeder davon 4 Cysteinmoleküle enthält, eine „Hinge“-Region inklusive nukleärer Lokalisationssignale, eine Ligandenbindungsdomäne (LBD), welche für die Interaktion mit Co-Aktivatoren und Co-Repressoren erforderlich ist und einen C-terminalen Aktivierungsbereich (AF-2) (Abb.6). Die Bindung an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz (VDRE, Vitamin D responsive element) ermöglicht dem VDR die Transkription bestimmter Zielgene zu aktivieren bzw. zu hemmen. Der VDR bindet mit seiner LBD am C-Terminus 1,25D 100x stärker im Vergleich zu 25D oder 24,25D.

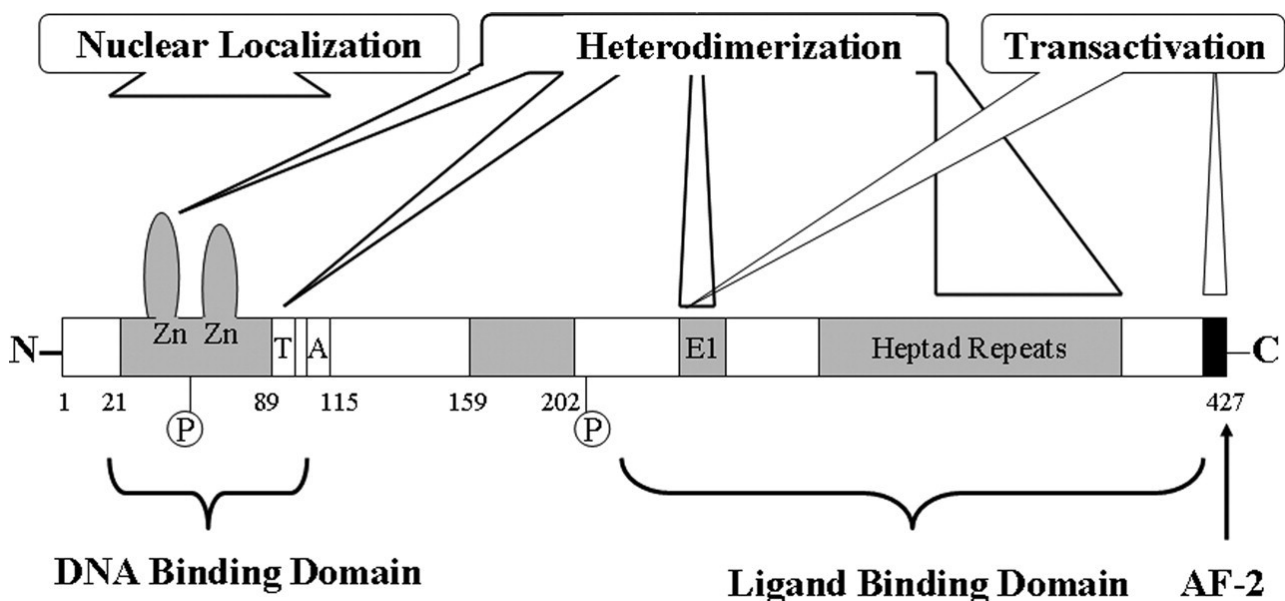


Abbildung 6: Funktionelle Domänen des Vitamin D Rezeptors (VDR) (107). Schematische Darstellung der Domänen des menschlichen VDR Moleküls mit Ligandenbindungsdomäne (LBD) und DNA-Bindungsdomäne, nukleäre Lokalisation, Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), Transaktivierung sowie die 2 wichtigsten Phosphorylierungsstellen. AF-2 = Aktivierungsfunktion 2; N = N-Terminus; C = C-Terminus; Zn = Zinkfinger, Zahlen bezeichnen die Aminosäuren

2.2. Aktivierung und Regulation des VDR

Der ursprünglich als ein Chromatin-assoziiertes Protein (108) identifizierte VDR vermittelt die biologischen Reaktionen von 1,25D indem er dieses mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Der Ligand 1,25D bewirkt durch Bindung an die C-terminale Ligandenbindungsdomäne des Vitamin D Rezeptors dessen Phosphorylierung und Konformationsänderung und initiiert die Interaktion des nun phosphorylierten VDR an seinen heterodimeren Partner, den Retinoid-X-Rezeptor (RXR), ebenfalls ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptoren (109) (Abb.7a)). Der so entstandene ligandengebundene VDR-RXR-Heterodimer-Komplex wird anschließend durch Importin- α , ein nukleäres Transportprotein, welches an die AF-2-Region des VDR bindet (110), aus dem Zytoplasma in den Nukleus transportiert.

Der aktivierte 1,25D-VDR-RXR-Komplex bindet durch seine DNA-Bindungsdomäne (DBD) des N-Terminus, sequenzspezifisch an Vitamin D-responsive Elemente (VDRE) mit der Konsensussequenz (PGGTCA)₃n (GPGTTCA) (P= Purinbase; n= beliebiges Nukleotid) in der Promotorregion des Zielgens (111). Für die Transkriptionsaktivierung besetzt der VDR das 3'-Ende, wohingegen der RXR an das 5'-Ende der VDRE bindet (112). Die Verbindung des VDR/RXR-Heterodimers mit den VDRE initiiert die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren, die gemeinsam mit Co-Aktivatoren zu einem Anstieg der Transkription von Zielgenen führen oder zusammen mit Co-Repressoren die Transkription eines Gens unterdrücken, sodass der VDR sowohl als Enhancer als auch als Suppressor regulatorisch die Transkription der Zielgene beeinflussen kann.

Die zwei Hauptfunktionseinheiten des 427 AS langen menschlichen VDR sind die N-terminale Zinkfinger-DBD & die C-terminale Ligandenbindungs- (LBD)/ Heterodimerisierungsdomäne, wobei die VDR-LBD, eine sandwichartige Struktur von mindestens 12 α -Helices (113), VDR-Flächen für die Heterodimerisierung mit dem RXR (vorwiegend Helices (H) 9 & 10 und die Schleife zwischen H8 & H9) und für die Wechselwirkung mit Co-Aktivatoren präsentiert. Co-Aktivator-

Schnittstellen im VDR bestehen aus Teilen von H3, H5 & H12, wobei die zuletzt genannte die Aktivierungsfunktionsdomäne-2 (AF-2) bildet (Abb.7a)).

Die Induktion der Genexpression wird durch die Anwesenheit des gebundenen Liganden 1,25D ausgelöst, da dieser einer Konformationsänderung in Position H12 am C-Terminus des VDR bewirkt, woraus eine „geschlossenen“ Positionierung folgt, damit die AF-2 als Teil einer Plattform für die Co-Aktivatorbindung dienen kann (114). Die Affinität eines Co-Aktivators für die Helices H3, H5 & H12 des ligandengebundenen VDR stabilisiert allosterisch das VDR-RXR-Heterodimer auf dem VDRE und kann sogar die Auslösung der starken Heterodimerisierung durch die Induktion der Wanderung der VDR-LBD auf die 5'-Seite der RXR-LBD unterstützen. Durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Helices H9 & H10 im VDR und den entsprechenden Helices im RXR rotiert der RXR-LBD um 180° (Abb.7a)). Die Liganden-VDR-Konformation wird durch dessen RXR Heteropartner beeinflusst, welcher bewirkt, dass die AF-2-Region des RXR in die „geschlossene“ oder aktive Position schwenkbar ist.

Die Liganden-abhängige Repression der Gentranskription durch den VDR-RXR-Komplex teilt wahrscheinlich einige molekulare Merkmale mit der Induktion. Ein zentraler Schritt der Repression ist die Bereitstellung eines Kernrezeptor-Co-Repressors, um die Architektur des Chromatins in der Nähe des Zielgens zum Heterochromatin zu modulieren. Diese Umstrukturierung des Chromatins wird durch Histon-Deacetylasen und Demethylasen katalysiert. Das Andocken des Liganden-gebundenen VDR-RXR an ein negatives VDRE bevorzugt die Bindung an einen Co-Repressor anstelle eines Co-Aktivators (Abb.7b)).

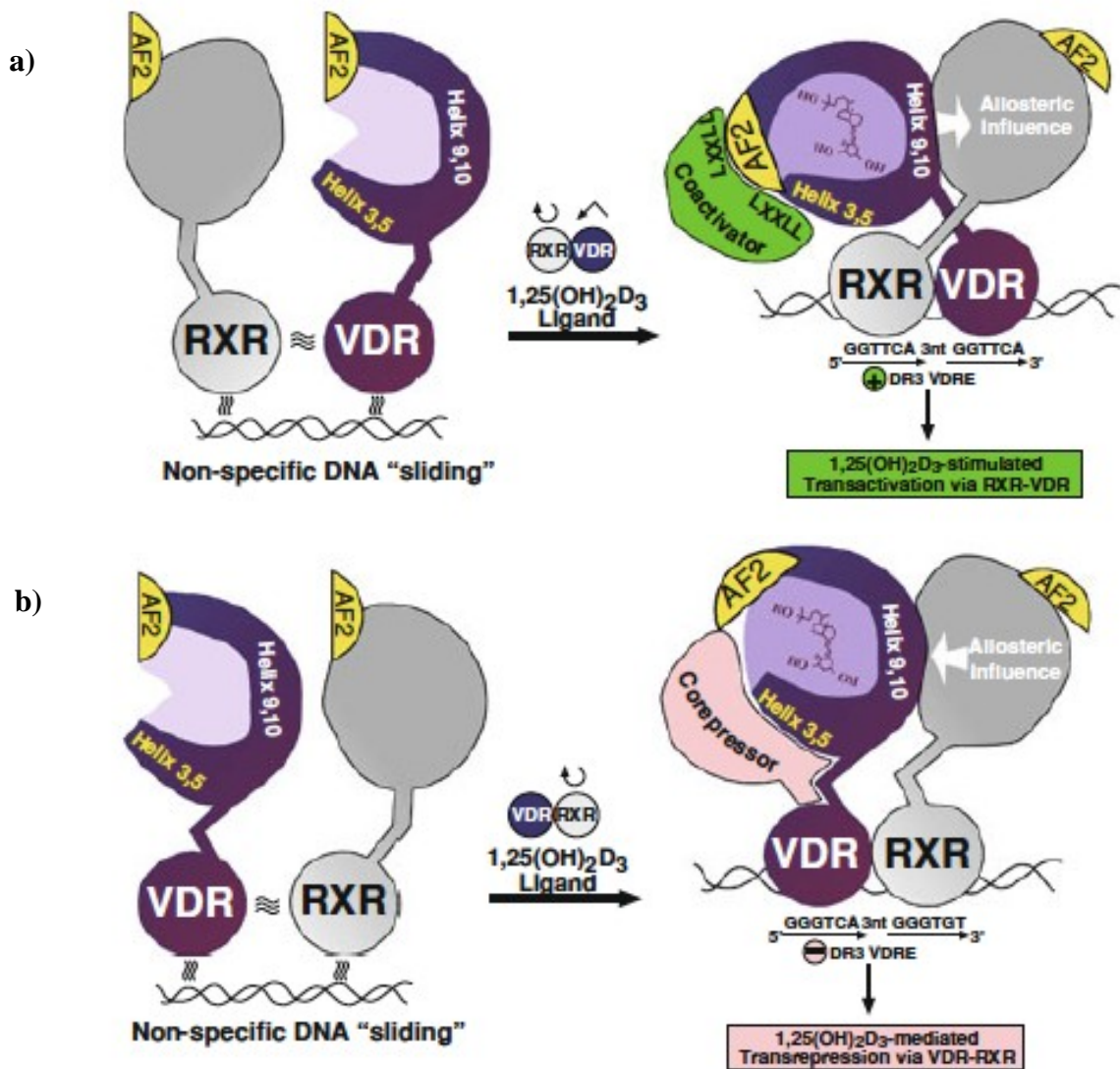


Abbildung 7: Mechanismen der Geninduktion und Repression durch den VDR (5).

- a) Allosterisches Modell der RXR-VDR-vermittelten Transaktivierung nach Bindung von 1,25D und Rekrutierung eines Co-Aktivators an ein hochaffines positives VDRE.
- b) Allosterisches Modell der VDR-RXR-vermittelten Transrepression nach Bindung von 1,25D und Gewinnung eines Co-Repressors an ein hochaffines negatives VDRE.

VDR = Vitamin D-Rezeptor; RXR = Retinoid-X-Rezeptor; VDRE = Vitamin D-Responsive Elemente; AF2 = Aktivierungsfunktion 2; 1,25(OH)₂D₃ = 1,25D

2.3. Lokalisation des VDR in verschiedenen Zielgeweben

Nach der Entdeckung des VDR in der Mitte der 1970er Jahre (115-116) und seiner Klonierung 1988 (117-118), wurde seine Präsenz in einer Reihe von Geweben entdeckt, die zuvor nicht mit dem Ca^{2+} - & P-Stoffwechsel assoziiert waren. Menschliches und tierisches Gewebe werden häufig für die Recherche der VDR-Expression verwendet, allerdings können eine Anzahl von Faktoren wie z.B. Alter, Vitamin D Status, Ca^{2+} und Gesundheit die Expression des VDR-Gens in bestimmten Geweben beeinflussen. Sowohl der Vitamin D Status als auch Ca^{2+} regulieren die Produktion des VDR beispielsweise in der Niere (119) und im Knochen (120), jedoch nicht im Darm. Auch frisch isolierte Immunzellen und Osteoblasten werden häufig zur Bestimmung des Vitamin D Rezeptors bzw. dessen Expression verwendet, jedoch zeigten Ahn et al. mit pankreatischen β -Zellen, dass der Isolierungsprozess selbst die Gentranskription verändern kann (121) und somit wäre es möglich, dass die Zellen den VDR während der *in-vitro*-Kultur exprimieren können, was bereits für menschlichen Gelenkchondrozyten bewiesen wurde (122). Hepatozyten exprimieren keinen Vitamin D Rezeptor *in vivo*, während geringe Mengen in frisch kultivierten Hepatozyten von Mensch, Ratte und Maus entdeckt wurden (123), wodurch dementsprechend kultivierte Zellen irreführende Informationen in Bezug auf die VDR-Expression liefern können.

Der VDR ist im gesamten Dünndarm, von Duodenum bis Ileum und im Dickdarm einschließlich Blinddarm und Colon weit verbreitet (124-133). Seine genaue Lokalisation befindet sich in den Darmepithelzellen, wohingegen Becherzellen und lymphatisches Gewebe überhaupt keinen Rezeptor besitzen (124-125, 129).

Die Leber wird im Allgemeinen als negatives Organ für eine Expression des Vitamin D Rezeptors betrachtet (134), da der VDR in den Hepatozyten nicht nachgewiesen werden konnte (135). Allerdings wurden sehr geringe VDR-Spiegel, 1300x niedriger als im Darm, in normaler Rattenleber festgestellt (128).

Stumpf et al. zeigten die Präsenz einer VDR-Expression überwiegend in den β -Zellen des Pankreas (135) und Clark et al. berichteten von den insulinhaltigen

Zellen des Pankreas als Zielzellen des Vitamin D Hormons, nicht die Zellen welche Glucagon und Somatostatin produzieren (136).

Mehrere Studien belegten die Produktion des Vitamin D Rezeptors in den distalen Tubuli und den Sammelrohren der Niere (124-126,137-143), jedoch nur das Vorhandensein von geringen Mengen desselben in den proximalen Nierentubuli (144). Dies stimmt überein mit der Funktion des VDR bei der Regulierung der Ca^{2+} - Reabsorption aus dem Primärurin, wobei die geringe vorhandene Menge in den proximalen Tubuli eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation der 24-Hydroxylase (CYP24A1) & der 1α -Hydroxylase (CYP27B1) zu spielen scheint. Nicht nachweisbar ist der Rezeptor allerdings in den juxtaglomerulären Zellen, den renalen interstitiellen Fibroblasten und in den Mesangialzellen und Endothelzellen der Glomeruli (124, 126, 137, 144-146).

Ein weiteres Organ in welchem der VDR exprimiert wird, sind die bronchialen Epithelzellen der Lunge von Mensch-, Maus- und Rattenfötus, wohingegen in den menschlichen Alveolarzellen kein Rezeptor gefunden wurde (126, 147).

In der Haut scheint der Vitamin D Rezeptor auf die Kerne der epidermalen Epithelzellen beschränkt zu sein, da auch die Epithelzellen der Haarwurzelscheiden, der Schweißdrüsen und der Talgdrüsen den VDR exprimieren (124, 148-151).

Auch im Knochengewebe, genauer in Knochenvorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und in Chondrozyten erfolgte ein Nachweis dieses Rezeptors (126, 152-157), wohingegen seine Anwesenheit in Osteoklasten noch diskutiert wird (127, 154-156, 158-159).

Ebenfalls präsent zeigt sich der VDR in einigen Zellen des Immunsystems wie z.B in isolierten menschlichen peripheren Monozyten und in aktivierten T-Lymphozyten, aber nicht nachweisbar in isolierten ruhenden menschlichen T-Zellen (160-161). Der VDR scheint konstitutiv in unreifen Makrophagen, jedoch nicht in reifen exprimiert zu werden (162). Der Thymus als spezialisiertes Organ des Immunsystems, welches T-Lymphozyten produziert, bildet den VDR ausschließlich in den Kernen der retikulären Thymusepithelzellen, wohingegen bei den Thymozyten kein Rezeptor gefunden wurde (163).

Eine ebenfalls starke Expression des Vitamin D Rezeptors zeigen die Epithelzellen der Nebenschilddrüse, wobei 1,25D diese Produktion erhöht und somit die Transkription von PTH unterdrückt (164-166).

Die Prostata und die Kerne der Epithelzellen der Brustdrüse sind weitere Lokalisationsorte des VDR (126), wobei festgestellt wurde, dass sein Gehalt während der Schwangerschaft und Stillzeit zunimmt (167).

3. MDM2 (Murine Double Minute 2 homolog)

3.1. Struktur von MDM2

MDM2 (Murine Double Minute 2 homolog) ist eine multifunktionale E3-Ubiquitin-Ligase, welche als wichtiger Negativregulator von mehreren Transkriptionsfaktoren wirkt (168-171). Ursprünglich wurde das MDM2-Gen als eines von drei Genen (MDM 1,2,3) in einer spontan transformierten Mauszelllinie (BALB/c 3T3) identifiziert, in welcher es in Form von 25-30 Kopien gepaarter, azentrischer Chromatinkörperchen, „double minutes“, vorhanden war. Allein *MDM2* zeigte, von dem ursprünglich 3 nachgewiesenen Genen, transformierende Eigenschaften, woraufhin diesem Gen die Funktion eines Onkogens zugeschrieben werden konnte (172-173).

Das humane MDM2 befindet sich auf dem Chromosom 12q14.3-15 (174), besteht aus 12 Exons (I-XII) und kodiert für das Phosphoprotein MDM2, von welchem multiple Spleißvarianten existieren (Abb.8). Zwei verschiedene Promotoren sind an der Transkriptionsregulation beteiligt und erzeugen 2 Proteine (Abb.8): ein p90 Protein, bestehend aus 491 Aminosäuren und 90kD schwer und ein kürzeres p76 Protein. Beide Proteine führen ein internes Startcodon ATG in Exon 3 bzw. Exon 4 (175-177) (Abb.8). Der P1-Promotor, welcher vor dem Exon 1 lokalisiert ist und unabhängig vom p53-Transkriptionsfaktor agiert, dient der Expression der langen MDM2-mRNA. Der P2-Promotor hingegen befindet sich im Intron 1 und ist der 53-spezifische Promotor.

Des Weiteren beinhaltet das Onkoprotein MDM2 mehrere funktionelle Domänen, die jeweils unterschiedlichen Funktionen unterstützen. Die N-terminale p53- Interaktionsdomäne wird durch die aminoterminalen 100 Aminosäuren von MDM2 kodiert und bindet an die aminoternale Transaktivierungsdomäne von p53, wodurch dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor unterdrückt wird. Zusätzlich enthält MDM2 sog. nukleäre Import - & Exportsignale (NLS bzw. NES), welche dem Protein ein ständiges Pendeln zwischen Nukleus und Zytoplasma ermöglichen und damit eine weitere Möglichkeit darstellen, die p53- Aktivität zu regulieren (172, 178-179) (Abb.8).

Die Aminosäuren 464-471 können, obwohl die biologische Bedeutung dieser Regulation noch unklar ist, ebenfalls als nukleäres Lokalisierungssignal fungieren (180) (Abb.8). Weitere funktionelle Domänen des MDM2-Proteins sind die zentrale saure Domäne mit einer integrierten Bindungsstelle z.B. für die Interaktion mit ribosomalen Proteinen, die Zinkfingerdomäne und die RING-Domäne am C-terminalen Ende, welche an RNA binden kann und als E3-Ligase die Ubiquitylierung von p53 einleitet (Abb.8).

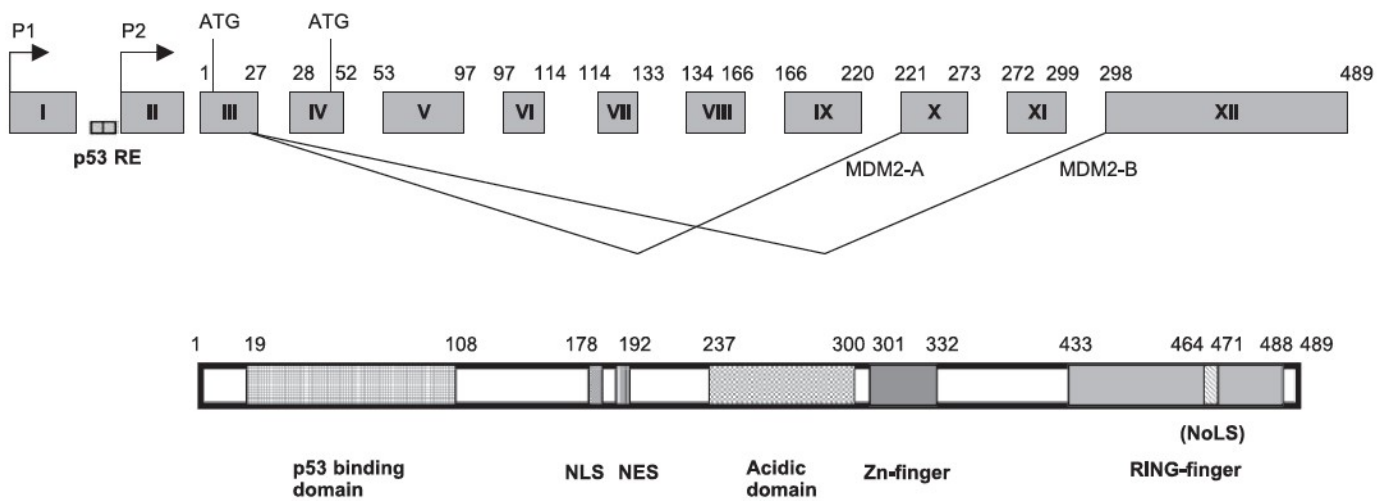


Abbildung 8: Struktur von MDM2 (Gen und Protein) (168). Beide Promotoren (P1 und P2) sind durch Pfeile dargestellt. MDM2A & MDM2B repräsentieren 2 alternative Spleißvarianten des humanen MDM2. NLS= Kernlokalisierungssignal; NES = Kernexportsignal; Zn-finger = Zinkfingerdomäne; RING-finger = Ringfingerdomäne; Acidic domain = saure Domäne; p53 binding domain = P53-Bindungsdomäne; ATG = internes Startcodon; Zahlen bezeichnen Aminosäurenummern, römische Zahlen sind die Exonnummern.

3.2. MDM2, eine E3-Ubiquitin-Ligase

Biochemisch fungiert MDM2 als eine E3-Ubiquitin-Ligase, die verantwortlich ist für die Ubiquitylierung und den Abbau von Proteinen wie z.B. p53 (181-183). Die Ubiquitylierung von Proteinen, welche ursprünglich als Erkennungssignal für den proteasomalen Abbau derselben identifiziert wurde (184), erfolgt durch eine komplexe Reihe von Schritten, die E1, E2 und E3-Proteine umfassen (185-186).

Ubiquitin, ein ubiquitär exprimiertes Polypeptid bestehend aus 76 Aminosäureresten (AS), wird durch eine dreiteilige Enzymkaskade kovalent an Proteine gebunden. Im ersten Schritt bindet Ubiquitin ATP-abhängig an das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1. Aus dieser Interaktion folgt die Übertragung auf eine Cystein-Gruppe des E2-konjugierenden Enzyms, das daraufhin das

aktivierte Ubiquitin auf eine E3-Ubiquitin-Ligase überträgt, welche nun das Ubiquitin kovalent an Lysinreste des Substratproteins bindet. Je nach Anzahl der gebundenen Ubiquitinmoleküle wird zwischen einer Mono-, Multi-, Oligo- und Polyubiquitinierung unterschieden, wobei Ubiquitin selbst 7 Lysine für die Beteiligung an der Konjugation besitzt und beispielsweise die Bildung von K-48 verknüpften Ubiquitinketten, ab einer Anzahl von 4 Ubiquitinen, eine Erkennung und ein Abbau des Substratproteins durch das Proteasom bewirkt. Die Monoubiquitinierung ist z.B. beteiligt an der Rezeptorendozytose, der Transkription und der DNA-Reparatur, während eine Polyubiquitinierung generell einen Proteinabbau bewirkt (185-186).

MDM2 ubiquityliert, durch seine E3-Ligasefunktion, p53 an mehreren Lysinresten und hat womöglich auch die Fähigkeit sich selbst zu ubiquitylieren, wobei die RING-Domäne von MDM2 für diese E3-Ligaseaktivität verantwortlich ist.

3.3. Funktion von MDM2 im Kontext der p53 Familie von Transkriptionsfaktoren

Das zelluläre Onkoprotein MDM2 wirkt als ein Inhibitor des Tumorsuppressors p53 und ist einer der wichtigsten negativen Regulatoren von p53 (187-188). Eine erhöhte Expression von MDM2 tritt in vielen menschlichen Tumoren auf, da das Genprodukt des *MDM2*-Gens bei Überexpression für die Transformation von Zellen verantwortlich ist (189, 190). Ausschlaggebend für das Transformationspotential von MDM2 ist die Bindung an den Tumorsuppressor p53 und die daraus resultierende Hemmung der p53-vermittelten Transaktivierung von Genen (191). P53 wird konstitutiv exprimiert, aber bei Abwesenheit von Stress sofort wieder abgebaut, sodass die Konzentration von p53 äußerst gering gehalten wird. Bei Auftritt eines DNA-Schadens in der Zelle erfolgt eine Phosphorylierung von p53, was dazu führt, dass dieses von MDM2

nicht mehr abgebaut werden kann und es somit zur Akkumulation von p53 in der Zelle kommt, was entweder eine DNA-Reparatur, einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose der Zelle bewirkt. Zwischen p53 und MDM2 besteht eine negative regulatorische Rückkopplungsschleife, da das *MDM2*-Gen von p53 transaktiviert wird und MDM2 p53 hemmt.

Zum Abbau von p53 durch MDM2 bindet p53 zunächst an die p53-responsiven Elemente (p53-RE's) im sekundären Promotor des *MDM2*-Gens und aktiviert die *MDM2*-Expression, während die anschließende Erhöhung des MDM2-Proteins zu seiner Bindung an die N-terminalen Reste 1-52 von p53 führt und schließlich den Abbau von p53 induziert (192). Außerdem kann MDM2 an die Transaktivierungsdomäne von p53 binden und damit seine Transkriptionsaktivität blockieren (192-194).

Darüber hinaus kann MDM2 auch eine Monoubiquitylierung von p53 einleiten, wodurch dieses eine Konformationsänderung erfährt, aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird und somit im Kern nicht mehr als Transkriptionsfaktor vorhanden ist, jedoch nicht durch das Proteasom abgebaut wird. Geringe *MDM2*-Spiegel induzieren eine Monoubiquitylierung mit der Folge des Transports von p53 aus dem Kern ins Zytoplasma, wohingegen hohe *MDM2*-Konzentrationen eine Polyubiquitylierung bewirken und den Abbau von p53 einleiten (195).

4. Zielsetzung der Arbeit

Die aktive Form des Hormons Vitamin D, $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (1,25D), übt nahezu alle seinen bekannten Effekte über die Bindung an den Vitamin D Rezeptor (VDR) aus, einem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor der sog. nukleären Rezeptorsuperfamilie. Nanomolare Mengen an 1,25D reichen aus, um im typischen Fall die Bildung eines Heterodimers bestehend aus dem VDR und dem in der Zelle im Überschuss vorhandenen Retinolsäure-X- Rezeptor (RXR) zu induzieren. Das Heterodimer bindet schließlich im Genom an eines oder mehrere der zahlreichen Vitamin D „response elements“ (VDRE). In Antwort auf die Bindung können Gene entweder transaktiviert oder supprimiert werden.

Während die Initiation der Transaktivierung von VDR-regulierten Genen recht gut verstanden ist, ist viel weniger über die Termination der Transaktivierung sowie über die Suppression von Genen durch den VDR bekannt. Grundlage für die vorliegende Arbeit war die Entdeckung in der Arbeitsgruppe von Prof. Roemer, dass der VDR an MDM2 binden kann. MDM2 ist, wie beschrieben, eine bedeutende Transkriptionsfaktor-regulierende Ubiquitinligase, die unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität auch als direkter Inhibitor der Gentranskription wirken kann, sofern sie durch Transkriptionsfaktor-Bindung an genregulatorische Sequenzen rekrutiert worden ist.

Ziel der Arbeit war es:

- 1) Einen kommerziell erhältlichen Antikörper zu identifizieren, mit dem sich der endogene VDR in humanen Zellen eindeutig nachweisen lässt.**

VDR wird in zahlreichen humanen Zelltypen, jedoch immer nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Die allgemein verfügbaren mono-oder polyklonalen anti-VDR-Antikörper hatten sich in der Vergangenheit als z.T. von fraglicher Spezifität und Sensitivität erwiesen. Für die weiteren Arbeiten zu dem vorliegenden Projekt war es deshalb von großer Wichtigkeit, zunächst einen brauchbaren Antikörper zu identifizieren.

2) Zu untersuchen, ob der zelluläre Level an VDR über den proteasomalen Abbau reguliert wird.

Das VDR Protein erwies sich selbst nach Transfektion von Plasmid als nur sehr schlecht exprimierbar. Auch fanden sich in humanen Zellen, trotz hinreichend vorhandener mRNA, meist nur sehr geringe Level an endogenem VDR. Dies deutete darauf hin, dass die Menge an VDR in der Zelle auch über den proteasomalen Abbau reguliert wird.

3) Zu analysieren, ob der VDR ubiquityliert wird und eventuell Substrat der MDM2-Ubiquitinligase ist.

Wenn der VDR über das 26S-Proteasom abgebaut werden kann, sollte er durch zelluläre Ubiquitinligasen eine entsprechende chemische Modifikation (Ubiquitylierung) erfahren. Eine dieser VDR-regulierenden Ubiquitinligasen könnte das in unserer Arbeitsgruppe als neuer Interaktionspartner identifizierte MDM2 darstellen.

4) Zu untersuchen, ob MDM2 die VDR-vermittelte Transaktivierung von Genen beeinflusst und wenn ja, dieser Effekt abhängig von der enzymatischen Aktivität von MDM2 ist.

MDM2 regelt nicht nur als Ubiquitinligase den proteasomalen Abbau von Transkriptionsfaktoren, sondern vermag diese auch durch direkte Bindung an den Promotoren von Genen zu inhibieren. Es war unklar, ob MDM2 diese Funktion auch für den VDR ausübt.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Allgemeine Reagenzien und Lösungen

Aceton	Hedinger
Acrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA (Titriplex III)	Merck
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL TM)	Pierce
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH
Glycin	Applichem
HiPerfect Transfektionsreagenz	Qiagen
Immobilon-Membran	Millipore
Isopropanol	Hedinger
JetPei-Transfektionsreagenz	Peqlab
Kaliumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Töpfer
Magnesiumchlorid	Merck
MG132	Millipore
β -Mercaptoethanol	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumphosphat	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma

NP-40 (Igepal)	Sigma
Nukleotide (dNTP's)	Qiagen
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma
Röntgenentwickler Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgenfixierer Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Appllichem
Tween-20	Serva
Zellulosefilter Whatman IM #1	Schleicher & Schuell

1.2. Arbeitspuffer

PBS-Puffer	NaCl	140mM
	KCL	25mM
	MgCl ₂	0,5mM
	Na-K-Phosphat	10nM
Lysis-Puffer	Tris-HCl (ph 7,8)	10mM
	NaCl	140mM
	NP-40	0,5 %
	Protease Inhibitor Cocktail	1:100
10x SDS-Laufpuffer für Agarosegelelektrophorese (Lösung für die SDS-PAGE)	Tris	250mM (30,3g)
	Glycin	1,9M (144,1g)
	SDS	10% (10g)
		ad 1L Aqua dest.

10x Transferpuffer für Western-Blot (Lösung für den Western-Blot)	Tris	250mM (30,3g)
	Glycin	1,9M (144,1g)
		ad 1L Aqua dest.
		davon 100ml entnehmen und 700ml Aqua dest. und 200ml Methanol hinzugeben

1.3. Enzyme für die Zellkultur und die qRT-PCR

Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen
RNasin	Qiagen
Trypsin/EDTA 100x	Gibco

1.4. Molekulargewichts-und Größenmarker

1) Proteinmarker

Das Molekulargewicht von Proteinen wurde bestimmt mit Hilfe eines vorgefärbten Markers (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Firma Fermentas). Dieser verwendete Marker enthält 9 Proteine, welche mit einem kovalent gebundenen blauen Farbstoff gekoppelt sind (10-170 kDa), wobei ein Protein (70 kDa) jedoch mit einem orangenen Farbstoff markiert ist (Abb.9)

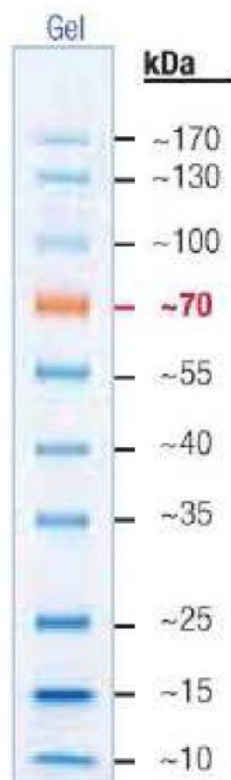


Abbildung 9: PageRuler™, vorgefärbte Proteinleiter der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).

2) Primärantikörper

DO-1 (Calbiochem)	Monoklonaler Anti-p53 AK, IgG (Maus)
β-Aktin (Sigma)	Monoklonaler Anti-β-Aktin AK, IgG (Maus)
9A7 (Abcam)	Monoklonaler Anti-VDR AK (Ratte)
ChIP (Abcam)	Polyklonaler Anti-VDR AK (Kaninchen)
3G9 (Millipore)	Monoklonaler Anti-MDM2 AK (Maus)
Flag-AK M2 (Sigma)	Monoklonaler Anti-Flag AK M2, Flag-VDR/ Flag-p53
HRS3 (José Carreras Zentrum)	Anti-HRS3 AK, IgG
HA-Ubiquitin (Covance)	Anti-HA AK

Die Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

3) Sekundärantikörper

Anti-Ratte-Pox (Universitätsklinikum des Saarlandes, Institut für Virologie)	Peroxidase-gekoppelter Anti-Ratten AK
Anti-Maus-Pox (Sigma)	Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus AK, IgG
Anti-Kaninchen-Pox (Sigma)	Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen AK

Die Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

1.5. Zelllinien**1) H1299**

Humane, epitheliale Lungenadenokarzinomzelllinie, welche p53-defizient ist (ATCC CRL-5803 TM).

2) CaCo

Humane Colonadenokarzinomzelllinie, welche p53-defizient ist.

1.6. Lösungen und Nährmedien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	4,5mg/ml Glucose	PAA Laboratories
	1% Natriumpyruvat	
	L-Glutamin	
FKS (fetal calf serum), fötales Kälberserum	wurde zu 10% dem DMEM Medium hinzugefügt. Vor der Zugabe 30 Minuten bei 55°C inaktiviert	PAA Laboratories
Penicillin-Streptomycin		Gibco (Paisly/ Scotland)

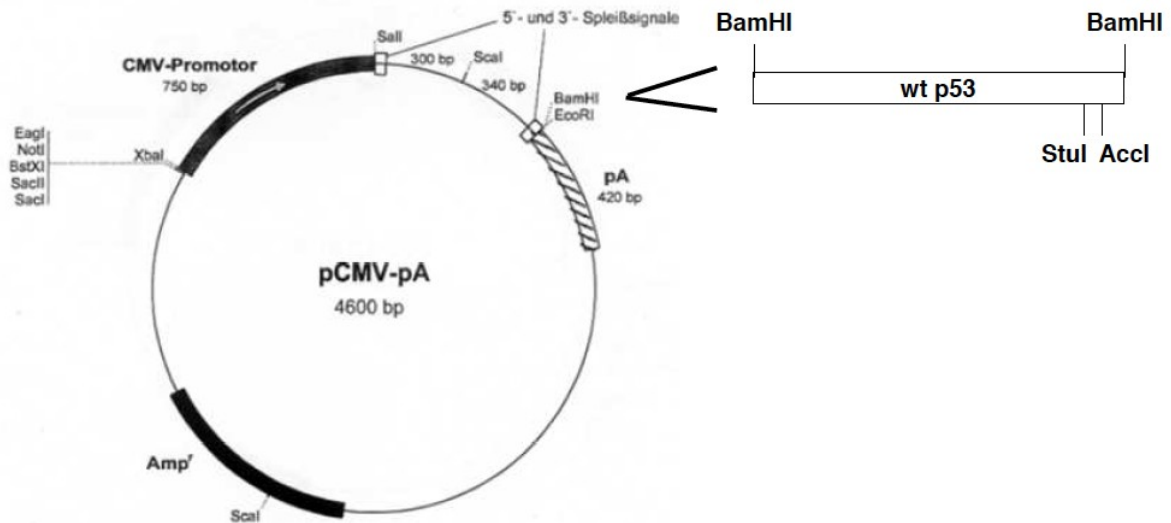
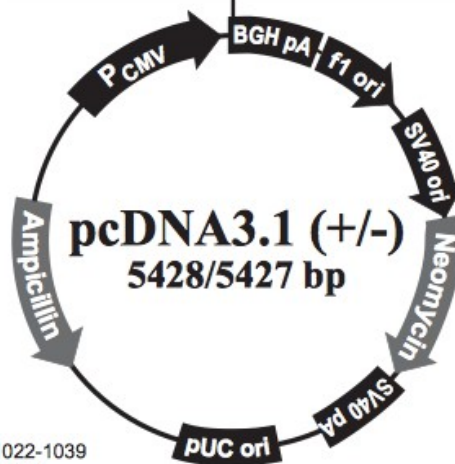


Abbildung 10: pCMV-p53 Vektor (Dr. Kristina Heyne, Neue Funktionen des p53-Tumorsuppressors an den Mitochondrien und im Zellkern).



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter/priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
f1 origin: bases 1298-1726
SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

Abbildung 11: Vektor pcDNA 3.1 (+) Neo der Firma Invitrogen.

1.7. Arbeitsmaterialien für die Zellkultur

Zellkulturflaschen 75cm ² , 25cm ² und Zellkratzer	Greiner Bio one
Zellkulturschalen (Petrischalen) 10cm und 6cm	Corning Costar

1.8. Plasmide

pcDNA 3.1-Flag-VDR	José Carreras Zentrum, Universitätsklinikum des Saarlandes
pCMX-Flag p53	José Carreras Zentrum, Universitätsklinikum des Saarlandes
pCMV-p53 pA (p53 Plasmid)	eukaryotischer Expressionsvektor, welcher das p53-Gen führt und exprimiert; José Carreras Zentrum, Universitätsklinikum des Saarlandes
pcDNA3.1 (+) Neo (Leervektor)	Invitrogen
pcDNA3-HA-Ubiquitin	Addgene

1.9. Small interfering RNA's (siRNA's)

MDM2 siRNA, Doppelstrang siRNA (humanes MDM2)	<u>Sequenz:</u> Sense r (CCACCUCACAGAUU CCAGC) dTdT! Antisense r (GCUGGAAUCUGUG AGGUGG) dTdT	Qiagen
VDR 8	Flexi Tube siRNA Hs VDR8 Cat.No. S103649163	Qiagen
VDR 9	Flexi Tube siRNA Hs VDR9 Cat.No. S103649177	Qiagen

Kontroll siRNA (Scrambled siRNA)	<u>Sequenz:</u> Sense r (UUCUCCGAACGUG UCACGU) dTdT Antisense r (ACGUGACACGUUC GGAGAA) dTdT	Qiagen
-------------------------------------	---	--------

1.10. Synthetische Oligonukleotide („Primer“) für die qRT-PCR

CYP24A1	Hs_CYP24A1_1_SG QuantiTect Primer Assay QT00015482 (NM_000782,NM_001 128915,XM_00526030 4)	Qiagen
SOST DC1	Hs_SOSTDC1_1_SG QuantiTect Primer Assay QT01017982! (NM_015464)	Qiagen
P21	For 5'GGCGGCAGACCA GCATGACAGATT 3' Rev 5'ATGAAGCCGGCCC ACCCAACCTC 3'	Qiagen
18s	Hs_RRN18S_1_SG QuantiTect Primer Assay QT00199367 (X03205) Cat.No. QT00199367	Qiagen

2. Methoden

2.1. Zellkultur

Mit Hilfe der Zellkultur können Zellen *in vitro* kultiviert und vermehrt werden, wobei adhärenente Zellen meist als Einzelschicht (Monolayer) in mehreren Zellschichten (Multilayer) und nicht adhärenente Zellen in Suspensionen (Suspensionskultur) wachsen. Die speziellen Kulturflaschen aus Plastik, in welchen die adhärenenten Zellen, wie auch die H1299- und CaCo-Zellen, kultiviert werden, besitzen eine beschichtete Oberfläche, um das Zellwachstum zu erleichtern.

Nach dem erfolgreichen Anwachsen der Zellen wird die sogenannte Zellpassage, auch Subkultivierung genannt, durchgeführt, wobei unter Zuhilfenahme von Trypsin/EDTA das Ablösen der adhärenenten Zellen vom Kulturflaschenboden erfolgt. Die durch die Zellpassage, insbesondere durch die verwendete Protease Trypsin, entstandene Einzelzellsuspension kann nun zur erneuten Beimpfung bzw. Anzucht in Kulturgefäßen herangezogen werden.

Bei dem Nährmedium für die Zellkultur handelt es sich um ein gepuffertes Medium, welches u.a. Zusätze von Salzen, Vitaminen, Aminosäuren und fötales Kälberserum (FKS) enthält.

2.1.1. Kultivierung von H1299-Zellen

Die Erhaltung der Stammkultur der H1299-Zellen erfolgte in 75cm² Kulturflaschen aus Plastik mit dem Zusatz von 13ml DMEM-Nährmedium. Die Bebrütung im Brutschrank wurde mit 7% CO₂-Begasung und bei 37°C vollzogen. Dem DMEM-Medium wurde 10% fötales Kälberserum (FKS) und 0,5% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Die Zelllinie wurde aufgrund ihrer Wachstumsgeschwindigkeit zweimal pro Woche 1:8 gesplittet.

2.1.2. Kultivierung von CaCo-Zellen

Die Stammhaltung der Colonadenokarzinomzelllinie wurde ebenfalls in 75cm² Zellkulturflaschen durchgeführt. Auch diese Zellen erhielten einen Zusatz von 13ml DMEM-Nährmedium und wurden bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7% in einem Hera-cell- Brutschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf) inkubiert. Das DMEM-Nährmedium wurde mit 10% FKS und 0,5% Penicillin/Streptomycin supplementiert. Aufgrund der relativ langsamen Wachstumsgeschwindigkeit der CaCo-Zellen wurden diese einmal pro Woche 1:3 gesplittet.

2.1.3. Einfrieren und Auftauen der H1299- und der CaCo-Zellen

Zur Langzeitlagerung beider eingesetzter Zelllinien wurde flüssiger Stickstoff (-196°C) verwendet. Da es sich sowohl bei den H1299-Zellen als auch bei den verwendeten CaCo-Zellen um adhärenente Zellen handelt, wurden diese zuerst mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. In einem weiteren Schritt wurden die abgelösten Zellen einmal mit DMEM-Medium gewaschen, mit Hilfe einer Zentrifuge (1200U/min, 3 Minuten, 21°C) pelletiert und das gewonnene Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert. 1ml der Zellsuspension wurde mit 100µl sterilem DMSO in einem Kryotube vermischt und die Zellen mit einer Temperaturabsenkung von 1°C pro Minute langsam eingefroren. Hierzu erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation bei -20°C, gefolgt von einer 24-stündigen weiteren Temperatursenkung bei -70°C und letztendlich die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C, in welchem beide Zelllinien über Jahre konserviert werden können.

Im Gegensatz zum Einfrieren erfolgte das Auftauen der H1299- und CaCo-Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad unter anschließender Hinzugabe von 12ml vorgewärmtem DMEM-Nährmedium. Im Anschluss wurde durch Abzentrifugation (1200U/min, 3 Minuten, 21°C) das Zellpellet gewonnen. Nach diesem Schritt wurde ein weiterer Waschschriff der Zellsuspension vollzogen, um alle Rückstände von DMSO zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2ml Nährmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche,

welcher 13ml Nährmedium bereits zugefügt wurden, pipettiert und bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.1.4. Zellzahlbestimmung und Lebend-Tot-Differenzierung mittels

Neubauer-Kammer

Bei bestimmten Fragestellungen dieser Arbeit war eine exakte Bestimmung einerseits der Zellzahl und andererseits der Lebendigkeit der Zellen erforderlich. Hierzu wurde eine Neubauer-Kammer verwendet, welche eine Fläche von 1mm², eine Höhe von 0,1mm und ein Volumen von 0,1mm³ (µl) aufwies. Zunächst wurde ein Objektträger auf die Zählkammer gelegt und anschließend max. 10µl der zu bestimmenden Zellkultur an die Grenze zwischen Objektträger und Kammer pipettiert, so dass die Zelllösung in die unter dem Träger liegenden Quadrate der Neubauer-Kammer fließt. Zur Lebend-Tot-Differenzierung der Zellen wurde in einem Eppendorfgefäß ein Tropfen (20µl) der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau vermischt und hiervon 10µl zur Zellzählung in der Neubauer-Kammer verwendet.

Im Gegensatz zu toten Zellen färben sich lebende Zellen aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht mit dem Farbstoff Trypanblau an. Ausgezählt unter dem Mikroskop wurden jeweils nur die vier großen Eckquadrate der Neubauer-Kammer, wobei jedes Eckquadrat aus 16 kleineren Feldern besteht. Die Anzahl aller lebenden Zellen in allen 4 großen Eckquadraten ergab die Zellzahl/ml, wobei aufgrund der 1:1 Verdünnung mit dem Farbstoff Trypanblau das Ergebnis verdoppelt werden muss.

2.1.5. Transiente Transfektion mit Hiperfect (Qiagen)

Bei der transienten Transfektion von Zellen erfolgt eine zeitlich begrenzte Einschleusung von DNA in das Wirtszellgenom, so dass die zur Transfektion eingesetzten Gene bei weiteren Zellteilungen verloren gehen und somit nur zeitlich begrenzt aktiv sind.

Bei den durchgeführten Transfektionen, sowohl bei den H1299-Zellen als auch

bei den CaCo-Zellen, wurde das Transfektionsreagenz der Firma Qiagen verwendet. Hierzu wurden die zu 100% konfluenten adhärenen Zellen 24 Stunden vor der durchzuführenden Transfektion in 6cm bzw. 10cm Petrischalen ausgesät, so dass diese am Transfektionstag zu 60-70% konfluent waren.

Die Transfektion mittels Hiperfect (Qiagen) wurde gemäß den Handhabungen des Herstellers durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden zunächst die eingesetzten siRNA-Stocklösungen mit einer Konzentration von 20 μ M jeweils 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden jeweils 5 μ l einer jeden verdünnten siRNA-Lösung pro Transfektionsansatz mit 100 μ l FKS-freiem Nährmedium in einem Reagiergefäß vermischt. Die endgültigen siRNA Konzentrationen betragen 5nM.

In einem nächsten Arbeitsschritt wurde zu jedem Transfektionsansatz zusätzlich 20 μ l Transfektionsreagenz Hiperfect pipettiert, dieses sofort resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die tropfenweise Zugabe der Transfektionslösungen auf die entsprechend beschrifteten Zellkulturschalen, gefolgt von einer 24-48 stündigen Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 7% CO₂-Gehalt.

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Abzugswerkbank und unter sterilen Bedingungen vollzogen.

2.1.6. Behandlung der Zellen mit dem Liganden 1,25 D

Zur Demonstration des VDR als Genregulator wurde bei einigen Versuchsdurchführungen dessen Ligand 1,25D eingesetzt. Die verwendete 1,25D Stamm-Stocklösung hatte eine Konzentration von 4mM, welche in absolutem Ethanol als Trägersubstanz gelöst war und wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die 4mM 1,25D Stocklösung, welche lichtempfindlich ist und deshalb in einem dunklen Glasgefäß aufbewahrt wird, wurde entsprechend mit 100% igem Ethanol verdünnt, um eine endgültige 1,25D Konzentration von 100nM zu erhalten, welche zur Behandlung der Zellen verwendet wurde. Das zur Anzucht

beider Zelllinien verwendete DMEM-Nährmedium benötigte für die 1,25D Behandlung zusätzlich eine 1% BSA-Konzentration. Das Medium wurde nach Zugabe von BSA steril filtriert. In einem weiteren Schritt wurde das zur Anzucht der Zellen verwendete Medium unter Zuhilfenahme einer Glaspipette mit Absaugvorrichtung verworfen. Im Anschluss daran wurde jeweils 5ml des angesetzten 1%igen BSA-Nährmediums und 5µl der 100nM 1,25D Lösung in jede Petrischale pipettiert und unter leichten Schwenken der Ligand 1,25D über die Zellen verteilt. Aufgrund der Vorliebe des Liganden 1,25D an Plastik zu binden und der Verwendung von Plastikpipettenspitzen wurde das 1% ige BSA DMEM Nährmedium in ein Falcon überführt und nach jeder 1,25D Aufnahme die neu verwendete Pipettenfilterspitze mit diesem durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gespült. Nach entsprechender Beschriftung aller Petrischalen erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 7% CO₂.

2.2. Proteintechniken

2.2.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten und Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.1.1. Zellernte und Zellyse

Mit Hilfe dieser Methode wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und für die im Anschluss durchgeführte SDS-Page vorbereitet.

Die adhärent gewachsenen H1299- bzw. CaCo-Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Brutschrank mittels Zellernte gewonnen. Hierzu wurde das sich auf den Zellen befindliche DMEM-Nährmedium verworfen, die Petrischalen zweimal mit PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers die Zellen vom Schalenboden abgekratzt und mittels Pipette in auf Eis gekühlte Eppendorfgeläße überführt. Im Anschluss daran erfolgte die Abzentrifugation der Zellen (1min, 13.000U/min, 4°C) und die Verwerfung des Überstandes.

Die Zellyse des so gewonnenen Zellpellets wurde, je nach Größe des Pellets, durch Zugabe von 200-250µl, 98°C heißem 2X SDS-Gel-Ladepuffer (Lysepuffer)

durchgeführt. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme einer Pipette das mit dem Lysepuffer versetzte Zellpellet resuspendiert, um eine optimale Lysierung der Zellen zu erreichen.

Im nächsten Schritt erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 98°C, welche zum Zellaufbruch, zur Proteindenaturierung und zur Enzyminaktivierung führt und eine Zerstörung der Tertiärstruktur der Proteine bewirkt. Der verwendete SDS-Ladepuffer lysiert sowohl die äußere Zellmembran als auch die Kernmembran der Zellen. Die Proteine werden denaturiert und durch das im Lysepuffer enthaltene SDS alle negativ geladen, wodurch das Laufverhalten der Proteine im SDS-Gel proportional zum Molekulargewicht ist.

Nach Ablauf der Inkubation im Heizblock wurde unter Zuhilfenahme einer 23 Gauge-Kanüle die enthaltene DNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen geschert. Das nach erneuter Zentrifugation (1min, 13.000U/min, 4°C) gewonnene Pellet wurde verworfen und der Protein-enthaltende Überstand nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung für die folgende SDS-PAGE verwendet.

Tris/HCl, pH 6,8	100mM
DTT	200mM
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,2 %
Glycerol	20% (v/v)

Tabelle 1: 2x SDS-Gel-Ladepuffer (Lysepuffer)

2.2.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10µl des Proteinextraktes mit 500µl 0,1M NaOH verdünnt und die Absorption bei 280nm Wellenlänge (OD280nm) im Spektralphotometer gemessen. Die Berechnung der benötigten Proteinmenge erfolgte im Anschluss mit folgender Formel:

$6,4 / OD(280nm) = x \mu l$, welche 15µg Protein enthalten

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers „Ultrospec 3100 pro“ der Firma Amersham Biosciences.

2.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wird mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese vollzogen, wobei in dieser Arbeit die Auftrennung der Proteine ausschließlich nach deren Molekulargewicht erfolgte. Aufgrund der negativen Ladung von Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich sowohl in der Gelmatrix als auch im Puffer im Überschuss befindet, erfolgt eine Anlagerung desselben an die hydrophoben Regionen der Proteine, woraus eine Zerstörung der meisten nichtkovalenten Wechselwirkungen im Protein resultiert. Folge ist eine Kompensation der positiven Ladungen der Proteine mit nachfolgender Erhaltung einer stark negativen Ladung, welche die Eigenladung des Proteins überlagert. Somit wird einerseits gewährleistet, dass die Proteine im Gel ausschließlich zur Anode wandern und andererseits wird dadurch eine komplette Proteindenaturierung bewirkt.

Die Gelmatrix des SDS-Gels setzt sich aus Ketten polymerisierten Acrylamids zusammen, welche durch N,N'-Methylenbisacrylamid eine Quervernetzung erfährt. Als Auslöser der Polymerisierungsreaktion kommt Ammoniumpersulfat (APS) zum Einsatz. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient hier als Katalysator der Reaktion. Sowohl die Mengenverhältnisse der verwendeten Acrylamidkonzentrationen als auch die Bisacrylamidkonzentrationen sind ausschlaggebend für die Porengröße und somit für die Auftrennung des jeweiligen Gels.

Das zu analysierende Proteingemisch wird dabei entsprechend seiner Molmasse in einem Gel aufgetrennt, welches aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und pH-Werten zusammengesetzt ist. Zur Erzielung einer hohen Auflösung bei der Proteintrennung kam bei dieser Arbeit eine diskontinuierliche Gelelektrophorese zum Einsatz.

Zu Beginn der Polyacrylamidgelelektrophorese wandern die Proteine zunächst durch ein grobporiges Sammelgel, in welchem sie bis zu einer einheitlichen Lauffront konzentriert werden. Die anschließende Proteinauftrennung erfolgt dann in einem feinporigen Trenngel.

Zur Ermittlung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde gleichzeitig ein Proteinmarker auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Molekulargewichtsgröße der Referenzproteine des verwendeten Proteinmarkers sind bekannt und werden farblich im Gel angezeigt.

2.2.2.1. Herstellung eines SDS-Gels

Zu Beginn wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5cm), von denen eine Platte an einer Seite eine Aussparung aufweist, zunächst mit Ethanol (70% v/v) gereinigt. In alle drei anderen Seiten der Glasplatten ohne Aussparung wurde jeweils ein Abstandshalter (Spacer) eingelegt und diese zwischen den beiden aufeinander gelegten Platten mit Klammern befestigt. Damit das anschließend zwischen die Glasplatten eingefügte SDS-Gel nicht aus den Gießkammern ausläuft, wurden die Ränder mit 1% Agarose abgedichtet.

Nach Erhärtung der Agarose erfolgte das Eingießen des angesetzten Trenngels zwischen die Platten bis ca. 4cm unter den Rand, gefolgt von der anschließenden vorsichtigen Überschichtung mit Aqua dest..

Im nächsten Schritt wurde nach erfolgreicher Polymerisation des Trenngels das Aqua dest. vollständig abgeschüttet und das angesetzte Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Unmittelbar nach diesem Schritt erfolgte das Einsetzen eines Teflonkammes zur Schaffung von Geltaschen (Slots) für die später aufzutragenden Proteinproben. Dieser Kamm wurde nach Polymerisation des Sammelgels entfernt, ebenso wie der Abstandshalter (Spacer) an der Unterseite des Trenngels.

Anschließend wurde die komplette Glasplattenvorrichtung mit den enthaltenden Gelen senkrecht mit Hilfe von Klammern in die Elektrophoresekammer eingespannt und beide Gelelektrophoresekammern mit

1x Laufpuffer aufgefüllt. Mit Hilfe einer auf eine Spritze aufgesetzte 23 Gauge-Kanüle wurden nun die noch vorhandenen Luftblasen an der Unterseite des Trenngels und aus den Slots entfernt, um einerseits einen kontinuierlichen Stromfluss zu erzeugen und andererseits die Geltaschen von Sammelgelresten, bevor die Proteinproben auf das Gel aufgetragen werden, zu befreien. Unter Zuhilfenahme einer Hamilton- Mikropipette wurden sowohl die Proteinproben, als auch der Proteinmarker in die Geltaschen pipettiert.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte anfangs bei der Durchwanderung des Sammelgels mit 150 V und später im Trenngel bei 220 Volt.

Gelkomponenten	Trenngel			Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	5 %
1M Tris pH 6,8	0	0	0	750µl
1M Tris pH 8,8	4,5 ml	6 ml	6 ml	0
30% Acrylamid	3,2 ml	5,3 ml	7,4 ml	1 ml
2% Bis-Acrylamid	1,28 ml	2,12 ml	2,96 ml	400 µl
10% SDS	240 µl	320 µl	320 µl	120 µl
H2O dest.	2,72 ml	2,26 ml	1,7 ml	3,67 ml
APS	50 µl	140 µl	140 µl	50 µl
TEMED	10 µl	14 µl	14 µl	10 µl

Tabelle 2: Reagenzien für die Herstellung von SDS-Gelen

2.2.3. Western-Blot

Die Western-Blot-Methode beruht auf der Übertragung der zuvor mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran, wobei das entstandene Proteinmuster auf der PVDF-Membran immobilisiert erhalten bleibt und durch spezifische Antikörper immunologisch identifiziert werden kann.

2.2.3.1. Proteintransfer und immunologischer Nachweis der übertragenen Proteine

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte unter Verwendung einer PVDF-Membran der Firma Millipore, welche vor Beginn des Blots in Methanol äquilibriert wurde. Die Vorrichtung zur Durchführung des Western-Blots bestand aus zwei PVC-Gittern, welche zusammengesetzt wurden.

Hierzu wurden auf ein PVC-Gitter ein Schwammtuch, zwei Whatman-Papiere, das Polyacrylamidgel, jedoch seitenverkehrt, die Immobilon-Membran, erneut zwei Whatman-Papiere und wiederum ein Schwammtuch aufgelegt. Die obere Begrenzung dieser Blot-Vorrichtung bildete ein zweites PVC-Gitter, welches für eine luftblasenfreie Abdeckung des Blots sorgte.

Anschließend wurde die komplette Kunststoffgittervorrichtung in eine mit Western-Transferpuffer gefüllte Kammer eingespannt und der Transfer je nach Proteingröße zwischen 3h und 4h bei 380mA vollzogen. Während dieser Zeit erfolgte die Übertragung der zur Anode wandernden negativ geladenen Proteine von dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran.

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die Immobilon-Membran luftgetrocknet und die ebenfalls auf die Membran geblottete Markerspurs mittels Skalpell abgetrennt. Die restlich vorhandene Membran mit den übertragenen Proteinen wurde anschließend für 30 Minuten mit 5% iger PBS-Magermilch inkubiert, um unspezifische Bindungen auf der Membran zu blocken.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Inkubation der auf die Membran transferierten, immobilisierten Proteine zusammen mit den entsprechenden Primär-Antikörpern in einer luftblasenfrei eingeschweißten Klarsichtfolie über Nacht bei 4°C. Vor der Inkubation der Immobilon-Membran mit dem Sekundär-Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, erfolgte ein Waschschriff von 3x 10 Minuten mit PBS, um lose, nicht gebundene Antikörper von der PVDF-Membran zu eliminieren. Die Membran wird 2h bei Raumtemperatur (RT) mit dem Sekundär-AK inkubiert, wonach sich nochmal ein Waschschriff von 3x 10 Minuten mit PBS anschließt.

Im Anschluss daran erfolgte der Nachweis der gebundenen Sekundär-Antikörper mittels einer Peroxidase-katalysierten chemischen Reaktion. Bei dieser Art der Detektion handelt es sich um die „enhanced Chemiluminescence“ -Methode (ECL, Amersham), welche auf einer enzymkatalysierten Lichtreaktion beruht. Diese Lichtemission mit einer Wellenlänge von 428nm entsteht, wenn es durch den Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper zur Reduktion von H₂O₂ und zur Oxidation von Luminol kommt.

Hierzu wurde die PVDF-Membran, welche zuvor mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurde, für 1 Minute mit den kurz zuvor 1:1 gemischten ECL TM-Lösungen in eine Kunststoffschale eingelegt und die Lichtemission mittels eines ECL TM-Films (Hyperfilm ECL TM, Amersham) unter Anwendung der entsprechenden Expositionszeit dokumentiert. In einem letzten Schritt erfolgte die Entwicklung, Fixierung und Trocknung des Films.

2.2.3.1. „Stripping“: Entfernung gebundener Antikörper

Unter „ Stripping“ versteht man die Entfernung der an die Membran gebundenen Primär- und Sekundär-Antikörper nach der Durchführung einer ECL-Färbung. Mit Hilfe dieser Methode kann die gleiche PVDF-Membran für weitere immunologische Nachweise herangezogen werden, da es aufgrund von Vergleichsgründen in wenigen Versuchsreihen wichtig war, die gleiche Immobilon-Membran mit verschiedenen Antikörpern zu inkubieren.

Hierzu wurde die Membran für 30 Minuten in 50 ml Stripping Puffer bei 55°C im Wasserbad inkubiert, um durch die im Puffer vorhandenen Reagenzien wie beispielsweise SDS und β-Mercaptoethanol die kovalenten Bindungen zwischen Proteinen und Antikörpern zu lösen. In einem nächsten Schritt wurde die PVDF-Membran viermal für ca. 5 Minuten mit PBS gewaschen und stand nun für eine weitere Antikörper-Inkubation zur Verfügung.

SDS	2 %
Tris pH 6,6	62,5mM
β-Mercaptoethanol	100mM

Tabelle 3: Reagenzien des Stripping Puffers

2.2.4. *In-vivo*-Ubiquitinierung

H1299-Zellen wurden am Tag vor Transfektion mit den angegebenen Plasmiden in 10cm Schalen ausgesät, um eine Dichte von bis zu 70-80% zu erreichen. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für weitere 4-6 h mit 10 µM MG132 behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Ein Zehntel der Zellen wurde als Input-Kontrolle entnommen. Die restlichen Zellen wurden in 400 µl TBS-Lysepuffer (1% SDS in TBS; TBS: 120 mM NaCl, 1mM EDTA pH 8, 20mM Tris/HCl pH 8) pro 10 cm Schale bei 95°C für 5 Minuten lysiert.

Die gewonnenen Lysate wurden mehrmals mit einer 23 Gauge-Nadel aufgezogen und danach für 10 Sekunden kräftig gevortext. Anschließend wurde pro 400 µl des Lysates jeweils 800 µl TBS-Triton-Puffer (1,5% Triton X-100 in TBS) hinzugegeben und gemischt, bevor es mit 100 µl einer 1:1 Mischung aus Protein G und Protein A Sepharose (GE Healthcare) inkubiert wurde. Die darauffolgende Inkubation erfolgte bei 4°C für 1 Stunde auf einem rotierenden Rad (Preclearing).

Im Anschluss daran wurden die Proben für 5 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde mit 100 µl einer 1:1 Mischung aus Protein G und Protein A Sepharose, präkonjugiert mit 4 µg der angegebenen Antikörper, für mindestens 4 Stunden bei 4°C inkubiert.

In einem nächsten Schritt erfolgte die dreimalige Waschung der Proben in 1 ml TBS-Mischung (1 Teil TBS-Lysepuffer plus 2 Teile TBS-Triton-Puffer). Danach wurden die gewaschenen Beads in 30 µl 95°C heißem SDS-Probenpuffer (100 nM Tris-HCl (pH 6,8), 100 nM DTT, 4% SDS und 20% Glycerol) resuspendiert und für 10 Minuten gekocht. Die Proteine wurden nun mittels einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran (Immobilon P,

Millipore) immobilisiert und mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

2.2.5. Co-Immunpräzipitation und sequentielle Immunpräzipitation

Die H1299-Zellen wurden mit einer Dichte von 60 % ausgesät und mit den angegebenen Plasmiden unter Verwendung von JetPei-Transfektionsreagenz nach den Empfehlungen des Herstellers transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 2-6 Stunden mit 10 μ M MG132 (Sigma) behandelt. Im Anschluss wurden 4 μ g der angegebenen Antikörper zu einer 1:1:1 Mischung aus Protein A Sepharose, Protein G Sepharose und Gamma-Bind-Sepharose (alle von GE Healthcare) dem Co-Immunpräzipitation-Lysepuffer (0,5% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄ X 12 H₂O, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, supplementiert mit 1 mM PMSF und Proteaseinhibitoren) hinzugegeben und auf einem rotierenden Rad für mindestens 4 Stunden inkubiert.

Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Co-Immunpräzipitation-Lysepuffer (Co-IP-Lysepuffer) entfernt.

Anschließend wurden die Zellen geerntet und in steriler Phosphatpuffer-Salzlösung gewaschen. Ein Zehntel der Zellen diente als Input-Kontrolle und wurde in SDS-Probenpuffer lysiert (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4% SDS und 20% Glycerin). Die verbleibenden Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis mit Co-IP-Lysepuffer permeabilisiert. Die gewonnenen Extrakte wurden anschließend bei 16.000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation des Überstandes mit der Sepharose-Antikörper-Mischung für mindestens 4 Stunden bei 4°C. Die Präzipitate wurden dreimal mit Co-IP-Lysepuffer gewaschen, bevor der SDS-Probenpuffer zugesetzt wurde. In einem nächsten Schritt wurden alle Proben für 10 Minuten gekocht und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit darauffolgendem Western-Blot unterzogen.

Für die sequentielle Immunpräzipitation der Flag-VDR- und Flag-p53-Komplexe wurden die H1299-Zellen in 10 cm Schalen mit einer Dichte von 60% ausgesät und mit den angegebenen Plasmiden unter Verwendung von jetPEI (Peqlab) nach den Empfehlungen des Herstellers transfiziert. Der α -Flag-AK M2 (Sigma) wurde wie vom Hersteller angegeben, kovalent an Affi-Prep Hz Hydrazide (Bio-Rad) gebunden. Für die Äquilibrierung der Matrix und der Entfernung von ungebundenen Antikörpern, wurden die Beads dreimal mit Co-IP-Lysepuffer (0,5% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄ X 12 H₂O, 5 mM EDTA) inklusive 2% Glycerol gewaschen.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 10 μ M MG132 für 5 Stunden behandelt, anschließend geerntet und in steriler Phosphatpuffer-Salzlösung gewaschen. Ein Zehntel der Zellen diente als Input-Kontrolle und wurde in SDS-Probenpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4% SDS und 20% Glycerol) lysiert. Die verbleibenden Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis mittels Co-IP-Lysepuffer plus 2% Glycerol permeabilisiert, gefolgt von einer 30 minütigen Zentrifugation bei 16.000g und 4°C. Der Überstand wurde mit 100 μ l des α -Flag-AK M2, gebunden an Affi-Prep Hz Hydrazid, über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Präzipitate wurden sechsmal mit Co-IP-Lysepuffer plus 2 % Glycerol gewaschen und Flag-konjugierte Komplexe wurden mit 100 μ l Flag-Peptid (Sigma) über Nacht bei 4°C eluiert. 2 μ g des monoklonalen Anti-MDM2-AK 3G9 (Millipore) bzw. 2 μ g des irrelevanten monoklonalem Anti-HRS3-AK wurden einem 1:1 Gemisch aus Protein A Sepharose und Protein G Sepharose in Co-IP-Lysepuffer plus 2% Glycerol zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Co-IP-Lysepuffer entfernt.

Die Affi-Prep Hz Hydrazid Kügelchen, welche über Nacht mit Flag-Peptid inkubiert wurden, wurden zentrifugiert und der Überstand entweder mit den MDM2-AK-Kügelchen oder mit den irrelevanten-AK-Kügelchen inkubiert. Auch diese Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Die Präzipitate wurden dreimal mit Co-IP-Lysepuffer plus 2% Glycerol gewaschen, bevor der SDS-Probenpuffer zugesetzt wurde. Alle Proben wurden 10

Minuten lang gekocht und einer SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot unterzogen.

2.3. RNA-Techniken

2.3.1. RNA-Präparation als Vorbereitung für die Umschreibung in cDNA

Die Durchführung der RNA-Präparation vor der Umschreibung in cDNA erfolgte mit Hilfe von zwei Kits der Firma Qiagen: RNeasy Mini Kit (50) und QIAshredder TM (50).

Vor Beginn der Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers der RLT-Puffer in einer 15ml Falcon entsprechend eingesetzter Menge mit β -Mercaptoethanol versetzt und dem RPE-Puffer 44ml 70%-iges Ethanol hinzugefügt. Im Anschluss an diese Vorbereitungen wurden die bei Gefriertemperaturen gelagerten Zellpellets als Ergebnis der zuvor durchgeführten Zellernte, mit jeweils 600 μ l RLT-Puffer pro Pellet versetzt, resuspendiert und in einen entsprechend beschrifteten Shredder (lila), welche ebenfalls im Kit enthalten waren, überführt. Die Shredder mit den beinhaltenden Proben wurden anschließend für 3 Minuten bei 25°C und 15.000 U/Minute zentrifugiert. Nachfolgend wurde zum gewonnenen Lysat 600 μ l 70%-iges Ethanol pro Shredder hinzugefügt, der Inhalt erneut resuspendiert und in ein entsprechend beschriftetes Säulchen (rosa) pipettiert. Die Zentrifugation der Säulchen erfolgte für 15 Sekunden bei 10.000 U/Minute, wobei der gewonnene Durchlauf jeweils verworfen wurde.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 700 μ l RW1-Puffer pro Säulchen, gefolgt von einer Zentrifugation über 15 Sekunden bei 10.000 U/Minute. Auch hier erfolgte anschließend die Verwerfung des Durchflusses aus den Säulchen. Nachfolgend wurde zu jedem Säulchen 500 μ l RPE-Waschpuffer pipettiert, 15 Sekunden bei 10.000 U/Minute zentrifugiert und das entstandene Lysat verworfen. Dieser Schritt wurde erneut wiederholt, jedoch mit einer Zentrifugationszeit von 2 Minuten.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Überführung der Säulchen in entsprechend beschriftete Eppendorfgefäße unter Hinzugabe von 30 µl RNase freiem Wasser pro Probe. Alle Proben wurden für 1 Minute bei 10.000 U/Minute zentrifugiert, die Säulchen aus den Eppendorfgefäßen anschließend verworfen und 2 µl pro gewonnener Probe in ein entsprechend markiertes Eppendorfgefäß pipettiert, welche zur Vermessung der RNA-Konzentration im Spektralphotometer herangezogen wurden. Die Vermessung erfolgte mittels des Spektralphotometers Nanovue der Firma GE Healthcare bei A260nm, A280nm und A260nm/A280nm Wellenlänge. Alle Proben wurden dreimalig vermessen und der errechnete Mittelwert (MW) zur weiteren Vorgehensweise herangezogen.

Alle RNA-Proben, welche zu einem späteren Zeitpunkt in cDNA umgeschrieben werden sollten, wurden bei -80 C° weggefroren.

2.3.2. Umschreibung der RNA in cDNA mittels Reverser Transkription

Die Herstellung von cDNA wurde unter Zuhilfenahme der Omniscript Reverse Transkriptase von der Firma Qiagen durchgeführt. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase erfolgt die Umschreibung der RNA in cDNA (complementary DNA). Sogenannte „random Hexamer“-Oligonukleotide definieren den Startpunkt der Erststrangsynthese, welche sich zufällig entlang der RNA anlagern. Die hier eingesetzte Reverse Transkriptase lagert sich anschließend an diese Oligonukleotide an und produziert mit Hilfe von dNTPs einen komplementären DNA-Strang.

Die Umschreibung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zu Beginn wurde der RNase Inhibitor (40 U/µl) mit 1x RT-Puffer 1:4 verdünnt um eine Konzentration von 10 U/µl zu erhalten.

10 x RT-Puffer	2 µl
dNTPs	2 µl
Primer (50 µg/ml, Random Primer 1:10 verdünnt)	1,8 µl
RNasin (10 U/µl)	1 µl
Omniscrypt Reverse Transkriptase	1 µl

Tabelle 4: Reagenzien für die Herstellung des Mastermixes pro Ansatz

Zu dem benötigten Master-Mix pro Probe (7,8 µl) wurden zusätzlich 1 µl RNA hinzugefügt und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 19 µl aufgefüllt. Anschließend wurden alle RNA-Proben für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und nachfolgend im Heizblock für 5 Minuten bei 93 °C inaktiviert. Die Vermessung der so entstandenen cDNA-Menge erfolgte mittels des Spektralphotometers Nanovue der Firma GE Healthcare bei A260nm, A280nm und A260nm/A280nm. Alle Proben wurden dreimalig vermessen und der errechnete Mittelwert (MW) zur weiteren Vorgehensweise herangezogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.4. DNA-Techniken

2.4.1. Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Um aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Strängen selektiv Nukleinsäuresequenzen mit einer definierten Länge vervielfältigen zu können, wurde in dieser Arbeit die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) herangezogen. Ausgehend von einem DNA-Einzelstrang, kann somit unter Zuhilfenahme von DNA-Polymerasen ein neuer komplementärer Strang gebildet werden.

Als erstes erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, gefolgt von der spezifischen Anlagerung der Oligonukleotide an den

entsprechenden Einzelstrang, wobei Start- und Endpunkt der zu vervielfältigten Sequenz von den Oligonukleotiden definiert wurde. Mit Hilfe von Desoxynukleotiden (dNTPs) wurden nun in einem nächsten Schritt die mit Primern verbundenen Einzelstränge zu einem Doppelstrang aufgefüllt.

Diese neusynthetisierten DNA-Stränge, welche durch die Primer genau definierte Ausgangspunkte aufweisen bzw. durch diese flankiert sind, wurden nach weiteren Reaktionszyklen nur noch zu doppelsträngigen DNA-Molekülen. Mehrmalige Wiederholungen dieser Reaktionsabfolgen führten letztendlich zur exponentiellen Amplifizierung der gewünschten Zielsequenz.

Durchgeführt wurde die qRT-PCR mit Hilfe des StepOne Plus von Applied Biosystems. Alle verwendeten Primer, ebenso wie das verwendete Quanti Tect SYBRGreen PCR Kit, stammten von der Firma Qiagen. Alle Reagenzien, welche für die qRT-PCR verwendet wurden, entstammten diesem Kit.

Zu Beginn wurden die Primer, die cDNA-Proben, das SYBRGreen, welches lichtempfindlich ist und das QPCR-Standard, welches zur Herstellung der Standardkurve herangezogen wurde, aufgetaut und auf Eis gelagert. Anschließend wurde zur Herstellung der Standardkurve eine serielle 1:10 Verdünnung des QPCR-Standard (200ng) angefertigt. Hierzu wurden in 4 Eppendorfgefäße 18µl RNase freies Wasser vorgelegt und aus dem QPCR-Standard 2µl in das Eppendorfgefäß mit der Beschriftung 20ng pipettiert. Das weitere Vorgehen erfolgte analog bis zu einer Verdünnung von 0,02ng.

In einem weiteren Schritt erfolgte nach der Vermessung der cDNA-Proben im Spektralphotometer die Verdünnung derselben auf eine Konzentration von 100ng/µl.

Folgende Rechnung ergab sich somit für eine gemessene cDNA-Probenkonzentration von beispielsweise 796ng/μl:

$$796\text{ng}/\mu\text{l}: 100\text{ng}/\mu\text{l} = 7,96$$

Die Zahl 7,96 bezeichnet den Verdünnungsfaktor (Vf). Dieser Verdünnungsfaktor diente zum Ansatz von jeweils 50μl einer jeden 100ng/μl verdünnten cDNA-Probe.

Folgende Rechnung ergab sich folglich für den Vf 7,96:

$$50\mu\text{l}/\text{Vf } 7,96 = 6,2814\mu\text{l}$$

Die Zahl 6,2814 definiert somit die benötigte cDNA-Menge (μl) für diese Probe, welche für die qRT-PCR eingesetzt wurde.

In einem nächsten Schritt erfolgte der Ansatz des Mastermixes. Je Probe und je Primer bestand dieser aus folgenden Komponenten:

SYBRGreen	10μl
Primer	2μl
RNase freies Wasser	6μl

Tabelle 5: Reagenzien für die Herstellung des Mastermixes für die qRT-PCR

Pro Probe und pro Primerpaar wurden Triplikate hergestellt.

In einer 96 MicroAmp Platte, welche auf einem Eisblock stand, wurden zuerst 18μl Mastermix pro well vorgelegt und anschließend jeweils 2μl cDNA hinzugegeben. Die Platte wurde im Anschluss mit einer Cover Folie verschlossen, abzentrifugiert, in den StepOne Plus eingelegt und das Programm gestartet.

Das Zeitprotokoll lautete wie folgt: 95°C für 15 Minuten; dann 40 Zyklen: 94° C für 15 Sekunden, 60°C für 1 Minute und 72°C für 30 Sekunden. Das Zeitprotokoll der Schmelzkurve ergab sich aus: 95°C für 15 Sekunden, 60°C für 1 Minute und 95°C für 15 Sekunden.



Abbildung 12: Zeitprotokoll für die qRT-PCR mit dem StepOne Plus von Applied Biosystems

IV. ERGEBNISSE

Es war bekannt, dass der multifunktionelle Transkriptionsfaktor VDR als metabolischer Regulator und Tumorsuppressor wirken kann. Es lag deshalb Nahe zu mutmaßen, dass er mit anderen, funktionell ähnlichen Transkriptionsfaktoren, insbesondere denjenigen aus der p53-Familie, welche gleichermaßen als metabolische Regulatoren und Tumorsuppressoren wirken können, regulatorische Proteine teilt. Diese Mutmaßung wurde durch bereits bekannt Mechanismen des Zusammenwirkens der VDR- und p53-Achsen gestützt. So wusste man beispielsweise, dass sowohl p53 als auch der VDR, das Gen für MDM2 transaktivieren kann (204,205). MDM2 ist jedoch einer der Haupt-Negativregulatoren der p53-Proteinfamilie (170). Wir untersuchten deshalb zunächst, ob MDM2 womöglich auch mit dem VDR interagiert.

Frau Dr. Kristina Heyne und ich hatten in Vorarbeiten zu dem vorliegenden Projekt mit Hilfe der Immunpräzipitation erstmals zeigen können, dass die beiden Proteine VDR und MDM2 tatsächlich aneinander binden.

1. Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) bindet an MDM2

Zunächst wurden menschliche H1299-Lungenadenokarzinomzellen, welche p53-defizient sind, in Petrischalen mit DMEM-Nährmedium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 7% CO₂ angezogen. Anschließend wurden verschiedene Kombinationen von Plasmiden in gleichen Mengen transfiziert, welche den Flag-markierten menschlichen VDR sowie MDM2 produzieren. 24h nach der Transfektion wurden die H1299-Zellen für weitere 4h mit MG132 behandelt, welches als Proteasomblocker fungiert. Auf diese Weise wurde verhindert, dass MDM2 sowie eventuell der VDR abgebaut werden.

Schließlich wurden die Zellen aufgebrochen. Zellextrakte wurden für die Co-Immunpräzipitation vorbereitet und entweder mit monoklonalem Anti-Flag-VDR

Antikörper oder irrelevantem monoklonalem IgG Anti-HRS3 Antikörper, welcher weder an Flag-VDR noch MDM2 bindet, inkubiert (Abb.13a).

Die Immunpräzipitate (IP), die Co-Immunpräzipitate (Co-IP) und die Proteine in den Gesamtzell-Lysaten (TCL) wurden durch Western-Blot analysiert, unter Verwendung des Anti-Flag Ak M2, des monoklonalen Anti-MDM2 Antikörpers 3G9 oder des Anti- β -Actin Antikörpers. Die Gesamtzell-Lysate dienten als Kontrolle der Transfektion und als Beweis für die erfolgreiche Expression der Proteine (Abb.13a und b).

Wir konnten nachweisen, dass MDM2 gemeinsam mit Flag-VDR gefällt werden kann (Abb. 13a). Umgekehrt, wenn die Zellextrakte mit monoklonalem Anti-MDM2 Antikörper 3G9 inkubiert wurden oder mit irrelevantem IgG als Kontrolle, wurde Flag-VDR gemeinsam mit MDM2 gefällt (Abb.13b). Sogar die geringe endogene Menge an MDM2 in der H1299-Zelllinie reichte aus, um Flag-VDR in der Immunpräzipitation mit Anti-MDM2 Antikörper 3G9 zu fällen.

Insgesamt deutete diese erste Untersuchung also darauf hin, dass VDR und MDM2 interagieren können.

Außerdem zeigte sich, dass die Menge an Flag-VDR in der Zelle bei gleichzeitiger Expression von MDM2 reduziert war (Abb. 13). Da MDM2 als Ubiquitinligase die Stabilität von interagierenden Proteinen verringern kann, wies diese Beobachtung darauf hin, dass VDR Substrat von MDM2 sein könnte.

Die Feststellung der Bindung des VDR an MDM2 war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

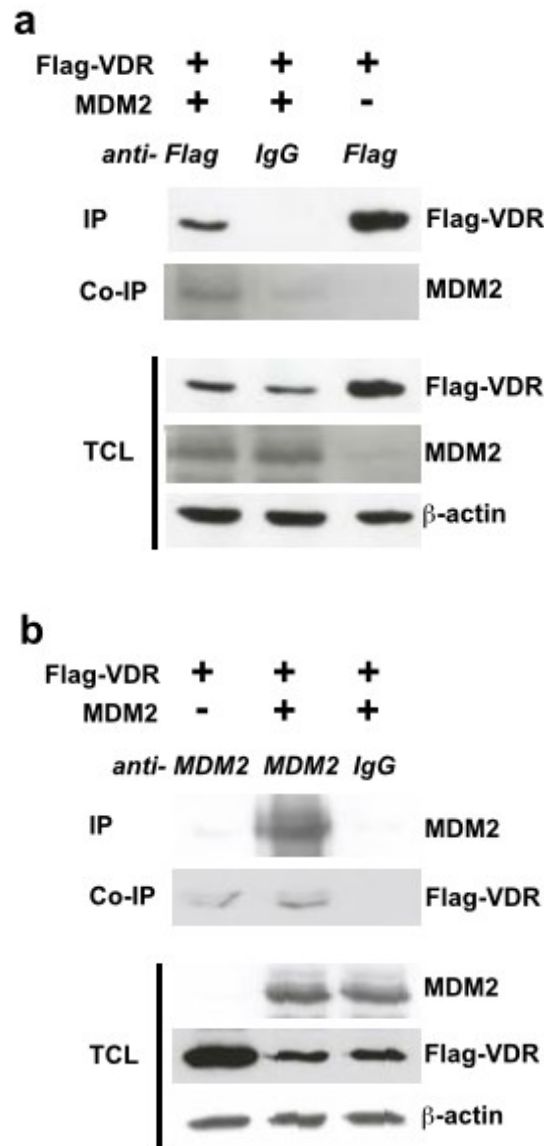


Abbildung 13: Co-Immunpräzipitation von a) MDM2 mit Flag-VDR bzw. b) von Flag-VDR mit MDM2. Abbildung aus Heyne K., Heil T.-C. et al., „MDM2 binds and inhibits vitamin D receptor.“ Cell Cycle Mai 2015. IP= Immunpräzipitation; Co-IP= Co-Immunpräzipitation; TCL= Gesamtzellextakte; +/- = zeigen Transfektionen; β -actin= Ladekontrolle. Die Plasmidkonzentration betrug jeweils 4 μ g und MG132 wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Verwendete AK für die Co-Immunpräzipitation waren der monoklonale Anti-Flag-VDR-AK und der irrelevante monoklonale IgG Anti- HRS3-AK, jeweils 2 μ g. Weiterhin zum Einsatz kamen der Anti-Flag-AK M2 (1:10.000), der Anti-MDM2-AK 3G9 (1:2000) und ein β -Actin -AK (1:10.000).

2. Antikörper-Spezifizierung zur Erkennung des endogenen VDR: Nachweisbarkeit des Rezeptors in H1299- & CaCo-Zellen

Nach dem Hinweis, dass der VDR und MDM2 aneinander binden und somit zwischen ihnen eine Interaktion stattfindet, bestand die erste und wichtige Aufgabe dieser Arbeit darin, einen kommerziell erhältlichen Antikörper (AK) zu identifizieren, mit welchem sich der endogene, nicht Flag-markierte Vitamin D- Rezeptor in humanen Zelllinien eindeutig nachweisen ließ.

Der VDR wird in sehr vielen Zelltypen, jedoch immer nur in sehr geringen Konzentrationen exprimiert. Die bereits allgemein verfügbaren mono-oder polyklonalen AK für den VDR hatten sich in der Vergangenheit z.T. als von fraglicher Spezifität herausgestellt. Als geeignete Zelllinien für die durchzuführenden Experimente dieser Arbeit erwiesen sich humane Lungenadenokarzinomzellen (H1299) und humane Colonadenokarzinomzellen (CaCO), da beide defizient für Wildtyp-p53 sind und sich somit sehr gut eignen, um die Interaktionen zwischen dem VDR und MDM2 frei von störendem, weil selbst mit MDM2 interagierenden, p53 zu untersuchen.

An beiden Zelllinien wurden sowohl ein polyklonaler Kaninchen Anti-VDR-AK, als auch ein monoklonaler Ratten Anti-VDR-AK (9A7) getestet (Abb.14). Hierzu wurden die H1299- & die CaCo-Zellen in Petrischalen mit DMEM-Nährmedium, welches Zusätze von fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B enthält, ausgesäht und anschließend im Brutschrank bebrütet. Die anschließende Zellernte erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Zelltypen, bei den H1299-Zellen nach 3 Tagen und den CaCo-Zellen nach 6 Tagen.

Die nach Abzentrifugation gewonnenen Zellpellets wurden einer Zellyse unterzogen, um die daraus gewonnenen Proteine für die anschließende SDS-Gelelektrophorese und den folgenden Western-Blot vorzubereiten.

Nach dem Auftrennen der Proteine nach ihrer Molekülgröße im 10%igen SDS-

Gel und dem Übertragen derselben auf eine PVDF-Membran durch den Western-Blot, erfolgte eine Inkubation, über Nacht bei 4°C, mit beiden zu testenden Primär-AK, dem VDR-AK 9A7 und dem VDR-AK CHIP. Im Anschluss daran wurde mit den jeweiligen Sekundär-AK, Anti-Ratten-AK bzw. Anti-Kaninchen-AK, welche gegen die Primär-AK gerichtet sind, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und das Ergebnis des durchgeführten Versuchs in der Dunkelkammer auf Röntgenfilm entwickelt.

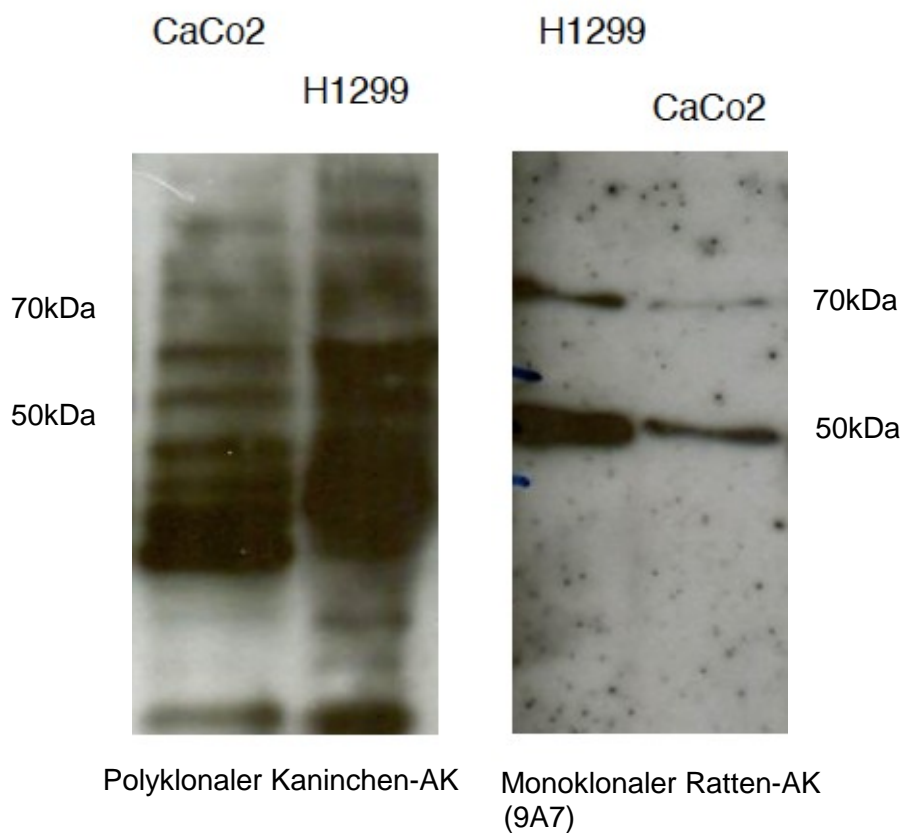


Abbildung 14: AK-Spezifisierung zum Nachweis des endogenen VDR an H1299- und CaCo-Zelllinien. *Links:* Polyklonaler Kaninchen-AK getestet an CaCo-Zellen (linke Bande) und an H1299-Zellen (rechte Bande); *Rechts:* Monoklonaler Ratten-AK 9A7 getestet an H1299-Zellen (rechte Bande) und an CaCo-Zellen (linke Bande). 70kDa und 50kDa zeigen die Proteinmarkerbanden. Zum Einsatz kamen als Primär-AK, ein polyklonaler Kaninchen-AK und der monoklonale Ratten-AK 9A7, jeweils im Verhältnis 1:1000. Verwendete Sekundär-AK waren ein Anti-Kaninchen-AK und ein Anti-Ratten-AK, jeweils im Verhältnis 1:3000.

Sowohl der polyklonale Kaninchen-AK als auch der monoklonale Ratten-AK 9A7 zeigten diverse Signale (Abb.14). Der polyklonale Kaninchen-AK erwies sich für die weiteren Untersuchungen als unbrauchbar, da er zu unspezifisch interagiert. Der monoklonale Ratten-AK 9A7 hingegen zeigte sich wesentlich spezifischer und erkannte lediglich zwei Proteinbanden im Bereich von ca. 50 und 70kDa (Abb.14). Der VDR besitzt eine Größe von ca.48kDa. Es wurde also zunächst der AK 9A7 weiterverwendet.

Allerdings stand der Nachweis noch aus, dass es sich bei der Bande von ca. 50kDa wirklich um den endogenen VDR handelt, da dieser in Zellen bekanntlich nur sehr schwach exprimiert wird. Es wurden deshalb im Folgenden zwei weitere Untersuchungen vorgenommen, um dies zu überprüfen: a) eine Plasmidtransfektion mit VDR-Expressionsvektor und b) ein Knockdown des endogenen VDR durch eine gegen die VDR mRNA gerichtete siRNA.

3. Transfektion von VDR Plasmid in H1299 Zellen zur Expression des VDR

Zur Plasmidtransfektion wurden die adhärennten H1299-Zellen in 3 Petrischalen unter Zugabe von DMEM-Nährmedium ausgesät und im Brutschrank bei den bereits oben erwähnten Bedingungen für 24h bebrütet. Im Anschluss daran, blieb Petrischale Nr.1 untransfiziert und diente lediglich als Negativkontrolle. Die H1299-Zellen der Petrischale Nr.2 wurden mit Leervektor behandelt und diejenigen der Nr.3 erhielt VDR-Plasmid, Leervektor sowie p53-Plasmid als interne Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion und Expression von Proteinen (Abb.15).

Zur Transfektion wurden in 2 Eppendorfgefäßen zusätzlich zu den Plasmiden bzw. dem Leervektor jeweils 0,9 % NaCl-Lösung und jeweils das Transfektionsreagenz HiPerfect (Quiagen) pipettiert, mit der Pipette resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die tropfenweise Zugabe der Lösung auf die H1299-Zellkultur der Petrischalen Nr.2 und Nr.3, gefolgt von einer erneuten Bebrütung für 24h.

Anschließend wurden die nach Zellernte und Abzentrifugation, gewonnenen Zellpellets einer Zelllyse mittels SDS Lysepuffer unterzogen zur Gewinnung der Proteinextrakte. Dieser Lysepuffer lysiert sowohl die äußere Zellmembran als auch die Kernmembran und bewirkt eine Proteindenaturierung und Inaktivierung der Enzyme in der Zelle.

Nach erfolgter Proteinmengenbestimmung im Spektralphotometer, bei einer Wellenlänge von 280 nm, wurden die Proteinlysate mittels 10% SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt und im Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Nachfolgend wurde eine Inkubation für 24h mit dem Primär-AK 9A7 bei 4°C vollzogen und ein Peroxidase-konjugierter Anti-Ratten-AK, als Sekundär-AK eingesetzt. Das Sichtbarmachen des Ergebnisses der Plasmidtransfektion erfolgte in der Dunkelkammer auf einem Film für Chemilumineszenz.

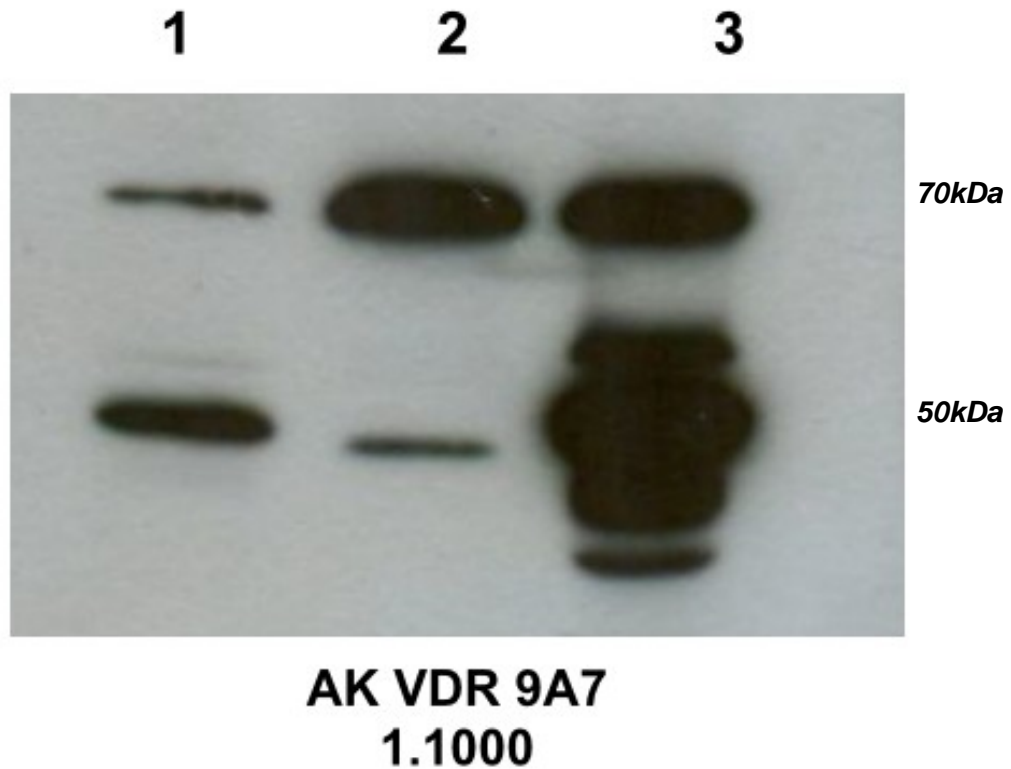


Abbildung 15: Transfektion von VDR-Plasmid in H1299-Zellen. 1. untransfizierte H1299 Zellen. 2. Transfektion des Leervektors (8 μ l). 3. Transfektion des VDR-Plasmids (4 μ l), des Leervektors (4 μ l) und des p53- Plasmids (0,5 μ l). Nachweis mit dem Primär-AK Anti-VDR Ak 9A7 (1:1000). Verwendeter Sekundär-AK war ein Anti-Ratten-AK (1:5000). 70kDa und 50kDa repräsentieren die Proteinmarkerbanden.

Es zeigte sich, dass das transfizierte VDR-Plasmid ein Signal bei 48kDa produzierte, also etwa auf der Höhe des unteren Signals, das von 9A7 in untransfizierten Zellen erzeugt wird. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei diesem unteren Signal in der Tat um den endogenen VDR handelte (Abb.15).

Bei der zusätzlich auftretenden Signalbande im Bereich von ca.70kDa (Abb.15) könnte es sich um eine Variante des VDR-Proteins oder um ein kreuzreagierendes fremdes Protein handeln.

Zur Verifizierung der Identität des 70kDa Signals als endogener VDR erfolgte im Anschluss ein erneutes Transfektionsexperiment, diesmal mit zwei

unterschiedlichen, jedoch bereits verifizierten (Quiagen), VDR-siRNA's, um durch Hemmung der VDR-mRNA Translation das Verschwinden des VDR Proteins zu erreichen.

4. Transfektion der si RNA's VDR8 & VDR9 in H1299 Zellen zur Identifizierung des VDR durch dessen Knockdown

Das folgende Transfektionsexperiment, unter Zuhilfenahme der beiden siRNA's VDR8 und VDR9, wurde ebenfalls mit der H1299-Zelllinie durchgeführt (Abb. 16).

Zu Beginn des Versuches wurden 4 entsprechend beschriftete Petrischalen, unter Verwendung von DMEM-Medium, mit H1299-Zellen ausgesät und für 24h im Brutschrank, unter den oben genannten Bedingungen, zum Anwachsen der adhärennten Zellen bebrütet. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der beiden siRNA's VDR 8 und VDR 9 für die anschließende Transfektion der Zellen unter der Sterilbank.

Zur Transfektion der ausgesäten H1299-Zellen wurden sowohl die beiden einzusetzenden siRNA's, als auch eine Kontroll-siRNA (siRNA c) (Abb. 16, Bande 2), 1:5 mit RNA-ase freiem Wasser verdünnt.

Im Anschluss daran wurden diese siRNA's zusammen mit FKS-freiem Medium in ein entsprechend beschriftetes Eppendorfgesäß überführt, zu jeder Suspension ein Transfektionsreagenz (HiPerfect, Quiagen) hinzugegeben, resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter der Sterilbank inkubiert.

Der Inhalt eines jeden Eppendorfgesäßes, mit einer nun endgültigen siRNA-Konzentration von 5nM, wurde tropfenweise auf die entsprechend analog beschrifteten H1299-Zellen in den Petrischalen pipettiert und diese für 48h bebrütet.

Eine Petrischale blieb als Negativkontrolle des Experiments untransfiziert. Die Kontroll - siRNA diente zum Nachweis der Nichtbeeinflussung des Versuchsergebnisses durch das eingesetzte Transfektionsreagenz (Abb.16, Bande 1 & 2).

Nach der 48-stündigen Bebrütung erfolgte die Zellernte, unter Gewinnung der jeweiligen Zellpellets durch Zentrifugation, welche, wie oben bereits erwähnt, mittels Lysepuffer zur Herstellung der Proteinextrakte lysiert wurden. Der Messung der Proteinabsorption bei 280nm unter Zuhilfenahme eines Spektralphotometers, folgte die Beladung eines 10% SDS-Gels mit dem Protein einer jeden Probe. Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße in der Gelelektrophorese, unter Zuhilfenahme eines Proteinmarkers (Page Ruler, Prestained Protein Ladder) wurde ein Western-Blot durchgeführt und der Primär-AK 9A7 und der Sekundär-AK (Anti-Ratten-AK) eingesetzt.

Die Entwicklung des Blots in der Dunkelkammer mittels Chemilumineszenzfilm erfolgte nach einer langen Exposition von 2h. Dies erwies sich zur Darstellung des endogenen hVDR als notwendig.

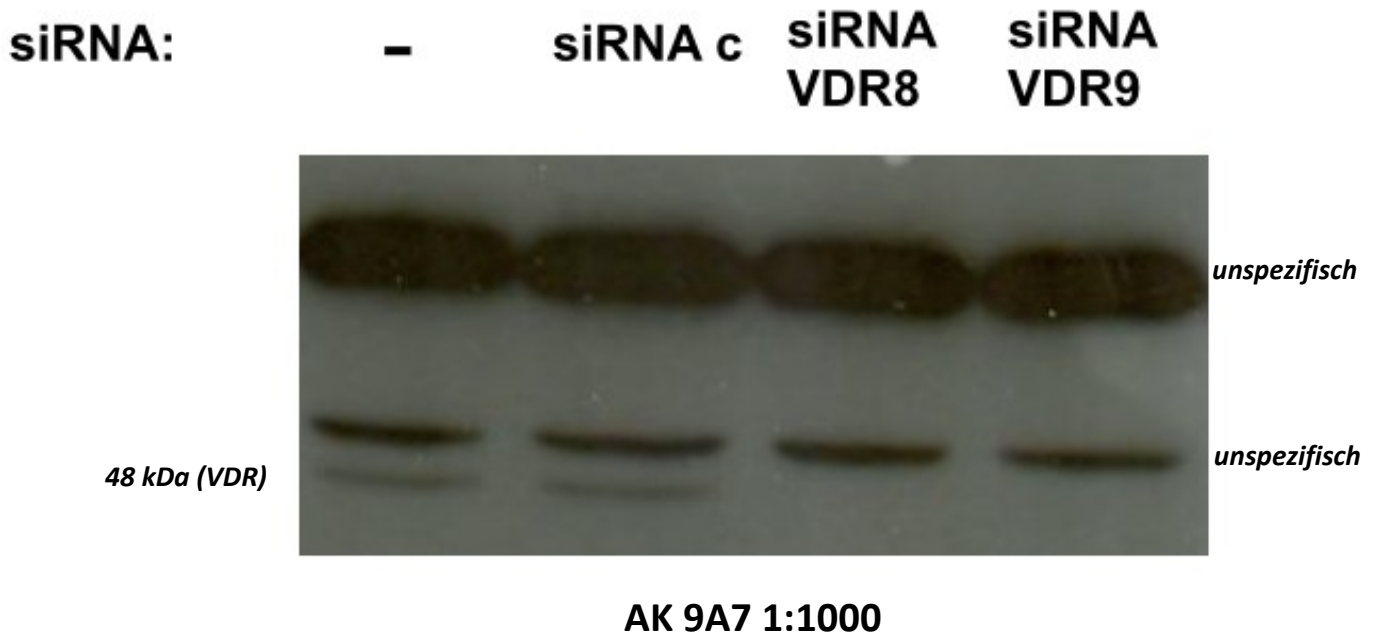


Abbildung 16: Transfektion der siRNA's VDR 8 & VDR 9 in H1299-Zellen zum Knockdown des VDR. Die verwendete siRNA's wurden alle in einer Konzentration von 5nM eingesetzt. Nachweis mit dem Primär-AK Anti-VDR-Ak 9A7 (1:1000) und einem Sekundär-AK Anti-Ratten-AK (1:5000); 48kDa repräsentiert die Proteinmarkerbanden des VDR. unspezifisch = unspezifische Signalbanden; Bande 1 (-) demonstriert die untransfizierten H1299-Zellen und diente als Negativkontrolle. Bande 2 siRNA c = Kontroll siRNA; Bande 3 und 4 (siRNA VDR8/9) = verifizierte VDR-siRNA's.

Es zeigte sich, anhand des Verschwindens des ca.48kDa großen endogenen VDR Proteins, dass beide verifizierten siRNA's, VDR 8 und VDR 9, einen Translationsblock, bewirkten (Abb.16, Bande 3/4). Folglich handelte es sich bei diesen Signalbanden tatsächlich um den endogenen VDR, da durch die Hemmung der VDR-mRNA Translation kein neuer VDR gebildet werden konnte und der in den Zellen vorhandene Vitamin D Rezeptor über den Zeitraum der 48 stündigen siRNA Inkubation abgebaut wurde.

Mit Hilfe der Kontroll-siRNA (Abb.16, Bande 2) konnte gezeigt werden, dass der

endogene VDR in den Zellen vorhanden ist und dass dieser auch eindeutig, durch die Spezifität und die Sensitivität des monoklonalen VDR-AK 9A7 erkannt wird.

Bei den in allen 4 Banden (Abb.16) erneut aufgetretenen Signalen von ca. 50 kDa und 70 kDa könnte es sich, wie bereits zuvor vermutet, um eine Variante des VDR Proteins bzw. um eine VDR-Isoform mit größerer Molekülgröße, handeln (Abb.16, Bande 1-4). Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da unter siRNA die Intensität der Signale erhalten blieb. Alternativ könnte es sich um unspezifische kreuzreagierende Signale handeln.

Insgesamt zeigte sich also, dass der AK 9A7 den endogenen VDR eindeutig erkennt und ein Knockdown des Vitamin D Rezeptors in der H1299-Zelllinie nachweislich möglich ist (Abb.16). Im Folgenden stellte sich nun die Frage wie der VDR und MDM2, da sie aneinander binden, miteinander interagieren. Wenn MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase die Stabilität des Vitamin D-Rezeptors reduziert, sollten die VDR-Konzentrationen in der Zelle unter MDM2-Knockdown mittels siRNA ansteigen. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment, die Auswirkungen eines MDM2-Knockdown mittels siRNA auf die VDR-Level in der Zelle untersucht.

5. Auswirkungen eines MDM2-Knockdowns auf die VDR-Level

Zum Nachweis der Interaktionsmechanismen zwischen dem Vitamin D-Rezeptor und MDM2 mittels MDM2-Knockdown wurden zu Beginn des Versuchs 6 Petrischalen mit H1299-Zellen, unter Zugabe von DMEM-Nährmedium ausgesät und für 24h im Brutschrank inkubiert.

In dem nachfolgenden Transfektionsexperiment wurden 2 Petrischalen mit Kontroll-(c)-siRNA und 2 mit MDM2 siRNA transfiziert; 2 Schalen blieben als Negativkontrolle des Experiments unbehandelt.

Verwendet wurden 4 Eppendorfgefäße, in welche unter der Sterilbank jeweils FKS-freies Medium pipettiert wurde. Im Anschluss daran erfolgte in zwei dieser Gefäße die Zugabe einer 20µM siRNA c Stocklösung und in die anderen beiden Eppendorfgefäße das Hinzufügen einer 20µM siRNA MDM2 Stocklösung. In jedes dieser 4 Gefäße wurde zusätzlich das Transfektionsreagenz HiPerfect pipettiert, resuspendiert und die entstandene Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die endgültig eingesetzte siRNA-Konzentration, welche letztendlich tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde, betrug 5nM. Alle 6 Petrischalen befanden sich anschließend für 48h im Brutschrank, unter den bereits in den vorangegangenen Experimenten erwähnten klimatischen und atmosphärischen Bedingungen.

Nach der Zellernte mit Gewinnung der Zellpellets und der Proteinextraktion aus den Zellen mittels SDS-Lysepuffer zur Proteindenaturierung und Enzyminaktivierung, erfolgte eine erneute Vermessung der gewonnenen Proteinmengen im Spektralphotometer bei 280nm, zur Berechnung der benötigten Proteinmengen für die folgende SDS-Gelelektrophorese.

Die Slots des 10% SDS-Gels wurden mit den entsprechenden Proteinextrakten einer jeden Probe beschickt und zusätzlich der bereits erwähnte Proteinmarker aufgetragen. Während der darauf folgenden Überführung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot erfolgte die Inkubation mit den Primär-AK.

Verwendet wurden zur Inkubation über Nacht die Primär-AK Anti-MDM2-AK 3G9, der Anti-VDR-AK 9A7 und ein Anti-β-Actin-AK. β-Actin diene als Ladekontrolle. Es wurde die PVDF-Membran mit den geblotteten Proteinen, mit Hilfe des vorhandenen Proteinmarkers, anhand der bekannten Molekülgrößen von VDR, MDM2 und β-Actin, an den entsprechenden Stellen durchtrennt und mit ihren dazugehörigen Primär-AK inkubiert.

Eingesetzte Peroxidasekonjugierte Sekundär-AK waren, für MDM2 und β-Actin ein Anti-Maus-AK und für den VDR ein Anti-Ratte-AK.

Nach der 1-stündigen Inkubation der PVDF-Membranstücke mit den

entsprechenden Sekundär-AK erfolgte wiederum die Entwicklung der Blots in der Dunkelkammer, wobei sich erneut zeigte, dass bei den geringen Leveln an VDR eine lange Expositionszeit von über 2h von Vorteil war. Der Nachweis von MDM2 und β -Actin hingegen benötigte nur wenige Minuten.

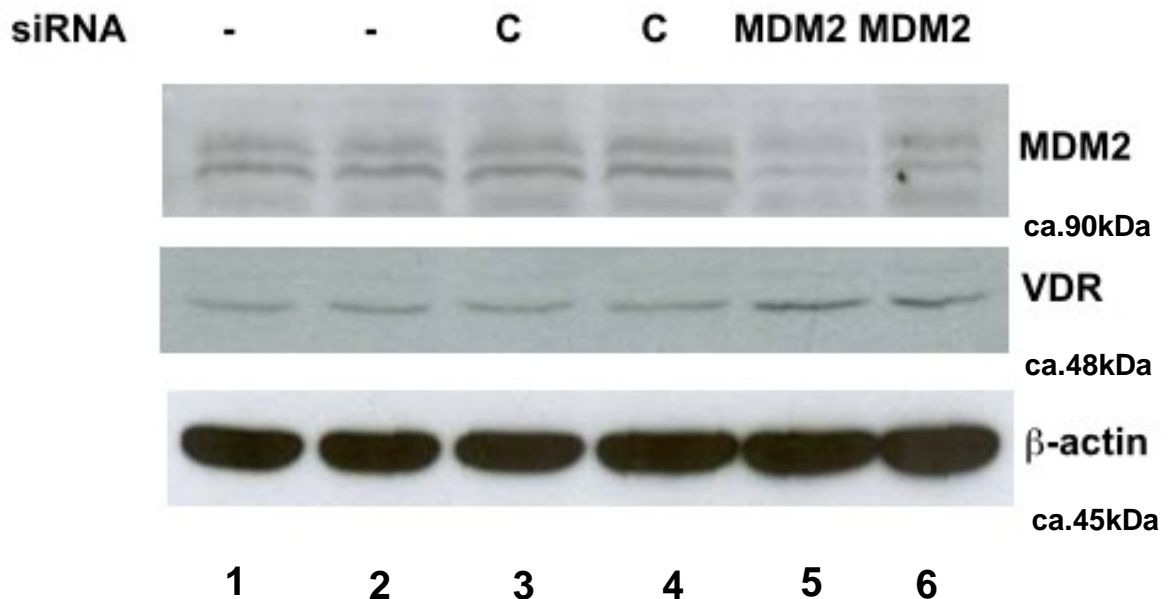


Abbildung 17: MDM2-Knockdown mittels siRNA bewirkt steigende VDR-Konzentrationen in den H1299-Zellen. MDM2 nachgewiesen mit Hilfe des Anti-MDM2 AK 3G9 (1:2000), VDR nachgewiesen mittels des Anti-VDR AK 9A7 (1:1000) und β -Actin-Nachweis unter Zuhilfenahme eines Anti- β -Actin AK (1:5000). Zum Einsatz kamende Sekundär-Ak waren für MDM2 ein Anti-Maus - AK (1:1000), für den VDR ein Anti-Ratten-AK (1:1000) und für β -Actin ebenfalls ein Anti-Maus-AK (1:3000). β -Actin diente als Ladekontrolle. 45kDa, 48kDa und 90kDa demonstrieren die Molekülgröße mittels Proteinmarkerbanden. **Bahn 1 & 2 (-):** untransfizierte H1299-Zellen; **Bahn 3 & 4 (c):** Transfektion mit Kontroll siRNA (siRNA c); **Bahn 5 & 6 (MDM2):** Transfektion mit siRNA MDM2.

Das Versuchsergebnis des MDM2-Knockdowns zeigte sowohl bei den untransfizierten H1299-Zellen (Abb. 17, Bahnen 1 und 2 MDM2) als auch bei den mit Kontroll-siRNA (siRNAc) behandelten Zellen (Abb.17, Bahnen 3 und 4 MDM2) auf dem Blot bei ca. 90 kDa die typischen MDM2-Signale nach Behandlung mit dem MDM2-AK 3G9. Die Bahnen 5 und 6 (Abb. 17, MDM2)

demonstrierten deutlich den erfolgreichen MDM2-Knockdown mittels siRNA, da die MDM2-Signalbahnen reduziert bzw. deutlich schwächer waren.

Auch bei den mit Hilfe des VDR-AK 9A7 nachgewiesenen ersten 4 Signalbahnen bei ca.48 kDa (Abb. 17, Bahnen 1-4 VDR) zeigte sich der Vitamin D-Rezeptor gleichmäßig relativ schwach vorhanden, da in jenen Zellen keine MDM2-Hemmung erfolgte und dieses als E3-Ubiquitin-Ligase den VDR eventuell abgebaut haben könnte. Die Bahnen 5 und 6 (Abb. 17, VDR), in welchen ein MDM2-Knockdown erfolgreich durchgeführt werden konnte, demonstrieren jedoch wesentlich stärkere VDR-Signale. Dementsprechend könnte bei diesen Zellen, aufgrund des Translationsblockes von MDM2, der VDR durch die E3-Ubiquitinligase nicht mehr abgebaut worden sein und somit in den Zellen akkumuliert vorliegen.

Somit zeigte der nachweislich erfolgreich durchgeführte Knockdown von MDM2 einen Anstieg der VDR-Konzentration in den H1299-Zellen.

Aufgrund dieser Beeinflussung der VDR-Spiegel durch einen MDM2 Knockdown, stellte sich nun die Frage, ob der Vitamin D-Rezeptor ein Proteasomal-abgebautes Protein ist und ob MDM2, als E3-Ubiquitin-Ligase den VDR ubiquitinyliert und somit zu seinem Abbau in der Zelle beiträgt. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch zunächst der proteasomale Abbau des Vitamin D-Rezeptors experimentell untersucht.

6. Der proteasomale Abbau des Vitamin D-Rezeptors

Um zu untersuchen, ob die niedrigen Steady-State-Level des VDR in den H1299-Zellen (Abb.18, Bahnen 1-4 VDR) zum Teil auf proteasomalen Abbau zurückzuführen sind, wurden die Effekte einer Proteasomhemmung durch MG132, welches als Proteasomblocker fungiert, auf den Ebenen des transfizierten Flag-VDR und des endogen vorhandenen VDR untersucht.

Hierzu wurden zunächst H1299-Zellen in Petrischalen mit DMEM-Nährmedium ausgesät und alle Zellen mit den in Abbildung 18 genannten Konzentrationen von Flag-VDR-Plasmid transfiziert. 24h nach der Transfektion und Inkubation im Brutschrank unter den bereits erwähnten Bedingungen erfolgte eine Behandlung aller Zellen mit dem Proteasomblocker MG132.

Nach den in Abbildung 18 angegebenen Zeiten wurden die Zellextrakte geerntet, die Proteinextrakte mittels Zellyse gewonnen, jeweils erneut mittels Spektralphotometer bei 280nm Wellenlänge vermessen, in der Gelelektrophorese (10% SDS-Gel) nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt und mit Hilfe des Western- Blots untersucht.

Flag-VDR wurde mittels Anti-Flag-VDR-Ak M2 nachgewiesen, MDM2 durch Anti-MDM2-Ak 3G9 und β -Actin mit Anti- β -Actin-Ak (Abb. 18).

In einem weiteren unabhängig durchgeführten Versuch wurden erneut H1299 Zellen ausgesät, einer 24 stündigen Bebrütung und einer anschließenden Behandlung mit MG132 unterzogen. Dieses Experiment diente dem Nachweis des endogenen VDR, so dass hier keine Transfektion von Flag-VDR notwendig war.

Die Zellextrakte wurden nach den in Abbildung 19 angegeben Zeiten nach der MG132 Behandlung hergestellt, wobei die weitere Vorgehensweise und die eingesetzten Antikörper Anti-MDM2-Ak 3G9 bzw. Anti- β -Actin-Ak mit den entsprechenden Konzentrationen analog zu der oben genannten gewählt wurde. Der endogene VDR wurde mittels dem monoklonalen Anti-VDR-AK 9A7 erkannt.

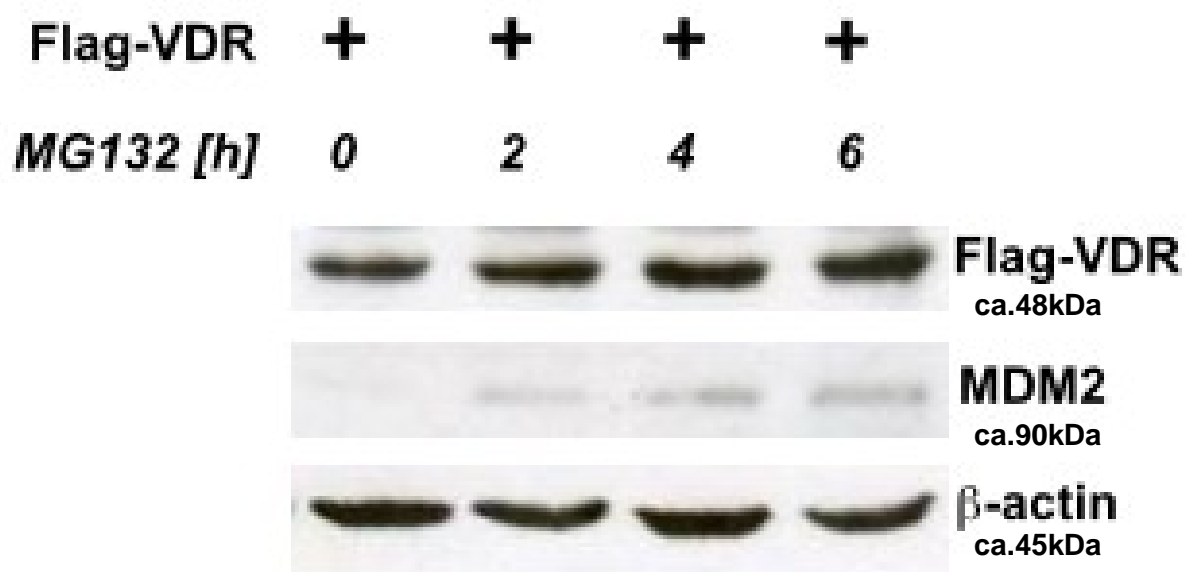


Abbildung 18: Flag-VDR akkumuliert als Antwort auf die Proteasom- Hemmung in H1299-Zellen. + = Transfektion von 4 μ g Flag-VDR Plasmid; Die Zahlen bezeichnen die Zeitpunkte der Zellernte in Stunden (h) nach der MG132 Behandlung; MG132 wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt; β -Actin diente als Ladekontrolle; 45kDa, 48kDa und 90kDa demonstrieren die Molekülgröße mittels Proteinmarkerbanden. Nachweis von Flag-VDR mittels Anti-Flag-VDR-AK M2 (1:10000), MDM2 durch Zuhilfenahme von Anti- MDM2-AK 3G9 (1:2000) und β -Actin unter Verwendung von Anti- β -Actin-AK (1:10000).

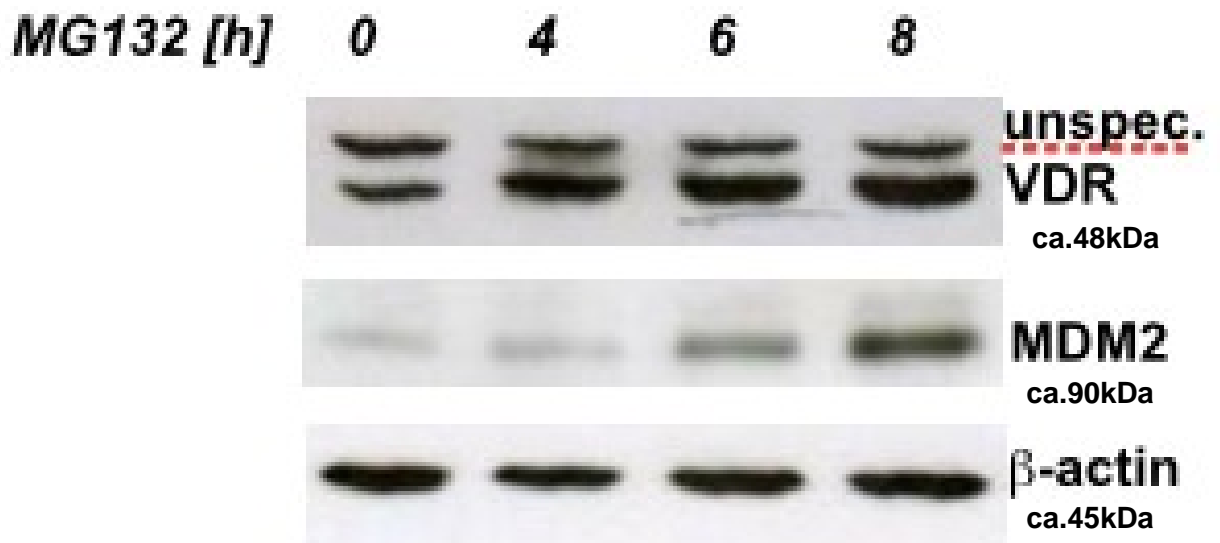


Abbildung 19: Anstieg des endogenen VDR unter Proteasom-Hemmung in H1299-Zellen. Die Zahlen bezeichnen die Zeitpunkte der Zellernte in Stunden (h) nach der MG132 Behandlung; MG132 wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt; β -Actin diente als Ladekontrolle; 45kDa, 48kDa und 90kDa demonstrieren die Molekülgröße mittels Proteinmarkerbanden. Nachweis des endogenen VDR mittels Anti-VDR-AK 9A7 (1:2000), MDM2 durch Zuhilfenahme von Anti-MDM2-AK 3G9 (1:2000) und β -Actin unter Verwendung von Anti- β -Actin-AK (1:10000). Unspec. = unspezifisches Signal.

Das Ergebnis zeigte einen schwachen, aber nachweisbaren Anstieg der Flag-VDR Menge in den H1299-Zellen (Abb.18 Flag-VDR). Deutlich sichtbar war hingegen das verstärkte Vorhandensein des endogenen VDR in den humanen Lungenadenokarzinomzellen nach erfolgter Behandlung mit MG132 (Abb.19 VDR). Die Flag-VDR- bzw. die endogenen VDR-Konzentrationen nahmen mit zunehmender Behandlungsdauer mit MG132 zu (Abb.18 Flag-VDR und Abb. 19 VDR). Die erfolgreiche Proteasomhemmung zeigte sich auch durch die parallele Zunahme des bereits als über das Proteasom abgebaut bekannten MDM2.

Insgesamt deutete dies darauf hin, dass sowohl der Flag-VDR, als auch der endogene VDR über das 26S Proteasom abgebaut werden können.

β -Actin diente bei diesen Experimenten erneut als Ladekontrolle (Abb. 18 und 19 β -Actin).

Nach dem Hinweis darauf, dass sowohl der Flag-VDR als auch der endogene VDR proteasomal abgebaut werden, stellte sich also die Frage, ob der VDR ein Substrat von MDM2 ist und ob MDM2 in seiner Funktion als E3-Ubiquitin- Ligase den Vitamin D-Rezeptor ubiquityliert.

7. Die Ubiquitylierung des Vitamin D-Rezeptors

Zum Nachweis der Ubiquitylierung des VDR wurden wiederum die humanen Lungenadenokarzinomzellen H1299 eingesetzt, ausgesät und mit den in Abbildung 20 angegebenen Kombinationen von Plasmiden, die entweder Flag- p53 oder Flag-VDR exprimieren, transfiziert. Zusätzlich wurden Plasmide transfiziert, welche MDM2 und Ubiquitin exprimieren.

Im Anschluss an die Transfektion wurden die Petrischalen mit den H1299-Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und dann für weitere 5 Stunden einer Behandlung mit dem Proteasomblocker MG132 unterzogen.

Der proteasomale Abbau wurde somit vorübergehend gehemmt, damit die Ubiquitin-markierten Proteine in der Zelle akkumulieren können.

Entweder das bereits bekannte MDM2-Target Flag-p53 (Abb. 20, links) oder Flag-VDR (Abb.20, rechts) wurden aus den gewonnenen Zellextrakten, welche denaturiert worden waren, mittels Immunpräzipitation (IP) herausgefällt (Abb. 20 IP). Die Denaturierung war wichtig, um nur kovalent an Flag-p53 oder Flag-VDR gebundenes HA-Ubiquitin nachzuweisen.

Die für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper waren der Anti-Flag-AK M2 als auch ein irrelevanter monoklonaler IgG-Anti-HRS3-AK.

Die gefällten sowie die im ursprünglichen Extrakt vorhandenen Proteine wurden wiederum mittels Western-Blot unter Zuhilfenahme der Antikörper Anti-HA-AK, Anti-Flag-AK M2, Anti-MDM2-AK 3G9 und Anti- β -Actin-AK nachgewiesen.

Die Darstellung der Gesamtzellextrakte (Abb.20, TCL) diente als Nachweis für die erfolgreich durchgeführten Transfektionen der Plasmide und der Expression der entsprechenden Proteine.

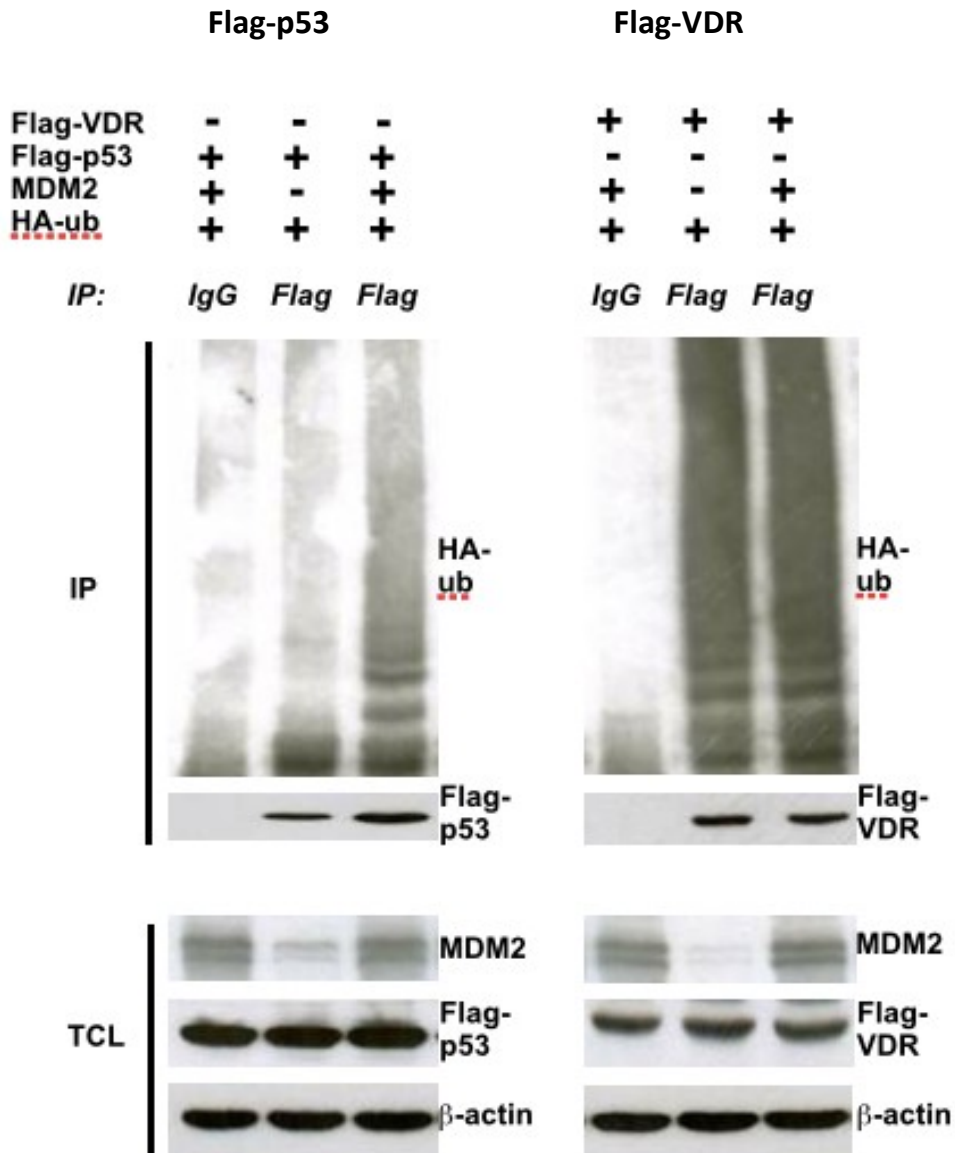


Abbildung 20: Flag-VDR wird in H1299-Zellen ubiquityliert. +/- demonstrieren die Plasmidtransfektionen. Zum Einsatz kamen die Plasmide Flag-VDR (4 μ g), Flag-p53 (0,5 μ g), MDM2 (3 μ g) und HA-Ubiquitin (3 μ g). MG132 wurde in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Für die Immunpräzipitation verwendete AK waren, für die Plasmide Flag-VDR und Flag-p53, der Anti-Flag- AK M2 (2 μ g/IP) und ein irrelevanter monoklonaler IgG-Anti-HRS3-AK. Weitere eingesetzte AK waren der Anti-HA-AK (1:2000), der Anti-MDM2-AK 3G9 und der Anti- β -Actin-AK. HA-ub = HA-Ubiquitin; TCL = Gesamtzellextrakt; IgG = irrelevanter monoklonaler IgG-Anti-HRS3-AK; Flag = Anti-Flag-AK M2; IP = Immunpräzipitation.

Es zeigte sich, dass Flag-p53 nur schwach HA-ubiquityliert war in Gegenwart der nur geringen Mengen an endogenem MDM2 (Abb.20, links Flag-p53, Bahn 2). Eine starke HA-Ubiquitylierung zeigte Flag-p53 erst bei Anwesenheit von mittels Transfektion hinzugefügtem ectopischem MDM2. Dieses Ergebnis war erwartet worden, da MDM2 die primäre Ubiquitin-Ligase für p53 in diesen Zellen ist (Abb.20, links Flag-p53, Bahnen 1 und 3). Flag-p53 erwies sich folglich als gute Kontrolle der Ubiquitylierung durch MDM2.

Im Gegensatz dazu wurde Flag-VDR bereits stark HA-ubiquityliert wenn gar kein zusätzliches MDM2 transfiziert worden war (Abb.20, rechts Flag-VDR, Bahnen 2 und 3). Allerdings konnte die Flag-VDR-Ubiquitylierung durch zusätzliches MDM2 durchweg leicht erhöht werden. Der VDR wird also offenbar durch mehrere Ubiquitin-Ligasen ubiquityliert.

Die zellulären Steady-State-Level des Vitamin D-Rezeptors scheinen zumindest z.T. durch das Proteasom gesteuert zu werden und MDM2 ist eine unter womöglich mehreren Ubiquitin-Ligasen, welche die VDR-Konzentration in der Zelle regulieren.

MDM2 kann nicht nur durch Ubiquitylierung Transkriptionsfaktoren wie p53 für den Abbau markieren, sondern p53 auch durch direkte Bindung in seiner Funktion als Transaktivator von Genen beeinträchtigen, indem es - nach Rekrutierung an Genpromotoren - über verschiedene Mechanismen die Transkription hemmt.

Es stellte sich also die Frage, ob MDM2 auch die VDR-vermittelte Genregulation modulieren kann.

8. Der VDR als Regulator für die Gene *CYP24A1* und *SOSTDC1*

Die experimentelle Untersuchung des Vitamin D-Rezeptors als Regulator unter Behandlung mit 1,25D erfolgte beispielhaft für die Gene *CYP24A1* und *SOST DC1*. Das *CYP24A1*-Gen, kodiert für die 24-Hydroxylase. Diese ist für den Abbau von Vitamin D-Metaboliten erforderlich. Es handelt sich um eine NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Hydroxylase, welche an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Das *CYP24A1*-Gen ist ein routinemäßig eingesetztes Standardgen bei experimentellen 1,25D Versuchen und dient zur Demonstration der Befähigung des VDR zur Transaktivierung. Die *CYP24A1*-Expression wird nahezu ausschließlich durch die 1,25D-Spiegel reguliert.

SOST DC1 (Sclerostion-Domäne-enthaltendes Protein 1) ist hingegen in die Hautentwicklung und Hautdifferenzierung involviert. Auch dieses Gen wird häufig bei experimentellen 1,25D Versuchen eingesetzt, allerdings zur Demonstration der Suppression durch den VDR. *SOST DC 1* kodiert für WISE, ein inhibitorisches Protein, welches die Hautentwicklung hemmt. Zur Förderung der Hautentwicklung muss der VDR also das *SOST DC1*-Gen herunterregulieren.

Zum Nachweis des Vitamin D-Rezeptors als Regulator für die Gene *CYP24A1* und *SOST DC1* wurden sowohl die bereits bekannte H12299-Zelllinie als auch humane Colonadenokarzinomzelllinien (CaCo) herangezogen. Bei letzteren handelt es sich ebenfalls um adhärente, p53-defiziente Zellen, welche allerdings im Vergleich zu H1299 Zellen mehr VDR und MDM2 produzieren. Die p53-Defizienz war notwendig, um einen störenden Einfluss von MDM2 auf p53 zu vermeiden.

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden einerseits 6 Petrischalen mit CaCo-Zellen als auch die gleiche Anzahl an Petrischalen mit H1299-Zellen in DMEM-Nährmedium ausgesät und für 24h im Brutschrank inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde ein speziell steril gefiltertes DMEM-Nährmedium für die anschließende 1,25D-Behandlung angesetzt, welches 1% iges BSA (Bovines Serum Albumin) enthielt. Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation erfolgte aus allen 12 Petrischalen, unter der Sterilbank mit Hilfe einer Glaspipette, die Verwerfung des zur Bebrütung der Zellen eingesetzten Mediums und die anschließende Zugabe des speziell angesetzten Vitamin D-Behandlungsmediums.

Die 1,25D-Stocklösung in Ethanol wurde soweit verdünnt, dass eine 100nM Endkonzentration erhalten wurde. Jeweils eine Petrischale mit den beiden Zelllinien enthielt lediglich Ethanol (12h EtOH); diese diente als Negativkontrolle.

Aus 12 behandelten Zellkulturschalen wurde im Anschluss an die 1,25D- bzw. Ethanol-Zugabe und nach Bebrütung im Brutschrank bei den bereits bekannten klimatischen und atmosphärischen Bedingungen bebrütet und 2h, 4h, 6h, 8h oder 12h die Gesamt-RNA-Menge präpariert.

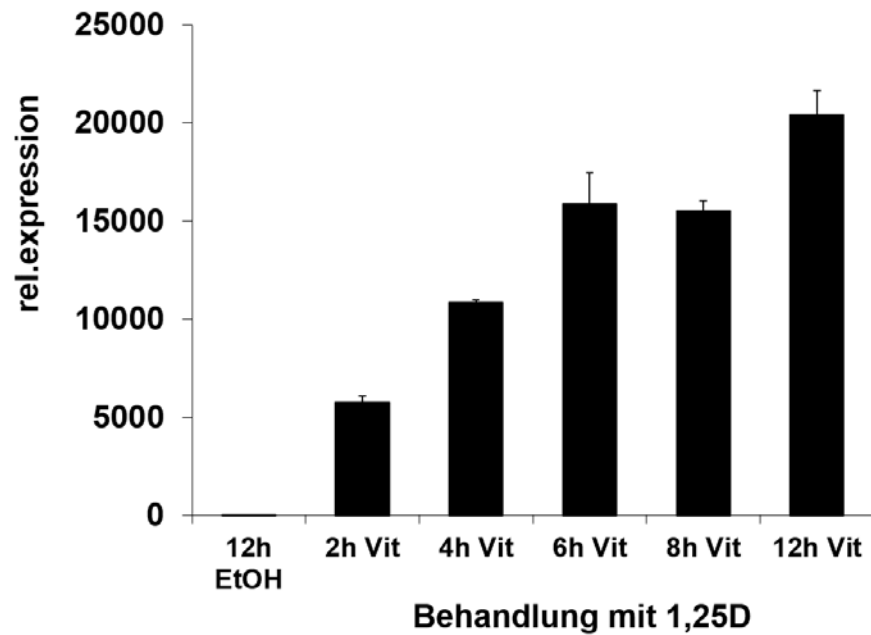
Vor der Umschreibung der RNA in cDNA, zum Zwecke der qRT-PCR, wurde die RNA-Menge mittels Spektralphotometer vermessen.

Die cDNA-Umschreibung erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (Omniscript), welches auch die Primer und die Reverse Transkriptase enthielt. Als House Keeping Gen für die qRT-PCR kam das *18S*-Gen zum Einsatz. Jeweils 1µg RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die anschließend gewonnenen cDNA-Menge erneut mittels Spektralphotometer bestimmt.

Diese Messung diente zur Berechnung des Verdünnungsfaktors. Zur Herstellung der Standardkurve für die qRT-PCR erfolgte eine serielle 1:10 Verdünnung einer 200ng enthaltenden QPCR-Standardlösung. Alle Proben wurden als Triplikate vermessen.

Die qRT-PCR erfolgte mit Hilfe eines StepOne plus von Applied Biosystems.

a)



b)

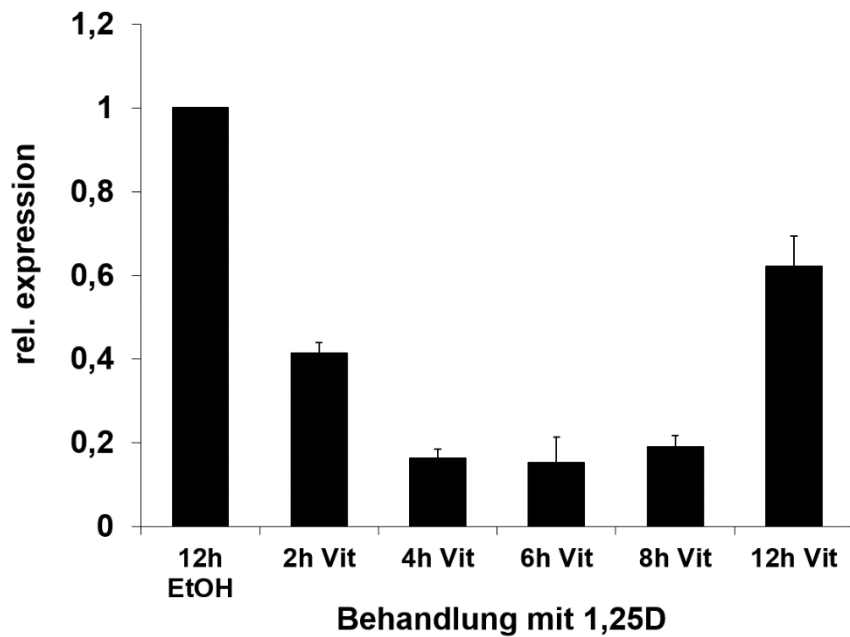


Abbildung 21: Behandlung von CaCo-Zellen mit 100nM 1,25D und anschließender qRT-PCR mit den Genen a) *CYP24A1* bzw. b) *SOST DC1* unter Zuhilfenahme des Gens 18S zur normalisierten Expression (rel. expression). Die Zahlen bezeichnen die Zeitpunkte in Stunden (h) der Gesamtzellextraktgewinnung nach der 1,25D-bzw. Ethanol-Behandlung. EtOH = Ethanol; Vit = 1,25D

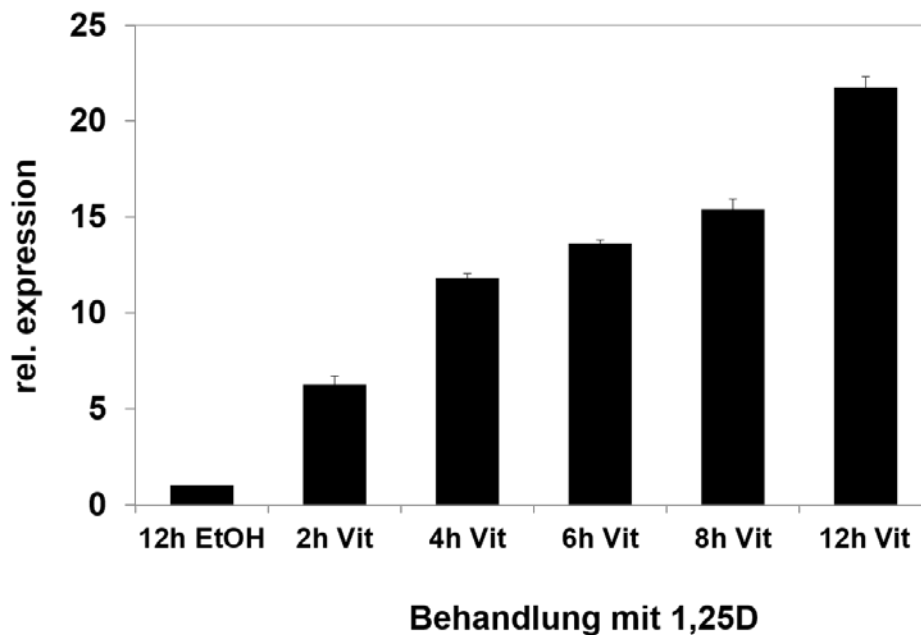


Abbildung 22: Behandlung von H1299-Zellen mit 100nM 1,25D und anschließender qRT-PCR mit dem Gen *CYP24A1* unter Zuhilfenahme des Gens 18S zur normalisierten Expression (rel.expression). Die Zahlen bezeichnen die Zeitpunkte in Stunden (h) der Gesamtzellextraktgewinnung nach der 1,25D-bzw. Ethanol-Behandlung. EtOH = Ethanol; Vit = 1,25D

Sowohl bei den humanen Colonadenokarzinomzellen (CaCo), als auch bei der Lungenadenokarzinomzelllinie (H1299) zeigte eine Behandlung mit 100nM 1,25D eine deutliche Transaktivierung des *CYP24A1*-Gens durch den VDR (Abb. 21a) und 22). Wie erwartet zeigte sich das *SOST DC1*-Gen in CaCo Zellen als durch den VDR reprimiert. H1299 Zellen exprimieren kein *SOST DC1*.

Nach dem Nachweis der Regulation von *CYP24A1* und *SOST DC1* durch den VDR wollten wir untersuchen, wie ein Knockdown von MDM2 diese Regulation beeinflusst. Als ein weiteres, VDR-aktiviertes Gen wurde das *p21*-Gen mit in die Untersuchungen einbezogen, welches für einen Inhibitor des Zellzyklus kodiert.

9. Der VDR als Genregulator unter MDM2-Knockdown

In unabhängigen Experimenten, zum Nachweis des Vitamin D-Rezeptors als Regulator für das Gen *CYP24A1* unter MDM2-Knockdown, ohne anschließende Liganden-Behandlung, erfolgte das Aussähen von H1299-Zellen mit Anwachsen der Zelllinie im Brutschrank und anschließender Transfektion.

Die Transfektion wurde sowohl mit einer 20µM siRNA c- Stocklösung, als auch mit einer 20µM siRNA-MDM2-Stocklösung durchgeführt, wobei jeweils eine Probe Mock-transfiziert (untransfiziert/unbehandelt) wurde und als Negativkontrolle diente. Als Transfektionsreagenz wurde erneut HiPerfect (Qiagen) eingesetzt. Alle Zellen, welche eine endgültige siRNA-Konzentration von 5nM erhielten, wurden im Anschluss an die Transfektion für 24h im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte bei diesen Versuchen zunächst keine Behandlung mit dem Liganden 1,25D.

Anschließend wurden die Gesamt-RNA-Extrakte nach Zellernte gewonnen und der MDM2-Knockdown mittels Western-Blot-Analyse unter Einsatz des Anti-MDM2-AK 3G9 überprüft. Die RNA-Präparation erfolgte mit den bereits erwähnten Kits der Firma Qiagen. Dann erfolgte als Vorbereitung für die qRT-PCR und nach Vermessung der RNA-Menge im Spektralphotometer die Umschreibung der RNA in cDNA mit Hilfe des Kits Omniscript von Qiagen. Als House-Keeping Gen für die qRT-PCR wurde wiederum das *18S*-Gen verwendet.

Für die qRT-PCR erfolgte die Herstellung der Standardkurve wie oben bereits beschrieben. Für die qRT-PCR wurde SYBR-Green verwendet. Jede Probe wurde als Triplikat vermessen d.h. es wurden 3 Ansätze pro Probe und pro Primerpaar generiert. Bei den zum Einsatz kommenden Primern handelte es sich wiederum um Primer für das House-Keeping Gen *18S* und das Gen *CYP24A1*.

Im Folgenden wurden die gleichen Experimente wiederholt, diesmal jedoch mit zusätzlicher Liganden-Behandlung (1,25D) der Zelllinien H1299 und CaCo.

Die Zellen wurden nach 2h, 4h und 8h geerntet und das Gesamtzellextrakt gewonnen. Für die 1,25D-Behandlung kam 1% iges BSA-enthaltendes DMEM-Nährmedium zum Einsatz, um die Adsorption des Liganden an Proteine zu verhindern.

Die anschließenden Versuchsschritte erfolgten analog zu den im oberen Abschnitt bereits erwähnten.

In einer weiteren, analog durchgeführten Versuchsreihe erfolgte die Untersuchung des VDR als Genregulator für das Gen *p21* in CaCo-Zellen. Die Experimente erfolgten genau wie für die H1299 Zellen beschrieben.

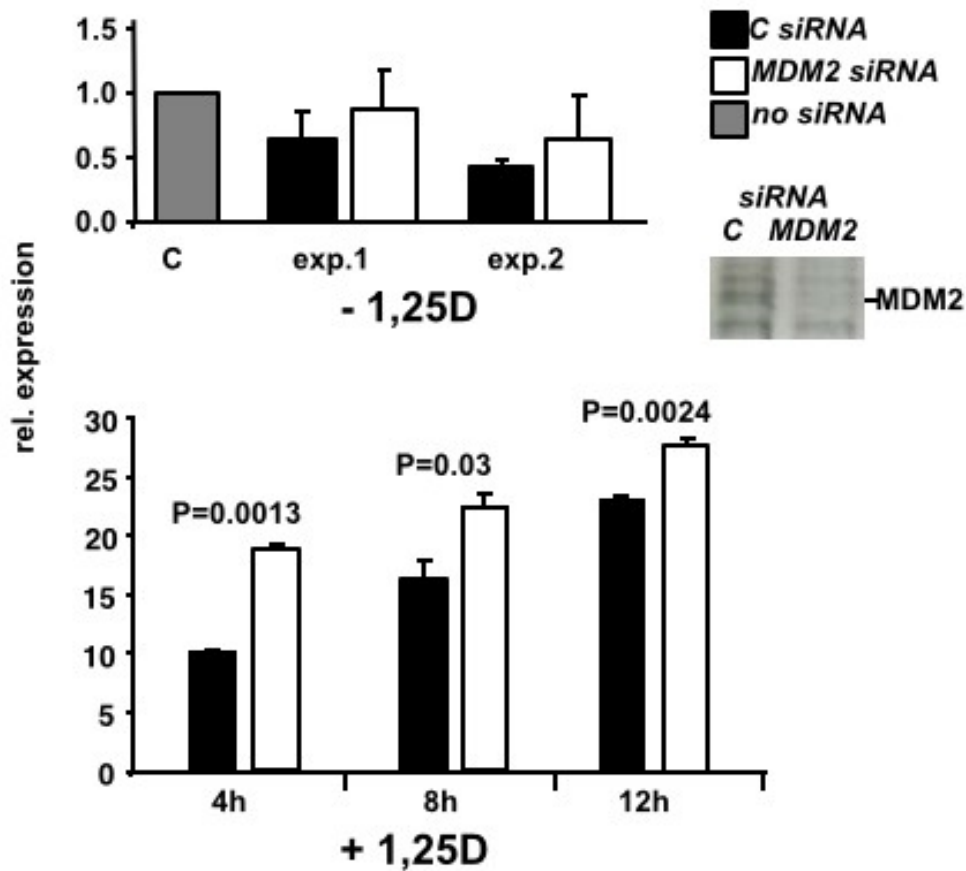


Abbildung 23: MDM2-Knockdown erhöht die Transkriptionslevel des VDR-getriebenen *CYP24A1*-Gens unter 1,25D-Behandlung in H1299-Zellen (unten). Kein Effekt auf die Transkription ersichtlich bei Abwesenheit von 1,25D (oben). MDM2-Knockdown war erfolgreich (Einschub). Die H1299-Zellen wurden Mock-transfiziert (grauer Balken c) oder transfiziert mit jeweils 5nM siRNA c (schwarzer Balken) bzw. siRNA MDM2 (weißer Balken). Anschließend erfolgte eine Behandlung bzw. keine Behandlung mit 1,25D (100nM) für 4h, 8h und 12h. **Einschub:** Der MDM2-Knockdown wurde durch einen Western-Blot unter Verwendung des Anti-MDM2-AK 3G9 (1:2000) überprüft. exp.1 und exp.2 stehen für die beiden unabhängig voneinander durchgeführten Experimente; -1,25D = keine 1,25D Behandlung; +1,25D = 1,25D Behandlung; rel. Expression = relative Bestimmung der Expression des *CYP24A1*-Transkripts zum 18s-Transkript in einer qRT-PCR; P = Signifikanzniveau, P-Werte wurden durch Students t-Test ermittelt; $P \leq 0.05$ wurde als signifikant gewertet.

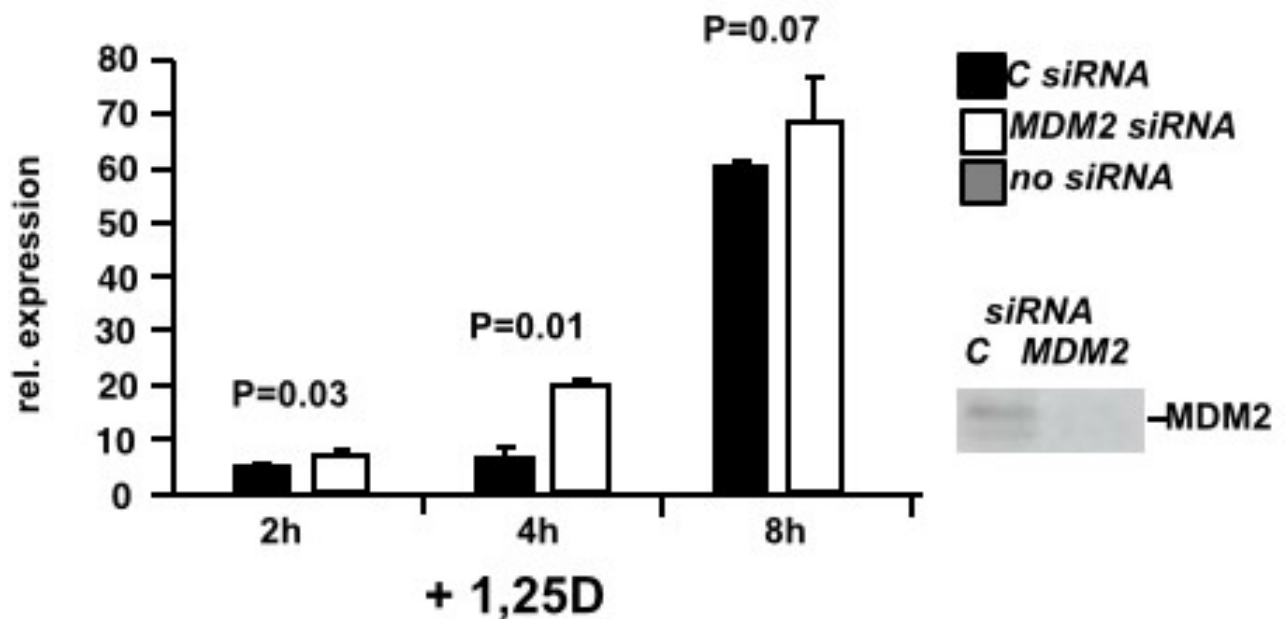


Abbildung 24: MDM2-Knockdown erhöht die Transkriptionslevel des VDR-getriebenen *CYP24A1*-Gens unter 1,25D-Behandlung in CaCo-Zellen. MDM2-Knockdown war erfolgreich (Einschub). Die CaCo-Zellen wurden transfiziert mit jeweils 5nM siRNA c (schwarzer Balken) bzw. siRNA MDM2 (weißer Balken). Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 1,25D (100nM) für 2h, 4h und 8h. **Einschub:** Der MDM2-Knockdown wurde durch einen western- blot unter Verwendung des Anti-MDM2-AK 3G9 (1:2000) überprüft. +1,25D = 1,25D Behandlung; rel. Expression = relative Bestimmung der Expression des *CYP24A1*-Transkripts zum 18s-Transkript in einer qRT-PCR; P = Signifikanzniveau, P-Werte wurden durch Students t-Test ermittelt; $P \leq 0.05$ wurde als signifikant gewertet.

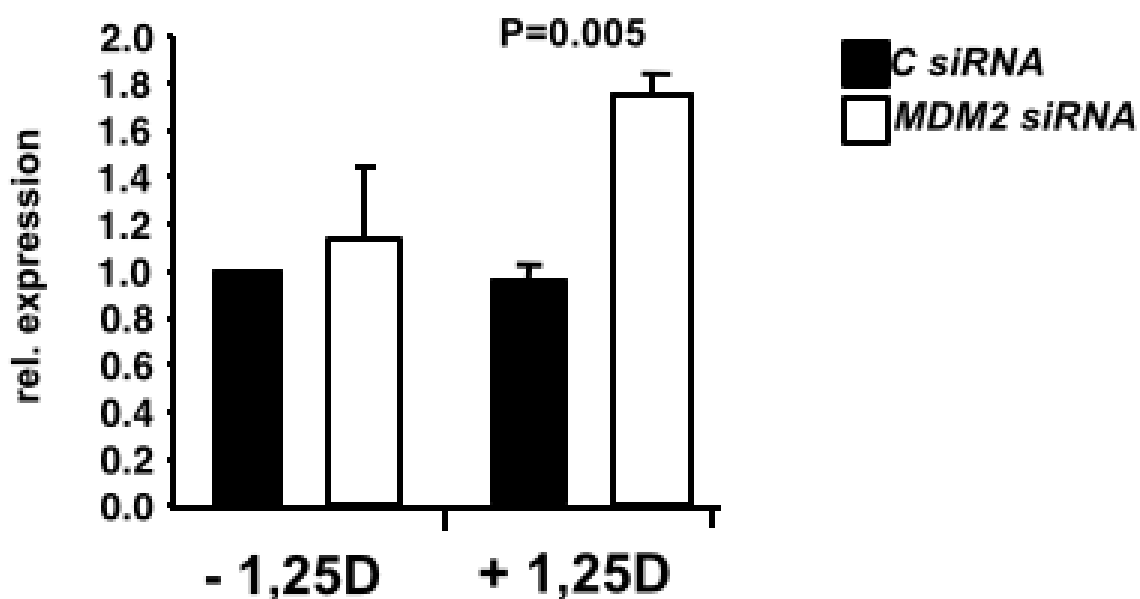


Abbildung 25: MDM2-Knockdown erhöht die Transkriptionslevel des VDR-getriebenen *p21*-Gens (*CDKN1A*) unter 1,25D-Behandlung in CaCo-Zellen. Das Diagramm zeigt das Ergebnis einer 2h stündigen Exposition der Zellen mit 1,25D (100nM). Ähnliche Ergebnisse wurden in H1299-Zellen erhalten. Die CaCo-Zellen wurden transfiziert mit jeweils 5nM siRNA c (schwarzer Balken) bzw. siRNA MDM2 (weißer Balken). Anschließend erfolgte eine Behandlung bzw. keine Behandlung mit 1,25D (100nM) für 2h. +1,25D = 1,25D Behandlung; rel. Expression = relative Bestimmung der Expression des p21-Transkripts zum 18s-Transkript in einer qRT-PCR; P = Signifikanzniveau, P-Werte wurden durch Students t-Test ermittelt; $P \leq 0.05$ wurde als signifikant gewertet.

Sowohl in H1299- als auch in CaCo-Zellen konnte die Expression von MDM2 durch spezifische siRNA inhibiert werden (Abb. 23 und 24, Einschübe).

In Abwesenheit des Liganden 1,25D hatte ein MDM2-Knockdown in den H1299-Zellen keinen signifikanten Effekt auf die Expression des endogenen *CYP24A1*-Gens (Abb.23, oberes Diagramm). Im Gegensatz dazu, führte ein Knockdown von MDM2 unter 1,25D-Behandlung zu signifikant höheren *CYP24A1* Transkript Leveln in der humanen Lungenadenokarzinom-Zelllinie (H1299) nach 4h, 8h und

12h (Abb.23, unteres Diagramm).

Zur Bestätigung dieses Befundes wurden dieselben Versuche mit menschlichen Colonadenokarzinom-Zellen (CaCo) durchgeführt, welche wie H1299 Zellen ebenfalls p53-defizient sind. Auch bei dieser Zelllinie bewirkte ein MDM2 Knockdown unter Liganden-Behandlung (1,25D) eine signifikante Zunahme des *CYP24A1* Transkripts (Abb. 24).

In beiden Zelllinien wurde also ein signifikanter Effekt des MDM2-Knockdown auf die *CYP24A1*-Gen-Transaktivierung, unter 1,25D-Behandlung, vornehmlich zu frühen Zeitpunkten (2h und 4h) beobachtet. Dies deutete darauf hin, dass auch *in-vivo* der VDR von MDM2 inhibiert ist.

Zur Überprüfung des Einflusses von MDM2 wurde unter 1,25D Behandlung ein weiteres Gen, *p21*, in einem unabhängigen Experiment untersucht. *P21* (*CDKN1A*), ein Gen, welches für einen Inhibitor der Zellzyklus-abhängigen Kinasen kodiert und zum Zellzyklusarrest führt, ist ebenfalls ein bekanntes Ziel der Transaktivierung durch den VDR (208). Auch hier zeigte sich, dass unter 1,25D Behandlung MDM2-Knockdown zu einer erhöhten Expression des *p21*-Transkripts führt (Abb.25).

Zusammengefasst unterstützen diese Resultate also die Annahme, dass MDM2 die VDR-vermittelte Transaktivierung der Gene *CYP24A1* und *p21* hemmen kann.

Der Effekt eines MDM2-Knockdown auf die Expression von *SOST DC1* wurde ebenfalls untersucht. *SOST DC1* ist ein Gen im Säugetierhaarzyklus, welches durch den Liganden VDR in CaCo-Zellen supprimiert, nicht aktiviert wird. Ein MDM2-Knockdown hatte allerdings keine Wirkung auf die Suppression von *SOST DC1* durch den Vitamin D-Rezeptor.

Insgesamt weisen die hier dargelegten Ergebnisse also erstmals darauf hin, dass die E3 Ubiquitinligase MDM2, die auch als Inhibitor von Transkriptionsfaktoren wirken kann, mit dem VDR interagiert und diesen hemmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind Teil des Paper Heyne K., Heil T.C. et al., „MDM2 binds and inhibits vitamin D receptor“, welches im Mai 2015 im Journal Cell Cycle veröffentlicht wurde.

V. DISKUSSION

Durch die Entdeckung des endokrinen Vitamin D-Systems und des Rezeptors (VDR) für das Hormon 1,25D kam es zu einem neuen Verständnis der Beziehung und Etablierung zwischen Vitamin D und metabolischen Knochenerkrankungen wie Rachitis bei Kindern bzw. Osteomalazie bei Erwachsenen. Daraus resultierend wurde die Rolle von Vitamin D auch bei Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten, kardiovaskulären Erkrankungen und bei den verschiedensten Krebserkrankungen untersucht und diskutiert.

Epidemiologische Studien zeigen, dass ein Vitamin D-Mangel eine wichtige Rolle bei der Ätiologie unterschiedlichster Krebsarten des Menschen haben könnte und dass der aktive Metabolit von Vitamin D (1,25D) oder Vitamin D-Analoga Potential als Antikrebsmittel vorweisen könnten, da ihre Verabreichung einerseits antiproliferative Effekte aufzeigt und andererseits die Aktivierung von apoptotischen Signalwegen und die Hemmung der Angiogenese bewirkt.

Epidemiologische Daten legen nahe, dass ein Vitamin D-Mangel relativ häufig ist, zumindest in einigen Teilen der USA und in Europa und dass eine unzureichende Menge an 1,25D mit einem erhöhten Risiko und einer schlechten Prognose bei verschiedensten Krebsarten verbunden ist (196).

Die aktive Form des Hormons Vitamin D, 1,25D, übt fast alle ihre bekannten Wirkungen im Organismus durch die Bindung an den VDR aus, welcher als DNA-Bindungstranskriptionsfaktor der Kernrezeptor-Superfamilie fungiert. Nach der Bindung von 1,25D an die C-terminale Ligandenbindungsdomäne des VDR bildet der VDR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Heterodimer, um über die N-terminale DNA-Bindungsdomäne die VDRE (Vitamin D response elements) zu kontaktieren.

Nanomolare Mengen von 1,25D sind ausreichend, um den VDR auf diese Art und Weise zu aktivieren und so eine Vielzahl von Genen zu regulieren (197-198). Nach der Bindung durch den VDR können Gene sowohl aktiviert als auch unterdrückt werden, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.

Insgesamt ist über die Einleitung der Gentransaktivierung relativ viel bekannt, sehr viel weniger ist jedoch über die Beendigung der Transaktivierung bzw. der Genunterdrückung bekannt (45,97,199).

Die E3 Ubiquitin-Ligase und Transkriptionsrepressor MDM2 ist ein potenter Inhibitor der p53-Familie von Transkriptionsfaktoren, Stoffwechselregulatoren und Tumorsuppressoren. MDM2 fungiert als wichtiger Negativregulator von mehreren Transkriptionsfaktoren, u.a. p53 und p73, welche wie der VDR wichtige Funktionen im Stoffwechsel, der Homöostase und der Tumorunterdrückung erfüllen (168-171).

Grundsätzlich sind 2 Wege der Hemmung durch MDM2 beschrieben worden. MDM2 kann beispielsweise p53 für den Abbau durch das 26S Proteasom oder für den nukleären Export ubiquitinieren. Alternativ oder zusätzlich jedoch kann MDM2 auch von p53 und p73 an Promotoren rekrutiert werden, was zur direkten Hemmung der Gentransaktivierung durch Co-Aktivator-Hemmung, Co-Repressor Rekrutierung und Unterdrückung der basalen Transkriptionsmaschinerie führt (181,183,200-203).

Da sowohl p53 und der VDR das *MDM2*-Gen transaktivieren können (204,205) und p53 durch MDM2 reguliert wird (170), stellte sich die Frage, ob der VDR vielleicht auch durch dieses Protein kontrolliert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der Vitamin D-Rezeptor (VDR) ein weiterer Transkriptionsfaktor, Stoffwechselregulator und Tumorsuppressor ist, welcher ebenfalls von MDM2 gebunden und inhibiert wird und ob die Regulation in einer Art und Weise erfolgt, welche sich analog zu der Regulation von p53 verhält.

Grundvoraussetzung für die Durchführung aller Untersuchungen in dieser Arbeit war der Nachweis der Interaktion zwischen dem Vitamin D Rezeptor (VDR) und dem Onkoprotein MDM2.

In einer ersten Reihe von Experimenten mit menschlichen Lungenadenokarzinomzellen (H1299) wurden Kombinationen von Plasmiden transfiziert, welche Flag-markierten menschlichen VDR und MDM2 produzieren.

Die Wahl sowohl der H1299-Zelllinie als auch der menschlichen Colonadenokarzinomzelllinie (CaCo) erfolgte aufgrund der Tatsache, dass beide Tumorzelllinien defizient für Wildtyp-p53 sind und somit die Ergebnisse der Experimente nicht durch die Anwesenheit von p53, welches selbst mit MDM2 interagieren würde, beeinflusst bzw. verfälscht werden konnten. Für die Immunpräzipitation wurden Zellextrakte hergestellt und entweder mit monoklonalem Anti-Flag-AK oder einem irrelevanten monoklonalem IgG inkubiert. Das Ausfällen der Proteine erfolgte mittels Standard-Western-Blot.

Es konnte gezeigt werden, dass MDM2 gemeinsam mit Flag-VDR ausgefällt werden kann. Auch die Umkehrung des Versuchs d.h. die Zellextrakte wurden mit monoklonalem Anti-MDM2-AK 3G9 oder mit IgG anstelle von Anti-Flag-AK inkubiert, zeigte die gemeinsame Ausfällung von Flag-VDR mit MDM2. Selbst geringe endogen vorhandene Mengen an MDM2 in den H1299-Zellen waren ausreichend, um mittels der Immunpräzipitation Flag-VDR mit Anti-MDM2-AK 3G9 auszufällen.

Diese Ergebnisse deuteten somit darauf hin, dass der VDR und MDM2 miteinander interagieren können und demonstrierten, dass die Flag-VDR-Menge bei gleichzeitiger MDM2-Expression reduziert war, was vermuten ließ, dass MDM2 als Ubiquitinligase die Stabilität des VDR verringern kann und der Vitamin D-Rezeptor somit ein Substrat von MDM2 sein könnte.

Eine der zunächst zentralsten und wichtigsten Aufgaben zur weiteren Fortführung dieser Arbeit bestand darin, einen kommerziell erhältlichen Antikörper, zum Nachweis des endogen vorhandenen VDR in humanen Zelllinien zu identifizieren.

Da in vielen Zelllinien der Vitamin D-Rezeptor jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen exprimiert wird (206) und die meisten verfügbaren mono- oder polyklonalen AK für den VDR sich in der Vergangenheit z.T. als von fraglicher Qualität und Spezifität erwiesen, wurde zunächst an beiden Tumorzelllinien sowohl ein polyklonaler Kaninchen Anti-VDR-AK als auch

ein monoklonaler Ratten Anti-VDR-AK (9A7) getestet.

Beide Antikörper zeigten auf den durchgeführten Western-Blots diverse Signale. Allerdings erwies sich der polyklonale Kaninchen-AK für die weitere Verwendung als unbrauchbar, da er zu unspezifisch interagiert. Der monoklonale Ratten-AK 9A7 stellte sich als brauchbar heraus, da er lediglich Proteinbanden im Molekülbereich von ca. 50 und 70 kDa erkannte und der gesuchte VDR eine Größe von ca. 48 kDa besitzt. Er wurde für diese Arbeit verwendet.

Zur Verifizierung, dass es sich bei der Bande von ca. 50 kDa tatsächlich um den zu untersuchenden VDR handelt, wurden in weiteren Versuchsreihen sowohl eine Plasmidtransfektion mit einem VDR-Expressionsvektor als auch ein Knockdown des endogenen VDR mittels siRNA gegen die VDR mRNA durchgeführt.

Das transfizierte VDR-Plasmid erzeugte ein Signal bei ca. 48 kDa, also etwa auf gleicher Höhe des Signals welches von dem Antikörper 9A7 in untransfizierten Zellen erzeugt wurde. Dies ließ vermuten, dass es sich bei diesem Signal in der Tat um den endogenen VDR handelte.

Sowohl bei dieser Versuchsdurchführung, als auch bei den folgenden durchgeführten Experimenten stellten sich zusätzlich auftretende Signalbanden im Bereich von ca. 70 kDa dar.

Möglicherweise handelt es sich bei diesen Signalen entweder um eine Variante des VDR-Proteins bzw. um eine VDR-Isoform mit größerer Molekülgröße oder um ein kreuzreagierendes fremdes Protein.

Das Transfektionsexperiment mit den beiden bereits verifizierten VDR-siRNA's (VDR8 und VDR9) demonstrierte durch die Hemmung der VDR-mRNA Translation und somit durch das Verschwinden der ca. 48 kDa großen Signalbande, dass es sich tatsächlich um den endogenen VDR handelt.

Dies deutet darauf hin, dass der endogene VDR in diesen Zelllinien vorhanden ist und dass dieser mittels dem monoklonalen VDR-AK 9A7 auch eindeutig identifiziert werden kann.

P53 und auch MDM2 selbst werden für den Abbau durch das 26S Proteasom mit Ubiquitin markiert und sind daher in nur sehr geringen Konzentrationen in vielen Zelltypen vorhanden. Da der VDR ebenfalls in nur geringen Mengen in der Zelle exprimiert wird (206) und um zu untersuchen, ob diese niedrigen Steady-State- Level des Vitamin D-Rezeptors in den Zellen zum Teil auf den proteasomalen Abbau zurückzuführen sind, wurden die Auswirkungen einer Proteasomhemmung durch MG 132 auf den Ebenen des transfizierten Flag-VDR und des endogenen VDR untersucht. Western-Blot Analysen der Proteinexpression in den H1299- Zellen verdeutlichten einerseits, dass sich sowohl das endogene MDM2 als auch die extern zugeführten Flag-VDR-Level nach der Behandlung mit MG132 erhöhen und andererseits, dass diese Proteasomhemmung auch die Menge des endogenen VDR-Proteins erhöht.

Zur Klärung der Frage, ob der VDR möglicherweise ein Substrat von MDM2 sein kann, wurden H1299-Zellen mit Kombinationen von Plasmiden transfiziert, welche entweder Flag-p53 oder Flag-VDR produzieren und welche zusätzlich MDM2-und HA-Ubiquitin markiert waren. Damit die Ubiquitin-markierten Proteine in der Zelle akkumulieren können, wurde der proteasomale Abbau mittels MG 132 vorübergehend gehemmt. Es konnte gezeigt werden, dass Flag-VDR, unabhängig von der MDM2 Transfektion, stark HA-Ubiquitiniert war und dass diese Flag-VDR Ubiquitinierung unter extern zugeführtem MDM2 durchweg erhöht vorlag. Dies deutet darauf hin, dass der VDR gezielt durch mehrere Ubiquitin-Ligasen, einschließlich MDM2 ubiquitiniert wird.

Ein weiterer Aspekt, welcher mittels der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, war die Tatsache, dass ein Knockdown von endogenem MDM2 mittels siRNA die Menge an endogenem VDR in den untersuchten Zellen erhöhte. Kombiniert man diese Ergebnisse, so lassen sie vermuten, dass die zellulären Steady-State-Level des VDR teilweise durch das Proteasom gesteuert werden und das MDM2 eine unter vielleicht mehreren Ubiquitin-Ligasen ist, welche diese Level reguliert.

CYP24A1 kodiert die 24-Hydroxylase, welche für den Abbau der Vitamin D-Metaboliten erforderlich ist und stellt somit ein klassisches VDR Zielgen dar,

welches direkt von diesem und in Abhängigkeit der Liganden transaktiviert wird (207). In dieser Arbeit konnte unter Zuhilfenahme der qRT-PCR gezeigt werden, dass ein MDM2-Knockdown mittels siRNA einen Effekt auf die Transkription dieses Gens hatte. In Abwesenheit von 1,25D hatte dieser Knockdown jedoch keine signifikante Wirkung auf die endogene *CYP24A1*-Genexpression. Im Gegensatz dazu, führte der durchgeführte MDM2 Knockdown unter 1,25D-Behandlung jedoch zu deutlich höheren *CYP24A1*-Transkripten. Sowohl in den humanen Lungenadenokarzinomzellen als in der Colonadenokarzinomzelllinie wurde der deutlichste Effekt dieses Knockdown auf die *CYP24A1* Gentransaktivierung unter 1,25D Behandlung zu frühen Zeitpunkten (2-4 Stunden) beobachtet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch bei *p21 (CDKN1A)*, ein Gen welches für einen großen Inhibitor der zellzyklusabhängigen Kinasen codiert und ein bekanntes Ziel der Transaktivierung durch den Liganden VDR ist (208), ein Knockdown von MDM2 in Abwesenheit von 1,25D nicht die *p21* Genexpression verändert. In Gegenwart von 1,25D führte ein MDM2-Knockdown allerdings zu einem Anstieg des *p21* Transkripts bereits 2 Stunden nach der Ligandenexposition.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass MDM2 die VDR-vermittelte Transaktivierung von Genen hemmen kann.

Der 1,25D ligandengebundene VDR zeigt potente antiproliferative Wirkungen in vielen Tumorzelltypen und aktiviert die Mitglieder der p53-Familie (*p53*, *p63*, *p73*) durch die Induktion von Seneszenz, Differenzierung und Apoptose (209). Es ist daher vielleicht nicht verwunderlich, Übereinstimmungen zwischen den Tumorsuppressoren zu finden (210). *p63*, *p73* und weniger effizient auch *p53* selbst können VDR-Gene transaktivieren (211-212). Der VDR wiederum regelt mehrere Gene, welche ebenfalls Ziele der p53-Familie darstellen, einschließlich *p21 (CDKN1A)* und *MDM2* (205, 208). Die Transaktivierung des *MDM2*-Gens durch *p53* und die anschließende Repression von *p53* durch *MDM2* etablieren eine negative Rückkopplungsschleife (204).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass der VDR zumindest in einigen Geweben in diese Rückkopplungsschleife eingreifen kann (205).

Tumoren verlieren oft ihre Tumorsuppressoren oder inaktivieren sie, wie im Falle des VDR, beispielsweise durch Hochregulation der *CYP24A1*-Expression, welches 1,25D abbaut (213). Eine Überexpression des Onkoproteins MDM2 ist eine weitere bekannte Methode, mit welcher Tumore ihre Tumorsuppressoren inaktivieren. MDM2 ist häufig überexprimiert in Sarkomen (214), bei Leukämie und Lymphomen (215-216), bei Brustkrebs (217) und in Gliomen (218).

Studien zeigen, dass 1,25D potente antineoplastische Wirkung gegen eine Vielzahl von Tumorzellen hat (219). Beispielsweise zeigen sowohl Mäuse mit Vitamin D-Mangel als auch VDR-Knockout-Mäuse eine verstärkte Krebsentwicklung und ein erhöhtes Krebswachstum (220). Im Gegensatz zum Menschen wird bei Hunden das Serum-Vitamin D nicht durch UV-Exposition beeinflusst, da Hunde 7-Hydroxycholesterol aufgrund der sehr niedrigen Konzentration nicht zu 1,25 D umwandeln (69). Aufgrund dieser Tatsache haben Hunde keine Möglichkeit, aus Cholesterin-Vorstufen und durch UV-Bestrahlung Vitamin D über die Haut zu synthetisieren, so dass die orale Aufnahme von Cholecalciferol oder Ergocalciferol ausschließlich über die Nahrung erfolgen muss (69).

Auch in der Veterinärmedizin gibt es Studien zur Assoziation zwischen dem Vitamin D Spiegel im Blut und dem Auftreten von verschiedenen Krebsarten. Hautmastzelltumore (MCT) treten beispielsweise bei Hunden häufiger auf als bei anderen Spezies und machen 7-21% aller caninen Hauttumore aus (221-222). Die Mehrzahl der caninen MCT exprimiert den VDR, wahrscheinlich eine Voraussetzung um auf Vitamin D oder seine Derivate zu reagieren (223). Auch die Tiermedizin zeigte, dass hohe orale Dosen an 1,25 D die Tumorregression bei Hunden mit MCT induziert, allerdings nicht ohne klinische Anzeichen einer Vitamin D Toxizität (224).

Dennoch könnte die Substitution von 1,25 D oder Vitamin D Analoga, aufgrund seiner antineoplastischen Wirkung, in Zukunft als zusätzliche Therapie zur standardisierten Operation oder Strahlentherapie in Betracht gezogen werden.

Die Notwendigkeit für eine weiterführende Vitamin D Forschung ist somit eindeutig gegeben und dies, obwohl Vitamin D vor fast einem Jahrhundert entdeckt wurde. Aufgrund der noch vorhandenen weitreichenden Lücken im Vitamin D Verständnis wird die Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten in Bezug auf dieses Hormon in Zukunft weitere interessante neue Erkenntnisse und Ergebnisse bereithalten. Es bleibt zu hoffen, dass die Aufmerksamkeit um das Vitamin D-Hormon und seine noch zu entdeckenden Fähigkeiten nicht zu schnell erlischt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin D kann entweder durch die Nahrung aufgenommen oder durch UV-Bestrahlung der Haut aus 7-Dehydrocholesterol gebildet werden. Das entstehende inaktive Vitamin D₃ wird anschließend durch die 25-Hydroxylase (CYP2R1) in der Leber zu 25-Hydroxyvitamin D₃ (25D) metabolisiert. 25D ist die vornehmlich zirkulierende Form von Vitamin D, es selbst besitzt allerdings nur etwa ein Tausendstel der Aktivität der endgültigen, aktiven Form des Hormons, 1 α ,25-Hydroxyvitamin D₃ (1,25D), das überwiegend in der Niere durch die mitochondriale Hydroxylase CYP27B1 produziert und im Plasma durch Interaktion mit DBP (plasma vitamin D binding protein) stabilisiert und transportiert wird. Die Hauptfunktion von 1,25D besteht offenbar in der Bindung an das intrazelluläre Protein Vitamin D Rezeptor (VDR), welches daraufhin typischerweise mit einem zweiten Protein, dem Retinoid X Rezeptor, heterodimersiert und dann gemeinsam mit diesem an sogenannte Vitamin D response elements (VDREs) in der DNA bindet. Die weiteren Konsequenzen dieser Bindung sind nicht in allen Einzelheiten verstanden, führen aber entweder zur transkriptionellen Aktivierung oder Reprimierung einer großen Anzahl von Gensequenzen.

Die E3 Ubiquitin-Ligase und Transkriptionsrepressor MDM2 ist ein potenter Inhibitor der p53 Familie von Transkriptionsfaktoren, Stoffwechselregulatoren und Tumorsuppressoren. Es konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass der VDR ein weiterer Transkriptionsfaktor, Stoffwechselregulator und Tumorsuppressor ist, welcher ebenfalls von MDM2 gebunden und inhibiert wird. Es stellte sich heraus, dass der VDR in der Zelle zum Teil durch MDM2 ubiquityliert wird, seine Steady-State Level durch das Proteasom kontrolliert werden und ein Knockdown von endogenem MDM2 die VDR-Level erhöht. Ein Knockdown von MDM2 führte zu einer signifikanten Erhöhung des Transkripts der Gene *CYP24A1* und *p21*, klassische zelluläre Ziele der Transaktivierung durch ligandengebundenen VDR. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass MDM2 analog zu p53 den VDR negativ reguliert.

VII. SUMMARY

Vitamin D can be obtained either by ingestion of food or produced from 7-dehydrocholesterol by exposure to UV rays in the skin. The produced inactive vitamin D₃ is metabolized to 25-hydroxyvitamin D₃ (25D) by the 25-hydroxylase (CYP2R1) in the liver. 25D is the predominating circulated form of vitamin D; but 25D itself has only one thousandth of the activity of the final active form 1 α , 25-hydroxyvitamin D₃ (1,25D), that is produced predominantly in the kidney by the mitochondrial hydroxylase CYP27B1 and becomes stable and transported in the plasma by binding to DBP (plasma vitamin D binding protein). The main function of 1,25D is obviously the bond with the intracellular protein vitamin D receptor (VDR) that typically forms a heterodimer with a second protein, the retinoid X receptor, and then binds to so called vitamin D response elements (VDREs) in the DNA. The further consequences of this bond are not understood in all details but they lead either to a transcriptional activation or repression of a great number of genes.

The E3 ubiquitin ligase and transcriptional repressor MDM2 is a potent inhibitor of the p53 family of transcription factors, metabolism regulators and tumour suppressors. The present scientific research could demonstrate that the VDR is one of those molecules, that is bound and inhibited by MDM2. It became apparent that the VDR is partly ubiquitylated in the cell by MDM2, its steady-state level is controlled by the proteasome and a knockdown of endogenous MDM2 increases the VDR-level. A knockdown of MDM2 resulted in a significant increase of transcript from the CYP24A1 and p21 genes, noted targets of transactivation by liganded VDR. The results of this scientific research suggest that MDM2 negatively regulates VDR in some analogy to p53.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- A. Mellanby, T., 1918. The part played by an „ accessory factor“ in the production Of experimental rickets. J. Physiol. 52, 1-14.
- B. McCollum, E.V., Simmonds, N., Becker, J.E., Shipley, P.G., 1922.
An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes Calcium deposition. J. Biol. Chem. 53, 293-298.
- C. Huldshinski, K., 1919. Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne.
Med. Wochenschr.45, 712-713.
- D. Steenbock, H., Hart, E.B., 1913. The influence of function on the lime Requirements of animals. J. Biol. Chem. 14, 59-73.
1. Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 7.Auflage, Springer.
 2. Holick M.F., Uskokovic M., Henry J.W., Maclaughlin J., Holick S.A., Potts J.T., Jr. (1980). The photoproduction of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in skin: an approach to the therapy of vitamin-D-resistant syndromes. N. Engl J Med, 303:349-54.
 3. Milde P. (1991). (Vitamin D and the skin: new aspects and perspectives). Hautarzt, 42: 671-6.
 4. Norman A. W. (1998). Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. Am J clin Nutr, 67: 1108-10.
 5. Mark R. Haussler, G. Kerr Whitfield, Ichiro Kaneko, Carol A. Haussler, David Hsieh, Jui-Cheng Hsieh, Peter W. Jurutka (2012). Molecular Mechanisms of vitamin D Actin. Calcif Tissue Int (2013) 92: 77-98, DoI 10.1007/s 00223-012-9619-0.
 6. Physiologie der Haustiere, Wolfgang von Engelhart, Gerhard Breves, 2., völlig neu bearbeitete Auflage, Enke.

7. Haussler M.R., Whitfield G.K., Hausller C.A., Hsieh J.C., Thompson P.D., Selznick S.H., Dominguez C.E., Jurutka P.W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*, 13:325-49.
8. University of Bristol/UK: www.bris.ac-uk/webprojets2002/schepp/vitamind.html.
9. Kristin K. Deeb, Donald L. Trump and Candace S. Johnson (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrc2196.
10. Sylvia Christakos, Ph.D., Dare V. Ajibade, B.A., (...), and Leila J. Mady, B.A (2010). Vitamin D: Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 39(2): 243-253.
11. Hollis, B.W. 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).
12. 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*. 1988; 67: 373-8.
13. Matsuoka LY, Jole L, Wortsman J, et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64: 1165-8.
14. Matsuoka LY, Wortsman J, Dannenberg MJ, et al. Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75: 1099-103.
15. Velluz, L. & Amiard, G. Chimie organique-nouveau précurseur de la vitamin D₃. *Compt. Rend.* 228, 1037-1038 (1949).
16. Matsuoka L.Y., Wortsman J., Hollis B.W. (1990). Use of topical sunscreen for the evaluation of regional synthesis of vitamin D₃. *J Am Acad Dermatol*, 22: 772-5.

17. Holick M.F. (1995). Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 61: 638 S - 645 S.
18. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29: 664-73.
19. Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 139-66.
20. Haussler, M.R. et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* 13, 325-349 (1998).
21. Lehmann B., Meurer M. (2010). Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther*, 23:2-12.
22. Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E. (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289: F8-28.
23. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, et al. genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 7711-5.
24. Wortsman J., Matsuoka L.Y., Cheng T.C., Luz., Holick M.F. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*, 72: 690-3.
25. Cheng, J.B., Motola, D.L., Mangelsdorf, D.J. & Russell, D.W. De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 278, 38084-38093 (2003).
26. Brunette, M.G., Chan, M., Ferriere, C. & Roberts, K.K. Site of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in the kidney. *Nature* 276, 287-289 (1978).
27. Fraser D.R., Kodicek E. (1970). Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*, 228: 764-6.
28. DeLuca, H.F. Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Fed. Proc.* 33, 2211-2219 (1974).

29. Weisman Y, Harell A, Edelstein S, et al. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and 24,25-dihydroxyvitamin D3 in vitro synthesis by human decidua and placenta. *Nature*. 1979; 281: 317-9.
30. Gray TK, Lester GE, Lorence RS. Evidence for extra-renal 1 alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Science*. 1979; 204: 1311-3.
31. Stoffels K, Overbergh I, Bouillon R, et al. Immune regulation of 1 alpha-hydroxylase in murine peritoneal macrophages: unravelling the IFN gamma pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007; 103: 567-71.
32. Esteban L, Vidal M, Dusso A. 1 alpha-Hydroxylase transactivation by gamma-interferon in murine macrophages requires enhanced C/EBP beta expression and activation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90: 131-7.
33. Haussler MR, Haussler CA, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Barthel TK, Bartik L, Egan JB, Wu Y, Kubicek JL, Lowmiller CL, Moffet EW, Forster RE, Jurutka PW (2010). The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the „Fountain of Youth“ to mediate healthful aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 88-97.
34. Henry HL, Norman AW. Vitamin D: metabolism and biological actions. *Annu Rev Nutr*. 1984; 4: 493-520.
35. DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev*. 2008; 66: S73-87.
36. Boyle IT, Gray RW, DeLuca HF. Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 2131-4.
37. Henry HL. Parathyroid hormone modulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism by cultured chick kidney cells in mimicked and enhanced by forskolin. *Endocrinology*. 1985; 116: 503-10.

38. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 alpha, 25 (OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology*. 1999; 140: 2224-31.
39. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, et al. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 1387-91.
40. Zierold C, Nehring JA, DeLuca HF. Nuclear receptor 4A2 and C/EBP beta regulate the parathyroid hormone-mediated transcriptional regulation of the 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 460 : 233-9.
41. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al. 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*. 1998; 249: 11-6.
42. Jones, G., Strugnek, S.A. & DeLuca, H.F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* 78, 1193-1231 (1998).
43. Kim MS, Fujiki R, Murayama A, et al. 1 Alpha, 25 (OH)2D3-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol*. 2007; 21: 334-42.
44. Brenza HL, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys*. 381: 143-52.
45. Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, et al. 2004. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J*. 2000; 23: 1598-608.

46. Bai X, Miao D, Li J, et al. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology*. 2004; 145: 5269-79.
47. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets in associated with mutations in FGF 23. *Nat Genet*. 2000; 26: 345-8.
48. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF 23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 6500-5.
49. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, et al. Autosomal-dominant hypophosphataemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF 23. *kidney Int*. 2001; 60: 2079-86.
50. Weber TJ, Liv S, Indridason OS, et al. Serum FGF 23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 1227-34.
51. Fukumoto, S. Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism - pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Inter. Med*. 47, 337-343 (2008).
52. Liv S, Tang W, Zhou J, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 1305-15.
53. Quarles, L.D. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J. Clin. Invest*. 118, 3820-3828 (2008).
54. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of FGF 23 demonstrates an essential physiological role of FGF 23 in phosphat and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*. 2004; 113: 561-8.
55. Regulation der Vitamin D Synthese, *Harrisons Innere Medizin*, 18. Auflage.
56. Johnson JA, Kumar R. Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin-D and vitamin-D dependent calcium binding proteins. *Sem Nephrol* 1994; 14: 119-128.

57. Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin-D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypothesis. *J Nutr* 1995; 125: S1971-1979.
58. Feher JJ, Jullmer CS, Wasserman RH. The role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol* 1992; 262: S17-526.
59. Bikle D. (2009). Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.*, 94: 26-34.
60. Shinki T, Jin CH, Nishimura A, et al. Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in rat kidney but not in intestine. *J Biol Chem.* 1992; 267: 13757-62.
61. Bouhtiay I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG. Two vitamin D-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II: Effect of CaBP28k. *Kidney Int* 1994; 45: 461-468. II: Effect of CaBP9k. *Kidney Int* 1994; 45: 469-474.
62. Koster HPG, Hartog A, Vanos CN, Bindels RJM. Calbindin D28k facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. *Cell Calcium* 1995; 18: 187-196.
63. Liu L, Khastigir A, VcCauley J, Dunn ST, Morrissey JH, Christakos S, Hughes MR, Bordeau JE. RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin-D28k and vitamin-D receptor in murine nephron. *Am J Physiol* 1996; 270: F677-F681.
64. Löffler und Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer.
65. Holick M.F (2007 b). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 357: 266-81.
66. Chen K.S., DeLuca H. F. (1995). Cloning of the human 1 alpha, 25-dehydroxyvitamin D3-24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochem Biophys Acta*, 1263: 1-9.

67. Ohyama Y., Yamasaki T. (2004). Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism. *Front Biosci*, 9: 3007-18.
68. Holick, M.F., 1990. Vitamin D and the skin: photobiology, physiology and therapeutic efficacy for psoriasis. In: Heersche, J.N.M., Kanis, J.A. (Eds.), *Bone and Mineral Research*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 313-366.
69. How, K.L., Hazewinkel, H.A.W., Mol, J.A., 1994. Dietary Vit D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of Vit D. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 12-18.
70. Morris, J.G., 1999. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol- δ 7-reductase. *J. Nutr.* 129, 903-908.
71. Hazewinkel, H.A.W., 1989. Nutrition in relation to skeletal growth deformities. *J. Small Anim. Pract.* 30, 625-630.
72. Johnson, K.A., Church, D.B., Barton, R.J., Wood, A.K.W., 1988. Vitamin D-dependent rickets in a Saint Bernard dog. *J. Small Anim. Pract.* 29, 657-666.
73. Kealy, R.D., Lawler, D.F., Monti, K.L., 1991. Some observations on the dietary vitamin D requirement of weanling pups. *J. Nutr.* 121, 566-569.
74. Schulze, C., Rothvizen, J., von Sluijs, F.J., Hazewinkel, H.A.W., van den Ingh, T.S.G.A.M., 2000. Extrahepatic biliary atresia in a border collie. *J. Small Anim. Pract.* 41, 27-30.
75. Kallfelz, F.A., Dzanic, D.A., 1989. Overnutrition: an epidemic problem in pet animal practice. *Vet. Clin. North. Am. SAC* 19, 433-446.
76. Hedhammar, A., Wu, F., Krook, L., Schryver, H.F., De Lahunta, A., Whalen, J.D., Kallfelz, F.A., Nunez, E.A., Hintz, H.F., Sheffy, B.E., Ryan, G.D., 1974. Overnutrition and skeletal diseases, an experimental study in growing Great Dane dogs. *Cornell. Vet.* 65 (Suppl. 5), 1-160.
77. Hazewinkel, H.A.W., Goldegebuuve, S.A., Poulos, P.W., Wolvekamp, W.Th.C., 1985. Influences of chronic calcium excess on the skeleton of growing Great Danes. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 21, 377-391.

78. a) Nap, R.C., Mol, J.A., Hazewinkel, H.A.W., 1993. Age-related plasma concentrations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in Great Dane pups fed different dietary levels of protein. *J. Domestic Anim. Endocrinol.* 10, 237-247. b) Nap, R.C., Hazewinkel, H.A.W., van den Brom, W.E., 1993. Calcium kinetics in growing miniature poodles challenged by four different dietary levels of calcium. *J. Nutr.* 123, 1826-1833.
79. Goodman, S.A., Montgomery, R.D., Titch, R.B., Hatchcock, J.T., Lauten, S.D., Kincaid, S.A., Rumph, P.F., Brawer, W.R., Baker, H.J., Lepine, A.J., Reinhart, G.A., 1998. Serial orthopaedic examinations of growing Great Dane puppies fed three diets varying in calcium and phosphorus. In: Reinhart, G.A., Carey, D.P. (Eds.), *Recent Advances in canine and feline Nutrition*, vol. III. Orange Frazer Press, Wilmington, OH, pp. 3-12.
80. Schoenmakers, I., Hazewinkel, H.A.W., Voorhout, G., Carlson, C.S., Richardson, D., 2000. Effect of diets with different calcium and phosphorus contents on the skeletal development and blood chemistry of growing Great Danes. *Vet. Rec.* 147, 652-660.
81. Nap, R.C., Hazewinkel, H.A.W., Mol, J.A., 1992. Prepubertal differences in plasma growth hormone and IGF-I concentrations related to adult body size in the dog. *J. Endocrinol. Invest.* 15, 91-106.
82. Goff, J.P., Caperna, T.J., Steele, N.C., 1990. Effects of growth hormone administration on vitamin D metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 425-435.
83. Lund, B., Eskildsen, P.C., Lund, B., Norman, A.W., Sorensen, O.H., 1981. Calcium and vitamin D metabolism in acromegaly. *Acta. Endocrinol.* 96, 444-450.
84. Condamine, L., Vztovsniak, I., Friedlander, G., Mena, C., Garabedian, M., 1994. Local action of phosphate depletion and insulin-like growth factor I on in vitro production of 1,25-dihydroxyvitamin D by cultured mammalian kidney cells. *J. Clin. Invest.* 94, 1673-1679.

85. Wei, S., Kubo, T., Tanaka, H., Ono, T., Moriwake, T., Kanazaki, S., Seino, Y., 1996. Growth hormone increases serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels and decreases 24,25-dihydroxyvitamin D levels in children with growth hormone deficiency. *J. Bone Miner. Res.* 11, M541.
86. Hazewinkel, H.A.W., Tryfonidou, M.A., 2002. Vitamin D3 metabolism in dogs. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197 (2002), 23-33. Elsevier
87. Boyan, B.D., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Schwartz, Z., 2001. 24,25-(OH)₂ D₃ regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms. *Steroids* 66, 363-374.
88. Schwartz, Z., Dean, D.D., Walton, J.K., Brooks, B.P., Boyan, B.D., 1995. Treatment of resting zone chondrocytes with 24,25-dihydroxyvitamin D₃ (24,25(OH)₂D₃) induces differentiation into 1,25(OH)₂ D₃ responsive phenotype characteristic of growth zone chondrocytes. *Endocrinology* 136, 402-411.
89. Ono, T., Tanaka, H., Yamate, T., Nagai, Y., Nakamura, T., Seino, Y., 1996. 24R, 25-Dihydroxyvitamin D₃ promotes bone formation without causing excessive resorption in hypophosphatemic mice. *Endocrinology* 137, 2633-2637.
90. H.F. DeLuca, *Fed. Proc.* 33 (1974) 2211-2219.
91. J.K. Burmester, N. Maeda, H.F. DeLuca, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 1005-1009.
92. A.R. Baker, D.P. Mc Donnell, M. Hughes, T.M. Crisp, D.J. Mangelsdorf, M.R. Haussler, J.W. Pike, J. Shine, B.W. O' Malley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3294-3298.
93. P.I. Brumbaugh, D.H. Haussler, R. Bressler, M.R. Haussler, *Science* 183 (1974) 1089-1091.
94. P.F. Brumbaugh, M.R. Haussler, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1588-1594.
95. B.E. Kream, M. Jose, S. Yamada, H.F. DeLuca, *Science* 197 (1977) 1086-1088.

96. M.R. Haussler, G.K. Whitfield, C.A. Haussler, J.C. Hsieh, P.D. Thompson, S.H. Selznick, C.E. Dominguez, P.W. Jurutka, J. Bone Miner. Res. 13 (1998) 325-349.
97. M.S. Kim, R. Fujiki, H. Kitagawa, S. Kato. 1 alpha, 25(OH)₂ D₃-induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. Mol. Cell. Endocrinol 2007; 265-266:168-173.
98. M.S. Kim, R. Fujiki, A. Murayama, H. Kitagawa, K. Yamaoka, Y. Yamamoto, M. Mihara, K. Takeyama, S. Kato, Mol. Endocrinol. 21 (2007) 334-342.
99. M.B. Demay, J.M. Gerardi, H.F. DeLuca, H.M. Kronenberg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 369-373.
100. C. Zierold, H.M. Darwish, H.F. DeLuca, J. Biol. Chem. 270 (1995) 1675-1678.
101. C. Zierold, H.M. Darwish, H.F. DeLuca, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 900-902.
102. H.M. Darwish, H.F. DeLuca, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 53 (1996) 321-344.
103. S. Kitazawa, K. Kajimoto, T. Kondo, R. Kitazawa, J. Cell. Biochem. 89 (2003) 771-777.
104. K. Ozono, J. Liao, S.A. Kerner, R.A. Scott, J.W. Pike, J. Biol. Chem. 265 (1990) (1988) 21881-21882.
105. J. Nishikawa, M. Matsumoto, K. Sakoda, M. Kitaura, M. Imagawa, T. Nishihara, J. Biol. Chem. 268 (1993) 19739-19743.
106. Szpiver, J., Szpiver, C., Riviere, M., Levan, G., Marynen, P., Cassiman, J.J., Wiese, R., DeLuca, H.F. The Sp 1 transcription factor gene (SP 1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. Genomics 1991; 11: 168-173.

107. Funktionelle Domänen des Vitamin D-Rezeptors (VDR). www.ajprenal.physiology.org/cortent/277/2/F157-vitaminD/RenalPhysiology ; Zugang: 07.11.2014 13:55.
108. Haussler M.R., Norman A.W. (1969). Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 155-162.
109. Kliewer S.A., Umesono K., Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*, 355: 446-9.
110. Goldfarb D.S., Corbett A.H., Mason D.A., Harreman M.T., Adam S.A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*, 14: 505-14.
111. Carlberg, C. et al. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* 361, 657-660 (1993).
112. Kurokawa, R. et al. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev.* 7, 1423-1435 (1993).
113. Rochel N., Wurtz J.M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D., (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol. Cell.* 5: 173-179.
114. Jurutka P.W., Hsieh J.-C., Remus L.S., Whitfield G.K., Thompson P.D., Haussler C.A., Blanco J.C.G., Ozato K., Haussler M.R. (1997). Mutations in the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor identifying C-terminal amino acids required for transcriptional activation that are functionally dissociated from hormone binding, heterodimeric DNA binding and interaction with basal transcription factor IIB, in vitro. *J. Biol. Chem.* 272: 14592-14599.
115. Brumbaugh, P.F. & Haussler, M.R. Nuclear and cytoplasmic binding components for vitamin D metabolites. *Life Sci.* 16, 353-362 (1975).
116. Kream, B.E., Reynolds, R.D., Knutson, J.C., Eisman, J.A. & DeLuca, H.F. Intestinal cytosol binders of 1,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 779-787 (1976).

117. Baker, A.R. et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3294-3298 (1988).
118. Burmester, J.K., Maeda, N. & DeLuca, H.F. Isolation and expression of rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1005-1009 (1988).
119. K.D. Healy, J.B. Zella, J.M. Prah, H.F. DeLuca, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 9733-9737.
120. L.A. Zella, S. Kim, N.K. Shevde, J.W. Pike, *Mol. Endocrinol.* 20 (2006) 1231-1247.
121. Y.B. Ahn, G. Xu, L. Marselli, E. Toschi, A. Sharma, S. Bonner-Weir, D.C. Sgroi, G.C. Weir, *Diabetologia* 50 (2007) 334-342.
122. A.K. Bhalla, W.C. Wojno, M.B. Goldring, *Biochem. Biophys. Acta* 931 (1987) 26-32.
123. M. Gascon-Barre, C. Demers, A. Mirshahi, S. Neron, S. Zalzal, A. Nanci, *Hepatology* 37 (2003) 1034-1042.
124. W.E. Stumpf, M. Sar, F.A. Reid, Y. Tanaka, H.F. DeLuca, *Science* 206 (1979) 1188-1190.
125. Y. Wang, B.R. Becklund, H.F. DeLuca, *Arch. Biochem. Biophys.* 494 (2010) 166-177.
126. U. Berger, P. Wilson, R.A. McClelland, K. Colston, M.R. Haussler, J.W. Pike, R.C. Coombes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67 (1988) 607-613.
127. T.L. Clemens, K.P. Garrett, X.Y. Zhou, J.W. Pike, M.R. Haussler, D.W. Dempster, *Endocrinology* 122 (1988) 1224-1230.
128. M.E. Sandgren, M. Bronnegard, H.F. DeLuca, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 (1991) 611-616.
129. A. Boos, K. Riner, M. Hassig, A. Liesegang, *Cells Tissues Organs* 186 (2007) 121-128.

130. Y.C. Huang, S. Lee, R. Stolz, C. Gabrielides, A. Pansini-Porta, M.E. Bruns, D.E. Bruns, T.E. Miffin, J.W. Pike, S. Christakos, J, *Biol. Chem.* 264 (1989) 17454-17461.
131. R. Zineb, B. Zhor, W. Odile, R.R. Marthe, *Endocrinology* 139 (1998) 1844-1852.
132. J.W. Pike, L.L. Gooze, M.R. Haussler, *Life Sci.* 26 (1980) 407-414.
133. W.E. Duncan, T.C. Aw, P.G. Walsh, J.G. Haddad, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 209-214.
134. H.F. DeLuca, *Am. J. Clin. Nutr.* 80 (2004) 1689S - 1696S.
135. W.E. Stumpf, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 33 (2008) 85-100.
136. S.A. Clark, W.E. Stumpf, M. Sar, H.F. DeLuca, *Am. J. Physiol.* 253 (1987) E99-E105.
137. L. Liu, M. Ng, A.M. Iacopino, S.T. Dunn, M.R. Hughes, J.E. Bourdeau, J. *Am. Soc. Nephrol.* 5 (1994) 1251-1258.
138. L. Liu, A. Khastgir, J.M. McCauley, S.T. Dunn, J.H. Morrissey, S. Christakos, M.R. Hughes, J.E. Bourdeau, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) F677 - F681.
139. N. Farman, *Pathol. Biol. (Paris)* 36 (1988) 839-845.
140. R. Kumar, J. Schaefer, J.P. Grande, P.C. Roche, *Am. J. Physiol.* 266 (1994) F477 - F485.
141. K. Iida, S. Taniguchi, K. Kurokawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (1993) 659-664.
142. H. Kawashima, K. Kurokawa, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13428- 13432.
143. W.E. Stumpf, M. Sar, R. Narbaitz, F.A. Reid, H.F. DeLuca, Y. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1149-1153.
144. Y. Wang, M.L. Borchert, H.F. DeLuca, *Kidney Int.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.463>. (Epub ahead print).

145. N. Koike, N. Hayakawa, K. Kumaki, W.E. Stumpf, J. Histochem. Cytochem. 46 (1998) 1351-1358.
146. J. Kong, G. Qiao, Z. Zang, S.Q. Liu, Y.C. Li, Kidney Int. 74 (2008) 1577-1581.
147. M. Nguyen, H. Guillozo, M. Garabedian, S. Balsan, Biol. Neonate 52 (1987) 232-240.
148. W.E. Stumpf, S.A. Clark, M. Sar, H.F. DeLuca, Cell Tissue Res. 238 (1984) 489-496.
149. W.E. Stumpf, M.M. Perez-Delgado, L. Li, H.J. Bidmon, P. Tuohimaa, Histochemistry 100 (1993) 115-119.
150. W.E. Stumpf, N. Koike, N. Hayakawa, K. Tokuda, K. Nishimiya, J. Hirate, A. Okazaki, K. Kumaki, Arch. Dermatol. Res. 287 (1995) 294-303.
151. H.J. Bidman, I. Radu, W.E. Stumpf, Rom. J. Morphol. Embryol. 43 (1997) 91-101.
152. R. Narbaitz, W.E. Stumpf, M. Sar, J. Histochem. Cytochem. 29 (1981) 91-100.
153. W.E. Stumpf, N. Koike, N. Hayakawa, K. Tokuda, K. Nishimiya, Y. Tsuchiya, J. Hirate, A. Okazaki, K. Kumaki, Histochemistry 102 (1994) 183-194.
154. G. Boivin, P. Mesguich, J.W. Pike, R. Bouillon, P.J. Meunier, M.R. Haussler, P.M. Dubois, G. Morel, Bone Miner. 3 (1987) 125-136.
155. J.A. Johnson, J.P. Grande, P.C. Roche, R. Kumar, J. Bone Miner Res. 11 (1996) 56-61.
156. C. Menea, J. Barsony, S.V. Reddy, J. Cornish, T. Cundy, G.D. Roodman, J. Bone Miner Res. 15 (2000) 228-236.
157. M.C. Langub, T.A. Reinhardt, R. L. Horst, H.H. Malluche, N.J. Koszewski, Bone 27 (2000) 383-387.
158. J. Merke, G. Klaus, U. Hugel, R. Waldherr, E. Ritz, J. Clin. Invest. 77 (1986) 312-314.

159. A. P. Mel, J.A. Hoyland, I.P. Braidman, A. J. Freemont, M. Davies, E.B. Mawer, *Bone* 18 (1996) 295-299.
160. D.M. Provvedini, C.D. Tsoukas, L.J. Deftos, S.C. Manolagas, *Science* 221 (1983) 1181-1183.
161. A.K. Bhalla, E.P. Amento, T.L. Clemens, M.F. Holick, S.M. Krane, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57 (1983) 1308-1310.
162. M. Kreutz, R. Andreesen, S.W. Krause, A. Szabo, E. Ritz, H. Reichel, *Blood* 82 (1993) 1300-1307.
163. W.E. Stumpf, H.J. Bidmon, R. Murakami, C. Heiss, A. Mayerhofer, A. Bartke, *Histochemistry* 94 (1990) 121-125.
164. J. Silver, T. Naveh-Many, H. Mayer, H.J. Schmelzer, M.M. Popovtzer, *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 1296-1301.
165. T. Naveh-Many, R. Marx, E. Keshet, J.W. Pike, J. Silver, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 1968-1975.
166. T. Naveh-Many, J. Silver, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 1313-1319.
167. K.W. Colston, U. Berger, P. Wilson, L. Had Cocks, I. Naeem, H.M. Earl, R.C. Coombes, *Mol. Cell. Endocrinol.* 60 (1988) 15-22.
168. Iwakuma, T. and Lozano, G. (2003) Mdm2, an introduction. *Mol Cancer Res*, 1, 993-1000.
169. Meek, D.W. and Knippschild, U. (2003) Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res*, 1, 1017-1026.
170. Wade, M., Wang, Y.V. and Wahl, G.M. (2010) The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends*, 20, 299-309. Epub 2010 Feb 19.
171. Heyne, K., Winter, C., Gerten, F., Schmidt, C. and Roemer, K. (2013) A novel mechanism of crosstalk between the p53 and NFkappa B pathways: MDM2 binds and inhibits p65RelA. *Cell Cycle* 2013; 12: 2479-2492.
172. Freedman, D.A., L. Wu, and A.J. Levine, Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 1999. 55 (1): p. 96-107.

173. Moll, U.M. and O. Petrenko, The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*, 2003. 1 (14): p. 1001-8.
174. NCBI Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
175. Olson, D.C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C., and Levine, A.J. Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene*, 8: 2353-2360, 1993.
176. Saucedo, L.J., Myers, C.D., and Perry, M.E. Multiple murine double minute gene 2 (MDM2) proteins are induced by ultraviolet light. *J. Biol. Chem.*, 274: 8161-8168, 1999.
177. Perry, M.E., Piette, J., Zawadzki, J.A., Harrey, D., and Levine, A.J. The mdm-2 gene is induced in response to UV-light in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11623-11627, 1993.
178. Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T., and Levine, A.J. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.*, 17: 554-564, 1998.
179. Freedman, D.A. and Levine, A.J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 7288-7293, 1998.
180. Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., and Vousden, K.H. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat. Cell Biol.*, 2: 179-181, 2000.
181. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387: 296-299, 1997.
182. Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.*, 420: 25-27, 1997.
183. Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387: 299-303, 1997.

184. Chilchanover A. (1998). The Ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO journal* 17: 7151-7160.
185. Lee, J.C. and Peter, M.E. Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.*, 193: 39-47, 2003.
186. Yang, Y. and Yu, X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.*, 17: 790-799, 2003.
187. Vogelstein, B., D. Lane and A.J. Levine (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810): 307-10.
188. Vousden, K.H. and X. Lu (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2 (8): 594-604.
189. Fakharzadeh, S.S., Trusko, S.P., and George, D.L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.*, 10: 1565-1569, 1991.
190. Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U., and George, D.L. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somatic Mol. Genet.*, 13: 235-244, 1987.
191. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69: 1237-1245, 1992.
192. Chen J., Marechal V., Levine A.J. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 4107-4114.
193. Freedman, D.A., C.B. Epstein, J.C. Roth and A.J. Levine (1997). A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol Med* 3 (4): 248-59.
194. Picksley, S.M., B. Vojtesek, A. Sparks and D.P. Lane (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2; - - fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* 9 (9): 2523-9.

195. Li, M., C.L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer and W. Gu (2003).
Monoversus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2.
Science 302 (5652): 1972-5.
196. Giovannucci, E. et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and
cancer incidence and mortality in men. J. Natl Cancer Inst. 98, 451-459
(2006). A paper presenting a predictive model for serum 25(OH)₂ D₃ level
and risk factor in tumor incidence and mortality in men.
197. Zang J, Chalmers MJ, Stayrook KR, Burris LL, Wang Y, Busby SA, et al.
DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR-RXR
complex. Nat Struct Mol Biol 2011; 18: 556-63.
198. Rochel N, Ciesielski F, Godet J, Moman E, Roessle M, Peluso-Ittis C, et al.
Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct
repeat elements with different spacings. Nat Struct Mol Biol 2011; 18: 564-70.
199. Pike JW, Meyer MB. Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene
expression. J Steroid Biochem Mol Biol 2013; 144: 5-11.
200. Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M. Regulation of mdm2
expression by p53: alternative promoters produce transcripts with
nonidentical translation potential. Genes Dev 1994; 8: 1739-49.
201. Ohtsubo C, Shiokawa D, Kodama M, Gaiddon C, Nakagama H, Jochemsen AG,
et al. Cytoplasmic tethering is involved in synergistic inhibition of p53 by
Mdmx and Mdm2. Cancer Sci 2009; 100: 1291-9.
202. Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ. Several hydrophobic amino acids in the
p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation,
binding to mdm2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. Genes Dev 1994;
8: 1235-46.
203. Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R. Repression of p53-mediated transcription by
MDM2: a dual mechanism. Genes Dev 1997; 11: 1974-86.
204. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm2 autoregulatory feedback
loop. Genes Dev 1993; 7: 1126-32.

205. Chen H, Reed G, Guardia J, Lakhan S, Couture O, Hays E, et al. Vitamin D directly regulates Mdm2 gene expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430: 370-4.
206. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 2012; 523: 123-33.
207. Zou A, Elgort MG, Allegretto EA. Retinoid X receptor (RXR) ligands activate the human 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase promoter via RXR heterodimer binding to two vitamin D-responsive elements and elicit additive effects with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem* 1997; 272: 19027-34.
208. 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* 1996; 10: 142-53.
209. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 342-57.
210. Reichrath J, Reichrath S, Heyne K, Vogt T, Roemer K. Tumor suppression in skin and other tissues via cross-talk between vitamin D-and p53-signaling. *Front Physiol* 2014; 5: 166.
211. Kommagani R, Payal V, Kadakia MP. Differential regulation of vitamin D receptor (VDR) by the p53 Family: p73-dependent induction of VDR upon DNA damage *J Biol Chem* 2007; 282: 29847-54.
212. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, et al. Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer Res* 2006; 66: 4574-83.
213. 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* 1993; 132: 1952-60.

214. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-3.
215. Bueso-Ramos CE, Yang Y, deLeon E, Mc Cown P, Stass SA, Albitar M. The human MDM2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* 1993; 82: 2617-23.
216. Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 1994; 84: 3158-65.
217. Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, Fontana JA. The p53-binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 3226-8.
218. Reifenberger G, Liu L, Ichimurak K, schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 1993; 53: 2736-9.
219. Rassnick KM, Muindi JR, Johnson CS, et al. (2008) In vitro and in vivo evaluation of combined calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 62, 881-891.
220. Welsh J (2004) Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr* 80, Suppl. 6, 1721S-1724S.
221. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, et al. (1968) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties. California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 40, 307-318.
222. Cohen D, Reif JS, Brodey RS, et al. (1974) Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res* 34, 2859-2868.
223. Russell DS, Rassnick KM, Erb HN, et al. (2010). An immunohistochemical study of vitamin D receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours. *J Comp Pathol* 143, 223-226.

-
224. Malone EK, Rassnick KM, Wakshlag JJ, et al. (2010) Calcitriol enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in-vitro and has single agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 8. 209-220.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Metaboliten des Vitamin D Stoffwechsels und ihre strukturellen Unterschiede.	S.5
Abbildung 2:	Vitamin D Metabolismus modifiziert	S.9
Abbildung 3:	Regulation der Vitamin D Synthese durch Ca ²⁺ , P, PTH und 1,25D	S.12
Abbildung 4:	Mechanismen der aktiven Ca ²⁺ -Resorption in Dünndarmepithelzellen	S.14
Abbildung 5:	Regulation der 1,25D-Synthese in den renalen proximalen Tubulusepithelzellen	S.17
Abbildung 6:	Funktionelle Domänen des Vitamin D Rezeptors (VDR)	S.22
Abbildung 7:	Mechanismen der Geninduktion und Repression durch den VDR	S.25
Abbildung 8:	Struktur von MDM2 (Gen und Protein)	S.30
Abbildung 9:	Page Ruler TM, Proteinleiter der Firma Fermentas	S.38
Abbildung 10:	pCMV-p53 Vektor (Dr. Kristina Heyne, Neue Funktionen des p53-Tumorsuppressors an den Mitochondrien und im Zellkern).	S. 40
Abbildung 11:	Vektor pcDNA 3.1 (+) Neo der Firma Invitrogen	S. 40
Abbildung 12:	Zeitprotokoll für die qRT-PCR mit dem StepOne Plus von Applied Biosystems	S.62
Abbildung 13:	Co-Immunpräzipitation von a) MDM2 mit Flag-VDR bzw. b) von Flag-VDR mit MDM2	S.65
Abbildung 14:	AK-Spezifisierung zum Nachweis des endogenen VDR an H1299- und CaCo-Zelllinien	S.67
Abbildung 15:	Transfektion von VDR-Plasmid in H1299-Zellen	S.70

- Abbildung 16:** Transfektion der siRNA's VDR8 & VDR9 in H1299-Zellen zum Knockdown des VDR S.73
- Abbildung 17:** MDM2-Knockdown mittels siRNA bewirkt steigende VDR-Konzentrationen in den H1299-Zellen S.76
- Abbildung 18:** Flag-VDR akkumuliert als Antwort auf die Proteasom-Hemmung in den H1299-Zellen. S.79
- Abbildung 19:** Anstieg des endogenen VDR unter Proteasom-Hemmung in den H1299-Zellen. S.80
- Abbildung 20:** Flag-VDR wird in H1299-Zellen ubiquityliert. S.83
- Abbildung 21:** Behandlung von CaCo-Zellen mit 100nm 1,25D und anschließender qRT-PCR mit den Genen a) *CYP24A1* bzw. b) *SOST DC1* unter Zuhilfenahme des Gens *18S* zur normalisierten Expression. S.87
- Abbildung 22:** Behandlung von H1299-Zellen mit 100nm 1,25D und anschließender qRT-PCR mit den Genen a) *CYP24A1* bzw. b) *SOST DC1* unter Zuhilfenahme des Gens *18S* zur normalisierten Expression. S.88
- Abbildung 23:** MDM2-Knockdown erhöht die Transkriptionslevel des VDR-getriebenen *CYP24A1*-Gens unter 1,25D-Behandlung in H1299-Zellen (unten). Kein Effekt auf die Transkription ersichtlich bei Abwesenheit von 1,25D (oben). MDM2-Knockdown war erfolgreich (Einschub). S.91
- Abbildung 24:** MDM2-Knockdown erhöht die Transkriptionslevel des VDR-getriebenen *CYP24A1*-Gens unter 1,25D-Behandlung in CaCo-Zellen. MDM2-Knockdown war erfolgreich (Einschub). S.92

Abbildung 25: MDM2-Knockdown erhöht die Transkriptionslevel
des VDR-getriebenen *p21*-Gens (*CDKN1A*) unter
1,25D-Behandlung in CaCo-Zellen. S.93

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 2x SDS-Gel-Ladepuffer (Lysepuffer) S.48

Tabelle 2: Reagenzien für die Herstellung von SDS-Gelen S.51

Tabelle 3: Reagenzien des Stripping-Puffers S. 54

Tabelle 4: Reagenzien für die Herstellung des Mastermixes pro Ansatz S. 59

Tabelle 5: Reagenzien für die Herstellung des Mastermixes für die qRt-PCR S. 61

X. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Ralf Mueller bedanke ich mich für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Roemer bedanke ich mich besonders für die Bereitstellung des klinisch und wissenschaftlich höchstinteressanten Themas, die gute Betreuung der praktischen Arbeiten im Labor, die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation, für seine Hilfestellungen, Diskussionsbereitschaft und die humorvollen Gespräche, welche mir oft die Arbeit erleichterten.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe des José Carreras Zentrums für Immun- und Gentherapie des Universitätsklinikum des Saarlandes für die herzliche Arbeitsatmosphäre, die hervorragende und kompetente Betreuung und die einmalige Hilfestellung und Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Kristina Heyne für die beispiellose Betreuung, Unterstützung, Einweisung in die Methodiken der Laborarbeit und die humorvollen und liebevollen Gespräche während der gesamten Zeit der Dissertation.

Weiterhin bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Birgitt Bette und Frau Heike Palm für die kompetente, verantwortungsbewusste und zuverlässige Einweisung in die verschiedensten Bereiche der Laborarbeit. Mein Dank geht ebenfalls an Frau Sandra Reichrath, Frau Maria Kemele, Frau Gabi Carbon und Frau Evi Regitz.

Bei Prof. Dr. Jörg Reichrath und dem gesamten Team der Dermatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes bedanke ich mich für die Möglichkeit der Durchführung meiner qRT-PCR.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester. Erstgenannten für das Ermöglichen meines Studiums, die schier unendliche Geduld, Fürsorge und Unterstützung während dieser Dissertation; meiner Schwester für die stete Motivation, Fürsorge und humorvollen Aufmunterungen. Die Unterstützung dieser Personen hat mir erst die Anfertigung der Dissertation ermöglicht.