

**Einfluß des Sphingomyelin-Zyklus und der MAP-  
Kinasen auf die Differenzierung von Keratinozyten  
humaner gesunder und atopischer Haut.**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
- Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie -

vorgelegt von

**Sabrina Steffen**  
aus Hamburg

Hamburg 2001

Unser Kopf ist rund, damit das Denken  
die Richtung ändern kann.

Francis Picabia

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 1997 bis Februar 2000 unter der Leitung von Professor Dr. Günther Gercken, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Paul-Gerson-Unna-Forschungszentrum der Beiersdorf AG Hamburg, Abteilung Experimentelle Dermatologie durchgeführt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. G. Gercken

**2. Gutachter:** Prof. Dr. R. Bredehorst



# **Inhalt**

<b>I.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
II.1.	AUFBAU UND FUNKTION DER MENSCHLICHEN HAUT	4
II.2.	AUSDIFFERENZIERUNG VON KERATINOZYTEN	7
II.3.	DAS KRANKHEITSBILD DER ATOPISCHEN DERMATITIS	8
II.4.	BIOCHEMISCHER HINTERGRUND ZUR ATOPISCHEN DERMATITIS	12
II.5.	DIE BIOCHEMISCHE RELEVANZ VON SPHINGOLIPIDEN DER MENSCHLICHEN HAUT FÜR DIE BARRIEREEIGENSCHAFTEN DER HORNSCHICHT UND DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION	17
II.6.	WICHTIGE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DER KERATINOZYTEN	22
II.6.1.	AKTIVIERUNG DER MAPK-KINASE	24
II.6.2.	DER SAPK/JNK-SIGNALWEG	24
<b>III.</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>26</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>27</b>
IV.1.	GERÄTE	27
IV.2.	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	28
IV.3.	ANTIKÖRPER	30
IV.3.1.	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	30
IV.3.2.	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	31
IV.3.3.	MOLEKULARGEWICHTSMARKER	31
IV.4.	SICHERHEIT UND ENTSORGUNG	31
IV.5.	MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	32
IV.5.1.	MEDIEN	32
IV.5.2.	LÖSUNGEN UND PUFFER	32
<b>V.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>36</b>
V.1.	IN VITRO-VERSUCHE	36

---

V.1.1.	ZELLKULTUR	36
V.1.2.	ISOLIERUNG VON KERATINOZYTEN AUS HAUTBIOPSIEMATERIAL	36
V.1.3.	IN VITRO-EXPERIMENTE ZUR ÜBERPRÜFUNG ZELLULÄRER FUNKTIONEN	37
<b>V.2.</b>	<b>PROTEINBIOCHEMIE</b>	<b>38</b>
V.2.1.	GEWINNUNG VON ZYTOSOLEXTRAKTEN	38
V.2.2.	PROTEINBESTIMMUNG	38
V.2.3.	POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT	38
V.2.4.	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS SPEZIFISCHER PROTEINE	39
<b>V.3.</b>	<b>EX VIVO-UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>39</b>
V.3.1.	KERATINOZYTENGEWINNUNG AUS SAUGBLASENEPIDERMIS	39
V.3.2.	ISOLIERUNG VON KERATINOZYTEN AUS DER SAUGBLASENEPIDERMIS	40
<b>V.4.</b>	<b>HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>40</b>
V.4.1.	HERSTELLUNG VON KRYOSTATSCHNITTEN	41
V.4.2.	IMMUNDETEKTION VON HISTOLOGISCHEN SCHNITTEN	41
V.4.3.	IMMUNPEROXIDASE FÄRBUNG	42
<b>V.5.</b>	<b>LIPIDANALYSE</b>	<b>42</b>
V.5.1.	LIPIDEXTRAKTION AUS KERATINOZYTEN	42
<b>V.6.</b>	<b>NOTHERN BLOT-ANALYSEN</b>	<b>43</b>
V.6.1.	ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA	43
V.6.2.	GEL-ELEKTROPHORESE	44
V.6.3.	NOTHERN BLOT	44
V.6.4.	DETEKTION VON DIGOXIGENIN-MARKIERTER RNA	45
V.6.5.	DETEKTION DES NOTHERN BLOT	45
<b>VI.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>VI.1.</b>	<b>IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN AN KERATINOZYTEN GESUNDER SPENDER ZU VERSCHIEDENEN EINFLUßGRÖßEN DER PROTEINPHOSPHORYLIERUNG</b>	<b>46</b>
VI.1.1.	CALCIUM-KONZENTRATIONSREIHE	46
VI.1.2.	MAGNESIUM-KONZENTRATIONSREIHE	48
VI.1.3.	INKUBATION VON KERATINOZYTEN MIT TNF- $\alpha$	50
VI.1.4.	INKUBATION VON KERATINOZYTEN MIT ACYL-L-CARNITIN	53
VI.1.5.	N-ACETYL-D-SPHINGOSIN	55
<b>VI.2.</b>	<b>ERMITTLUNG DES ANTEILS EINZELNER LIPIDE VOM GESAMTLIPIDGEHALT IN VITRO- GEWONNENER KERATINOZYTEN</b>	<b>57</b>
VI.2.1.	CERAMIDANTEIL VOM GESAMTLIPIDGEHALT IN VITRO-GEWONNENER KERATINOZYTEN UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSANSÄTZE	57

VI.2.2.	SPHINGOMYLINANTEIL VOM GESAMTLIPIDGEGHALT IN VITRO-GEWONNENER KERATINOZYTEN UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSANSÄTZE	59
VI.2.3.	GLUCOCEREBROSIDANTEIL VOM GESAMTLIPIDGEGHALT IN VITRO-GEWONNENER KERATINOZYTEN UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSANSÄTZE	60
VI.2.4.	PHOSPHATIDYLSERINANTEIL VOM GESAMTLIPIDGEGHALT IN VITRO-GEWONNENER KERATINOZYTEN UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSANSÄTZE	61
VI.2.5.	PHOSPHATIDYLCHOLINANTEIL VOM GESAMTLIPIDGEGHALT IN VITRO-GEWONNENER KERATINOZYTEN UNTERSCHIEDLICHER INKUBATIONSANSÄTZE	62
<b>VI.3.</b>	<b>DIFFERENZIERUNG VON PRIMÄREN KERATINOZYTEN</b>	<b>64</b>
VI.3.1.	ÜBERPRÜFUNG DER DIFFERENZIERUNG ANHAND DES DIFFERENZIERUNGSMARKERS INVOLUKRIN.	64
VI.3.2.	EINFLUß DES DIFFERENZIERUNGSGRADDES AUF DIE EXPRESSION VON NFκ-B	68
VI.3.3.	BEZIEHUNG ZWISCHEN DIFFERENZIERUNGSGRAD UND DER AKTIVITÄT VON MAPK	69
VI.3.4.	EINFLUß VON SPHINGOMYELINASE AUF DIE DIFFERENZIERUNG UND DIE AKTIVITÄT VON ERK1 UND ERK2	72
VI.3.5.	VERDOPPELUNG DER EINGESETZTEN CALCIUMCHLORIDKONZENTRATION ZUR STÄRKEREN DIFFERENZIERUNG DER KERATINOZYTEN	74
VI.3.6.	EINFLUß EINES WASSERLÖSLICHEN KATECHINHALTIGEN EXTRAKTES DES GRÜNEN TEES AUF DIE AKTIVITÄT VON ERK1 UND ERK2 BEI ZUNEHMENDER DIFFERENZIERUNG	75
VI.3.7.	BEZIEHUNG ZWISCHEN DIFFERENZIERUNGSGRAD UND DER AKTIVITÄT VON SAPK/JNK	77
<b>VI.4.</b>	<b>PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS IN PRIMÄREN KERATINOZYTEN VON NORMALER UND ATOPISCHER HAUT</b>	<b>79</b>
<b>VI.5.</b>	<b>EX VIVO-UNTERSUCHUNGEN AN SAUGBLASENEPIDERMIS GESUNDER UND ATOPISCHER HAUT</b>	<b>81</b>
VI.5.1.	DIFFERENZIERUNGSUNTERSUCHUNGEN AN SAUGBLASENEPIDERMIS MITTELS INVOLUKRIN	81
VI.5.2.	ÜBERPRÜFUNG DER AKTIVITÄT VON SAPK/JN-KINASE AN SAUGBLASENEPIDERMIS	83
VI.5.3.	UNTERSUCHUNG DER MAP-KINASEN ERK1 UND ERK2 BEI KERATINOZYTEN AUS SAUGBLASENEPIDERMIS	85
<b>VI.6.</b>	<b>LIPIDZUSAMMENSETZUNG VON KERATINOZYTEN</b>	<b>88</b>
VI.6.1.	VERGLEICH DER LIPIDZUSAMMENSETZUNG GESUNDER HAUT UND NEAE	88
<b>VI.7.</b>	<b>HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>89</b>
VI.7.1.	KONTROLLANTIKÖRPER ANTI-P13 ALS DARSTELLUNGSHILFE FÜR REIN MORPHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE DER GESUNDEN UND DER NICHT-EKZEMATÖSEN HAUT DES ATOPISCHEN EKZEMS (NEAE)	90
VI.7.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG IN DER EPIDERMIS DER GESUNDEN HAUT UND DER NEAE ÜBER IMMUNHISTOCHEMISCHE MARKIERUNG MIT DEN DIFFERENZIERUNGSMARKER INVOLUKRIN UND FILAGGRIN	91

---

VI.7.3.	LOKALISATION DER AKTIVIERTEN MITOGEN-ACTIVATED PROTEINKINASE (PMAPK) IM HISTOLOGISCHEN SCHNITT DER NORMALHAUT UND DER NEAE	92
VI.7.4.	STRESS-ACTIVATED PROTEINKINASE ALS ANTIKÖRPER IN DER HISTOLOGIE IM VERGLEICH ZWISCHEN NORMALER HAUT UND NEAE	93
<b>VII.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>94</b>
<hr/>		
<b>VII.1.</b>	<b>EINFLUßPARAMETER AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG VON KERATINOZYTEN</b>	<b>94</b>
<b>VII.2.</b>	<b>DIFFERENZIERUNG VON PRIMÄREN KERATINOZYTEN</b>	<b>95</b>
VII.2.1.	BEZIEHUNG ZWISCHEN DER DIFFERENZIERUNG UND DER AKTIVITÄT VON MAPK	96
VII.2.2.	BEZIEHUNG ZWISCHEN DER DIFFERENZIERUNG UND DER AKTIVITÄT VON SAPK/JNK	98
<b>VII.3.</b>	<b>STATUSVERGLEICH DER PHOSPHORYLIERUNG AN SERIN-/THREONIN- UND TYROSIN-RESTEN IN KERATINOZYTEN ATOPISCHER UND GESUNDER SPENDER</b>	<b>99</b>
<b>VII.4.</b>	<b>EX VIVO-UNTERSUCHUNGEN AN SAUGBLASENEPIDERMIS GESUNDER UND ATOPISCHER HAUT</b>	<b>99</b>
VII.4.1.	ÜBERPRÜFUNG DER INVOLUKRINEXPRESSION	99
VII.4.2.	ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION UND DER AKTIVITÄT VON SAPK/JNK	101
VII.4.3.	ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION UND DER AKTIVITÄT VON ERK1 UND ERK2	102
<b>VII.5.</b>	<b>HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>103</b>
VII.5.1.	MORPHOLOGIE GESUNDER UND NICHT-EKZEMATÖSER HAUT DES ATOPISCHEN EKZEMS	103
VII.5.2.	DIFFERENZIERUNGSGRAD VON KERATINOZYTEN, AUSGEWERTET AN KRYOSTATSCHNITTEN IN GESUNDER UND NICHT-EKZEMATÖSER HAUT DES ATOPISCHEN EKZEMS (NEAE)	104
VII.5.3.	NACHWEIS VON AKTIVIERTEM ERK1/ERK2 UND SAPK/JNK	105
<b>VII.6.</b>	<b>LIPIDGEHALT VON IN VITRO-GEWONNENEN KERATINOZYTEN</b>	<b>106</b>
<b>VII.7.</b>	<b>LIPIDGEHALT VON EX VIVO-GEWONNENEN KERATINOZYTEN</b>	<b>107</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
<hr/>		
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>111</b>
<hr/>		
<b>VIII.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>112</b>
<hr/>		

## I. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDF	Beiersdorf AG
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAPK	ceramid-aktivierende Proteinkinase
CAPP	ceramid-aktiviertes Phosphatase-Protein
CD	Differenzierungscluster
CDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dT	2'-Desoxy(ribo)-Thymin
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECP	Eosinophilen-Kationische-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Groth Faktor
EPX	Eosinophilenprotein-X
Erk	extrazellulär regulierte Kinasen
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

---

INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
JIP-1	JNK interacting protein-1
JNK	c-Jun-NH <sub>2</sub> -terminale Kinasen
JNK-1	Jun-Kinase
KSFM	Keratinocyte serumfree medium
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAPKK	MAPK-Kinase (= MEK)
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MEK	MAP ERK Kinase (= MAPKK)
MEKK	MEK-Kinase
MG	Molekulargewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MP1	MEK partner-1
MRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEAE	Nicht ekzematöse Haut des atopischen Ekzems
NF $\kappa$ -B	Nuclear factor of the $\kappa$ enhancer B
OD	Optische Dichte
p.a.	Pro analysi
PBS	Phosphate balanced saline
PK-A	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
rpm	Rotation pro minute
RT	Raumtemperatur
S	Sicherheit
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinasen
SBE	Suction Blister Epidermis; Saugblasenepidermis
SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodezylsulfat
Ser	Serin
Smase	Sphingomyelinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEWL	transepidermaler Wasserverlust

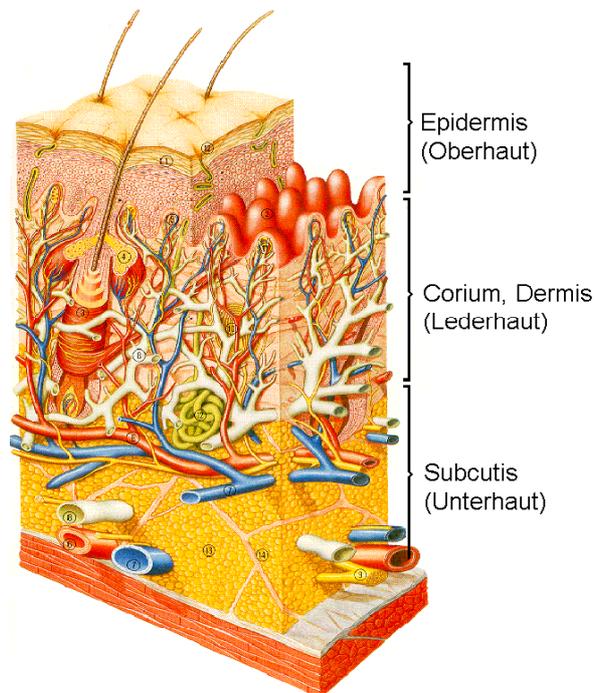
---

TGK	Transglutaminase-Kinase
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktoren
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar
w/o	without (ohne bivalente Ionen)
$\beta$ -ME	$\beta$ -Merkaptoethanol

## II. Einleitung

### II.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut des menschlichen Körpers ist das Abgrenzungsorgan des Organismus zur Umwelt und besitzt als solches eine Kontakt- und Schutzfunktion vor chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Umwelteinflüssen. Sie umfaßt eine Fläche von 1,5-2 m<sup>2</sup>. Ihr Gesamtgewicht beträgt zwischen 3,4 und 10 kg, ca. 8-12% des Körpergewichtes. Ihre Dicke ist abhängig von der Körperregion und schwankt zwischen 1,5 und 4 mm. Die Haut ist morphologisch in verschiedene Schichten untergliedert (Abbildung 1), Subcutis (Unterhautfettgewebe), Dermis (Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut) [Fritsch 1990].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung vom Aufbau der Haut [nach „Die Haut“, Beiersdorf AG].

Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe und eingelagerten Fettzellen. Ihre Hauptaufgaben sind Wärmeisolierung und mechanischer Schutz. Zusätzlich dient sie als Energiespeicher [Niedner 1992].

Die Dermis ist ein fibroelastisches Gewebe von hoher Reißfestigkeit und Elastizität. Sie ist Träger der versorgenden Gefäße und Nerven, sowie Schweiß- und Talgdrüsen. Sie besteht aus einzelnen, ineinander verflochtenen Kollagenfaserbündeln sowie elastischen Fasern. Die

Kollagenfasern sind in der Lage viel Wasser zu binden. Von der oberen Dermis reichen Zapfen (Papillen) in die nächste Gewebsschicht, der Epidermis. Die papilläre Verzahnung ermöglicht über eine vergrößerte Oberfläche den verbesserten Stoffaustausch zwischen den angrenzenden Hautschichten [Fritsch 1990].

Die Epidermis umfaßt nur ca. 3% der gesamten Hautdicke. Sie enthält keine Blutgefäße und wird über die Lymphflüssigkeit versorgt. Keratinozyten sind die zu 90% vorherrschende Zellart der Epidermis. Nur 10% der Epidermiszellen sind Melanozyten, Langerhanszellen, Merkelzellen und wenige Lymphozyten. Die Keratinozyten besitzen außer den üblichen Zellorganellen folgende charakteristische Strukturen: Tonofilamentbündel (Keratinfilament mit mechanischer Funktion), Desmosomen (Kohäsionsstrukturen benachbarter Keratinozyten), Keratohyalinkörper (Vorläufer der Matrixsubstanz des Keratins) und Lammellar Bodies (kleine Zellorganellen lysosomalen Ursprungs, die Lipide und Enzyme des Lipid- und Proteinkatabolismus enthalten) [Niedner 1992].

Die Zellentwicklung der Keratinozyten umfaßt Zellproliferation und Zelldifferenzierung und erfolgt in vier Unterschichten der Epidermis, dem Stratum basale, dem Stratum spinosum, dem Stratum granulosum und der Hornschicht, dem Stratum corneum (Abbildung 2). Alle Schichten sind demnach durch einen unterschiedlichen Reifungszustand der Keratinozyten gekennzeichnet.

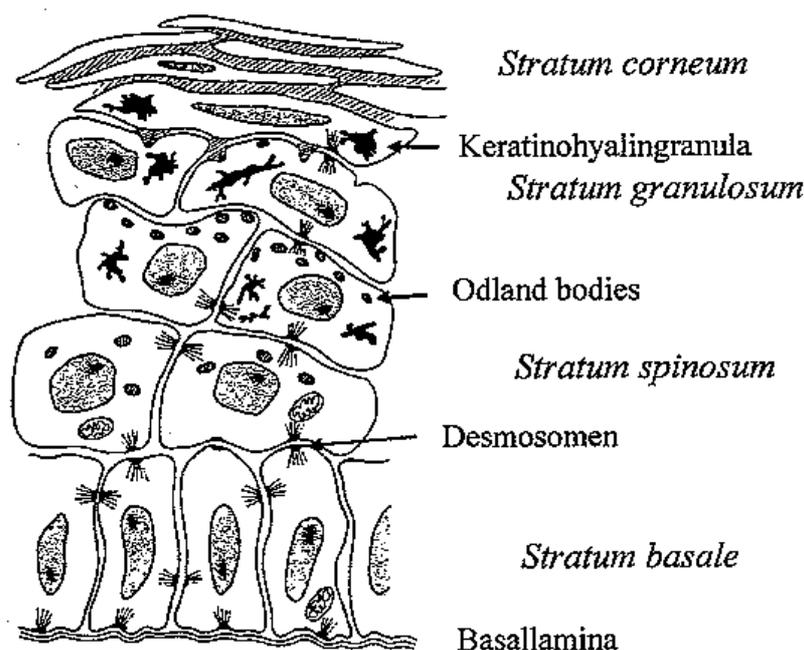


Abbildung 2: Aufbau der Epidermis.

Das Stratum basale besteht aus zylindrischen Zellen und bildet die Grenzschicht zur Dermis. Etwa 5% der in dieser Schicht lokalisierten Keratinozyten sind Stammzellen und mitotisch aktiv. Schon ab dem darüber liegenden Stratum spinosum endet die Proliferation. Die Zellen differenzieren und ändern dabei Morphologie und Stoffwechsel.

Im darüber liegenden Stratum granulosum erfolgt die terminale Differenzierung. Die Zellen der zwei- bis dreilagigen Schicht werden flacher und die Zellkerne beginnen sich aufzulösen. Die Zellen beginnen, im großen Umfang verschiedenartige Ceramide zu synthetisieren und zu lagern. Schließlich setzt ein Verhornungsprozess ein, und die Zellen gehen in die Apoptose über. In der obersten noch vitalen Zellage des Stratum granulosums diffundieren die Lamellar Bodies nach außen, verschmelzen mit der Zellmembran und verteilen ihr Inneres in den Interzellularraum.

Zehn bis 20 Zellagen bilden die letzte und oberste Hautschicht, das Stratum corneum. Die terminal ausdifferenzierten, verhornten und abgestorbenen Zellen dieser äußersten Hautschicht werden Korneozyten genannt. Sie liegen plättchenförmig und ohne Zellkern vor und sind über verhornte Desmosomen (Corneosomen) miteinander verbunden. Im Interstitium des Stützgerüsts aus Korneozyten und Corneosomen befinden sich die von den Lamellar Bodies extrudierten Lipide, die multilamellare Membransysteme ausbilden, welche wiederum für Wasser und Fremdstoffe eine Diffusionsbarriere darstellen. An der Oberfläche wird der Zellverband aus Korneozyten durch proteolytische Auflösung der Corneosomen aufgelockert, die vereinzelt Korneozyten lösen sich schließlich und schuppen sich nach und nach ab. Dieser Vorgang wird auch Desquamation genannt.

Somit besteht in der normalen Haut ein Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Desquamation, eine Rundumerneuerung der Haut innerhalb von 28 – 30 Tagen [Elias 1988, Niedner 1992]. Störungen des Abschuppungsprozesses bedingen das Auftreten größerer Zellaggregate an der Hautoberfläche. Diese Schuppen sind ein wesentliches und für das menschliche Auge sichtbares Merkmal für trockene Hautzustände.

## II.2. Ausdifferenzierung von Keratinozyten

Keratine sind ein Hauptbestandteil terminal differenzierter Keratinozyten-Strukturen. Im Rahmen der Differenzierung erfolgt eine Umschaltung von Keratin 14 und Keratin 5 auf Keratin 10 und Keratin 1 (Abbildung 3). Bei der normalen Differenzierung werden die Keratin-Zwischenfilament-Netzwerke durch Wechselwirkungen mit Filaggrin in eine hochorganisierte Struktur überführt. Gegen Ende der Differenzierung werden unter dem Einfluß einer Transglutaminase (EC 2.3.213) Glutaminyl- und Lysylreste von Proteinen kovalent verknüpft, wodurch die Plasmamembran zunehmend durch eine Zellhülle ersetzt wird. Diese Zellhülle besitzt viele Lipide auf ihrer Außenfläche und den sogenannten Filament-Matrix-Komplex an der Innenfläche.

Die TGK verknüpft außerdem membrangebundene Proteine mit Involukrin, einem Cytoplasmprotein, welches mit zunehmender Differenzierung verstärkt exprimiert wird. Das entstandene Gerüst wird durch Verknüpfung mit anderen Proteinen wie Lorikrin weiter verstärkt.

Bei vielen Dermatosen ist bekannt, daß eine Differenzierungsstörung der Keratinozyten in den verschiedenen Epidermisschichten vorliegt. Patienten mit einer ausgeprägten Psoriasis zeigen eine starke Verdickung der Haut. Bei Hautkrankheiten mit einer verdickten Epidermis zeigt sich, daß die Proliferation der Keratinozyten nicht rechtzeitig gestoppt wird. Insbesondere ekzematöse Hautareale von Atopikern und Psoriatikern ähneln sich morphologisch. Hier liegt der Schluß nahe, daß in beiden Fällen der Differenzierungsprozeß gestört ist. Darüber hinaus weisen auch nicht befallene Hautbezirke bei Atopikern Merkmale der Hyperproliferation, verbunden mit Differenzierungsstörungen auf, die mit einer ausgeprägten Hauttrockenheit einhergehen.

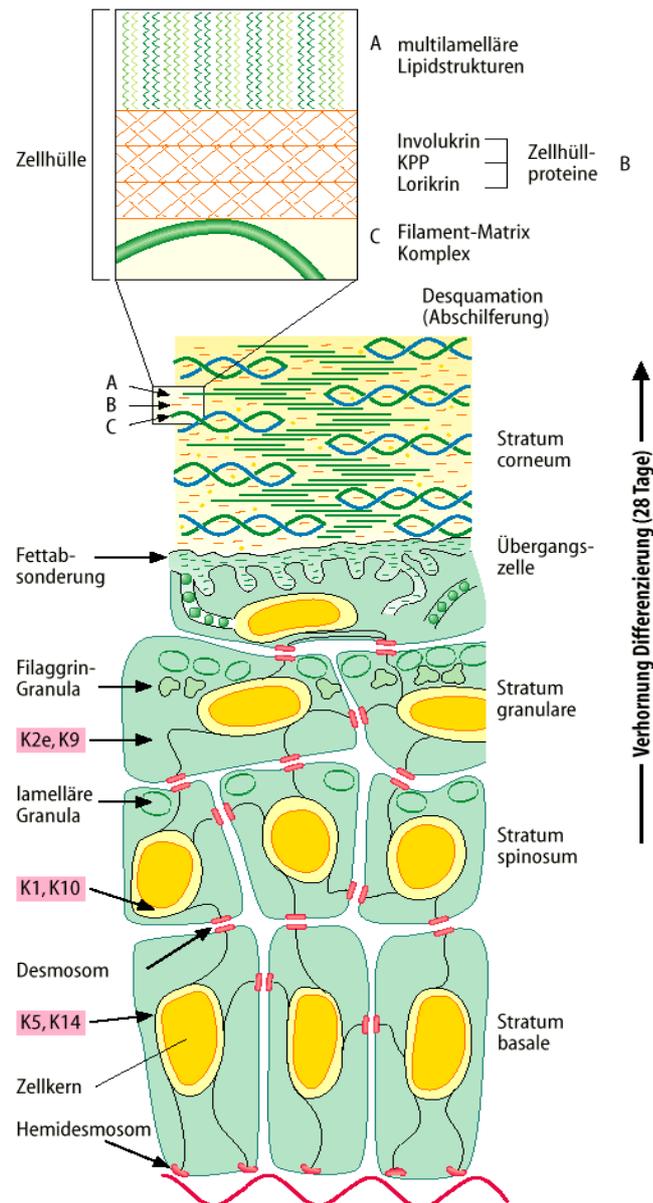


Abb. 26.24 aus Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie 6. Auflage 1998  
 Kap. 26.5: P.E. Petrides: Haut  
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1998

**Abbildung 3:** Keratinozyten-Differenzierungsschema der Haut.

### II.3. Das Krankheitsbild der atopischen Dermatitis

Insgesamt 1/5 der Bevölkerung klagt über Spannungsgefühl, Rötungen, Rhagadenbildung (Hauteinrisse) und / oder starken Juckreiz der Haut. Besonders Kinder und ältere Menschen leiden unter trockener Haut, die sich schuppig und rauh anfühlt. Klinische Erfahrungen zeigen, daß trockene Haut zum Verlust an Elastizität, zu Entzündungsreaktionen und zu gesteigerter Ekzembereitschaft neigt und damit häufig zu einer behandlungsbedürftigen Dermatitis führt.

Als Hauptursache für trockene Haut wird eine Störung der Permeabilitätsbarriere diskutiert, die zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust führt und durch exogene und endogene Faktoren hervorgerufen werden kann (Tabelle 1).

Exogene Faktoren	Endogene Faktoren
<b>Chemische Einflüsse</b> Aggressive Reinigungsmittel Übermäßige Waschgewohnheiten <b>Ernährung</b> Ungenügende Flüssigkeitsaufnahme <b>Umwelt</b> Hitze/ Kälte Luftfeuchtigkeit UV-Strahlung	<b>Erbliche Veranlagung</b> <b>Hautalterung</b> <b>Hormonelle Einflüsse</b> <b>Krankheiten</b> Allergien Diabetes <u>Neurodermitis</u> Psoriasis

**Tabelle 1:** Endogene und exogene Faktoren als Ursache für trockene Haut.

Die häufigsten Hauterkrankungen sind die Schuppenflechte (Psoriasis) und Neurodermitis (atopische Dermatitis). 5 bis 6 Millionen Menschen leiden in Deutschland an Neurodermitis. Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen und ethnischen Gruppen existieren nicht. Es treten jedoch Unterschiede zwischen Landbevölkerung und Städtebewohnern auf, da in Städten die ausgesetzte Konzentration an Allergenen deutlich höher ist [Rothe 1996].

Neurodermitis ist eine oft im Kleinkindalter beobachtete Hauterkrankung. Bei 3 – 4% aller Kinder treten chronisch stark juckende Ekzeme auf, sie leiden an extrem trockener, juckender Haut, häufig in Begleitung von Entzündungen. Die Ekzemschübe werden in der Regel mit den Jahren milder und ca.  $\frac{3}{4}$  der Betroffenen haben mit Abschluß der Pubertät keine oder nur noch geringe Hauterscheinungen [Boguniewicz 1996]. Der Anteil an Betroffenen nach der Pubertät steigt jedoch stetig an. Dieser Anstieg spricht für „äußere“ Provokationsfaktoren dieser Erkrankung [Werfel 1998].

Der Begriff Neurodermitis weist auf neurologische Ursachen hin. Historisch wurde immer wieder versucht die Krankheit als eine klassische psychosomatische Krankheit zu definieren und nachzuweisen, jedoch ohne Erfolg. Die Ursachen sind vielmehr vererbt. Additiv und

manchmal auslösend sind psychische Faktoren [Niemeier 1999, Niemeier 1998], daher wird neuerdings medizinisch der Begriff endogenes Ekzem bzw. atopische Dermatitis verwendet.

Es fällt schwer, die atopische Dermatitis von einer normalen Hautallergie per Definition abzugrenzen. Allgemein ist eine Allergie eine veränderte Reaktionslage des Organismus aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion nach vorausgegangener Sensibilisierung mit einem Allergen. Bei erneuter Einwirkung des gleichen oder eines ähnlichen Allergens tritt eine Reaktion ein, wahrscheinlich infolge erhöhter Histaminproduktion. Eine Allergie kann angeboren sein, jedoch auch erworben werden. Als Atopie hingegen wird die ungewöhnliche Bereitschaft mancher Menschen bezeichnet, welche von vornherein auf bestimmte Substanzen ihrer natürlichen Umgebung in besonderer Weise reagieren. Ein Atopiker ist ein Mensch, dessen Immunsystem übermäßig angeregt ist und zu allergischen Reaktionen neigt. Daher bezeichnet man die Atopie als erbliche Dispositionskrankheit und nicht als Allergie.

Die atopische Dermatitis kennzeichnet ekzematöse Hautveränderungen (Abbildung 4), wobei Hauttrockenheit und starker Juckreiz im Vordergrund stehen. Der extrem starke Juckreiz löst zwanghaftes Kratzen der Haut aus. Die Oberhaut wird abgeschabt und das darunterliegende Gewebe mit der Gewebsflüssigkeit tritt hervor. Durch weiteres Kratzen werden die kleinen Blutgefäße unter der Epidermis verletzt, und es kommt zu punktförmigen Blutungen. An Ellenbeugen, Kniekehlen, Hals, Handgelenke, Augenlider und überall dort wo die Haut stärker gefaltet ist, findet man den starken Juckreiz. Dieser tritt vor allem in Stresssituationen auf.



**Abbildung 4:** *Typisches Erscheinungsbild der Haut bei der atopischen Dermatitis.*

Der die Krankheit begleitende krankhafte Juckreiz ist mit Ausschüttung von Histamin aus den Mastzellen verbunden. Das Histamin gelangt in die Blutbahn, die Blutgefäße werden

erweitert und Blutplasma kann in das an die Blutkanäle angrenzende Gewebe austreten. Die Zellen im Gewebe werden durch das einfließende Plasma auseinandergedrückt, wodurch erneut Juckreiz ausgelöst wird. Als Folge entstehen an der Epidermis die spröden, schuppigen Partien und das darunter liegende Unterhautgewebe wird fester. Diese Faktoren bewirken eine deutliche Hautzeichnung, die Lichenifikation, eine Vergrößerung der Hautfelder. Besonders in der Winter und Frühjahrszeit bilden sich bei Atopikern aufgrund der härteren Witterung vermehrt Lichenifikationen und entzündete Hautareale. An den entzündeten Hautarealen ist eine stärkere Durchblutung, extrem hohe Hauttemperatur und eine erhöhte Neubildung (Proliferation) der Keratinozyten zu beobachten [Roop 1995].

Aufgrund der stark belasteten Haut durch den Juckreiz und der aufgekratzten Wunden ist die Gefahr von begleitenden Infektionen besonders groß. Schädliche Keime können die Haut leichter durchdringen und Viruserreger bzw. Bakterien gelangen tiefer in die Haut. Extrem belastend für den Körper ist z.B. eine zusätzliche Herpes-Virus Infektion, die häufig als Begleitinfektion bei der atopischen Dermatitis auftritt.

Es gibt keinen spezifischen Test für eine atopische Dermatitis [Graham-Brown 1998], lediglich der transepidermale Wasserverlust der Haut durch die Hornschicht und die Wasserbindungsfähigkeit können als Anhaltspunkt und Therapieüberwachung des Hautzustandes ermittelt werden [Manke-Heiman 1999, Cork 1997, Gebhardt 1998]. Der TEWL-Wert ist bei Atopikern deutlich erhöht [Loden 1992, Tupker 1990] und die Wasserbindungsfähigkeit, Hydratation der Hornschicht ist geringer [Rajka 1989]. In den letzten Jahren wurden zusätzlich typische Veränderungen in der Zusammensetzung der Ceramide in der Hornschicht der nicht-ekzematösen Bereiche der Haut der atopischen Dermatitis als klinischer Marker diskutiert [Bleck 1999].

Während die Symptomentstehung des atopischen Asthmas durch die IgE-vermittelte Sofort-Typ-Reaktion weitgehend geklärt ist, sind die Ursachen der atopischen Dermatitis bis heute nicht bekannt. Vor allem ist bisher offen, was der gemeinsame Nenner so unterschiedlicher Erkrankungen wie der Neurodermitis einerseits und des Asthmas bzw. des Heuschnupfens andererseits sein könnte. Diese drei atopischen Krankheitsformen können auch im sogenannten „Etagenwechsel“ ineinander übergehen. Im klassischen Fall wird die initiale Manifestation des atopischen Säuglingsekzems von dem Heuschnupfen abgelöst und geht schließlich in Asthma bronchiale über [Gebhardt 1998, Kissling 1993].

Die atopische Dermatitis ist laut Definition eine erbliche Dispositionskrankheit, ca. 2/3 der Erkrankten entstammen einer mit Atopien (Asthma, Heuschnupfen, atopische Dermatitis) belasteten Familie. Die aus umfangreichen Stammbaum- und Zwillingsuntersuchungen gewonnenen Daten sind mit dem Modell der multifaktoriellen Vererbung mit Schwellenwert zu erklären [Deichmann 1999, Lawson 1998, Schäfer 1998]. Dabei wird die (atopische) Disposition als Summe aller in eine gleiche Richtung weisenden Gene (additive Polygenie) angenommen. Sobald ein von Umweltfaktoren abhängiger und individuell variabler Schwellenwert überschritten wird, schlägt die Disposition in Krankheit um. Atopiker neigen zudem noch zu Lebensmittelallergien [Guillet 1992] und haben allgemein eine herabgesetzte Sensibilisierbarkeit gegenüber Kontaktallergenen [Nolte 1992]. Außerdem haben sie eine hohe Hautrauigkeit [Eberlein-König 1996] und eine verminderte Schweiß- und Talgdrüsensekretion [Parkkinen 1991]. Es wurde eine gestörte Exocytose der lipidreichen Lamellar Bodies beobachtet [Faratsch 1992], welche die Erklärung für ein vermindertes Vorkommen interzellulärer Lipide und Ceramide des Stratum Corneum sein könnte [Imokawa 1991, Melnik 1990].

#### II.4. Biochemischer Hintergrund zur atopischen Dermatitis

Bei der atopischen Dermatitis wurden bisher verschiedene Ansatzpunkte gefunden, die allein jedoch nicht zur völligen Aufklärung des Krankheitsbildes beitragen können. Zahlreiche Studien berichten über eine Dysregulation der humoralen und zellulären Immunantwort bei Patienten mit atopischer Dermatitis. Viele dieser Ergebnisse sind Einzelbefunde und es ist bisher nicht gelungen, diese Befunde in ein biochemisches Gesamtbild einzufügen, um den komplexen pathophysiologischen Prozeß dieser Erkrankung besser verstehen zu können und eine geeignete Therapie für die atopische Dermatitis zu entwickeln.

Aufgrund der trockenen Haut wurde der Metabolismus des Fettstoffwechsels untersucht. Hier zeigte sich besonders bei den ungesättigten Fettsäuren ein gestörter Metabolismus. Die Linolsäure ist im Serum erhöht, wohingegen die Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure und Arachidonsäure vermindert sind. Hier konnte ein Defekt der  $\gamma$ -6-Desaturase aufgezeigt werden, denn dies führt zu einer unzureichenden Verstoffwechslung von Linolsäure zu  $\gamma$ -Linolensäure und Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure [Nolte 1992, Manku 1984]. Außerdem hat die verminderte Aktivität der  $\gamma$ -6-Desaturase Auswirkung auf die Produktion der Prostaglandine und Leukotriensynthese [Nolte 1992].

Einen weiteren Ansatzpunkt stellt das Immunglobulin-E dar. IgE tritt vermehrt bei der Immunantwort allergischer Reaktionen auf. 1978 konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe der IgE-Konzentration und der Schwere der atopischen Dermatitis gezeigt werden [Wüthrich 1978]. Jedoch wurden 1989 Daten über eine Variante der atopischen Dermatitis publiziert, die nicht mit einer erhöhten IgE-Antwort in Verbindung zu bringen sind [Wüthrich 1989, Nolte 1992]. Diese Form wird „intrinsische“ Form der atopischen Dermatitis genannt und entspricht ca. 20% des betroffenen Kollektivs [Werfel 1998]. Bei der intrinsischen Form der Erkrankung liegt eine Eosinophilenaktivierung vor, jedoch ohne Nachweis erhöhter IgE-Antikörper im Gegensatz zu der extrinsischen Form [Kägi 1994]. Ein hoher IgE-Spiegel ist somit nicht aussagekräftig für den absoluten Nachweis einer Atopie. Aufgrund des erhöhten Vorkommens von IgE wurde vermutet, daß die Fc-Bindungsregion des IgE bei Atopikern Unterschiede zu normalem IgE aufweist. Dies wurde jedoch mit einem Sequenzvergleich widerlegt [Rutz 1997].

Patienten mit atopischer Dermatitis und erhöhtem IgE-Spiegel besitzen außerdem mehr CD-4-T-Zellen als Probanden mit normaler Haut. Ein erhöhter IgE-Spiegel kann durch die Zugabe von CD8-T-Zellen unterdrückt werden. Durch das Entfernen von CD4-Zellen konnte die Konzentration an IgE ebenfalls verringert werden. Aus diesen Befunden läßt sich die Vermutung ableiten, daß die erhöhte Anzahl antigen-präsentierender Zellen und die T-Zell-Aktivierung in Zusammenhang stehen. Hinzu kommt, daß die Lymphozytenproliferation herabgesetzt ist, vor allem T3<sup>+</sup>- und T8<sup>+</sup>-Lymphozyten treten vermindert auf [Nolte 1992]. Auch wurden im Blut von Atopikern numerische und funktionelle Störungen von zytotoxischen Lymphozyten und von T-Suppressorzellen, neben Defekten der Monozyten und Neutrophilen-Chemotaxis beobachtet. Diese spielen eine mögliche Rolle bei der zusätzlich erhöhten Infektionsgefahr dieser Patienten [Kapp 1995]. Staphylococcus aureus ist bei 90% aller Patienten auf der Haut nachweisbar [Werfel 1998, Skov 1996, Cork 1996, Abeck 1998]. Diese Bakterien tragen Exotoxine, welche als Allergene und als Superantigene fungieren können. Sie binden an MHC-Klasse-II Moleküle von Langerhanszellen oder Monozyten und rufen die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 und TNF- $\alpha$  hervor [Strange 1996].

Sämtliche Zytokine wurden für eine mögliche Dysregulation der zellulären Immunantwort untersucht. In den Überständen von mononukleären Zellen bei AD-Patienten wurden signifikant weniger Interleukin 2 und weniger Tumor-Nekrose-Faktoren nach Stimulation

nachgewiesen [Kapp 1987, 1990]. Auch produzieren die aus Ekzempläsionen gewonnenen T-Zellklone zum großen Teil größere Mengen an IL-4 oder IL-5 [Sager 1992, van Reijssen 1992]. Ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von IL-4 und der verminderten Expression von Interferon- $\gamma$  wurde ebenfalls bestätigt [Grewe 1994, Grewe 1995, Hamid 1994, Thepen 1996]. IL-4 spielt bei der Regulation der IgE Produktion eine zentrale Rolle, vor allem bei dem Wechsel von IgM- zur IgE-Produktion in B-Lymphozyten. Eine Mutation in der  $\alpha$ -Untereinheit des IL-4 Rezeptors wurde vermehrt bei Menschen mit einem erhöhten IgE-Spiegel (über 95 IgE pro ml) gefunden. Das Allel des  $\alpha$ -Interleukin-4-Rezeptors trägt bei diesen Personen eine Mutation an der Position 576. Bindet IL-4 an den Rezeptor, so stimuliert dieser die Produktion des IgE-Rezeptors CD 23. Die Mutante des  $\alpha$ -Interleukin-4-Rezeptors zeigt sich hierbei besonders leistungsfähig, sie stimuliert die CD 23-Produktion stärker als der Wildtyp. Durch diese Überexpression wird die IgE vermittelte Immunantwort verstärkt und eine allergische Überempfindlichkeit begünstigt [Hershey 1997].

Von großer Bedeutung sind neben der IgE-Regulation auch die Effekte von Zytokinen auf die lokale Entzündungsantwort. So kann IL-4 die Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen stimulieren und beeinflusst somit Adhäsionsmechanismen von Leukozyten bei der allergischen Reaktion. Auch auf mRNA-Ebene wurden mit immunhistologischen Methoden Hinweise auf eine erhöhte Expression von IFN- $\gamma$  in chronischen Läsionen der atopischen Dermatitis gefunden [Grewe 1995, Hamid 1994, Thepen 1996]. Bei dem Verlauf einer atopischen Dermatitis konnte ein Wechsel im Zytokinmuster nachgewiesen werden. Somit hat die hohe Sekretion an IL-4 möglicherweise nur in der Initialphase der atopischen Dermatitis eine essentielle Bedeutung, wohingegen während der Entzündung IFN- $\gamma$  maßgeblich für die Unterhaltung der Entzündungsantwort sein könnte [Werfel 1998]. Die Hochregulierung von IgE könnte in der Anfangsphase der Dermatitis durch die reduzierte Produktion von INF- $\gamma$  gefördert werden, da INF- $\gamma$  normalerweise IgE herunterreguliert [Bos 1992, Penne 1988, Tang 1994]. Dieser Wechsel im Zytokinmuster bei akuten und chronischen Ekzemen zeigte sich auch bei den allergenspezifischen T-Lymphozyten [Werfel 1996]. IFN- $\gamma$  hat somit in der entzündeten Haut eine besondere Bedeutung. IFN- $\gamma$  induziert wie auch Allergene und Superantigene die Bildung von MHC-Klasse-II-Moleküle, die außer auf Langerhanszellen auch auf Keratinozyten als Zeichen der Aktivierung gefunden werden. Keratinozyten exprimieren unter dem Einfluß von IFN- $\gamma$  auch das Adhäsionsmolekül ICAM-1, das in

löslicher Form je nach Schweregrad der atopischen Dermatitis im Blut nachgewiesen werden kann [Wüthrich 1995].

Histologisch ähneln die Hautläsionen bei der atopischen Dermatitis denen einer allergischen Kontaktdermatitis [Kapp 1995]. Die Keratinozyten in befallener atopischer Haut zeigen wie bei einer Kontaktdermatitis eine lokale Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. Akute Läsionen zeigen einen unterschiedlichen Grad der Hypogranulation, wobei eine signifikant erhöhte Anzahl an vollgranulierten Mastzellen in subakuten Läsionen lichenifizierter Haut nachzuweisen ist [Kapp 1993].

Weiterhin weisen Patienten mit einer atopischen Dermatitis eine Bluteosinophilie auf. Eosinophile werden durch IL-5 aktiviert [Kapp 1993]. IL-5 ist allgemein für die Eosinophilendifferenzierung, -proliferation und -aktivierung verantwortlich und entfaltet seine Aktivität besonders am Ort der Entzündung. IL-5 trägt zur verlängerten Überlebenszeit von eosinophilen Granulozyten von Atopikern bei [Wedi 1997]. Im Blut finden sich hohe Eosinophilenzahlen mit erhöhten Aktivierungszuständen bei der extrinsischen wie auch bei der intrinsischen Variante der atopischen Dermatitis [Kägi 1994].

Im Ablauf entzündlicher Prozesse spielt das Eosinophilen-Kationische-Protein eine wesentliche Rolle. ECP ist in den Granula der Eosinophilen enthalten und wird im Verlauf einer allergischen Reaktion freigesetzt. Es ist in der Lage, die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen zu stimulieren und die Zerstörung von Epithelzellen und möglicherweise auch von Keratinozyten zu veranlassen. Die ECP-Konzentration im Serum von Atopikern sind signifikant erhöht [Czech 1992, Kägi 1992, Kapp 1991, Walker 1993]. Wahrscheinlich reflektieren erhöhte ECP-Konzentrationen den Aktivierungsgrad des gesamten Eosinophilenpools. Der ECP-Spiegel ist somit geeignet, den Krankheitsgrad bei Patienten mit atopischer Dermatitis zu charakterisieren. Er korreliert mit der Schwere des Krankheitsbildes und fällt stark ab, wenn das Krankheitsbild sich verbessert. [Czech 1992, Kapp 1991]. Dies spricht für eine Korrelation zwischen der klinisch sichtbaren Entzündung und der Eosinophilenaktivität. Als weiteres Merkmal des Krankheitsverlaufs kann das Eosinophilenprotein-X dienen, welches mit der Eosinophilenaktivität im Blut korreliert und dessen Konzentration auch im Urin gemessen werden kann. Dies wäre als Verlaufskontrolle der Krankheit geeignet [Kristjansson 1996].

Weitere Mediatoren, die bei einer florierenden atopischen Dermatitis in erhöhter Konzentration nachweisbar sind, sind die lösliche Form der IL-2-Rezeptoren aus aktivierten Lymphozyten [Kägi 1992, Wüthrich 1992], ELAM-1 aus Endothelzellen [Czech 1996], lösliches CD14-Antigen aus aktivierten Monozyten [Wüthrich 1992] und, wie bereits erwähnt, lösliches ICAM-1 [Wüthrich 1995].

Durch Haptene ausgelöste Kontaktallergien zeigen einen erhöhten Anteil an epidermalen Zytokinen wie IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL12. Ebenso reagieren Atopiker auf den Kontakt mit Hausstaub (HDM). Auch hier zeigte sich eine Erhöhung der m-RNA dieser Zytokine in der Epidermis, welche bei gesunden Menschen nicht auftritt [Junghans 1998].

Ebenso wurden inflammatorische Mediatoren wie Histamin und Metabolite der Arachidonsäure (Eicosanoide) kontrolliert. Bei Atopikern wurde ein erhöhter Spiegel an Eicosanoiden gefunden, außerdem eine größere Anzahl an Mastzellen und ein höherer Haut- und Plasmahistamingehalt im Vergleich zu normaler Haut. In vitro konnte gezeigt werden, daß Mastzellen von Atopikern als Antwort auf die Bindung von IgE mehr Histamin freisetzen. Diese Histaminfreisetzung kann außerdem durch eine Reihe weiterer Stimuli beeinflusst werden, wie z.B. Zytokine, Hitze, Druck und UV-Licht. Die hauptregulative Eigenschaft des Histamins kommt jedoch dem intrazellulären cAMP zu. Entzündungsmediatoren wie Histamin und Prostaglandin haben gemein, daß sie die Fähigkeit besitzen an Zelloberflächen-Rezeptoren zu binden, die mit der Adenylatcyclase in Verbindung stehen. Atopiker zeigen eine defekte cAMP-vermittelte Signalantwort, so daß die verminderte leukozytäre cAMP-Konzentration die Zytokinproduktion erhöht [Gebhardt 1998]. Zudem ist die inhibitorische Wirkung der Prostaglandine auf IL-1 geschwächt. So kann es außerdem zu einer erhöhten Bildung von IL-1 kommen.

Generell zeigen die Zellen in erkrankter Haut eine gestörte Fähigkeit, Signale weiterzuleiten. Die Expression der zellulären Adhäsionsmoleküle ist gleichermaßen gesteigert, extrem jedoch in den Fällen, in denen der second messenger cAMP involviert ist [Gebhardt 1998]. Die fehlgesteuerte cAMP-Antwort in den Zellen von Atopikern ist vielleicht auch für das Fehlen der histamin-induzierten Downregulation der hypersensiblen Haut verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, daß der Grundstatus der Protein-Phosphorylierung in mononuclearen Leukozyten doppelt so hoch erscheint wie der bei gesunden Probanden. Bei gesunden

Leukozyten wurde die Aktivität der Proteinkinasen, nach Zugabe von Histamin stark gesteigert. Bei Atopikern zeigte eine Histamingabe jedoch keine Wirkung auf die Zellen.

Die zunehmende PK-A Aktivität bei Atopikern und histamin-gestrebten normalen Zellen korreliert mit dem hohen Vorkommen an cAMP-spezifischer Diesterase, PDE. Eine hohe Aktivität der cAMP spezifischen Phosphodiesterase, spricht auch für die niedrige intrazelluläre cAMP-Antwort in atopischen Leukozyten. Ebenfalls für eine Störung des cAMP-Stoffwechsels spricht die verstärkte Reaktivität des  $\alpha$ -adrenergischen Rezeptors und ein Defekt des  $\beta$ -adrenergischen Rezeptors [Nolte 1992].

Anhand der Vielzahl der publizierten Daten über die atopische Dermatitis , welche jedoch oft als Einzelergebnisse zu interpretieren sind, wird die hohe Komplexität dieser weit verbreiteten Hautkrankheit ablesbar.

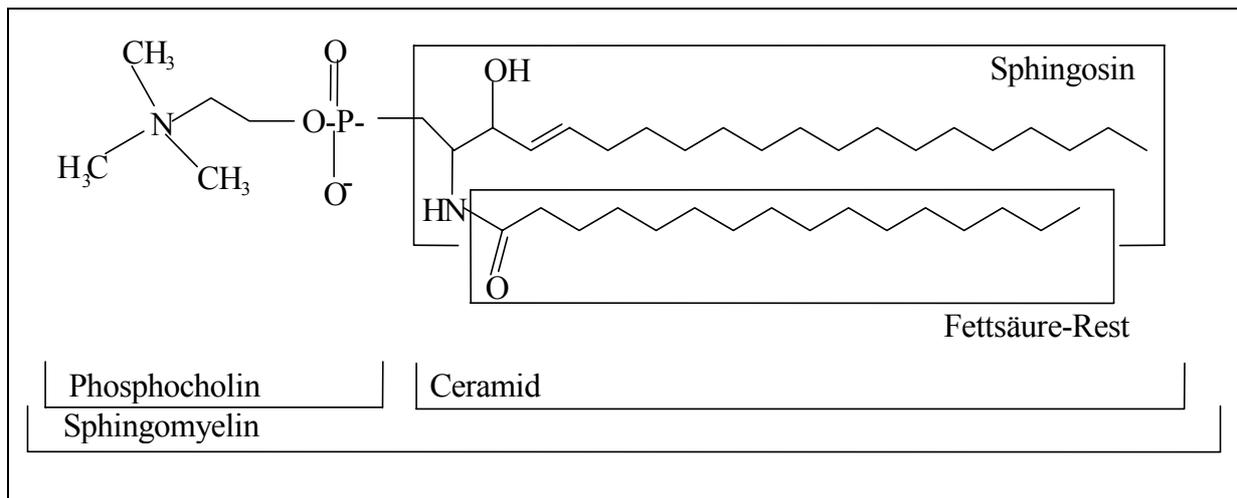
#### II.5. Die biochemische Relevanz von Sphingolipiden der menschlichen Haut für die Barriereeigenschaften der Hornschicht und die intrazelluläre Signaltransduktion

Der Barrierschutz des Stratum corneum ist eng mit der Anwesenheit von Lipiden verknüpft, die im gesamten Extrazellulärraum multilamellar angeordnet sind [Holleran 1991]. Die ausschließlich aus Neutrallipiden aufgebauten Membransysteme zeichnen sich durch eine geringe Wasserdurchlässigkeit aus und bilden die Permeabilitätsbarriere des Körpers. Lipide werden in den differenzierten Keratinozyten des Stratum granulosum in Speicherorganellen, den „Lamellar Bodies“ intrazellulär angereichert. Unmittelbar vor der Kornifizierung geben die Keratinozyten den Inhalt der Lamellar Bodies in den Extrazellulärraum ab. Die freigesetzten Lipide, die neben Cerebrosiden auch freie Sterole und Phospholipide enthalten, fusionieren zu mehrlagigen Interzellulärmembransystemen. Coextrudierte Enzyme (Phospholipase und Glucocerebrosidase) spalten die Phospholipide bzw. Glucocerebroside zu freien Fettsäuren und Ceramiden.

Die Biosynthese von Ceramiden beginnt mit der enzymatischen Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA. Unter Decarboxylierung entsteht die 3-Oxo-Verbindung, die durch NADPH zu Sphinganin (Dihydrosphingosin) reduziert wird. Nun erfolgt die Verbindung von Sphinganin mit einer Fettsäure. Anschließend wird durch ein Flavoprotein, eine Desaturase,

eine Doppelbindung eingeführt, und es entsteht Ceramid. Auf diese Weise werden größere Sphingosin-Konzentrationen in den Zellen vermieden [Michel 1997].

Durch die Verknüpfung mit Phosphocholin aus Phosphatidylcholin entsteht aus Ceramid Sphingomyelin (N-Acylsphingosin-1-phosphocholin).



**Abbildung 5:** Strukturformel des Sphingomyelin.

Der Katabolismus von Sphingomyelin beschreibt nahezu vollständig den umgekehrten Syntheseweg. Er beginnt mit der enzymatischen Spaltung von Sphingomyelin in Phosphocholin und Ceramid durch Sphingomyelinasen. Man unterscheidet je nach subzellulärer Lokalisation verschiedene Isoenzyme der Sphingomyelinase (s.u.). Ein Mangel an Sphingomyelinase kann genetisch bedingt sein und verursacht die Niemann-Pick-Krankheit [Kelter 1991]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß ein Defekt der Sphingomyelinaseaktivität eine verminderte Apoptose-Induktion durch TNF- $\alpha$  und UV-Licht bewirkt [Wright 1996].

In den letzten Jahren beschreiben zahlreiche Publikationen neue Funktionen der Sphingolipide [Hannun 1989]. Neben ihrer Aufgabe als Membranbausteine fungieren sie als „Second Messenger“ afferenter Signaltransduktionswege [Hannun 1994]. Signalceramide zeichnen sich durch eine bimodale Kettenlängenverteilung aus. So haben die amidartig gebundenen Fettsäuren entweder eine Länge von 16-18 oder 24 C-Atomen.

Signalceramide werden intrazellulär u.a. durch die Aktivität der oben beschriebenen Sphingomyelinasen aus Sphingomyelin freigesetzt. Bisher wurden folgende Sphingomyelinasen charakterisiert, welche intrazellulär unterschiedlich lokalisiert sind:

- 1) Saure Sphingomyelinase (EC 3.1.412) (lysosomal),
- 2) Neutrale  $Mg^{2+}$ -abhängige Sphingomyelinase (zytosolisch),
- 3) Neutrale  $Mg^{2+}$ -abhängige, in die Plasmamembran integrierte Sphingomyelinase.

Die Aktivierung der Sphingomyelinase kann rezeptorvermittelt erfolgen. Nach Spaltung von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin können bei entsprechender Aktivierung Ceramidasen (N-Acylsphingosindeacylasen) die amidgekoppelte Fettsäure entfernen, es entstehen Sphingosin und eine freie Fettsäure. Sphingosin kann wieder in den Anabolismus eingeschleust oder nach Phosphorylierung durch die Sphingosinkinase abgebaut werden. Ceramide können auch mit einem Kohlenhydrat-Rest (Glucose, Galactose) versehen und in den Interzellularraum ausgeschleust werden. Die rezeptorvermittelte Freisetzung von Ceramid aus Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen und die enzymvermittelte Regeneration von Sphingomyelin aus Ceramid bzw. Sphingosin oder der Katabolismus von Sphingosin über Sphingosin-Phosphat werden auch als „Sphingomyelin-Zyklus“ bezeichnet.

Das Phänomen der rezeptorvermittelten Sphingomyelin-Hydrolyse und die Bildung von intrazellulärem Ceramid konnte in einer menschlichen Leukämie-Zelllinie HL-60 erstmals gezeigt werden. Verschiedene Zytokine und andere chemische Verbindungen haben einen funktionellen Einfluß als Agonisten im Sphingomyelin-Abbau, wie z.B.: IL-1,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , Dexamethason, Brefedin A, monoklonale Antikörper gegen FAS/APO-1 und auch Vitamin D3-Analoga wie Calcipotriol.  $TNF\alpha$  interagiert mit dem 55kDa-Rezeptor, welcher sowohl die lysosomale als auch die neutrale Smase aktiviert. Außerdem haben experimentelle Untersuchungen bestätigt, daß Arachidonsäure in die Induktion der Sphingomyelinase über  $TNF\alpha$  involviert ist. Ob es sich hierbei um eine spezifische oder unspezifische Induktion handelt bedarf weiterer Untersuchungen.

Bei der Zellkommunikation existieren zahlreiche Möglichkeiten mit denen eine Zelle Signale aufnehmen und weiterleiten kann. In der sogenannten Signaltransduktion weisen Verknüpfungen der Signalwege darauf hin, wie dicht das Kommunikationsnetz in jeder einzelnen Zelle strukturiert ist. Normalerweise bestehen diese Kommunikationsstrukturen aus Proteinen, jedoch wurde 1993 entdeckt, daß auch Ceramide in diese Signalwege involviert

sind. Ceramide beeinflussen die Zellproliferation und -differenzierung. Sie sind außerdem ein Regulator des programmierten Zelltodes, der Apoptose, welche durch TNF- $\alpha$  und andere Mitglieder der TNF-Superfamilie induziert werden [Cifone 1994, Haimovitz-Friedmann 1994, Hannun 1994, Heller 1994, Kolesnick 1994, Obeid 1993]. Der Mechanismus, bei dem der TNF- $\alpha$ -Rezeptor an die Sphingomyelinase koppelt, ist noch unklar [Weigmann 1992].

Weiterhin ist bekannt, daß Sphingolipide mit den Signalwegen, die den zellulären Calciumhaushalt regulieren, kommunizieren [Merrill 1997]. Außerdem stimulieren sie über Kinase-Aktivierung die Phosphorylierung von Proteinen und leiten Signale an c-myc, die Protooncogenen, die Kernfaktoren  $\kappa$ B, Phospholipase A<sub>2</sub> und an Prostaglandine weiter [Hannun 1994]. Auch wurde gezeigt, daß ein Mangel an Sphingolipiden die Ursache für verschiedene tierische Krankheiten ist und möglicherweise an der Bildung von humanem Krebs beteiligt ist [Merrill 1997]. Darüber hinaus ist bekannt, daß Krebszellen mit erhöhter Aktivität der Glycosylceramid-Synthase eine erhöhte Resistenz gegenüber onkotoxisch wirkenden Substanzen aufweisen, was auf eine bedeutende Rolle des ceramid-vermittelten Signaltransfers bei der Cancerogenese hinweist [Lucci 1999].

Insgesamt wurden verschiedene Zielaktivitäten von Ceramiden bestimmt. Die ceramid-aktivierende Proteinkinase [Joseph 1993] phosphoryliert z.B. Raf-1, ansteigende Mengen an Raf-1 aktivieren die MAP-Kinase-Kaskade [Raines 1993, Yao 1995, Testi 1996]. Die MAP-Kinase-Kaskade kann auch durch andere Signalwege aktiviert werden, in denen Ceramid involviert ist, wie z.B. über die Phospholipase A<sub>2</sub>, Cyclin B, S6-Kinasen und die Transkriptions Faktoren AP-1, NF-IL-6, ELK1 und ATF2 [Yao 1995]. Desweiteren wurde ein zytosolisches ceramid-aktiviertes Phosphatase-Protein identifiziert, welches für viele Zielaktionen der Ceramide verantwortlich ist [Dobrowsky 1992, 1993, Hannun 1994, Wolf 1994].

Der Phosphatase-Inhibitor Okadeinsäure inhibiert beide Ceramid induzierten Kaskaden: die Apoptose-Kaskade und die c-myc-Kaskade, welche eine wichtige Rolle in der Differenzierung von HL-60 Zellen spielt. Die Aktivität des CAPP korreliert mit einer großen Anzahl an Wachstumsinhibitoren in zahlreichen Zelltypen [Hannun 1994].

In der Kaskade der Stress-Antwort aktivieren Ceramide die MEKK, welche die Jun-Kinase (JNK-1) aktiviert und hierüber wird c-jun aktiviert, welches eine Reihe von Transkriptionsvorgängen auslöst [Testi 1996].

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 6 und Abbildung 7) zeigen den möglichen Einfluß von Ceramiden und weiteren Stoffwechselprodukten, wie Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat auf unterschiedliche Signaltransduktionswegen.

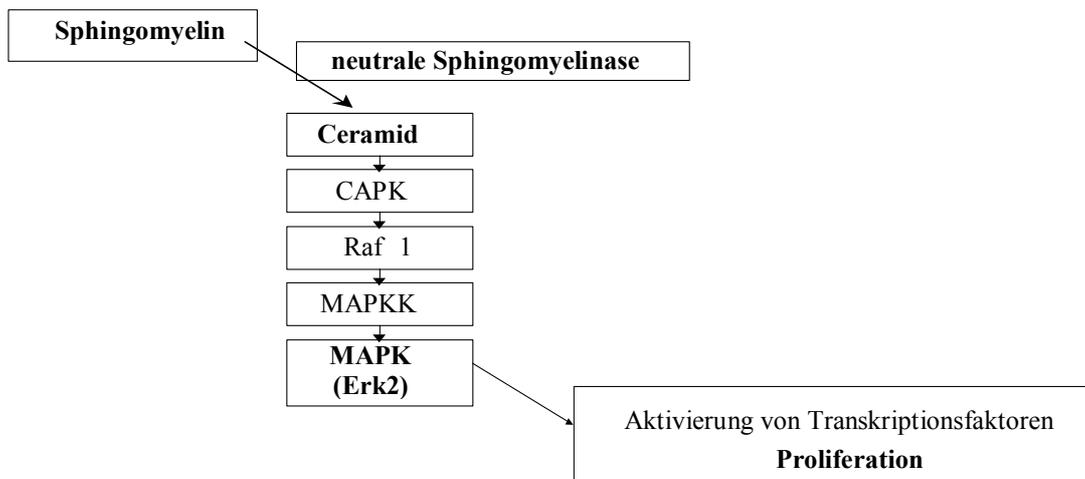


Abbildung 6: Möglicher proliferativer Weg, induziert durch Ceramid [nach Testi, R.].

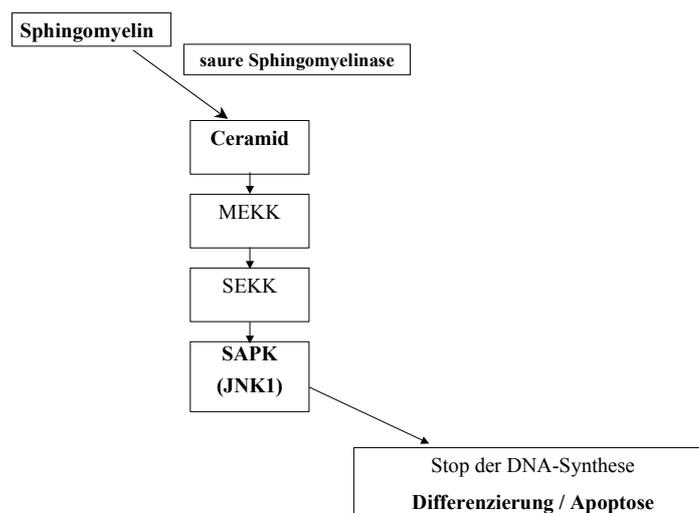


Abbildung 7: Möglicher Apoptose-Weg, induziert durch Ceramid [nach Testi, R.].

Trotz der zahlreichen Erkenntnisse, die bereits vorliegen, ist der vollständige Mechanismus des Sphingomyelin-Zyklus und der mögliche Zusammenhang mit den verschiedenen Hautkrankheiten und anderen möglichen Barrierschwächen nicht aufgeklärt.

## II.6. Wichtige Signaltransduktionswege der Keratinozyten

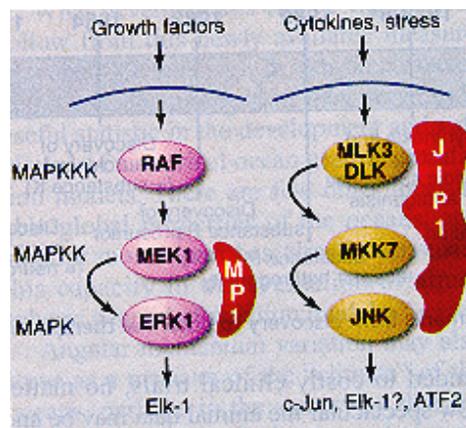
Wachstum, Differenzierung und andere Zelleistungen werden durch unterschiedliche externe Signale beeinflusst. Dabei entscheidet die Imbalance von funktionell antagonistischen Signalen über die Richtung, in die das Pendel der Zelleistung ausschlägt. Von aktivierten Transmembranrezeptoren erfolgt die intrazelluläre Signalleitung auf verschiedenen Wegen. Um auf diese Signale möglichst schnell zu reagieren, haben Eukaryonten verschiedene Proteinkaskaden entwickelt. Vor allem bei der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsreaktionen verläuft die Signaltransduktion über eine Kaskade von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen.

Ein extrazelluläres Signal wird von einem Transmembranrezeptor registriert, der Rezeptor wird aktiviert und gibt das Signal in Form einer Stimulation der Tyrosin-Phosphorylierung nachgeschalteter Effektormoleküle weiter. Als zentrale Schaltstation werden hier häufig das Ras-Protein oder andere Mitglieder der Superfamilie der Ras-Proteine angesehen. Bis zum Ras-Protein laufen die beteiligten Reaktionen überwiegend membranassoziiert ab. Vom Ras-Protein aus wird das Signal mit Hilfe von Proteinkinasen, die in Form einer Kaskade hintereinander geschaltet sind, ins Zellinnere geleitet. Das Signal kann so bis in den Zellkern hinein getragen werden. Als Resultat wird die Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen oder von Enzymen beobachtet, die Schlüsselreaktionen des Stoffwechsels katalysieren [Davis 1994, Blumer 1994, Cano 1995, Marshall 1995]. Schlüsselemente der intrazellulären Signalübertragung, die vom Ras-Protein (oder anderen Mitgliedern der Ras-Superfamilie) ausgehen, sind cytoplasmatische Proteinkinasen. Diese wurden in Säugetieren aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen (zellteilungsfördernd) wirkende Liganden als MAP-Kinasen, oder als Erk bezeichnet. Die sogenannten MAPK bilden das zentrale Element in diesen Signalwegen (Abbildung 9).

Die MAPK/Erk-Proteine stehen am unteren Ende der Signalübertragung der MAPK-Wege und haben häufig zwei weitere Proteinkinasen vorgeschaltet. Die MAPK/Erk-Proteine empfangen das Signal in Form einer aktivierenden Phosphorylierung durch eine

vorgesaltete Proteinkinase, die als MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) oder auch als MEK (MAP-Erk-Kinase) bezeichnet wird. Die MAPKK/MEK-Proteine wiederum sind Substrat für einen weiteren Typ von ihrerseits vorgeschalteten Proteinkinasen, die MAPKK-Kinasen. Zu dieser Gruppe gehören u.a. die verschiedenen Raf-Kinasen, die vom Ras-Protein aktiviert werden, die Mos-Kinase und die Proteinkinase MEKK-1.

Die unterschiedlichen MAPK-Kaskaden nutzen die gleichen Proteine in ihren Übertragungswegen. Diese Verknüpfungen zeigen, daß Cross-Talks unter den verschiedenen Signalwegen nicht zu vermeiden sind. Unklar war, warum einige Proteine innerhalb eines Signalweges bleiben, auch wenn sie theoretisch in verschiedenen Wegen ihre Aufgabe erfüllen könnten. Die Zugehörigkeit einer Kinase zu genau einem Signalweg wird offenbar über eine topologische Fixierung in Gerüstproteine der Zelle erreicht (Abbildung 8). Diese Gerüstproteine bilden einen riesigen Proteinkomplex aus den unterschiedlichen Kinasen und legen so die Richtung eines Signals wie eine Einbahnstraße fest. Kinase-fixierende Proteine sind z.B. MP1 und JIP-1.



**Abbildung 8:** Gerüstproteine, gefunden in Säugerzellen. MP-1 ist hoch konserviert und hat auch ein humanes Analogon.

Vermutlich gibt es noch wesentlich mehr solcher Proteine mit verschiedenen Bindungsstellen für einige Enzyme. Diese Gerüstproteine sind von großer Bedeutung für die Entwicklung von Inhibitoren für spezifische Zellantworten.

### *II.6.1. Aktivierung der MAPK-Kinase*

Die Aktivierung der MAP-Kinase-Wege wird bei Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, mit Tumor Nekrose Faktoren (TNF), mit Interleukin-1 sowie unter Streßbedingungen beobachtet. Außerdem kann die Einwirkung von bakteriellen Endotoxinen wie Lipopolysacchariden eine Aktivierung der MAP-Kinase-Wege nach sich ziehen. Die Vielfalt der extrazellulären Signale zeigt, daß sehr unterschiedliche Signalwege an der Aktivierung der MAP-Kinase-Wege beteiligt sein können. Eine zentrale Funktion der MAP-Kinase-Wege besteht in der Aktivierung der Genexpression. Die Aktivierung wird über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt. Insgesamt ergibt sich für die MAPK-Wege ein komplexes und an vielen Punkten noch unvollständiges Bild. Es muß davon ausgegangen werden, daß verschiedene Wege vernetzt sind, und daß Verzweigungen auf allen Ebenen möglich sind. Darüber hinaus können dieselben Substrate durch verschiedene MAPK-Wege phosphoryliert und aktiviert werden.

In dieses Netzwerk der Signaltransduktion scheint der Sphingomyelin-Zyklus ebenfalls beteiligt zu sein. Vor allem der Signalweg der Mitogen-Aktivierten-Protein-Kinase steht in direkter Verbindung mit dem Sphingomyelin-Zyklus (Abbildung 6).

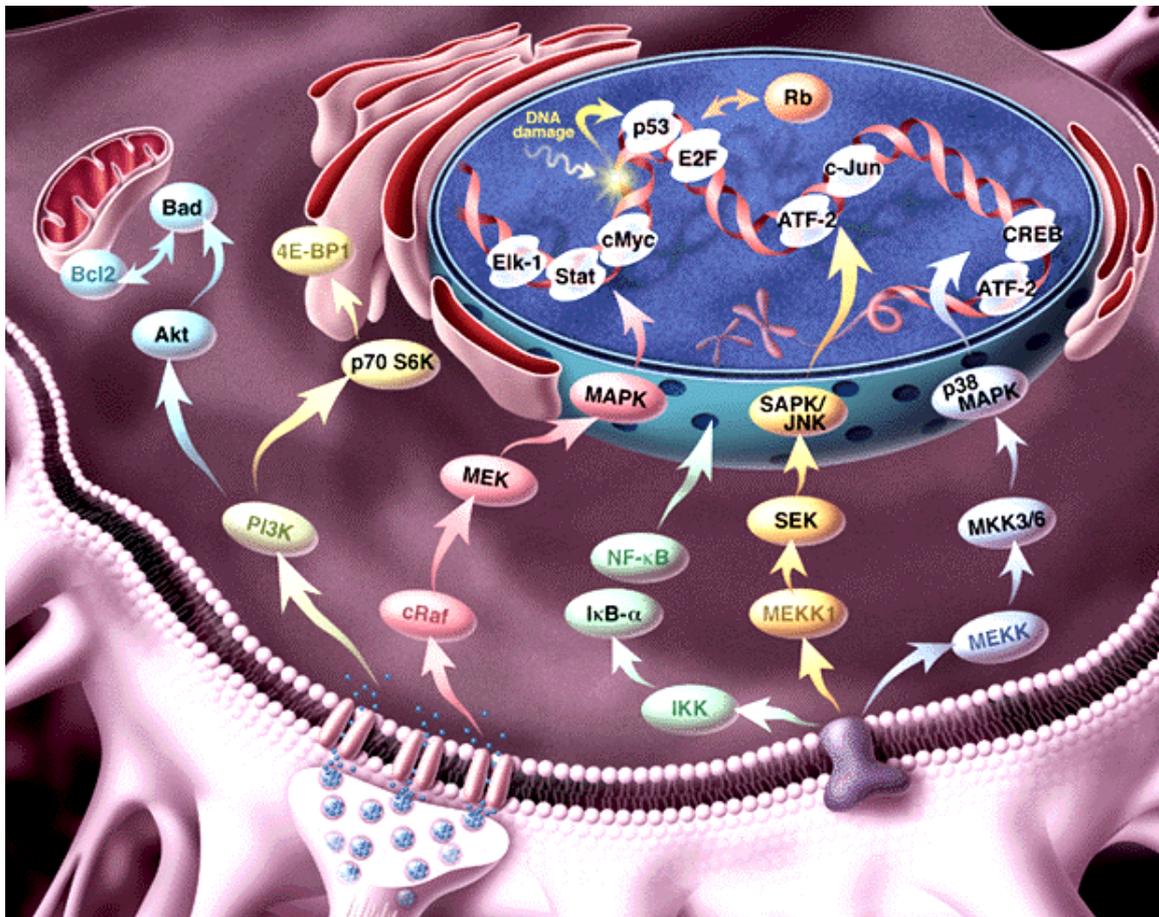
### *II.6.2. Der SAPK/JNK-Signalweg*

Der SAPK/JNK-Signalweg ähnelt dem MAPK-Signalweg, jedoch wird er von völlig anderen Stimuli aktiviert. Eine ganze Reihe von Aktivatoren starten diesen Signalweg wie z.B. Zytokine, UV-Licht und osmotischer Streß [Denhardt 1996].

Diese Subgruppe der MAP-Kinasen hat den Transkriptionsfaktor c-Jun als Substrat. Solche Kinasen werden als c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen oder als Streß-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) bezeichnet. Die JNK/SAPK-Proteine binden an die N-terminale Transaktivierungsdomäne des c-Jun-Proteins und phosphorylieren die Reste Ser63 und Ser73. Als Folge wird eine erhöhte Transkriptionsaktivität von Genen beobachtet, die durch c-Jun kontrolliert werden. Die Aktivierung der JNK/SAPK-Proteine verläuft unter Beteiligung der kleinen regulatorischen GTPasen Rac1 und CDC42, die beide zur Rho-Familie der Ras-Superfamilie gehören [Olson 1995].

Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}$  aktivieren den Signalweg über die Rac/Rho-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, während UV-Licht unabhängig voneinander Rho und Rac aktiviert. Aktivierte MEKK1 phosphoryliert die SEK, welche dann wiederum die SAPK bzw. JNK phosphoryliert. Die phosphorylierte SAPK bindet extrem stark an die N-terminale Region des c-Jun und ATF-2.

Die zwei Hauptsignalwege führen je nach Zelltyp und Differenzierungsstadium zu unterschiedlichen Zellantworten (Abbildung 9). Über die MAPK wird bei Säugetieren eine Zelldifferenzierung und Zellteilung beobachtet, während die Signalantwort auf die Aktivierung der JNK einen Wachstumsstop, also eine typische Streßantwort zeigt, welche bis zur Apoptose führen kann.



**Abbildung 9:** Signaltransduktionswege in der Zelle von der Membran bis zur Transkription im Zellkern [verändert nach new england biolabs catalogue 1999].

### III. Problemstellung

Verschiedene ekzematöse und trockene Hautzustände weisen auf eine gestörte Lipidbarriere hin. Ursprungsort dieserer Lipide ist der Golgi-Apparat der Keratinozyten. Der Sphingomyelinase-Zyklus hat einen großen Einfluß auf die Zusammensetzung der Lipide in den Vesikeln des Golgi-Apparates. Somit kann eine Störung der Sphingomyelinase direkten Einfluß auf die Lipidzusammensetzung des Stratum corneum haben. In den Sphingomyelin-Zyklus sind außerdem die Signaltransduktionswege der MAP-Kinase und der JNK/SAPK-Kinase involviert.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Ermittlung der Aktivitäten der MAP-Kinasen, Erk1/Erk2 und JNK/SAPK, hervorgerufen durch den Einfluß einer zunehmenden Differenzierung in Keratinozyten gesunder und atopischer Haut

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll zunächst der Phosphorylierungsstatus der Keratinozyten von normaler Haut im Hinblick auf verschiedene Parameter des Sphingomyelin-Zyklus analysiert werden. Anschließend soll der Differenzierungszustand und der Einfluß der Sphingomyelinase auf die Differenzierung mittels Northern Blotting ermittelt werden. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Erk1 und Erk2 bzw. JNK/SAPK soll die Aktivierung dieser Kinasen in den verschiedenen Keratinozytenkollektiven im Western Blot aufgezeigt werden. Ziel dieser *in vitro*-Versuche ist die Ermittlung des Phosphorylierungsstatus der gesunden Keratinozyten und die möglichen Einflussparameter auf die Signaltransduktion. Ferner sollen im Anschluß daran *ex vivo*-Untersuchungen folgen, die einen möglichst realitätsnahen Vergleich zwischen Probanden mit gesunder Haut und Probanden mit atopischer Dermatitis ermöglichen. Die *ex vivo*-Versuche sollen im Schwerpunkt die Untersuchung der Differenzierung der Keratinozyten und der Aktivität der Kinasen MAPK und JNK/SAPK beider Probandenkollektive beinhalten.

## IV. Material

### IV.1. Geräte

#### Autoklaven

- GTA 50
- GVA 570

Fritz Gössner; Hamburg

Fritz Gössner; Hamburg,

#### Bildanalyse

Kontron Elektronik; Echingen

#### Bilddokumentationssystem

- MPU-F100P time base corrector

MC32115II PM, AVT Horn Sony; Japan

#### CO<sub>2</sub>-Inkubator

WTB-Binder; Bremen

#### Dünnschicht-Chromatographie-Auftragung

CAMAG Linomat IV; Frankfurt

#### Dünnschicht-Chromatographie-Scanner

CAMAG TLC Scanner II; Frankfurt

#### Fotokamera

Nikon F3, Nikon; Düsseldorf

#### Gefriermikrotom

Jung Frigocut 2800E, Leica; Cambridge

#### Geldokumentationssystem

Lumi-Imager, Boehringer; Mannheim

#### Glasgeräte

Schott, Fisher Scientific; Frankfurt

#### Mikroskop

Will WilovertS, Hund; Wetzlar

#### pH-Meter

763 Multi-Calimatic, Knick; Berlin

#### Photometer UV/Vis-Spektrometer

Lambda 40, Perkin Elmer; Bad Wildbach

#### Pipetten, Pipetierhilfen

Research, Reference, Eppendorf;  
Hamburg

#### Präparierbesteck

W. Link; Hamburg

#### Proteinblotting-Apparatur

BioRad; München

#### Proteingelkammer

BioRad; München

#### RNA-Quantifizierungsgerät

GeneQuant Pharmacia; Freiburg

#### Saugblasenmaschine

Beiersdorf AG (Eigenbau); Hamburg

(Suction Blister Pumpe)

#### Spannungsquelle

EPS 600 Pharmacia; Freiburg

#### Sterilwerkbank

Gelaire BSB 4A, Flow Laboratories;  
Meckenheim

#### Trockenschrank

Heraeus; Hannover

#### Ultraschallgerät

Sonorex RK100 Bandelin Electronic;  
Berlin

#### Vakuumzentrifuge

SpeedVac Plus SC110A Savant;  
Farmingdale - N.Y.

Analysenwaage	KB BA 100, Sartorius; Göttingen
Zentrifugen	
- Zentrifuge 5417C	Eppendorf; Hamburg
- Kühlzentrifuge	Sorvall, Du Pont; Bad Homburg

Außerdem wurden handelsübliche Kühlgeräte (4° C, -20° C, -80° C), Eismaschine, Schüttler, Wasserbäder und Magnetrührer eingesetzt.

#### IV.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien werden mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ bzw. reinst von den jeweils aufgeführten Firmen verwendet.

Aceton	Merck	Darmstadt
Acrylamid (40%ig)	ICN	München
Ammoniumpersulfat	Sigma	München
Bis-Acrylamid (2%)	ICN	München
Bromphenolblau	Sigma	München
Bovine Serum Albumin	Sigma	München
Calciumchlorid	Sigma	München
Chemiluminescence Blotting Substrate	Boehringer	Mannheim
Chloroform	Merck	Darmstadt
Coomassie Blue G-250	Merck	Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck	Darmstadt
Dispase	Boehringer	Mannheim
Dulbeccos PBS w/o (1 x)	Life Tecnologies	Eggenstein
ECL-Nachweis Kit	Boehringer	Mannheim
Einbettmedium	Tissue-Tek O.C.T. Compound Miles Inc.	USA
Entwickler GBX	Kodak	Stuttgart
Essigsäure	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
ExtrAvidin-POD	Sigma	München
Fötale Kälberserum	Life Tecnologies	Eggenstein
Filmmaterial	Ektacrome 3210T, Kodak	Biomax MR, Kodak

Filterpapier	Schleicher & Schuell	Darmstadt
Fixierer GBX	Kodak	Stuttgart
Glycerol	Sigma	München
Glycin	Sigma	München
Lysispuffer	new england biolabs	Beverly MA, USA
Magnesiumchlorid	Sigma	München
Methanol	Merck	Darmstadt
Milchpulver (Magerstufe)	Glücksklee	Frankfurt
Nitrozellulose Membran	BioRad	München
Oligo-dT-Zellulose Typ S	Pharmacia	Freiburg
Penicillin-Streptomycin (500 U/ml, 5000 µg/ml)	Life Tecnologies	Eggenstein
Phenol	Merck	Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma	München
Poly-L-Lysin	Sigma	München
Protein Assay Dye Reagent	BioRad	München
Proteinkinase K	Sigma	München
Sodiumdodecylsulfat	Merck	Darmstadt
Sphingomyelinase	Sigma	München
Spin-X-Säule	Costar	USA
TEMED	Sigma	München
TNF- $\alpha$	Sigma	München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	Darmstadt
Trypan-Blau-Lösung	Serva	Heidelberg
Trypsin (2,5%)	Boehringer	Mannheim
Trypsin-EDTA (1 x)	Life Tecnologies	Eggenstein
Tween 20	Merck	Darmstadt
Zellkulturmedien , K-SFM, DMEM	Life Technologies	Eggenstein
Zellkulturverbrauchsmaterial	Renner, Greiner, Nunc, Millipore	Dannstadt, Nürtingen, Wiesbaden, Escheborn
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma	München

### IV.3. Antikörper

#### IV.3.1. *Primäre Antikörper*

<b>Ak (anti-)</b>	<b>Organismus</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung/Inkubation Histologie</b>	<b>Verdünnung /Inkubation Western Blots</b>
Erk1	Polyclonal Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies; Kalifornien	1/100 1 h in 0,1% BSA	1/1000 1 h in Milch
Erk2	Polyclonal Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies; Kalifornien	1/100 1 h in 0,1% BSA	1/1000 1 h in Milch
Filaggrin	Monoclonal Maus	Paesel + Lorei; Frankfurt	1/300 1 h in 0,1% BSA	/
Involukrin	Monoclonal Maus	Sigma; München	1/100 1 h in 0,1% BSA	1/1000 1 h in Milch
JNK	Polyclonal Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies; Kalifornien	1/100 1 h in 0,1% BSA	1/1000 1 h in Milch
JNK activated	Monoclonal Maus	Santa Cruz Biotechnologies; Kalifornien	1/100 1 h in 0,1% BSA	1/1000; 1/200 üN in Milch
MAPK activated	Monoclonal Maus	Sigma; München	1/100 1 h in 0,1% BSA	1/1000 üN in Milch
p13	Monoclonal Maus	Sigma; München	1/100 1 h in 0,1% BSA	/
Phospho- Serin	Monoclonal Maus	Biomol; Hamburg	/	1/1000 üN in 0,2% BSA
Phospho- Threonin	Monoclonal Maus	Sigma; München	/	1/1000 üN in 0,2% BSA
Phospho- Tyrosin	Monoclonal Maus	Sigma; München	/	1/1000 üN in 0,2% BSA

### IV.3.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper (anti-)	Organismus	Firma	Verdünnung/Inkubation Histologie	Verdünnung/Inkubation Western Blots
Maus	Kaninchen IgG	Sigma; München	1/ 250 30 min in 0,1% BSA	1/ 500 1 h in BSA oder Milch je nach primärem AK
Kaninchen	Ziege IgG	Sigma; München	1/ 250 30 min in 0,1% BSA	1/ 500 1 h in BSA oder Milch je nach primärem AK

### IV.3.3. Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsmarker	Firma	Bandengrößen
Biotinylated Standard BroadRange	BioRad; München	200 kDa; 116 kDa; 97,4 kDa; 66 kDa; 45 kDa; 31 kDa; 21,5 kDa; 14,5 kDa
ECL	Amersham; Braunschweig	97,4 kDa; 68 kDa; 46 kDa; 31 kDa; 20,1 kDa; 14,4 kDa
Kaleidoscope Prestained Standard	BioRad; München	208 kDa; 127 kDa; 85 kDa; 45 kDa; 32,8 kDa; 18,1 kDa; 7,4 kDa
Rainbow	Amersham; Braunschweig	250 kDa; 160 kDa; 105 kDa; 75 kDa; 50 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa

### IV.4. Sicherheit und Entsorgung

Alle Chemikalien werden entsprechend ihren R- und S-Sätzen gehandhabt und nach den angegebenen Vorschriften entsorgt. Halogenfreie und halogenhaltige Lösungsmittel werden getrennt gesammelt und entsorgt. Die Arbeit mit humanen Zellen war auf Zellkultur-Laboratorien beschränkt. Biologisch kontaminiertes Material wurde durch Autoklavieren oder Desinfektion sterilisiert und anschließend ordnungsgemäß vernichtet.

#### IV.5. Medien, Lösungen und Puffer

##### *IV.5.1. Medien*

DMEM	500 ml DMEM (fertig bezogen) 10% (v/v) FCS 50 µg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin
Kulturmedium für Keratinozyten	500 ml KFSM (fertig bezogen) 50 µg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin 5 ng/ml EGF 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt

Um Lösungen oder Puffer anzusetzen, wird deionisiertes Wasser aus der Filtrationsanlage Seralpur RRO 90C verwendet. Die für die Zellkultur angesetzten Lösungen und Puffer werden vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert.

##### *IV.5.2. Lösungen und Puffer*

Blockierungspuffer Nothern Blot	DIG-Puffer + 1% (w/v) Blockierungsreagenz käuflich erworben von Boehringer Manheim
BSA-Lösung	2% (w/v) BSA (1%, 0,1%, 0,2%) 98% (v/v) PBS-Tween (99%, 99,9%, 99,8%)
CDP-Star-Lösung	käuflich erworben von Boehringer Manheim
Coomassie-Blue-Färbelösung	45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung wird filtriert

---

DIG Puffer Stam mlösung	23,22 g Maleinsäure 17,53 g NaCl 14 g NaOH-Plätzchen 2000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,5
DIG-Waschpuffer	DIG-puffer + 3% (v/v) Tween 20
Dulbecco's PBS w/o (1 x) (fertig bezogen)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Eindeckmedium	50% (v/v) Glycerin 50% (v/v) PBS w/o
Elektrophorese-Puffer (10 x)	250 mM Tris/Cl 1,8 M Glycin 1% (w/v) SDS
Entfärbelösung für Coomassie-Färbung	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Färbelösung für die Immunhistochemie	225 ml, 0,5 M Acetatpuffer pH 4,9 250 µl, 30% Wasserstoffperoxid 10 ml AEC-Substrat
Kammerpuffer	0,6% (w/v) Tris/HCl 0,1% (w/v) SDS 2,9% (w/v) Glycin

---

Lysis-Puffer (fertig bezogen bei new england biolabs)	20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 1 mM EGTA 1% Triton 2,5 mM Sodumpyrophosphat 1 mM β-glycerophosphate 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 μg/ml Leupeptin +PMSF frisch dazugeben
Lysispuffer Nothern Blot - Lösung A	0,5 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 1% (v/v) SDS
- Lösung B	0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 1% (v/v) SDS
Milchlösung	0,5% (w/v) Magermilchpuver 99,5% (v/v) PBS-Tween
MOPS-Puffer	41,9 g MOPS 4,1 g Na-Acetat 3,7 g EDTA
PBS für die Immunhistochemie	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,9 mM CaCl <sub>2</sub>

---

PBS-Tween	99,9% (v/v) Dulbecco's PBS 0,1% (v/v) Tween
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin-Lösung fertig bezogen 1/10 verdünnt
RNA-Ladepuffer	250 µl Formamid dideionisiert 83 µl Formaldehyd 37% (w/v) 50 µl 10 x MOPS 40 µl Bromphenolblau 0,01% (w/v) 50 µl Glycerin
Sammelgel 5%	5% (w/v) Acrylamid 0,125% (w/v) Bisacrylamid 130 mM Tris/Cl- pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,08% (w/v) APS 0,15% (v/v) TEMED
SSC 20 x-Stammlösung	350,6 g NaCl 176,5 g Na-Citrat 2000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,0
Transferpuffer	50% (v/v) Kammerpuffer 20% (v/v) Methanol
Trenngel 10%	10% (w/v) Acrylamid 0,125% (w/v) Bisacrylamid 375 mM Tris/Cl- pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,08% (w/v) APS 0,15% (v/v) TEMED

## V. Methoden

### V.1. In vitro-Versuche

#### V.1.1. *Zellkultur*

Alle Experimente wurden ausschließlich mit primären Keratinozyten erster bis maximal zweiter Passage durchgeführt. Die Gewinnung von Keratinozyten-Kulturen wurde mit Hilfe von Hautbiopsien verschiedener weiblicher und männlicher Spender zwischen 19 und 56 Jahren (deren Einwilligung zur Verwendung ihrer Biopsien für Forschungszwecke vorliegt) realisiert. Alle Zellen wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37° C, 7% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Mittels Trypan-Blau-Lösung wurden die Keratinozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der prozentuale Anteil an toten Zellen ermittelt. Alle Arbeitsgänge wurden eisgekühlt durchgeführt. Das Medium über den Zellen wurde zweimal wöchentlich gewechselt, ja nach Bedarf wurde zusätzlich ein- bis zweimal mit PBS gewaschen. Nach ca. 4 - 12 Tagen waren die Zellen zu 70 - 90% konfluent gewachsen und konnten passagiert werden.

#### V.1.2. *Isolierung von Keratinozyten aus Hautbiopsiematerial*

Die Hautbiopsien wurden in einem Transportmedium überreicht, anschließend in PBS gewaschen und mit Hilfe eines sterilen Präparierbestecks vom Unterhautfettgewebe, der Subcutis befreit. Die Biopsie wurde in kleine Stücke der Größe von ca. 5 x 5 mm geschnitten. Danach wurde jede kleine Biopsie 5 s in 70% Ethanol gelegt, 2 mal für 5 s in PBS gewaschen und in einer 2 U/ml konzentrierten Dispase-Lösung für 2 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die Dispase fungiert als Kollagenase für Kollagen Typ IV und Fibronectin. Sie beeinflusst die Zellaktivität jedoch nicht. Die Epidermis wurde hiernach von der Dermis mit einer Pinzette abgetrennt. Die Epidermisstücke wurden in PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-Lösung bei 37° C erneut im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer gestopften Pasteurpipette durch mehrmaliges Trituieren vereinzelt. Gestoppt wurde der Trypsinverdau mit fertig angesetztmem DMEM. Die Stratum Corneum-Reste wurden aus der Lösung entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein 12 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm bei 4° C zweimal zentrifugiert. Zwischen den zwei Zentrifugationsschritten und am Ende der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und

die Zellen mit frischem KSFM-Medium resuspendiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen je nach Zellzahl auf verschiedene Zellkultivierungsbehälter verteilt.

Zum Passagieren wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS w/o gewaschen, mit Trypsin/EDTA für 5-10 min inkubiert und anschließend mit einer Pipette von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Der Trypsinverdau wurde mit fertig angesetzttem DMEM-Medium gestoppt. Es folgte eine 10 min Zentrifugation bei 4° C und 1500 rpm. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden erneut in DMEM-Medium resuspendiert und wieder 10 min zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand entfernt, und die Zellen wurden mit frisch angesetzttem KFSM in die gewünschten Kulturgefäße je nach Zellzahl und experimentellen Vorgehen ausgesät. Nach erneuter Konfluenz der Keratinozyten, konnten die Zellen dann direkt für Experimente eingesetzt werden.

### *V.1.3. In vitro-Experimente zur Überprüfung zellulärer Funktionen*

Jeweils zum Experimentbeginn wurden die Zellen der Nullkontrolle nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS mittels Abschaben von der Kulturgefäßoberfläche in PBS geerntet und nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm/4° C als feuchtes Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Mit allen weiteren Zellen wurde nach einem gesetzten Streß oder nach einem definierten Zeitraum ebenso verfahren.

Als Stressoren wurden folgende Reagenzien in den jeweiliges aufgeführten Konzentrationen verwendet:

<u>Reagenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Konzentration</u>
Sphingomyelinase	Sigma; München	25 mU/ml
TNF- $\alpha$	Sigma; München	10 ng/ml
Calciumchlorid	Sigma; München	1,1 mM
Green Tea	BDF AG; Hamburg	0,05 mg/ml
Magnesiumchlorid	Sigma; München	0,5 mM

## V.2. Proteinbiochemie

### *V.2.1. Gewinnung von Zytosolextrakten*

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellpellets wurden direkt in  $30\ \mu\text{l}$  Lysispuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal für 5 s in einem eiskalten Wasserbad einer Ultraschallbehandlung unterzogen, nachfolgend bei  $14000\ \text{rpm}$  für 10 min und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Kernpellet verworfen. Das nun vorliegende Zellysate konnte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder auf Eis weiter verwendet werden.

### *V.2.2. Proteinbestimmung*

Um bei nachfolgenden Untersuchungen die gleiche Menge an Proteinen des Cytosolextraktes einzusetzen, wurden durch eine Proteinbestimmung die Proteinkonzentrationen der Zellysate ermittelt. Mit Hilfe einer BSA-Eichreihe wurde nach Bradford [Bradford 1976] mit dem BioRad Protein Assay Dye Reagenz bei  $595\ \text{nm}$  im Photometer die Proteinbestimmung durchgeführt.

### *V.2.3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot*

Von den Zellextrakten wurden  $10\ \mu\text{g}$  Protein in 3 x Probenpuffer bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 min denaturiert. 10% SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus Sammel- und Trenngel (Laemmli, 1970), wurden mit den Proben beladen und bei  $80\ \text{V}$  für 15 min und bei  $180\ \text{V}$  für 45 min in einem Laufpuffer aufgetrennt. Protein-Molekulargewichtsmarker wurden zur Größenabschätzung mit aufgetrennt.

Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte im Transferpuffer mit einer angelegten Spannung von  $100\ \text{V}$ . Nach einer Stunde war der Transfer abgeschlossen. Die Membran wurde von dem Gel befreit. Mittels einer Coomassie-Blue-Lösung wurde das SDS-Gel gefärbt, um die Vollständigkeit des Proteintransfers von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Membran zu überprüfen. Das Gel wurde  $\text{üN}$  bei RT in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in die Entfärbelösung transferiert, welche mehrmals gewechselt wurde, bis das Gel die gewünschte Farbintensität der verbleibenden Proteinbanden aufwies.

#### *V.2.4. Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine*

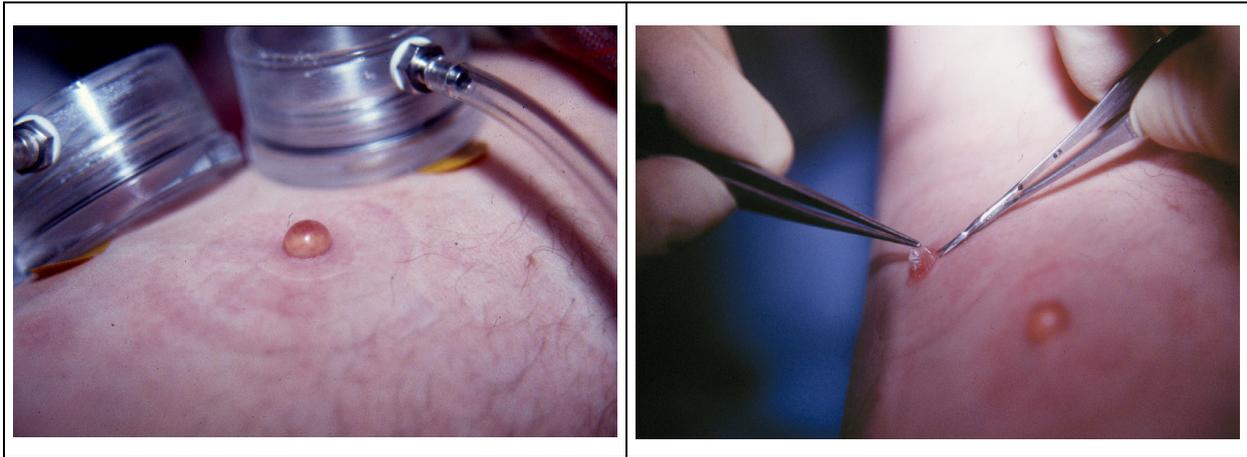
Je nach einzusetzendem primären Antikörper wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 h in 5%iger Milchlösung oder 2%iger BSA-Lösung abgesättigt. Die abgesättigten Membranen wurden dreimal je 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper (Konzentration und Inkubationszeit siehe IV.3.1 „Primäre Antikörper“), auf die erneut ein dreimaliges Waschen für je 10 min mit PBS-Tween folgte. Danach folgte eine weitere Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe IV.3.2 „Sekundäre Antikörper“). Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS wurde die Membran in dem Chemiluminescence-Blotting-Substrate (POD) für ca. 60 s inkubiert. Die Membran wurde anschließend in einer Klarsichtfolie in den Kameraraum des Lumi-Imager eingelegt, die Expositionszeiten lagen zwischen 1 und 15 min. Mit Hilfe der Software wurden die erhaltenen Signale quantitativ ausgewertet.

### V.3. Ex vivo-Untersuchungen

Alle Untersuchungen wurden an freiwilligen Probanden gemäß den Bestimmungen der Deklaration nach Helsinki für Probandentests durchgeführt. Alle schriftlich bestätigten Einwilligungen der Probanden lagen der Beiersdorf AG vor.

#### *V.3.1. Keratinozytengewinnung aus Saugblasenepidermis*

Diese Methode dient der Gewinnung von menschlicher Epidermis, die vor Ort ohne einen medizinischen Eingriff entnommen werden konnte und als sogenannte ex vivo-Methode bezeichnet wird. Auf sechs kreisrunden Arealen mit einem Durchmesser von 5 mm wurde ein Unterdruck von 220 – 250 mbar angelegt. Die Epidermis löst sich innerhalb von 2 – 3 langsam ab, und es entstanden Blasen, die mit einer serumhaltigen Flüssigkeit gefüllt waren. Mit einem sterilen Mikropräparierbesteck wurde die Saugblase entfernt und in kaltem PBS bis zur Weiterverarbeitung gelagert [Kiistala & Mustakallio 1964, Kiistala 1968]. Die Gewinnung von Saugblasenepidermis erfolgte ausschließlich an der Innenseite des Oberarms.



**Abbildung 10:** Gewinnung der Saugblasenepidermis. 10a) Durch Unterdruck entstandene Saugblase, mit Serum prall gefüllt. 10b) Entfernung der Epidermis mit Hilfe eines Mikropräparierbesteck.

### V.3.2. Isolierung von Keratinozyten aus der Saugblasenepidermis

Die SBE wurde in 3 ml 0,5% Trypsin-PBS-Lösung bei 37° C im Brutschrank für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden von der entnommenen Saugblase mittels 10 min Trituieren vereinzelt. Dabei wurde eine Pasteurpipette verwendet, um den Vorgang zu beschleunigen. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde die vollständige Ablösung der Zellen in Abständen von 3-5 min verfolgt. Der Trypsinverdau wurde mit 5 ml fertig angesetzttem DMEM-Medium gestoppt. Das verbleibende Stratum Corneum wurde aus der Lösung entfernt und die Zellsuspension bei 1500 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und bei 4° C erneut 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls entfernt, das feuchte Pellet bei Bedarf in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert und nachfolgend zum cytosolischen Extrakt weiterverarbeitet (siehe V.2.1 „Gewinnung von Zytosolextrakten“).

### V.4. Histologische Untersuchungen

Für alle histologischen Untersuchungen wurden Kryostatschnitte aus Saugblasenepidermis oder Punch-Biopsien oder normale Biopsien verwendet.

Die Saugblasengewinnung ist unter V.3.1 „Keratinozytengewinnung aus Saugblasenepidermis“ beschrieben. Punch-Biopsien sind Hautbiopsien mit epidermalen und dermalen Anteilen, die ex vivo-gewonnen wurden. In lokaler Betäubung erfolgte die Entnahme der Punch-Biopsien (4 – 6 mm Durchmesser). Die Hautproben wurden aus nicht

läsionaler Haut zumeist am medialen Oberarm oder an der Wade entnommen. Die Wunden wurden primär verschlossen und nach 12 – 14 Tagen die Fäden entfernt. Insgesamt wurden Hautproben bei 17 Probanden (24 bis 50 Jahre) entnommen. Dies erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki, ausschließlich durch Ärzte der Hautklinik der Universitätskliniken Eppendorf in Hamburg. Die Einwilligung aller Probanden bezüglich der Biopsieentnahme und Verwendung lag der Beiersdorf AG vor.

#### *V.4.1. Herstellung von Kryostatschnitten*

Die Saugblasenepidermis bzw. die Punch-Biopsien wurden in Einbettmedium getränkt mit Hilfe einer Pinzette in die richtige Lage positioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Schneiden wurde die eingebettete Hautprobe mittels Einbettmedium auf einen Präparatehalter aufgebracht und bei -80° C gelagert bzw. bei -30° C direkt weiterverarbeitet.

Zur Vorbereitung wurden Objektträger mit Hilfe einer Poly-L-Lysin-Lösung in einer Verdünnung von 1/10 für 10 min beschichtet und bei 60° C 10 min getrocknet.

Die Kryostatschnitte wurden in einem Gefriermikrotom mit einem c-Schliff in einem Winkel von 5° in einer Dicke von 7-10 µm angefertigt und auf die beschichteten Objektträger gebracht. Nach 5 min Lufttrocknung wurden die Schnitte für 10 min in einer Methanol/Aceton-Lösung (1/1) bei -20° C fixiert.

#### *V.4.2. Immundetektion von histologischen Schnitten*

Die fixierten Schnitte wurden mit speziell für die Immunhistochemie angesetzttes PBS gewaschen (siehe IV.5.2). Nach zwei fünfminütigen Waschschrinen mit dieser PBS-Lösung wurden die Schnitte zum Absättigen in eine 1%ige BSA-Lösung gegeben und 30 min inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschschrine in 0,2% BSA-Lösung. Anschließend wurden die Proben mit dem 1. Antikörper (in 0,2%iger BSA-Lösung angesetzt) inkubiert. Die Antikörper wurden in der Konzentration und Inkubationsdauer nach IV.3 „Antikörper“ eingesetzt. Erneut wurde dreimal mit 0,2% BSA-Lösung gewaschen und der sekundäre Antikörper (ebenfalls in 0,2% BSA-Lösung angesetzt) für 30 min hinzugefügt. Erneut wurde dreimal mit 0,2% BSA-Lösung für je 5 min gewaschen.

### *V.4.3. Immunperoxidase Färbung*

Nachdem die Antikörperreaktionen abgeschlossen waren, folgte die Färbereaktion. Bei dieser Reaktion wurden die an den zweiten Antikörper gekoppelten farblosen Substrate zu farbigen Substraten umgesetzt. Die Färbung entsteht an dem Präzipitationsort von primärem und sekundärem Antikörper. Die Objektträger mit den Schnitten wurden in die Färbelösung bei 37° C getaucht und für 5-12 min inkubiert. Diese Inkubationszeit beeinflusst die Intensität der Färbung. Verschiedene Vorversuche waren daher notwendig, um die bestmögliche Reaktionsdauer des Substratumsatzes des sekundären Antikörpers zu optimieren. Die Reaktion wurde mit dem Eintauchen der Objektträger in bidestilliertes Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit PBS gespült und bei RT getrocknet.

Vor der mikroskopischen Betrachtung wurden die Präparate mit einem Tropfen Eindeckmedium versehen und mit einem Deckgläschen geschützt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -20° C.

Bei einem immunofluoreszenz-(FITC)-gekoppelten Antikörper war keine weitere Färbelösung notwendig, die Schnitte konnten nach der Antikörperreaktion direkt bei -20° C gelagert werden. Die Auswertung dieser immunhistochemischen Präparate sollte jedoch nicht länger als 2 Monate aufgeschoben werden, da sonst die Immunofluoreszenz verblaßt.

## V.5. Lipidanalyse

### *V.5.1. Lipidextraktion aus Keratinozyten*

Isolierte Keratinozyten aus Saugblasenepidermis oder aus anderen Biopsien konnten zur Lipidextraktion ebenfalls herangezogen werden. Dabei wurden die Keratinozyten mittels eines Trypsinverdaus gewonnen. Die vereinzelt Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und das feuchte Pellet bei -80° C gelagert oder direkt weiterverarbeitet (wie unter V.2.1 „Gewinnung von Zytosolextrakten“ beschrieben). Für die Lipidgewinnung wurde das Pellet in 800 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein 6 ml Hamilton-Glasvial mit Spitzboden überführt. Ein Aliquot von 10 µl wurde zur DNA-Bestimmung herangezogen. Die Lipidextraktion erfolgte durch Zugabe von 2 ml Methanol und einem kurzen Schütteln. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Chloroform und eine 5 min Ultraschallbad-Behandlung. Erneut wurde 1 ml Chloroform hinzugefügt und die Lösung erneut für 5 min

einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Abschließend wurde 1 ml H<sub>2</sub>O der gesamten Lösung hinzugefügt und ein letztes Mal für 5 min in einem Wasserbad mit Ultraschall behandelt. Es folgte eine 10 min Zentrifugation bei 1500 rpm. Anschließend wurde die untere Chloroformphase (lipidhaltige Lösung) mit einer Pasteurpipette in ein neues Probenvial überführt. Die vollständige Lösung wurde bis zur Trockene an der SpeedVac eingeeengt und mit 200 µl eines Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) wieder in Lösung gebracht. Bei der Extraktion war es wichtig, die Volumenverhältnisse genau einzuhalten, um zu Beginn der Extraktion ein einphasiges System aus H<sub>2</sub>O, CHCl<sub>3</sub> und MeOH zu erhalten. Zur Kontrolle einer vollständigen Extraktion konnte mit 1 ml Chloroform nachextrahiert werden.

Die organische Phase wurde bis zur Trockene eingeeengt. In 3 x 500 µl Hexan/Ethanol 95/5 (v/v) aufgenommen und erneut eingeeengt. Anschließend in 200 µl Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) gelöst und 10–15 µl, je nach DNA-Bestimmung mit Hilfe des CAMAG Linomat IV auf die Dünnschicht-Chromatographie-Träger aufgetragen. Jetzt wurden die fertigen Platten in ein Fließmittel aus Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O 65/25/4 (v/v/v) gegeben. Der Träger wurde darin zweimal entwickelt, anschließend in ein Säurebad aus 10% Kupfersulfat in 8%iger Phosphorsäure gegeben und dann für 20 min bei 190° C verascht. Mit Hilfe des aufgetragenen Standards wurden die sichtbaren Banden im CAMAG TLC Scanner II ausgewertet.

## V.6. Nothern Blot-Analysen

### *V.6.1. Isolierung der Gesamt-RNA*

Die Isolierung der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA erfolgte mit Hilfe der Proteinkinase K und Oligo-dT-Zellulose. Auf den mit PBS gewaschenen Zellrasen wurde 2 ml eines speziellen Lysispuffer (Lösung A, welche mit Proteinkinase K angereichert war) gegeben. Das stark viskose Lysat wurde mittels einer Spritze und Kanüle homogenisiert. Das Homogenat wurde für 60min bei 37° C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 7,5 mg Zellulose (in Lösung A). Anschließend wurden die Proben auf einem Horizontalschwenker bei RT 60 min inkubiert. Das komplette Gemisch wurde auf 37° C erwärmt und bei 2050 rpm für 5 min zentrifugiert. Das weiße Pellet wurde zweimal in 2 ml Lösung A resuspendiert, anschließend erneut abzentrifugiert und in 2 ml Lösung B gewaschen und zentrifugiert. Das gewaschene Zellulose Pellet wurde in 400 µl Lösung B suspendiert und in drei Schritten über eine Spin-X Säule für 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Der auf der Säule haftende Zellulose-RNA-Komplex wurde durch dreimalige Zugabe von 150 µl H<sub>2</sub>O, Inkubation bei 65° C und Zentrifugation bei 14000 rpm

aufgelöst. Die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA lag nun in wäßriger Lösung frei vor. Durch Zugabe von 50 µl 3 M Na-Acetat Lösung (pH 5,2), sowie 1 ml Ethanol (96%), wurde die RNA bei -20° C üN ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugation (14000 rpm, 4° C) wurde das Pellet in 300 µl Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bei RT für 30 min getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Wasser aufgenommen für 5 min bei 65° C erwärmt und anschließend quantifiziert. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm mit Hilfe eines RNA-Quantifizierungsgerät bestimmt.

#### V.6.2. *Gel-Elektrophorese*

Als Auftrennungsverfahren für die RNA schloß sich eine Elektrophorese in einem Agarose-Gel an. Die hitzedenaturierten RNA-Proben wurden in einem 1,2% (w/v) Agarose-Gel bei 100 V für 2,5 h in MOPS-Puffer aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1 x MOPS-Puffer angesetzt und mit 37% (w/v) Formaldehyd versetzt. Die RNA wurde in 5 µl RNA-Ladepuffer (+3 µl Ethidiumbromid) bei 65° C für 10 min denaturiert.

#### V.6.3. *Nothern Blot*

Mittels kapillarer Saugkräfte wurde die RNA in einem RNA-Transfer-Puffer (10 x SSC) über 12 h passiv auf eine Nylonmembran übertragen. Eine anschließende UV-Bestrahlung (120 mJ/cm<sup>2</sup>) der Membran bewirkte eine irreversible Vernetzung der RNA und der Membran.

Die RNA beladene Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre zusammen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (DIG-Puffer) gegeben. Nach 2 h bei 68° C wurde der Hybridisierungspuffer durch neuen ersetzt. 100 ng der Hybridisierungssonden wurden in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 min bei 94° C linearisiert. Nach schneller Abkühlung auf Eis wurden die Sonden der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung verlief über 24 h. Anschließend wurde die Hybridisierungsmembran zweimal bei RT mit 25 ml 2 x SSC/ 0,1% (w/v) SDS und zweimal mit 25 ml 1 x SSC/ 0,1% (w/v) SDS bei 68° C gewaschen.

#### *V.6.4. Detektion von Digoxigenin-markierter RNA*

Bei der hier angewandten Methode zum Nachweis Digoxigenin markierter Nucleinsäuren handelte es sich um ein Enzym gekoppeltes Immun-Adsorptions-Verfahren. Die Detektion ist ein mehrstufiger Prozeß. Zuerst wurde die Membran einem Konjugat aus Anti-DIG-Antikörper und dem Enzym alkalische Phosphatase exponiert, welches spezifisch an die DIG-markierten Sonden bindet. IM nächsten Schritt wurde der alkalischen Phosphatase als Substrat ein Chemilumineszenzreagenz angeboten (CDP-Star). Durch die einsetzende Dephosphorylierung kommt es zur Bildung von metastabilen Dioxethan Phenolat Anionen. Diese zerfallen unter einer Lichtimmission der Wellenlänge 466 nm. Die über einen Luminometer (Lumi-Imager) erfaßten Lichtintensitäten, können somit als indirekter Mengenmaßstab für die vorliegende mRNA angesehen werden. Die Meßwerte der einzelnen Banden sowie des Hintergrundes werden digitalisiert und zueinander in relativen Bezug gestellt.

#### *V.6.5. Detektion des Northern Blot*

Die Membran wurde für 5 min mit 100 ml DIG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert. Nach 30 min Inkubation mit der Antikörperlösung wurde die Membran zweimal mit DIG-Waschpuffer gewaschen und mit 100 ml Substratpuffer über 5 min equilibriert. Danach wurde die Membran mit 7 ml CDP-Star-Lösung versetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Membran in transparente Folie eingeschweißt und in die Meßkammer des Lumi-Imagers plaziert. Die Expositionszeit lag bei ca. 10 min. Mit Hilfe der Software wurden die erhaltenen Signale quantitativ ausgewertet.

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden, bis auf die im Text erwähnten Sonderfälle, mindestens dreimal reproduziert. Bei den Abbildungen handelt es sich um repräsentative Ergebnisse oder Ergebnisausschnitte. Die Werte der graphischen Darstellungen über quantitative Veränderungen in den Western Blots wurden optisch mittels eines Lumi-Imagers ermittelt. Als Kontrolle bezeichnete Proben stellen die Ausgangswerte der Inkubation ( $t = 0$ ) dar.

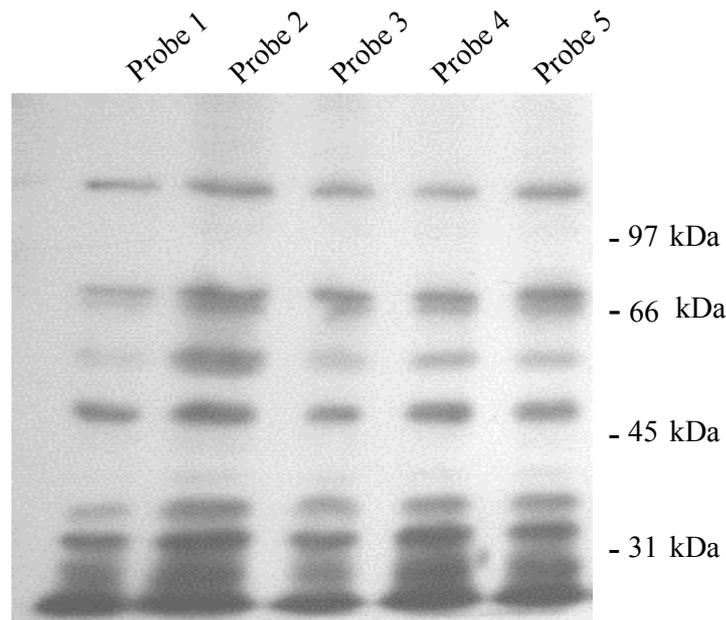
## **VI. Ergebnisse**

### VI.1. In vitro-Untersuchungen an Keratinozyten gesunder Spender zu verschiedenen Einflußgrößen der Proteinphosphorylierung

Für die folgenden Versuche wurden Keratinozyten gesunder weiblicher und männlicher Spender zwischen 19 und 56 Jahren kultiviert. Für jeden Versuch wurde die erste Passage der kultivierten Zellen verwendet. Die Experimente am gesunden Probandenkollektiv dienten der Klärung allgemeiner Einflußgrößen und Randbedingungen der Zellkultur auf die Aktivität der untersuchten Phosphorylierungsarten von Proteinen (Phosphoserin, Phosphothreonin oder Phosphotyrosin). Einige dieser vorgenommenen Veränderungen werden auch in Verbindung mit der Hautkrankheit des atopischen Ekzems diskutiert.

#### *VI.1.1. Calcium-Konzentrationsreihe*

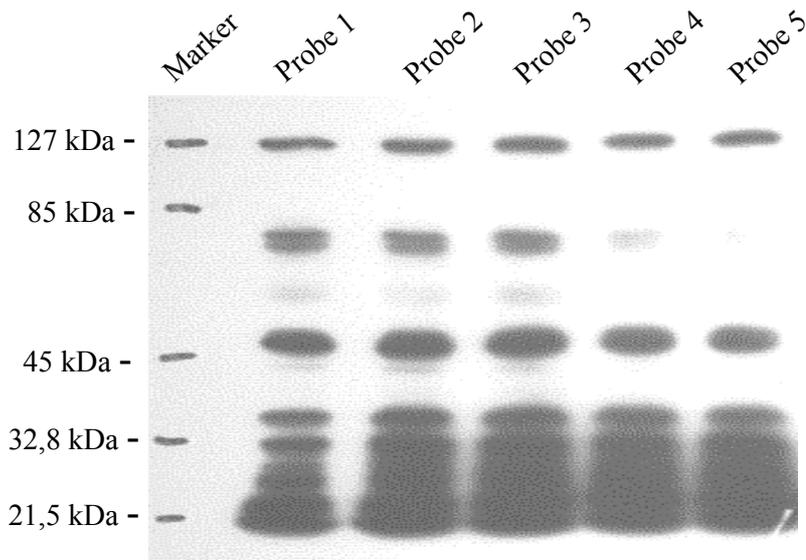
In Abbildung 11 ist ein Western Blot von Keratinozyten gesunder Spender, welche mit einer Calciumchloridlösung inkubiert wurden, dargestellt. Probe 2 dieses Blots zeigt im Vergleich zur Kontrolle (Probe 1) einen Anstieg der Phosphorylierung. Die Proben 3 – 5 sind der Kontrolle sehr ähnlich, jedoch weisen sie im Bereich von 66 kDa eine verstärkte Doppelbande auf, welche in der Kontrolle nur sehr schwach ausgeprägt ist. Außerdem ist das Auftreten einer neuen Bande im Bereich von 50-55 kDa bei Probe 2 deutlich zu sehen, welche in den weiteren Proben wieder schwächer vertreten ist.



1. Antikörper: Anti-Phosphoserin und -threonin					
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Marker
Kontrolle	110 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	150 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	200 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	350 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	BroadRange-BioRad

**Abbildung 11:** Western Blot von 10  $\mu\text{g}$  Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermalen Keratinozyten 1. Passage, welche mit Calciumchloridlösungen der Konzentrationen 110  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  und 350  $\mu\text{M}$  für 20 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphoserin und -threonin erfolgte mit einem monoclonalen anti-Phosphoserin und -threonin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

In Abbildung 12 ist ein weiterer Western Blot dargestellt, für welchen die gleichen zytoplasmatischen Extrakte zur Verfügung standen, wie in dem Western Blot in Abbildung 11. Dieser Western Blot wurde jedoch mit einem Anti-Phosphotyrosin Antikörper detektiert. Gegenüber der Kontrolle weisen alle Proben eine leichte Phosphorylierungszunahme der Phosphotyrosin-positiven Proteine auf. Bei Probe 4 nimmt, durch Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Calciumchloridlösung die Phosphorylierung einer Proteinbande im Bereich von 60-70 kDa stark ab.

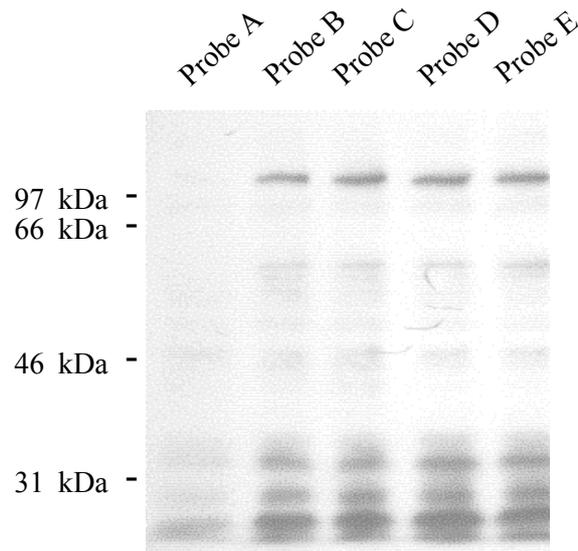


1. Antikörper: Anti-Phosphotyrosin					
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
BroadRang-BioRad	Kontrolle	110 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	150 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	200 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$	350 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$

**Abbildung 12:** Western Blot von 10  $\mu\text{g}$  Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten 1. Passage, welche mit Calciumchloridlösungen der Konzentrationen 110  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  und 350  $\mu\text{M}$  für 20 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphotyrosin erfolgte mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

### VI.1.2. Magnesium-Konzentrationsreihe

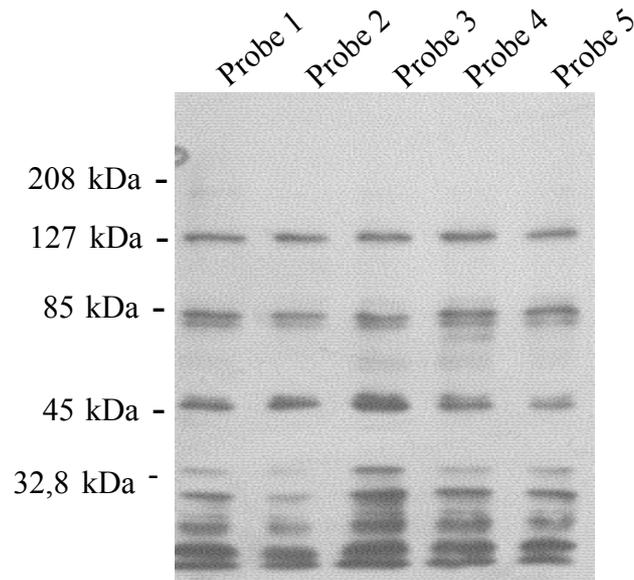
Viele Enzyme wie auch die Sphingomyelinase benötigen Magnesiumionen, um aktiv zu sein. Darüber hinaus bindet ATP, das Substrat von Kinasen, Magnesiumionen in einer 1:1 Stöchiometrie. Auch hier wurden nur primär gezüchtete Keratinozyten verschiedener Spender eingesetzt und deren Zell-Lysate nach der Inkubation mit Magnesiumchlorid gewonnen. Magnesiumionen stimulieren die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-positiven Proteinen. Besonders deutlich tritt dieser Effekt bei den Proteinbanden von 90 kDa und von 40 kDa auf, dieser Effekt kann aber auch bei sehr kleinen Proteinen beobachtet werden.



1. Antikörper: Anti-Phosphoserin und -threonin					
Marker	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E
BroadRang-BioRad	Kontrolle	210 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$	250 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$	300 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$	450 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$

**Abbildung 13:** Western Blot von 10  $\mu\text{g}$  Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten 1. Passage, welche mit Magnesiumchloridlösungen der Konzentrationen 210  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 450  $\mu\text{M}$  für 20 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphoserin und -threonin erfolgte mit einem monoclonalen anti-Phosphoserin und -threonin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Im Gegensatz zu den Phosphoserin- und Phosphothreonin-positiven Proteinen zeigt sich bei den Phosphotyrosin-positiven Proteinen keine allgemeine Steigerung der Phosphorylierung gegenüber der Kontrolle. Probe 2 zeigt hier sogar eine leichte Abnahme, wohingegen Probe 3 eine leichte Steigerung der Proteinbandenintensität aufweist. Probe 4 gleicht im Bandenmuster der Kontrollprobe. Probe 5 hat insgesamt, wie auch Probe 2, eine schwächere Ausprägung der Proteinbanden. In den Proben 3-5 zeigen sich Ansätze einer neuen Proteinbande im Größenbereich von 60-70 kDa.

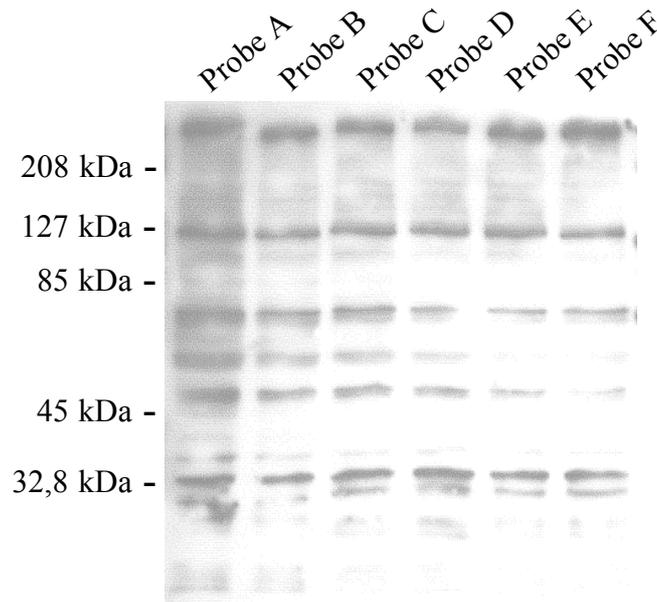


1. Antikörper: Anti-Phosphotyrosin					
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Kaleidoscope	Kontrolle	210 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$	250 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$	300 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$	450 $\mu\text{M}$ $\text{MgCl}_2$

**Abbildung 14:** Western Blot von 10  $\mu\text{g}$  Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermalen Keratinozyten 1. Passage, welche mit Magnesiumchloridlösungen der Konzentrationen 210  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 450  $\mu\text{M}$  für 20 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphotyrosin erfolgte mit einem monoclonalen anti-Phosphotyrosin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

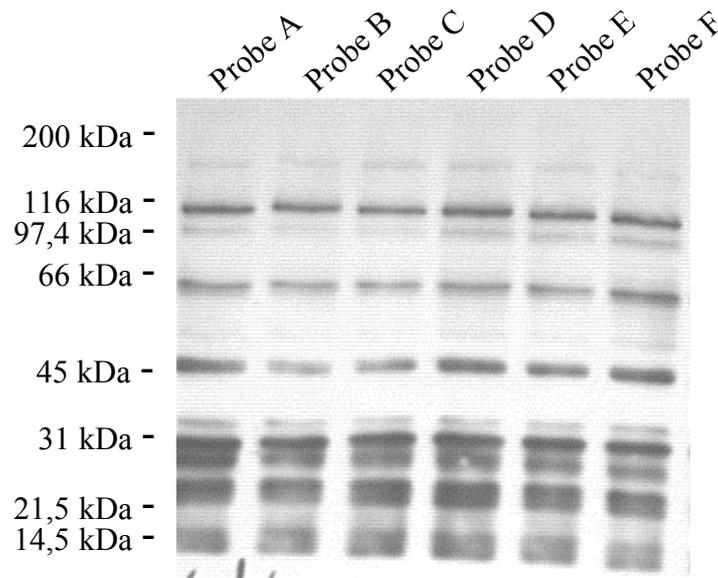
### VI.1.3. Inkubation von Keratinozyten mit $\text{TNF-}\alpha$

Für NEAE wird eine konstitutive Überexpression von  $\text{TNF-}\alpha$  beschrieben. Darüber hinaus ist bekannt, daß dieses Zytokin den Sphingomyelin-Zyklus aktiviert. Daher wurde eine in vitro-Stimulation von Keratinozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\text{TNF-}\alpha$  vorgenommen. Gegenüber der Kontrolle lassen sich nur sehr schwache und unsystematische Unterschiede feststellen. Die Proben E und F weisen eine leichte Abnahme von zwei Proteinen im Bereich von 60-500 kDa auf. Ansonsten sind die Bandenmuster identisch.



1. Antikörper: Anti-Phosphoserin und -threonin						
Marker	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F
Kaleidoscope	Kontrolle	0,25 ng	0,25 ng	0,5 ng	0,5 ng	0,5 ng
		120 min	180 min	60 min	120 min	180 min

**Abbildung 15:** Western Blot von 10  $\mu\text{g}$  Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten 1. Passage, welche mit verschiedenen Konzentrationen von  $\text{TNF-}\alpha$  für 60-180 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphoserin und -threonin erfolgte mit einem monoclonalen anti-Phosphoserin und -threonin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



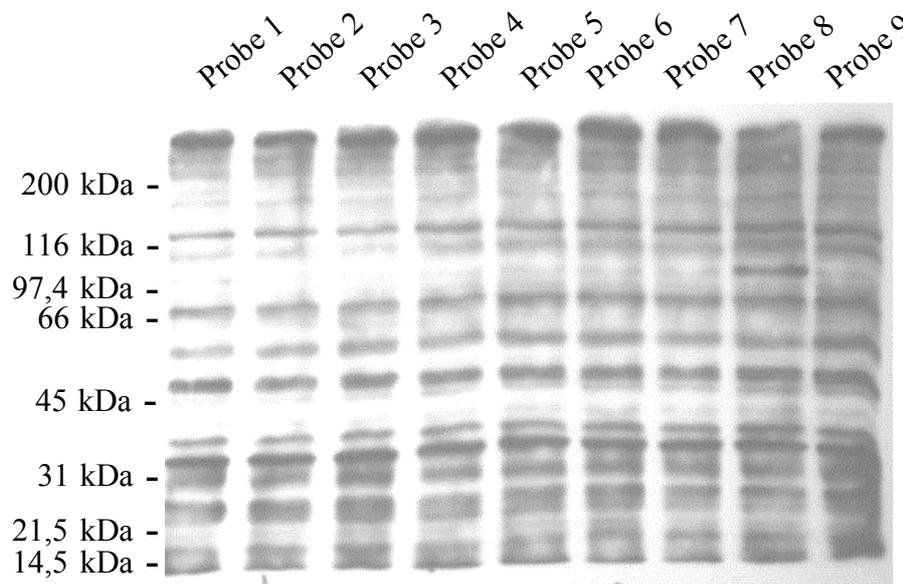
1. Antikörper: Anti-Phosphotyrosin						
Marker	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F
Kaleidoscope	Kontrolle	0,25 ng	0,25 ng	0,5 ng	0,5 ng	0,5 ng
		120 min	180 min	60 min	120 min	180 min

**Abbildung 16:** Western Blot von 10 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermalen Keratinozyten 1. Passage, welche mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  für 60 – 180 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphotyrosin erfolgte mit einem monoclonalen anti-Phosphotyrosin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Die wenigen geringen Unterschiede dieser Versuchsreihe sind nicht systematisch und versuchstechnischen Schwankungen zuzuschreiben.

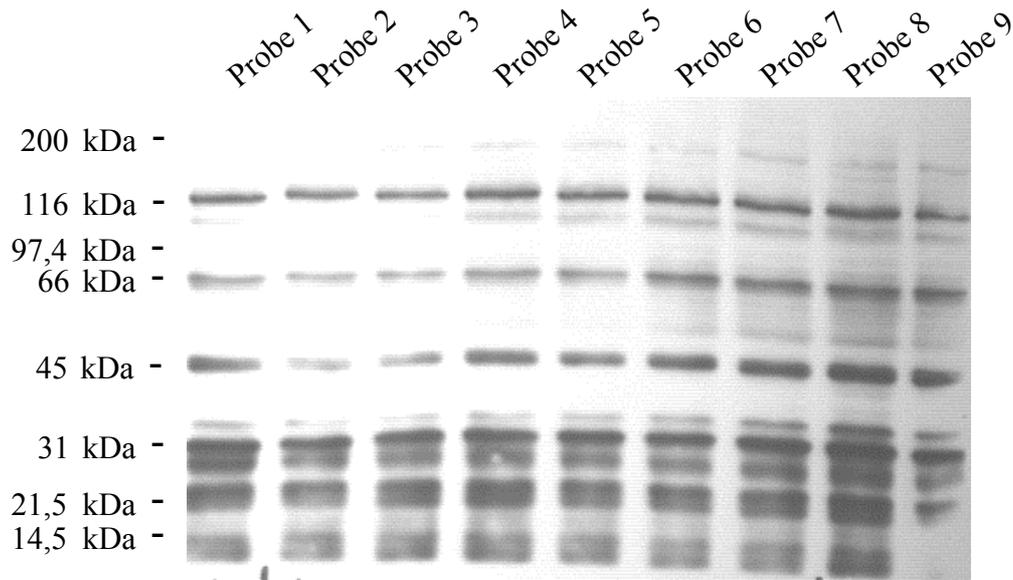
#### VI.1.4. Inkubation von Keratinozyten mit Acyl-L-Carnitin

Acyl-L-Carnitin ist multifunktionell und wird u.a. eingesetzt, um Lipidsysteme von Zellen zu stabilisieren, und dient der Verbesserung der mitochondrialen Funktionen in gealterten Zellen. Es ist darüber hinaus auch ein Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase. Hier fällt besonders auf, dass bei Probe 8 eine völlig neue Bande zum Vorschein kommt, deren Größe um die 90 kDa liegt. Auch ist eine generelle Zunahme des Phosphorylierungsstatus der Proben 8 und 9 zu beobachten. Besonders betroffen sind die Banden um 120 kDa und 116 kDa.



1. Antikörper: Anti-Phosphoserin und -threonin									
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9
Broad Range	Kontrolle	150 $\mu$ M	300 $\mu$ M	300 $\mu$ M					
BioRad		5 min	20 min	60 min	120 min	180 min	210 min	60 min	180 min

**Abbildung 17:** Western Blot von 10  $\mu$ g Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten 1. Passage, welche mit verschiedenen Konzentrationen von Acyl-L-Carnitin für 5–210 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphoserin und -threonin erfolgte mit einem monoclonalen anti-Phosphoserin und -threonin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



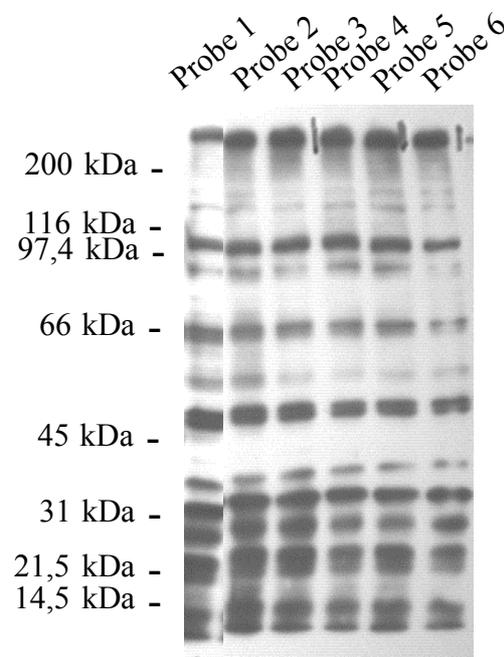
1. Antikörper: Anti-Phosphotyrosin									
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9
Broad	Kontrolle	150 $\mu$ M	300 $\mu$ M	300 $\mu$ M					
Range									
BioRad		5 min	20 min	60 min	120 min	180 min	210 min	60 min	180 min

**Abbildung 18:** Western Blot von 10  $\mu$ g Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermalen Keratinozyten 1. Passage, welche mit verschiedenen Konzentrationen von Acyl-L-Carnitin für 5–210 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphotyrosin erfolgte mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Auch hier zeigt sich bei Probe 8 eine Zunahme verschiedener Phosphotyrosin-positiver Proteine. Bei den Proben 6, 7 und 8 zeigt sich eine sehr schwache Zunahme an Phosphorylierung einer neuen Bande mit einer Proteingröße um 50 kDa.

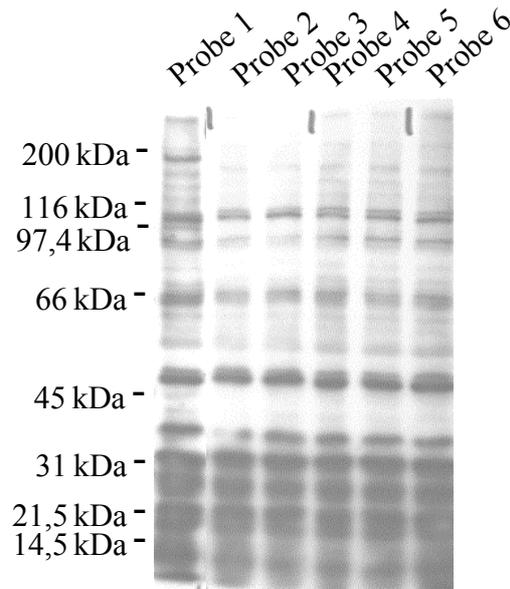
### VI.1.5. *N*-Acetyl-*D*-Sphingosin

Um den direkten Einfluß von exogen applizierten Ceramiden auf die Phosphorylierung von Proteinen in Keratinozyten zu ermitteln, wurde in dieser Versuchsreihe ein membranständiger kurzkettiger Vertreter, das *N*-Acetyl-*D*-Sphingosin, eingesetzt. Gegenüber der Kontrolle zeigt sich kein nennenswerter Unterschied. Bei den Proben 3-6 zeigt sich bei der Bande um 50 kDa eine geringere Markierung mit anti-Phosphoserin und -threonin. Probe 6 weist allgemein eine schwächere Markierung von Proteinen auf, vor allem die Proteinbande um 66 kDa ist davon betroffen.



1. Antikörper: Anti-Phosphoserin und -threonin						
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Broad Range BioRad	Kontrolle	C2	C2+MgCl <sub>2</sub>	C2	C2	C2+MgCl <sub>2</sub>
		5 min	5 min	20 min	60 min	60 min

**Abbildung 19:** Western Blot von 10 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten 1. Passage, welche mit verschiedenen Konzentrationen von *N*-Acetyl-*D*-Sphingosin für 5–60 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Proben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphoserin und -threonin erfolgte mit einem monoklonalen anti-Phosphoserin und -threonin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



1. Antikörper: Anti-Phosphotyrosin						
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Broad Range BioRad	Kontrolle	C2	C2+MgCl <sub>2</sub>	C2	C2	C2+MgCl <sub>2</sub>
		5 min	5 min	20 min	60 min	60 min

**Abbildung 20:** Western Blot von 10 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten dermalen Keratinozyten 1. Passage, welche mit verschiedenen Konzentrationen von N-Acetyl-D-Sphingosin für 5–60 min inkubiert wurden. In der Tabelle befinden sich die Daten der verschiedenen Zellproben und des eingesetzten 1. Antikörpers dieses Versuchs. Der Nachweis von Phosphotyrosin erfolgte mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin Antikörper (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

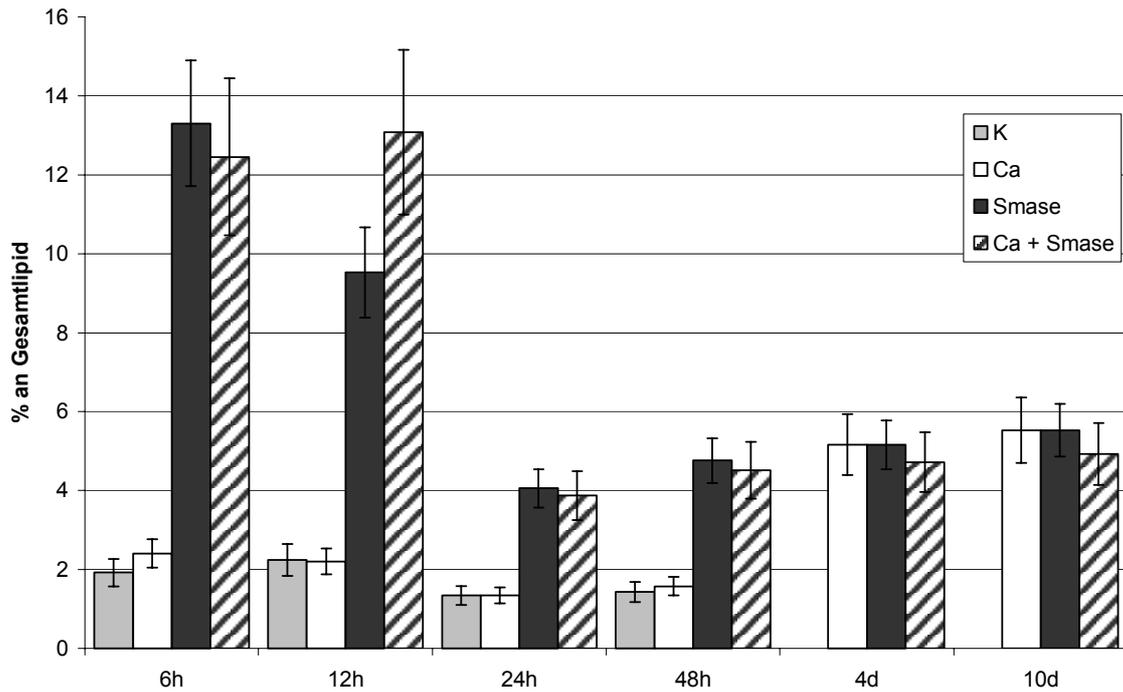
Bei diesem Western Blot läßt sich auf die Bande um 200 kDa der Kontrolle hinweisen. Diese ist bei allen weiteren Proben nicht mehr vorhanden. Eine Proteinbande um 100 kDa ist in der Kontrolle stärker ausgeprägt als bei den restlichen Proben, in denen dieses Protein nur sehr schwach exprimiert ist. Ab der Probe 4 scheint sich die Bande wieder neu hervorzuheben. Auch im Bereich von 66 kDa ist ein Phosphotyrosin-positives Protein der Kontrolle stärker vorhanden als in allen anderen Proben.

## VI.2. Ermittlung des Anteils einzelner Lipide vom Gesamtlipidgehalt in vitro-gewonnener Keratinozyten

Konfluente Keratinozyten, die in unterschiedlicher Weise stimuliert und auf die Aktivität von Erk1/2 sowie JNK untersucht wurden, zeigten die folgenden Veränderungen in ihrer Lipidzusammensetzung. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Sphingolipide gesetzt, da diese im Zusammenhang mit der Beeinflussung der Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten diskutiert werden.

### *VI.2.1. Ceramidanteil vom Gesamtlipidgehalt in vitro-gewonnener Keratinozyten unterschiedlicher Inkubationsansätze*

Zwischen der Kontrolle in Abbildung 21 (1. Säule im Diagramm) und der Inkubation der Keratinozyten mit 1,1 mM Calciumchloridlösung (2. Säule im Diagramm) besteht kaum ein Unterschied in dem prozentualen Anteil des Ceramid. Durch die Zugabe von 25 mU Sphingomyelinase (3. und 4. Säule im Diagramm) steigt bereits nach 6 h der Ceramidanteil um über 500% an. Bei der Verwendung einer Kombination aus Smase und Calciumchlorid bleibt dieser drastische Anstieg erhalten. Bei Verwendung der Sphingomyelinase allein liegt der Ceramidgehalt der Zelle nach 12 h unterhalb des Wertes, welcher nach 6 h ermittelt wurde. Nach 24 h und 48 h Inkubation mit Sphingomyelinase mit und ohne Calciumchlorid zeigen die Keratinozyten immer noch einen doppelten Ceramidanteil im Vergleich zur Kontrolle. Nach vier bis zehn Tagen Dauerinkubation unterscheidet sich der Anteil an Ceramid in den Proben mit Sphingomyelinase, Sphingomyelinase + Calciumchlorid und Calciumchlorid nicht mehr. Dabei steigt die Ceramidmenge in der Calciumchloridinduzierten Probe nach 4 Tagen an und gleicht sich dem Ceramidanteil der anderen Proben an.

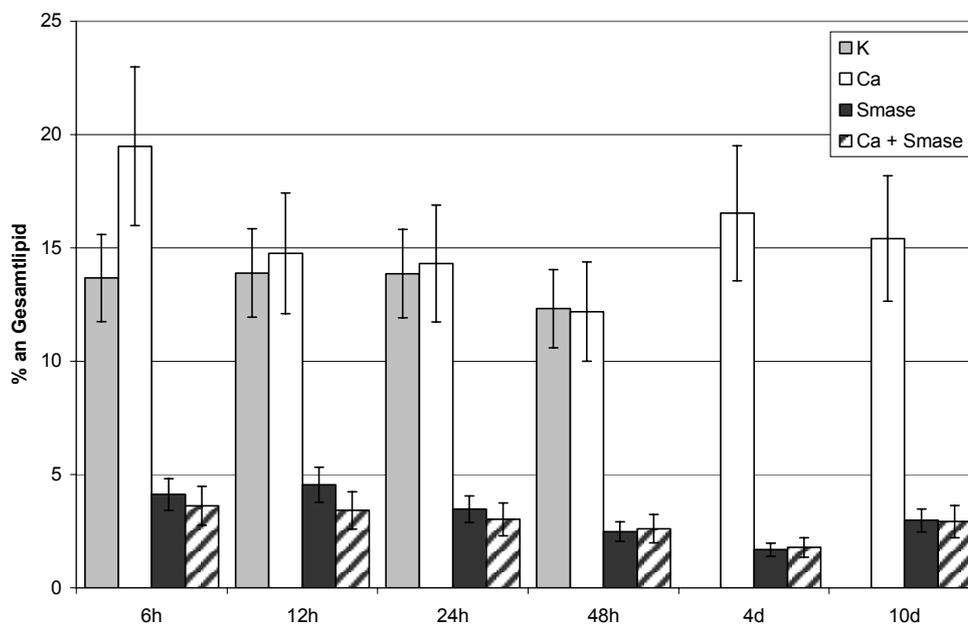


Probe 1a	Probe 2a	Probe 3a	Probe 4a	Probe 1b	Probe 2b	Probe 3b	Probe 4b	Probe 1c	Probe 2c	Probe 3c	Probe 4c	Probe 1d	Probe 2d	Probe 3d	Probe 4d	Probe 2e	Probe 3e	Probe 4e	Probe 2f	Probe 3f	Probe 4f		
Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation			
6 h				12 h				24 h				48 h				4 d				10 d			

**Abbildung 21:** Anteil an Ceramid des Gesamtlipidgehalts kultivierter Keratinozyten 1. Passage, welche mit 1,1 mM Calciumchloridlösung, 25mU Sphingomyelinase und einer Kombination aus Calciumchlorid und Sphingomyelinase über 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4 d und 10 d inkubiert wurden. Die unbehandelte Kontrolle konnte lediglich bis zu 48 h mit untersucht werden, da bei einem längeren Zeitraum die Zellen nicht mehr adhären und die Ergebnisse nicht auswertbar waren. Die Tabelle zeigt die unterschiedliche Probenbezeichnung zu jeder Inkubationsgruppe. Die Lipidzusammensetzung der Zellen wurde dünnschichtchromatographisch ermittelt und ausgewertet.

### VI.2.2. Sphingomyelinanteil vom Gesamtlipidgehalt in vitro-gewonnener Keratinozyten unterschiedlicher Inkubationsansätze

In Abbildung 22 wird der Sphingomyelinanteil kultivierter Keratinozyten dargestellt. Es zeigt sich ein umgekehrter Verlauf wie zuvor bei der Ermittlung des Ceramidanteils. Die Kontrolle (Probe 1a-d) und die Probe mit reiner  $\text{CaCl}_2$ -Inkubation (Probe 2a-f) bleiben im Verlauf der 10 d auf gleich hohem Niveau. Lediglich nach den ersten 6 h zeigt sich ein größerer Anstieg bei der Probe mit reiner  $\text{CaCl}_2$ -Inkubation (Probe 2a). Die Inkubation mit Sphingomyelinase (mit und ohne  $\text{CaCl}_2$ ) hingegen weist ein Absinken des Sphingomyelinanteils auf 20 – 30% des Ausgangswertes auf. Die weitere Inkubation mit Smase und oder  $\text{CaCl}_2$  hat ein weiteres Absinken der Sphingomyelinmenge in den Zellen zur Folge.

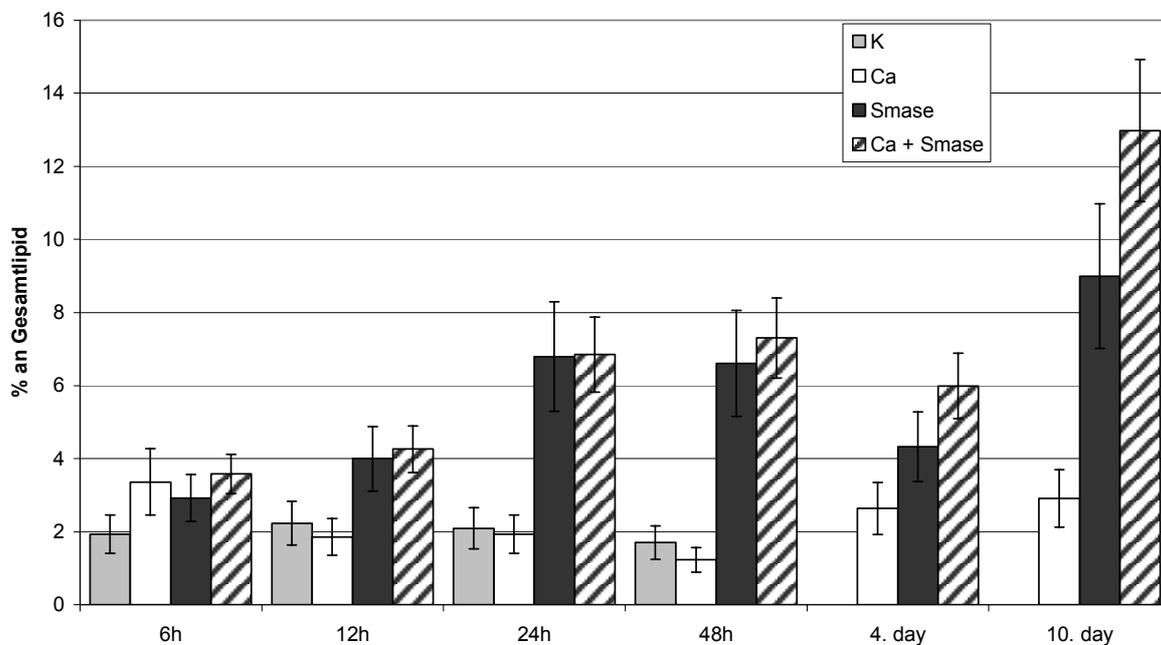


Probe 1a	Probe 2a	Probe 3a	Probe 4a	Probe 1b	Probe 2b	Probe 3b	Probe 4b	Probe 1c	Probe 2c	Probe 3c	Probe 4c	Probe 1d	Probe 2d	Probe 3d	Probe 4d	Probe 2e	Probe 3e	Probe 4e	Probe 2f	Probe 3f	Probe 4f		
Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation			
6 h				12 h				24 h				48 h				4 d				10 d			

**Abbildung 22:** Anteil an Sphingomyelin des Gesamtlipidgehalts kultivierter Keratinozyten 1. Passage, welche mit 1,1 mM Calciumchloridlösung, 25mU Sphingomyelinase und einer Kombination aus Calciumchlorid und Sphingomyelinase über 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4 d und 10 d inkubiert wurden. Die unbehandelte Kontrolle konnte lediglich bis zu 48 h mit untersucht werden, da bei einem längeren Zeitraum die Zellen nicht mehr adhären und die Ergebnisse nicht auswertbar waren. Die Tabelle zeigt die unterschiedliche Probenbezeichnung zu jeder Inkubationsgruppe. Die Lipidzusammensetzung der Zellen wurde dünnschichtchromatographisch ermittelt und ausgewertet.

### VI.2.3. Glucocerebrosidanteil vom Gesamtlipidgehalt in vitro-gewonnener Keratinozyten unterschiedlicher Inkubationsansätze

Zu Beginn der Inkubation weisen alle Zellen annähernd den gleichen Anteil an Glucosylceramid auf. Erst nach 24 h und 48 h steigt der Glucocerebrosidanteil der Proben, welche mit Sphingomyelinase inkubiert wurden, um fast 250% an, wohingegen die Kontrolle und die Probe 2 auf dem gleichen Niveau bleiben. Nach 4 Tagen gibt es einen kleinen Einbruch bei den Proben 3 d und 4 d. Allerdings nach 10 Tagen steigt der Anteil an Glucocerebrosid dann insgesamt auf 300% bei der Probe 3f mit reiner Sphingomyelinase Inkubation. Auf 500% steigt Probe 4f bei der Kombinationsinkubation von Calciumchlorid und Sphingomyelinase.

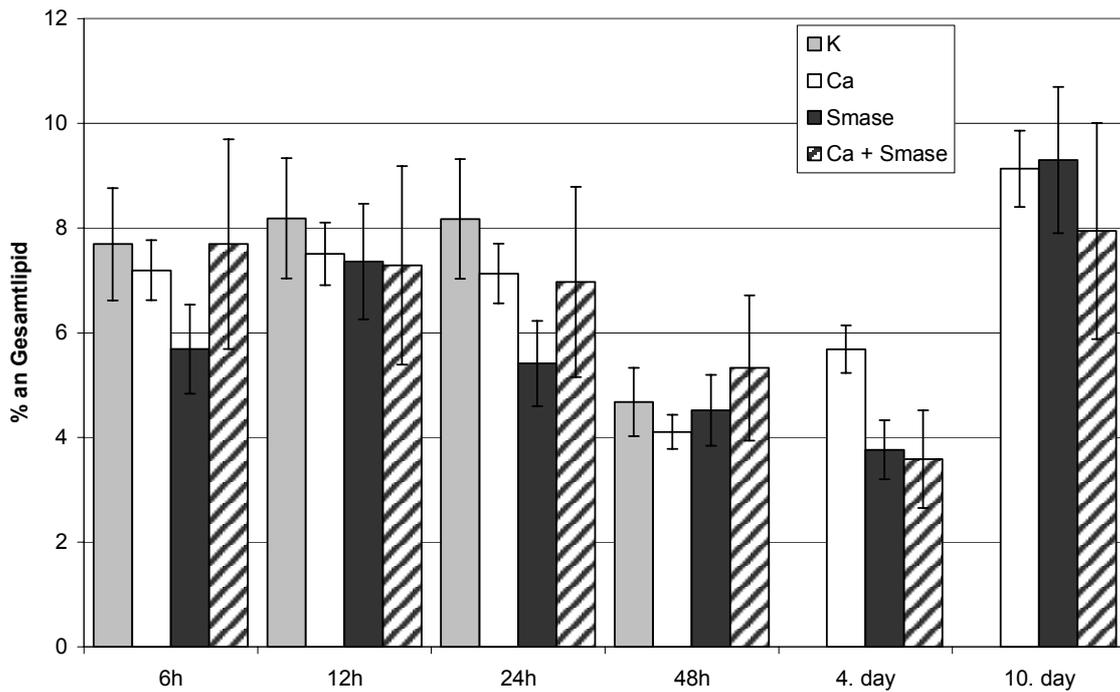


Probe 1a	Probe 2a	Probe 3a	Probe 4a	Probe 1b	Probe 2b	Probe 3b	Probe 4b	Probe 1c	Probe 2c	Probe 3c	Probe 4c	Probe 1d	Probe 2d	Probe 3d	Probe 4d	Probe 2e	Probe 3e	Probe 4e	Probe 2f	Probe 3f	Probe 4f		
Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation				Inkubation			
6 h				12 h				24 h				48 h				4 d				10 d			

**Abbildung 23:** Anteil an Glucocerebrosid des Gesamtlipidgehalts kultivierter Keratinozyten 1. Passage, welche mit 1,1 mM Calciumchloridlösung, 25mU Sphingomyelinase und einer Kombination aus Calciumchlorid und Sphingomyelinase über 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4 d und 10 d inkubiert wurden. Die unbehandelte Kontrolle konnte lediglich bis zu 48 h mit untersucht werden, da bei einem längeren Zeitraum die Zellen nicht mehr adhären und die Ergebnisse nicht auswertbar waren. Die Tabelle zeigt die unterschiedliche Probenbezeichnung zu jeder Inkubationsgruppe. Die Lipidzusammensetzung der Zellen wurde dünnschichtchromatographisch ermittelt und ausgewertet

#### VI.2.4. Phosphatidylserinanteil vom Gesamtlipidgehalt in vitro-gewonnener Keratinozyten unterschiedlicher Inkubationsansätze

Der Anteil an Phosphatidylserin bleibt bei allen Proben nahezu konstant. Lediglich nach 6 h zeigen die Kontrolle und Probe 2a eine kleine Erhöhung gegenüber den restlichen Proben. Nach 48h sinken alle 4 Proben leicht ab, steigen jedoch nach 10d wieder an.

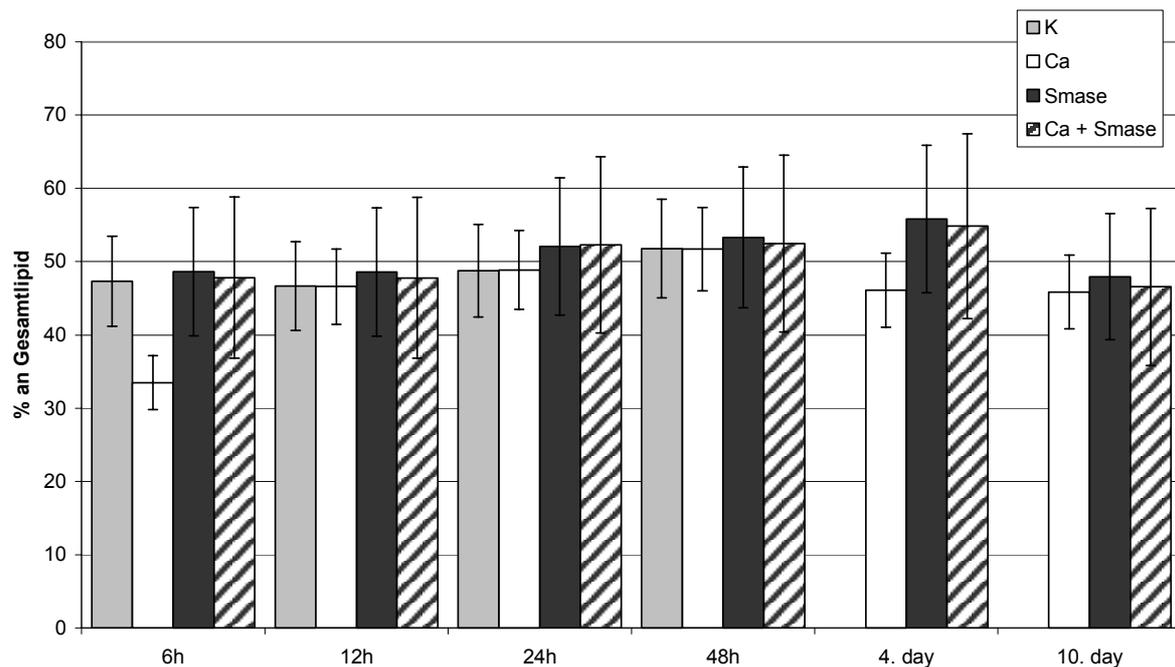


Probe 1a	Probe 2a	Probe 3a	Probe 4a	Probe 1b	Probe 2b	Probe 3b	Probe 4b	Probe 1c	Probe 2c	Probe 3c	Probe 4c	Probe 1d	Probe 2d	Probe 3d	Probe 4d	Probe 2e	Probe 3e	Probe 4e	Probe 2f	Probe 3f	Probe 4f
Inkubation 6 h				Inkubation 12 h				Inkubation 24 h				Inkubation 48 h				Inkubation 4 d			Inkubation 10 d		

**Abbildung 24:** Anteil an Phosphatidylserin des Gesamtlipidgehalts kultivierter Keratinozyten 1. Passage, welche mit 1,1 mM Calciumchloridlösung, 25mU Sphingomyelinase und einer Kombination aus Calciumchlorid und Sphingomyelinase über 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4 d und 10 d inkubiert wurden. Die unbehandelte Kontrolle konnte lediglich bis zu 48 h mit untersucht werden, da bei einem längeren Zeitraum die Zellen nicht mehr adhären und die Ergebnisse nicht auswertbar waren. Die Tabelle zeigt die unterschiedliche Probenbezeichnung zu jeder Inkubationsgruppe. Die Lipidzusammensetzung der Zellen wurde dünnschichtchromatographisch ermittelt und ausgewertet.

### VI.2.5. Phosphatidylcholinanteil vom Gesamtlipidgehalt in vitro-gewonnener Keratinozyten unterschiedlicher Inkubationsansätze

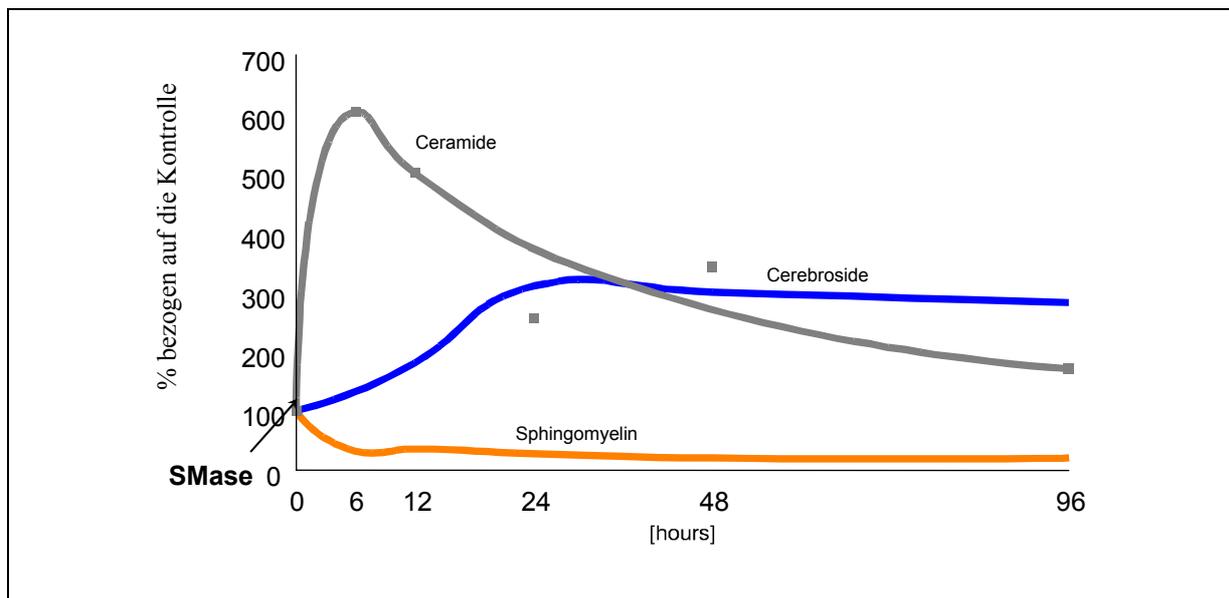
Auch hier zeigt sich kein großer Unterschied zwischen den Proben in Abbildung 25. Lediglich Probe 2a weist auf eine geringere Konzentration an Phosphatidylcholin nach 6 Stunden Inkubation mit Calciumchlorid auf. Der PC-Anteil der Probe bleibt während der weiteren Inkubation konstant bei ca. 50% der Gesamtlipide.



Probe 1a	Probe 2a	Probe 3a	Probe 4a	Probe 1b	Probe 2b	Probe 3b	Probe 4b	Probe 1c	Probe 2c	Probe 3c	Probe 4c	Probe 1d	Probe 2d	Probe 3d	Probe 4d	Probe 2e	Probe 3e	Probe 4e	Probe 2f	Probe 3f	Probe 4f
Inkubation 6 h				Inkubation 12 h				Inkubation 24 h				Inkubation 48 h				Inkubation 4 d			Inkubation 10 d		

**Abbildung 25:** Anteil an Phosphatidylcholin des Gesamtlipidgehalts kultivierter Keratinozyten 1. Passage, welche mit 1,1 mM Calciumchloridlösung, 25mU Sphingomyelinase und einer Kombination aus Calciumchlorid und Sphingomyelinase über 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4 d und 10 d inkubiert wurden. Die unbehandelte Kontrolle konnte lediglich bis zu 48 h mit untersucht werden, da bei einem längeren Zeitraum die Zellen nicht mehr adhären und die Ergebnisse nicht auswertbar waren. Die Tabelle zeigt die unterschiedliche Probenbezeichnung zu jeder Inkubationsgruppe. Die Lipidzusammensetzung der Zellen wurde dünnschichtchromatographisch ermittelt und ausgewertet.

Zusammenfassend zeigt die Kinetik der Änderung des Sphingolipidgehalt, welche über einen Zeitraum von 96 Stunden aufgenommen wurde, einen schnellen und starken Anstieg von Ceramid. Dieser Anstieg geht einher mit dem Absinken des zellulären Sphingomyelingehtes. Sphingomyelin sinkt in den ersten 6 h ab und bleibt danach konstant, bei einem äußerst geringen Gesamtanteil. Dem starken Anstieg der Ceramide folgt nach 12 h ein langsamer Abfall bis nach 96 h fast das Ausgangsniveau erreicht ist. Im Vergleich dazu steigen die Cerebroside langsam nach 12 h und 24 h auf über 300% an und verweilen dann auf dieser Konzentration bis zum Ende der untersuchten Kinetik.



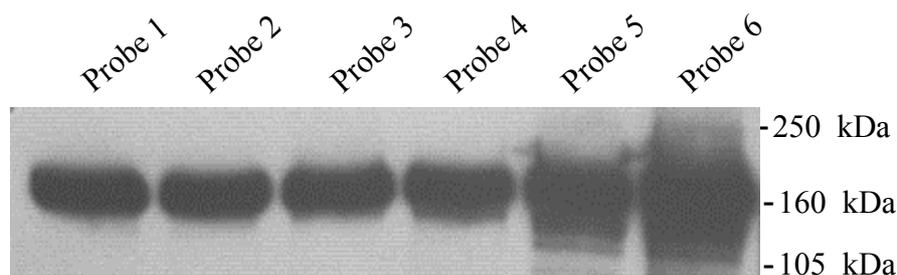
**Abbildung 26:** Kinetik der Anteile an Ceramid; Cerebrosid und Sphingomyelin von *in vitro* gewonnenen Keratinozyten nach Zugabe von Sphingomyelinase über einen Zeitraum von 96 h.

### VI.3. Differenzierung von primären Keratinozyten

#### VI.3.1. *Überprüfung der Differenzierung anhand des Differenzierungsmarkers Involukrin.*

Wie in der Einleitung erwähnt ist die Differenzierung essentiell für die Entwicklung und das Entstehen der Barrierefunktion der Haut. Differenzierung kann z.B. durch Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) gefördert werden. In den folgenden Versuchen wurde im Keratinozytenmedium KSFM eine 1,1 mM Calciumchloridlösung angesetzt. Die Keratinozyten wurden für 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4 d und 10 d mit dieser Lösung inkubiert.

Folgende Western Blots sind das Ergebnis eines Calciumchlorid-Shiftes über diese verschiedenen Zeitpunkte. Als Differenzierungsnachweis wurde der Antikörper anti-Involukrin ausgewählt, da eine zunehmende Differenzierung der Zellen mit einer erhöhten Expression des Proteins einhergeht (Einleitung II.2).



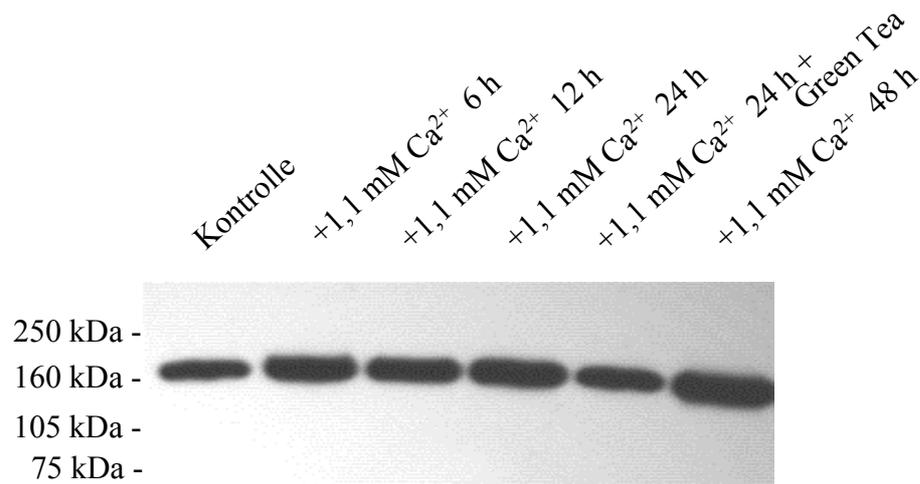
1. Antikörper: Anti-Involukrin						
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Marker
Kontrolle	1 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	2 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	4 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	7 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	10 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	Rainbow

**Abbildung 27:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoklonalen anti-Involukrin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Eine stärkere Expressionsbande ist nach 2-4 Tagen Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$  erstmals in Abbildung 27 zu erkennen. Extrem intensiv verstärkt sich die Bande nach 7 bzw. 10 Tagen. Hier sind die Zellen im Endstadium der Differenzierung. Anhand dieses Calciumchlorid-Shiftes ist somit eine Differenzierung festzustellen. Dieses System dient den nach folgenden Experimenten als

Ausgangsvoraussetzung für die Überprüfung der Signaltransduktionswege im Hinblick auf die Differenzierung.

In einem weiteren Versuch wurde zusätzlich ein Extrakt des grünen Tees (GTE) hinzugegeben, um dessen Wirkung auf die Differenzierung zu bewerten (Abbildung 28).



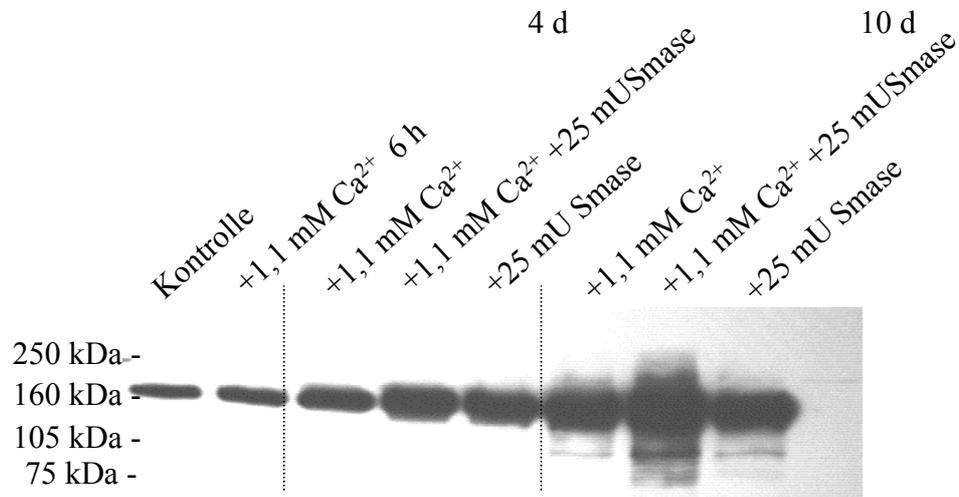
1. Antikörper: Anti-Involukrin Antikörper						
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Rainbow	Kontrolle	6 h	12 h	24 h	24 h	48 h
		1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + Green Tea	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>

**Abbildung 28:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 6, 12, 24 und 48 h. Zusätzlich wurde bei Probe 5 zu der Calciumchlorid-Inkubation, Green Tea (50 µg/ml) hinzugegeben (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-Involukrin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Die erhöhte Expression von Involukrin ist hier ab 48 h zu registrieren. Durch die Zugabe eines Green Tea-Extraktes (50 µg/ml) kann die Involukrin Expression nach 24 Stunden leicht vermindert werden.

In einer weiteren Untersuchung wurde als weiteres Reagenz Sphingomyelinase den Keratinozyten zugegeben, um ebenfalls dessen Wirkung auf die Differenzierung zu

untersuchen (Abbildung 29). Die Zugabe von Sphingomyelinase beeinflusst die Ceramidfreisetzung aus Sphingomyelin in der Plasmamembran.



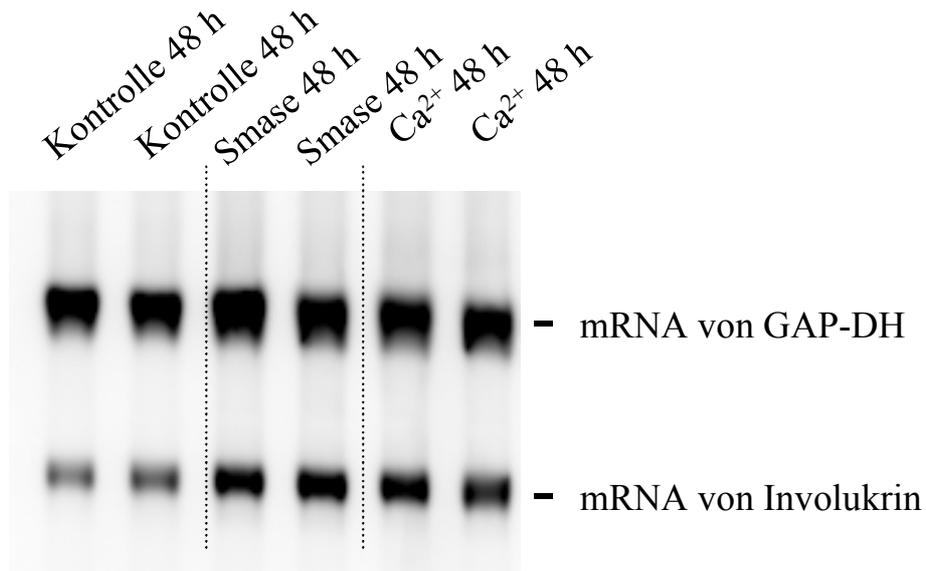
1. Antikörper: Anti-InvolukrinAntikörper								
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
Rainbow	Kontrolle	6 h	4 d	4 d	4 d	10 d	10 d	10 d
		1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + 25 mU Smase	25 mU Smase	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + 25 mU Smase	25 mU Smase

**Abbildung 29:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 6 h, 4 d und 10 d. Desweiteren Inkubationen mit 25 mU Sphingomyelinase über 4 d und 10 d. Zusätzlich wurde noch eine Inkubation von 1,1 mM Ca<sup>2+</sup> + 25 mU Sphingomyelinase über 4 d und 10 d vorgenommen (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-Involukrin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Hervorzuheben ist hier ebenfalls eine erhöhte Expression an Involukrin durch die zugesetzte Sphingomyelinase nach 4 und 10 Tagen. Eine 10-tägige Aktivierung mit beiden Stimuli (Sphingomyelinase und Calciumchlorid) bedingt eine additive Stimulation der Involukrin Expression.

### VI.3.1.1 Quantitative Ermittlung der Involukrin-mRNA

Folgender Northern Blot bestätigt die Ergebnisse der Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29. Alle Ergebnisse beziehen sich auf den GAP-DH-Anteil in den Zellen (Housekeeping Gene). Weiterhin ist deutlich zu erkennen, daß bei der Kontrolle nach 48 h die Bildung der m-RNA von Involukrin nur ansatzweise zu sehen ist.

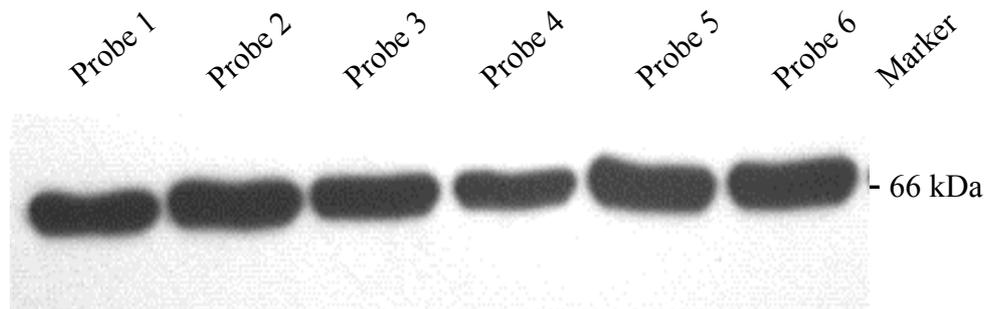


**Abbildung 30:** Northern Blot von 5µg Gesamt-RNA von dermalen Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit 1,1 mM Calciumchloridlösung und 25 mU Sphingomyelinase über 48 h. Die obere Bandenreihe zeigt als Kontrollwert die m-RNA Expression von GAP-DH. In der unteren Reihe wurde der quantitative Anteil der Involukrin m-RNA ermittelt.

Abbildung 30 zeigt, daß durch die Zugabe von Ca<sup>2+</sup> und Sphingomyelinase die m-RNA von Involukrin verstärkt gebildet wird. Dies ist in jeder der beiden Proben deutlich zu sehen.

### VI.3.2. Einfluß des Differenzierungsgrades auf die Expression von NFκ-B

NFκ-B ist ein Transkriptionsfaktor, der im Zusammenhang mit der stressinduzierten Signaltransduktion über Serin/Threonin Kinasen aktiviert wird. Anlehnend an den Versuch in Abbildung 27 wurde hier nach der erfolgreichen Differenzierung mit 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 10 d die Expression von NFκ-b untersucht.



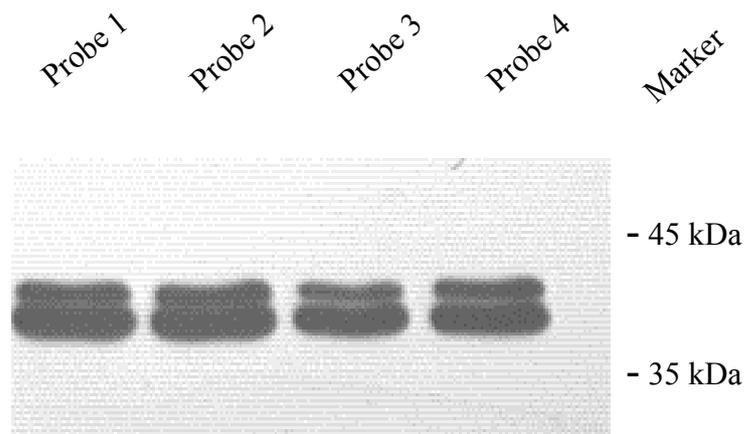
1. Antikörper: Anti-NFκ-b						
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Marker
Kontrolle	1 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	2 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	4 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	7 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	10 d 1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	Broad Range

**Abbildung 31:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoklonalen anti-NF-κ-B Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Trotz fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten zeigen sich kaum Expressionsveränderungen von NFκ-B. Lediglich in Probe 4 (Calciumchlorid-Inkubation über 4 d) deutet sich ein leichter Rückgang der NFκ-B Expression an. Diese Abnahme an Protein wird jedoch nach 7 d und 10 d wieder zum Ausgangswert ausgeglichen trotz erhöhter Differenzierung.

### VI.3.3. Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und der Aktivität von MAPK

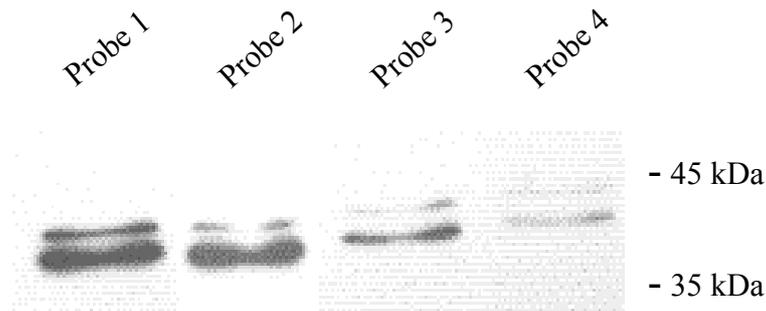
Zur Überprüfung der aktivierten Form der MAP-Kinase (pMAPK: pErk1, pErk2) wurde ebenfalls ein Western Blot erstellt. Hier wurden zunächst die Zellen über 4, 7 und 10 Tage mit 1,1 mM Calciumchloridlösung inkubiert. Der Involukringehalt wurde bestimmt und zeigte wie auch in Abbildung 27 ab dem 4. Tag eine zunehmende Expression bis hin zum 10. Tag. Zunächst wurde der Gehalt an exprimiertem Erk1 und Erk2 überprüft.



1. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2				
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Marker
Kontrolle	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 4 d	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 7 d	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 10 d	Kaleidoscope

**Abbildung 32:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 4 d, 7 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Im Gegensatz zur Aktivität (Abbildung 33) ändert sich die Expression von Erk1 und Erk2 nicht mit dem Grad der Differenzierung.

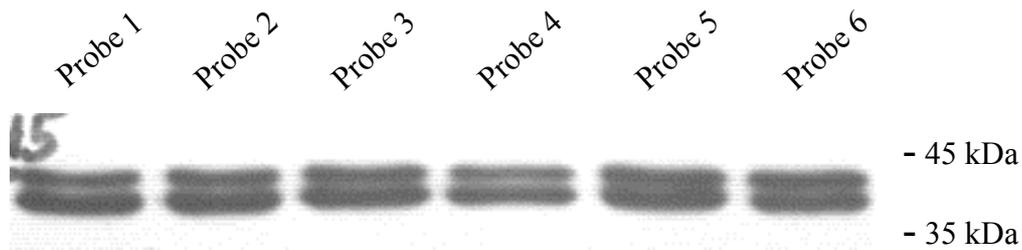


1. Antikörper: Anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2				
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Marker
Kontrolle	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 4 d	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 7 d	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 10 d	Kaleidoscope

**Abbildung 33:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 4 d; 7 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:500) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

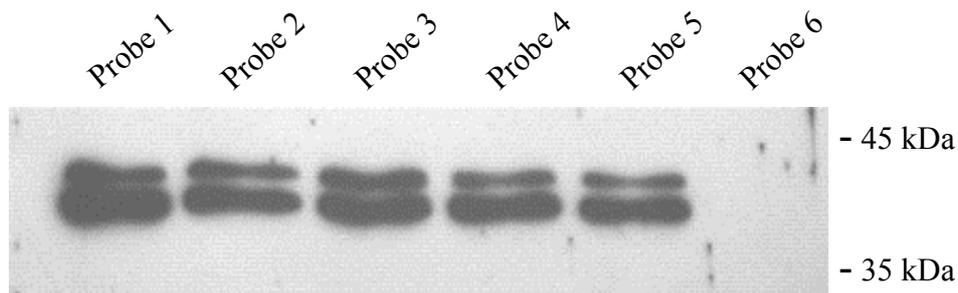
Bei dem Western Blot in Abbildung 33 wird deutlich, daß der Differenzierungsgrad starke Auswirkungen auf die Aktivität der Erk1 (42 kDa) und Erk2 (44 kDa) Kinase hat. Wobei in der Kontrolle noch die Banden für die aktivierte Form von Erk1 und Erk2 gut sichtbar sind, beginnt am 4 Tag der Differenzierung durch 1,1 mM Calciumchloridlösung die Aktivität von Erk2 nachzulassen. Am siebten Tag ist die Aktivität von Erk2 fast vollständig aufgehoben und auch Erk1 zeigt eine schwächere Aktivität. Am zehnten Tag ist die Aktivität von Erk2 nicht mehr und von Erk1 nur noch in Spuren nachweisbar.

Die Ergebnisse aus Abbildung 32 und Abbildung 33 wurden zum Anlaß genommen, die Aktivität von Erk1 und Erk2 nach kürzeren Inkubationszeiten mit erhöhter Calciumionenkonzentration im Medium zu überprüfen. Im folgenden wurden die Aktivitäten und die Expression der Enzyme von Erk1 und Erk2 nach 1, 2, 4, 7 und 10 Tagen gemessen. Es bestätigte sich, daß sich mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad die reine Expression an Erk1 und Erk2 nicht verändert (Abbildung 34).



1. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2						
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Marker
Kontrolle	1 d	2 d	4 d	7 d	10 d	Kaleidoscope
	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>					

**Abbildung 34:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



1. Antikörper: Anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2						
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Marker
Kontrolle	1 d	2 d	4 d	7 d	10 d	Kaleidoscope
	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>					

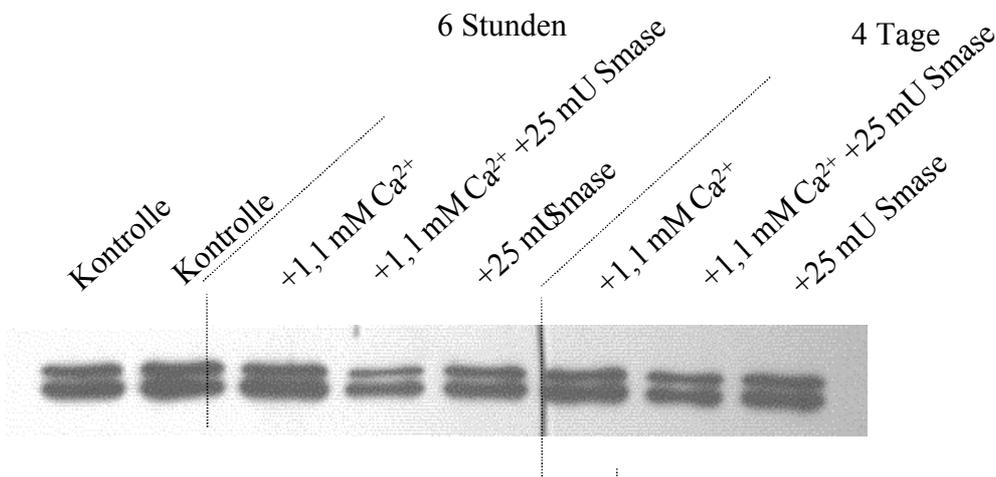
**Abbildung 35:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Der in Abbildung 35 dargestellte Western Blot zeigt die aktivierten Formen von Erk1 und Erk2. Wie schon zuvor deutet sich auch hier an, daß erst am vierten Tag der Differenzierung es zu einer Abnahme der Aktivität dieser Kinasen kommt. Bei Probe 6 in Abbildung 35, ist

die Aktivität nach 10 d nicht mehr nachweisbar. Somit geht die Aktivität von Erk1 und Erk2 mit zunehmender Differenzierung zurück. Eine Abnahme der Aktivität mit zunehmender Differenzierung zeigt sich jedoch erst ab dem vierten Tag.

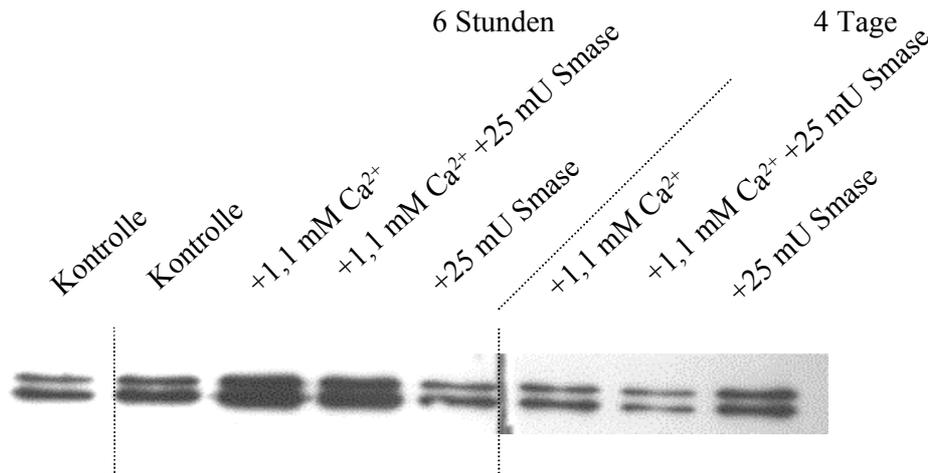
#### VI.3.4. Einfluß von Sphingomyelinase auf die Differenzierung und die Aktivität von Erk1 und Erk2

In dem folgenden Versuch wurde der Einfluß von Sphingomyelinase auf die Expression und die Aktivität der Kinasen Erk1 und Erk2 überprüft. Mit dem anti-Erk1 und anti-Erk2 Antikörper konnten trotz erhöhter Differenzierung keine Unterschiede bei der Expression der beiden Kinasen gezeigt werden (Abbildung 36).



1. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2							
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
Kontrolle	6 h	6 h	6 h	6 h	4 d	4 d	4 d
	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	25 mU Smase	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	25 mU Smase
			25 mU Smase			25 mU Smase	

**Abbildung 36:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 6 h und 4 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



1. Antikörper: Anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2

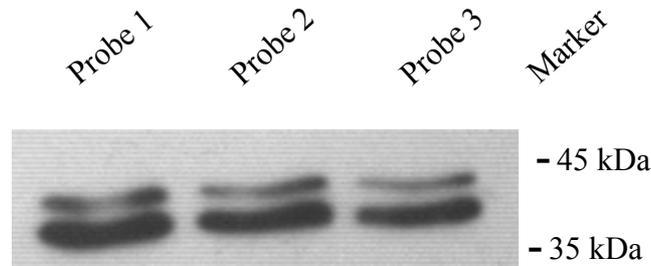
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
Kontrolle	6 h	6 h	6 h	6 h	4 d	4 d	4 d
	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 25 mU Smase	25 mU Smase	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 25 mU Smase	25 mU Smase

**Abbildung 37:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung und einer 25 mU Smase-Lösung über einen Zeitraum von 6 h und 4 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Die Überprüfung der Enzymaktivität in Abbildung 37 mit anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2 zeigt eine Aktivierung nach 6 h Inkubation mit Calciumchlorid bzw. Calciumchlorid und Sphingomyelinase. Sphingomyelinase allein bedingt zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung gegenüber der Kontrolle. Eine 4-tägige Inkubation mit Calciumchlorid oder Calciumchlorid und Sphingomyelinase bewirkt eine Verringerung der Aktivität gegenüber dem 6 h Inkubationswert und gegenüber der Kontrolle. Eine Dauerinkubation mit Smase führt jedoch zu einem Rückgang der Aktivität von Erk1 und Erk2 gegenüber der Kontrolle.

### VI.3.5. Verdoppelung der eingesetzten Calciumchloridkonzentration zur stärkeren Differenzierung der Keratinozyten

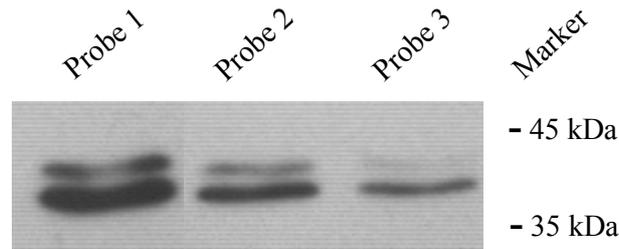
Auch eine doppelte Calciumchloridkonzentration bedingt nach 4 Tagen keine Expressionsveränderung von Erk1 und Erk2 (Abbildung 38).



1. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2			
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Marker
Kontrolle	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 4 d	2,1 mM CaCl <sub>2</sub> 4 d	Kaleidoscope

**Abbildung 38:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermalen Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung und 2,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 4 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

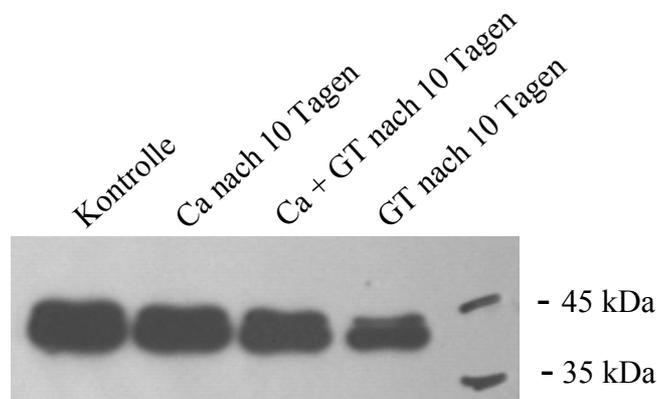
Bei der aktivierten Form zeigt sich jedoch bei einer Erhöhung der Calciumchloridkonzentration ein Rückgang der Aktivität (Abbildung 39).



1. Antikörper: Anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2			
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Marker
Kontrolle	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 4 d	2,1 mM CaCl <sub>2</sub> 4 d	Kaleidoscope

**Abbildung 39:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung und 2,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 4 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

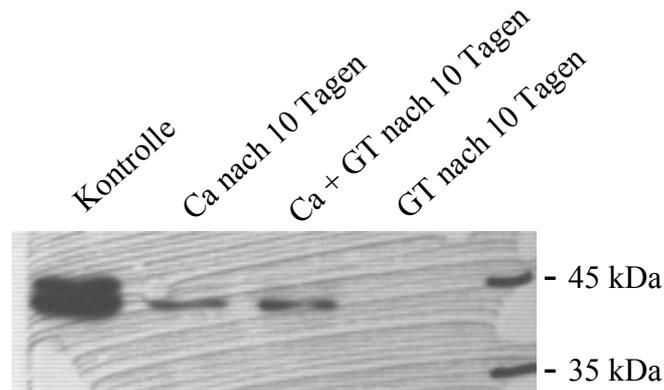
### VI.3.6. Einfluß eines wasserlöslichen catechinhaltigen Extraktes des Grünen Tees auf die Aktivität von Erk1 und Erk2 bei zunehmender Differenzierung



1. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2				
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Marker
Kontrolle	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 10 d	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + GT 10 d	GT 10 d	Kaleidoscope

**Abbildung 40:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die untersuchten Proben wurden mit 1,1 mM Calciumchloridlösung und GT über 10 d inkubiert (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

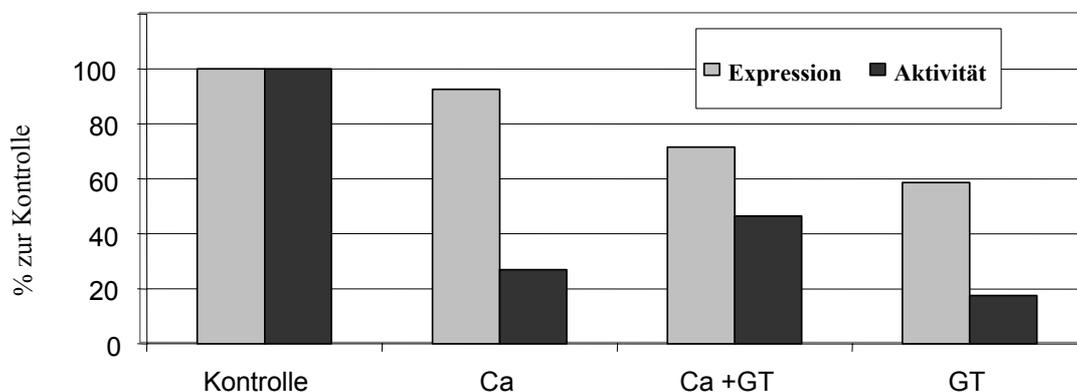
Nach einer Inkubation von 10 d mit 1,1 mM Calciumchlorid verändert sich die Expression von Erk1 und Erk2 in Abbildung 40 nicht. Bei der Kombination von Calciumchlorid und Green Tea Extrakt im Keratinozytenmedium zeigt sich ein leichter Rückgang der Expression an Erk1 und Erk2. In Probe vier ist ein starker Expressionsrückgang an Erk1 und Erk2 zu erkennen, verursacht durch eine alleinige Inkubation mit Green Tea Extrakt.



1. Antikörper Anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2				
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Marker
Kontrolle	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> 10 d	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + GT 10 d	GT 10 d	Kaleidoscope

**Abbildung 41:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die untersuchten Proben wurden mit 1,1 mM Calciumchloridlösung und GT (50 µg/ml) über 10 d inkubiert (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

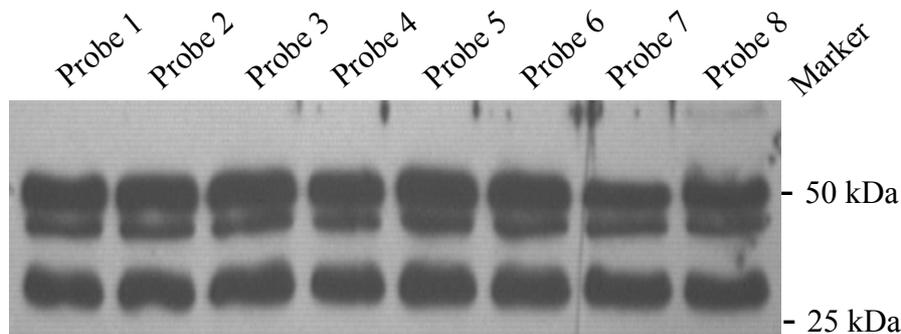
Wiederum zeigt sich in Abbildung 42 die Calciumchlorid abhängige Reduktion der Erk1/2-Aktivität. Der Zusatz des Extraktes des grünen Tees bedingt jedoch in erster Linie eine Abnahme der Erk-Expression.



**Abbildung 42:** quantifizierte Bandenintensität der Western Blots in Abbildung 40 und Abbildung 41.

### VI.3.7. Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und der Aktivität von SAPK/JNK

In dem folgenden Western Blot (Abbildung 43) wurde nach erfolgreicher Differenzierung mittels Inkubation von 1,1 mM Calciumchloridlösung, ein weiteres Protein der Signaltransduktions-Kaskade überprüft. Es wurden alle SAPK/JNK-Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert.



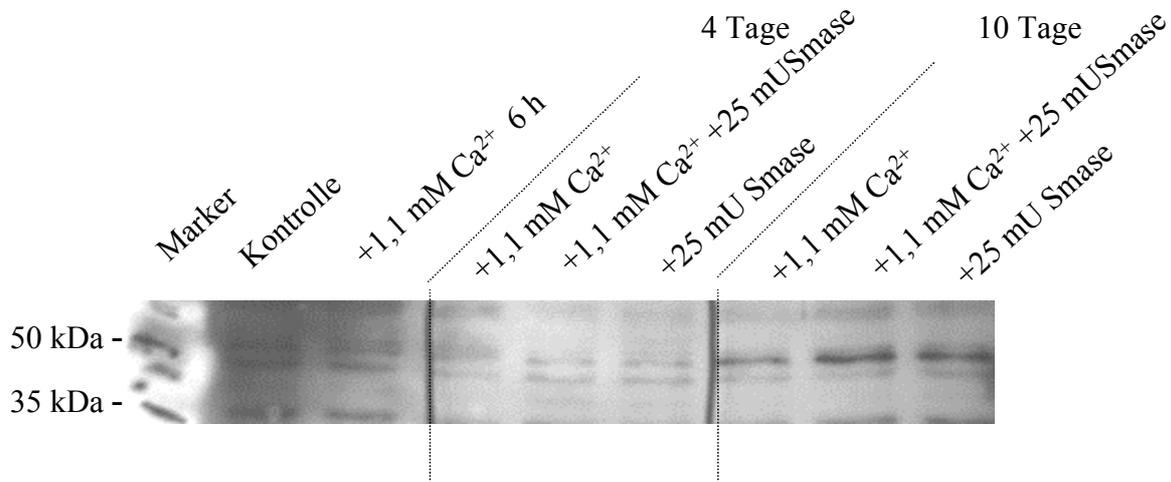
1. Antikörper: Anti-SAPK/JNK								
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Marker
Kontrolle	6 h	4 d	4 d	4 d	10 d	10 d	10 d	Rainbow
	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + 25 mU Smase	25 mU Smase	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + 25 mU Smase	25 mU Smase	

**Abbildung 43:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 6 h, 4 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines SAPK/JNK Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Auch bei dieser Kinase zeigt sich keine Veränderung in der Expression gegenüber dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten, ausgelöst durch Calciumchlorid und/oder der Sphingomyelinase.

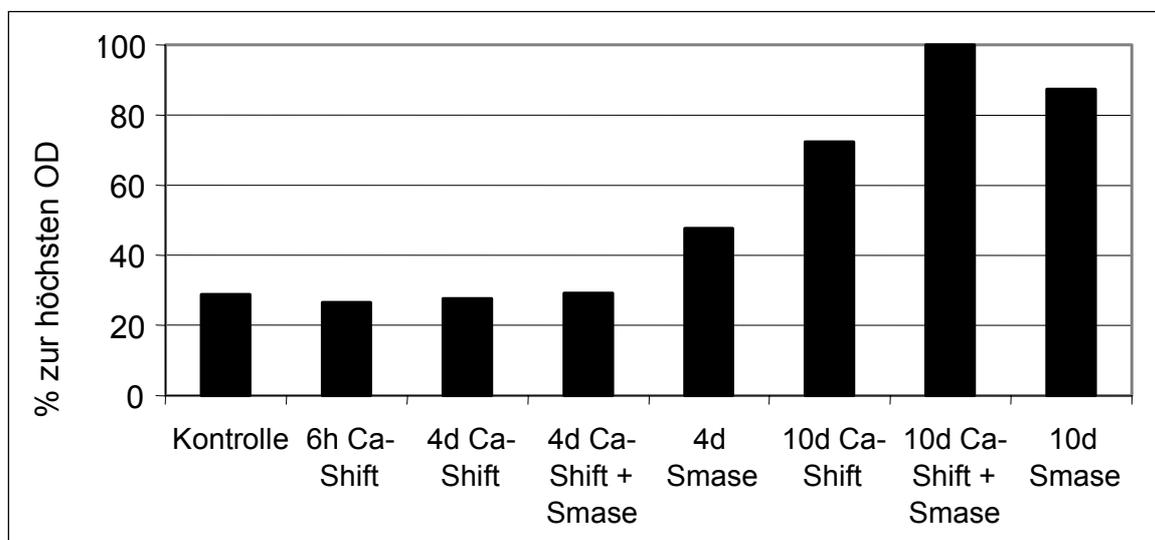
Eine deutliche Erhöhung der Phosphorylierung und damit der Aktivität der JNK/SAPK ist erst nach 10tägiger Inkubation mit 1,1 mM Calciumchlorid und/oder Sphingomyelinase erkennbar. Dabei aktiviert Smase in Kombination mit Calciumchlorid das Enzym stärker als die bakterielle Sphingomyelinase allein und diese aktiviert SAPK/JNK jedoch noch stärker

als Calciumchlorid allein. Diese Tendenz wird bereits nach einer 4tägigen Inkubation sichtbar.



1. Antikörper: Anti-activated-SAPK/JNK								
Marker	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
Rainbow	Kontrolle	6 h	4 d	4 d	4 d	10 d	10 d	10 d
		1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + 25 mU Smase	25 mU Smase	1,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM CaCl <sub>2</sub> + 25 mU Smase	25 mU Smase

**Abbildung 44:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten dermaler Keratinozyten erster Passage. Die Proben resultieren aus einer Inkubation mit einer 1,1 mM Calciumchloridlösung über einen Zeitraum von 6 h, 4 d und 10 d (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines Anti-activated-SAPK/JNK Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



**Abbildung 45:** Quantifizierte Bandenintensität des Western Blots in Abbildung 44.

Zusammenfassend läßt sich folgende Tabelle erstellen:

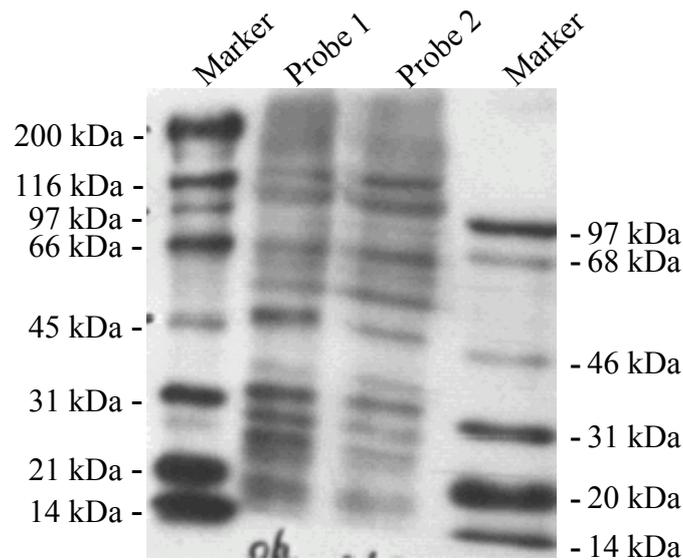
	<b>Erk1/2</b>	<b>pErk1/2</b>	<b>JNK</b>	<b>pJNK</b>	<b>Involukrin</b>
Ca <sup>2+</sup> *	→	↓ kontinuierlich	→	↑ ab 10. Tag	↑ kontinuierlich
Smase*	→	→	→	↑ kontinuierlich	↑ ab 10. Tag
Ca <sup>2+</sup> + Smase*	→	↓ ab 10. Tag	→	↑ ab 10. Tag	↑ kontinuierlich
GTE + Ca <sup>2+</sup> *	↓	↓	-	-	↓

Alle Proben wurden bei 90 – 100% Konfluenz eingesetzt

**Tabelle 2:** Zusammenfassung aller Ergebnisse des Abschnitts VI.3.

#### VI.4. Phosphorylierungsstatus in primären Keratinozyten von normaler und atopischer Haut

Nur wenige primäre Keratinozyten standen für diese Versuche zur Verfügung. Deshalb wurde dieser Vergleich zwischen kultivierten Keratinozyten normaler und atopischer Haut lediglich zweimal reproduziert. Proteinlysate der in vitro-kultivierten Zellen wurden in einem Western Blot Versuch aufgetragen und mittels eines Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers detektiert. Es zeigen sich gleiche Bandenmuster. Unterschiede sind kaum erkennbar. Lediglich die Intensität der Banden der Probe mit Keratinozyten eines atopischen Spenders zeigt einen erhöhten Gesamtstatus an Phosphotyrosin-positiven Proteinen in Abbildung 46.

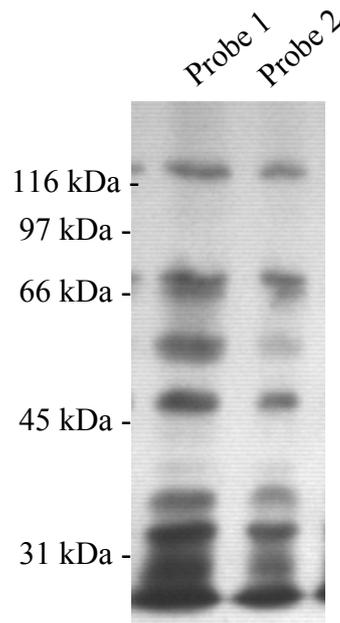


1. Antikörper: Anti-Phosphotyrosin

Marker	Probe 1	Probe 2	Marker
Broad Range	Spender mit atopischer Dermatitis	Spender mit gesunder Haut	ECL

**Abbildung 46:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer dermaler Keratinozyten erster Passage (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-Phosphotyrosin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Bei der Untersuchung mit den anti-Phosphoserin und –threonin-positiven Antikörpern lassen sich ebenfalls keine außergewöhnlichen Proteinexpressionsbanden feststellen. Auch hier erscheint die Expression der Phosphoserin und –threonin-positiven Proteine bei dem Spender mit atopischer Dermatitis leicht erhöht.



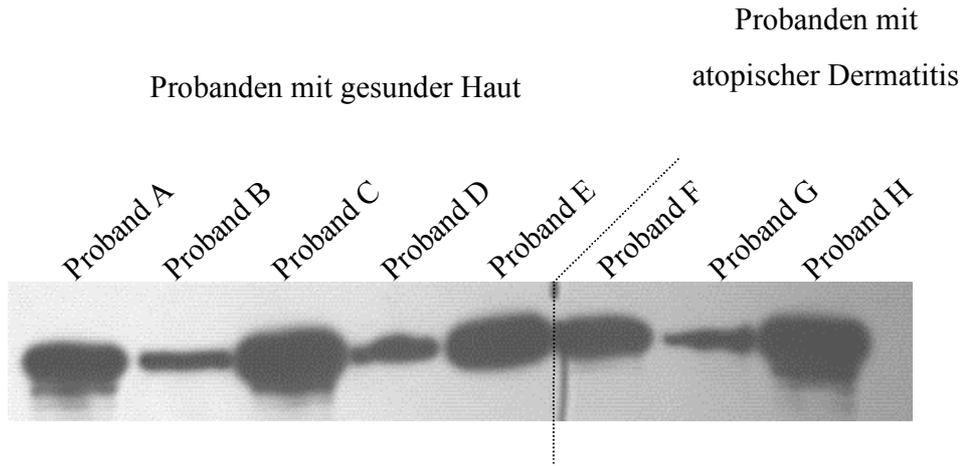
1. Antikörper: Anti-Phosphoserin und anti-Phosphothreonin		
Marker	Probe 1	Probe 2
Broad Range	Spender mit atopischer Dermatitis	Spender mit gesunder Haut

**Abbildung 47:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer dermaler Keratinozyten erster Passage (siehe Tabelle). Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-Phosphoserin und -threonin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

## VI.5. Ex vivo-Untersuchungen an Saugblasenepidermis gesunder und atopischer Haut

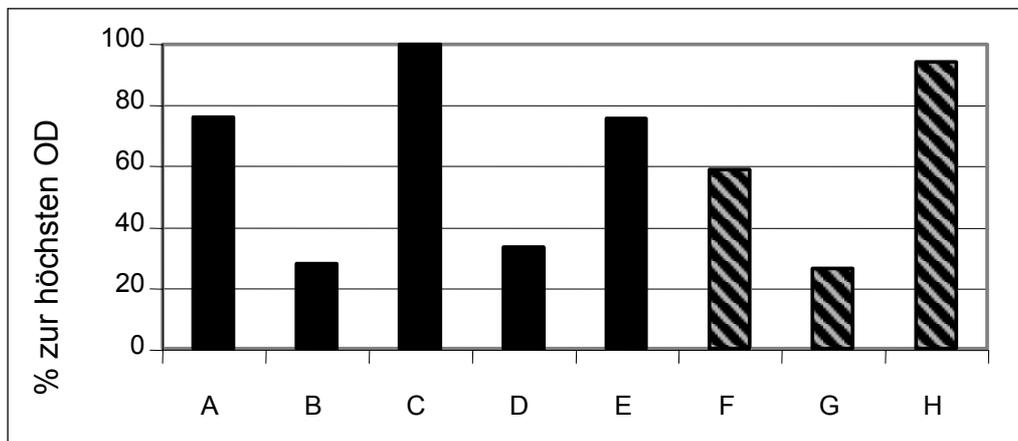
### *VI.5.1. Differenzierungsuntersuchungen an Saugblasenepidermis mittels Involukrin*

Hier wurde normale Haut direkt mit atopischer Haut (NEAE) verglichen. Die Keratinozyten wurden (wie unter V.3.1) isoliert und aufgearbeitet. Zytoplasmatische Proteine wurden mittels Western Blot auf Involukrin Expression untersucht.



I. Antikörper: Anti-Involukrin							
Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F	Probe G	Probe H
Spender mit gesunder Haut (NS)					Spender mit atopischer Dermatitis (AD)		

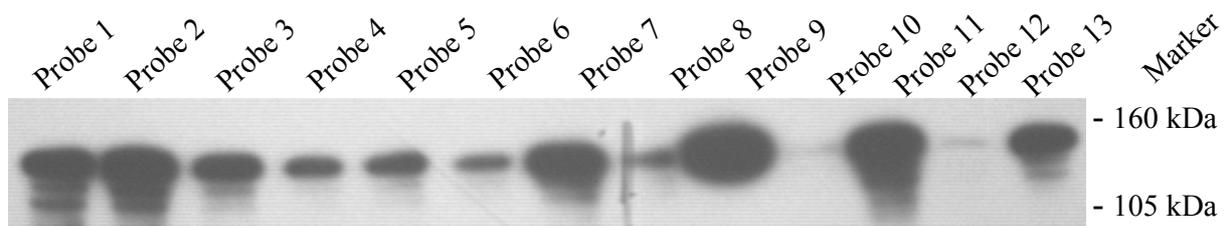
**Abbildung 48:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Probanden A-E mit gesunder Haut und Probanden F-H mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-Involukrin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



**Abbildung 49:** quantifizierte Bandenintensität des Western Blots in Abbildung 48.

Der zytoplasmatische Extrakt der Epidermis von Proband A, C und E enthält viel Involukrin, Proband B und D weisen weniger Involukrin auf. Die Probanden des Kollektivs mit atopischen Ekzem (F und H) haben jeweils auch eine hohe Involukrinexpression, wohingegen Proband G weniger Involukrin exprimiert. Somit zeigt sich eine hohe Heterogenität zwischen den zwei untersuchten Kollektiven. Sowohl gesunde, als auch erkrankte Probanden zeigen eine unterschiedliche Involukrinexpression.

Zusätzlich wurde in Abbildung 50 ein neu ausgewähltes größeres Kollektiv an Spendern untersucht. Auch hier zeigt sich kein Bezug zwischen Hauttyp und ermittelter Involukrinmenge. Die Probe der Probanden 1, 2, 3 und 7 zeigen viel Involukrin, wohingegen die anderen Proben des gesunden Kollektivs wenig auffällige Konzentrationen an Involukrin zeigen. NEAE Probe 9, 11 und 13 weisen viel Involukrin, die Spender 8, 10 und 12 zeigen geringere Konzentrationen an Involukrin auf.

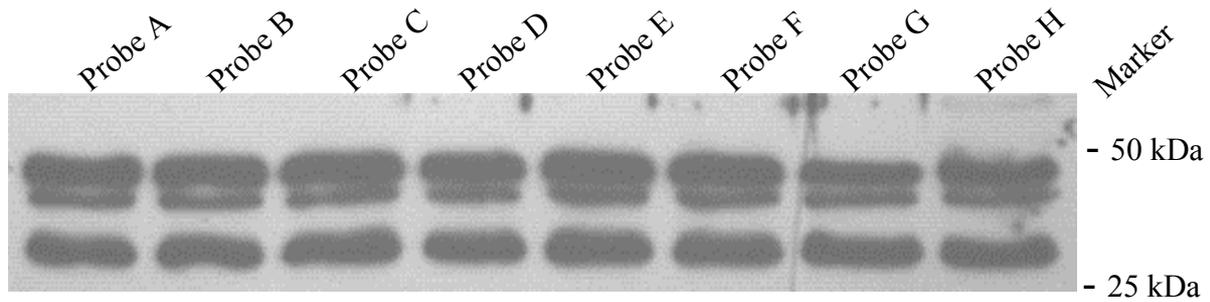


I. Antikörper: Anti-Involukrin												
Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Spender mit gesunder Haut (NS)							Spender mit atopischer Dermatitis (AD)					

**Abbildung 50:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Probanden 1-7 mit gesunder Haut und Probanden 8-13 mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-Involukrin Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

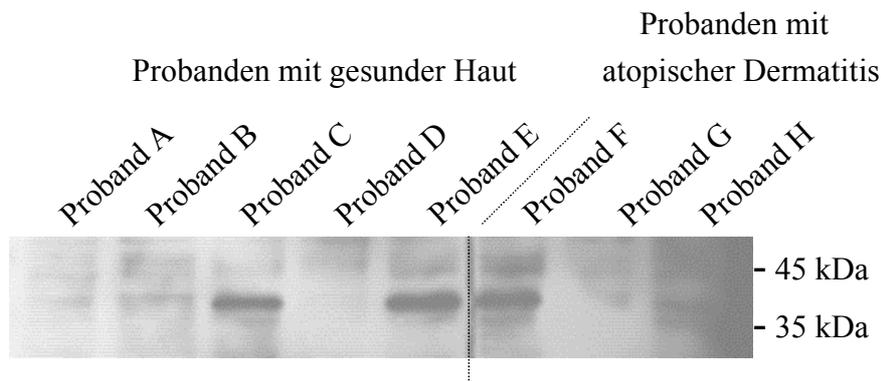
#### VI.5.2. Überprüfung der Aktivität von SAPK/JN-Kinase an Saugblasenepidermis

Die zuvor auf Involukrinquantität untersuchten Proben von normaler Haut und NEAE wurden auf die Aktivität der SAPK/JN-Kinase untersucht. Ziel dieser Versuche war es, eine Korrelation zwischen den Involukrinbanden, dem Differenzierungsgrad und der Aktivität dieses Enzyms zu erstellen. In Abbildung 51 wurde zuvor der Expressionsstatus an SAPK/JNK in Proben von gesunden Spendern und Proben von Spendern mit atopischer Dermatitis erhoben. Es zeigten sich keine Unterschiede des Expressionslevels zwischen den Kollektiven.



I. Antikörper: Anti-SAPK/JNK							
Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F	Probe G	Probe H
Spender mit gesunder Haut (NS)				Spender mit atopischer Dermatitis (AD)			

**Abbildung 51:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Proband A-E mit gesunder Haut und Proband F-H mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-SAPK/JNK Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



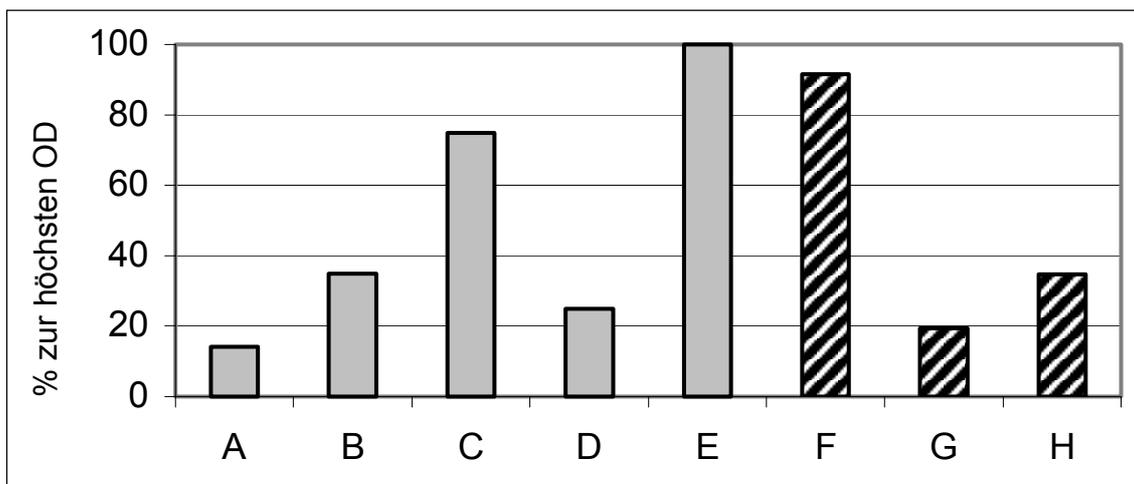
I. Antikörper: Anti-activated-SAPK/JNK							
Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F	Probe G	Probe H
Spender mit gesunder Haut (NS)				Spender mit atopischer Dermatitis (AD)			

**Abbildung 52:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Proband A-E mit gesunder Haut und Proband F-H mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-SAPK/JNK Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

In Abbildung 52 wurde die Aktivität des vorhandenen SAPK/JNK von gesunden Probanden und Probanden mit atopischer Dermatitis überprüft. In diesem Versuch zeigt sich eine Heterogenität unter den Probanden eines Kollektives. Die Haut der gesunden Spender C und

E verfügen über große Mengen, jedoch Proband A, B und D über extrem geringe Mengen an aktiver SAPK/JNK. Bei den Atopikern weist nur Proband F eine hohe Aktivität der SAPK/JNK auf, dagegen ist das Enzym der beiden Proben G und H inaktiv.

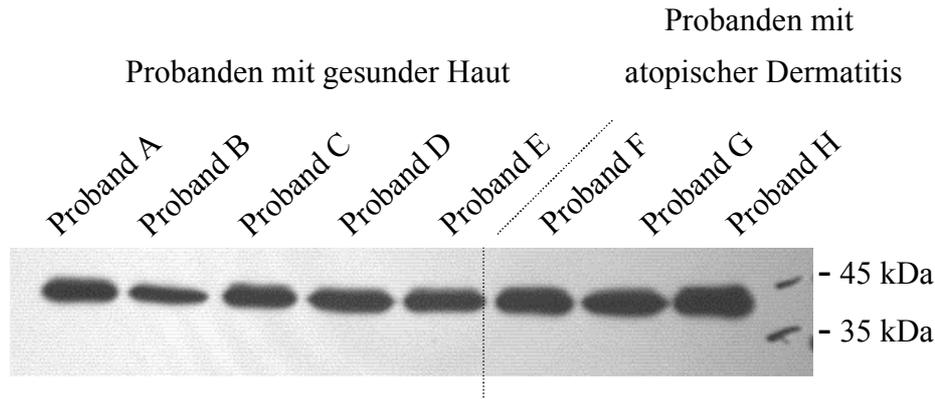
Die quantitative Auswertung der Banden des in Abbildung 52 dargestellten Blots zeigt, daß Proband C, E und F den höchsten Aktivierungsgrad der SAPK/JNK zeigen. Bei allen anderen Proben liegt die Aktivität unter 40 % des höchsten Wertes.



**Abbildung 53:** quantifizierte Bandenintensität des Western Blots in Abbildung 52.

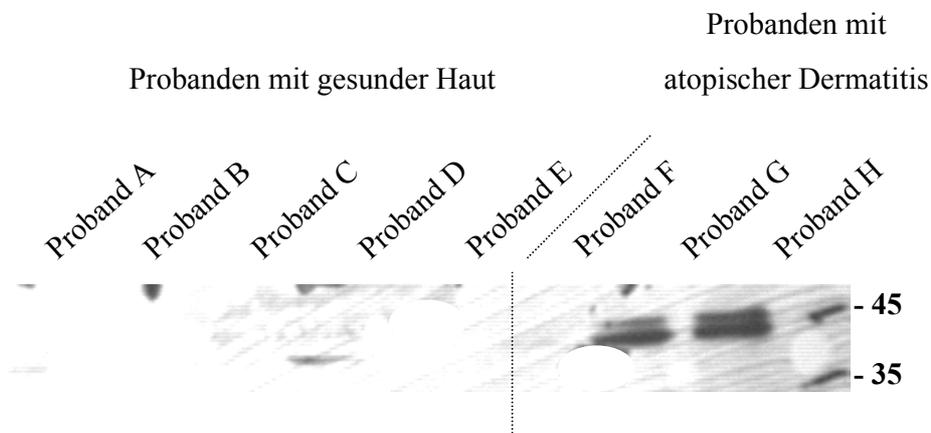
### VI.5.3. Untersuchung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 bei Keratinozyten aus Saugblasenepidermis

In den folgenden Versuchen wurde die Expression und Aktivität von Erk1 und Erk2 bei beiden Kollektiven von Menschen mit gesunder Haut und Menschen mit atopischer Dermatitis untersucht. In Abbildung 54 und Abbildung 55 wurden acht Probanden, davon fünf gesunde Spender (A, B, C, D, E) und drei Spender mit atopischer Dermatitis (F, G, H) untersucht. Die Expression an Erk1 und Erk2 zeigt keine nennenswerte Unterschiede zwischen den Kollektiven. Jedoch zeigten die Kollektive ein absolut konträres Ergebnis bezüglich der Aktivität der Erk1- und Erk2-Kinasen. Die Spender mit gesunder Haut weisen fast keine Aktivität der Kinasen auf, wohingegen zwei der drei Proben von Probanden mit atopischen Ekzem eine hohe Erk1- und Erk2-Aktivität aufweisen.



1. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2							
Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F	Probe G	Probe H
Spender mit gesunder Haut (NS)				Spender mit atopischer Dermatitis (AD)			

**Abbildung 54:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Proband A-E mit gesunder Haut und Proband F-H mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.



1. Antikörper: Anti-activated-Erk1 und anti-activated-Erk2							
Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E	Probe F	Probe G	Probe H
Spender mit gesunder Haut (NS)				Spender mit atopischer Dermatitis (AD)			

**Abbildung 55:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Proband A-E mit gesunder Haut und Proband F-H mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:1000). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Abbildung 56 zeigt die quantitative Auswertung der in Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellten Blots.

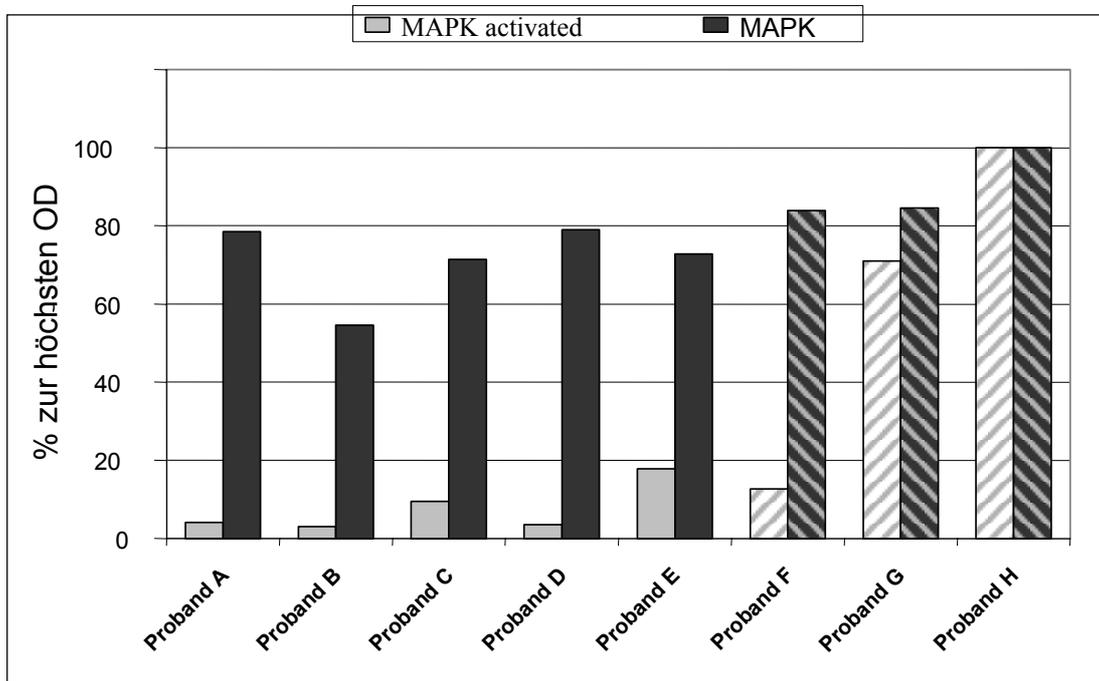
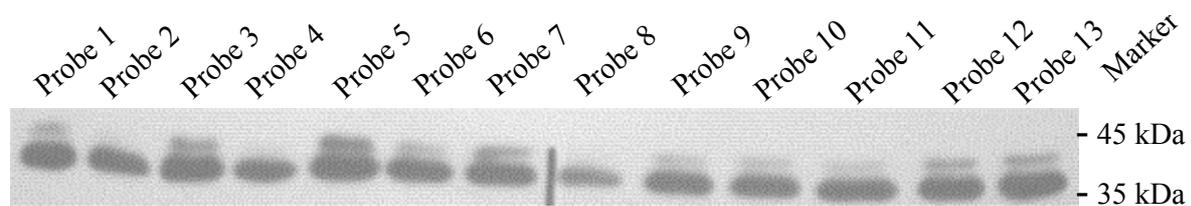


Abbildung 56: Quantifizierte Bandenintensität der Western Blots Abbildung 54 und Abbildung 55.

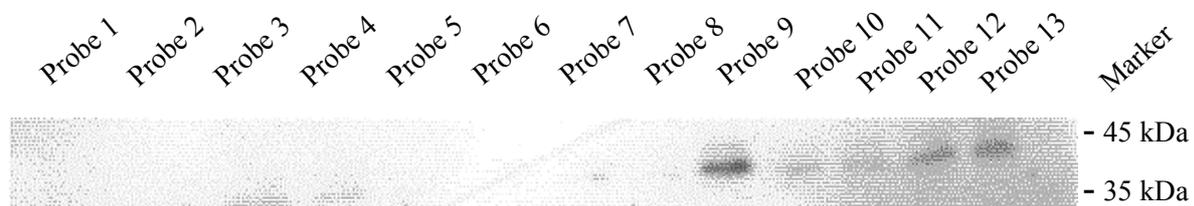
Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde ein zweiter Versuch mit einem weiteren Kollektiv aus 13 Probanden vorgenommen: 7 Probanden mit gesunder Haut und sechs Probanden mit atopischem Ekzem. Wiederum zeigen sich kaum Unterschiede in der Expression der Enzyme Erk1 und Erk2.



I. Antikörper: Anti-Erk1 und anti-Erk2												
Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Spender mit gesunder Haut (NS)							Spender mit atopischer Dermatitis (AD)					

Abbildung 57: Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Proband 1-7 mit gesunder Haut und Proband 8-13 mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines polyclonalen anti-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Bei der Aktivität zeigte sich erneut ein Unterschied zwischen den beiden Kollektiven. Gesunde Probanden zeigen keine Aktivität an Erk1 und Erk2, wohingegen eine erhöhte Aktivität bei fünf von sechs Probanden mit atopischer Dermatitis nachgewiesen werden kann.



1. Antikörper: Anti-activated-Erk1 und anti-activated Erk2												
Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Spender mit gesunder Haut (NS)							Spender mit atopischer Dermatitis (AD)					

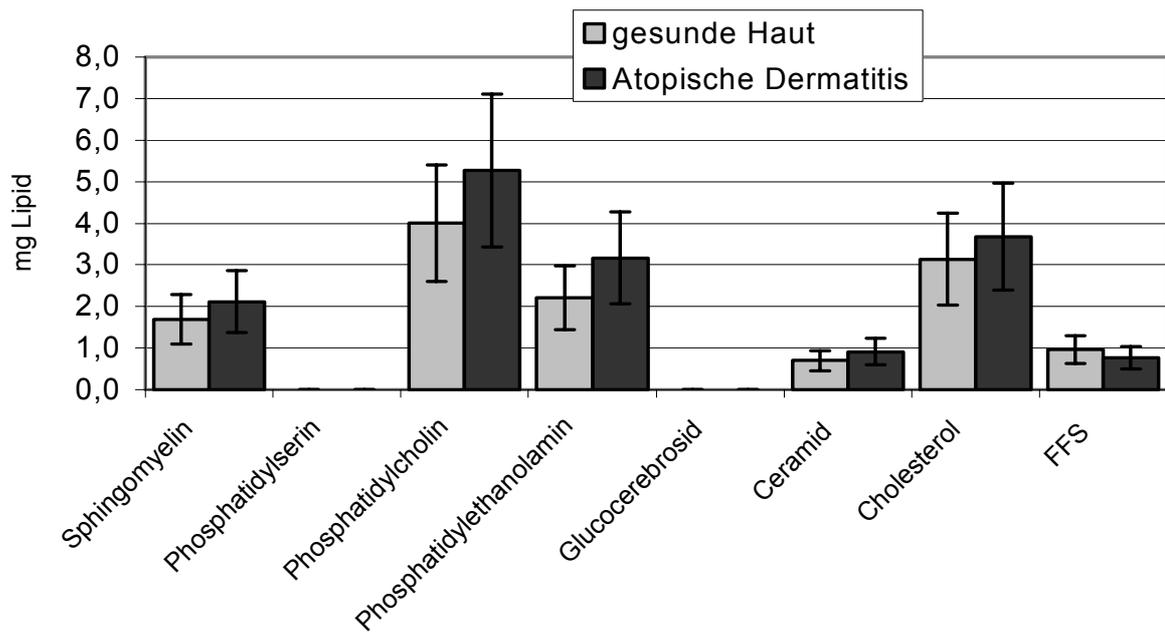
**Abbildung 58:** Western Blot von 10 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten gesunder und atopischer Keratinozyten von Saugblasenepidermis (siehe Tabelle). Zwei Kollektive wurden überprüft: Proband 1-7 mit gesunder Haut und Proband 8-13 mit atopischer Dermatitis. Die Bandendetektion erfolgte mittels eines monoclonalen anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörpers (1:1000) und einem POD gekoppelten sekundären Antikörper (1:500). Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

## VI.6. Lipidzusammensetzung von Keratinozyten

### VI.6.1. Vergleich der Lipidzusammensetzung gesunder Haut und NEAE

Bei der folgenden Analyse wurden Epidermis-Proben von fünf gesunden Spendern und drei Spendern mit atopischer Dermatitis untersucht. Dabei wurden nur die durch Trypsinisierung gewonnenen Keratinozyten einer Saugblase untersucht und auf die eingesetzte DNA-Menge bezogen. Die Lipide des Stratum corneum und des Stratum granulosum wurden nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 59 dargestellt.

Phosphatidylserin und Glucocerebrosid lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis wird deutlich, daß außer bei den freien Fettsäuren, der Level an vorhandenen Lipiden immer ein wenig höher liegt als bei den gesunden Probanden. Auch beim Cholesterol zeigt sich eine etwas größere Konzentration.



**Abbildung 59:** Mittlere Verteilung der Lipidzusammensetzung von Keratinozyten aus Saugblasenepidermis von Probanden mit gesunder Haut und Probanden mit atopischer Dermatitis.

In folgender Tabelle ist die prozentuale Zusammensetzung der Abbildung 59 aufgeführt.

Lipid	NSK	NEAE
Sphingomyelin	13,30	13,32
Phosphatidylcholin	31,51	33,10
Phosphatidylethanolamin	17,37	19,91
Ceramid	5,51	5,74
Cholesterol	24,69	23,13
FFS	7,62	4,81

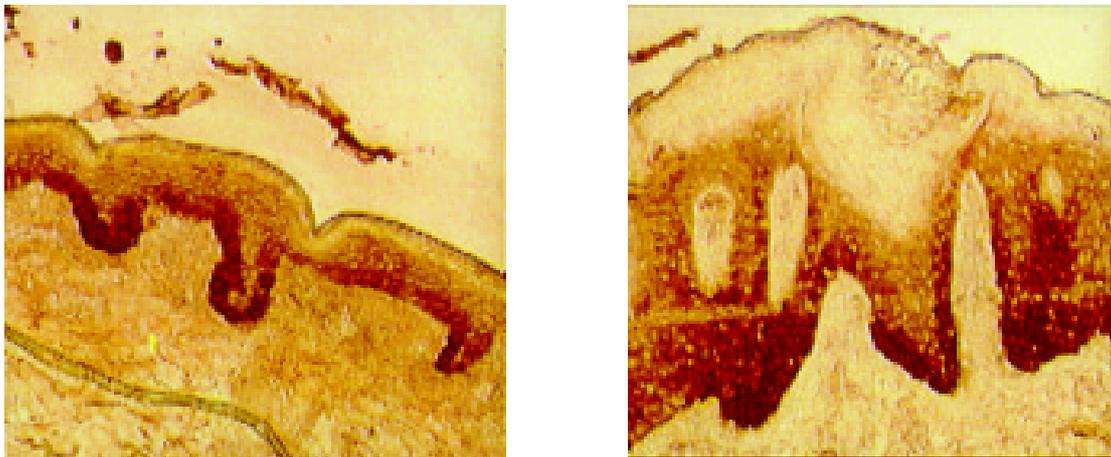
**Tabelle 3:** Prozentuale Zusammensetzung der Lipide aus Abbildung 59.

## VI.7. Histologische Untersuchungen

Im folgenden Abschnitt werden histologische Untersuchungen (wie unter V.4 beschrieben) zum Thema Morphologie der gesunden Haut und der nicht-ekzematösen Haut des atopischen Ekzems (NEAE) vorgestellt. Es wurden je Kollektiv verschiedene Probanden ausgewählt. Die Abbildungen zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel für jedes Kollektiv.

*VI.7.1. Kontrollantikörper anti-p13 als Darstellungshilfe für rein morphologische Unterschiede der gesunden und der nicht-ekzematösen Haut des atopischen Ekzems (NEAE)*

p13 ist ein Protein, welches in der untersten Epidermisschicht gebildet wird und somit als ideale Abgrenzung zwischen den beiden Hautschichten zu erkennen ist. Anti-p13 ermöglicht die Darstellung der Grenze zwischen Epidermis und Dermis im histologischen Schnitt. Abbildung 60a zeigt einen vertikalen Schnitt durch eine Punch-Biopsie der normalen menschlichen Haut, Abbildung 60b zeigt die NEAE. Bei der normalen Haut sind die einzelnen Papillenverzahnungen gut zu erkennen. Dagegen fällt die extrem stark verzahnte und verdickte Epidermis der NEAE auf.

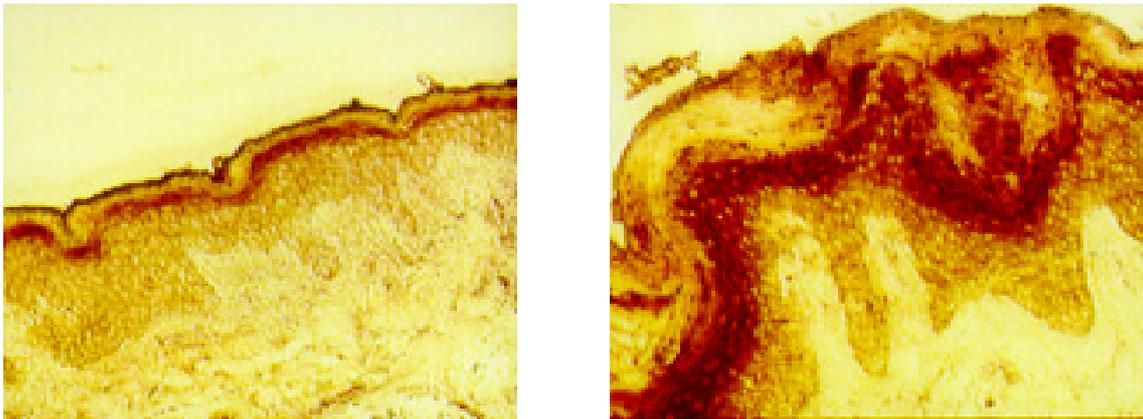


**Abbildung 60:** Immunmarkierung von p13 in Kryostatquerschnitten aus der Haut von a) klinisch Gesunden und b) Atopikern (NEAE). Aus Punch-Biopsien wurden jeweils 10 µm dicke Kryostatquerschnitte angefertigt, an denen eine indirekte Immunmarkierung mittels anti-p13 spezifischen Antikörper und anschließender POD-abhängiger Färbereaktion durchgeführt wurde. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt. Vergrößerung 100x.

Die Abbildungen zeigen grundlegende morphologische Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Hauttypen auf. Die NEAE zeigt eine extrem verdickte Epidermis, der Verzahnungsgrad der Papillen zwischen Dermis und Epidermis ist extrem hoch, außerdem reichen die Papillen weit in die Dermis hinein.

*VI.7.2. Untersuchungen zur Differenzierung in der Epidermis der gesunden Haut und der NEAE über immunhistochemische Markierung mit den Differenzierungsmarkern Involukrin und Filaggrin*

Als weitere Antikörper wurden in Abbildung 61 Involukrin und in Abbildung 62 Filaggrin als Differenzierungsmarker verwendet. Beide Proteine werden in der oberen Epidermis exprimiert, an den Orten, wo die Keratinozyten nahezu ausdifferenziert sind. Bei der NEAE ist auch in diesen histologischen Schnitten die extrem verdickte Epidermis der NEAE und der hohe Verzahnungsgrad zwischen Epidermis und Dermis erkennbar. Die Involukrin-exprimierenden Epidermisschichten sind in NEAE stark verbreitert und die Verteilung des Proteins über die Zelllagen ist nicht homogen, sondern extrem ungeordnet. Die Trennungslinie zwischen proliferierenden und differenzierten Zellen ist nicht klar.

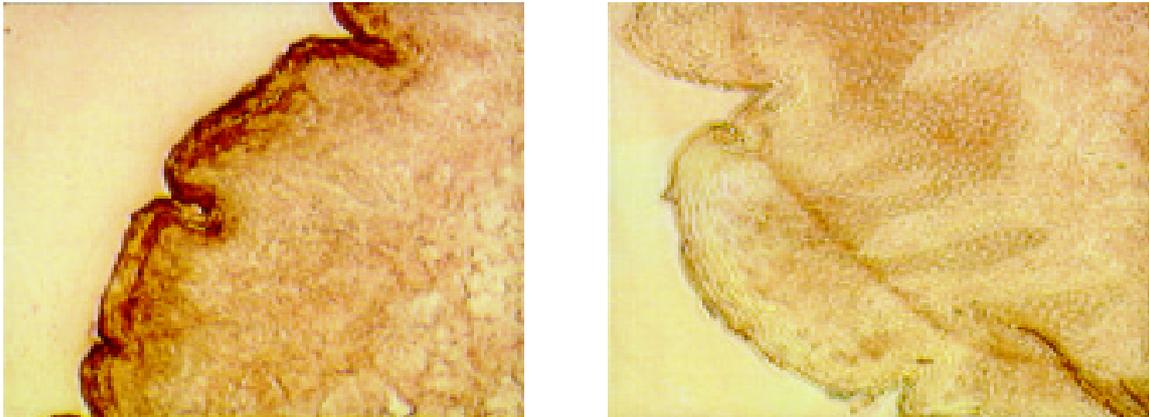


**Abbildung 61:** Immunmarkierung von Anti-Involukrin in Kryostatquerschnitten aus der Haut von a) klinisch Gesunden und b) NEAE. Aus Punch-Biopsien wurden jeweils 10 µm Kryostatquerschnitte angefertigt, an denen eine indirekte Immunmarkierung mittels anti-Involukrin spezifischen Antikörpern und anschließender POD-abhängiger Färbereaktion durchgeführt wurde. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt. Vergrößerung 100x.

Unmittelbar an der Grenze zum Stratum corneum ist die Involukrinexpression maximal. Aufgrund der hohen Verdichtung erscheint die Färbung in einem tiefen Dunkelrot. Bei der atopischen Dermatitis fehlt diese starke Verdichtung unterhalb des Stratum corneums. Vielmehr wird Involukrin maximal im oberen und mittleren Stratum granulosum exprimiert.

Auch bei Filaggrin zeigt sich zwischen gesunder Haut und NEAE eine unterschiedliche Verteilung (Abbildung 62). Ist Involukrin reichlich in atopischer Haut vorhanden, so wird im Gegensatz dazu Filaggrin kaum exprimiert. In normaler Haut sind Involukrin und Filaggrin

offenkundig colokalisiert; sie werden maximal im Stratum granulosum exprimiert.

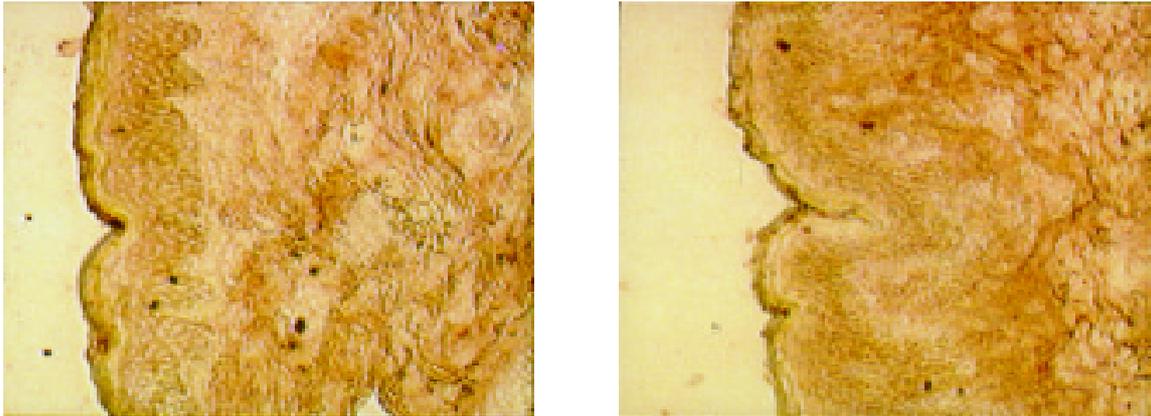


**Abbildung 62:** Immunmarkierung von Filaggrin in Kryostatschnitten aus der Haut von klinisch a) Gesunden und b) NEAE. Aus Punch-Biopsien wurden jeweils 10  $\mu$ m Kryostatquerschnitte angefertigt, an denen eine indirekte Immunmarkierung mittels anti-Filaggrin spezifischen Antikörper und anschließender POD-abhängiger Färbereaktion durchgeführt wurde. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt. Vergrößerung 100x.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß beide Differenzierungsmarker in normaler Haut in den Zellagen des Stratum granulosums exprimiert werden. In NEAE dagegen divergiert die Expression der beiden Marker extrem. Filaggrin, ein Marker der späten Differenzierungsschritte, wird bei Keratinozyten überhaupt nicht exprimiert. Wohingegen Involukrin vermehrt und verfrüht im Stratum spinosum exprimiert wird.

### *VI.7.3. Lokalisation der aktivierten Mitogen-Activated Proteinkinase (pMAPK) im histologischen Schnitt der Normalhaut und der NEAE*

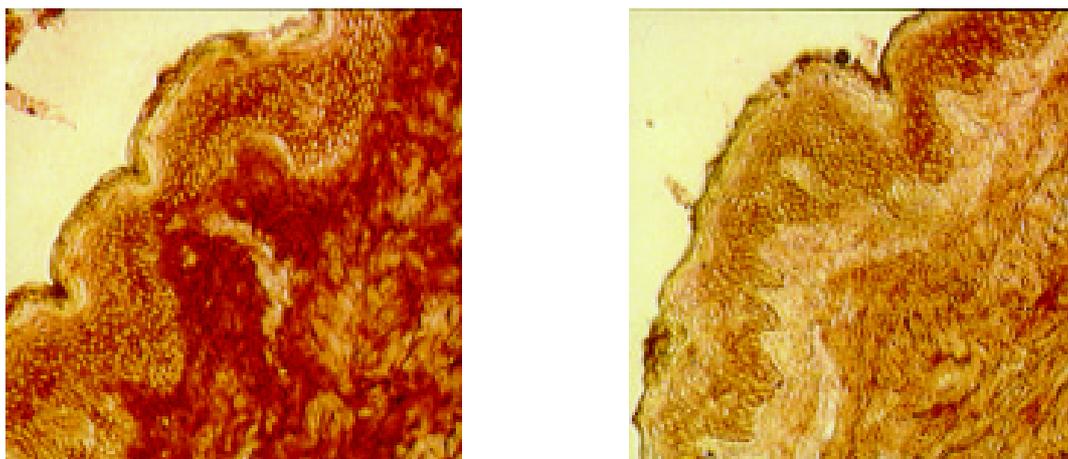
Um etwaige Veränderungen in der Signaltransduktion in NEAE erkennen zu können, wurde der Antikörper anti-activated-Erk1 und -Erk2 in einer histologischen Untersuchung eingesetzt. Dieser Antikörper eignet sich mehr für den Einsatz bei Western Blots. Daher sind die Immunfärbungen dieser histologischen Kryostatschnitte nur schwach ausgeprägt und Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Hauttypen sind kaum erkennbar.



**Abbildung 63:** Immunmarkierung von Erk1 und Erk2 in Kryostatquerschnitten der Haut von a) klinisch Gesunden und b) NEAE. Aus Punch-Biopsien wurden jeweils 10  $\mu$ m Kryostatquerschnitte angefertigt, an denen eine indirekte Immunmarkierung mittels anti-activated-Erk1 und -Erk2 Antikörper und anschließender POD-abhängiger Färbereaktion durchgeführt wurde. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt. Vergrößerung 100x.

#### VI.7.4. Stress-Activated Proteinkinase als Antikörper in der Histologie im Vergleich zwischen normaler Haut und NEAE

Bei dem Antikörper der spezifisch die aktivierte Form der JNK/SAP-Kinase bindet, zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen gesunder und kranker Haut. Während die gesunde Haut durchgehend durch Epidermis und Dermis die aktivierte Form von JNK/SAPK vorliegen hat, fehlt diese gänzlich bei der NEAE.



**Abbildung 64:** Immunmarkierung von JNK/SAP-Kinase in Kryostatquerschnitten aus der Haut von klinisch a) Gesunden und b) NEAE. Aus Punch-Biopsien wurden jeweils 10  $\mu$ m Kryostatquerschnitte angefertigt, an denen eine indirekte Immunmarkierung mittels anti-activated-JNK/SAPK Antikörper und anschließender POD-abhängiger Färbereaktion durchgeführt wurde. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt. Vergrößerung 100x.

## VII. Diskussion

### VII.1. Einflußparameter auf die Phosphorylierung von Keratinozyten

Die Proteinphosphorylierung ist der wichtigste biologische Regulationsprozeß, der auch in die Signaltransduktion integriert ist. Die Proliferation, Differenzierung und die Reaktion auf Stress bzw. Wundheilung wird bei Keratinozyten durch Signaltransduktionswege eingeleitet [Wurgler-Murphy 1997]. Von den verschiedenen Proteinkinasen sind die Serin-/Threonin-spezifischen und die Tyrosin-spezifischen Enzyme am besten charakterisiert [Davis 1994, Blumer 1994]. Zur Regulierung der Differenzierung und Proliferation sind zwei essentielle Proteinkinasen notwendig, die MAP-Kinasen und die SAPK/JN-Kinase [Canno 1995, Marshall 1995]. Yusuf A. Hannun und Lina M. Obeid konnten 1995 nachweisen, daß in diese Signaltransduktionswege auch Ceramide eingreifen. Eines der Schlüsselenzyme, welches zusammen mit Ceramiden in den Kaskaden der Signaltransduktion auftritt ist die Sphingomyelinase. Dieser sogenannte Sphingomyelin-Zyklus wirkt somit regulativ auf Differenzierung und Proliferation [Testi 1996].

Zu Beginn der in vitro-Versuche wurden durch die Literatur bekannte Parameter eingesetzt, um die Proteinphosphorylierung zu beeinflussen. Neben Calciumionen wurden auch Magnesiumionen dem Keratinozytenmedium zugesetzt, um verschiedene Magnesium-abhängige Enzyme in ihrer Aktivität und Bildung positiv zu beeinflussen (wie z.B. Sphingomyelinase) [Hannun 1995]. Es zeigte sich jedoch, daß die Serin-/Threonin und Tyrosinphosphorylierung nur wenig von verschiedenen Calcium- bzw. Magnesium-chloridkonzentrationen beeinflußt werden. Mit erhöhter Konzentration werden jedoch einige Phosphorylierungen etwas schwächer.

Das Zytokin TNF- $\alpha$  aktiviert den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg [Pushkareva 1995], Acyl-L-Carnitin stabilisiert die Lebensdauer von Lipiden, N-Acetyl-D-Sphingosin soll die zelluläre Ceramid-Konzentration anheben. Aus diesen Versuchen ergeben sich nur wenig aussagekräftige Ergebnisse, die einen gewissen Einfluß auf die Stimulation von Serin- und Threonin-spezifischen Proteinkinasen haben. Vereinzelt neu aufgetretene bzw. verstärkte Banden sind in eindimensionalen Gelen und ohne spezifische Antikörper nicht näher zu charakterisieren. Bei weiteren Betrachtungen wurden daher spezifische Antikörper zur Überprüfung der Aktivitäten der Proteinkinase-Kaskade verwendet.

## VII.2. Differenzierung von primären Keratinozyten

Die Differenzierung ist essentiell für die Bildung der verschiedenen Epidermisschichten und den gesamten Stoffwechsel. In der vorliegenden Arbeit wurde, in Übereinstimmung mit Literaturbefunden [Elias 1988, Niedner 1992] eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zur Differenzierung von Keratinozyten eingesetzt. Als Differenzierungsmarker wurde Involukrin im Western Blot untersucht. Es wird deutlich, daß die Anhebung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration stimulierend wirkt. Nach 10tägiger Inkubation ist die Differenzierung nahezu abgeschlossen (Abbildung 27), die Zellen verlieren ihre Adhärenz. Es handelt sich um einen kontinuierlichen Anstieg der Involukrinkonzentration innerhalb dieses Zeitraums. In Abbildung 29 wird deutlich, daß die Inkubation konfluenter Keratinozyten mit bakterieller Sphingomyelinase ebenfalls eine deutliche Zunahme der Involukrin-Expression hervorruft. Nach 4 Tagen ist die Involukrinexpression, die durch Sphingomyelinase hervorgerufen wurde, größer als die rein Calciumioneninduzierte Differenzierung [Wakita 1994]. Nach 10tägiger Behandlung ist zwar die Involukrin-Expression der reinen Calciumchloridinkubation größer als die der Sphingomyelinase-Inkubation, jedoch ist eine additive Wirkung von Calciumionen und Sphingomyelinase deutlich zu erkennen. Dieser Versuch zeigt, daß auch Sphingomyelinase in der Lage ist die Involukrin-Expression in Keratinozyten zu erhöhen und somit aus dem Proliferationsstadium in eine kontinuierliche Differenzierung zu expedieren. Dies bestätigt auch der Northern Blot in Abbildung 30. Hier ist kein Unterschied in der Inkubation der Keratinozyten mit Calciumionen oder Sphingomyelinase sichtbar. Beide Parameter verursachen die verstärkte m-RNA Bildung von Involukrin.

### *VII.2.1.1 Einfluß von Green Tea auf die Differenzierung von Keratinozyten*

Extrakte des grünen Tees besitzen seit den letzten Jahren ein besonderes Forschungsinteresse. Die in Green Tea zu 17-30% enthaltenen Catechine haben nachweislich einen hemmenden Einfluß auf die Cancerogenese und sind auch als Antioxidanzien anzusehen. Die Untersuchungen zu den positiven Eigenschaften dieser Catechine sind noch nicht annähernd erschöpft. In Abbildung 28 ist ein Versuchsansatz unternommen worden, Keratinozyten, die sich bereits im Differenzierungsstadium befinden, mit Green Tea (als komplett Extrakt) zu inkubieren. Hier ist ein deutlicher Rückgang der Involukrinexpression zu verzeichnen. Ausgehend von einer verbreiterten Involukrinexprimierenden Epidermisschicht, hätte dieses

Ergebnis zur Schlußfolgerung, daß Green Tea für die Therapie dieser Krankheit geeignet wäre. Dies ist nicht gleichzusetzen mit erhöhter Involukrinexpression der einzelnen Keratinozyten. Geht man deshalb eher von einer Differenzierungsstörung bei atopischen Keratinozyten aus, die nicht durch Involukrin zu beobachten ist, wäre Green Tea möglicherweise kein geeignetes Therapeutikum. Um dies jedoch zu untermauern, bedarf es weiterer Untersuchungen. Vor allem müßten aufgereinigte Catechine verwendet werden, um additive bzw. sich hemmende Effekte aller im Green Tea Extrakt vorhandenen Substanzen auszuschließen.

NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der im Zusammenhang mit der Stressinduzierten Signaltransduktion über Serin/Threonin Kinasen aktiviert wird [Wiegmann 1994]. Infolgedessen wurde versucht ein Unterschied in der Expression von NF-κB mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten aufzuzeigen. In Abbildung 31 wird jedoch deutlich, daß keine Unterschiede sichtbar sind.

#### *VII.2.2. Beziehung zwischen der Differenzierung und der Aktivität von MAPK*

Die MAP-Kinasen stellen ein Bindeglied in der Zytokin- und Wachstumsfaktoren getriggerte Signaltransduktion dar [Testi 1996]. Ein sehr wichtiger Signaltransduktionsweg führt über die MAP-Kinase Erk1 und Erk2. Dieser Signalweg fördert die Proliferation und die Zellteilung. Aus diesem Grund wurden parallel zur Involukrin-Expression die Expression und Aktivität von Erk1 und Erk2 kontrolliert. Abbildung 32 und Abbildung 34 zeigen, daß keine Unterschiede in der Expressionsstärke der Proteine Erk1 und Erk2 mit zunehmendem Differenzierungsgrad bestehen. Bei der Überprüfung der Aktivität dieser Enzyme mit Hilfe der aktivierten Erk1- und Erk2-Antikörper konnte eine Abhängigkeit zum Differenzierungsstadium der Keratinozyten dargestellt werden. In Abbildung 33 ist bereits nach einer 96stündigen Inkubation mit Calciumchlorid die Aktivität der Enzyme abnehmend. Nach 7 Tagen verschwindet die Aktivität von Erk2 fast gänzlich und nach 10tägiger Inkubation sind sie nahezu vollständig inaktiv. Dies bestätigt auch die Abbildung 35. Auch hier ist nach 10 Tagen keine Aktivität beider Enzyme nachzuweisen. Dies ist der erste Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad von Keratinozyten und der Aktivität von Erk1 und Erk2.

Im folgenden Versuch wurde überprüft, ob die Art der Differenzierungsinduktion Einfluß auf die Expression und die Aktivität von Erk1 und Erk2 hat. Dies konnte eindeutig widerlegt werden. Abbildung 36 zeigt auch hier, daß die Differenzierung, gleichgültig durch welche Inkubationsart von Calciumionen, Sphingomyelinase oder beidem, keine Expressionsveränderung der Enzyme Erk1 oder Erk2 hat. Eindeutig wird jedoch auch in Abbildung 37 nach 4 Tagen sichtbar, daß die Aktivität beider Enzyme nachläßt. Dieser Aktivitätsverlust ist direkt proportional zum Grad der Involukrin-Expression. Dies ist besonders gut ersichtlich an der additiven Wirkung der Calciumionen und Sphingomyelinase-Inkubation, da hier die größte Involukrin-Expression vorliegt und auch der größte Aktivitätsverlust zu verzeichnen ist.

Auch bei der Zugabe von 2,1 mM Calciumchloridlösung zum Keratinozytenmedium ist nach 4 Tagen ein Aktivitätsverlust von Erk1 und Erk2 bei nahezu gleichbleibender Expression beider Kinasen zu verzeichnen. Abbildung 38 und Abbildung 39 bestätigen somit die vorangegangenen Ergebnisse, daß die Aktivität der MAP-Kinasen proportional mit dem Differenzierungsstadium der Keratinozyten einhergeht.

In Abbildung 40 wird deutlich, daß im Verlauf einer 10tägigen Inkubation mit Calciumchlorid die Expression von Erk1 und Erk2 konstant bleibt. Es zeigt sich, daß bei Zugabe von Green Tea in Kombination mit Calciumchlorid, die Expression von Erk2 nach 10 Tagen leicht zurück geht und bei alleiniger Gabe von Green Tea vollständig zurückgeht. Auch die Expression von Erk1 wird sichtbar geringer. Hiermit einhergehend bestätigt sich ein Aktivitätsrückgang beider Enzyme in Abbildung 41, wobei der größte Aktivitätsverlust durch Inkubation mit GTE unter Calcium-freien Bedingungen zu verzeichnen ist. Sollten demnach atopische Keratinozyten über hyperaktive MAP-Kinasen verfügen wäre GTE auch hier ein geeignetes Agens, um die Aktivitäten zu reduzieren bzw. auszugleichen.

Dieser Aktivitätsrückgang ist jedoch nicht mit den zuvor geschilderten Beobachtungen gleichzusetzen, denn hier wies die Zugabe von Green Tea zum ersten Mal eine Reduktion der Expression auf. Somit ist ein Rückgang der Aktivität nur folgerichtig. Abbildung 42 setzt dieses graphisch für einen Mittelwert beider Enzyme in Verbindung. Hier wird deutlich, daß sich mit abnehmender Expression die Aktivitätsabnahme prozentual verringert. Jedoch unterstützt diese nachweisbare Aktivitätsabnahme die geeignete Therapiemöglichkeit von GTE für Atopiker, wie die nachfolgenden Untersuchungen noch bestätigen werden.

### VII.2.3. Beziehung zwischen der Differenzierung und der Aktivität von SAPK/JNK

Zu den MAP-Kinasen zählt auch die Stress-Activated-Protein-Kinase (SAPK) oder auch c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale-Kinase (JNK) genannt. Dieser JNK Weg verläuft parallel zu dem Erk1 und Erk2 Kinase-Weg. Während eine Aktivierung von Erk1 und Erk2 eine Proliferationssteigerung bzw. Differenzierung zur Folge hat, fördert der Signalweg über die SAP-Kinase den Wachstumsstopp und ist als klassische Streßantwort zu deuten [Testi 1996].

Parallel zu Erk1 und Erk2 wurde die Expression und Aktivität der SAPK/JNK in Abhängigkeit zur Involukrin-Expression untersucht. Abbildung 43 zeigt keinerlei Unterschiede im Expressionsverhalten der SAPK/JNK-Enzyme. In der Aktivität erscheinen hingegen wesentliche Unterschiede. Abbildung 44 macht deutlich, daß im Gegensatz zu Erk1 und Erk2 die Aktivität mit zunehmender Differenzierung hier nicht schwächer, sondern stärker wird. Bis zu einer Calciumchlorid- und/oder Sphingomyelinase-Inkubation von 4 Tagen läßt sich keinerlei Aktivitäten von SAPK/JNK nachweisen. Jedoch wird nach 10tägiger Inkubation eine schwache Zunahme der Aktivität von SAPK/JNK sichtbar, eine etwas stärkere Aktivität des Enzyms erscheint bei reiner Gabe von Sphingomyelinase über 10 Tage. Auch hier ist wieder eine additive Wirkung von Calciumionen und Sphingomyelinase durch die stärkste Aktivität von SAPK/JNK nach 10 Tagen sichtbar. Abbildung 45 verdeutlicht dies graphisch anhand der reinen Aktivität, da die Expression bei allen Proben gleichbleibend ist. In vitro-Versuche an Keratinozyten haben somit in dieser Arbeit bewiesen, daß die Aktivität hier im Gegensatz zu der Aktivität von Erk1/Erk2 mit zunehmender Differenzierung der Zellen parallel zunimmt. Die Differenzierung wird somit durch den Signaltransduktionsweg über die SAPK-JN-Kinase gefördert.

Somit geht die Differenzierung der Keratinozyten, gemessen an der Involukrin-Expression, mit folgender Änderung der Erk1-/Erk2- und SAPK/JNK-Aktivität einher:

<b>Differenzierung</b>	<b>Expression Erk1/Erk2</b>	<b>Aktivität Erk1/Erk2</b>	<b>Expression SAPK/JNK</b>	<b>Aktivität SAPK/JNK</b>
Steigend	gleichbleibend	Abnehmend	gleichbleibend	steigend
↗	↔	↘	↔	↗

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Differenzierungsergebnisse aus Abschnitt VI.3.

### VII.3. Statusvergleich der Phosphorylierung an Serin-/Threonin- und Tyrosin-Resten in Keratinozyten atopischer und gesunder Spender

Das vorhandene Material war mengenmäßig so gering, daß ein Großteil der geplanten in vitro Versuche nicht realisiert werden konnte. Allgemein bleibt hier zu erwähnen, daß die Kultivierung von atopischen Keratinozyten extrem schwierig ist. Die Keratinozyten wachsen im Vergleich zu normalen Keratinozyten sehr langsam. Auffällig war auch hierbei, daß Kontaminationen bevorzugt bei atopischen Zellkulturen beobachtet wurden, was daraufhin deuten kann, daß die atopische Haut evtl. anfälliger gegenüber Bakterien und Pilzbefall ist.

Die vergleichende Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Zellysate zeigt, daß in NEAE und normaler Haut dieselben Proteine an Serin-/Threonin phosphoryliert sind. Allerdings sind pro mg Gesamtprotein aus dem Lysat in NEAE einige stärkere und andere etwas schwächere Phosphorylierungen zu beobachten. Insgesamt macht diese Untersuchung deutlich, daß die Keratinozyten von Probanden mit atopischer Dermatitis in einigen Bereichen einen deutlich erhöhten und in anderen Bereichen einen niedrigeren Aktivitätsstatus haben. Anhand dieses einen Befundes kann nur die Aussage gemacht werden, daß der Phosphorylierungsstatus der Keratinozyten NEAE Probanden extrem von dem Phosphorylierungsstatus der gesunden Keratinozyten abweicht.

Wäre es möglich, mehr Biopsiematerial zu erhalten und die Kultivierungsbedingungen für atopische Keratinozyten zu optimieren, sollten Anschlußversuche folgen. Diese würden zur Aufklärung der Aktivitätsunterschiede von Serin-/Threonin- und Tyrosin-spezifischen Proteinkinasen zwischen gesunder Haut und NEAE in vitro dienen.

### VII.4. Ex vivo-Untersuchungen an Saugblasenepidermis gesunder und atopischer Haut

#### *VII.4.1. Überprüfung der Involukrinexpression*

Die histologischen Befunde in Abschnitt VI.7 zeigen, daß die Differenzierung der Keratinozyten in NEAE nicht dem Differenzierungsgrad, der gesunden Haut entspricht (Abbildung 61 und Abbildung 62). Um die histologischen Unterschiede zu quantifizieren, bedarf es der Zellisolierung aus Biopsiematerial oder Saugblasenepidermis. Biopsiematerial konnte im Rahmen dieser Dissertation nur wenig zur Verfügung gestellt werden. Deshalb wurde hier epidermales Gewebe mit Hilfe der Saugblasentechnik gewonnen. Dabei gilt es zu

beachten, daß der angelegte Unterdruck, der benötigt wird, um die Epidermis von der Dermis abzuheben, möglicherweise einen Streß im Gewebe verursacht. Da dieses Verfahren jedoch bei beiden Kollektiven angewendet wurde, ist ein Vergleich dieser Proben legitim. Nach längerer Spendersuche konnten 9 Probanden mit atopischer Dermatitis und 12 Probanden mit gesunder Haut für verschiedene ex vivo-Untersuchungen gewonnen werden.

Anlehnend an die in vitro-Ergebnisse wurden auch hier die Involukrinexpression [Fuchs 1990] und die Aktivität der MAP-Kinasen und SAPK/JN-Kinase untersucht. Zunächst wurden Zytosolextrakte untersucht, die aus Saugblasenepidermis von 5 gesunden und 3 atopischen Probanden gewonnen wurden. Diese wurden mittels Involukrin-Antikörper in einem Western Blot untersucht. In Abbildung 48 zeigt sich, daß keine einheitliche quantitative Aussage bezüglich der Involukrin-Expression getroffen werden kann. Abbildung 49 macht dies noch einmal graphisch sichtbar. 60% der Proben weisen eine hohe Involukrinmenge auf, 40% der Proben enthalten weniger Involukrin.

In einem weiteren Versuch wurden wiederum Keratinozyten von nun 7 gesunden Probanden und 6 Probanden, die an atopischer Dermatitis leiden, untersucht. Abbildung 50 zeigt erneut eine ähnliche Verteilung der Involukrinmenge in beiden Kollektiven, bei dem gesunden Kollektiv hatten rund 60% eine hohe Involukrinexpression und die restlichen 40% wiesen erneut eine schwächere Ausprägung der Involukrinbande auf. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis haben 50% einen ausgeprägten und 10% einen schwachen Differenzierungsstatus, wohingegen 20% keinerlei Involukrinexpression aufweisen.

Zusammengefaßt ergibt sich folgende Statistik:

Involukrin expression	Gesunde Probanden (n=12)		Probanden mit atopischer Dermatitis (n=9)	
	Hoch	n=7	58%	n=5
Wenig	n=5	42%	n=2	22,5%
Keine	n=0	0%	n=2	22,5%

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt VI.5.1.

Dieses uneinheitliche Ergebnis läßt sich nur schwer diskutieren. Es kann jedoch festgehalten werden, daß der Unterschied zwischen den verschiedenen Kollektiven nur gering ist.

#### VII.4.2. Überprüfung der Expression und der Aktivität von SAPK/JNK

In den in vitro-Versuchen zur Differenzierung von primären Keratinozyten wurde unter VI.5.2 die Aktivität von SAPK/JNK in Abhängigkeit zum Differenzierungsgrad überprüft. Eine steigende Tendenz der Aktivität ist, parallel zu einer steigenden Involukrin-Expression sichtbar. Mit den aus der Saugblasenepidermis isolierten Keratinozyten konnte nun ein Vergleich zwischen gesunden Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis dargestellt werden. Zunächst wurde auch hier der Expressionsstatus an SAPK/JNK überprüft. Abbildung 51 zeigt, daß in der gesunden und atopischen Haut kein Unterschied im Expressionsspiegel zu erkennen ist. Alle Banden sind ähnlich stark ausgeprägt. Anschließend wurde die Aktivität der Proben untersucht. Abbildung 52 und die graphische Auswertung in Abbildung 53 zeigen, daß zwei der fünf gesunden Hautproben und eine von drei NEAE-Proben eine erhöhte Aktivität an SAPK/JNK haben.

SAPK/JNK Expression	Gesunde Probanden (n=5)		Probanden mit atopischer Dermatitis (n=3)		
	<b>Hoch</b>	n=5	100%	n=3	100%
SAPK/JNK Aktivität					
	<b>hoch</b>	n=2	40%	n=1	33%
	<b>wenig</b>	n=1	20%	n=0	0%
	<b>keine</b>	n=2	40%	n=2	64%

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt VI.5.2.

Die Aktivität von SAPK/JNK scheint bei Atopikern geringer zu sein. Somit würde dies ein weiterer Hinweis darauf sein, daß eine Differenzierungsstörung vorliegt, die sich nicht direkt auf die Expression des Involukrins auswirkt. Wie in den histologischen Versuchen gezeigt liegt extrem viel Involukrin in der Epidermis von Atopikern vor.

Nachfolgende Tabelle macht hauttypenübergreifend die Korrelation zwischen einer erhöhten Expression an Involukrin und einer gleichzeitig erhöhten Aktivität an SAPK/JNK deutlich.

Proband	A	B	C	D	E	F	G	H
Verstärkte Expression von Involukrin	+	-	+	-	+	+	-	+
Erhöhte JNK-Phosphorylierung	-	-	+	-	+	+	-	-

**Tabelle 7:** Gegenüberstellung der Ergebnisse aus Tabelle 5 und Tabelle 6.

Anhand der Tabelle wird deutlich, daß keine 100%ige Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und erhöhtem Phosphorylierungsstatus der SAPK/JN-Kinase besteht. Jedoch ist eindeutig, daß bei einer erhöhten Aktivität der SAPK/JNK auch ein erhöhter Grad an Involukrinexpression vorliegt.

#### VII.4.3. Überprüfung der Expression und der Aktivität von Erk1 und Erk2

Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen zur Differenzierung von primären Keratinozyten zeigen unter VI.5.3, daß die Aktivitäten von Erk1 und Erk2 in Abhängigkeit zum Differenzierungsgrad sinken. Ein sinkender Verlauf der Aktivitäten, parallel zur Zunahme der Involukrin-Expression war sichtbar.

Bei den Zytosolextrakten aus Saugblasenepidermis von Normalhaut und NEAE wurde zusätzlich die Expression und die Aktivitäten von Erk1 und Erk2 untersucht. Abbildung 54 zeigt, daß die Expression von Erk1 bei allen Proben beider Kollektive gleich stark ausgebildet ist. Die Aktivität von Erk1 und Erk2 dieser Proben in Abbildung 55 und der graphischen Auswertung in Abbildung 56, macht deutliche Unterschiede innerhalb der Kollektive sichtbar. Die gesunden Probanden haben keinerlei Aktivität der Erk1- und Erk2-Kinasen. Dies korreliert mit einer hohen Involukrin-Expression bei in vitro-Untersuchungen an konfluenten Ca<sup>2+</sup>-induzierten Keratinozyten. Die Atopiker weisen eine geringe, doch deutlich sichtbare Aktivität beider Erk-Kinasen auf. Um dieses Ergebnis in einem erweiterten Probandenkollektiv zu überprüfen, wurde dieser Versuch mit 7 gesunden und 6 Atopikern wiederholt. In Abbildung 57 wird deutlich, daß bei gesunden Probanden als auch bei Atopikern Erk1 konstant exprimiert wird, jedoch ist Erk2 in einigen Proben der beiden Kollektive nicht exprimiert. Anschließend wurde die Aktivität der MAP-Kinasen untersucht. Hier bestätigt sich in Abbildung 58 das bereits zuvor erläuterte Ergebnis der Abbildung 55. Innerhalb des gesunden Kollektivs sind keine Aktivitäten weder von Erk1 noch von Erk2 meßbar. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis ist abermals bei 5 von 6 Spendern eine deutliche Aktivität der Erk1-Kinase nachzuweisen. Eine Aktivität von Erk2 ist nur bei einer

Probe in Abbildung 58 zu erkennen. Die folgende Tabelle zeigt eine Auswertung beider Versuchsansätze.

<b>Erk1/Erk2 Expression</b>	<b>Gesunde Probanden (n=12)</b>		<b>Probanden mit atopischer Dermatitis (n=9)</b>	
<b>Erk1</b>	n=12	100%	n=9	100%
<b>Erk2</b>	n=5	42%	n=3	33%
<b>Erk1 Aktivität</b>				
<b>hoch</b>	n=0	0%	n=3	33%
<b>wenig</b>	n=0	0%	n=4	45%
<b>keine</b>	n=12	100%	n=2	22%
<b>Erk2 Aktivität</b>				
<b>hoch</b>	n=0	0%	n=2	22%
<b>Wenig</b>	n=0	0%	n=1	11%
<b>Keine</b>	n=12	100%	n=6	67%

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt VI.5.3.

Die oben dargestellte Tabelle macht deutlich, daß die Kollektive sich extrem unterscheiden: Obwohl die Expression von Erk1 und Erk2 in beiden Kollektiven vergleichbare Werte annimmt, zeigt sich in der Aktivität der Kinasen ein absolut konträres Ergebnis. Die gesunden Spender haben zu 100% keine Aktivität der Kinasen. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis zeigt sich jedoch ein deutlich erhöhter Prozentanteil an Erk1-Aktivität und eine, wenn auch schwach ausgeprägte Aktivität an Erk2.

## VII.5. Histologische Untersuchungen

### *VII.5.1. Morphologie gesunder und nicht-ekzematöser Haut des atopischen Ekzems*

Mit Hilfe von Kryostatschnitten und der Immunmarkierung konnten Unterschiede in der Morphologie der Haut sichtbar gemacht werden (Abbildung 60a). Der Antikörper p13 ist gut geeignet die Hautstruktur deutlich abzubilden. Dieser Antikörper markiert das Protein p13, welches in der untersten Epidermisschicht, dem Stratum basale, gebildet wird. Die einzelnen Papillen sind sichtbar von der Dermis abgegrenzt. Diese Papillen dienen der

Grenzflächenvergrößerung zwischen Epidermis und Dermis, um den Stoffwechsel der beiden getrennten Hautschichten zu verbessern. Auch das Stratum corneum wird durch den reinen Färbvorgang und die extreme Verdichtung an Zellen klar umgrenzt.

Atopiker haben eine andere Hautstruktur als gesunde Menschen. In Abbildung 60b zeigt sich auch hier eine klare Trennung von Epidermis und Dermis in der atopischen Haut. Jedoch erscheint die gesamte Hautstruktur ungeordnet. Die Epidermis ist extrem verbreitert und einzelne Papillen sind nur teilweise zu erkennen. p13 ist bei gesunder Haut in der Epidermis durchgehend vertreten, die Konzentration sinkt aber zunehmend bis hin zum Stratum corneum [Graham-Brown 1998]. Bei der atopischen Haut ist keine durchgehende Färbung der Epidermis darzustellen.

#### *VII.5.2. Differenzierungsgrad von Keratinozyten, ausgewertet an Kryostatschnitten in gesunder und nicht-ekzematöser Haut des atopischen Ekzems (NEAE)*

Abbildung 61a zeigt durch die unterschiedliche Zellstruktur eine Abgrenzung von Epidermis und Dermis. Hier ist, wenn auch nur recht schwach, die Ausbildung von Epidermis-Papillen zu erkennen. Der schmale Zellstreifen in der Grenzzone zwischen Epidermis und Stratum corneum ist gut sichtbar angefärbt. Die Zone der Involukrinbildung ist in gesunder Haut genau definiert. Über diesem Bereich liegt abschließend nur noch das sichtbar abgegrenzte Stratum corneum. Involukrin ist ein Protein, welches gegen Ende der Differenzierung bei Keratinozyten exprimiert wird. Deutlich sichtbar wird dies in histologischen Schnitten bei einer Immunmarkierung mit einem Involukrin-Antikörper.

In Abbildung 61b läßt sich nachweisen, daß sich Involukrin in NEAE im oberen Bereichen des Stratum granulosum befindet. Anhand der Saugblasenuntersuchungen konnte ermittelt werden, daß im Verhältnis zu dem Proteingehalt der Keratinozyten quantitativ nicht mehr Involukrin vorliegt. Insgesamt wird jedoch deutlich, daß alle Hautschichten, einschließlich der Epidermis, verbreitert sind und somit Involukrin durch die hohe Anzahl der vorliegenden Keratinozyten verstärkt sichtbar ist. Involukrin wird hier in einem, bis zu 8x breiteren Bereich exprimiert.

Der späte Differenzierungsmarker Filaggrin befindet sich bei gesunder Haut in einer dünnen Grenzschicht zwischen Stratum Granulosum und Stratum Corneum in Abbildung 62a. Bei

Filaggrin ist die Abgrenzung zum Stratum corneum nicht so stark ausgeprägt, wie zuvor bei Involukrin. Der Querschnitt durch die atopische Haut zeigt in (Abbildung 62b) dagegen keinerlei Anzeichen einer Existenz von Filaggrin. Möglich wäre, daß die Keratinozyten der atopischen Haut den letzten, durch Filaggrin-Expression gekennzeichneten Differenzierungsstatus nicht erreichen.

### *VII.5.3. Nachweis von aktiviertem Erk1/Erk2 und SAPK/JNK*

Zunächst wurde in Kryostatschnitten der gesunden und atopischen menschlichen Haut nach aktiviertem Erk1 und Erk2 gesucht. Hierbei ließ sich jedoch weder in gesunder noch in erkrankter Haut eine vorhandene Konzentration nachweisen. Dieses Ergebnis ist nur schwer zu erklären, da ex vivo-Versuche dieser Arbeit die Existenz von aktiviertem Erk1 und Erk2 in atopischer Haut nachweisen konnten. Außerdem müsste zumindest Erk1 und Erk2 in gesunder Haut in tiefergelegenen, noch proliferierenden Hautschichten sichtbar sein. Möglicherweise ist der Antikörper für histologische Zwecke nicht geeignet gewesen.

Mit einem weiteren Antikörper wurde der Anteil an aktiviertem SAPK/JNK ermittelt. Hier sind deutliche Unterschiede zwischen der gesunden Haut und der NEAE nachzuweisen. In jeder Schicht der gesunden Haut befinden sich Anteile an SAPK/JNK. In der Dermis ist die Immunmarkierung am deutlichsten, in der Epidermis ist diese schwächer, aber immer noch gut erkennbar. Auffällig ist, daß es keine klare Abgrenzung der verschiedenen Epidermis-Schichten gibt, bezüglich des Auftretens von SAPK/JNK. Bei der atopischen Dermatitis hingegen zeigt sich keine Anfärbung der Kryostatschnitte in den unterschiedlichen Bereichen. Lediglich vereinzelt tritt eine schwache Färbung der Epidermis auf. Somit bleibt festzuhalten, daß die aktivierte Form von SAPK/JNK in atopischer Haut histologisch nicht nachweisbar ist.

Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor gewonnenen Erkenntnisse durch die ex vivo-erhaltenen Keratinozyten gesunder und atopischer Haut in weiten Teilen. Lediglich die Aktivität der Erk1 und Erk2 Kinasen ist in histologischen Schnitten nicht nachzuweisen. Die histologischen Untersuchungen weisen jedoch deutlich auf die extrem verdickte Haut von Atopikern hin und den starken „ungeordneten“ Zustand der verschiedenen Hautschichten. Dies deutet erneut auf eine hohe Differenzierungsstörung dieser Keratinozyten hin, welche bereits durch die ex vivo-Studien belegt wurde. Der extreme Anteil an Proliferierenden Zellen in der Epidermis wird

durch die fehlende Existenz von aktiviertem SAPK/JNK, im Vergleich zu gesunder Haut erneut ersichtlich.

### VII.6. Lipidgehalt von in vitro-gewonnenen Keratinozyten

Die Ergebnisse unter VI.2.1 bis einschließlich VI.2.5 zeigen zum Abschluß eine Lipidanalyse von Proben mit einer Inkubation von 6 h bis 240 h [Wertz 1997]. In folgender Tabelle sind alle Ergebnisse der Abbildung 21 bis Abbildung 25 zusammengefaßt dargestellt.

	Kontrolle		Ca <sup>2+</sup> -Inkubation		Smase-		Ca <sup>2+</sup> + Smase	
	6-48 h		6-48 h		Inkubation 6-48 h		Inkubation 6-48 h	
Ceramid-2	2%*	↔	2%*	↔	13-4%*	↗↘	13-4%*	↗↘
Sphingomyelin	14%*	↔	20- 12%*	↘↘	4-2%*	↘↘	4-2%*	↘↘
Glucocerebrosid	2%*	↔	3-1%*	↘↘	3-7%*	↗↗	3-7%*	↗↗
Phosphatidylserin	35%*	↔	42%- 35%*	↘	35%*	↔	35%*	↔
Phosphatidylcholin	50%*	↔	50%*	↔	50%*	↔	50%*	↔

\* Anteil an untersuchten Lipiden; ↘ oder ↗ Differenz weniger als 50%; ↘↘ oder ↗↗ Differenz größer 50%.

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt VI.2.1 bis Abschnitt VI.2.5.

Die Kontrolle zeigt während des Versuchszeitraumes von 48 h keine Unterschiede in den untersuchten Parametern. Somit können alle weiteren Untersuchungsparameter direkt auf den Kontrollwert bezogen werden. Hervorzuheben ist hier, daß der Phosphatidylcholingehalt aller Proben konstant bei 50% angesiedelt ist. Dies hat für weitere Untersuchungen einen methodischen Vorteil, somit kann auf eine Protein- oder DNA-Bestimmung der eingesetzten Keratinozyten zukünftig verzichtet werden. Phosphatidylcholin kann demnach als Standardnormierung der Proben gelten. Der Vorteil dieser Bezugsgröße liegt (neben dem geringeren Arbeitsaufwand) darin, daß dieser Bezugswert mit der gleichen Methode ermittelt und ein Folgefehler verschiedener Methoden somit vermieden wird.

Wird Sphingomyelinase als Inkubationsparameter dem Medium hinzugegeben [Hannun 1994], so sinkt der Anteil an Sphingomyelin stark ab, da dies von der Sphingomyelinase direkt zu Ceramid umgesetzt wird. Der Ceramidspiegel steigt jedoch nur vorübergehend an und sinkt ebenso wie der Anteil an Sphingomyelinase ab. Da Ceramid weiter zum

Glucocerebrosid verstoffwechselt wird, erklärt sich auch hier die Wiederabnahme nach 12stündiger Inkubation. Phosphatidylserin bleibt hingegen konstant. Die Analyse des Lipidumsatzes einer kombinierten Inkubation mit Calciumionen und Sphingomyelinase erfolgte wie bei einer Inkubation mit Sphingomyelinase allein. Sphingomyelinase ist in diesem System somit alleiniger Verursacher eines Anstiegs an Glucocerebrosid. Es konnte somit ermittelt werden, daß die Zufuhr von Sphingomyelinase zu in vitro-kultivierten Keratinozyten nur einen vorübergehend kurzen Anstieg des Ceramid-2-Spiegels verursacht. Letztendlich ist das Resultat der Sphingomyelinase-Inkubation ein hoher Glucocerebrosidspiegel in den untersuchten Zellen. Die reine Inkubation der Keratinozyten mit Calciumionen bedingt eine zunehmende Differenzierung. Somit kann durch diese Lipid-Untersuchungen die Schlußfolgerung gezogen werden, daß bei  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggelter Differenzierung der Ceramid-2-Anteil in den Zellen konstant bleibt, jedoch sinkt der relative Sphingomyelinanteil. Auch der relative Anteil an Glucocerebrosid und Phosphatidylserin sinkt mit zunehmender Differenzierung der Zellen.

#### VII.7. Lipidgehalt von ex vivo-gewonnenen Keratinozyten

In diesem Abschnitt wurden Keratinozyten ex vivo-gewonnener Saugblasenepidermis untersucht. Folgende Tabelle resultiert aus den in Abbildung 59 gewonnenen Ergebnissen.

<b>Untersuchter Parameter</b>	<b>Keratinozyten von Spendern mit atopischer Dermatitis n=3 Differenz in % gegenüber gesunden Spendern</b>
<b>Sphingomyelin</b>	25,40
<b>Phosphatidylserin</b>	Nicht ermittelbar
<b>Phosphatidylcholin</b>	31,59
<b>Phosphatidylethanolamin</b>	43,53
<b>Glucocerebrosid</b>	Nicht ermittelbar
<b>Ceramid 2</b>	30,39
<b>Ceramid 1</b>	Nicht ermittelbar
<b>Cholesterol</b>	17,29
<b>FFS</b>	-20,99

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der Ergebnisse in Abbildung 59.

Ausgenommen der Freien Fettsäuren zeigen die Keratinozyten von Atopikern erhöhte Werte der untersuchten Parameter gegenüber den Keratinozyten gesunder Probanden. Diese Lipidbilanz bestätigt die zuvor ermittelten Schlußfolgerungen der Befund der Kinasenuntersuchungen an Keratinozyten aus Saugblasenepidermis. Zusammenfassend kann aufgezeigt werden, daß atopische Keratinozyten einen erhöhten Grundumsatz an Lipiden aufweisen. Dies widerspricht der These das eine hohe Konzentration an Lipiden, den Wasserverlust der Haut vermindert [Potts 1990, Loden 1992]. Allerdings ist ein erhöhtes Lipidvorkommen ein weiteres Indiz für eine verlängerte Proliferationsphase bzw. eine zu spät einsetzende, nicht ausreichende Differenzierung der Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis.

## V. Zusammenfassung

Die atopische Dermatitis (Neurodermitis) ist eine Dispositionskrankheit, die als additive Polygenie bezeichnet wird. Dabei wird die Disposition als Summe aller in eine gleiche Richtung weisenden Gene angenommen. Sobald ein von Umweltfaktoren abhängiger und individuell variabler Schwellenwert überschritten wird, schlägt die Disposition in Krankheit um. Es sind verschiedenste Merkmale gefunden worden, die es erlauben, Menschen mit atopischer Dermatitis in verschiedene Kollektive einzuteilen. Dagegen gelingt es nur selten, verschiedene Ergebnisse ein und demselben Kollektiv zuzuordnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Keratinozyten von Probanden mit gesunder Haut und mit atopischer Dermatitis untersucht. Histologische Befunde zeigen zwar, daß alle Hautschichten auch bei Menschen mit atopischer Dermatitis strukturiert angeordnet sind, jedoch haben diese eine 8fache Dicke im Vergleich zu gesunder Haut. Herausragend ist vor allem hier die Epidermis, deren überdimensionale Papillen extrem weit in die Dermis hineinragen und stark verbreitert, in ihrer Fläche vorliegen. Die atopische Haut kompensiert hierüber den gestörten Stoffwechsel zur Dermis. Zusätzlich wird durch eine verbreiterte Epidermis der bereits fortgeschrittenen Austrocknung der atopischen Haut entgegengewirkt. Auch ist der Exprimierungsbereich der untersuchten Proteine völlig ungeordnet. Das Fehlen von Filaggrin deutet auf eine gestörte Ausdifferenzierung der Keratinozyten hin. Die Differenzierung wird durch den Signaltransduktionsweg über die JNK/SAP-Kinase gefördert. Keratinozyten weisen mit zunehmender Differenzierung und Involukrinexpression auch eine Erhöhung der Aktivität der JNK/SAP-Kinase auf. Ein weiterer wichtiger Signaltransduktionsweg in dieser Betrachtung führt über die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2. Dieser zu JNK/SAPK komplementäre Signalweg fördert die Proliferation und die Zellteilung. In vitro-Versuche an Keratinozyten haben in dieser Arbeit nachgewiesen, daß die Aktivität hier im Gegensatz zu der Aktivität von SAPK/JNK mit zunehmender Differenzierung parallel abnimmt. Die soeben erwähnten in vitro-Versuche wurden an gesunden Keratinozyten vorgenommen. Bei einem Vergleich zwischen gesunden und atopischen Keratinozyten konnte die ex vivo-Methode der Saugblasengewinnung angewandt werden, die es erlaubt einen näheren Bezug zum in vivo-Status zu erlangen. Diese ex vivo-Untersuchungen wurden parallel an gesunden und atopischen Probanden durchgeführt.

Die Untersuchung der exprimierten Involukrinkonzentration zeigte innerhalb des gesunden Kollektives keine einheitlichen Ergebnisse. Eine hohe Expression wiesen 58% der Probanden auf, wohingegen 42% eine geringere Expression an Involukrin hatten. Auch die Probanden mit atopischer Dermatitis differierten innerhalb des Kollektives. Ebenfalls 55% zeigten einen hohen Differenzierungsgrad, 22,5% eine geringere und 22,5% keinerlei Involukrinexpression. Somit ist das Ergebnis dieser Untersuchung uneinheitlich innerhalb der Kollektive.

Desweiteren wurde die Aktivität der JNK/SAP-Kinase ermittelt. Im Kollektiv der gesunden Spender ließen sich bei 40% eine hohe, 20% eine geringe und 40% gar keine Aktivität nachweisen. Die atopischen Probanden zeigten auch hier ein uneinheitliches Ergebnis. 33% haben eine hohe, 64% keine Aktivität der Kinase. Auch hier lassen sich die Kollektive nicht direkt manifestieren. Ganz im Gegensatz dazu steht das Ergebnis der Aktivitätsuntersuchungen der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2. Während die gesunden Probanden zu 100% keine Aktivität in den Keratinozyten zeigten, ist das Ergebnis der Atopiker eindeutig zuzuordnen. 78% der Atopiker wiesen eine Aktivität der Erk1-Kinase und 33% eine Aktivität der Erk2-Kinase auf. Anders als bei gesunden Probanden wird hieran deutlich, daß die Phosphorylierung der Erk1- und Erk2-Kinasen, in diesem Stadium der Keratinozyten stark erhöht ist.

Somit scheint die Differenzierung der atopischen Keratinozyten im Vergleich zu gesunden Keratinozyten nicht zufriedenstellend ausgeprägt. Dieser Effekt ist verbunden mit einer erniedrigten Aktivität an JNK/SAPK und einer erhöhten Aktivität an Erk1 und Erk2. Beide Kinasen sind essentiell für die Signaltransduktion von Keratinozyten und deren Differenzierung bzw. Proliferation. Während normale Keratinozyten differenzieren, erreichen Atopiker durch unkontrollierte Aktivität verschiedener Kinasen die Differenzierung zu spät. Die Keratinozyten proliferieren stetig, was eine verdickte Epidermis und einen gestörten Stoffwechsel der atopischen Haut zur Folge hat, welche in den histologischen Befunden eindeutig belegt wurde. Alle erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine Funktionsstörung der atopischen Haut, welche parallel mit einer Differenzierungsstörung einhergeht.

## VI. Summary

Atopic Dermatitis is a chronically relapsing inflammatory skin disease. Together with allergic rhinitis or asthma the atopic dermatitis builds up the concept of the circle of atopic diseases. Because AD has no pathogenic skin lesions or unique laboratory parameters, the diagnosis is based on the presents of major and minor clinical features.

Histology results of this thesis show that the morphology of the atopic skin is different to the healthy skin. All layers of the atopic skin are 8times thicker, their papules are much deeper inside the dermis and the whole epidermis appears very thick. It shows also the existence of all investigated proteins in a much more confused order compared to normal skin. In particular the differentiation proteins show a very disordered existence in the epidermis of atopic dermatitis patients.

The signaltransduction pathway for the differentiation of the human keratinocytes could be summarised in two significant pathways. One is related to the Stress-activated-protein-kinase (JNK), which induces the differentiation of the cell. The other is the complementary pathway, which follows the signal by the Mitogen-activated Proteinkinase (Erk1, Erk2). This pathway does promote the proliferation of the cell.

Those two pathways in the signaltransduction of keratinocytes were analysed by studying the activity of the two enzymes SAPK/JNK and MAPK. Keratinocytes were isolated from suction blister epidermis of healthy and atopic dermatitis donators. A direct lack of involucrin as a Differentiation marker is not found. It also shows that SAPK/JNK does not have a mayor difference compared to healthy cells. But MAPK which belongs to the proliferation pathway of the cell is hyperactive in comparison to normal skin cells. The hyperactivity of the MAP-Kinase is a possible reason for the thickness of the skin, the not complete differentiation, and the metabolic dysfunction of the keratinocytes of the atopic Dermatitis.

## VIII. Literatur

- ABECK, D. und MEMPEL, M. (1998) Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br. J. Dermatol.* **139**, 13 – 16.
- BELL, R.M., HANNUN, Y.A., MERRILL, A.H., JR. (1993) Advances in Lipid Research: Sphingolipid and their metabolites. **Vol. 25, 26.** *Academic Press, Orlando, Fl.*
- BLECK O, ABECK D, RING J, HOPPE U, VIETZKE JP, WOLBER R, BRANDT O, SCHREINER V. (1999) Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol.* **113(6)**, 894-900.
- BLUMER, K.J. AND JOHNSON, G.L. (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 236 – 240.
- BOGUNIEWICZ, M. and Leung, D.Y.M. (1996) New concepts in atopic dermatitis. *Comprehensive therapy* **22(3)**, 144 – 151.
- BOS, J.D., WIERENG, E.A., SILLEVIS SMIT, J.H. (1992) Immune dysregulation in atopic eczema. *Arch Dermatol.* **128**, 1509 – 1512.
- CANO, E. AND MAHADEVAN, L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 117 – 122.
- CIFONE, M.G., DE MARIA, R., RONCAIOLI, P., RIPPO, M.R., AZUMA, M., LANIER, L.L. SANTONI, A., TESTI, R. (1994) Apoptotic signaling through CD95 (FAS/Apo1) activates an acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* **180**, 1547 – 1552.
- COLEMAN, R., TREMBATH, R.C., HARPER, J.I. (1993) Chromosome 11q13 and atopy underlying atopic eczema. *Lancet*, **341**, 1121 – 1122.
- COOPER, K.D. (1994) Atopic Dermatitis: Recent Trends in Pathogenesis and Therapy. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 128 – 137.
- CORK, M.J. (1996) The role of Staphylococcus aureus in atopic eczema: treatment strategies. *JEADV.* **7**, 31 – 37.
- CORK, M.J. (1997) The importance of skin barrier function. *J. Dermatol. Treatment* **8**, 7 – 13.
- CZECH, W., KRUTMANN, J., SCHÖPF, E., KAPP, A. (1992) Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **126**, 351 – 355.

- CZECH, W., SCHÖPF, E., KAPP, A. (1996) Soluble E-selection in sera of patients with atopic dermatitis and psoriasis-correlation with disease activity. *Br. J. Dermatol.* **134**, 17 – 21.
- DAVIS, R.J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 470 – 473.
- DEICHMANN, K.A. (1999) *Kongreß Deutscher Dermatologen Abstractband*, Vortrag O5.06.01.
- DILLEHAY, D.L., WEBB, S.K., SCHMELZ, E.-M. MERILL, A.H., JR. (1994) Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CFI mice. *J. Nutr.* **124**, 615 – 620.
- DOBROWSKY, R.T. AND HANNUN Y.A. (1992) Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 5048 – 5051.
- DOBROWSKY, R.T., KAMIBAYASHI, C., MUMBY, M.C., HANNUN, Y.A. (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **268**, 15523 – 15530.
- EBERLEIN-KÖNIG, B., SPIEGEL, A., PRZYBILLA (1996) Change of skin roughness due to lowering air humidity in climate chamber. *Acta. Derm. Venereol.* **76**, 447 – 449.
- FARTASCH, M. UND DIEPGEN, T.L. (1992) The barrier function in atopic dry skin. Disturbance of membrane-coating granule exocytosis and formation of epidermal lipids. *Acta Derm. Venereol. (Suppl.) (Stockh.)* **176**, 26 – 31.
- FRITSCH P. (1990) *Dermatologie*. 3. Aufl. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg.
- GEBHARD, M. und ELSNER, P.(1998) Hautphysiologische Veränderungen bei Atopikern und Konsequenz. *Allergologie*, **21**, 272 – 278.
- GRAHAM-BROWN, R.A.C. (1998) Therapeutics on Atopic Dermatitis. *Advances in Dermatology* **13**, 3 – 27.
- GREWE M., GYUFKO, K., SCHÖPF, E., KRUTMANN, J. (1994) Lesional expression of interferon- $\gamma$  in atopic eczema. *Lancet* **343**, 25 – 26.
- GREWE, M., WALTER, S., GYUFKO, K., CZECH, E., SCHÖPF, E., KRUTMANN, J. (1995) Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 407 – 410.
- GUILLET, G. UND GUILLET, M-H. (1992) Natural history of sensitization in atopic dermatitis: a 3-year follow-up in 250 children. *Arch Dermatol.* **128**, 187 – 192.

- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., KANN, C.C., EHLEITER, D., PERSAUD, R.S., MCLOUGHLIN, M., FUKS, Z., KOLESNICK, R.N. (1994) Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* **180**, 525 – 535.
- HAMID, Q., BOGUNIEWICZ, M., LEUNG, D.Y.M. (1994) Differential cytokine gene expression in acute vs. chronic atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* **94**, 870 – 876.
- HANNUN, Y. AND BELL, R.M. (1989) *Science* 243, 500 – 507.
- HANNUN, Y.A. (1994) The Sphingomyelin Cycle and the Second Messenger Function of Ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**, 3125 – 3128.
- HELLER, R.A. AND KRONKE, M. (1994) Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.* **126**, 5 – 9.
- HERSHEY, G.K.K., FRIEDRICH, M.F., ESSWEIN, L.A., THOMAS, M.L. CHATTILA, T.A. (1997) The Association of Atopy with a gain-of-function Mutation in the  $\alpha$ -subunit of the Interleukin-4-Rezeptor. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1720 – 1725.
- HOLERAN, W.M., FEINGOLD, K.R., MAO-QIANG, M., GAO, W.N., LEE, J.M., ELIAS, P.M. (1991) Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J. Lipid Res.* **3**, 1151 – 1158.
- IMOKAWA, G., ABE, A. JIN, K. HIGAKI, Y., KAWASHIMA, M., HIDANO, A. (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 523 – 526.
- JOESPH, C.E., BYUN, H.-S., BITTMAN, R., KOLESNICK, R.N., (1993) Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase. Evidence that kinase activity is proline-directed. *J. Biol. Chem.* **268**, 20002 – 20006.
- JUNGHANS V, GUTGESELL C, JUNG T, NEUMANN C. (1998) Epidermal cytokines IL-1beta, TNF-alpha, and IL-12 in patients with atopic dermatitis: response to application of house dust mite antigens. *J Invest Dermatol.* **111(6)**, 1184-1188.
- KÄGI, M.K., JOLLER-JEMELKA, H., WÜTHRICH, B. (1992) Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology* **185**, 88 – 92.
- KÄGI, M.K., WÜTHRICH, B, MONTANO, E., BARANDUM, J., BLASER, K., WALKER, C. (1994) Differential cytokine profiles in peripheral blood lymphocyte supernatants and skin biopsies from patients with different forms of atopic dermatitis, psoriasis and normal individuals. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **103**, 332 – 340.

- KAPP, A. (1993) The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis- eosinophil granule proteins as markers of disease activity. *Allergy*, **48**, 1 - 5.
- KAPP, A. (1993) The role of eosinophils in the pathogenesis os atopic dermatitis- eosinophil granule proteins as markers of disease activity. *Allergy* **48**, 1 – 5.
- KAPP, A. (1995) Atopic dermatitis- the skin manifestation of atopy. *Clin. Exp. Allergy*. **25**, 210 – 219.
- KAPP, A., CZECH, W., KRUTMANN, J., SCHÖPF, E. (1991) Eosinophil cation protein (ECP) in sera of patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 555 – 558.
- KAPP, A., KIRNBAUER, R., LUGER, T.A., SCHÖPF, E. (1987) Altered production of immunomodulating cytokines in patients with atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol.* **144**, 97 – 99.
- KAPP, A., TEXTOR, A., KRUTMANN, J., MÖLLER, A. (1990) Immunomodulating cytokines in atopic dermatitis and psoriasis- production of tumor necrosis factor/cachectin and lymphotoxin by mononuclear cells in vitro. *Br. J. Dermatol.* **122**, 587 – 592.
- KARLSON,P., DOENECKE, D., KOOLMAN, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York*.
- KELTER, WISKOTT, BETKE, KÜNZER, SCHAUB (1991) Lehrbuch der Kinderheilkunde, *Georg Thieme Verlag*
- KISSLING, S. UND WÜTHRICH, B. (1993) Verlauf der atopischen Dermatitis nach dem Kleinkinderalter. *Hautarzt*, **44**, 569 – 573.
- KOLESNICK, R. AND GOLDE, D.W. (1994) The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**, 325 – 328.
- KRISTJANSSON, S., STRANNEGARD, I.L., STRANNEGARD, Ö., PETERSON, C., ENANDER I., WENNEGREN, G. (1996) Urinary eosinophil protein X (EPX) in children with atopic asthma. A useful marker of antiinflammatory treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 1179 – 1187.
- LAWSON, V., LEWIS-JONES, M.S., FINLAY, A.Y., REID, P., OWENS, R.G. (1998) The family impact of childhood atopic dermatitis: the Dermatitis Family Impact questionnaire. *Br J Dermatol* **138**, 107 – 113.
- LEONHARDT, A., KRAUSS, M., GIELER, U., SCHWEER, H., HAPPLE, R., SEYBERTH, H.W. (1997) In vivo formation of prostaglandin E1 and prostaglandin E2 in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **136**, 337 – 340.

- LODEN, M., OLSSON, H., AXELL, T., WERNER-LINDE, Y. (1992) Friction, capacitance and transepidermal water loss (TEWL) in dry atopic and normal skin. *Br. J. Dermatol.* **126**, 137 – 41.
- LUCCI A, HAN TY, LIU YY, GIULIANO AE, CABOT MC. (1999) Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics. *Int J Oncol.* **15(3)** 541-546.
- MANKE-HEIMANN, A., BANGHA, E., AMON, U. (1999) TEWL, Corneometrie und pH-Metrie zur Qualitätssicherung der therapie der atopischen Dermatitis, *Abstractband*, Vortrag F1.05.15.
- MANKU, M.S., HORROBIN, D.F., MORSE, N.L., WRIGHT, S., BURTON, J.L. (1984) Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **110**, 643 – 648.
- MARSHALL, C.J. (1995) Specification of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179 – 185.
- MELNIK, B., HOLLMANN, J., HOFMANN, U., YUH, M.S., PLEWIG, G. (1990) Lipid composition of outer stratum corneum and nails in atopic and control subjects. *Arch. Derm. Res.* **282**, 549.
- MELNIK, B.C. UND PLEWIG (1989) Is the origin of atopy linked to deficient conversion of 6-fatty acids to prostaglandin E1 ? *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 557 – 563.
- MERRILL, A.H. JR. and JONES D.D. (1990) An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochem. Biophys. Acta* **1044**, 1 - 12.
- MERRILL, A.H., SCHMELZ, E.-M., DILLEHAS, D.L., SPIEGEL, S., SHAYMAN, J.A., SCHROEDER, J.J., RILEY, R.T. VOSS, K.A., WANG, E. (1997) Sphingolipids – The Engimatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Tox. and Applied Pharm.* **142**, 208 – 225.
- MICHEL C, VAN ECHTEN-DECKERT G, ROTHER J, SANDHOFF K, WANG E, MERRILL AH JR. (1997) Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem.* **5;272(36)** 22432-22437.
- MORREN, M-A., PRZYBILLA, B., BAMELIS, M., HEYKANTS, B., REYNAERS, A., DEGREEF, H. (1994) Atopic dermatitis: Triggerin factors. *J.Am. Acad. Dermatol.* **31**, 467 – 473.
- NIEDNER, R., ZIEGENMAYER, J. (1992) *Dermatika*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

- NIEMEIER, V. und GIELER U. (1998) Ambulante Schulung für Neurodermitiker, *T&E Dermatologie* **28**, 30 – 32.
- NIEMEIER, V., SCHILL, W.-B., KUPFER, J. GIELER, U. (1999) Psychoneuroimmunologie in der Dermatologie, *Abstractband*, Vortrag F1.05.02.
- NOLTE, H. (1992) Allergie, München, Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle
- OBEID, L.M., LENARDIC, C.M., KAROLAK, L.A., HANNUN Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769 – 1771.
- OLSON, M.F., ASHWORTH, A. AND HALL, A. (1995) An essential role for Rho, Rac and Cdc-42 GTPases in cell cycle progressing through G1. *Science* **269**, 1270 – 1272.
- PARKKINEN, M.U., KIISTALA, R., KIISTALA, U. (1991) Baseline water loss and cholinergic sweat stimulation in atopic dermatitis: a gravimetric measurement of local skin water loss. *Arch. Dermatol. Res.* **283**, 382 – 386.
- PENE, J., ROUSSET, F., BRIERE, F. (1988) IgE production by normal human lymphocytes as induced by interleukin4 and suppressed by interferon  $\gamma$  and  $\alpha$  and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6880 – 6884.
- RAINES, M.A., KOLESNICK, R.N., AND GOLDE, D.W. (1993) Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 14572 – 14575.
- RAJKA, G. (1989) Essential aspects of atopic dermatitis. Springer, Berlin
- ROOP, D. (1995) *Defects in the Barrier*. *Science* **267**, 474 – 475.
- ROTHE, M.J. UND GRANT-KELS, J.M. (1996) Atopic dermatitis: An update. *J. Am. Acad. Dermatol.* **35**, 1 – 13.
- RUTZ, S., SIEGEL, P., MUCHE, M., STERRY, W., JAHN, S. (1997) Nucleotide sequence Comparison of the IgE Constant Region in Patients with Atopic Dermatitis and Non-Atopic Individuals. *Exp Clin Immunogenet* **14**, 166-172.
- SAGER, N., FELDMAN, A., SCHILLING, G., KREITSCH, P., NEUMANN, C. (1992) House dust mite-specific T-cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: Frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **89**, 801 – 810.
- SANDFORD, A.J., SHIRAKAWA, T., MOFFATT, M.F. (1993) Localisation of atopy and  $\beta$  subunit of high-affinity IgE-receptor (FceR1) on chromosome 11q. *Lancet*, **341**, 332 – 334.
- Schäfer, T. und Ring, J. (1998) Epidemiologie des atopischen Ekzems. *Allergologie*, **21**, 259 – 271.

- SKOV, L. und BAADSGAARD, O. (1996) The potential role of Staphylococcus aureus superantigens in atopic eczema. *JEADV*. **7**, 8 – 11.
- STRANGE, P., SKOV, L., LISBY, S., NIELSEN, P.L., BAADSGRAAD, O. (1996) Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. *Arch. Dermatol.* **132**, 27 – 33.
- TANG, MLK., KEMP, A.S., THORBURN, J. (1994) Reduced interferon-g secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet*. **344**, 983 – 985.
- TESTI, R. (1996) Sphingomyelin breakdown and cell fate *TIBS* **21** 468 – 471.
- THEPEN, T., LANGEVELD-WILDSCHUT, E.G., BIHARI, I.C., VAN WICHEN, C.F., VAN REIJSEN, F.C., MUDDE, G.C., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A. (1996) Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from initial TH2 response into an TH1 response in situ. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 828 – 837.
- TUPKER, R.A., PINNAGODA, J., COENRAADS, P.J., NATER, J.P. (1990) Susceptibility to irritants: role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **123**, 199 – 205.
- VAN REIJSEN, F.C., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A., KALTHOFF, F.S., MAGGI, E., ROMAGNANI, S., WESTLAND, J.K., MUDDE, G.C. (1992) Skin derived aeroallergen-specific T-cell clones of TH2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy, Clin. Immunol.* **90**, 184 – 193.
- WALKER, C., KÄGI, M.K., INGOLD, P., BRAUN, P., BLASER, K., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A., WÜTHRICH, B. (1993) Atopic dermatitis: correlation of peripheral blood T-cell activation, eosinophilia and serum factors with clinical severity. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 145 – 153.
- WEDI, B., RAAP, U., LEWRICK, H., KAPP, A. (1997) Delayed eosinophil programmed cell death in vitro- a common feature of inhalant allergy, extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 536 – 543.
- WEIGMANN, K., SCHUTZE, S., KAMPEN, E., HIMMLER, A., MACHLEIDT, T., KRONKE, M. (1992) Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J. Biol. Chem.* **267**, 7313 – 7316.
- WERFEL, T. und KAPP, A. (1998) Immunologische Befunde bei atopischer Dermatitis. *Allerlogie*, **21**, 251 – 258.

- WERFEL, T., MORITA, A., GREWE, M., RENZ, H., WAHN, U., KRUTMANN, J., KAPP, A. (1996) Allergen-specificity of skin infiltrating T-cells is not restricted to a type 2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 871 – 876.
- WOLFF, R.A., DOBROWSKY, R.T., BIELAWSKA, A., ABEID, L.M., HANNUN, Y.A. (1994) Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19605 – 19609.
- WRIGHT, S.C., ZHENG, H., ZHONG, J. (1996) Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24kDa apoptotic protease (AP2). *FASEB J.* **10**, 325 – 332.
- WÜTHRICH, B. (1978) Serum IgE in atopic dermatitis: relationship to severity of cutaneous involvement and course of disease as well as coexistence of atopic respiratory diseases. *Clin. Allergy* **8**, 241 – 248.
- WÜTHRICH, B. (1989) Atopische Neurodermitis. *Med. Wochenschr. Wien*, **139**, 156 – 165.
- WÜTHRICH, B., JOLLER-JEMELKA, H., HELFENSTEIN, U., GROB, P.J (1990). Levels of soluble interleukin-2 receptors correlate with the severity of atopic dermatitis. *Dermatologica* **181**, 92 – 97.
- WÜTHRICH, B., JOLLER-JEMELKA, H., KÄGI, M.K. (1995) Levels of soluble ICAM-1 in atopic dermatitis. A new marker for monitoring the clinical activity? *Allergy* **50**, 88 – 89.
- WÜTHRICH, B., KÄGI, M.K., JOLLER-JEMELKA, H. (1992) Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* **284**, 339 – 342.
- YAO, B., ZHANG, Y., DELIKAT, S., MATHIAS, S., BASU, S., KOLESNICK, R. (1995) Ceramide-activated protein kinase is a Raf kinase. *Nature* **378**, 307 – 310.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere Quellen als die angegebenen nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Dissertation habe ich noch keiner anderen Universität vorgelegt, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Sabrina Steffen

Hamburg, 28. Mai 2001

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Günther Gercken für seine unendliche Geduld.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, meiner Tante Ingeborg Steffen, meinem Onkel Reinhard Steffen und meiner kleinen Omi Charlotte Hille für die ständige Unterstützung und Rücksichtnahme während des Studiums und der Dissertation und überhaupt für alles.

Meine Mama ist sowieso die allerbeste ohne deren aufbauende Worte, Aufmunterungen und ständigem Antrieb ich es nie bis hierhin geschafft hätte, die mir allerdings auch immer wieder gesagt hat, dass sie mich auch ohne einen Dokortitel immer lieb hat (ich hoffe mit aber auch).

Meinem Freund Ralf Köhn gehört eigentlich diese schriftliche Ausführung meiner Dissertation, denn ohne seine Tritte, Schlägeandrohungen und seinen zahlreichen Wiederbelebungsversuchen meiner kalten Hände und Füße hätte ich diese Arbeit nie fertiggestellt.

Für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung danke ich Forscherin Stefanie Carstensen-Hase, deren Freundschaft für mich eine der größten Bereicherungen dieser Arbeit darstellt. Auch Karen tom Dieck und Melanie Schmidt sei an dieser Stelle für eine nette und angenehme Arbeitsatmosphäre und vorallem für das entgegengebrachte Vertrauen gedankt.

Für ein stets offenes Ohr und einem verständnisvollen Zufluchtsort danke ich meiner Leidensgenossin und Freundin Susen Gottwald, wir haben die Bedeutung der Wörter Betreuung und Rückgrat neu kennengelernt.

Guido Janeke danke ich für das schöne Gefühl endlich einer Arbeitsgruppe angehört zu haben, den unermüdlichen Einsatz für die Rechte der Doktoranden und seiner entgegengebrachten Freundschaft.

Außerdem möchte ich noch allen danken, die während dieser Zeit einfach um mich herum agiert haben und Interesse an meiner Arbeit und meiner Person gezeigt haben. Dank an Kirsten; Heiko; Willi; allen Doktorranden des Doktorrandentreffs, Steffi M., Peter Philipp, allen Kollegen der tesa AG und meinen wirklich echten Freunden.

Vielen Dank an Cony Gatermann für die Unterstützung bei den Lipidanalysen und den Probandentests. Ausserdem danke ich den vielen Probanden, die sich mit Geduld und Ausdauer an den durchgeführten Untersuchungen beteiligt haben

Gedankt sei an dieser Stelle auch Claudia Mundt, Christopher Mummert und Thomas Blatt für einige lustige Stunden im Oval-Lab.

Für die Möglichkeit diese Dissertation anzufertigen danke ich dem Paul-Gersson-Unna-Forschungszentrum der Beiersdorf AG und Herrn Dr. Schreiner.

## CURRICULUM VITAE

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

- Sabrina Steffen
- 31. Juli 1971 in Hamburg
- ledig

### SCHULBILDUNG

---

1977 – 1981

Grundschule Ifflandstraße; 1. – 4. Schuljahr; Hamburg

1981 – 1984

Privat und Staatliche Schule; 1. – 7. Schuljahr; Syrien

1984 – 1986

Gesamtschule Meerweinstrasse; 8. und 9. Schuljahr; Hamburg

1986 – 1990

Gesamtschule Jahnschule; 10. – 13. Schuljahr; Hamburg

Abitur 1990

### BERUFLICHE AUSBILDUNG

---

1990 – 1997

Studiengang: Diplom Chemie; Nebenfach: Journalistik

Universität Hamburg

1997

Diplomarbeit: „Charakterisierung alternativer Spleißformen der Interleukin-7-mRNA“; Prof. Dr. Gerdes; Forschungszentrum Borstel

1997 – 2000

Promotion: Beiersdorf AG cosmed

Seit März 2000

Projektmanagerin; tesa AG

## STIPENDIEN

---

1993 – 1997

Stipendiatin der Friedrich Ebert Stiftung

## PRAKTIKA

---

1990 (6 Wochen)

Hamburger Rundschau, Wochenzeitung für Hamburg und Umgebung

1993 (6 Wochen)

Beiersdorf AG; Technikum cosmed

1998 (8 Wochen)

Westdeutscher Rundfunk WDR Köln

Wissenschaftsredaktion Quarks & Co; Ranga Yogeshwar

1998 – 1999

Beiersdorf AG; freie Mitarbeiterin „Presse & Public Relations“

## AUSLANDSAUFENTHALTE

---

1994 (12 Wochen)

Universidad de Sevilla; Spanien

1994 (4 Wochen)

SARGEL; Sairsa Gelita LTDA; Sao Paulo; Brasilien

1995 (12 Wochen)

Georgetown University; Washington D.C.; USA