

## 6. Zusammenfassung

Reaktive sauerstoffspezies (ROS)-vermittelte Reaktionen (oxidativer Stress) spielen eine Rolle bei pathophysiologischen Hautkrankheiten, wobei der Einfluß der ROS auf zellbiochemische Vorgänge von Patienten mit atopischer Dermatitis noch weitestgehend ungeklärt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von oxidativem Stress in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu normalhäutigen Spendern mit zellbiologischer und biochemischer Methodik analysiert.

Primäre Dermisfibroblasten der beiden Spenderkollektive zeigten im ungestressten Grundzustand bereits gravierende Unterschiede im Status der zellulären Redoxhomöostase. Die dermalen Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis wiesen einen erhöhten zellulären Peroxidgehalt und ein verringertes Mitochondrienmembranpotential (MMP) auf, daß allerdings keinen Einfluß auf den intrazellulären ATP-Spiegel hatte. Untersuchungen zum Einfluß dieser Befunde auf redoxregulierte Signaltransduktionskaskaden ließen erkennen, daß sowohl die Tyrosinkinase- als auch die Phosphotyrosinphosphatase-Aktivitäten der Spender mit atopischer Haut im Vergleich zu den normalhäutigen Spender stärker aktiviert vorlagen. Im Gesamtgehalt an phosphotyrosinpositiven Proteinen bei beiden Spenderkollektiven war kein Unterschied zu erkennen. Bei der Untersuchung der MAP-Kinasen zeigte sich allerdings bei den dermalen Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis eine deutlich stärkere Aktivierung von ERK1/2.

Darüber hinaus wurde ermittelt, welche Reaktionen in den dermalen Zellen der beiden Spenderkollektive durch UVA-Licht (5, 10, 20 J/cm<sup>2</sup>) bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress (0,1, 0,375, 0,75 mM) ausgelöst werden. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress reduzierte bei beiden Kollektiven den Gehalt an freien Thiolen und die Zellvitalität, ferner führte der oxidative Stress zu einer Erhöhung des Gehalts an intrazellulären Peroxiden bei den Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis, aber das MMP blieb unbeeinflusst.

Bestrahlungsversuche mit UVA-Licht zeigten ebenfalls bei beiden Spenderkollektiven eine Beeinflussung der zellulären Redoxhomöostase. UVA-Licht (5, 10, 20 J/cm<sup>2</sup>) reduzierte die Zellvitalität, das MMP und den Gesamtthiolstatus. Im Hinblick auf die Veränderungen der Zellvitalität und des MMPs wurde eine dosisabhängige, höhere Empfindlichkeit gegenüber UVA-Licht in Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis gefunden. UVA-Bestrahlung hatte lediglich auf den intrazellulären ATP-Gehalt bei Spendern mit atopischer Dermatitis einen absenkenden Einfluß. Außerdem wurde in Experimenten mit UVA-Bestrahlung nachgewiesen, daß Vorinkubationen mit Coenzym Q10 (CoQ10) und O-Acetyl-Carnitin (O-AC) protektiv im Sinne einer MMP-Erhöhung bei normalhäutigen Spendern waren, während bei den Spendern mit atopischer Dermatitis durch eine Vorinkubation mit Alpha-Glucosylrutin (AGR) dieser Effekt erreicht wurde. Die Wirkung von UVA-Licht auf redoxregulierte Signaltransduktionskaskaden wurde ebenfalls intensiv analysiert. Die Enzymaktivitäten der Tyrosinkinase wurden durch den oxidativen Stress nur schwach beeinflusst, während die Phosphotyrosinphosphatasen sehr deutlich bei beiden Kollektiven inhibiert wurden. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, daß bei beiden Kollektiven oxidativer Stress in Form einer UVA-Bestrahlung zu einer Erhöhung des Gehalts an phosphotyrosinpositiven Proteinen führte. Die MAP-Kinasen JNK und p38 wurden durch eine Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> bei beiden Spenderkollektiven zusätzlich aktiviert. Die gleiche Bestrahlung hatte allerdings lediglich bei den Spendern mit atopischer Dermatitis eine zusätzliche Aktivierung von ERK1/2 zur Folge. Oxidativer Stress beeinflusste redoxsensitive, zellphysiologische Vorgänge in dermalen Hautzellen von Spendern mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu normalhäutigen Spendern stärker. Eine Vorinkubation mit AGR führte dazu, daß die Auswirkungen der UVA-Bestrahlung auf die Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität und die zusätzliche Aktivierung der ERK1/2-Kinase bei den Spendern mit atopischer Dermatitis verringert wurden. Im Hinblick auf die Modulation dieser wahrscheinlich ROS-vermittelten Vorgänge können die Befunde der vorliegenden *in vitro* Untersuchungen an Fibroblasten neue Wege zur therapeutischen Anwendung auf dem Gebiet der atopischen Dermatitis eröffnen.

## 7. Summary

Reactive oxygen species (ROS)-mediated reactions (oxidative stress) play an important role in pathophysiology of the skin. However the influence of ROS on atopic dermatitis is poorly understood. In this PhD-thesis the influence of oxidative stress on dermal fibroblasts of patients with atopic dermatitis was analysed. The data were compared to volunteers with normal skin was analysed with cell-biological and biochemical methods.

There were significant differences in the cellular redox homeostasis of primary dermal fibroblasts of both donor groups. Dermal cells of volunteers with atopic dermatitis showed enhanced intracellular peroxide levels and decreased mitochondrial membranopotentials (MMP), however intracellular ATP levels were unchanged. Investigations on the influence of these results on redox-regulated signaltransduction cascades showed, that the tyrosine kinase activity as well as the activity of phosphotyrosinephosphatases were enhanced in patient with atopic dermatitis compared to volunteers with normal skin. The level of phosphotyrosine-positive proteins was identical in both donor groups. Investigations on the MAP kinases showed, that dermal cells of patients with atopic dermatitic skin had an enhanced ERK1/2 activity.

Furthermore it was determined, which reactions in dermal cells of both donor groups can be initiated on the one hand through UVA radiation (5, 10, 20 J/cm<sup>2</sup>) and on the other hand through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (0,1, 0,375, 0,75 mM). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress reduced the level of thiols and the cell viability in both donor groups, moreover oxidative stress led to an enhanced level of intracellular peroxides in volunteers with atopic dermatitis, but had no effect on the MMP.

UVA irradiation showed in both donor groups an influence on the redox homeostasis. UVA light (5, 10, 20 J/cm<sup>2</sup>) reduced the cell viability, the MMP and the level of thiols. There was a higher dose-dependent sensitivity to UVA light regarding cell viability and MMP in the fibroblasts of patients with atopic dermatitis. UVA irradiation reduced ATP levels only in atopic dermatitis donors. Besides, it was shown in experiments with UVA irradiation, that preincubation with coenzyme Q10 (CoQ10) and O-acetylcarnitin (O-AC) affect the MMP in a protective way in volunteers with normal skin, while preincubation with alpha-glucosylrutin (AGR) had a protective effect on the MMP of patients with atopic dermatitis. Likewise the effect of UVA light on redox-regulated signaltransduction cascades was thoroughly analysed. The enzyme activities of tyrosine kinases were only slightly influenced by oxidative stress, while the phosphotyrosinephosphatases were strongly inhibited in both donor groups. In this context it was found, that oxidative stress in both donor groups led to increased levels of phosphotyrosine-positive proteins. In addition the MAP kinases JNK and p38 were activated in both donor groups by irradiation with 20 J/cm<sup>2</sup> UVA. The same irradiation only was able to activate ERK1/2 in patients with atopic dermatitis. Oxidative stress influenced, redoxsensible, cell-physiological processes in dermal skin cells of donors with atopic dermatitis compared to donors with normal skin. A preincubation with AGR decreased the effect of the UVA irradiation on the phosphotyrosinekinase activity and the activation of ERK1/2 kinase in patients with atopic dermatitis. With regard to the modulation of these likely ROS-mediated processes the results of the presented investigations on fibroblasts can show new therapeutically approaches in the atopic dermatitis.