

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Science

**Die Charakterisierung des Oxytocin-Rezeptor-Systems
in der Haut**

**Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie**

vorgelegt von
Alisa Gruschka



Hamburg, August 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli bis August 2012 im Labor *Dermatologische Hautpflege* der Beiersdorf AG Hamburg, unter der Leitung von Frau Dr. Gitta Neufang, angefertigt. Die Betreuung durch die HAW Hamburg wurde von Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich übernommen.

1. **Gutachter:** Herr Prof. Dr. Oliver Ullrich, HAW Hamburg
2. **Gutachter:** Frau Dr. Gitta Neufang, Beiersdorf AG Hamburg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Die Charakterisierung des Oxytocin-Rezeptor-Systems in der Haut“ eigenständig, ohne unzulässige fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Hamburg, den 28.08.2012

Alisa Gruschka

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und Funktion der Haut.....	1
1.2	Das Oxytocin-Rezeptor-System.....	2
1.2.1	Aufbau und Funktion.....	2
1.2.2	Aktivierung des Oxytocin-Rezeptor-Systems.....	5
1.2.3	Einfluss von Oxytocin auf das Zellwachstum.....	9
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	Materialien.....	11
2.1	Chemikalien, Lösungen und Reagenzien.....	11
2.2	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	12
2.3	Kits.....	13
2.4	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.5	Geräte.....	14
2.6	Software.....	14
2.7	Zellkulturmedien und Puffer.....	15
3	Methoden.....	17
3.1	Isolierung und Kultivierung von adhärenenten primären Hautzellen.....	17
3.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	18
3.3	Quantitative RT-PCR.....	18
3.3.1	cDNA-Synthese.....	18
3.3.2	TaqMan [®] Real Time-PCR.....	19
3.4	Oxytocin-Rezeptor-Knockdown durch transientes Gen Silencing via siRNA.....	22
3.5	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	23
3.6	Neutralrottest.....	24
3.7	FACS-Messung.....	25
3.8	Messung der Proliferation.....	26

3.9	Statistik.....	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Expression und Verteilung des Oxytocin-Rezeptor-Systems in der Haut	28
4.2	Einfluss von Oxytocin und des Oxytocin-Antagonisten L-371,257 auf die Viabilität primärer Hautzellen	30
4.3	Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors in der Haut	32
4.4	Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation primärer Hautzellen	36
5	Diskussion.....	39
5.1	Das Oxytocin-Rezeptor-System wird von primären Hautzellen exprimiert	39
5.2	Der Oxytocin-Rezeptor ist in der Haut funktional	41
5.3	Oxytocin hemmt die Proliferation primärer Fibroblasten und Keratinozyten	43
6	Zusammenfassung.....	45
7	Literaturverzeichnis.....	46
	Abkürzungsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis.....	III
	Tabellenverzeichnis	IV
	Danksagung	V

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die menschliche Haut bedeckt je nach Körpergröße und -umfang eine Fläche von ca. 1,5-2 m² und stellt ungefähr 15 % der Gesamtkörpermasse dar (Sterry et al., 2010). Die Haut ist somit das größte und schwerste Organ des Menschen. Sie besteht aus den drei Hautschichten Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) (Abbildung 1.1). Die Epidermis bildet als oberste Hautschicht eine Barriere gegen eindringende Mikroorganismen, UV-Strahlung und chemische Einflüsse aus der Umwelt. Der dominierende Zelltyp dieses „mehrschichtigen verhornten Plattenepithels“ ist der Keratinozyt (Sterry, 2011). Unterhalb der Epidermis befindet sich die Dermis, die im Gegensatz zur Epidermis innerviert und vaskularisiert ist. Die wichtigsten Zellen der Dermis sind die Fibroblasten, welche am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Diese netzwerkartige Struktur aus Kollagen und elastischen Fasern bildet den Hauptbestandteil der Dermis und begründet die Flexibilität und Widerstandsfähigkeit der Haut (Sterry, 2011). Weitere Komponenten der Dermis sind wandernde Immunzellen wie Mastzellen und Makrophagen, die zum angeborenen Immunsystem gehören. In der Dermis befinden sich außerdem verschiedene Rezeptoren zur Wahrnehmung von Berührung, Druck, Temperatur und Schmerz. Die Subkutis ist die unterste der drei Hautschichten und besteht aus subkutanem Fett- und Bindegewebe. Sie dient als Energiespeicher, sowie Wärmeisolator (Slominski & Wortsman, 2000 und Sterry et al., 2010).

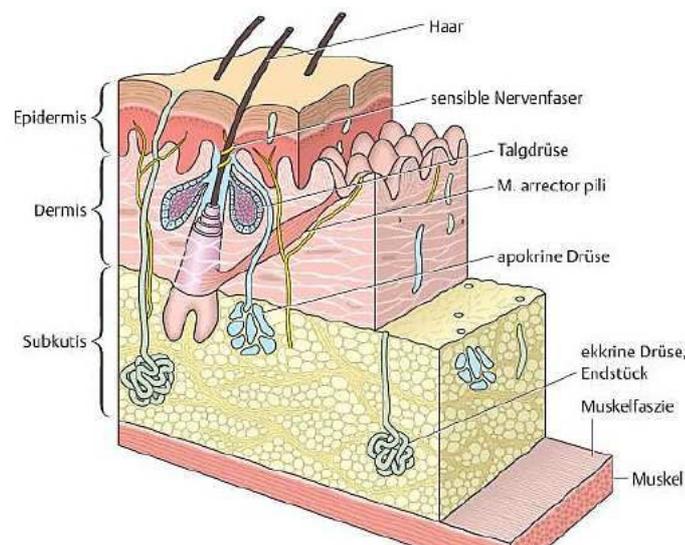


Abbildung 1.1: Aufbau der Haut (Sterry et al., 2010). Die Haut ist in die drei Hautschichten Epidermis, Dermis und Subkutis untergliedert. Die Haut bietet als erste Barriere Schutz gegen Umwelteinflüsse und ermöglicht die Wahrnehmung verschiedener Reize.

1.2 Das Oxytocin-Rezeptor-System

1.2.1 Aufbau und Funktion

Oxytocin ist ein 12,8 kDa großes Nonapeptid, welches aus den neun Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Isoleucin, Glutamin, Asparagin, Cystein, Prolin, Leucin und Glycinamid besteht (Abbildung 1.2, A). Die Cystein-Reste 1 und 6 sind über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden und formen den zyklischen Teil des Hormons (Abbildung 1.2, B) (Vrachnis et al., 2011 und Tom et al., 2009).

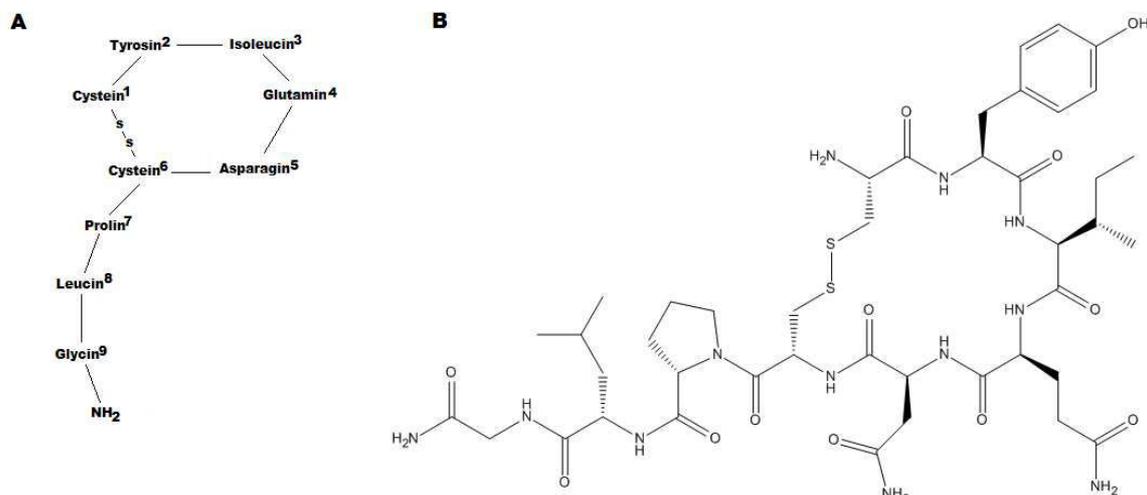


Abbildung 1.2: Die Aminosäurestruktur (modifiziert nach Vrachnis et al., 2011) und die chemische Strukturformel von Oxytocin (Heinis et al., 2009). (A) Oxytocin besteht aus neun Aminosäuren mit einer Disulfidbindung zwischen zwei Cystein Resten, wodurch eine zyklische Form entsteht. (B) Chemische Strukturformel von Oxytocin.

Das Peptidhormon bindet den spezifischen Oxytocin-Rezeptor, der in die Klasse 1 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eingeordnet wird. Das charakteristische dieser Rezeptor-Familie ist der Aufbau aus sieben Transmembran- α -Helices, einem N- und einem C-terminalen Ende, sowie drei extrazellulären und vier intrazellulären Schleifen (Abbildung 1.3) (Ji et al., 1998).

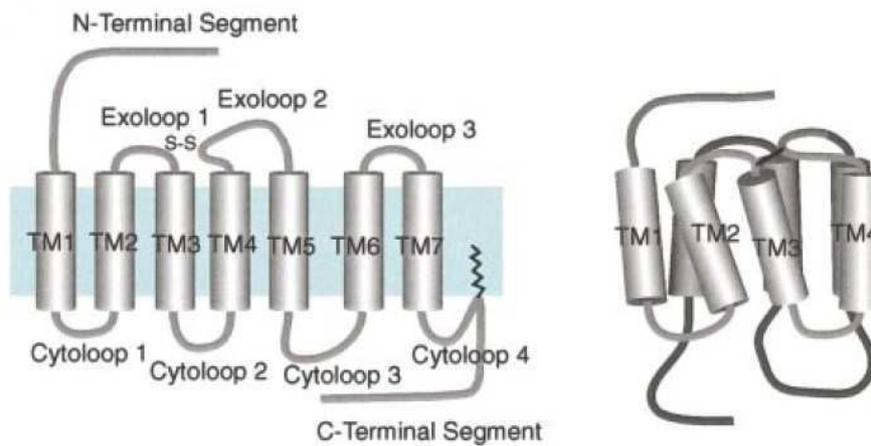


Abbildung 1.3: Struktureller Aufbau eines 7-Transmembran-Rezeptors (Ji et al., 1998). Der Rezeptor besteht aus einem N terminalen und einem C terminalen Segment mit sieben Schleifen, die sowohl in das Zytoplasma als auch in den extrazellulären Raum hineinragen.

Das Oxytocin-Gen befindet sich am Genlocus 20p13 und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Die Exons codieren für das Preprooxytocin, wobei es sich um eine Kopplung von Oxytocin an Neurophysin I handelt (Abbildung 1.4, A). Der Oxytocin-Rezeptor ist ein Polypeptid aus 389 Aminosäuren. Die Erbinformation für den Aufbau des Rezeptors befindet sich am Genlocus 3p25-3p26.2. Das Oxytocin-Rezeptor-Gen umfasst 17 kb und beinhaltet insgesamt vier Exons und drei Introns. Die Transmembran α -Helices des Rezeptors werden von Exon 3 und 4 codiert (Abbildung 1.4, B) (Gimpl & Fahrenholz, 2001 und Tom et al., 2010).

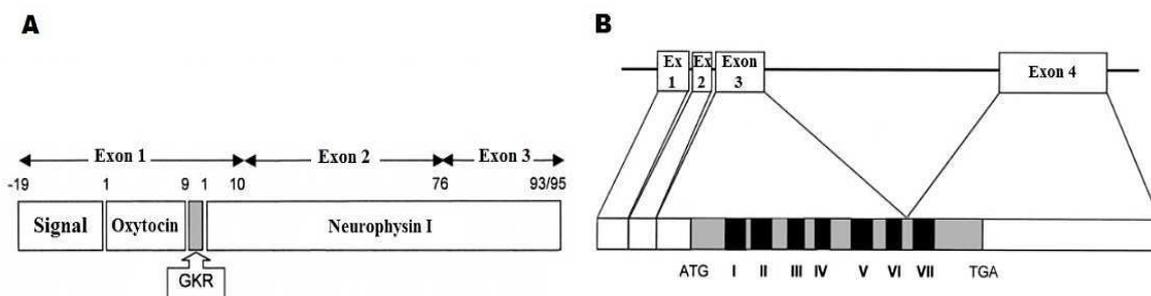


Abbildung 1.4: Genorganisation von Oxytocin und des Oxytocin-Rezeptors (modifiziert nach Gimpl & Fahrenholz, 2001). (A) Exon 1 codiert für die Promotorregion, das Oxytocin, sowie für den ersten Teil des Neurophysins I (Aminosäuren 1-9). Exon 2 und 3 codieren für den restlichen Teil des Neurophysins I, wobei Exon 3 die Information für das COOH terminale Ende trägt (Aminosäuren 77-93/95). Oxytocin und Neurophysin I werden als Preprooxytocin über die Tripeptid Sequenz Gly Lys Arg (GKR) miteinander verbunden. (B) Das Gen, welches für den Oxytocin Rezeptor codiert, befindet sich am Genlocus 3p25-3p26.2 und besteht aus vier Exons. Die Exons 3 und 4 beinhalten die Geninformation für die sieben Transmembrandomänen des Oxytocin Rezeptors (I-VII).

Das Neuropeptid Oxytocin wird in bestimmten Gehirnarealen exprimiert und über magnozelluläre Dendriten ausgeschüttet. Ein großer Anteil der Oxytocin-Produktion erfolgt in magnozellulären Neuronen des paraventriculären und supraoptischen Nukleus des Hypothalamus. Dort wird das Neuropeptid zusammen mit dem Transportprotein Neurophysin I, als Preprooxytocin über Axone in die Neurohypophyse transportiert. Während des Transportes wird das Preprooxytocin so modifiziert, dass sich Oxytocin abspaltet. Dieses wird dann pulsativ in die Blutzirkulation des Körpers abgegeben und gelangt somit in die Peripherie (Gimpl & Fahrenholz, 2001 und Brownstein et al., 1980).

Der Oxytocin-Rezeptor wurde bereits in einer Vielzahl an Geweben, wie z.B. in der Gebärmutter, in der Plazenta, im Gehirn, in den Hoden und im Herzen lokalisiert (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Zu den bekannten Funktionen von Oxytocin gehören unter anderem die Einleitung der Wehen bei der Geburt, durch Stimulation der Uterusmuskulatur, und der Milchspendereflex (Laktation) beim Säugen. Ebenso wurde in Studien belegt, dass Oxytocin eine große Rolle in der Entwicklung von Sozial- und Lernverhalten, Vertrauen und Gedächtnis spielt (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Oxytocin wird umgangssprachlich als „Kuschelhormon“ bezeichnet, da es die emotionale Bindung zwischen Mutter und Kind, sowie zwischen Partnern verstärkt. In Abbildung 1.5 werden die bisher bekannten Wirkungen von Oxytocin auf die Fortpflanzung und das Sozialverhalten des Menschen zusammengefasst.

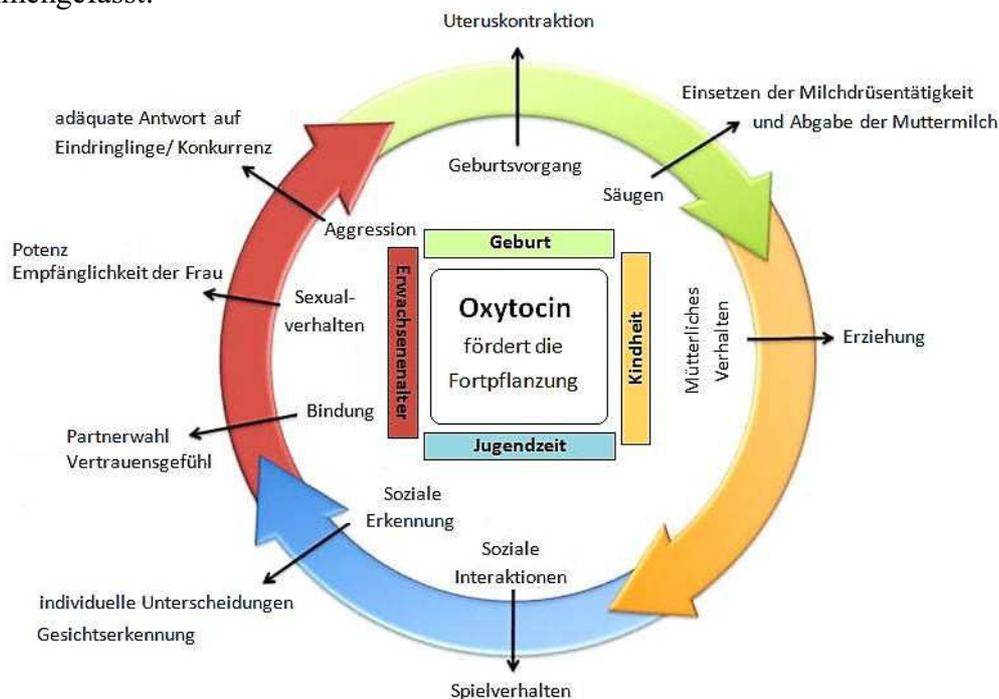


Abbildung 1.5: Wirkungen von Oxytocin auf die menschliche Entwicklung und Fortpflanzung (Lee et al., 2009). Oxytocin spielt nicht nur eine große Rolle bei der Geburt, sondern auch bei der Entwicklung von sozialem Verhalten und Sexualität.

Das Oxytocin-Rezeptor-System ist aufgrund der systemischen Verfügbarkeit von Oxytocin im gesamten Körper relevant. Oxytocin spielt nicht nur in der menschlichen Entwicklung eine wichtige Rolle, sondern ist auch bekannt als Mediator für Wohlbefinden und innere Ruhe (Ishak et al., 2011). Oxytocin ist außerdem in der Lage als Gegenspieler der sogenannten *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse* Anti-Stress-Effekte zu induzieren. Dazu gehört unter anderem die Senkung der Herzfrequenz, des Blutdrucks, sowie die Reduktion von Stresshormonen, wie z.B. Cortisol (Uvnäs-Moberg & Petersson, 2005). Ferner fördert Oxytocin Wundheilungsprozesse, durch dessen antiinflammatorische Wirkung (Detillion et al., 2004 und Iseri et al., 2008).

1.2.2 Aktivierung des Oxytocin-Rezeptor-Systems

Der Oxytocin-Rezeptor wird durch die Bindung von Oxytocin an den Rezeptor aktiviert. Die Kopplung erfolgt über die Interaktion des linearen C-terminalen Segments von Oxytocin, mit der NH₂-terminalen Domäne und der ersten extrazellulären Schleife des Rezeptors. Die Transmembrandomänen II und III des Oxytocin-Rezeptors sind ebenfalls an der Aktivierung beteiligt (Abbildung 1.6) (Postina et al., 1996). Der zyklische Part des Oxytocins bindet an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors und steht in Kontakt mit den Transmembrandomänen III, IV und VI (Gimpl & Fahrenholz, 2001 und Zingg & Laporte, 2003).

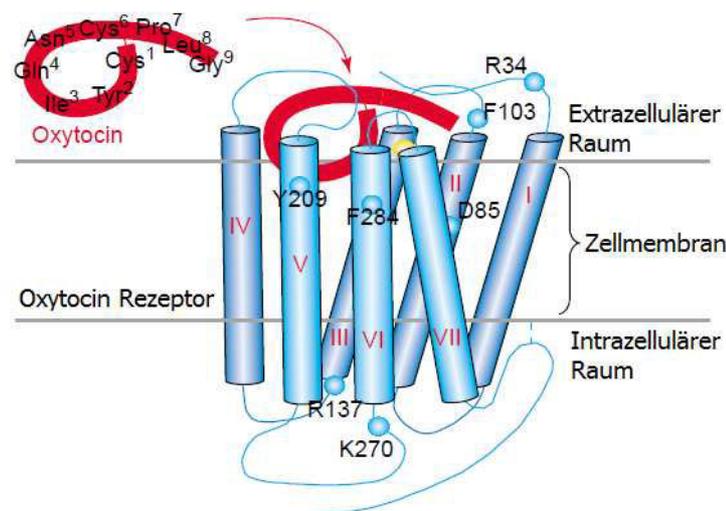


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des Oxytocin-Rezeptors und die Bindung an seinen Liganden Oxytocin (modifiziert nach Zingg & Laporte, 2003). Oxytocin bindet mit dem zyklischen Part an die Transmembrandomänen III, IV und VI und an die zweite extrazelluläre Schleife des Oxytocin Rezeptors. Der lineare C terminale Teil des Oxytocins interagiert mit den Transmembrandomänen II und III sowie der ersten extrazellulären Schleife.

Der Oxytocin-Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR), ist in der Lage das aus den drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaute G-Protein zu aktivieren. Der aus mehreren Schritten bestehende Aktivierungszyklus ist allgemein für GPCRs in Abbildung 1.7 dargestellt:

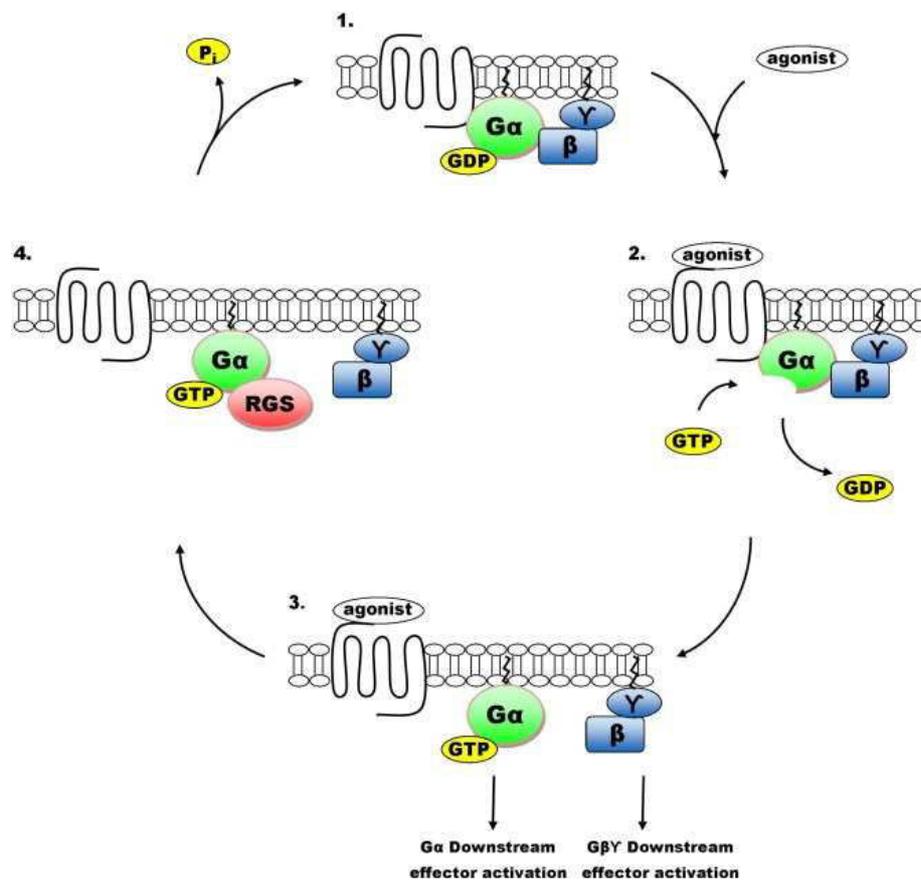


Abbildung 1.7: Aktivierungszyklus eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Bastin & Heximer, 2011). Der GPCR befindet sich im inaktiven Zustand (1). Durch Bindung eines Agonisten wird der Rezeptor aktiviert und tauscht das an die $G\alpha$ Untereinheit gebundene GDP mit GTP aus (2). Das GTP bewirkt eine Konformationsänderung der $G\alpha$ Untereinheit, wodurch diese von der heterodimeren $G\beta\gamma$ Untereinheit dissoziiert und die Signaltransduktion ermöglicht wird (3). RGS Proteine helfen dabei, dass durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i , der inaktive Grundzustand des Rezeptor G Protein Komplexes wiederhergestellt wird (4).

Im inaktiven Zustand ist der GPCR an das heterotrimere G-Protein-gekoppelt, wobei die α -Untereinheit ein GDP gebunden hat (Abbildung 1.7, 1). Lagert sich ein Rezeptor-Agonist an die Bindungsstellen des Rezeptors an, so wird dieser aktiviert und ändert seine Form. Durch die Konformationsänderung fungiert der Rezeptor als *GTP Exchange Factor* (GEF), indem der Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit ermöglicht wird (Abbildung 1.7, 2). Durch die Bindung von GTP wird die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert und ändert ebenfalls ihre Konformation, wodurch diese vom heterodimeren $G\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert (Abbildung 1.7, 3). Die aktivierten Untereinheiten des G-Proteins sind nun in der Lage weitere Signalwege im Zellinneren zu aktivieren (Bastin & Heximer, 2011). Der aktivierte Status wird aufrechterhalten, solange der Agonist an den Rezeptor bindet oder bis dieser durch verschiedene Mechanismen desensibilisiert wird. Die $G\alpha$ -Untereinheit stellt mit Hilfe ihrer GTPase-Aktivität den inaktiven Ausgangszustand des GPCR und dem daran gebunden heterotrimeren G-Protein-Komplex wieder her (Abbildung 1.7, 4). Dazu wird das GTP in GDP und anorganisches Phosphat (P_i) hydrolysiert und die $G\alpha$ -Untereinheit reassoziert mit dem $G\beta\gamma$ -Komplex. Die Dauer des aktivierten Zustands der $G\alpha$ -Untereinheit wird durch direkte Bindung von sogenannten *regulators of G protein signaling* (RGS)-Proteinen kontrolliert. Diese treiben die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit voran (Bastin & Heximer, 2011 und Alberts et al., 2012).

Die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine lassen sich in die vier Familien G_s , G_i , G_q und G_{12} kategorisieren. Der Oxytocin-Rezeptor besitzt die Affinität sowohl an $G\alpha_{q/11}$ -Proteine, als auch an $G\alpha_s$ oder $G\alpha_i$ -Proteine zu koppeln (Abbildung 1.8) (Viero et al., 2010). Mitglieder der Familie der *stimulatory G proteins* (G_s), z.B. $G\alpha_s$, aktivieren die Adenylylcyclase und stimulieren die Produktion von cAMP. Die $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_i$ und $G\alpha_0$ gehören zu der Gruppe der *inhibitory G proteins* (G_i) und sind in der Lage durch Steuerung der Ionen-Kanäle die Adenylylcyclase zu inhibieren, welches die cAMP-Produktion herabsenkt. $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ gehören zu den G_q -Proteinen. Diese aktivieren die Phospholipase C- β und setzen dadurch den Inositol-Phospholipid-vermittelten Signalweg in Gang. Die Folge ist ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Alberts et al., 2012).

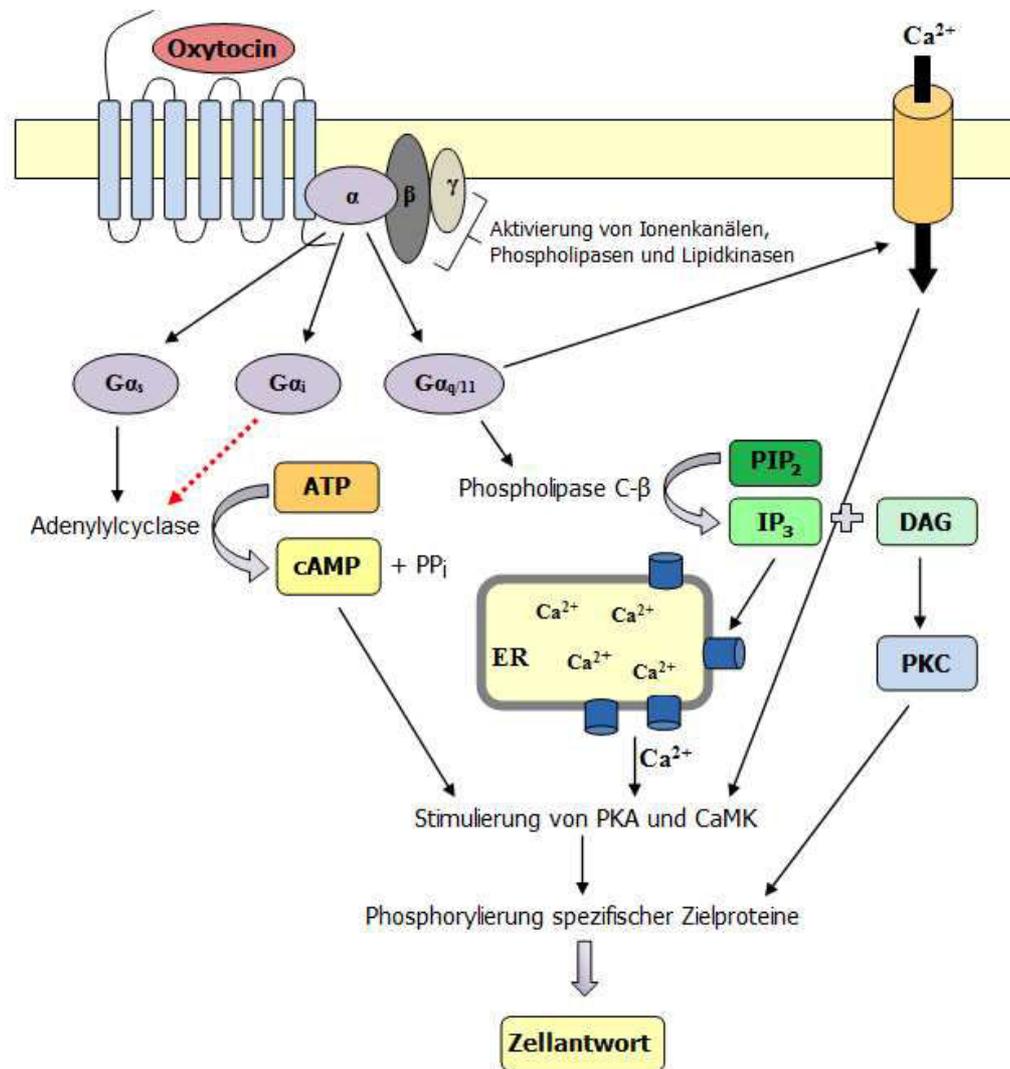


Abbildung 1.8: Signalwege des Oxytocin-Rezeptors (erstellt nach Viero et al., 2010). Bindet Oxytocin an den Oxytocin Rezeptor werden $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ oder $G\alpha_{q/11}$ vermittelte Signalwege aktiviert. $G\alpha_{q/11}$ aktiviert die Phospholipase C β welche PIP_2 zu IP_3 und DAG hydrolysiert. Gleichzeitig öffnet $G\alpha_{q/11}$ Ca^{2+} Kanäle in der Membran und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. IP_3 bindet an den IP_3 Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und verursacht die Freisetzung von gespeichertem Ca^{2+} . Als Folge der erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wird PKA und CaMK aktiviert, welche wiederum die Phosphorylierung spezifischer Zielproteine bewirken und dadurch Regulationsprozesse in Gang setzen. Das $G\alpha_s$ Protein aktiviert die Adenylcyclase, welche vermehrt cAMP aus ATP bildet und dadurch die cAMP Konzentration in der Zelle erhöht. Dieser Mechanismus wird durch das $G\alpha_i$ Protein inaktiviert. Die schwarzen Pfeile symbolisieren eine Aktivierung, der rote gestrichelte Pfeil hingegen eine Inaktivierung. ATP Adenosintriphosphat; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; PP_i anorganisches Diphosphat; PIP_2 = Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat; IP_3 Inositol 1,4,5 trisphosphat; DAG Diacylglycerin; PKC = Proteinkinase C; PKA Proteinkinase A; CaMK Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase.

1.2.3 Einfluss von Oxytocin auf das Zellwachstum

Oxytocin hat je nach Zelltyp und -art unterschiedliche Effekte auf die Zellproliferation (Gimpl & Fahrenholz, 2001). So wird Oxytocin beispielsweise in Osteoblasten mit dem Wachstum von Knochenzellen in Verbindung gebracht (Copland et al., 1999). Ferner wirkt Oxytocin bei Zellen aus der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC), sowie bei menschlichen Gebärmuttermuskelzellen stimulierend auf die Zellproliferation (Cattaneo et al., 2008 und Thibonnier et al., 1999). Bei Tumoren der glatten Muskulatur (Leiomyomen) wurde dieser Effekt ebenfalls beobachtet (Busnelli et al., 2010). In Nierenepithelzellen aus dem Hund (MDCK), sowie in menschlichen Brustkrebszelllinien zeigt Oxytocin hingegen einen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum (Rimoldi et al., 2003 und Cassoni et al., 1994).

Die gegensätzlichen Wirkungen von Oxytocin auf die Proliferation, lassen sich auf das Vorhandensein unterschiedlicher Signalwege bzw. die Kopplung an verschiedene G-Proteine zurückführen. Den proliferativen Effekt übt Oxytocin über den $G\alpha_{q/11}$ -vermittelten Signalweg, den anti-proliferativen Effekt über den $G\alpha_i$ -vermittelten Signalweg aus (Viero et al., 2010). Wann welcher Signalweg aktiv ist, wird durch verschiedene Faktoren, die teilweise noch unbekannt sind, beeinflusst. Laut Rimoldi et al. (2003) wird die Affinität des Oxytocin-Rezeptors zu verschiedenen G-Proteinen von Zelltyp und Lokalisation beeinflusst. Befindet sich der Oxytocin-Rezeptor in speziellen Membraneinstülpungen, den Caveolae, bindet dieser mit höherer Affinität an $G\alpha_{q/11}$ -Proteine (Abbildung 1.9, A) (Guzzi et al., 2002). Als Folge wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die über Bildung von Diacylglycerin zur Aktivierung der Proteinkinase C führt. Die Proteinkinase C wiederum führt zu der vorübergehenden Phosphorylierung der *mitogen-activated Protein* (MAP)-Kinasen ERK 1 und 2. Damit einhergehend wird die Zellproliferation stimuliert. Ist der Oxytocin-Rezeptor hingegen außerhalb der Caveolae lokalisiert, bindet dieser mit höherer Affinität an $G\alpha_i$. Diese Kopplung führt entweder durch die Aktivierung des Zellzyklus-Regulators p21 oder über den Einfluss der Proteinkinase A zur Hemmung des Zellwachstums (Abbildung 1.9, B) (Tom et al., 2010 und Rimoldi et al., 2003).

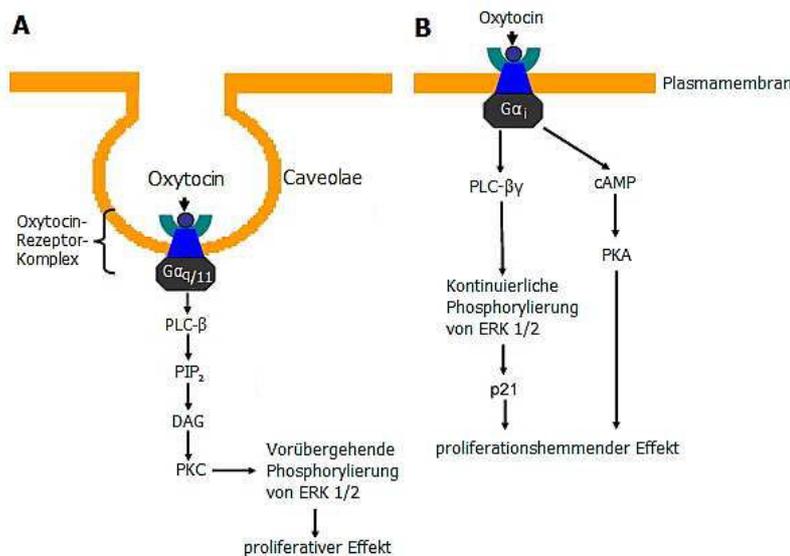


Abbildung 1.9: Einfluss der Lokalisation des Oxytocin-Rezeptors auf die Bindung von G-Proteinen (modifiziert nach Tom et al., 2010). (A) Befindet sich der Oxytocin Rezeptor in einer Membraneinstülpung (Caveolae), bindet der Rezeptor an $G\alpha_{q/11}$. Es wird eine Signalkaskade ausgelöst, bei welcher die PLC β aus PIP $_2$ DAG hydrolysiert. Die DAG aktiviert die PKC, welche zur vorübergehenden Phosphorylierung von ERK 1/2 führt, wodurch ein proliferativer Effekt hervorgerufen wird. (B) Außerhalb der Caveolae koppelt der Oxytocin Rezeptor an $G\alpha_i$ und kann über zwei Signalwege die Proliferation hemmen. Der erste Weg führt durch die Aktivierung der PLC $\beta\gamma$ zu einer anhaltenden Phosphorylierung von ERK 1/2. Als Folge wird der Zellzyklus Regulator p21 aktiviert, welcher als Inhibitor Cyclin abhängiger Kinasen das Zellwachstum hemmt. Eine weitere Möglichkeit ist die Hemmung des Zellwachstums über die PKA, welche durch eine erhöhte cAMP Konzentration aktiviert wird. PLC $\beta/\beta\gamma$ Phospholipase C $\beta/\beta\gamma$; PIP $_2$ Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat; DAG Diacylglycerin; PKC Proteinkinase C; ERK 1/2 *extracellular signal related kinases* 1 und 2; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA Proteinkinase A.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Oxytocin-Rezeptor-System wurde bereits in der Peripherie in verschiedenen Organen detektiert und untersucht. Bis auf die jüngst erschienene Publikation von Denda et al. (2012), in der erstmals die Expression von Oxytocin bei Keratinozyten gezeigt wurde, ist noch nichts zum Oxytocin-Rezeptor-System in der Haut bekannt. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob der Oxytocin-Rezeptor und sein Ligand in der Haut exprimiert werden. Ist dies der Fall sollte der Rezeptor weitergehend mittels FACS-Analyse auf seine Funktionalität geprüft werden. Es ist bereits bekannt, dass Oxytocin auf das Zellwachstum bestimmter Zelltypen proliferationsfördernd oder -hemmend wirkt (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Dies könnte besonders relevant sein für diverse Hautkrankheiten wie Psoriasis oder atopische Dermatitis, bei denen eine fehlregulierte Zellproliferation eine Rolle spielt (Guttman-Yassky et al., 2011). Deswegen sollte außerdem der Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation von Hautzellen untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
Albumin, bovines (Fraktion V) (BSA)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfidoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dispase-II (2 U/ml PBS)	Roche, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
DMEM (25 mM Hepes gepuffert)	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ^{+/+}	Life Technologies, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz (Österreich)
GlutaMax TM -I (100x)	Life Technologies, Darmstadt
Ionomycin (in DMSO gelöst)	Merck, Darmstadt
Keratinocyte Basal Medium-2 (KBM [®] -2) w/o Ca ²⁺	Lonza, Basel (Schweiz)
KGM [®] -2 SingleQuots [®]	Lonza, Basel (Schweiz)
L-371,257 (in DMSO gelöst)	Tocris, Bristol (UK)
Lipofectamine [®] 2000 Transfection Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Lipofectamine [®] RNAiMAX Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Neutralrot	Life Technologies, Darmstadt
Opti-MEM [®] I + GlutaMax TM -I	Life Technologies, Darmstadt
OXTR Silencer (Pre-designed siRNA) ID 1766	Life Technologies, Darmstadt
Oxytocin (in Wasser gelöst)	Tocris, Bristol (UK)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin (5000 U/mL)	Life Technologies, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies, Darmstadt
PLURONIC [®] F-127	Merck, Darmstadt

Probenecid	Life Technologies, Darmstadt
Signal Silence [®] Control siRNA (Unconjugated)	Cell Signal Technology, Danvers (USA)
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Linz (Österreich)

2.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Primärantikörper	Bestellnr.	Wirt	Verdünnung	Hersteller
OXT (monoklonal)	LS-C37953	Maus	1:300	LSBio
OXTR (polyklonal)	-	Meerschweinchen	1:150	Eurogentec
NPH (polyklonal)	SC-7809	Ziege	1:50	Santa Cruz
Sekundärantikörper	Bestellnr.	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor [®] 488 Anti-Maus IgG	A- 11029	Ziege	1:1000	Life Techn.
Alexa Fluor [®] 488 Anti-Meerschweinchen IgG	A-11073	Ziege	1:1000	Life Techn.
Alexa Fluor [®] 488 Anti-Ziege IgG	A-21467	Huhn	1:800	Life Techn.

Tabelle 2.3: Fluoreszierende Farbstoffe für die FACS-Analyse

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Fluo-4, AM	F 14201	Life Technologies, Darmstadt
Fura Red [™] , AM	F 3021	Life Technologies, Darmstadt

2.3 Kits

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan [®] High-Capacity cDNA RT Kit	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan [®] Gene Expression Assays	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 2.5: TaqMan[®] Gene Expression Assays

Zielgen	Primer-Artikelnummer
18s	Hs99999901_s1
OXT	Hs00792417_g1
OXTR	Hs00168573_m1

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.6: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Kammern mit Borosilikat-Glasböden (Lab-Tek [®])	Nunc Brand, Langenselbold
n-Loch Kulturplatten (CELLSTAR [®])	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petri-Schalen (10 cm) (CELLSTAR [®])	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Probenröhrchen (50 ml) (Falcon [®])	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipetten (BD Falcon [™])	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturflaschen (185 cm ²)	Nunc Brand, Langenselbold

2.5 Geräte

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
7900 HT Fast Real-Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt
FACS-Gerät BD FACS CANTO™	BD Bioscience, San Jose (USA)
Mikroskop Axio Observer Z.1	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Mikrotiterplatten-Photometer SpectraMax Plus	Molecular Devices, Ismaning
PCR-Gerät Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific, Langenselbold
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore, Darmstadt
Spectrophotometer Nanodrop 2000	PeqLab, Erlangen
Zellzählpipette Scepter™	Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1. OR	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Langenselbold

2.6 Software

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Software

Bezeichnung	Hersteller
Axiovision Version 4.7	Zeiss, Göttingen
BD FACSDiva™	BD Bioscience
FlowJo 7.2.1	BD Bioscience
GraphPad Prism 5	GraphPad, San Diego (USA)
KS400 Version 3.0	Zeiss, Göttingen
ND-1000 V 3.3.0	PeqLab, Erlangen
RQ-Manager 1.2	Life Technologies GmbH, Darmstadt
SDS 2.3 Analysis Software	Life Technologies GmbH, Darmstadt
SoftMax® Pro Version 2.0.1	Molecular Devices, Ismaning

2.7 Zellkulturmedien und Puffer

- **DMEM-Medium für primäre Fibroblasten**

DMEM low Glucose (1 g/l) mit L-Glutamin und Pyruvat

Zusätze:

- 10 % v/v FCS
- 10 µg/ml GlutaMax™-I
- 50 U/ml Penicillin G
- 50 µg/ml Streptomycinsulfat

- **Einfriermedium für Fibroblasten**

- 70 % DMEM high Glucose (4,5 g/l), ohne Zusätze
- 20 % FCS
- 10 % DMSO

- **Einfriermedium für Keratinozyten**

- 50 % KBM-2 (w/o Ca²⁺), ohne Zusätze
- 40 % FCS
- 10 % DMSO

- **FACS-Färbelösung**

in Waschpuffer ansetzen

- 3 µg/ml Fluo-4, AM
- 10 µg/ml Fura Red™, AM
- 0,02 % PLURONIC® F-127
- 4 mM Probenicid

- **KGM®-2 -Medium für primäre Keratinozyten (0,1 mM Ca²⁺)**

KBM®-2 (w/o Ca²⁺)

Zusätze (KGM®-2 SingleQuots®):

- Bovine Pituitary Extract (BPE)
- Human Epidermal Growth Factor (hEGF)
- Insulin
- Hydrocortison

Transferrin

Adrenalin

Gentamycin, Amphotericin-B

- **Messpuffer**

DPBS (enthält $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

Zusatz: 10 % v/v FCS

- **Opti-MEM[®]-Medium für die Transfektion**

Opti-MEM[®] mit GlutaMax[™]-I

- **Propidiumiodid-Färbelösung (Zellkernfärbung)**

0,5 ml Ethanol (100 %)

2 ml PBS

12,5 µl Propidiumiodid (2,5 mM)

- **Stopplösung**

PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

Zusatz: 10 % v/v FCS

- **Waschpuffer**

PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

Zusatz: 10 % v/v FCS

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung von adhärennten primären Hautzellen

Zur Gewinnung von Hautzellen, wurden Keratinozyten und Fibroblasten aus Hautbiopsiematerial isoliert. Die Hautbiopsien wurden zunächst von überschüssigem Fett und Haaren befreit und in ca. 0,5 cm große Hautstücke zerteilt. Um die Kultivierung unter sterilen Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Hautstücke ca. 2 sek in 70 %-igen Ethanol desinfiziert und dann mit PBS gewaschen. Die Hautstücke wurden danach in eine Dispase-Lösung überführt und entweder im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht oder im Brutschrank bei 37 °C für drei Stunden inkubiert. Der Dispase-Verdau bewirkt die Trennung der Epidermis von der Dermis, indem die Dispase Fibronectin und Kollagen IV spaltet (Schmitz, 2007).

Nach dem Dispase-Verdau wurde die Epidermis von der Dermis abgezogen. Aus der Epidermis wurden die primären Keratinozyten und aus der Dermis die primären Fibroblasten gewonnen. Die Keratinozyten wurden aus der Epidermis durch Zugabe von Trypsin gelöst und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Dermisstücke wurden in einer 6-Loch-Platte verteilt und nach dem Antrocknen in DMEM-Medium kultiviert. Die Fibroblasten wuchsen über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen aus den in den 6-Loch-Platten adhärennten Dermisstücken heraus und wurden dann in Zellkulturflaschen expandiert.

Die Kultivierung der Primärzellen erfolgte in 185 cm² großen Zellkulturflaschen bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 7 %. Die Keratinozyten wurden in KBM-2-Medium und die Fibroblasten in DMEM-Medium bis zu einer 80 %-igen Konfluenz kultiviert. Zellen, die erst für spätere Versuche verwendet wurden, wurden in Einfriermedium zunächst bei -80 °C eingefroren und nach drei Tagen bei -168 °C gelagert. Die Durchführung der zellkulturtechnischen Arbeiten erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung. Alle Arbeitsmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert.

3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy[®] Mini Kit 250 (Qiagen) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Um die Menge an Gesamt-RNA zu ermitteln, wurde die Adsorption bei 260 und 280 nm mit dem UV-Spektrophotometer Nano-Drop N-100 gemessen. Der Quotient aus beiden Wellenlängen gibt den Reinheitsgrad der Probe an und liegt bei einer reinen RNA-Lösung bei 2,0.

3.3 Quantitative RT-PCR

3.3.1 cDNA-Synthese

Als Reverse Transkription wird die Umschreibung der isolierten RNA in die sogenannte *complementary DNA* (cDNA) bezeichnet. Sie wurde mit Hilfe des TaqMan[®] High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kits (Life Technologies) durchgeführt.

Eine wichtige Komponente für die Umschreibung ist die Reverse Transkriptase. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet die isolierte RNA als Matritze zur Herstellung der zum RNA-Strang komplementären DNA (cDNA). Die Oligo-dT-Primer sorgen dafür, dass die Reverse Transkriptase direkt am Poly-A-Ende des Matritzenstranges bindet. Die dNTPs dienen dabei als Nukleotidbausteine zur Strangsynthese. Als Matritze für die Umschreibung wurden 20 ng/μl RNA in einem Volumen von 12,5 μl pro Probe eingesetzt und mit 12,5 μl Mastermix gemischt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Pipettierschema des Mastermixes für die Reverse Transkription

Reagenz	Volumen pro Probe
10X RT Puffer	2,5 μl
25X dNTP Mix (100 mM)	1 μl
10X RT Random Primers	2,5 μl
Reverse Transkriptase (50 U/μl)	1,25 μl
RNase-freies Wasser	5,25 μl
Summe	12,5 μl

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des Arktik Thermal Cyclers (Thermo Scientific), nach den in Tabelle 3.2 angegebenen Bedingungen. Die Proben wurden nach der Umschreibung entweder direkt für die TaqMan[®] Real Time-PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.2: Programm für die Reverse Transkription

Zeit	Temperatur
10 min	25 °C
120 min	37 °C
5 min	85 °C
∞	4 °C

3.3.2 TaqMan[®] Real Time-PCR

Die TaqMan[®] Real Time-PCR (RTq-PCR) basiert auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion. Die Methode ermöglicht die Quantifizierung der relativen mRNA-Konzentration über Messung der Fluoreszenz in Echtzeit. Für die Reaktion wurden 20 ng cDNA, sequenzspezifische *forward*- und *reverse*-Primer, sowie eine TaqMan[®]-Sonde eingesetzt. Die Sonde trägt am 5'-Ende den Reporterfarbstoff Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende einen sogenannten Quencher. Das RTq-PCR-Programm wurde mit den in Tabelle 3.3 angegebenen Temperaturschritten durchgeführt und in 40 Zyklen wiederholt.

Tabelle 3.3: RTq-PCR-Programm

Zeit	Temperatur
2 min	50 °C
10 min	95 °C
15 sek	95 °C
1 min	60 °C

In Abbildung 3.1 ist das allgemeine Prinzip der TaqMan[®] Real Time-PCR dargestellt. Solange die Sonde intakt ist, findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Dies hat zur Folge, dass das vom Reporterfarbstoff Fluorescein gesendete Fluoreszenzsignal durch die Anwesenheit des Quenchers gelöscht wird. Nach Anlagerung der Sonde an eine spezifische Sequenz zwischen den Primern, wird die Sonde während der Amplifikationsphase der DNA abgebaut (Abbildung 3.1). Dieser Abbau wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase hervorgerufen. Der Quencher wird infolgedessen vom Reporterfarbstoff räumlich getrennt und kann dessen Fluoreszenzsignal nicht mehr löschen. Durch die Freisetzung von immer mehr Reporter-Molekülen, steigt das Fluoreszenzsignal pro Zyklus proportional zur Menge an Zielprodukt in der Probe an (Heid et al., 1996).

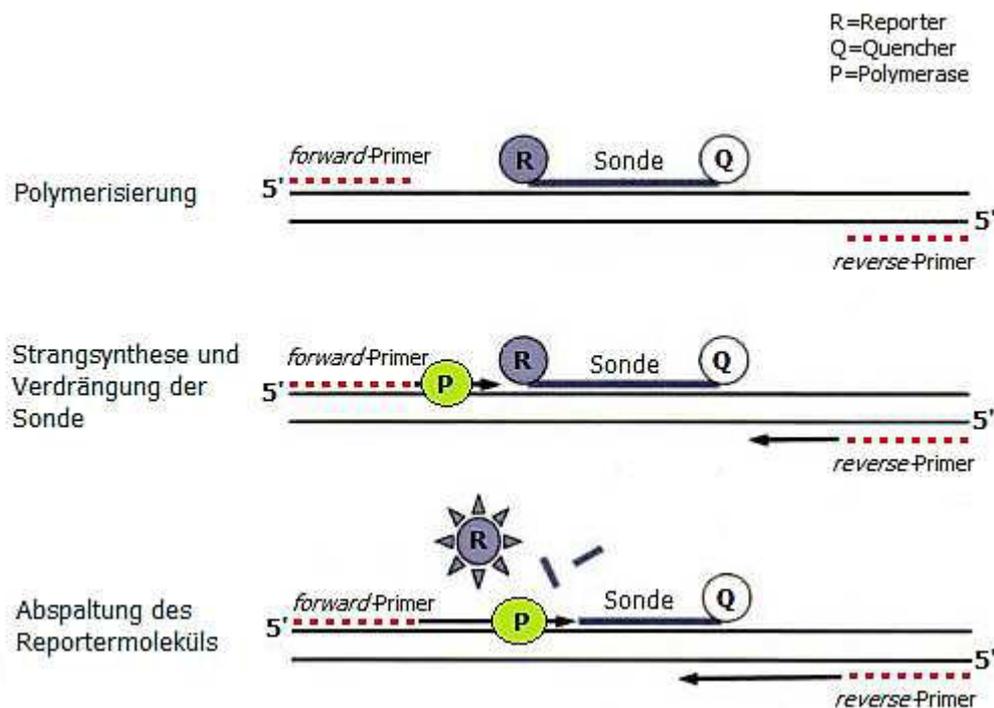


Abbildung 3.1: Anwendungsprinzip der TaqMan[®]-Sonde zur Quantifizierung der TaqMan[®] RTq-PCR (modifiziert nach Ganten & Ruckpaul, 2003). Die Sonde trägt einen Reporterfarbstoff und einen Quencher. Wird der Quencher vom Reporter durch die 5' 3' Exonuklease Aktivität der Polymerase abgetrennt, wird ein Fluoreszenzsignal induziert.

Die Quantifizierung bei der TaqMan[®] Real Time-PCR beruht auf der Messung des sogenannten C_T -Wertes (*Threshold cycle*). Dieser Wert spiegelt die Anzahl an Zyklen wider, die benötigt wird, bis die freigesetzte Fluoreszenz des Reporter-Moleküls einen definierten Schwellenwert überschreitet (Abbildung 3.2). Es gilt je niedriger der C_T -Wert, desto schneller wurde der Schwellenwert erreicht und desto höher ist die Ausgangskonzentration der Zielsequenz in der Probe. Dies bedeutet, dass das Gen mit dem niedrigsten C_T -Wert am stärksten exprimiert wird. Als endogene Kontrolle wurde 18S-rRNA verwendet. Dieses ist ein Gen, welches in einer konstanten Menge exprimiert wird und sich zu einer Erstellung einer Standardkurve eignet. Mit Hilfe der endogenen Kontrolle wurde die Menge der in den Proben befindlichen Zielsequenz mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode errechnet (Mülhardt, 2006 und Gibson et al., 1996).

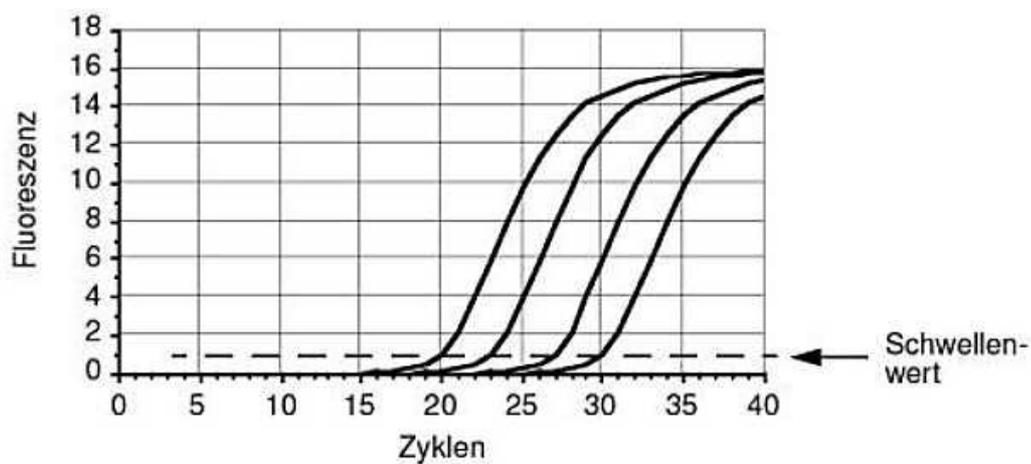


Abbildung 3.2: Ermittlung des C_T -Wertes bei der RTq-PCR (Mülhardt, 2006). Die Abbildung zeigt beispielhaft die gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragenen Fluoreszenzkurven von vier Proben. Je geringer der C_T Wert, desto höher ist die Menge an Zielsequenz in der Probe.

3.4 Oxytocin-Rezeptor-Knockdown durch transientes Gen Silencing via siRNA

Die Methode des Gen-Knockdowns eignet sich zur funktionellen Analyse von Genen. Durch den Knockdown ist es z.B. möglich die Einflüsse zu untersuchen, die durch die Runterregulierung des Gens in der Zelle hervorgerufen werden. Der Knockdown wird mit einer *small interfering RNA* (siRNA) durchgeführt, die eine zum Zielgen komplementäre Sequenz trägt. Durch die Kopplung der siRNA an den *RNA-induced silencing complex* (RISC), wird die Bindung der siRNA an die mRNA des Zielgens ermöglicht. Die Nuklease-Aktivität des Riboprotein-Komplexes führt daraufhin zur Degradierung dieser mRNA, sodass diese nicht mehr abgelesen werden kann und das Gen nicht mehr exprimiert wird (Mülhardt, 2006).

Für den Oxytocin-Rezeptor-Knockdown wurden Fibroblasten mit 20 nM und Keratinozyten mit 50 nM siRNA in 10 cm großen Petri-Schalen transfiziert. Die verwendete siRNA (siOXTR) trägt eine zum Oxytocin-Rezeptor-Gen komplementäre Sequenz. Als Kontroll-siRNA (siKontrolle) wurde die Signal Silence[®] Control siRNA (Cell Signal Technology) verwendet. Dies ist eine siRNA, deren Sequenz unspezifisch ist und die daher keine mRNA-Degradierung zur Folge haben sollte. Für Keratinozyten wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] 2000 und für Fibroblasten Lipofectamine[®] RNAiMAX verwendet. Pro Petri-Schale wurden 4,75 µl Transfektionsreagenz in Opti-MEM[®]-Medium angesetzt.

3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung von Oxytocin, Neurophysin I und des Oxytocin-Rezeptors bei Fibroblasten und Keratinozyten, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden Primärantikörper ausgewählt, die in der Lage sind spezifisch an die gesuchten Antigene zu binden. An die Primärantikörper binden wiederum Sekundärantikörper, an denen ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Abbildung 3.3). Dieser Farbstoff wird bei einer definierten Wellenlänge angeregt zu fluoreszieren, wodurch die Verteilung von Oxytocin, Neurophysin I und des Oxytocin-Rezeptors in den Zellen sichtbar wird.

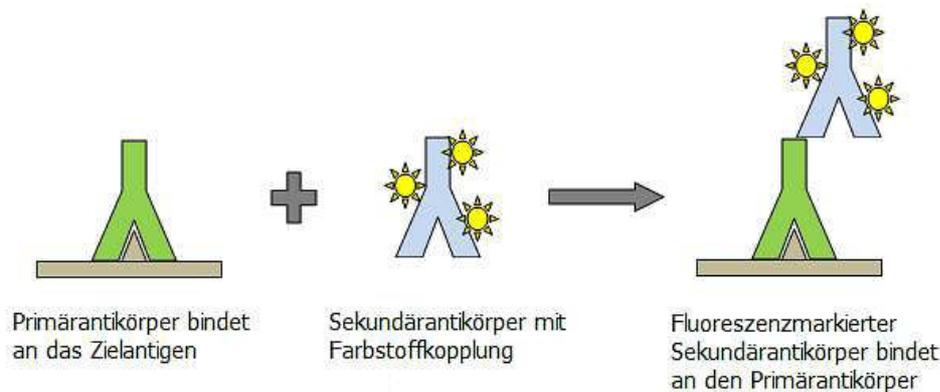


Abbildung 3.3 : Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung. Der Sekundärantikörper ist mit einem Farbstoff gekoppelt und bindet an den Primärantikörper, der an das Zielantigen gebunden hat. Durch Anregung des Farbstoffes mit Licht einer definierten Wellenlänge, werden die Strukturen sichtbar gemacht.

Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden 10.000 Zellen in Kammern mit Glasböden (Lab-Teks[®]) ausgesät und bis zur Adhärenz kultiviert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS für 15 min bei RT fixiert. Durch eine 10-minütige Behandlung mit 0,1 % Triton[™] X-100 in PBS, wurden die Zellmembranen für die anstehende Antikörperfärbung permeabilisiert. Nach einem Waschschriff mit PBS folgte das Blocken unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen mit 3 % BSA in PBS für eine Stunde bei RT. Der primäre Antikörper wurde in 1 % BSA in PBS angesetzt und nach dem Blocken zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte in den Lab-Teks[®] bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT mit DAPI (Zellkernfärbung), sowie dem sekundären Antikörper inkubiert. Beides wurde in 1 % BSA in PBS angesetzt. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen können der Tabelle 2.2 im Materialteil entnommen werden. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop Axio Observer Z.1 (Zeiss).

3.6 Neutralrottest

Mittels Neutralrottest wurden die Konzentrationen der Substanzen für die FACS-Messung und den Proliferationsversuch auf ihre zytotoxische Wirkung untersucht. Das Ergebnis des Neutralrottestes ist ein Maß für die Viabilität der Zellen. Der Farbstoff Neutralrot gelangt als schwaches Kation über nicht-ionische Diffusion durch die Zellmembran und lagert sich in den Lysosomen vitaler Zellen an. In den Lysosomen herrscht ein saures Milieu, wodurch der Farbstoff „zum Ion wird“ und folglich die Lysosomen nicht mehr verlassen kann. Die Zelle wird dadurch rot angefärbt (Borenfreund & Puerner, 1984). In Zellen, die durch die Behandlung in ihrer Viabilität beeinträchtigt wurden, ist die Neutralrotaufnahme durch Beschädigungen der Lysosomenstruktur vermindert. Tote Zellen weisen keine funktionierenden Lysosomen mehr auf und werden nicht angefärbt. Die Absorptionsspektren der Zellen wurden bei 540 nm gemessen. Die Messwerte geben Aufschluss darüber, inwiefern die Zellen durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen in ihrer Viabilität beeinträchtigt wurden.

Für den Neutralrottest wurden 15.000 Zellen pro Kavität in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Alle 24 Stunden wurden die Zellen mit Oxytocin, DMSO und dem Oxytocin-Antagonisten L-371,257 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Behandlung der Fibroblasten und Keratinozyten mit Oxytocin erfolgte in den Konzentrationsstufen 1, 10, 100 und 1000 nM. Zusätzlich zu den genannten Konzentrationen wurden die Keratinozyten mit 10 µM Oxytocin behandelt. Beide Zelltypen wurden außerdem mit L-371,257 in den Konzentrationsstufen 10, 100 und 1000 nM sowie 10 µM inkubiert. Da der Oxytocin-Antagonist L-371,257 in DMSO gelöst vorlag, wurde als Kontrolle ebenso eine Konzentrationsreihe mit DMSO mitgeführt. Nach dem Entfernen des Mediums folgte ein Waschschrift der Zellen mit DPBS und die Zugabe der Neutralrotfärbelösung. Diese setzt sich zusammen aus der Neutralrotstammlösung (200 mg/50 ml dH₂O), die mit 25 mM HEPES gepuffertem DMEM-Medium 1:80 verdünnt wird. Die Inkubation erfolgte über zwei Stunden bei 37 °C. Die überschüssige Färbelösung wurde durch dreimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 100 µl essigsäurem Alkohol pro Kavität für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Das Fixativ wurde zu 50 % aus reinen Ethanol, zu 49 % aus dH₂O und zu 1 % aus reiner Essigsäure (Eisessig) angesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde die Neutralrotkonzentration mittels SpectraMax Plus bei 540 nm gemessen.

3.7 FACS-Messung

Die Abkürzung FACS steht für *fluorescence-activated cell sorting* und beschreibt eine spezielle Anwendung der Durchflusszytometrie. Mit der Durchflusszytometrie wird die Sortierung von Zellen aus einer Zellsuspension gemäß ihrer zelltypischen Charakteristika wie Form und Größe ermöglicht. Bei der FACS-Messung werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und hinsichtlich der Menge und Art an gebundenem Farbstoff getrennt. Das Messprinzip basiert laut Herzenberg et al. (1976) auf dem Prozess der *hydrodynamischen Fokussierung*, wobei die Zellen den Laser in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl einzeln passieren. Der Laser regt die fluoreszenzmarkierten Zellen zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge an, welches von Detektoren gemessen wird. Die FACS-Messung wurde eingesetzt, um die Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors durch Oxytocin zu untersuchen. Über Fluoreszenzmarkierung wurde der Ca^{2+} -Flux im Zytosol der Zelle nach Substanzzugabe gemessen. Eine Sortierung der Zellen wurde hierbei nicht vorgenommen. Die Messung wurde mit dem BD FACS CANTO™ (BD Bioscience) durchgeführt.

Für die FACS-Messung wurden Keratinozyten und Fibroblasten in 10 cm große Petri-Schalen bis zu einer 80-90 %-igen Konfluenz kultiviert. Vor dem Start der Messung wurden die Zellen für 20 min mit der FACS-Färbelösung im Schüttelbad gefärbt. Die FACS-Färbelösung enthält die fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren Fluo-4 und Fura Red™. Fura Red™ färbt die gesamte Zelle an und dient als Referenz. Fluo-4 färbt die Zelle hingegen erst nach Aktivierung durch die Wirksubstanz an, indem es an das einströmende Ca^{2+} bindet und dadurch seine Fluoreszenz ändert. Die Kombination beider Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht eine ratiometrische Messung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration nach Lipp et al. (1993). Dadurch können Schwankungen der Gesamtfarbstoff- und intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgeglichen werden (Lipp & Niggli, 1993).

Nach dem Färbevorgang wurde die Zellsuspension mit Waschpuffer gewaschen und in Messpuffer aufgenommen. Die Anregung der fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren erfolgte bei 488 nm. Als Positivkontrolle wurde 4,2 μM Ionomycin verwendet. Ionomycin ist ein Ca^{2+} -Ionophor, welches den Ca^{2+} -Influx in die Zelle erleichtert und dadurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Der Oxytocin-Rezeptor-Knockdown wurde 72 Stunden vor der FACS-Messung durchgeführt. Die Zugabe des Oxytocin-Antagonisten

L-371,257 erfolgte ohne Inkubationszeit unmittelbar vor der Messung. Alle Messdaten wurden auf die sogenannte *Baseline* normiert. Diese charakterisiert das „Grundrauschen“ bei Messung der unbehandelten Probe. Nach Zugabe der verschiedenen Oxytocin-Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1000 nM, wurde der Ca^{2+} -Strom über einen Zeitraum von 25 sek gemessen. Die Messdaten wurden mit der Software FlowJo 7.2.1 (BD Bioscience) ausgewertet.

3.8 Messung der Proliferation

Der Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation primärer Hautzellen, wurde durch die repetitive Behandlung mit Oxytocin- und Oxytocin-Antagonist untersucht. Dafür wurden die Primärzellen in 96-Loch-Platten ausgesät und im Intervall von 24 Stunden mit Oxytocin und L-371,257 behandelt. Für den Behandlungszeitraum von 96 Stunden wurden 500 Zellen pro Kavität und für den Behandlungszeitraum von 168 Stunden (nur bei Fibroblasten) 250 Zellen pro Kavität ausgesät. Die Behandlung der Fibroblasten erfolgte mit Oxytocin in den Endkonzentrationsstufen 1, 10 und 100 nM. Die Keratinozyten wurden mit 10 und 100 nM, sowie 1 und 10 μM Oxytocin inkubiert. In einem getrennten Ansatz wurden zu 1, 10, 100 und 1000 nM Oxytocin zusätzlich 1 μM des Oxytocin-Antagonisten L-371,257 als Negativkontrolle pipettiert. Die verschiedenen Ansätze erfolgten für Fibroblasten in DMEM-Medium und für Keratinozyten in KBM-2-Medium. Das Gesamtvolumen betrug pro Kavität 200 μl . Um die Zellen durch den täglichen Mediumwechsel nicht zusätzlich zu stressen, wurde vor jeder Behandlung 100 μl Medium abgenommen und 100 μl zweifach-konzentrierter Ansatz hinzu pipettiert.

Die Zählung der adhärennten Primärzellen wurde mit dem Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss) und der Software KS 400 Version 3.0 (Zeiss) durchgeführt. Dazu wurden die Zellkerne mit Propidiumiodid fixiert, gefärbt und bei 590 nm vermessen.

3.9 Statistik

Für die graphische Darstellung der Daten wurde das arithmetische Mittel mit Standardfehler verwendet. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Daten mittels *Kolmogorov-Smirnov-Test* auf Normalverteilung geprüft. Lag eine Normalverteilung vor, wurden die Daten mittels gepaarter bzw. ungepaarter t-Tests ausgewertet. Waren die Daten nicht normal verteilt, wurden diese mittels *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest* bzw. mit dem *Mann-Whitney-Test* ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Verteilung des Oxytocin-Rezeptor-Systems in der Haut

Für die grundlegende Untersuchung, ob und in welcher Menge Oxytocin und dessen Rezeptor in primären Hautzellen exprimiert werden, wurden Expressionsdaten erhoben. Als dominierender Zelltyp der Dermis wurden Fibroblasten und als Hauptvertreter der Epidermis Keratinozyten ausgewählt und deren RNA mittels RTq-PCR untersucht. Im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Verena Deing (noch nicht veröffentlicht, 2012) lagen hierzu erste Expressionsdaten vor, die mit Erhöhung der Spenderzahl ergänzt wurden.

Die Daten der RTq-PCR zeigen, dass das Peptidhormon Oxytocin und der Oxytocin-Rezeptor sowohl bei Keratinozyten, als auch bei Fibroblasten detektierbar sind (Abbildung 4.1). Bei Fibroblasten wird der Oxytocin-Rezeptor signifikant 1000-fach stärker exprimiert als bei Keratinozyten (Abbildung 4.1, A). Die Genexpressionslevel von Oxytocin sind hingegen in beiden Zelltypen nahezu gleich (Abbildung 4.1, B).

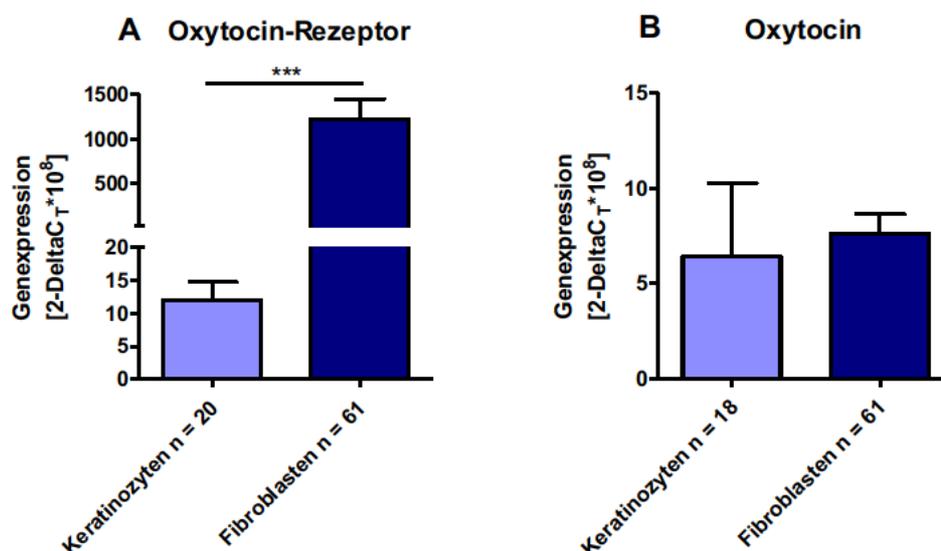


Abbildung 4.1: Genexpression von Oxytocin und des Oxytocin-Rezeptors in primären Hautzellen. Mittels RTq-PCR wurden die C_T Werte gemessen und die Genexpression ermittelt. (A) Die Expression des Oxytocin Rezeptors ist bei Fibroblasten signifikant 1000-fach stärker als bei Keratinozyten (***) P<0.001). (B) Das Oxytocin Gen wird sowohl bei Fibroblasten als auch bei Keratinozyten auf gleichem Niveau exprimiert.

Zur Lokalisation von Oxytocin, Neurophysin I und des Oxytocin-Rezeptors in Hautzellen, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Bei Fibroblasten ist der Oxytocin-Rezeptor flächig diffus in der Zelle verteilt, (Abbildung 4.2, A). Die Verteilung des Oxytocin-Rezeptors bei Keratinozyten zeigt ein anderes Bild. Hier wird eine faserige Struktur mit einer deutlichen Konzentrierung des Oxytocin-Rezeptors um den Zellkern sichtbar (Abbildung 4.2, B). Die Immunfluoreszenz-Färbung von Oxytocin zeigt sowohl bei Fibroblasten, als auch bei Keratinozyten eine diffuse zytoplasmatische Verteilung (Abbildung 4.2, A und B). Neurophysin I ist hingegen in beiden Zelltypen punktuell im Zytosol lokalisiert.

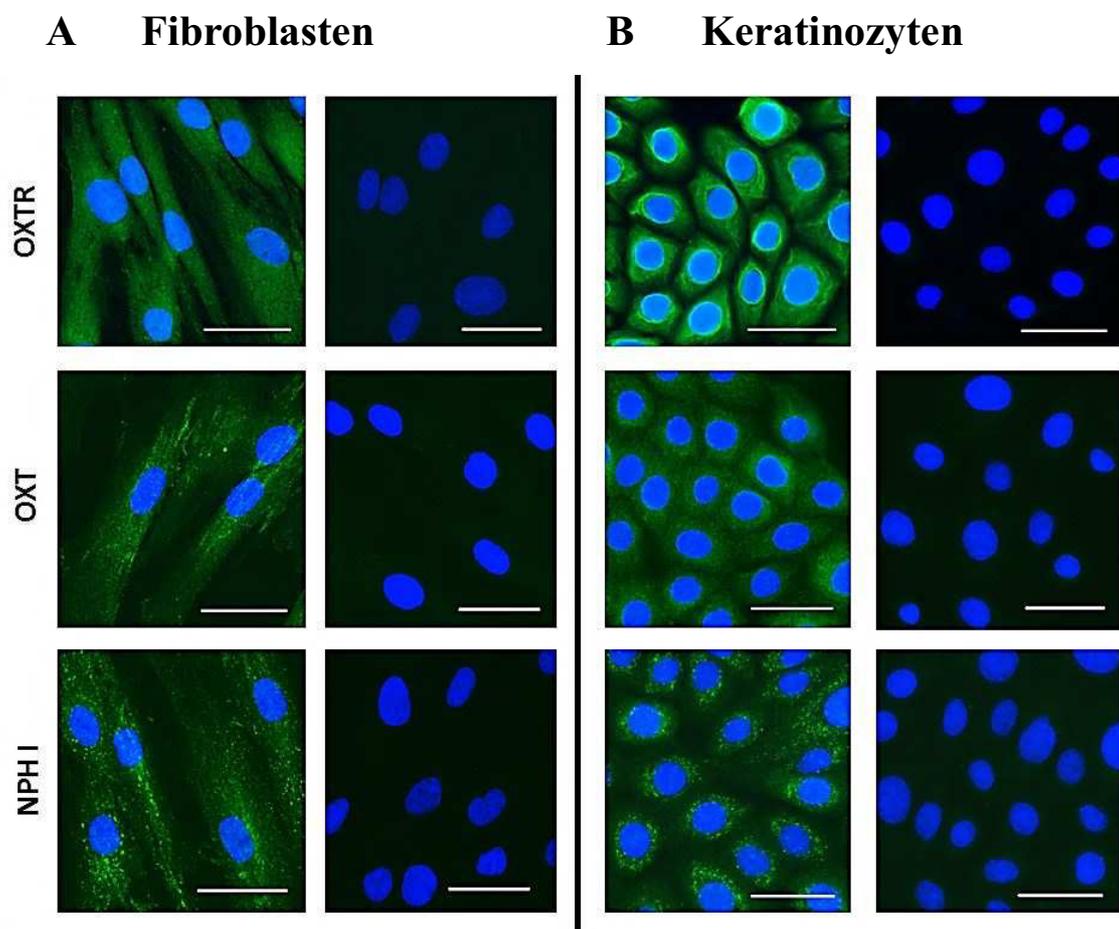


Abbildung 4.2: Lokalisation und Verteilung von Oxytocin, Neurophysin I und des Oxytocin-Rezeptors in primären Hautzellen. Der Oxytocin Rezeptor ist bei Fibroblasten flächig diffus in der Zelle verteilt (A). Bei Keratinozyten scheint der Oxytocin Rezeptor mit einer faserigen Struktur assoziiert zu sein und ist vermehrt um den Zellkern lokalisiert. Oxytocin zeigt in beiden Zelltypen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung, während Neurophysin I sowohl bei Fibroblasten (A), als auch bei Keratinozyten (B) punktuell im Zytosol verteilt ist. Für die Zellkernfärbung (blau) wurde DAPI 1:1000 verdünnt eingesetzt. Zur Lokalisation von Oxytocin, Neurophysin I und des Oxytocin Rezeptors wurden Sekundärantikörper mit einem Emissionsspektrum bei 488 nm (grün) verwendet. Die zweite und vierte Spalte zeigt die entsprechenden Negativkontrollen. Bei diesen erfolgte keine Inkubation mit dem primären Antikörper. OXTR Oxytocin Rezeptor, OXT Oxytocin, NPH I Neurophysin I. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 50 µm.

4.2 Einfluss von Oxytocin und des Oxytocin-Antagonisten L-371,257 auf die Viabilität primärer Hautzellen

Zur Untersuchung der Viabilität von Fibroblasten und Keratinozyten wurde ein Neutralrottest durchgeführt. Mit diesem Test wurden die einsetzbaren Konzentrationen von Oxytocin, des Oxytocin-Antagonisten L-371,257, sowie dessen Lösungsmittel DMSO für die Folgeversuche ermittelt. Nach 24-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der genannten Substanzen, wurde die Viabilität der Zellen gemessen. Diese lässt auf die Toxizität der eingesetzten Konzentrationen schließen, wodurch optimale Versuchsbedingungen geschaffen werden können. Substanzen, die die Viabilität um nicht mehr als 10 % einschränken, wurden als nicht toxisch eingestuft, da die dazugehörigen Messwerte im Schwankungsbereich des Tests liegen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Konzentrationen von 1 nM bis 1000 nM Oxytocin die Viabilität von Fibroblasten nicht einschränken (Abbildung 4.3, A). Ebenso ist der Einsatz von 10 nM bis 1000 nM L-371,257 ohne negativen Einfluss auf die Zellviabilität möglich (Abbildung 4.3, B). Ab einer Konzentration von 10 µM L-371,257 verringert sich die Zellviabilität um 7 %. Dieser Effekt ist jedoch nicht auf den Oxytocin-Antagonisten L-371,257, sondern auf dessen Lösungsmittel DMSO zurückzuführen. Bei einer Konzentration von 10 µM DMSO ist ein Abfall der Zellviabilität um 11 % zu beobachten (Abbildung 4.3, B). Die Eigenschaft von DMSO, die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen, begründet dessen zytotoxische Wirkung bei höheren Konzentrationen. Die Permeabilisierung der Membran führt zu einer Änderung des pH-Wertes und erhöht den osmotischen Stress, wodurch die Homöostase der Zellen gestört wird (Schmitz, 2007). Der Oxytocin-Antagonist wurde aus diesem Grund in den Folgeversuchen nur bis zu einer Konzentration von 1000 nM eingesetzt.

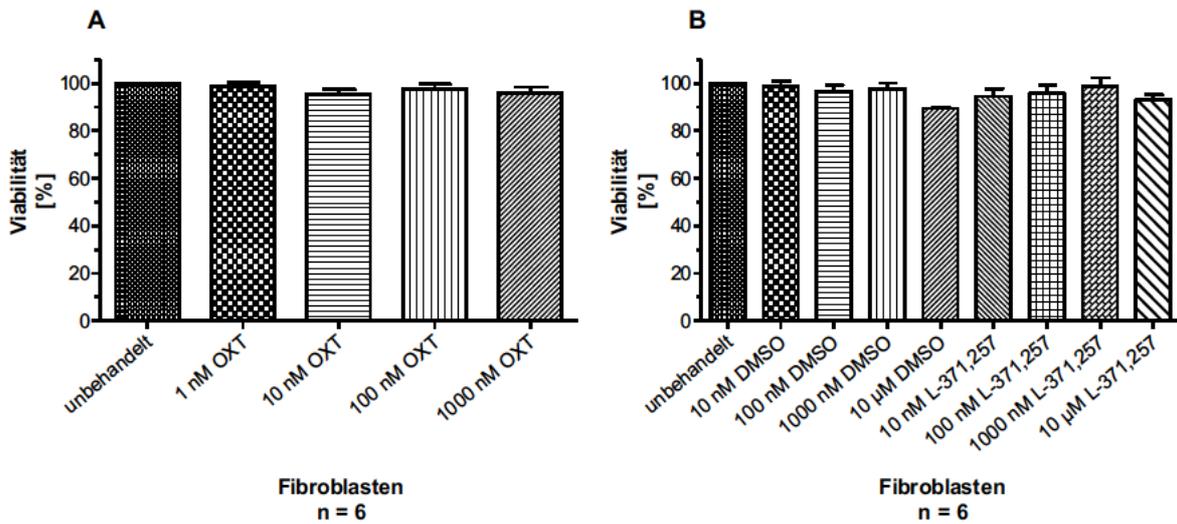


Abbildung 4.3: Viabilitätsmessung bei Fibroblasten. (A) Oxytocin Konzentrationen von 1 nM bis 1000 nM führen zu keiner negativen Beeinflussung der Zellviabilität. (B) Der Oxytocin Antagonist L 371,257 kann bis zu einer Konzentration von 1000 nM ohne Verringerung der Viabilität eingesetzt werden. Ab einer Konzentration von 10 µM L 371,257 wirkt dessen Lösungsmittel DMSO zytotoxisch und die Viabilität sinkt um 11 %.

Der Neutralrottest wurde ebenfalls mit Keratinozyten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Oxytocin in den Konzentrationen von 1 nM bis 10 µM nicht zu einem Viabilitätsverlust der Zellen führt (Abbildung 4.4, A). Die Behandlung der Keratinozyten mit 1000 nM DMSO zeigt hingegen einen Abfall der Viabilität um 10 %. Dieser Trend bestätigt sich allerdings bei höheren Konzentrationen nicht und spiegelt sich auch nicht bei einer Konzentration von 1000 nM L-371,257 wider (Abbildung 4.4, B). Die Messwerte befinden sich zudem im Schwankungsbereich. Daher ist der Einsatz von DMSO und des Oxytocin-Antagonisten L-371,257 in den Konzentrationsstufen 10 nM bis 10 µM als unbedenklich einzustufen.

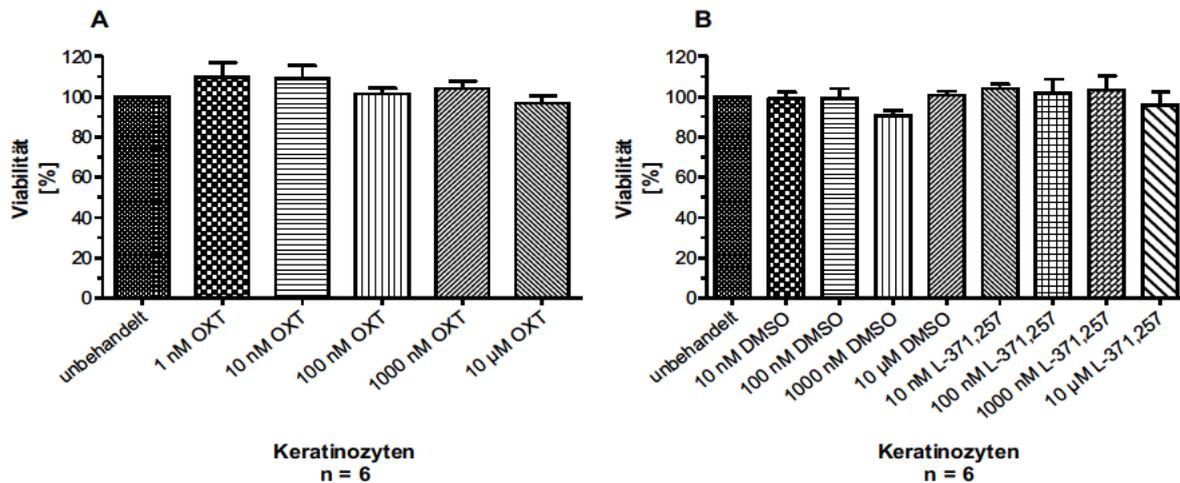


Abbildung 4.4 : Viabilitätsmessung bei Keratinozyten. (A) Die getesteten Konzentrationen von 1 nM bis 10 µM OXT setzten die Viabilität der Zellen nicht herab. (B) Konzentrationen von bis zu 10 µM des Oxytocin Antagonisten L 371,257 führen ebenfalls nicht zu einer verringerten Zellviabilität. Es können daher alle getesteten Konzentrationen für Folgeversuche eingesetzt werden.

4.3 Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors in der Haut

Es ist bekannt, dass der Oxytocin-Rezeptor an verschiedene G-Protein-Subtypen assoziiert und somit unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren kann. Koppelt der aktivierte Oxytocin-Rezeptor z.B. an den $G_{\alpha_{q/11}}$ -Subtyp, führt dies zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Viero et al., 2010). Dieser Ca^{2+} -Strom ist ein Maß für die Aktivierbarkeit des Rezeptors und ist mittels FACS-Analyse messbar. Da der Oxytocin-Rezeptor in primären Hautzellen erfolgreich detektiert werden konnte, sollte überprüft werden, ob dieser in Fibroblasten und Keratinozyten aktivierbar und somit funktional ist. Dafür wurden Fibroblasten und Keratinozyten mit unterschiedlichen Oxytocin-Konzentrationen inkubiert und der Ca^{2+} -Strom in den Zellen mit dem BD FACS CANTO™ (BD Bioscience) gemessen.

Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch den Ca^{2+} -Strom in Fibroblasten im Grundzustand (*Baseline*), nach Behandlung mit $4,2 \mu\text{M}$ Ionomycin, sowie nach Zugabe von 100 nM Oxytocin. Werden die Zellen nicht stimuliert, findet kein Ca^{2+} -Strom in der Zelle statt. Dieses wird durch die *Baseline* dargestellt, die nahezu waagrecht verläuft. Sie charakterisiert das „Grundrauschen“ der Messung und wird zur Normierung herangezogen. Werden die Zellen mit $4,2 \mu\text{M}$ Ionomycin behandelt, steigt der Ca^{2+} -Strom in der Zelle rapide an. Ionomycin ist ein Ca^{2+} -Ionophor und wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Als interne Kalibrierung gibt Ionomycin den maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Strom an. Die Behandlung der Zellen mit 100 nM Oxytocin zeigt, dass der Oxytocin-Rezeptor aktiviert werden kann und einen Ca^{2+} -Strom in der Zelle bewirkt.

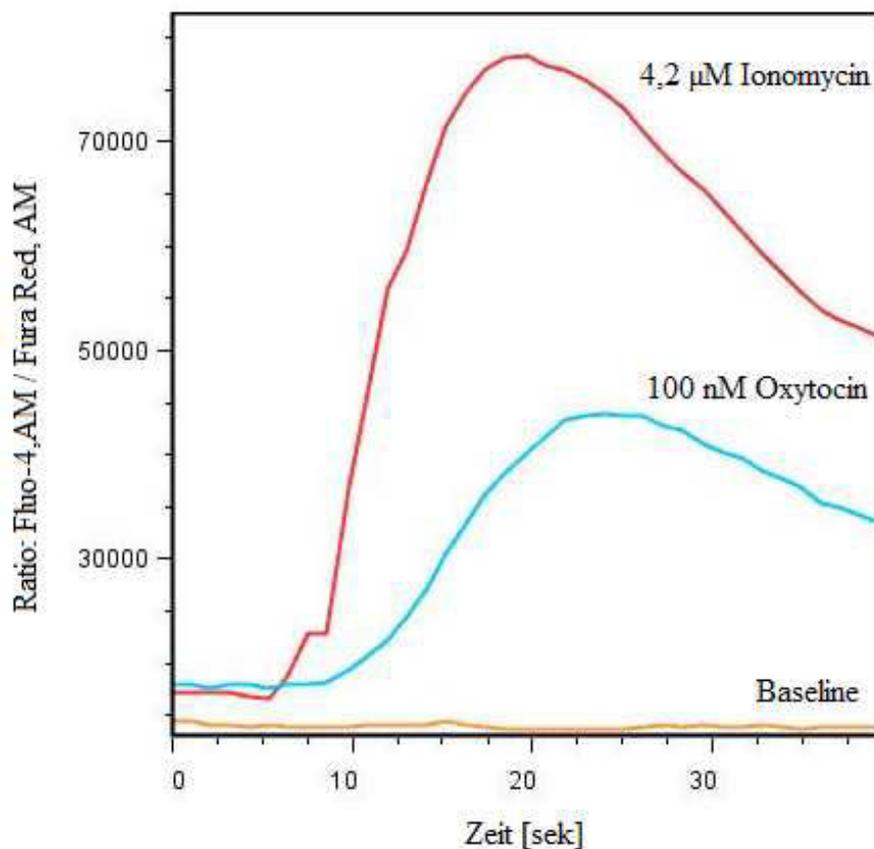


Abbildung 4.5: Kinetik des Ca^{2+} -Stroms bei Fibroblasten nach Behandlung mit 100 nM Oxytocin. Die *Baseline* stellt den Grundzustand in den Zellen ohne Substanzbehandlung dar. Ionomycin wurde als Positivkontrolle eingesetzt und ist in der Lage die Ca^{2+} Konzentration intrazellulär innerhalb weniger Sekunden sehr schnell ansteigen zu lassen. Oxytocin führt zu einer Aktivierung des Oxytocin Rezeptors und bewirkt den Anstieg an Ca^{2+} im Cytoplasma. Aufgetragen wurde das Verhältnis von Fluo 4 zu Fura Red™ in Abhängigkeit von der Zeit. Die Zugabe der Substanzen erfolgte ca. nach 7 sek.

Bei Fibroblasten ist eine deutliche Dosis-abhängige Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors durch Oxytocin messbar (Abbildung 4.6, A). Die siKontrolle zeigt nach Inkubation mit 1 nM Oxytocin im Vergleich zur *Baseline* lediglich einen 1,1-fachen und nach Inkubation mit 10 nM Oxytocin einen 1,3-fachen Anstieg des Ca^{2+} -Stroms. Werden die Fibroblasten hingegen mit 100 nM Oxytocin behandelt, steigt der messbare Ca^{2+} -Strom jedoch auf das 1,8-fache der Signalhöhe der *Baseline* an. Darüber hinaus wurde nach Zugabe von 1000 nM Oxytocin ein 2,1-facher Anstieg des Ca^{2+} -Stroms gegenüber der *Baseline* gemessen.

Als Spezifitätskontrolle für den Ca^{2+} -Strom wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown des Oxytocin-Rezeptors (siOXTR) durchgeführt, sowie der Oxytocin-Antagonist L-371,257 eingesetzt. Wird der Rezeptor durch den siRNA-vermittelten Knockdown herunterreguliert, bzw. seine Aktivierung durch den Oxytocin-Antagonisten blockiert, befindet sich der Ca^{2+} -Strom auf dem Niveau der *Baseline* (Abbildung 4.6, A und B). Beide Kontrollen bestätigen somit, dass der Ca^{2+} -Strom spezifisch für die Aktivierung des Oxytocin-Rezeptors durch Oxytocin ist.

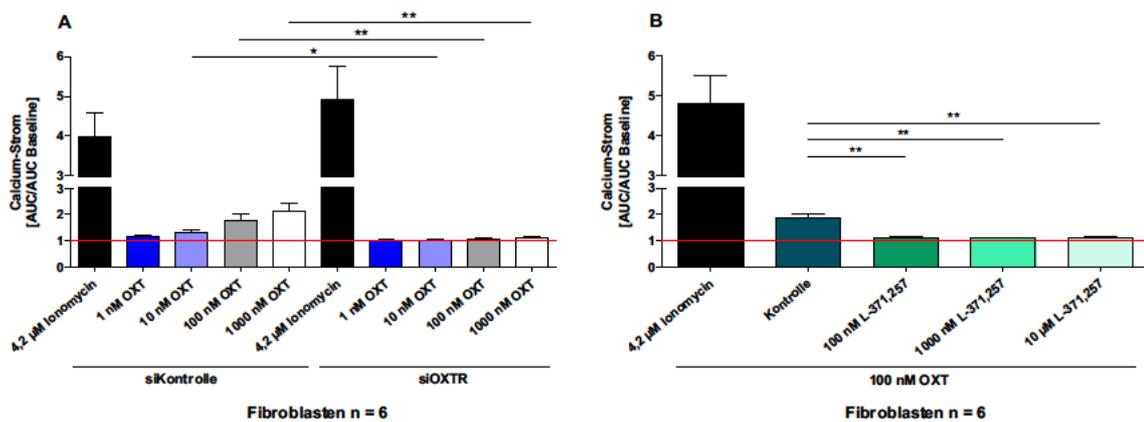


Abbildung 4.6: Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors bei Fibroblasten. (A) Der Oxytocin Rezeptor ist Dosis abhängig aktivierbar. Der Oxytocin Rezeptor Knockdown bestätigt die Spezifität des Ca^{2+} Stroms (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). (B) Der Oxytocin Antagonist L 371,257 blockiert die Aktivierung des Oxytocin Rezeptors durch Oxytocin und beweist dadurch die Spezifität des Ca^{2+} Stroms. (** $P < 0,01$). Als Positivkontrolle wurde 4,2 µM Ionomycin verwendet. Die *Baseline* wird durch die rote Linie symbolisiert. Die Skalierung der Y Achse gibt das Verhältnis des Ca^{2+} Stroms der unbehandelten Probe, normiert auf den Ca^{2+} Strom der *Baseline* wieder. Der Y Achsen Wert stellt die Aktivierbarkeit des Oxytocin Rezeptors dar. AUC = *Area under the Curve* (siehe Abbildung 4.5).

Bei Keratinozyten ist der Oxytocin-Rezeptor durch Oxytocin ebenfalls aktivierbar. Im Vergleich zu den Fibroblasten fällt die Aktivierbarkeit allerdings bei höheren Oxytocin-Konzentrationen schwächer aus und die gemessenen Ca^{2+} -Ströme weisen eine verminderte Dosis-Wirkungs-Beziehung auf (Abbildung 4.7, A). Die Behandlung der Keratinozyten mit 1 nM Oxytocin zeigt einen 1,4-fachen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gegenüber der *Baseline* und erhöht sich überdies durch Zugabe von 10 nM Oxytocin auf ein 1,6-faches. Die Behandlung der Keratinozyten mit 100 nM, sowie 1000 nM Oxytocin führt lediglich ebenfalls zu einem ca. 1,6-fachen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur *Baseline* (Abbildung 4.7, A).

Als Kontrolle für die Spezifität des Ca^{2+} -Stroms, wurde analog zu den Fibroblasten ein siRNA-vermittelter Knockdown (siOXTR) bei Keratinozyten durchgeführt. Die siKontrolle zeigt bei Keratinozyten eine 20 % geringere Signalthöhe der gemessenen Ca^{2+} -Ströme im Vergleich zu den Ca^{2+} -Strömen der unbehandelten Kontrolle. Darüber hinaus ist kein deutlicher Unterschied zwischen der siKontrolle und dem Oxytocin-Rezeptor-Knockdown in der Aktivierbarkeit messbar (Abbildung 4.7, B). Die Methode des siRNA-vermittelter Knockdowns eignet sich daher bei Keratinozyten nicht als Spezifitätskontrolle.

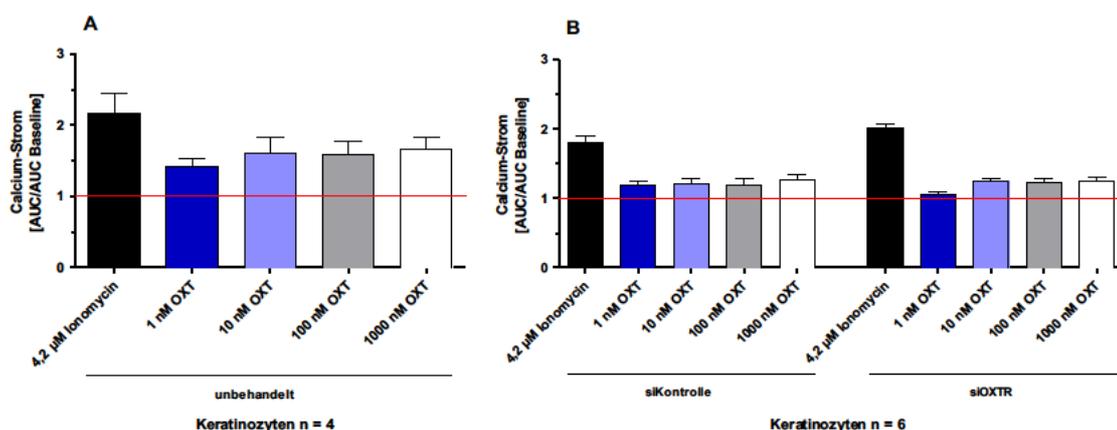


Abbildung 4.7: Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors bei Keratinozyten. Der Oxytocin Rezeptor wird in Keratinozyten durch Zugabe von Oxytocin aktiviert (A). Die Aktivierung fällt insgesamt im Vergleich zu Fibroblasten schwächer aus. Der Knockdown eignet sich bei Keratinozyten nicht als Spezifitätskontrolle für den Ca^{2+} Strom, da sich diese nicht auf dem Niveau der unbehandelten Probe befindet und kein Unterschied zwischen der siKontrolle und dem Knockdown (siOXTR) messbar ist (B). Die *Baseline* wird durch die rote Linie symbolisiert. Die Skalierung der Y Achse gibt das Verhältnis des Ca^{2+} Stroms der unbehandelten Probe, normiert auf den Ca^{2+} Strom der *Baseline* wieder. Der Y Achsen Wert stellt die Aktivierbarkeit des Oxytocin Rezeptors dar. AUC = *Area under the Curve* (siehe Abbildung 4.5).

4.4 Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation primärer Hautzellen

Um zu untersuchen, in welcher Weise Oxytocin das Wachstum primärer Hautzellen beeinflusst, wurden Proliferationsversuche mit Keratinozyten und Fibroblasten durchgeführt. Die beiden Zelltypen wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden im Intervall von 24 Stunden repetitiv mit Oxytocin und dem Oxytocin-Antagonisten L-371,257 behandelt. Die Behandlung der Fibroblasten erfolgte zusätzlich über einen Zeitraum von 168 Stunden. Die Messdaten wurden jeweils auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass Oxytocin bei Fibroblasten eine deutliche Dosis-abhängige Hemmung der Proliferation bewirkt (Abbildung 4.8). Dies bedeutet, dass mit steigender Oxytocin-Konzentration die Wachstumsgeschwindigkeitsrate der Fibroblasten sinkt. Während die Zellzahl der Fibroblasten nach 96 Stunden repetitiver Behandlung mit 1 nM und 10 nM Oxytocin kaum reduziert ist, vermindert die Zugabe von 100 nM Oxytocin das Zellwachstum um 10 % (Abbildung 4.8, A). Dieser Effekt wird deutlicher bei Behandlung über 168 Stunden. Nach diesem Zeitraum führt bereits 1 nM Oxytocin zu einer 10 % reduzierten Wachstumsgeschwindigkeitsrate der Zellen (Abbildung 4.8, B). Werden die Fibroblasten mit 10 nM Oxytocin behandelt, wird das Zellwachstum um 20 % und bei Behandlung mit 100 nM Oxytocin darüber hinaus um 30 % reduziert. Als Negativkontrolle wurden 1 μ M des Oxytocin-Antagonist L-371,257 eingesetzt. Dieser konnte erfolgreich die proliferationshemmende Wirkung von Oxytocin inhibieren, wodurch sich das Wachstumsverhalten der behandelten Zellen dem der unbehandelten Zellen annäherte (Abbildung 4.8, A und B).

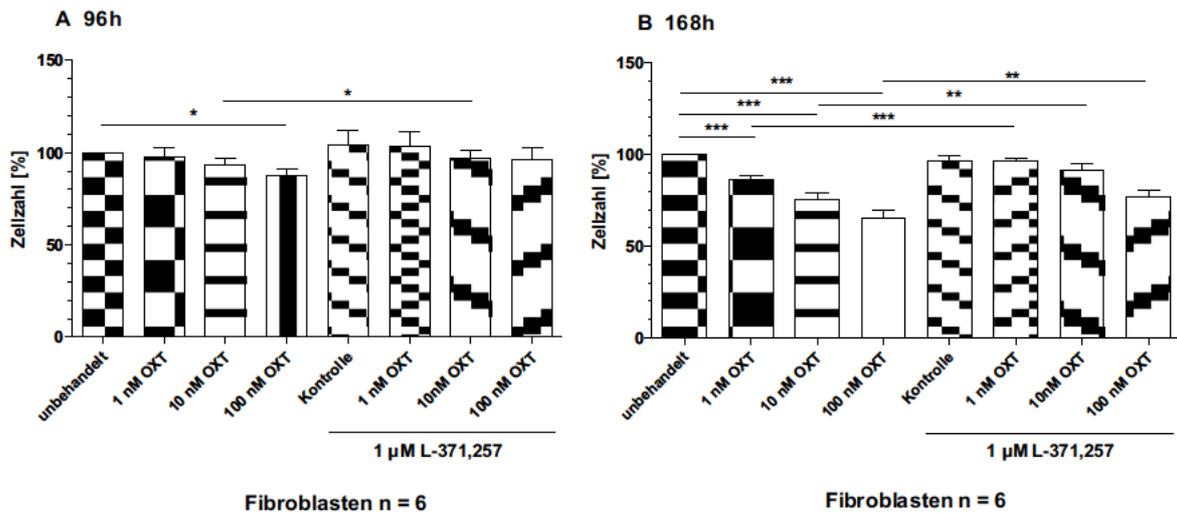


Abbildung 4.8: Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation von Fibroblasten. (A) Nach 96 Stunden zeigt Oxytocin eine proliferationshemmende Wirkung auf das Wachstum von Fibroblasten. Durch Zugabe von 100 nM Oxytocin sinkt die Wachstumsgeschwindigkeitsrate um ca. 10 % (* $P < 0,05$). (B) Über einen Zeitraum von 168 Stunden hebt sich der proliferationshemmende Effekt von Oxytocin stärker hervor und es entwickelt sich eine deutlich signifikante Dosis Wirkungs Beziehung. Bereits 1 nM Oxytocin hemmt das Zellwachstum um 10 %. Bei Behandlung der Fibroblasten mit 10 nM Oxytocin sinkt das Zellwachstum um 20 % und bei 100 nM Oxytocin auf 30 % herab (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Die Zugabe von 1 μM des Oxytocin Antagonisten L 371,257, wirkt dem proliferationshemmenden Effekt von Oxytocin entgegen (A, B). Die Messdaten wurden jeweils auf die unbehandelte Probe normiert.

Bei Keratinozyten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Oxytocin auf das Zellwachstum nach 96 Stunden einen hemmenden Effekt hat. Die Behandlung der Keratinozyten mit 10 nM und 100 nM Oxytocin reduziert das Zellwachstum um ca. 10 %, die Zugabe von 1000 nM Oxytocin um 20 %. Dieser proliferationshemmende Effekt von Oxytocin ist bei Behandlung der Zellen mit 10 μM Oxytocin hoch signifikant. Hierbei sinkt die Wachstumsgeschwindigkeitsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 30 % (Abbildung 4.9). Im Gegensatz zu den Fibroblasten reicht die Konzentration des Oxytocin-Antagonisten L-371,257 von 1 μM nicht aus, um den proliferationshemmenden Effekt von Oxytocin signifikant entgegenzuwirken. Nichtsdestotrotz, ist bei Vergleich der unbehandelten Probe zur mit Oxytocin-Antagonist behandelten Kontrolle ein deutlicher Rückgang der Hemmwirkung von Oxytocin durch den Antagonisten sichtbar. Grund hierfür ist, dass im KBM-2-Medium per se schon Oxytocin enthalten ist (ELISA-Daten nicht gezeigt). Dadurch wird von Anfang an die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen gehemmt.

Durch Zugabe des Oxytocin-Antagonisten besetzt dieser jedoch die Bindungsstellen des Oxytocin-Rezeptors und hemmt somit die Bindung des Oxytocins. Das im Medium vorhandene Oxytocin kann nicht mehr hemmend auf das Zellwachstum wirken, wodurch die Zellen bis zu 50 % schneller wachsen als bei der unbehandelten Probe. Mit steigender Oxytocin-Konzentration verdrängt das Oxytocin den Oxytocin-Antagonist von den Bindungsstellen des Oxytocin-Rezeptors, wodurch die proliferations-hemmende Wirkung des Oxytocins schließlich überwiegt.

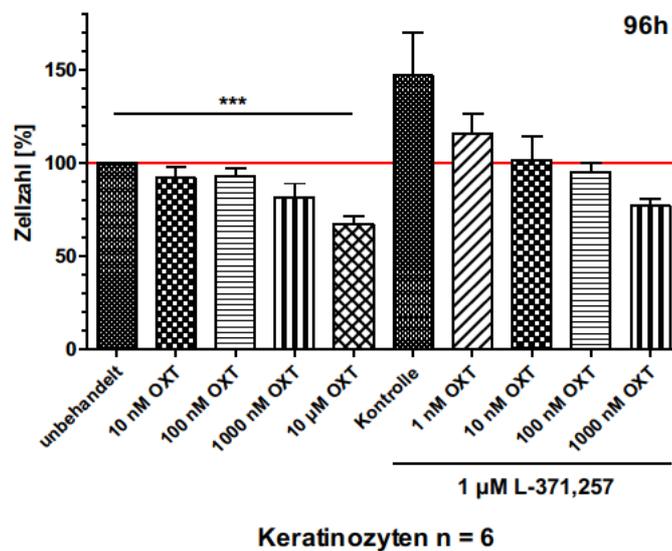


Abbildung 4.9: Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation von Keratinozyten. Oxytocin hemmt die Proliferation von Keratinozyten nach 96 Stunden mit steigender Konzentration. So führt die Behandlung der Keratinozyten mit 1000 nM Oxytocin zu einer Hemmung des Zellwachstums um ca. 20 %. Die Behandlung der Zellen mit 10 µM Oxytocin senkt die Wachstumsgeschwindigkeitsrate im Vergleich zur unbehandelten Probe um ca. 30 % (***) $P < 0,001$). Die Konzentration des Oxytocin Antagonisten L 371,257 von 1 µM reicht nicht aus, um der Hemmwirkung von Oxytocin signifikant entgegen zu wirken. Die Messdaten wurden jeweils auf die unbehandelte Probe normiert.

5 Diskussion

5.1 Das Oxytocin-Rezeptor-System wird von primären Hautzellen exprimiert

Neben den in Kapitel 1.2.1 genannten Funktionen von Oxytocin, ist das Peptidhormon auch als Regulator der neuroendokrinen Stressachse bekannt. Diese sogenannte *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HPA)-Achse* ist eine bedeutende Komponente des Neuroendokrinen Systems, welche das Gehirn mit der Peripherie verbindet. Bringen bestimmte Stressfaktoren die Homöostase des Körpers aus dem Gleichgewicht, wird über die HPA-Achse eine Stressreaktion ausgelöst (Papadimitriou & Priftis, 2009). Oxytocin ist in der Lage diese Stressantwort abzuschwächen. So fördert Oxytocin z.B. die Wundheilung durch Hemmung der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Interleukinen (Yegen, 2010). Interessanterweise wurde die Expression der zentralen Komponenten der HPA-Achse ebenso in der Haut festgestellt (Slominski & Wortsmann, 2000). Da Oxytocin als Gegenspieler der HPA-Achse identifiziert wurde, sollte auf Grund dessen untersucht werden, ob das Peptidhormon ebenfalls in der Haut exprimiert wird und welche Funktionen es dort ausübt. Aus diesem Grund wurde mittels RTq-PCR die Expression des Oxytocin-Rezeptor-Systems bei Fibroblasten und Keratinozyten untersucht und gegenübergestellt. Die Daten zeigen, dass der Oxytocin-Rezeptor in primären Hautzellen exprimiert wird. Bei Fibroblasten ist die Expression des Oxytocin-Rezeptors sehr viel höher als bei Keratinozyten, wohingegen die Expressionslevel von Oxytocin in beiden Zelltypen ähnlich sind.

Die Immunfluoreszenz-Analyse des Oxytocin-Rezeptors zeigt bei Fibroblasten eine gleichmäßige diffuse Zellfärbung. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Oxytocin-Rezeptor membranassoziiert ist. Für eine genauere Untersuchung würde sich die Analyse mit einem Konfokalmikroskop anbieten, da hierbei die räumliche Struktur der Zellen untersucht werden könnte. Bei Keratinozyten scheint der Oxytocin-Rezeptor an faserige Strukturen gebunden zu sein. Handelt es sich hierbei um Komponenten des Zytoskeletts, wie z.B. Mikrotubuli oder Aktin, könnte dieses durch Anfärben der entsprechenden Strukturen mittels Kofärbung überprüft werden. Oxytocin weist in Fibroblasten und Keratinozyten eine diffuse Verteilung im Zytosol auf, dieses könnte auf eine Lokalisierung

im Endoplasmatischen Retikulum hindeuten. Neurophysin I zeigt dagegen in beiden Zelltypen vermutlich eine vesikuläre Verteilung. Um diese Vermutungen zu untersuchen, sind weitere Immunfluoreszenz-Analysen mit den entsprechenden Zellorganell-Markern notwendig. Da Oxytocin zusammen mit seinem Transportprotein Neurophysin I im Hypothalamus exprimiert und von dort in die Peripherie transportiert wird, wäre es außerdem aufschlussreich zu überprüfen, ob hierbei eine Kollokalisierung vorliegt.

Ein Vergleich der Immunfluoreszenz-Analysen mit den Erkenntnissen von Denda et al. (2012) zeigt, dass die Ergebnisse für Oxytocin übereinstimmen. Denda konnte ebenfalls eine diffuse Verteilung des Oxytocins in Keratinozyten beobachten. Die Ergebnisse für Neurophysin I offenbaren jedoch ein anderes Bild. Hier dokumentierte Denda eine diffuse statt punktuelle Verteilung im Zytosol. Der Oxytocin-Rezeptor wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Denda und Kollegen verwendeten für die Immunfluoreszenz-Analyse sowohl einen anderen Primärantikörper gegen Oxytocin (Millipore, MAB5296), als auch gegen Neurophysin I (Santa Cruz, sc-7810). Die Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper könnte z.B. überprüft werden, indem das zu detektierende Antigen im Überschuss zu der Probe gegeben wird. Der Primärantikörper bindet dadurch statt an das in der Zelle lokalisierte Zielantigen, an das im Überschuss vorhandene Antigen und wird neutralisiert. Folglich kann sich der Farbstoffgekoppelte Sekundärantikörper nicht an den Primärantikörper anlagern und das Zielantigen wird nicht fluoreszenzmarkiert. Weist die Probe dennoch eine Fluoreszenzfärbung auf, deutet dieses auf eine unspezifische Bindung hin.

5.2 Der Oxytocin-Rezeptor ist in der Haut funktional

Es ist bekannt, dass der Oxytocin-Rezeptor über die Kopplung an $G\alpha_s$ zu einem intrazellulären Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP führt (Abbildung 1.8). Bindet der Rezeptor hingegen an die $G\alpha_i$ -Untereinheit, wird dieser cAMP-Signalweg inhibiert. Der Inositol-Phospholipid-vermittelte Signalweg wird wiederum über die Bindung des Rezeptors an die $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit in Gang gesetzt, wodurch ein intrazellulärer Ca^{2+} -Strom induziert wird (Viero et al., 2010).

Mittels FACS-Messung wurde die Funktionalität des Oxytocin-Rezeptors bei Fibroblasten und Keratinozyten über Detektion eines Dosis-abhängigen Ca^{2+} -Stroms nach Oxytocin-Behandlung festgestellt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass sowohl bei Fibroblasten, als auch bei Keratinozyten der $G\alpha_{q/11}$ -vermittelte Signalweg eine Rolle spielt. Der Ca^{2+} -Strom, der im Zytosol der getesteten primären Hautzellen nach Oxytocin-Stimulierung gemessen wurde, stammt zum einen aus intrazellulären Speichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Meldolesi & Pozzan, 1998). Zum anderen gelangt unter in vitro-Bedingungen extrazelluläres Ca^{2+} aus dem Messpuffer, über Öffnung von membranständigen Ca^{2+} -Kanälen in die Zelle (Putney, 2010). Es ist jedoch nicht bekannt, zu welchen Anteilen aus intra- und extrazellulärem Ca^{2+} sich der Strom zusammensetzt. Um dieser Frage nachzugehen, könnte z.B. der Ca^{2+} -haltige Messpuffer bei der Messung weggelassen werden, um zu prüfen, ob der messbare Ca^{2+} -Strom dadurch vermindert wird.

Die nach Oxytocin-Zugabe mittels FACS-Analyse gemessenen intrazellulären Ca^{2+} -Ströme, sind insgesamt bei Keratinozyten niedriger als bei Fibroblasten. Dieses spiegelt sich zudem in den Signalhöhen der Ca^{2+} -Ströme nach Ionomycin-Zugabe wider. Bei Keratinozyten zeigt die Positivkontrolle Ionomycin lediglich einen 2,3-fachen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration gegenüber der Baseline, während bei Fibroblasten der Ca^{2+} -Strom auf das 4-fache ansteigt (siehe Abbildung 4.6 und 4.7). Es ist bekannt, dass Ionomycin den intrazellulären Ca^{2+} -Flux über die direkte Stimulierung der Kationenkanäle der internen Calciumspeicher wie dem ER, induziert und weniger über die direkte Wirkung an der Plasmamembran (Putney, 2010 und Morgan & Jacob, 1994). Im Hinblick darauf, dass Ionomycin den maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Flux hervorruft, deuten die Messdaten vermutlich darauf hin, dass Keratinozyten im Vergleich zu den Fibroblasten einen geringeren internen Ca^{2+} -Gehalt aufweisen.

Neben der geringeren intrazellulären Ca^{2+} -Basalkonzentration, könnte bei Keratinozyten außerdem die Oxytocin-Rezeptor-Dichte eine Rolle spielen. Die Expression des Oxytocin-Rezeptors ist bei Keratinozyten im Vergleich zu den Fibroblasten sehr viel geringer (vergleiche Abbildung 4.1), sodass bei der Rezeptor-Aktivierung wahrscheinlich ebenso weniger Ca^{2+} mobilisiert wird. Eine weitere Ursache könnte sein, dass im Keratinozyten-Medium mit ca. 2,7 nM eine sehr viel höhere Oxytocin-Konzentration vorhanden ist, als im Fibroblasten-Medium mit nur 66 pM Oxytocin (ELISA-Daten nicht gezeigt). Die Primärzellen werden bis kurz vor der Messung im jeweiligen Zellmedium kultiviert. Die per se höhere Oxytocin-Konzentration führt bei Keratinozyten möglicherweise zu einer Internalisierung des Oxytocin-Rezeptors. Dies wurde bereits in Gebärmuttermuskelzellen nach kontinuierlicher Agonist-Stimulation beobachtet (Vrachnis et al., 2011). Das würde bedeuten, dass bei Keratinozyten durch die Internalisierung insgesamt weniger Oxytocin-Rezeptoren in der Zellmembran vorhanden sind. Folglich sind diese durch die Oxytocin-Zugabe bei der Messung schneller gesättigt und der Ca^{2+} -Strom ist dadurch vermindert. Unterstützend zu dieser These konnten Robinson et al. (2003) zeigen, dass eine Vorinkubation von Myozyten mit Oxytocin, zu einem verminderten intrazellulären Ca^{2+} -Strom durch Internalisierung des Rezeptors führt.

Bei Fibroblasten wurde mittels siRNA-vermittelten Oxytocin-Rezeptor-Knockdowns (siOXTR) nachgewiesen, dass die Aktivierung des Oxytocin-Rezeptors durch Oxytocin einen spezifischen Ca^{2+} -Strom induziert. Bei Keratinozyten eignet sich der siRNA-vermittelte Oxytocin-Rezeptor-Knockdown hingegen nicht als Spezifitätskontrolle für den Ca^{2+} -Strom. Es kann hierbei nicht genau geklärt werden, ob die Transfektion oder die verwendete siRNA (siKontrolle bzw. siOXTR) bei Keratinozyten den negativen Einfluss auf die Signalhöhe des Ca^{2+} -Stroms verursacht hat. Als nächstes wäre es sinnvoll, den Oxytocin-Antagonisten L-371,257 in diesem Zusammenhang als Spezifitätskontrolle für den Ca^{2+} -Strom zu testen.

5.3 Oxytocin hemmt die Proliferation primärer Fibroblasten und Keratinozyten

Abhängig vom Zelltyp kann Oxytocin sowohl hemmend, als auch proliferierend wirken. Oxytocin inhibiert das Zellwachstum über den sekundären Botenstoff cAMP, wie dies für Brustkrebszelllinien beobachtet werden konnte (Bussolati & Cassoni, 2001). Im Gegensatz dazu zeigten Thibonnier et al. (1999), dass Oxytocin-Stimulierung bei menschlichen Nabelschnurzellen (HUVECs) über einen intrazellulären Ca^{2+} -Strom Zellwachstum induziert. Während der FACS-Messung wurde ein Dosis-abhängiger Ca^{2+} -Strom detektiert. Aus diesem Grund wurde zunächst vermutet, dass Oxytocin den $\text{G}\alpha_{q/11}$ -vermittelten Signalweg in Gang setzt und über die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Proliferation fördert. Daher sollte der Einfluss von Oxytocin auf das Zellwachstum über einen Zeitraum von 96 und 168 Stunden genauer untersucht werden. Nach repetitiver Behandlung mit Oxytocin, zeigte sich jedoch, dass Oxytocin entgegen der Erwartung einen proliferationshemmenden Effekt auf das Zellwachstum von Fibroblasten sowie Keratinozyten hat. Die Ergebnisse des Neutralrottests haben gezeigt, dass sowohl Oxytocin, als auch der Oxytocin-Antagonist keinen negativen Einfluss auf die Viabilität von Fibroblasten und Keratinozyten haben (Abbildung 4.3 und 4.4). Demzufolge konnten alle getesteten Konzentrationen für den Proliferationsversuch eingesetzt werden, sodass die Hemmwirkung von Oxytocin nicht auf eine eingeschränkte Viabilität zurückzuführen ist.

Der Befund, dass Oxytocin einerseits einen Ca^{2+} -Strom in der Zelle hervorruft, aber andererseits proliferationshemmend wirkt, erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich zu sein. Allerdings ist bekannt, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie der Oxytocin-Rezeptor, in der Lage sind innerhalb des gleichen Zelltyps unterschiedliche Signalwege zu aktivieren (Tom et al., 2009). Dies wurde ebenfalls von Guzzi et al. (2002) bei MDCK-Zellen beobachtet. Der Oxytocin-Rezeptor koppelt dabei abhängig von seiner Lokalisation an verschiedene G-Protein-Subtypen, z.B. $\text{G}\alpha_{q/11}$ oder $\text{G}\alpha_i$ und setzt dadurch gegensätzliche Signalkaskaden in Gang (siehe Kapitel 1.2.3). Bei der FACS-Messung wurde zwar ein Ca^{2+} -Strom gemessen, allerdings wurde keine parallele Messung der cAMP-Konzentration vorgenommen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Oxytocin sowohl einen proliferationshemmenden Effekt über Kopplung an $\text{G}\alpha_{q/11}$, als auch einen fördernden Effekt über den $\text{G}\alpha_i$ -vermittelten Signalweg gleichzeitig ausübt. Welcher Effekt überwiegt, hängt laut Guzzi et al. (2002) von der Verteilung des Rezeptors inner- und

außerhalb der Caveolae ab. Gimpl & Fahrenholz (2001) fanden heraus, dass nur etwa 10 % der Oxytocin-Rezeptoren in Caveolae vorkommen. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass dies auch in Hautzellen der Fall sein könnte und dadurch der proliferationshemmende Signalweg überwiegt. Um diese These zu überprüfen, wäre eine Messung der sekundären Botenstoffe wie cAMP bzw. IP₃ mittels ELISA sinnvoll. Daraus würde sich schließen lassen, welcher Signalweg aktiv ist und ob eine der Signalkaskaden überwiegt.

Eine detaillierte Erklärung, könnte gemäß Rimoldi et al. (2003) sein, dass die Oxytocin-Rezeptor-Stimulierung inner- und außerhalb der Caveolae verschiedene EGFR/MAPK-Aktivierungsmuster bewirkt. So führt die Rezeptor-Stimulation innerhalb der Caveolae nur zu einer vorübergehenden Phosphorylierung von ERK 1/2, wodurch kurzzeitig ein proliferativer Impuls induziert wird. Befindet sich der Oxytocin-Rezeptor hingegen in der Zellmembran, findet eine kontinuierliche Phosphorylierung von ERK 1/2 statt. Infolgedessen wird der Zellzyklusinhibitor p 21 aktiviert und das Zellwachstum dauerhaft inhibiert (vergleiche Abbildung 1.9). Weiterhin zeigten Zingg & Laporte (2003), dass durch langanhaltende Stimulierung mit Oxytocin, der Oxytocin-Rezeptor internalisiert wird. Da Oxytocin-Rezeptoren innerhalb der Caveolae eher zur Internalisierung neigen, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass der proliferationshemmende Effekt von Oxytocin bei andauernder Stimulation überwiegt (Chini & Parenti, 2004). Denn während der Oxytocin-Rezeptor über den G $\alpha_{q/11}$ -vermittelten Signalweg internalisiert wird, sendet der G α_i -vermittelte Signalweg weiterhin ein wachstumshemmendes Signal.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Oxytocin-Rezeptor-System ein wichtiger Regulationsmechanismus der Proliferation bei Fibroblasten und Keratinozyten in der Monokultur ist. Um diesen Sachverhalt tiefergehend zu untersuchen, wäre es interessant, die Effekte von Oxytocin und des Oxytocin-Antagonisten im Hautmodell zu untersuchen. Hierbei könnte im Gegensatz zur Monokultur auch der Einfluss der Zelltypen untereinander untersucht werden, z.B. mittels Oxytocin-Rezeptor-Knockdown. Zukünftig würde sich außerdem die Untersuchung des Oxytocin-Rezeptor-Systems in atopischen Hautzellen lohnen, da einige Hautkrankheiten wie z.B. die atopische Dermatitis oder die Psoriasis mit einer fehlregulierten Proliferation in Verbindung gebracht werden (Guttman-Yassky et al., 2011).

6 Zusammenfassung

Das Oxytocin-Rezeptor-System wirkt sowohl systemisch als auch lokal organspezifisch. Es spielt in vielen unterschiedlichen Entwicklungsprozessen des Menschen eine tragende Rolle. So beeinflusst es zum Beispiel die zwischenmenschliche emotionale Bindung, ist aber auch am Entwicklungsprozess von Vertrauen, Gedächtnis und Lernverhalten beteiligt (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Zum Oxytocin-Rezeptor-System in der Haut ist bis dato lediglich bekannt, dass Oxytocin in epidermalen humanen Keratinozyten exprimiert und durch Stimulation mit einem ATP-Analogen ausgeschüttet wird (Denda et al., 2012). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Charakterisierung von Oxytocin und seinem Rezeptor in der Haut vorzunehmen.

Mittels RTq-PCR und Immunfluoreszenz-Analysen wurden Oxytocin und der Oxytocin-Rezeptor bei Fibroblasten und Keratinozyten auf RNA- und Proteinebene erfolgreich detektiert und lokalisiert. Durch Anwendung der FACS-Methode wurde die spezifische Dosis- abhängige Aktivierbarkeit des Rezeptors durch Oxytocin und damit einhergehend seine Funktionalität in der Haut nachgewiesen. Zur Untersuchung des phänotypischen Einflusses von Oxytocin auf die Proliferation primärer Hautzellen, wurden Fibroblasten und Keratinozyten repetitiv mit Oxytocin in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Bereits 96 Stunden nach Behandlungsbeginn zeigte Oxytocin einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum humaner Fibroblasten und Keratinozyten. Diese Hemmwirkung auf die Zellwachstumsgeschwindigkeitsrate nahm bei Fibroblasten nach 168 Stunden hoch signifikant zu. Neben dem proliferationshemmenden Effekt nach repetitiver Oxytocin-Behandlung, wurde bei Fibroblasten und Keratinozyten ein Ca^{2+} -Strom nach Oxytocin-Zugabe mittels FACS-Analyse gemessen. Es wird daher angenommen, dass Oxytocin sowohl den $G\alpha_{q/11}$ -vermittelten Signalweg über den sekundären Botenstoff Ca^{2+} , als auch den $G\alpha_i$ -vermittelten Signalweg gleichzeitig aktiviert. Hierbei scheint der proliferationshemmende Signalweg über den G-Protein-Subtypen $G\alpha_i$ bei Fibroblasten und Keratinozyten zu überwiegen.

7 Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P 2012: *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, 4. Auflage, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, S. 584-598.

Bastin G & Heximer SP 2011: „Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Bd. 510, Nr.2, S. 182-189.

Borenfreund E & Puerner JA 1984: „Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption“, *Toxicology Letters*, Bd. 24, Nr. 2-3, S. 119-124.

Brownstein MJ, Russell JT & Gainer H 1980: „Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones“, *Science*, Bd. 207, Nr. 4429, S. 373-378.

Busnelli M, Rimoldi V, Viganò P, Persani L, Di Blasio AM & Chini B 2010: „Oxytocin-induced cell growth proliferation in human myometrial cells and leiomyomas“, *Fertility and Sterility*, Bd. 94, Nr. 5, S. 1869-1874.

Bussolati G & Cassoni P 2001: „The oxytocin/oxytocin receptor system - expect the unexpected“, *Endocrinology*, Bd. 142, Nr. 4, S. 1377-1379.

Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G 1994: „Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines“, *Virchows Archive*, Bd. 425, Nr. 5, S. 467-572.

Cattaneo MG, Chini B & Vicentini LM 2008: „Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells“, *British Journal of Pharmacology*, Bd. 153, Nr. 4, S. 728-736.

Chini B & Parenti M 2004: „G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?“, *Journal of Molecular Endocrinology*, Bd. 32, Nr. 2, S. 325-338.

Copland JA, Ives KL, Simmons DJ & Soloff MS 1999: „Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts“, *Endocrinology*, Bd. 140, Nr. 9, S. 4371-4374.

Denda S, Takei K, Kumamoto J, Goto M, Tsutsumi M & Denda M 2012: „Oxytocin is expressed in epidermal keratinocytes and released upon stimulation with adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate in vitro“, *Experimental Dermatology*, Bd. 21, Nr. 7, S. 535-537.

Detillion CE, Craft TK, Glasper ER, Prendergast BJ & DeVries AC 2004: „Social facilitation of wound healing“, *Psychoneuroendocrinology*, Bd. 29, Nr. 8, S. 1004-1011.

Ganten D & Ruckpaul K (Hrsg.) 2003: *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*, Springer-Verlag, Berlin, S.5.

Gibson UE, Heid CA & Williams PM 1996: „A novel method for real time quantitative RT-PCR“, *Genome Research*, Bd. 6, Nr. 10, S. 995-1001.

Gimpl G & Fahrenholz F 2001: „The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation“, *Physiological Reviews*, Bd. 81, Nr. 2, S. 629-683.

Gutkowska J & Jankowski M 2012: „Oxytocin revisited: its role in cardiovascular regulation“, *Journal of Neuroendocrinology*, Bd. 24, Nr. 4, S. 599-608.

Guttman-Yassky E, Nogales KE & Krueger GJ 2011: „Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis - Part I: Clinical and pathologic concepts“, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Bd. 127, Nr. 5, S.1110-1118.

Guzzi F, Zanchetta D, Cassoni P, Guzzi V, Francolini M, Parenti M & Chini B 2002: „Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response“, *Oncogene*, Bd. 21, Nr. 11, S. 1658-1667.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM 1996: „Real time quantitative PCR“, *Genome Research*, Bd. 6, Nr. 10, S. 986-994.

Heinis C, Rutherford T, Freund S & Winter G 2009: „Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides“, *Nature Chemical Biology*, Bd. 5, Nr. 7, S. 502-507.

Herzenberg Leonard A, Sweet RG & Herzenberg Leonore A 1976: „Fluorescence-activated cell sorting“, *Scientific American*, Bd. 234, Nr. 3, S. 108-117.

Iseri SO, Gedik IE, Erzik C, Uslu B, Arbak S, Gedik N & Yegen BC 2008: „Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma“, *Burns*, Bd. 34, Nr. 3, S. 361-369.

Ishak WW, Kahloon M & Fakhry H 2011: „Oxytocin role in enhancing well-being: a literature review“, *Journal of Affective Disorders*, Bd. 130, Nr. 1-2, S.1-9.

Ji TH, Grossmann M & Ji I 1998: „G-Protein-coupled receptors: I diversity of receptor-ligand interactions“, *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 273, Nr. 28, S. 17299-17302.

Lee HJ, Macbeth AH, Pagani J & Young WS 3rd 2009: „Oxytocin: the great facilitator of life“, *Progress in Neurobiology*, Bd. 88, Nr. 2, S. 127-151.

Lipp P & Niggli E 1993: „Ratiometric confocal Ca(2+)-measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes“, *Cell Calcium*, Bd. 14, Nr. 5, S. 359-372.

Meldolesi J & Pozzan T 1998: „The endoplasmatic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen“, *Trends in Biochemical Science*, Bd. 23, Nr. 1, S. 10-14.

Morgan AJ & Jacob R 1994: „Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane“, *The Biochemical Journal*, Bd. 300, Nr. 3, S.665-672.

Mülhardt C 2006: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag, München, S. 109 und 126.

Papadimitriou A & Priftis KN 2009: „Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis“, *Neuroimmunomodulation*, Bd. 16, Nr. 5, S.265-271.

Postina R, Kojro E & Fahrenholz F 1996: „Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V₂ vasopressin receptor“, *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 271, Nr. 49, S. 31593-31601.

Putney JW 2010: „Pharmacology of store-operated calcium channels“, *Molecular Interventions*, Bd. 10, Nr. 4, S. 209-218.

Rimoldi V, Reversi A, Taverna E, Rosa P, Francolini M, Cassoni P, Parenti M & Chini B 2003: „Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains“, *Oncogene*, Bd. 22, Nr. 38, S. 6054-6060.

Robinson C, Schumann R, Zhang P & Young RC 2003: „Oxytocin-induced desensitization of the oxytocin receptor“, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Bd. 188, Nr. 2, S. 497-502.

Schmitz S 2007: *Der Experimentator: Zellkultur*, Spektrum Akademischer Verlag, München, S. 132 und 181.

Slominski A & Wortsman J 2000: „Neuroendocrinology of the skin“, *Endocrine Reviews*, Bd. 21, Nr. 5, S. 457-487.

Sterry W 2011: *Kurzlehrbuch Dermatologie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 3-7.

Sterry W, Burgdorf W & Paus R 2010: *Checkliste Dermatologie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 1-10.

Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA & Erzurum SC 1999: „Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors“, *Endocrinology*, Bd. 140, Nr. 3, S.1301-1309.

Tom N & Assinder SJ 2009: „Oxytocin in health and disease“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Bd. 42, Nr. 2010, S. 202-205.

Uvnäs-Moberg K & Petersson M 2005: „Oxytocin, a mediator of anti-stress, well-being, social interaction, growth and healing“, *Zeitschrift für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie*, Bd. 51, Nr. 1, S. 57-80.

Viero C, Shibuya I, Kitamura N, Verkhatsky A, Fujihara H, Katoh A, Ueta Y, Zingg HH, Chvatal A, Sykova E & Dayanithi G 2010: „Oxytocin: crossing the bridge between basic science and pharmacology“, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, Bd. 16, Nr. 5, S. 138-156.

Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, Deligeoroglou E & Iliodromiti Z 2011: „The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents“, *International Journal of Endocrinology*, Bd. 2011, 8 Seiten.

Yegen BC 2010: „Oxytocin and hypothalamo-pituitary-adrenal axis“, *Marmara Pharmaceutical Journal*, Bd. 14, Nr. 2, S.61-66.

Zingg HH & Laporte SA 2003: „The oxytocin receptor“, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Bd. 14, Nr. 5, S. 222-227.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AM	Acetoxymethyl-(Ester)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
Bd.	Band (Volumen)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cm ²	Quadratcentimeter
C _T	<i>Threshold cycle</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfidoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-related kinases</i>
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
HPA	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal (-axis)</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kb	Kilobase
KBM-2	<i>Keratinocyte basal medium-2</i>
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney (-cells)</i>
min	Minute
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NPH I	Neurophysin I
OXT	Oxytocin
OXTR	Oxytocin-Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
P _i	anorganisches Phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC-β	Phospholipase C-β
PP _i	anorganisches Diphosphat
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
sek	Sekunde
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
U	<i>Units</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/o	<i>without</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau der Haut (Sterry et al., 2010).....	1
Abbildung 1.2: Die Aminosäurestruktur (modifiziert nach Vrachnis et al., 2011) und die chemische Strukturformel von Oxytocin (Heinis et al., 2009).....	2
Abbildung 1.3: Struktureller Aufbau eines 7-Transmembran-Rezeptors (Ji et al., 1998).....	3
Abbildung 1.4: Genorganisation von Oxytocin und des Oxytocin-Rezeptors (modifiziert nach Gimpl & Fahrenholz, 2001)	3
Abbildung 1.5: Wirkungen von Oxytocin auf die menschliche Entwicklung und Fortpflanzung (Lee et al., 2009)	4
Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des Oxytocin-Rezeptors und die Bindung an seinen Liganden Oxytocin (modifiziert nach Zingg & Laporte, 2003).	5
Abbildung 1.7: Aktivierungszyklus eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Bastin & Heximer, 2011)	6
Abbildung 1.8: Signalwege des Oxytocin-Rezeptors (erstellt nach Viero et al., 2010).....	8
Abbildung 1.9: Einfluss der Lokalisation des Oxytocin-Rezeptors auf die Bindung von G-Proteinen (modifiziert nach Tom et al., 2010)	10
Abbildung 3.1: Anwendungsprinzip der TaqMan [®] -Sonde zur Quantifizierung der TaqMan [®] RTq-PCR (modifiziert nach Ganten & Ruckpaul, 2003).....	20
Abbildung 3.2: Ermittlung des C _T -Wertes bei der RTq-PCR (Mülhardt, 2006).	21
Abbildung 3.3: Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung	23
Abbildung 4.1: Genexpression von Oxytocin und des Oxytocin-Rezeptors in primären Hautzellen.....	28
Abbildung 4.2: Lokalisation und Verteilung von Oxytocin, Neurophysin I und des Oxytocin-Rezeptors in primären Hautzellen.....	29
Abbildung 4.3: Viabilitätsmessung bei Fibroblasten	31
Abbildung 4.4: Viabilitätsmessung bei Keratinozyten.....	32
Abbildung 4.5: Kinetik des Ca ²⁺ -Stroms bei Fibroblasten nach Behandlung mit 100 nM Oxytocin.....	32
Abbildung 4.6: Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors bei Fibroblasten	34
Abbildung 4.7: Aktivierbarkeit des Oxytocin-Rezeptors bei Keratinozyten.....	35
Abbildung 4.8: Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation von Fibroblasten	37
Abbildung 4.9: Einfluss von Oxytocin auf die Proliferation von Keratinozyten.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	11
Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie.....	12
Tabelle 2.3: Fluoreszierende Farbstoffe für die FACS-Analyse	12
Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits	13
Tabelle 2.5: TaqMan [®] Gene Expression Assays	13
Tabelle 2.6: Auflistung der Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Geräte	14
Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Software	14
Tabelle 3.1: Pipettierschema des Mastermixes für die Reverse Transkription	18
Tabelle 3.2: Programm für die Reverse Transkription.....	19
Tabelle 3.3: RTq-PCR-Programm	19

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Gitta Neufang für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, sowie für die hervorragende fachliche Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich danke ich für die wissenschaftliche Begleitung seitens der HAW Hamburg und für die Übernahme des Gutachtens.

Des Weiteren danke ich dem Labor Dermatologische Hautpflege für die freundliche Aufnahme in das Team, die motivierende Arbeitsatmosphäre, sowie für die stetige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Verena Deing, für die Betreuung und Unterstützung im Rahmen der Bachelorarbeit, die interessanten Diskussionen, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Dr. Soja Wessel danke ich für die Einführung am Mikroskop und die hilfreichen Tipps rund ums Mikroskopieren.

Meiner Familie danke ich für die Ermöglichung des Studiums, den Rückhalt und die Unterstützung während dieser Zeit.

Meinem Freund Christopher danke ich von Herzen, dass er mir stets liebevoll und geduldig zur Seite stand und mir immer wieder die notwendige Energie gegeben hat.