

Pharmakologische Wirkungen von Biotin auf Epidermiszellen

Autor(en): **Fritsche, A. / Mathis, G.A. / Althaus, F.R.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **133 (1991)**

Heft 6

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-590915>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

PHARMAKOLOGISCHE WIRKUNGEN VON BIOTIN AUF EPIDERMISZELLEN

A. FRITSCHÉ, G. A. MATHIS, F. R. ALTHAUS

ZUSAMMENFASSUNG

Biotinmangel verursacht bei Tieren pathologische Veränderungen der Haut und ihrer Anhangsgebilde, wie zum Beispiel exfoliative Dermatitis, Depigmentation und Alopecie. Das Klauenhorn biotindefizienter Schweine ist weich, brüchig oder sogar nekrotisch. Diese Veränderungen verschwinden nach Biotinzufütterung. Erstaunlicherweise verbessert eine Biotinzufuhr auch die Huf- bzw. Klauenqualität von Pferden, Kühen und Schweinen ohne apparenten Biotinmangel. Um die molekularen Mechanismen dieser Wirkung zu ergründen, wurde der Einfluss von Biotin auf die Expression der Zytokeratine in einer Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) mit elektrophoretischen und immunologischen Methoden untersucht.

Pharmakologische Biotinkonzentrationen von 1 μM und 100 μM im Medium bewirkten eine Zunahme jener Zytokeratine, die typischerweise bei der terminalen Differenzierung von Epidermiszellen in vivo vermehrt gebildet werden. Die Menge der Zytokeratine, die in allen mehrschichtigen Epithelien unabhängig vom Differenzierungsstatus vorkommen, veränderte sich nicht. Die Befunde zeigen, dass Biotin einen direkten Einfluss auf Epidermiszellen hat, indem es deren Differenzierung fördert. Diese in Zellkultur gewonnenen Ergebnisse bilden eine molekularbiologische Grundlage für die pharmakologische Wirkung von Biotin auf die Huf- und Klauenqualität von Nutztieren.

SCHLÜSSELWÖRTER: Biotin — Epidermisveränderungen — Keratinozyten — Zytokeratin — Differenzierung

EINLEITUNG

Biotin gehört zu den B-Vitaminen. Es ist in vielen Nahrungs- und Futtermitteln enthalten, jedoch in sehr unterschiedlichen Mengen. Der tägliche Bedarf von Mensch und Tier wird im Normalfall über die Nahrung und die intestinale Synthese gedeckt (Friedrich, 1988). Gut untersucht ist die Funktion von

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF BIOTIN ON EPIDERMAL CELLS

Biotin deficiency in animals causes pathological changes of the skin and its appendages including, for example, exfoliative dermatitis, depigmentation, and alopecia. The hooves of biotin-deficient swine are weak, brittle, and often necrotic. These changes disappear after dietary biotin supplementation. Biotin supplementation also noticeably improves the hoof quality of horses, cattle and swine having no apparent biotin deficiency. In order to elucidate the molecular basis of these effects, the influence of biotin on cytokeratin expression in a keratinocyte cell line (HaCaT) was investigated using electrophoretic and immunological techniques. Pharmacological biotin concentrations of 1 μM , and 100 μM in the culture medium caused a specific increase in cytokeratins, which are normally induced upon terminal differentiation of epidermal cells in vivo. The expression of cytokeratins occurring in stratified epithelia independent of differentiation were not affected. These findings show that biotin directly stimulates the differentiation of epidermal cells. Such a molecular mechanism revealed in cell culture could provide an explanation for the therapeutic effects of pharmacological doses of biotin on hoof quality in farm animals.

KEY WORDS: biotin — epidermal disorders — keratinocytes — cytokeratin — differentiation

Biotin als prosthetische Gruppe von Karboxylasen, die in die Glukoneogenese, die Lipogenese und in den Aminosäurenstoffwechsel eingreifen (Stryer, 1988; Aurbach, 1989). Bei Biotinmangel ist die Aktivität dieser Enzyme vermindert (Friedrich, 1988). Avidin, ein Protein des Eiklars, bindet Biotin mit sehr hoher Affinität und verhindert dadurch die enterale Resorption. Deshalb kann durch Beimischen von

Avidin zur Diät von Versuchstieren experimentell ein Biotinmangel erzeugt werden. Bei Jungtieren sind die ersten Folgen schlechte Futterverwertung und Wachstumsverlangsamung. Später treten Hautveränderungen auf, wie zum Beispiel exfoliative, seborrhoische Dermatitis, Depigmentation oder Alopezie (György et al., 1968; Sweetman et al., 1979). Histologisch ist meistens eine Hyperkeratose, seltener eine Parakeratose festzustellen (Whitehead, 1988). Biotin-defiziente Schweine verlieren an Gewicht und leiden an Verdauungsstörungen, Hautentzündungen und brüchigen Klauen (Geyer et al., 1981; 1984). Hunde, die Avidin im Futter aufnehmen, verlieren vermehrt Haare und weisen ebenfalls Hautentzündungen auf (Bonjour, 1977; Frigg et al., 1989). Die Veränderungen verschwinden, wenn dem Futter Biotin statt Avidin zugefügt wird. Überraschenderweise bewirken pharmakologische Biotindosen bei Pferden, Kühen und Schweinen ohne apparenten Biotinmangel eine Verbesserung der Huf- bzw. Klauenqualität (Cooke und Brumby, 1982; Bryant et al., 1985; Leu, 1987).

Molekularbiologisch ist die Wirkung von Biotin auf die Epidermis und ihre Angangsgebilde bisher ungeklärt. Es wurde spekuliert, dass Biotin die Fettsäurezusammensetzung der Haut verändert und dadurch die Epidermisfunktion beeinflusst (Aurbach, 1989).

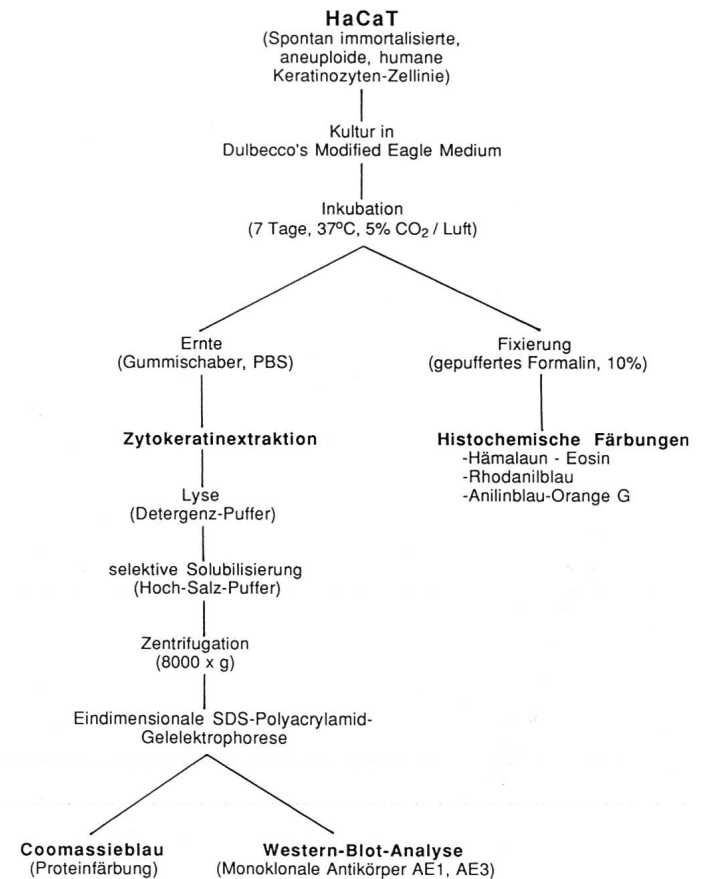
Keratin ist das Hauptprotein des Stratum corneum der Epidermis und bildet auch die Hornsubstanz von Haaren, Nägeln, Hufen und Klauen. Es wird von den Epithelzellen, den Keratinozyten, produziert und ist der Hauptbestandteil des Zytoskelettes. Es besteht aus verschiedenen Zytokeratinen, die je nach Typ und Differenzierungsstand des Epithels als charakteristische Paare exprimiert werden. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 40 und 70 kD¹ (Moscona, 1987). In der vorliegenden Arbeit haben wir den Einfluss von Biotin auf die Bildung und Zusammensetzung des Keratins in Epidermiszellen untersucht. Um die Variablen möglichst klein zu halten, wurden die Versuche mit der humanen epidermalen Keratinozytenzelllinie HaCaT durchgeführt, die aus spontan transformierten Zellen mit normalem Differenzierungsverhalten besteht (Boukamp et al., 1988).

MATERIAL UND METHODEN

Zellkultur

Die HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie wurde uns von Dr. P. Cerutti, ISREC, CH-1066 Epalinges, zur Verfügung gestellt. Sie wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM,

Abb. 1: Experimentelles Protokoll für die Untersuchung der Zytokeratinexpression von HaCaT-Zellen



Gibco Ltd., Paisley, Scotland, GB), das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 100 I.E./ml Penicillin G (Hoechst AG, Frankfurt, BRD) und 25 µg/ml Gentamicin (Gibco) ergänzt und auf einen pH von 7.2 eingestellt worden war, in einer Atmosphäre von 5% CO₂/ 95% Luft bei 37 °C kultiviert (Boukamp et al., 1988). Als Zellkulturträger dienten Kulturflaschen (75 cm² Bodenfläche, Corning Glass Works, Corning, NY, USA). Die Zelldichte betrug beim Aussäen 55 000–66 000 Zellen pro cm². Nach sieben Tagen waren die Zellen konfluent (550 000–660 000 Zellen pro cm²). Sie wurden mit Trypsin/EDTA (0.5 g/l Trypsin; 0.2 g/l EDTA, Gibco) geerntet, im Verhältnis 1:10 verdünnt und neu ausgesät.

Histochemische Analysen

Für den histochemischen Keratinnachweis erfolgte die Kultur der Zellen in Objektträger-Zellkulturflaschen (9 cm² Boden-

¹ kD = Kilodalton (das Tausendfache der Molekularmasse 1)

WIRKUNGEN VON BIOTIN AUF EPIDERMISZELLEN

fläche, 55 000–66 000 Zellen/cm², InterMed Nunc, Roskilde, Dänemark). Nach sieben Tagen wurden die konfluenten Zellen mit PBS-Puffer (136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) zweimal fünf Minuten gewaschen, in 10% neutral-gepuffertem Formalin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) fixiert und mit Hämalun-Eosin gefärbt (Böck, 1989). Keratin wurde mit der Anilinblau-Orange G (Ayaub und Shklar, 1963) und der Rhodanilblau-Färbung (MacConaill und Gurr, 1964; Rheinwald und Green, 1975) nachgewiesen.

Biochemische Analysen

Die Aussaat der Zellen erfolgte in P100- (Sterilin Ltd., Feltham, GB) oder P35-Schalen (Falcon, Becton Dickinson & Co., New Jersey, USA). Biotin (Janssen Chimica, Beerse, Belgien; 100 x Stammlösungen: 100 µM und 10 mM), gelöst in reinem Methanol (Fluka, Buchs, CH), wurde den Kulturmedien in adäquaten Mengen zugefügt. Die Methode von Achtstaetter et al. (1986) diente zur Extraktion der Zytoskelett-Proteine aus Zellen, die nach sieben Tagen Kultur mit einem Gummischaber in PBS geerntet und gewaschen worden waren. Die Zellen wurden zuerst während fünf Minuten bei Zimmertemperatur in Detergenz-Puffer (140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 1% Triton X-100, pH 7.6, steril filtriert, gelagert bei 4 °C) lysiert und dann während 30 Minuten bei Zimmertemperatur in Hochsalz-Puffer (140 mM NaCl, 1.5 M KCl, 5 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.6, steril filtriert, gelagert bei 4 °C) suspendiert. Die unter diesen Bedingungen unlöslichen Zytoskelettproteine wurden durch Zentrifugation (8000 x g, 10 Minuten) angereichert. Sie wurden schliesslich gemäss dem Protokoll von Franke et al. (1978) in Probenpuffer [10 mM Na₂HPO₄, 5% SDS (Fluka), 10% β-Merkaptoäthanol (Merck, München, BRD), 10% Glycerin (Fluka) und 0.01% Bromphenolblau (Sigma), pH 7.2] gelöst. Die Zytokeratine wurden mit Hilfe der Western-Blot-Methode (Towbin et al., 1979) analysiert. Die Proteine wurden zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7.5%, Laemmli, 1970) aufgetrennt (Mini-Gelelektrophorese Apparat, SE 250 Mighty Small II, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) und danach entweder mit Coomassieblau (0.25%) gefärbt oder elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert (SemiPhor TE 70 Transferkammer, Hoefer; Achtstaetter, 1986). Als Primärantikörper dienten die monoklonalen Antizytokeratin-Antikörper AE1 (Verdünnung 1:4) und AE3 (Verdünnung 1:100), welche uns von Dr. T. T. Sun, New York University School of Medicine, New York, NY 10016 zur Verfügung gestellt wurden (Woodcock-Mitchell et al., 1982; Weiss et al., 1984; Sun et al., 1985).

Als Sekundärantikörper diente ein aus Ziegen Serum gewonnener, Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:50.

Messung der Biotinkonzentration im Kulturmedium

Die Biotinkonzentration des Mediums wurde mit einer mikrobiologischen Methode (Lactobacillus plantarum; Schull und Peterson, 1943; Frigg und Brubacher, 1976) in den Labors der Firma Hoffmann-La Roche in Basel bestimmt. Die jeweiligen Mediumproben waren identisch mit den entsprechenden Kulturmedien ausser, dass keine Antibiotika zugegeben wurden. Die Biotinkonzentration des Kontrollmediums, das als einzige Biotinquelle fetales Kälberserum (10%) enthielt, betrug ~10 nM (7.2–10 nM). Die Biotin-supplementierten Medien enthielten ~1 µM (0.75–1.2 µM) und ~100 µM (60–100 µM) Biotin.

RESULTATE UND DISKUSSION

Nachweis der Keratinproduktion von HaCaT-Zellen in Kultur

Abbildung 2.1. zeigt Form und Anordnung der konfluenten HaCaT-Zellen nach sieben Tagen in Kultur. Die polygonalen, in ihrer Grösse sehr unterschiedlichen Zellen bildeten Aggregate mit im Zentrum erhöhter Zelldichte. Einige dieser einschichtigen Zellgruppen umschlossen grosskernige Zellen. Im Lichtmikroskop konnte bis zu diesem Zeitpunkt keine Mehrschichtigkeit und keine Hornplättchenbildung festgestellt werden.

Rhodanilblau färbt das Keratin verhornender Epidermiszellen in Kultur violett (Rheinwald und Green, 1975). Wie aus Abbildung 2.2. ersichtlich ist, färbten sich vor allem die Zentren der Zellaggregate stark an. Die gleiche Beobachtung wurde auch mit Anilin-Orange G, einer weiteren spezifischen Keratinfärbung (Ayaub und Shklar, 1963), gemacht (Abb. 2.3.). Damit konnten wir zeigen, dass HaCaT-Zellen unter unseren Kulturbedingungen Keratin produzieren. Allerdings gelang es uns nicht, mit histochemischen Methoden einen Einfluss von Biotin auf die Keratinexpression nachzuweisen.

Analyse des Zytokeratinmusters von HaCaT-Zellen

Wir entschlossen uns deshalb, den Einfluss von Biotin auf das Zytokeratinmuster von HaCaT-Zellen mit Hilfe der Western-Blot-Technik zu analysieren. Die Zellen wurden während sieben Tagen in Kontrollmedium (10 nM Biotin) oder in

Abb. 2: Histologische und histochemische Färbungen konfluenter HaCaT-Zellen in Kultur.

1: Hämalaun-Eosin-Färbung. Der Pfeil zeigt auf das Zentrum eines Zellaggregates mit grosskernigen Zellen; 2: Rhodanilblau-Färbung. Das exprimierte Keratin der HaCaT-Zellen wird violett angefärbt; 3: Anilinblau-Orange G färbt Keratin rot. Die Pfeile zeigen auf die stark gefärbten Zentren der Zellaggregate; Balken = 200 μm .

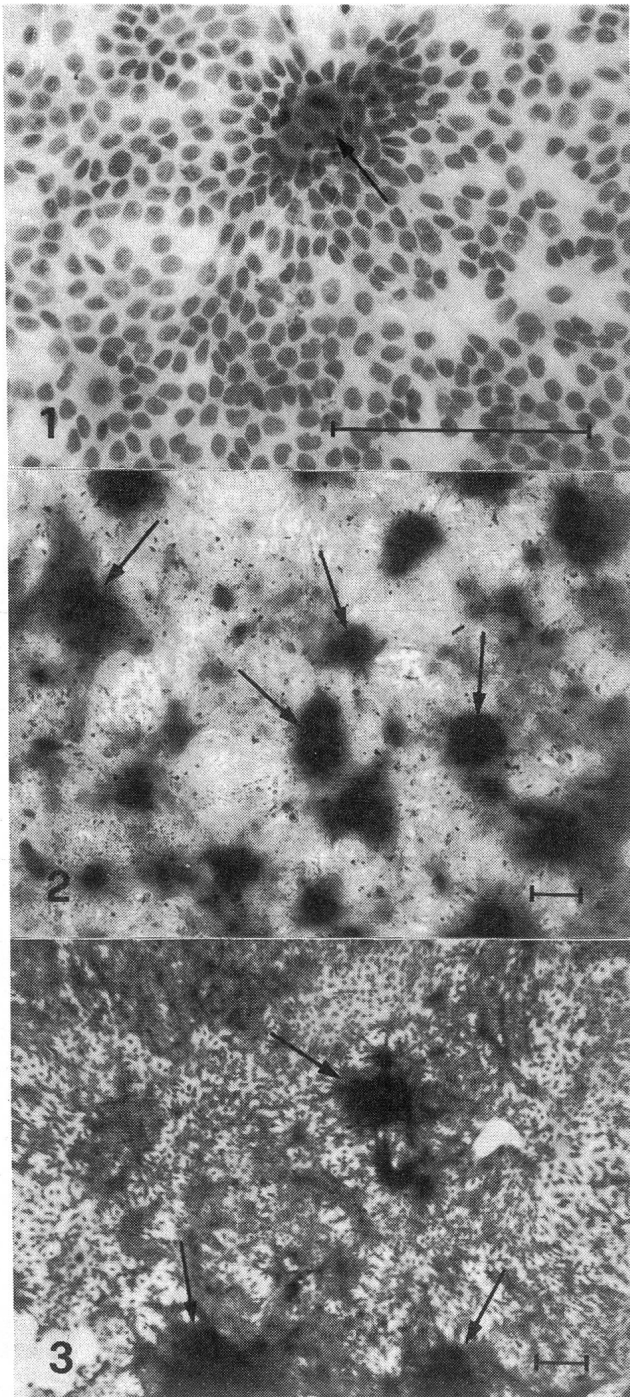
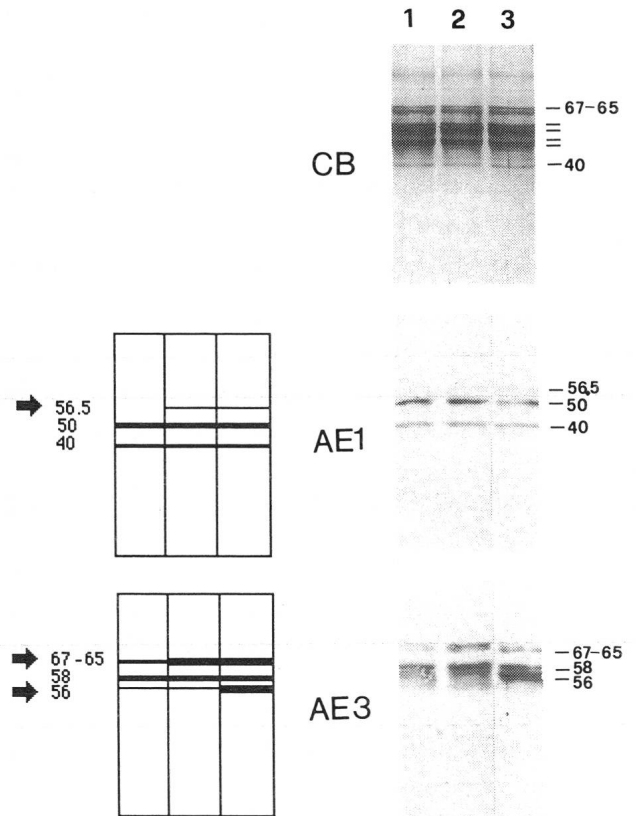


Abb. 3: Das Zytokeratinmuster von HaCaT-Zellen in Kultur. Die HaCaT-Zellen wuchsen während sieben Tagen in supplementiertem DMEM (10% FCS). Die extrahierten Zytoskelettproteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassieblau (CB) gefärbt oder mit monoklonalen Antikörpern gegen humane Zytokeratine (AE 1, AE 3) mittels Western-Blot-Methode analysiert. Kolonne 1: 10 nM Biotin. Kolonne 2: 1 μM Biotin; Kolonne 3: 100 μM Biotin; CB: Die Balken auf der rechten Seite bezeichnen von oben nach unten folgende Proteinbanden: 67–65, 58, 56, 50, 48, 40 kD; AE 1: Biotin induziert das Differenzierungskeratin 56.5 kD (Pfeil); AE 3: Biotin stimuliert die Expression der Differenzierungskeratingruppe 67–65 kD und des Hyperproliferationskeratins 56 kD (Pfeile). (Vgl. Tabelle)



supplementiertem Medium (1 bzw. 100 μM Biotin) inkubiert und die Zytoskelett-Proteine nachher isoliert. Die Coomassieblau-Färbung des Gels nach der Elektrophorese (Abb. 3, CB) zeigte bei allen Versuchsbedingungen sechs Hauptbanden (67, 65, 58, 56, 50 und 48 kD). Schwächere Banden waren bei 62, 46, 42 und 40 kD sichtbar. Untersuchungen mit den monoklonalen Antizytokeratin-Antikörpern AE1 und AE3 (Woodcock-Mitchell et al., 1982) ergaben, dass die Mehrzahl dieser Proteine Zytokeratine sind (Abb. 3, Kolonne 1). Bei erhöhten Biotinkonzentrationen (Abb. 3, Kolonnen 2 und 3)

WIRKUNGEN VON BIOTIN AUF EPIDERMISZELLEN

Tab. 1: Zytokeratin-Expressionsregeln (Sun et al., 1985): Es werden nur die Zytokeratine erwähnt, die in HaCaT-Zellen exprimiert werden.

Zytokeratine [kD]	Marker für	Vorkommen
56.5 / 65–67	Verhornung Epidermale Differenzierung	<ul style="list-style-type: none"> – suprabasale, differenzierte Epidermiszellen – verhornende Epidermiszellen in Kultur – embryonale Epidermis vor der Verhornung – verhornende Epithelzellen (Vitamin-A-Mangel)
50 / 58	Keratinocyten mehrschichtiger Epithelien	<ul style="list-style-type: none"> – mehrschichtige Epithelien – embryonale Epidermis (einschichtig) – kultivierte Epidermiszellen (Monolayer)
48 / 56	Hyperproliferation Dedifferenzierung	<ul style="list-style-type: none"> – hyperproliferierende Hautkrankheiten – kultivierte Keratinocyten – epitheliale Karzinome
45 / 52.5	Keratinocyten einschichtiger Epithelien	<ul style="list-style-type: none"> – einschichtige Epithelien – transformierte Epidermiszellen – embryonales Periderm
40	Keratinocyten einschichtiger Epithelien	<ul style="list-style-type: none"> – Hauptzytokeratin in einschichtigen Epithelien – in allen übrigen Epithelien in geringer Menge (ausser in terminal differenzierter Epidermis) – transformierte Epidermiszellen

erschien das 56.5 kD Zytokeratin, das unter Kontrollbedingungen (Kolonnie 1) nicht sichtbar war (AE1). Parallel dazu nahm die 65–67 kD Zytokeratingruppe und das 56 kD Zytokeratin zu (AE 3). Die Mengen der Zytokeratine 50 kD, 40 kD (AE1) und 58 kD (AE3) blieben unverändert. Da in jeder Kolonne die gleiche Proteinmenge aufgetrennt worden war, nahm die Menge anderer Zytokeratine ab. Diese wurden jedoch von den verwendeten Antikörpern nicht erkannt und nicht weiter untersucht. Wurden HaCaT-Zellen länger als sieben Tage gezüchtet, so konnte ebenfalls eine stärkere Expression der 65–67 kD Zytokeratingruppe und des 56 kD Zytokeratins beobachtet werden. Das 56.5 kD Zytokeratin wurde dabei nie exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Gemäss den Keratinexpressionsregeln von Sun (Sun et al., 1985; vgl. Tab.) können wir folgern, dass Biotin die Differenzierungs-Zytokeratine (65–67 / 56.5 kD) induziert, während die Marker für Keratinocyten mehrschichtiger Epithelien (50 / 58 kD) von Biotin unbeeinflusst exprimiert werden. Biotin induziert in der Zellkultur Veränderungen im Zytokeratinmuster, welche normalerweise bei der Differenzierung von Epidermiszellen *in situ* zu beobachten sind (Woodcock-Mitchell et al., 1982). Wir schliessen aus unseren Beobach-

tungen, dass Biotin *in vitro* eine differenzierungsinduzierende Wirkung auf epidermale Zellen hat. Es ist zu beachten, dass die wirksamen Biotinkonzentrationen (1 und 100 µM, d. h. 244.31 µg/l und 24.4 mg/l) wesentlich höher waren, als die physiologischen Plasmaspiegel der meisten Tiere und des Menschen (0.7–2.5 nM = 180–600 ng/l; Geyer et al., 1984; Leu, 1987; Friedrich, 1988). Pferde unter Biotintherapie weisen jedoch bis zu hundertfach höhere Plasmakonzentrationen auf (20 µg/l). Biotin dürfte im physiologischen Konzentrationsbereich die klassische Koenzymfunktion ausüben, während pharmakologische Konzentrationen die Differenzierung der Epidermiszellen stimulieren. Allerdings muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Zellen in Kultur weniger Biotin aufnehmen als *in vivo*. Wie Biotin die Expression der Zytokeratine auf molekularer Ebene steuert, bleibt abzuklären. Von Vitamin A ist bekannt, dass es das Muster der exprimierten Zytokeratine in kultivierten Epidermis- und Konjunktivazellen über die Menge translaterbarer mRNS verändert (Fuchs und Green, 1981). Es stellt sich weiter die Frage, ob und bei welchen Plasmakonzentrationen Biotin die Differenzierung von Epidermiszellen *in vivo* stimuliert. Wenn auch Ergebnisse aus Zellkultorexperimenten nur

mit Vorbehalt auf *in vivo*-Verhältnisse übertragen werden dürfen, so kann man auf Grund unserer Resultate doch annehmen, dass die *in vivo* beobachtete therapeutische Wirkung von Biotin auf die Epidermis durch eine direkte Beeinflussung der Epidermiszellen erfolgt. Eine verstärkte Ausdifferenzierung dieser Zellen dürfte *in vivo* zu einer Verbesserung der Epidermisfunktion führen. Dies könnte der Mechanismus für den therapeutischen Effekt von Biotin bei Haut-, Haar- und Hufveränderungen von Nutztieren sein. Die therapeutische Anwendung von Biotin bei Hauterkrankungen und die prophylaktische Applikation zur Verbesserung der Huf- und Klauenqualität ist deshalb nicht nur auf Grund klinischer Beobachtungen, sondern auch aus biochemischer Sicht gerechtfertigt.

LITERATUR

- Achtstaetter Th., Hatzfeld M., Quinlan R. A., Parmelee D. C., Franke W. W.* (1986): Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods in Enzymology* 134, 355–371. — *Aurbach G. D.* (ed.) (1989): «Vitamins and Hormones» 45, 337–385. Academic Press Inc., San Diego, USA. — *Ayaub P., Shklar G.* (1963): A modification of the Mallory connective tissue stain as a stain for keratin. *Oral Surg., Oral Med. & Oral Path.* 16, 580–581. — *Bonjour J. P.* (1977): Biotin in man's nutrition and therapy; a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 47, 107–118. — *Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E.* (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biology* 106, 761–771. — *Böck P.* (ed.) (1989): «Mikroskopische Technik/Romeis. Neubearb.», Verlag: Urban und Schwarzenberg, München. — *Bryant K. L., Kornegay E. T., Knight J. W., Webb K. E., Notter D. R., Notter Jr.* (1985): Supplemental biotin for swine. *J. Anim. Sci.* 60, 136–162. — *Cooke B. C., Brumby P. E.* (1982): Proceedings of Roche Symposium, London, 21–26. — *Franke W. W., Weber K., Osborn M., Schmid E., Freudenstein Ch.* (1978): Antibody to prekeratin. *Exp. Cell Research* 116, 429–445. — *Friedrich W.* (ed.) (1988): «Biotin» in «Vitamins», de Gruyter, Berlin–New York, pp. 353–805. — *Frigg M., Brubacher G.* (1976): Biotin deficiency in chicks fed a wheatbased diet. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 46, 314–321. — *Frigg M., Schulze J., Völker L.* (1989): Clinical study on the effect of biotin on skin conditions in dogs. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 131, 621–625. — *Fuchs E., Green H.* (1981): Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25, 617–625. — *Geyer H., Pohlentz J., Völker L.* (1981): Morphologische und histochemische Untersuchungen von Haut, Schleimhäuten und Klauen bei Schweinen mit experimentellem Biotinmangel. *Zbl. Vet. Med. A*, 28, 574–592. — *Geyer H., Schulze J., Streiff K., Tagwerker F., Völker L.* (1984): Der Einfluss des experimentellen Biotinmangels auf Morphologie und Histochemie von Haut und Klauen des Schweines. *Zbl. Vet. Med. A*, 31, 519–538. — *György P., Harris R. S., Langer B. W. I.* (1968): Biotin. in «The Vitamins» (W. H. Sebrell und R. S. Harris, eds.) Vol. 2, 336–350. Academic Press Inc., San Diego, USA. — *Laemmlis U. K.* (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227, 680–685. — *Leu U.* (1987): Vergleichende Untersuchungen über den Einfluss von oral verabreichtem Biotin auf das Hufhorn beim Pferd. Dissertation der Vet. Med. Fakultät der Universität Zürich. — *MacConaill M. A., Gurr E.* (1964): The histological properties of rhodanile blue. *Irish J. Med. Sci.* 462, 243–250. — *Moscona H. N.* (ed.) (1987): «Current Topics of Developmental Biology» Vol. 22, Academic Press Inc., San Diego, USA. — *Rheinwald J. G., Green H.* (1975): Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 6, 317–330. — *Schull G. M., Peterson W. H.* (1943): Improvements in the Lactobacillus casei assay for biotin. *J. Biol. Chem.* 151, 201–209. — *Stryer L.* (ed.) (1988): «Biochemistry» 3. Aufl. W. H. Freeman and Company, New York. — *Sun T. T., Tseng Scheffer C. G., Huang Andrew J.-W., Cooper D., Schermer A., Lynch M. H., Weiss R., Eichner R.* (1985) in «Intermediate Filaments» (Wang E., Fischman D., Liem R. K. H. und Sun T. T., eds.). Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 455, 307–329. — *Sweetman L., Suhr L., Nyhan W. L.* (1979): Deficiencies of propionyl CoA and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase in a patient with dietary deficiency of biotin. *Clin. Res.* 27, 118A (abstr.). — *Towbin H., Gordon J., Stähelin T.* (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354. — *Weiss R. A., Eichner R., Sun T. T.* (1984): Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J. Cell Biology* 98, 1397–1406. — *Whitehead C. C.* (1988): Biotin in animal nutrition. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd., Animal Nutrition and Health, Basle, CH. — *Woodcock-Mitchell J., Eichner R., Nelson W. G., Sun Tung-Tien* (1982): Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell Biology* 95, 580–588.

Effets pharmacologiques de la biotine sur les cellules épidermiques

Une déficience en biotine chez l'animal induit des changements pathologiques de la peau, entre-autres, par exemple une dermite exfoliative, la dépigmentation et l'alopécie. Le sabot de porcs déficients en biotine est mou, cassant et développe souvent une nécrose. Ces effets disparaissent après un régime riche en biotine. L'apport de biotine améliore aussi de façon notable la qualité du sabot de cheval, bétail et de porc, qui ne présentent apparemment pas de déficience en biotine. Afin d'élucider la base moléculaire de ses transformations, l'effet de la biotine sur l'expression de la cytokératine a été étudié dans une lignée cellulaire de kératinocytes (HaCaT) au moyen de techniques électrophorétiques et immunologiques.

Des concentrations pharmacologiques de biotine de 1 µM et 100 µM dans le milieu cellulaire entraînent une élévation

WIRKUNGEN VON BIOTIN AUF EPIDERMISZELLEN

spécifique de l'expression des cytokératines, qui est normalement induite lors de la différenciation terminale des cellules de l'épiderme in vivo. L'expression des cytokératines dans l'épithélium stratifié, indépendante de la différenciation n'est pas affectée. Ces résultats montrent que la biotine stimule directement la différenciation des cellules de l'épiderme. Un tel mécanisme, mis en évidence en culture cellulaire expliquerait les effets thérapeutiques sur la qualité du sabot des animaux de ferme lors de l'utilisation de doses pharmacologiques de biotine.

Effetti farmacologici della biotina su cellule epidermiche

Alopecia, depigmentazione, dermatite esfoliativa sono esempi di malattie della pelle e degli organi annessi, causate da una deficienza di biotina negli animali. L'unghia dei maiali con deficienza di biotina, risulta essere molle, fragile e spesso necrotica. Aggiunta di biotina nella dieta, elimina questi cambiamenti. La qualità dell'unghia di maiali, bovini e cavalli senza apparente deficienza di biotina, fu evidentemente migliorata dall'aggiunta di biotina nella dieta. Per determinare le basi molecolari di quest'azione, abbiamo utilizzato metodi immunologici e di separazione elettroforetica, per studiare per l'effetto della biotina sull'espressione di citocheratina in una linea di cheratinociti (HaCaT).

Concentrazioni farmacologiche di biotina (1 μM e 100 μM) nel mezzo nutritivo della coltura cellulare, portò ad un aumento specifico delle citocheratine normalmente indotte, in vivo,

durante la differenziazione finale di cellule epidermiche. L'espressione di citocheratine la cui sintesi in epiteli stratificati è indipendente dalla differenziazione, rimase invariata. Questi dati dimostrano come la biotina stimoli direttamente la differenziazione di cellule epidermiche. Tale meccanismo, osservato nell'ambito di culture cellulari, potrebbe fornire la spiegazione degli effetti terapeutici di dosi farmacologiche di biotina, sulla qualità dell'unghia in animali da produzione.

DANK

Die vorliegende Arbeit wurde unterstützt durch Forschungsbeiträge der F. Hoffmann-La Roche & Co., CH-Basel, und des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Wir danken Herrn Prof. Dr. P. Cerutti, ISREC, CH-Epalinges, für das Überlassen der HaCaT-Zellen, Herrn Prof. Dr. T.T. Sun, New York, für die Antikörper AE1 und AE3, den Herren Dr. K. Strub und Dr. J. Schulze der F. Hoffmann-La Roche & Co., CH-Basel, für die Unterstützung und die Biotinbestimmung, und dem Veterinärpathologischen Institut der Uni Zürich (Prof. Dr. A. Pospischil) für die Beratung und Hilfe beim histochemischen Keratinnachweis.

Adresse: PD Dr. Felix R. Althaus
Institut für Pharmakologie und Biochemie
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich

Manuskripteingang: 23. November 1990

Jetzt mit dem ersten PC-gesteuerten Röntgen-Generator der Welt

Mit Fr. 14.50 sind Sie dabei:

Mit unserem **neuen Röntgen-Vertriebs-System** berappen Sie **nachträglich** nur die ausgeführten Expositionen zu Fr. 14.50. Interessiert Sie diese risikofreie Beschaffung einer Röntgeneinrichtung, mit Service und **Vollgarantie**?

Bitte verlangen Sie unverbindlich unser Angebot für eine betriebsbereite, komplette Röntgenanlage mit Dunkelkammereinrichtung.

Vorteile: keine Kapitalinvestition; Vollgarantie während der Vertragsdauer. Nach 8 Jahren sind Sie Besitzer der kompletten Röntgeneinrichtung.

Revidierte Occasions-Röntgenanlage,
500 mA, 125 kV, Buckystand, fahrbarer Tisch, Fr. 19 000.-

R. Liehti AG, Röntgen, 2075 Thielle, Tel. 032 88 21 27

NEU!

