

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Ingrid Moll

VERGLEICH DER ISOPRENALIN-STIMULIERTEN cAMP-PRODUKTION VON
HACAT-KERATINOZYTEN UND KULTIVIERTEN KERATINOZYTEN AUS
GESUNDER UND PSORIATISCHER HAUT

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Susanne Betz
aus Pforzheim

Hamburg 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 19. August 2002

Datum des Rigorosums: 21./22.10.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. V. Steinkraus

Korreferent: Prof. Dr. I. Moll

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	5
1 EINLEITUNG	7
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 HERKUNFT DER UNTERSUCHTEN ZELLKULTUREN	14
2.1.1 HaCaT-Keratinocyten	14
2.1.2 Keratinocyten-Primärkulturen aus menschlicher Haut	15
2.2 VERSUCHSABLAUF DER STIMULATION MIT ISOPRENALIN	17
2.2.1 Inkubation.....	17
2.2.2 Proteinbestimmung	19
2.2.2.1 Testprinzip	19
2.2.2.2 Durchführung	20
2.2.3 cAMP-Bestimmung.....	21
2.2.3.1 Testprinzip	21
2.2.3.2 Durchführung	21
2.3 AUSWERTUNG	23
2.4 SUBSTANZEN, GERÄTE, HILFSMITTEL	24
2.4.1 Substanzen	24
2.4.2 Geräte	25
2.4.3 Hilfsmittel.....	25
3 ERGEBNISSE	27
3.1 KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DER ISOPRENALIN-INDUZIERTEN CAMP-PRODUKTION VON HAcAT-KERATINOZYTEN	27
3.2 KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DER ISOPRENALIN-INDUZIERTEN CAMP-PRODUKTION VON KERATINOZYTEN AUS PRIMÄRKULTUREN GESUNDER, MENSCHLICHER VORHAUT	30
3.3 KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DER ISOPRENALIN-INDUZIERTEN CAMP-PRODUKTION VON KERATINOZYTEN AUS PRIMÄRKULTUREN NICHT- LÄSIONALER, PSORIATISCHER HAUT.....	33

3.4 KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DER ISOPRENALIN-INDUZIERTEN CAMP-PRODUKTION VON KERATINOZYTEN AUS PRIMÄRKULTUREN LÄSIONALER, PSORIATISCHER HAUT.....	34
3.5 VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER KONZENTRATIONS-WIRKUNGS- BEZIEHUNGEN DER ISOPRENALIN-INDUZIERTEN CAMP-PRODUKTION VON KERATINOZYTEN.....	36
4 DISKUSSION	38
5 ZUSAMMENFASSUNG	48
6 LITERATURVERZEICHNIS	49
DANKSAGUNG.....	65
LEBENS LAUF	66
ERKLÄRUNG.....	67

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

°C	:	Grad Celsius
µg	:	Mikrogramm
µl	:	Mikroliter
³ H	:	Tritium
AMP	:	Adenosinmonophosphat
ATP	:	Adenosintriphosphat
BCA	:	Bicinchoninsäure
BSA	:	Rinderserumalbumin
ca.	:	zirka
Ca ²⁺	:	Kalziumionen
cAMP	:	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	:	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	:	Kohlendioxid
Cu ¹⁺	:	einfach positiv geladene Kupferionen
Cu ²⁺	:	zweifach positiv geladene Kupferionen
CuSO ₄	:	Kupfersulfat
DAG	:	Diazylglycerol
DMEM	:	Dulbecco`s modified essential medium
EC ₅₀	:	Effective concentration ₅₀ (Konzentration eines Agonisten, bei der 50% des Maximaleffekts erreicht wird)
EDTA	:	Ethylendiamintetraazetat
FCS	:	fötales Kälberserum
G _i	:	inhibitorisches G-Protein
G-Protein	:	Guanin-Nukleotid(GTP)-bindendes Protein
G _s	:	stimulatorisches G-Protein
GTP	:	Guanosintriphosphat
H ₂ O	:	Wasser
HaCaT	:	Human, adult, Calcium, Temperature
HBSS	:	Hank`s Salzlösung
IP ₃	:	Inositol-1,4,5-triphosphat

K ₂ -Tartrat	:	Kaliumtartrat
M	:	molar
min	:	Minute
ml	:	Milliliter
mM	:	millimolar
NaHCO ₃	:	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	:	Natriumhydroxid
nm	:	Nanometer
N	:	normal
PBS	:	phosphate-buffered-saline
pmol	:	Pikomol
SEM	:	Mittlerer Standardfehler
TCA	:	Trichloressigsäure
upm	:	Umdrehungen pro Minute

1 EINLEITUNG

Die Zelle ist die kleinste Einheit des Lebendigen, das heißt, sie ist in der Lage, die Grundfunktionen des Organismus, also Stoffwechsel, Wachstum, Bewegung, Vermehrung und Vererbung zu erfüllen. Um die Informationen auszutauschen, die zur Ausführung dieser vielgestaltigen Aufgaben notwendig sind, stehen die Zellen durch verschiedenartige Systeme untereinander in Kontakt.

Die einfachste Möglichkeit der Zellkommunikation sind sogenannte "gap junctions", Zell-Zell-Kanäle, die als Transportwege für kleine Moleküle zwischen benachbarten Zellen dienen.

Desweiteren besteht die Möglichkeit der Produktion lokaler, chemischer Mediatoren, wie zum Beispiel Histamin, Prostaglandin E₂ und Eosinophiler, chemotaktischer Faktor, die nur auf die Zellen der Umgebung einwirken können.

Eine dritte Variante ist die Sekretion extrazellulärer Signalmoleküle (Hormone), die über den Blutstrom auch zu weiter entfernten Zielzellen gelangen können, um dort an spezifische Rezeptoren zu binden und ihre Wirkung zu entfalten. Dabei gibt es einerseits extrazellulär liegende Membranrezeptoren, und andererseits intrazellulär liegende, zytoplasmatische Rezeptoren, zu denen Stoffe gelangen, die in das Zellinnere diffundieren können (Tabelle 1.1).

Beispiele für Hormone, die an Membranrezeptoren binden:

- Adrenalin
- Insulin
- Somatotropin
- Adrenocorticotropes Hormon
- Parathormon
- Epidermaler Wachstumsfaktor

Beispiele für Hormone, die an zytosolische Rezeptoren binden:

- Cortisol
- Östradiol
- Testosteron
- Thyroxin

Tabelle 1.1: Extra- und intrazelluläre Hormonrezeptoren

Es gibt drei Möglichkeiten wie die Aktivierung eines Membranrezeptors, nach Bindung eines Liganden, in ein intrazelluläres Signal umgewandelt, und so das Verhalten der Zielzelle verändert werden kann. Eine ist die Aktivitätsänderung eines Effektorenzyms, welches dann die Bildung eines intrazellulären Signalmoleküls katalysiert (Abbildung 1.1). Derartige Signalmoleküle werden als "second messenger" bezeichnet. Beispiele hierfür sind zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), 1,2-Diazylglyzerol (DAG) und Kalzium (Ca^{2+}) (Wuttke 1987).

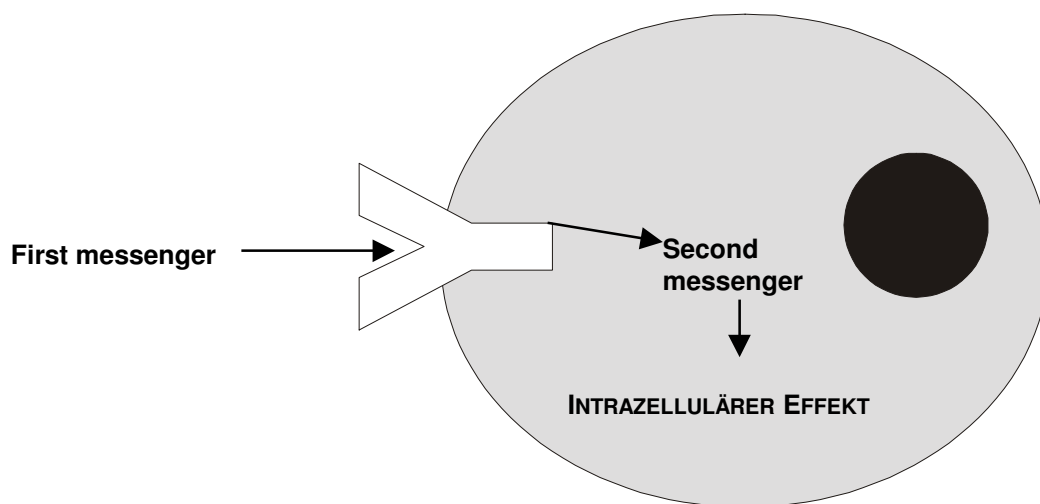


Abbildung 1.1: Funktion des „second messenger“

Zyklisches AMP ist ein sehr gut untersuchter "second messenger" und dient als ubiquitärer Mediator, der die Wirkung vieler unterschiedlicher Hormone vermittelt (Tabelle 1.2).

Hormon	Rezeptorgewebe	Hauptantwort
Adrenalin	Muskel, Leber	Abbau von Glykogen
	Fettgewebe	Abbau von Triglyzeriden
	Herz	Herzfrequenzsteigerung
Calcitonin	Knochen	Hemmung der Kalziumfreisetzung
Choriongonadotropin	Plazenta	Sekretion von Östrogen und Gestagen
Corticotropin	Nebennierenrinde	Cortison-Sekretion
Follikelstimulierendes Hormon	Ovar	Östrogen-Sekretion
Glucagon	Fettgewebe	Abbau von Triglyzeriden
Luteinisierendes Hormon	Ovar	Progesteron-Sekretion
Lipotropin	Fettgewebe	Abbau von Triglyzeriden
Noradrenalin	Gefäße	Vasokonstriktion
Parathormon	Knochen	Knochenresorption
Thyroideastimulierendes Hormon	Schilddrüse	Thyroxin-Sekretion
Vasopressin	Niere	Wasserresorption

Tabelle 1.2: Hormone, die cAMP als "second messenger" benutzen

Zyklisches AMP wird unter Wirkung des Enzyms Adenylylzyklase, eines integralen Membranproteins, aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet (Sutherland und Rall 1960).

Bei der Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird die Adenylylzyklase nicht direkt aktiviert, sondern durch ein zwischengeschaltetes Signalkopplungsprotein. Man fand heraus, daß dieses Zwischenprodukt des Aktivierungsprozesses ein guanylnucleotidbindendes Protein ist, das man kurz G-Protein nannte (Rodbell 1980, Gilman 1986, Bourne et al. 1987) (Abbildung 1.2). Es existiert ein stimulatorisches G-Protein (G_s), das die Adenylylzyklase

aktiviert und ein inhibitorisches G-Protein (G_i), welches die Bildung von cAMP durch die Adenylylzyklase hemmt (Rodbell 1980, Gilman 1984, Stryer und Bourne 1986).

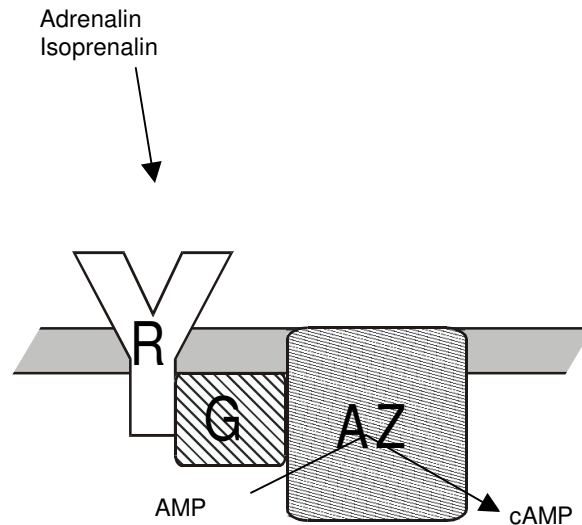


Abbildung 1.2: Signalkette Rezeptor→G-Protein→Adenylylzyklase→cAMP
 R Adrenozeptor
 G G-Protein
 AZ Adenylylzyklase

An menschlichen Keratinozyten, die quantitativ die vorherrschende Zellart in der Epidermis darstellen (Zelickson und Mottaz 1968, Matoltsy 1986), sind bisher 4 unterschiedliche Membranrezeptoren bekannt, die über ein G_s -Protein an die Adenylylzyklase koppeln. Der β_2 -Adrenozeptor (Yoshikawa et al. 1975a, Duell 1980a, Orenberg et al. 1983), der Histamin- (H_2 -) (Iizuka et al. 1976a, Aoyagi et al. 1981), der Adenosin- (A_2 -) (Iizuka et al. 1976b, Duell 1980b) und der Prostaglandin- (E_1/E_2 -) Rezeptor (Adachi et al. 1975, Lord und Ziboh 1979). Dabei bewirkt die Stimulation des β -Adrenozeptors beim Menschen die höchste Ansprechrate des Adenylylzyklase-cAMP-Systems (Iizuka et al. 1978a, 1990). Die Bedeutung des cAMP-Systems wurde für viele Organe wie zum Beispiel für Herz und Lunge weitestgehend erforscht.

Das Vorhandensein der Adenylylzyklase in der Haut konnte schon 1970 an der Meerschweinchen-Epidermis nachgewiesen werden (Mier und Urselmann, 1970).

Die Existenz eines β -Adrenozeptors wurde erstmals vor mehr als 25 Jahren beschrieben (Brønstad et al. 1971, Duell et al. 1971, Powell et al. 1971, Marks und Rebien 1972a, Voorhees und Mier 1974). Später konnte zwischen zwei Subtypen, dem β_1 - und dem β_2 - Adrenozeptor, unterschieden werden (Lands et al. 1967a, 1967b).

An Keratinozyten kommen fast ausschließlich β_2 -Adrenozeptoren vor und zwar in einer hohen Dichte mit ungefähr 6.000-12.000 Rezeptoren pro Zelle (Gazith und Reichert 1982, 1987, Gazith et al. 1983, Steinkraus et al. 1991a, 1992a).

Untersuchungen haben gezeigt, daß die Stimulation keratinozytärer β -Adrenozeptoren sehr effektiv an das Adenylylzyklase-System koppeln (Orenberg et al. 1983, Cavey et al. 1984, 1986, Steinkraus et al. 1991b).

Außerdem konnte durch die Aktivierung der β -Adrenozeptoren ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Keratinozyten nachgewiesen werden (Koizumi et al. 1991, Osawa et al. 1991, Yasui et al. 1992).

Da verschiedene Zellfunktionen in Keratinozyten durch Kalzium gesteuert werden, läßt dies eine regulatorische Funktion der β -Adrenozeptoren vermuten. Zu den Kalzium-abhängigen Mechanismen in Keratinozyten zählen die Zellproliferation (Durham und Walton 1982, Boynton 1988, Yuspa et al. 1988), die Zelldifferenzierung (Boyce und Ham 1983, Hennings und Holbrook 1983, Pillai et al. 1990), die Formation von Desmosomen (Watt et al. 1984) und Veränderungen des Zytoskeletts (Magee et al. 1987).

Dies könnte auf eine Rolle des β -adrenergen Systems bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen der Haut hinweisen, bei denen vorallem die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten gestört sind.

Ein Beispiel hierfür ist die Psoriasis vulgaris. Bereits in früheren Studien konnte eine erniedrigte β -adrenerge Stimulierbarkeit der Keratinozyten in psoriatischer Haut gezeigt werden (Hsia et al. 1972, Halprin et al. 1975, Mui et

al. 1975, Gommans et al. 1979, Iizuka et al. 1978a, 1981), wobei über den cAMP-Gehalt in der psoriatischen Epidermis unterschiedliche Ergebnisse vorliegen (Voorhees 1982).

Außerdem liegen Fallbeschreibungen vor, bei denen unter der Therapie mit β -Adrenozeptorenblockern psoriasiforme Arzneimittelexantheme bzw. Exazerbationen einer Psoriasis vulgaris auftraten (Arntzen et al. 1984, Abel et al. 1986, Gold et al. 1988), ohne daß eine pathogenetische Erklärung für diese Arzneimittelwirkung gefunden werden konnte.

Um diese Ergebnisse systematisch zu untersuchen, und eine erniedrigte Ansprechrate des β -adrenergen Systems in psoriatischer Haut nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Stimulierbarkeit von menschlichen Keratinozyten aus Primärkulturen von befallener psoriatischer Haut mit dem β -Adrenozeptoragonisten ($\pm$)-Isoprenalin untersucht und mit Untersuchungen an Keratinozyten aus Primärkulturen von nicht-befallener psoriatischer Haut, klinisch gesunder Haut und an einer permanenten menschlichen Keratinozytenlinie (HaCaT) verglichen.

Ziel dieser Arbeit war es:

die pharmakologische Stimulierbarkeit der β -Adrenozeptoren von kultivierten Keratinozyten durch den β -Agonisten Isoprenalin zu untersuchen. Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion an HaCaT-Keratinozyten.
2. Untersuchungen zum Zeitverlauf der isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion an HaCaT-Keratinozyten.
3. Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion an Keratinozyten aus Primärkulturen gesunder Haut.
4. Untersuchungen zum Zeitverlauf der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion an Keratinozyten aus Primärkulturen gesunder Haut.

5. Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion an Keratinozyten aus Primärkulturen unbefallener, psoriatischer Haut.
6. Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion an Keratinozyten aus Primärkulturen befallener, psoriatischer Haut.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Herkunft der untersuchten Zellkulturen

2.1.1 HaCaT-Keratinozyten

Die HaCaT-Keratinozyten wurden uns freundlicherweise von Norbert E. Fusenig (Abteilung für Differenzierung und Karzinogenese *in vitro*, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine permanente, nicht-tumorigene, menschliche Keratinozytenlinie.

Zellen, die aus histologisch unauffälliger Epidermis des oberen Rückens eines 62-jährigen Mannes entnommen worden waren, wandelten sich nach Langzeitinkubation in einem Medium mit niedriger Kalzium-Konzentration (0.2 mM Ca^{2+}) und erhöhter Temperatur (38.5°C) spontan in eine immortalisierte Zelllinie um (Boukamp et al. 1988). Auch nach mehr als 140 Passagen behielten die Zellen ihren nicht-tumorigenen Charakter und bildeten trotz ihres aneuploiden und strukturell stark veränderten Karyotyps nach Transplantation auf die nackte Maus ein normal strukturiertes und ausdifferenziertes Gewebe. Als Zeichen einer endständigen Differenzierung exprimieren die Zellen die Marker Keratin 1, Keratin 10, Involucrin und Filaggrin (Fusenig 1986). Der Name HaCaT ist ein Akronym und steht für

H	-uman
a	-dult
Ca	-lcium
T	-emperature.

Die HaCaT-Zellen wurden in Dulbecco`s modified essential medium (DMEM) mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) in Zellkulturflaschen aus Plastik in einer Atmosphäre von 5% CO_2 und 95% Luft bei 37 °C im Monolayer angezüchtet. Für die Versuche wurden konfluente HaCaT-Keratinozyten-

Kulturen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit 0.25%igem Trypsin und 0.01% EDTA in PBS (phosphate-buffered-saline) im Inkubator bei 37°C vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Die Einwirkungszeit des Trypsins betrug ca. 10 Minuten und wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann 2 Minuten bei 1500 upm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend mit DMEM resuspendiert, die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, und die Zellsuspension dann für die Versuche zur Stimulation der cAMP-Produktion durch Inkubation mit Isoprenalin eingesetzt. Die HaCaT-Keratinozyten stammen aus den Passagen 44 bis 60.

2.1.2 Keratinozyten-Primärkulturen aus menschlicher Haut

Zur Gewinnung der Keratinozyten aus gesunder, menschlicher Haut wurden uns freundlicherweise von der Abteilung für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Vorhäute zur Verfügung gestellt, die aus medizinischen Gründen operativ entfernt werden mußten.

Die Keratinozyten aus menschlicher, befallener und unbefallener psoriatischer Haut wurden aus überschüssigem Hautmaterial gewonnen, welches bei Hautentnahmen aus anderen medizinischen oder diagnostischen Gründen mit Einverständnis der Patienten in der Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entfernt wurde.

Um die Keratinozyten aus der Epidermis menschlicher Haut herauszulösen, wurden die Hautstücke zunächst in HBSS (Hanks` Salzlösung) überführt, anschließend wurde das subkutane Fettgewebe mit Hilfe eines Skalpells entfernt, und die Haut in ca. 4x4 mm große Stücke geschnitten.

Zur Sterilisation wurden die Stücke 3x10 Minuten in PBS-Lösung mit Zusatz von 0.2% Gentamicin inkubiert.

Danach wurde das Hautmaterial in Keratinozyten-Medium mit Dispaselösung (25 kaseinolytische Einheiten/ml) überführt und dort für ca. 18 Stunden bei

einer Temperatur von 4°C belassen. Danach konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen werden.

Zum Herauslösen der nicht ausdifferenzierten Keratinozyten aus der Epidermis wurde diese in 2 ml einer auf 37°C vorgewärmten Lösung aus 0.025% Trypsin und 0.01% EDTA für ca. 10-15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Zellen besser zu vereinzeln, wurde die Suspension dabei alle 5 Minuten vorsichtig leicht geschüttelt. Durch Zugabe von 3 ml sterilen Keratinozyten-Mediums mit Zusatz von 10% fötalen Kälberserums wurde die Trypsinierung gestoppt.

Die zellfreie Epidermis wurde nun entfernt, und die Zellsuspension für 2 Minuten mit 1500 upm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde der Überstand dekantiert, und das verbliebene Zellpellet mit Keratinozyten-Medium resuspendiert. Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt, und dann ca. 3×10^6 Keratinozyten in eine Kulturflasche aus Plastik mit 5 ml Keratinozyten-Medium überführt.

Die Zellen wurden anschließend bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luft 3 Tage störungsfrei inkubiert und dann lichtmikroskopisch auf adhärent gewordene Zellen kontrolliert. Die primären Keratinozyten-Kulturen erhielten alle 2 Tage frisches Kulturmedium und wurden bei Erreichen der Konfluenz für die Versuche zur β -Rezeptoren-Stimulation eingesetzt. Es wurden Kulturen zwischen der ersten und vierten Passage verwendet.

2.2 Versuchsablauf der Stimulation mit Isoprenalin

2.2.1 Inkubation

Um eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion nachzuweisen, wurden die Keratinozyten jeweils 5 Minuten mit ($\pm$)-Isoprenalin in den Konzentrationen 10^{-10} M bis 10^{-3} M inkubiert.

Zur Bestimmung des Zeitverlaufs der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion wurden die Keratinozyten mit ($\pm$)-Isoprenalin anfangs in einer Konzentration von 10^{-8} M, später dann mit 10^{-6} M inkubiert und die cAMP-Produktion nach 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 60 Minuten bestimmt.

Die unterschiedlichen Inkubationen der HaCaT-Keratinozyten und Keratinozyten aus Primärkulturen mit Isoprenalin wurden in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen an 200 μ l Zellsuspension in DMEM vorgenommen. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Durch Mitführen eines Kontrollansatzes ohne Stimulierung durch Isoprenalin konnte jeweils der basale, intrazelluläre cAMP-Spiegel ermittelt werden. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt und gegebenenfalls auf die gewünschte Dichte eingestellt.

Jeweils 200 μ l der Zellösung wurden mit 2 μ l Isoprenalin inkubiert und auf dem Vortex gemischt. Die Inkubation wurde nach der jeweiligen Zeit durch Zugabe von 200 μ l eiskalter 10%iger Trichloressigsäure (TCA) beendet, wodurch die Proteine denaturierten und das intrazelluläre cAMP freigesetzt wurde.

Durch 3-minütige Zentrifugation mit 14000 upm bei Raumtemperatur in einer Minifuge (Eppendorf) erfolgte eine Abtrennung des Zellproteins von dem gelösten cAMP. Der Überstand mit dem cAMP konnte leicht von dem festen Proteinpellet dekantiert und in ein neues 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurde der Proteingehalt des Zellproteinpellets jeder Probe gemessen, und aus dem Überstand nach Extraktion der TCA mit Diethylether der cAMP-Gehalt bestimmt.

Die Konzentrationen der Wirksubstanz Isoprenalin sowie die Inkubationsdauer wurden für die Versuche mit den verschiedenen Keratinozyten folgendermaßen gewählt:

Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion

Zellen: HaCaT-Keratinozyten
Stimulation mit: ($\pm$)-Isoprenalin: 10^{-10} M bis 10^{-3} M
Inkubationsdauer: 5 min

Zeitverlauf der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion

Zellen: HaCaT-Keratinozyten
Stimulation mit: ($\pm$)-Isoprenalin: 10^{-8} M bzw. 10^{-6} M
Inkubationsdauer: 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 min

Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion

Zellen: Keratinozyten aus klinisch gesunder Haut
Stimulation mit: ($\pm$)-Isoprenalin: 10^{-10} M bis 10^{-3} M
Inkubationsdauer: 5 min

Zeitverlauf der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion

Zellen: Keratinozyten aus klinisch gesunder Haut
Stimulation mit: ($\pm$)-Isoprenalin: 10^{-6} M
Inkubationsdauer: 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 min

Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion

Zellen: Keratinozyten aus nicht-läsionaler, psoriatischer Haut
Stimulation mit: ($\pm$)-Isoprenalin: 10^{-10} M bis 10^{-3} M
Inkubationsdauer: 5 min

Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion

Zellen: Keratinozyten aus läsionaler, psoriatischer Haut
Stimulation mit: ($\pm$)-Isoprenalin: 10^{-10} M bis 10^{-3} M
Inkubationsdauer: 5 min

2.2.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt jeder Probe wurde mit dem "bicinchoninic acid protein assay" nach Redinbaugh ermittelt (Redinbaugh und Turley 1986, Smith et al. 1985, Pierce Chemical Company 1984).

2.2.2.1 Testprinzip

Dem Protein in den Proben wurde ein grün-gefärbtes Arbeitsreagenz hinzugefügt, das oxidierte Cu^{2+} -Ionen und Bicinchoninsäure (BCA) in alkalischer Lösung enthält. Die Cu^{2+} -Ionen werden durch das Protein zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Diese können dann mit den BCA-Molekülen einen violett-gefärbten, stabilen Chelat-Komplex bilden. Durch den Farbumschlag von grün nach violett läßt sich die Produktion von Cu^{1+} -Ionen kontrollieren. Da diese in einem weiten Bereich der Proteinkonzentration proportional ist, kann man

durch die Messung der optischen Dichte (Extinktion) in einem Photometer die Proteinkonzentration der Proben ermitteln.

2.2.2.2 Durchführung

Die festen Proteinpellets wurden nach der Zugabe von 500 µl 1N NaOH solange auf dem Vortex gemischt, bis sie sich vollständig aufgelöst hatten.

Die für die Erstellung der Eichkurve notwendigen Proteinstandards wurden aus Rinderserum-albumin (BSA) in den Konzentrationen 12 µg, 8 µg, 6 µg, 4 µg, 2 µg, 1 µg, 0.5 µg Protein/50 µl hergestellt.

Die für die Farbkomplex-bildende Reaktion benötigten zwei Reagenzien bestehen aus:

Lösung A:	1.35% NaHCO ₃
	0.58% NaOH
	0.47% K ₂ -Tartrat x 0.5 H ₂ O
	1% Bicinchoninsäure (BCA)

Lösung B:	2.3% CuSO ₄ x 5 H ₂ O
-----------	---

Die Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, und Lösung A mit NaOH auf den pH-Wert 11.25 eingestellt. Beide Lösungen können mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Bei der Durchführung des Versuches wurde jedesmal frisch das Arbeitsreagenz aus 49 Volumeneinheiten Lösung A und 1 Volumeneinheit Lösung B gemischt.

Für die Proteinbestimmung wurden dann die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96x250 µl) mit je 50 µl der Standards, der Proben, sowie als Blindwert mit bidestilliertem Wasser beschickt. Anschließend wurde in jede Vertiefung je 200 µl des zuvor frisch hergestellten Arbeitsreagenzes pipettiert. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Platte mit den Proben wurde 1 Minute gemischt und für 45 Minuten bei 56°C inkubiert. Dabei sollte die Mikrotiterplatte abgedeckt werden.

Nach dem Abkühlen wurde die optische Dichte (Extinktion) der Proben in einem "Mikrotiter-Reader" mit einem 550 nm Filter gemessen (Referenzfilter 630 nm).

Durch Interpolation auf der Eichgeraden wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt.

2.2.3 cAMP-Bestimmung

2.2.3.1 Testprinzip

Das Testprinzip basiert auf der kompetitiven Bindung von dem zu bestimmenden, un-markierten cAMP und einer definierten, hinzugefügten Menge an Tritium-markierten cAMP an ein Protein mit hoher Spezifität und Affinität für cAMP. Dabei ist die Menge des gebundenen, radioaktiv-markierten cAMPs umgekehrt proportional zu der Menge an gebundenem, unmarkiertem cAMP. Deshalb läßt sich durch Messung der Radioaktivität, der Gehalt an unmarkiertem cAMP berechnen.

Durch die Zugabe von Aktivkohle wird das nicht an Protein-gebundene cAMP abgetrennt. Nach Zentrifugation wird aus dem Überstand jeder Probe ein Aliquot zur Flüssigkeits-Szintillations-Messung eingesetzt. Aus den mitgeführten Standards kann eine lineare Eichkurve erstellt werden, aus der dann der Gehalt jeder Probe an unmarkiertem cAMP errechnet werden kann.

2.2.3.2 Durchführung

Vor der Bestimmung des cAMPs erfolgte die 6-malige Auswaschung der in jeder Probe enthaltenen TCA mit Diethylether. Dabei wurde den Proben jeweils 1 ml eisgekühlter, mit Wasser gesättigter Diethylether zugegeben, sie wurden kurz auf dem Vortex gemischt, und anschließend konnte der

Überstand aus Diethylether und ausgewaschener TCA mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden.

Die TCA-freien Proben wurden dann bei -80°C eingefroren, um anschließend über Nacht in einem Lyophilisator vollständig gefriergetrocknet zu werden.

Für die cAMP-Bestimmung wurde das *cAMP [³H] assay system (Amersham Buchler GmbH & Co. KG)* verwendet. Die enthaltenen, gefriergetrockneten Substanzen wurden entsprechend der Anleitung in bidestilliertem Wasser aufgenommen, dazu gehörten Tris/EDTA-Puffer (50mM Tris/HCl, 4mM EDTA, pH 7.5), [³H]-cAMP, cAMP-Standard, Bindungsprotein und Aktivkohle.

Die gefriergetrockneten Proben wurden in Tris/EDTA-Puffer aufgenommen und zwar mit Volumina, welche die Proben soweit verdünnten, daß die gemessenen cAMP-Konzentrationen im Bereich der Eichkurve lagen.

Aus dem cAMP-Standard wurden 7 Standards mit den Konzentrationen 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 und 0.25 pmol cAMP/50 µl hergestellt.

Desweiteren wurden ein Blindwert (Puffer, kein Bindungsprotein), sowie ein Leerwert (Puffer und Bindungsprotein) mitgeführt, um nach Zugabe von markiertem cAMP die Aktivität ohne Probe und Bindungsprotein, beziehungsweise ohne Probe und mit Bindungsprotein zu messen.

Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Für den Assay wurden 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße nun wie folgt beschickt:

Blindwert:	150 µl Puffer
Leerwert:	50 µl Puffer
Standards 1-7:	50 µl des jeweiligen Standards
Proben 1-x:	50 µl der jeweiligen Probe

Anschließend wurde in jedes Gefäß 50 µl des Tritium-markierten cAMPs pipettiert und in alle Gefäße, außer in den Leerwert, je 100 µl des Bindungsproteins gegeben.

Alle Ansätze wurden gut auf dem Vortex gemischt und 2 Stunden im Eisbad (2-4°C) inkubiert.

Die bei -20°C aufbewahrte Aktivkohle wurde rechtzeitig vor Ablauf der Inkubationszeit aufgetaut und unter ständigem Rühren im Eisbad behalten.

Dann wurden nach Ablauf der Inkubationszeit bei 4°C in jedes Probengefäß je $100\text{ }\mu\text{l}$ eiskalte Aktivkohle pipettiert und kurz auf dem Vortex gemischt. Die zugegebene Aktivkohle band das freie Tritium-markierte und unmarkierte cAMP, damit allein das gebundene cAMP gemessen werden konnte. Die Reaktionsgefäße wurden 1 min bis spätestens 6 min nach Zugabe der Aktivkohlesuspension zentrifugiert, da sonst durch das veränderte Bindungsgleichgewicht ein Teil des Protein-cAMP-Komplexes dissoziieren könnte, und dadurch der Anteil der an die Aktivkohle gebundenen Radioaktivität möglicherweise ansteigen würde. Nach 2 min Zentrifugation (14000 upm , Raumtemperatur) wurde aus dem Überstand jedes Probengefäßes sehr vorsichtig $200\text{ }\mu\text{l}$ abpipettiert und jeweils in ein vorher mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit gefülltes Szintillations-Zählgläschen überführt.

Nachdem alle Gläschen gefüllt und auf dem Vortex gründlich gemischt worden waren, konnten in einem β -Counter die "counts per minute" gemessen werden.

Der gesuchte Gehalt der Proben an unmarkiertem cAMP wurde durch Interpolation aus der Eichkurve ermittelt.

2.3 Auswertung

Die Datenpunkte der cAMP-Produktion sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt und werden auf mg Zellprotein bezogen.

Die EC_{50} -Werte wurden graphisch ermittelt und entsprechen der Konzentration eines Agonisten bei der 50% des Maximalwertes erreicht wird.

2.4 Substanzen, Geräte, Hilfsmittel

2.4.1 Substanzen

DMEM (Dulbecco`s modified essential medium) (Seromed Biochrom KG, Berlin, FRG)

FCS (fötales Kälberserum) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, FRG)

Trypsin (Seromed Biochrom KG, Berlin, FRG)

EDTA (Ethyldiamintetraacetatic acid) (Sigma Chemical Co., St Louis, USA)

PBS (phosphate-buffered-saline)

HBSS (Hank`s Salzlösung) (Gibco BRL, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland)

Gentamicin (Gibco BRL, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland)

Keratinocyten-Medium (Keratinocyte Basal Medium ($\pm$ Ca)) (Promocell GmbH, Heidelberg, FRG)

Dispase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, FRG)

($\pm$)-Isoprenalin (1-[3',4'-Dihydroxyphenyl]-2-isopropylaminoethanol, Hydrochlorid) (Sigma-Chemical Co., St. Louis, USA)

10%ige TCA (Trichloressigsäure) (Merck, Darmstadt, FRG)

1 N NaOH (Merck, Darmstadt, FRG)

BSA (bovine serum albumine) (Merck, Darmstadt, FRG)

NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, FRG)

K₂-Tartrat-Hemihydrat (Merck, Darmstadt, FRG)

BCA (Bicinchoninic acid) (4,4`-Dicarboxy-2,2`-Biquinoline) (Sigma Chemical Co., St Louis, USA)

CuSO₄ (Sigma Chemical Co., St Louis, USA)

Diethylether (Merck, Darmstadt, FRG)

cAMP [³H] Radioassay Kit (Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, FRG)

bidestilliertes Wasser

Szintillationsflüssigkeit (Ready Safe Liquid Scintillation Cocktail) (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA)

2.4.2 Geräte

Laminar-Air-Flow ELB 2472 (Heraeus Instruments GmbH, Hannover, FRG)

Inkubator (37°C) (W.C. Heraeus GmbH, Hanau, FRG)

Zentrifuge (Labofuge 400e) (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, FRG)

Mikroskop (Leitz, Wetzlar, FRG)

Vortex (Reax 2000) (Heidolph Elektro GmbH+Co. KG, Kelheim, FRG)

Minifuge (Centrifuge 5415C) (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, FRG)

Inkubator (56°C) (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, FRG)

Mikrotiter-Reader MR 5000 (Dynatech, Guernsey, Channel Islands)

Lyophilisator: Evaporatorzentrifuge UNIVAPO 100 H (Uniequip, Martinsried, FRG)

Kältefalle UNICRYO MC 2L -80°C (Uniequip, Martinsried, FRG)

Drehscheibenvakuumpumpe UNIVAC PO 6 (Uniequip, Martinsried, FRG)

Magnetrührer (Cenco Instruments bv, Breda, Netherlands)

β-Counter Tri Carb A 201005 SN 86549 (Canberra Packard GmbH, Frankfurt, FRG)

2.4.3 Hilfsmittel

Zellkulturflaschen (Falcon Becton Dickinson Labware, Meylon Cedex, France)

Pipetten (Greiner GmbH, Frickenhausen, FRG)

Neubauer-Zählkammer

Skalpelle (Cutfix) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, FRG)

Pinzetten

Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, FRG)

Multipetten (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, FRG)

Stoppuhr

Eppendorf-Pipetten (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, FRG)

Analysenwaage (Mettler, Spoerhave AG, Giessen, FRG)

Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden, FRG)

Wasserstrahlpumpe (Brand GmbH+Co., Wertheim, FRG)

Gefrierschrank (Colora Messtechnik GmbH, Lorch, FRG)

Szintillations-Gläschen (Canberra Packard GmbH, Frankfurt, FRG)

3 ERGEBNISSE

3.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von HaCaT-Keratinocyten

Abbildung 3.1 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der cAMP-Produktion von HaCaT-Keratinocyten nach der Inkubation mit ($\pm$)-Isoprenalin in den Konzentrationen 10^{-10} mol/l bis 10^{-3} mol/l bei einer gleichbleibenden Inkubationszeit von 5 Minuten. Dabei markiert die Abszisse die jeweilige Konzentration von ($\pm$)-Isoprenalin in mol/l, mit der stimuliert wurde und die Ordinate die daraufhin intrazellulär gemessene cAMP-Konzentration der HaCaT-Keratinocyten in pmol/mg Zellprotein.

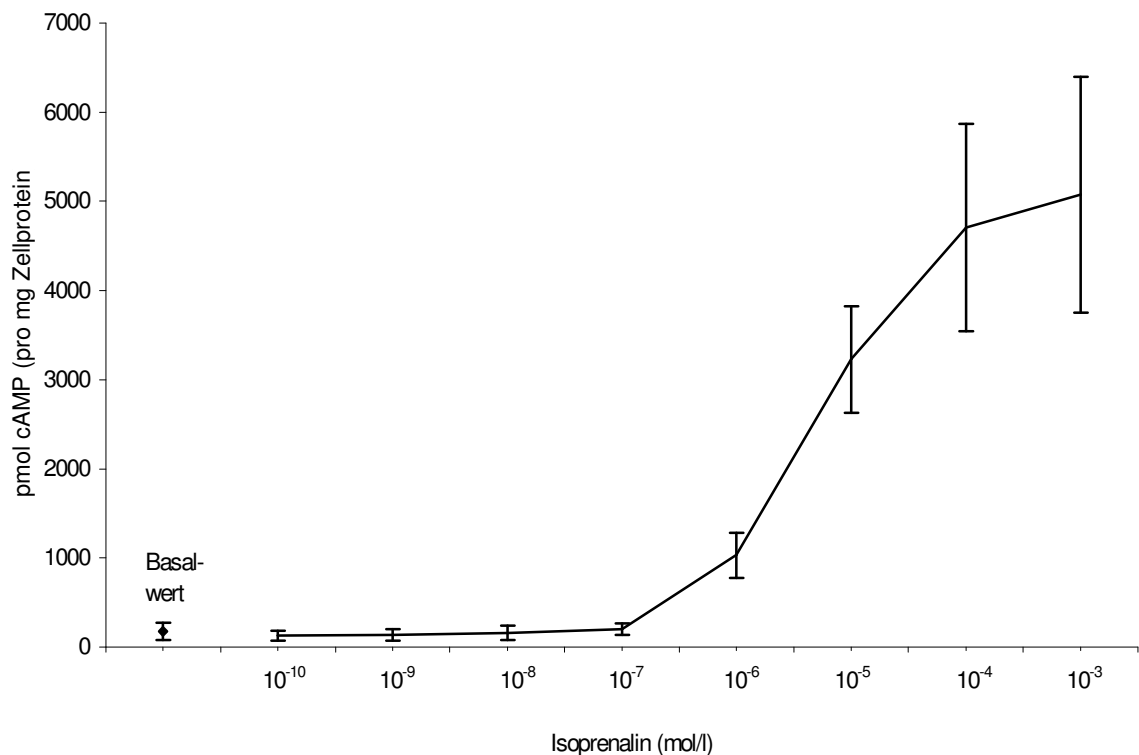


Abbildung 3.1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der cAMP-Produktion von HaCaT-Keratinocyten

Die Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ mittlerem Standardfehler aus 6 Einzelexperimenten dar, die alle in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Der markierte Basalwert wurde ohne Stimulation mit Isoprenalin gemessen.

Nach der Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit niedrigen Konzentrationen von ($\pm$)-Isoprenalin (10^{-10} bis 10^{-7} mol/l) zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve einen flachen Verlauf. Die cAMP-Produktion entspricht mit Werten von 130, 136, 160 und 202 pmol/mg Zellprotein etwa der basalen cAMP-Konzentration mit 178 pmol/mg Zellprotein ohne Zugabe von ($\pm$)-Isoprenalin. Erst bei Stimulation mit ($\pm$)-Isoprenalin in der Konzentration 10^{-6} mol/l zeigt die Kurve einen steilen Anstieg, der bei einer Konzentration ab 10^{-4} mol/l in eine Plateauphase mündet. Die cAMP-Produktion erreicht in diesem Bereich Werte von 5000 pmol/mg Zellprotein.

Die EC_{50} liegt bei 6.9×10^{-6} mol/l ($\pm$)-Isoprenalin.

3.2 Zeitverlauf der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von HaCaT-Keratinocyten

Anfangs wurde aufgrund von Ergebnissen in früheren Untersuchungen die Stimulation der HaCaT-Keratinocyten mit ($\pm$)-Isoprenalin in der Konzentration von 10^{-8} mol/l durchgeführt. Dabei stellt in Abbildung 3.2.1 die Abszisse die Inkubationszeit mit ($\pm$)-Isoprenalin 10^{-8} [M] und die Ordinate die jeweilig gemessene cAMP-Konzentration in pmol pro mg Protein dar.

Wie dieses Diagramm zeigt, wurde bald deutlich, daß bei dieser Konzentration von Isoprenalin kein nennenswerter Effekt bei der cAMP-Zunahme in den Keratinocyten auftrat.

Dies wurde auch in der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der cAMP-Produktion deutlich, wo ebenfalls erst ein deutlicher cAMP-Anstieg bei einer ($\pm$)-Isoprenalin-Konzentration von 10^{-6} mol/l zu beobachten war (siehe Abbildung 3.1).

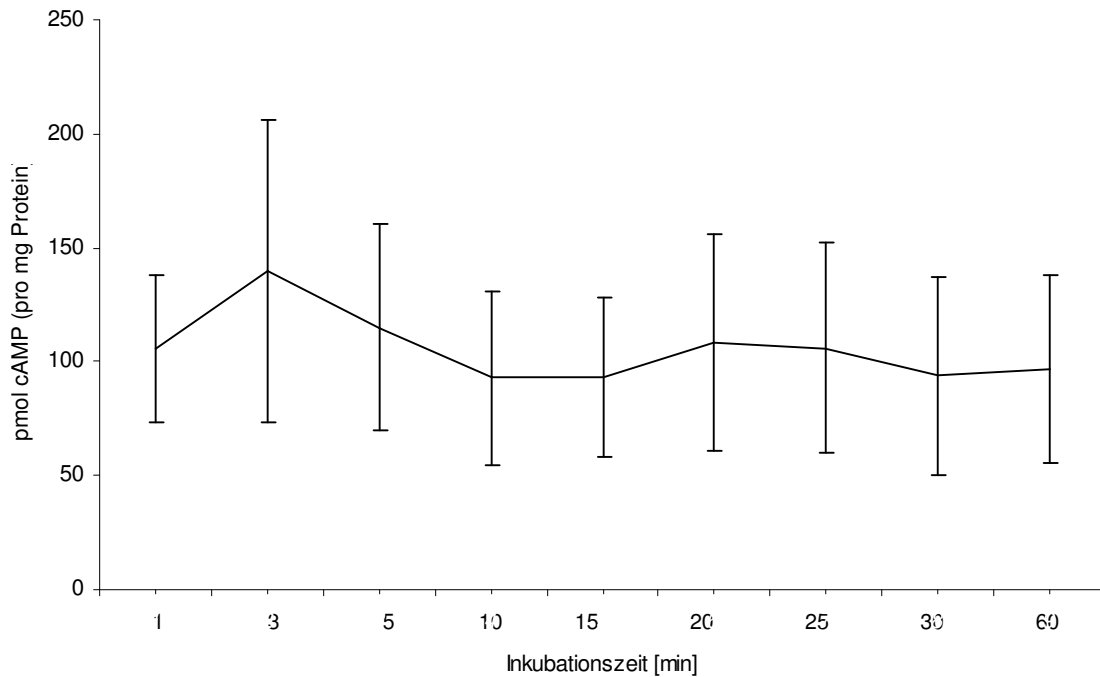


Abbildung 3.2.1: Zeitverlauf der cAMP-Produktion von HaCat-Keratinocyten nach Stimulation mit (±)-Isoprenalin 10^{-8} [M]

Wie in Abbildung 3.2.2 mit der blau eingefärbten Kurve dargestellt, wurden die HaCaT-Keratinocyten daraufhin mit (±)-Isoprenalin in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l stimuliert. In der Abszisse sind wiederum die Inkubationszeiten in Minuten und in der Ordinate die gemessenen cAMP-Konzentrationen in pmol pro mg Protein aufgetragen.

Dabei sieht man, daß nach einem anfänglich deutlichen Anstieg der cAMP-Konzentration nach ungefähr 10 Minuten eine Plateauphase erreicht wird. Die maximal erreichte cAMP-Konzentration liegt bei 756 pmol pro mg Zellprotein.

In schwarzer Farbe ist die Kurve eingezeichnet, welche die basale Produktion von cAMP in den Zellen darstellt. Diese Werte zeigen die ohne Stimulation mit (±)-Isoprenalin gemessenen cAMP-Konzentrationen in den HaCaT-Keratinocyten.

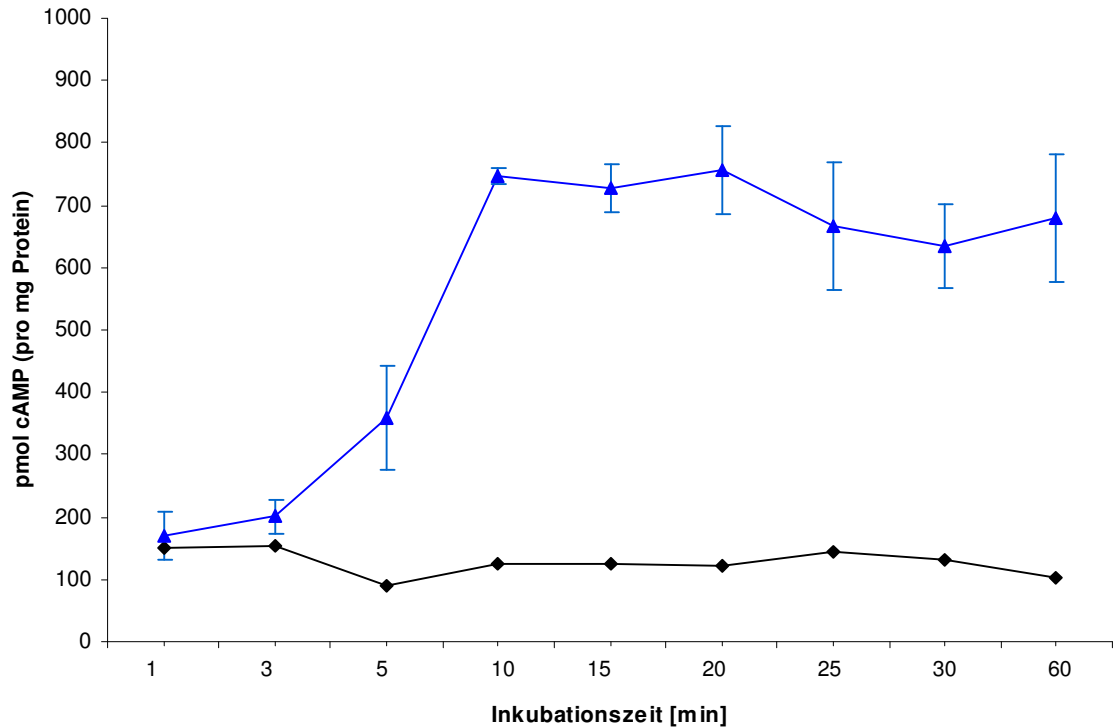


Abbildung 3.2.2: Zeitverlauf der cAMP-Produktion von HaCat-Keratinocyten nach Stimulation mit (±)-Isoprenalin 10^{-6} [M] und ohne Stimulation mit (±)-Isoprenalin

3.3 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Vorhaut

Abbildung 3.3 stellt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen von gesunder, menschlicher Vorhaut nach der Inkubation mit (±)-Isoprenalin in den Konzentrationen 10^{-10} mol/l bis 10^{-3} mol/l bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten dar. Die Abszisse markiert die jeweilige zur Stimulation benutzte Konzentration von (±)-Isoprenalin in mol/l und die Ordinate die dazugehörige intrazellulär gemessene Konzentration von cAMP in pmol/mg Zellprotein der Keratinocyten.

Die Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ mittlerem Standardfehler dar, die aus 6 Einzelexperimenten ermittelt wurden, die alle in Doppelbestimmung durchgeführt worden sind. Der Basalwert wurde ohne die Zugabe von Isoprenalin gemessen.

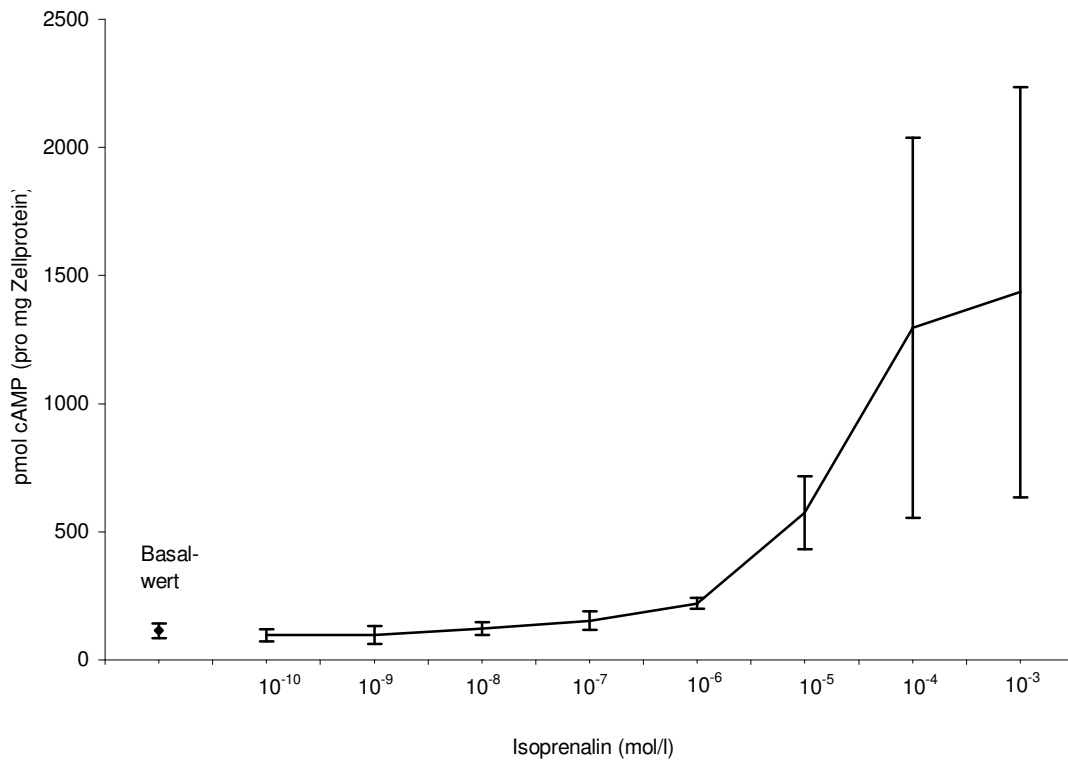


Abbildung 3.3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der cAMP-Produktion von Keratinozyten aus Primärkulturen von gesunder, menschlicher Vorhaut

Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Keratinozyten aus Primärkulturen von gesunder, menschlicher Vorhaut ist ähnlich der Kurve für HaCaT-Keratinozyten (siehe Abb. 3.1). Die Kurve zeigt den gleichen flachen Verlauf bei der Stimulation mit niedrigen Konzentrationen von ($\pm$)-Isoprenalin und den Anstieg ab einer Konzentration von 10^{-6} mol/l, der in einem Plateau endet. Dabei erreicht die Produktion von cAMP mit einem Maximalwert von 1400 pmol/mg Zellprotein aber deutlich niedrigere Werte. Bei den HaCaT-

Keratinocyten wurden dagegen Werte bis zu 5000 pmol/mg Zellprotein gemessen.

Die EC_{50} liegt bei 2.0×10^{-5} mol/l ($\pm$)-Isoprenalin.

3.4 Zeitverlauf der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Vorhaut

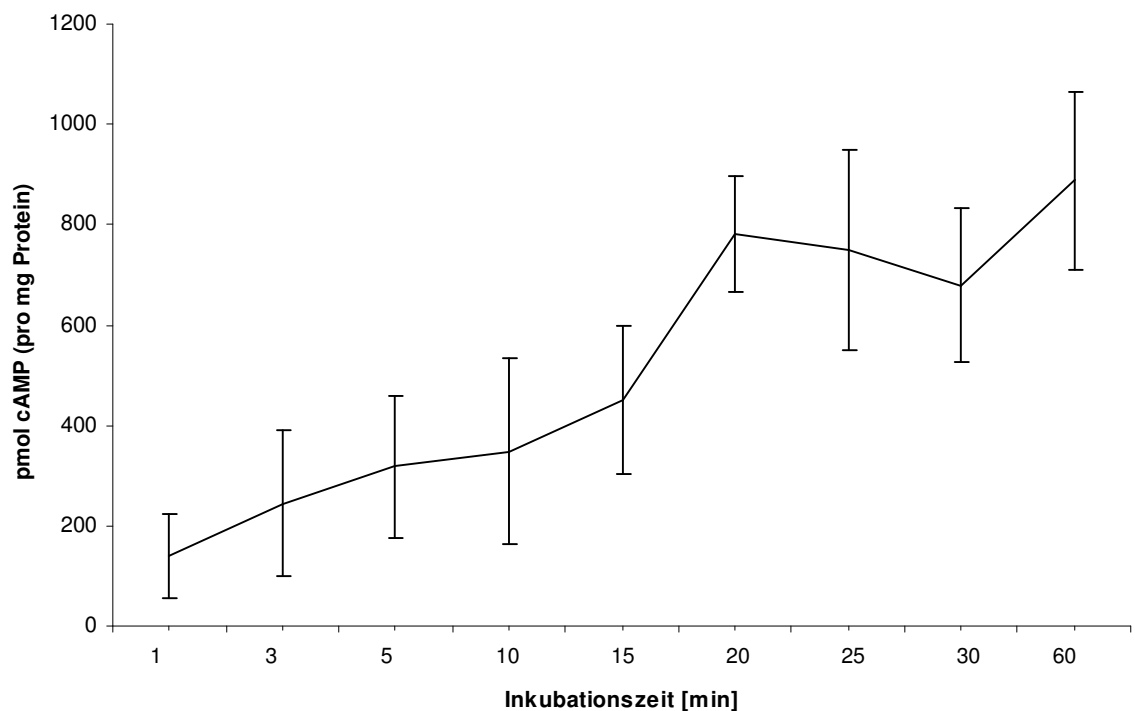


Abbildung 3.4: Zeitverlauf der cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Haut nach Stimulation mit ($\pm$)-Isoprenalin 10^{-6} [M].

Abbildung 3.4 stellt die im Zeitverlauf gemessenen cAMP-Konzentrationen in den Keratinocyten aus Primärkulturen von gesunder, menschlicher Haut nach der Stimulation mit ($\pm$)-Isoprenalin in der Konzentration von 10^{-6} mol/l dar. Die Abzisse markiert hier die gemessenen Konzentrationen von cAMP in pmol pro mg Protein und die Ordinate die jeweilige Inkubationszeit mit ($\pm$)-Isoprenalin

10^{-6} [M] in Minuten. Ähnlich wie bei den HaCaT-Keratinocyten (vergleiche Abbildung 3.2.2) folgt auch hier auf einen deutlichen Anstieg der gemessenen cAMP-Werte nach ungefähr 20 Minuten keine weitere Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der maximal erreichte Wert beträgt hier 887 pmol pro mg Zellprotein.

3.5 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen nicht-läsionaler, psoriatischer Haut

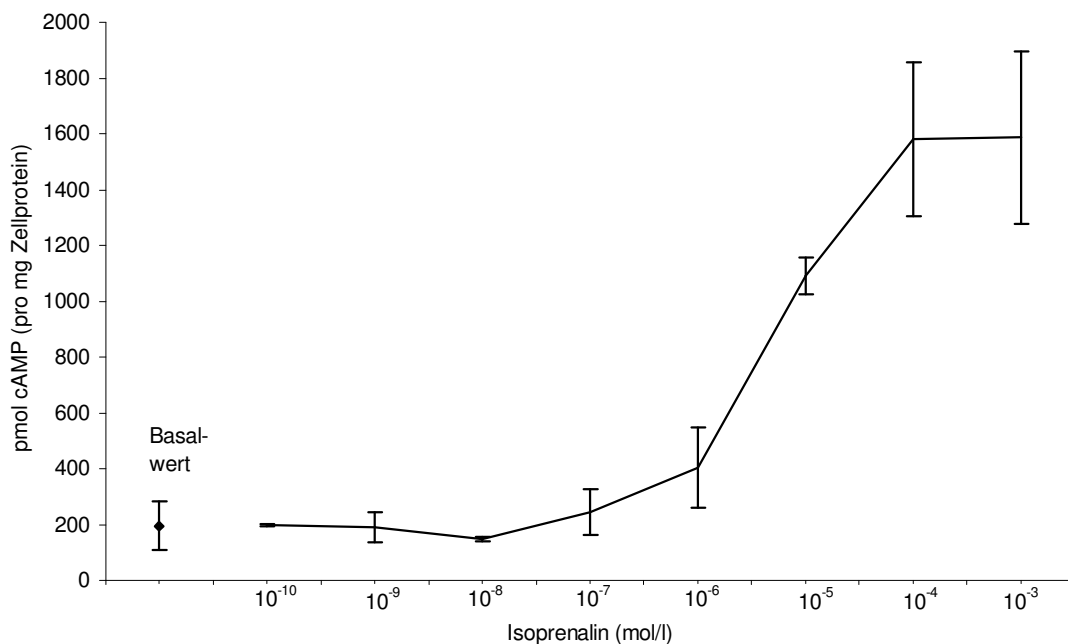


Abbildung 3.5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer, nicht-läsionaler Haut

Abbildung 3.5 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der cAMP-Produktion von Keratinocyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer, nicht-befallener Haut nach der Inkubation mit ($\pm$)-Isoprenalin in den Konzentrationen 10^{-10} mol/l bis 10^{-3} mol/l bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten. Die Abszisse

markiert die jeweilige zur Stimulation benutzte Konzentration von ($\pm$)-Isoprenalin in mol/l und die Ordinate die daraufhin intrazellulär gemessene Konzentration von cAMP in pmol/mg Zellprotein der Keratinozyten.

Die Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ mittlerem Standardfehler dar, die aus 2 Einzelexperimenten ermittelt wurden, die in Doppelbestimmung durchgeführt worden sind. Der Basalwert wurde ohne die Inkubation mit Isoprenalin bestimmt.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Keratinozyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer Haut, die aus nicht befallenen Hautarealen gewonnen wurde, zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Kurve für Keratinozyten aus gesunder, menschlicher Vorhaut (siehe Abb. 3.3). Die cAMP-Produktion liegt mit maximal erreichten Werten von 1500 pmol/mg Zellprotein in einem ähnlichen Bereich wie bei den Keratinozyten aus gesunder Haut, für welche die höchste cAMP-Produktion bei 1400 pmol/mg Zellprotein gemessen wurde. Die Werte liegen aber ebenfalls deutlich unter den Werten für die HaCaT-Keratinozyten.

Der EC₅₀-Wert liegt bei 5.7×10^{-6} mol/l ($\pm$)-Isoprenalin.

3.6 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von Keratinozyten aus Primärkulturen läsionaler, psoriatischer Haut

Abbildung 3.6 stellt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der cAMP-Produktion von Keratinozyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer, befallener Haut nach der Inkubation mit ($\pm$)-Isoprenalin in den Konzentrationen 10^{-10} mol/l bis 10^{-3} mol/l bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten dar. Die Abszisse markiert die jeweilige zur Stimulation benutzte Konzentration von ($\pm$)-Isoprenalin in mol/l und die Ordinate die daraufhin intrazellulär gemessene Konzentration von cAMP in pmol/mg Zellprotein der Keratinozyten. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte $\pm$ mittlerem Standardfehler

dar, die aus 3 Einzelexperimenten ermittelt wurden, die alle in Doppelbestimmung durchgeführt worden sind. Der Basalwert wurde ohne die Zugabe von Isoprenalin gemessen.

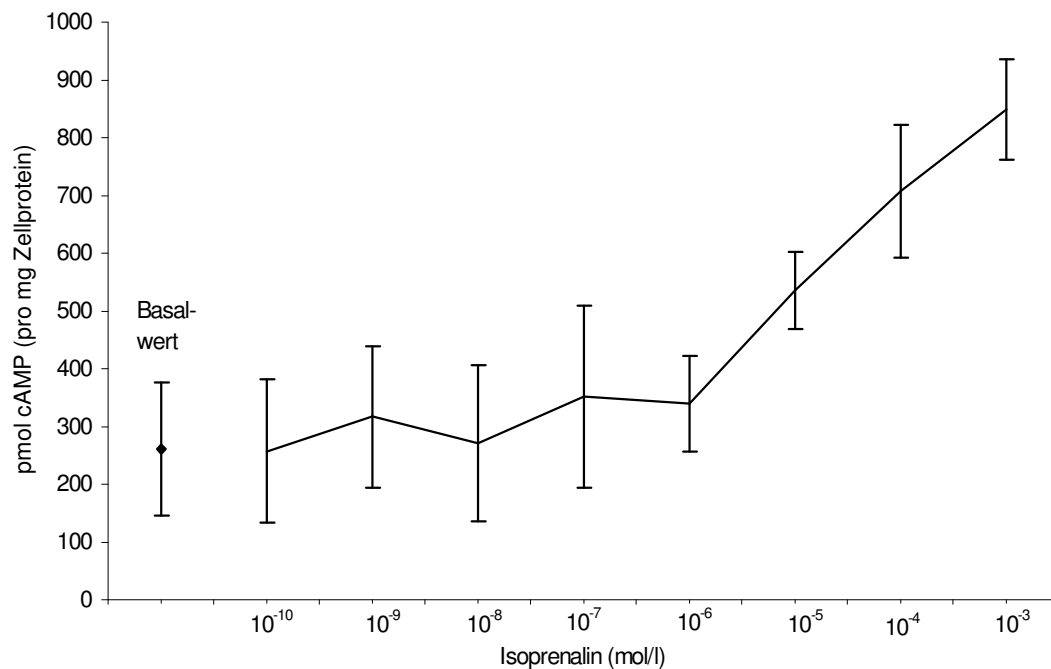


Abbildung 3.6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der cAMP-Produktion von Keratinozyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer, läsionaler Haut

Auch der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Keratinozyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer Haut, die aus befallenen Hautbezirken entnommen wurde, entspricht in den wesentlichen Merkmalen denen, der Kurven für HaCaT-Keratinozyten und für Keratinozyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Vorhaut und nicht befallener, psoriatischer Haut. Allerdings werden bei den Primärkultur-Keratinozyten aus läsionaler, psoriatischer Haut, mit einem Maximalwert von 850 pmol cAMP pro mg Zellprotein, die niedrigsten Werte der cAMP-Produktion nach der Stimulation mit ($\pm$)-Isoprenalin erreicht.

Die EC_{50} liegt bei 4.4×10^{-6} mol/l ($\pm$)-Isoprenalin.

3.7 Vergleichende Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von Keratinozyten

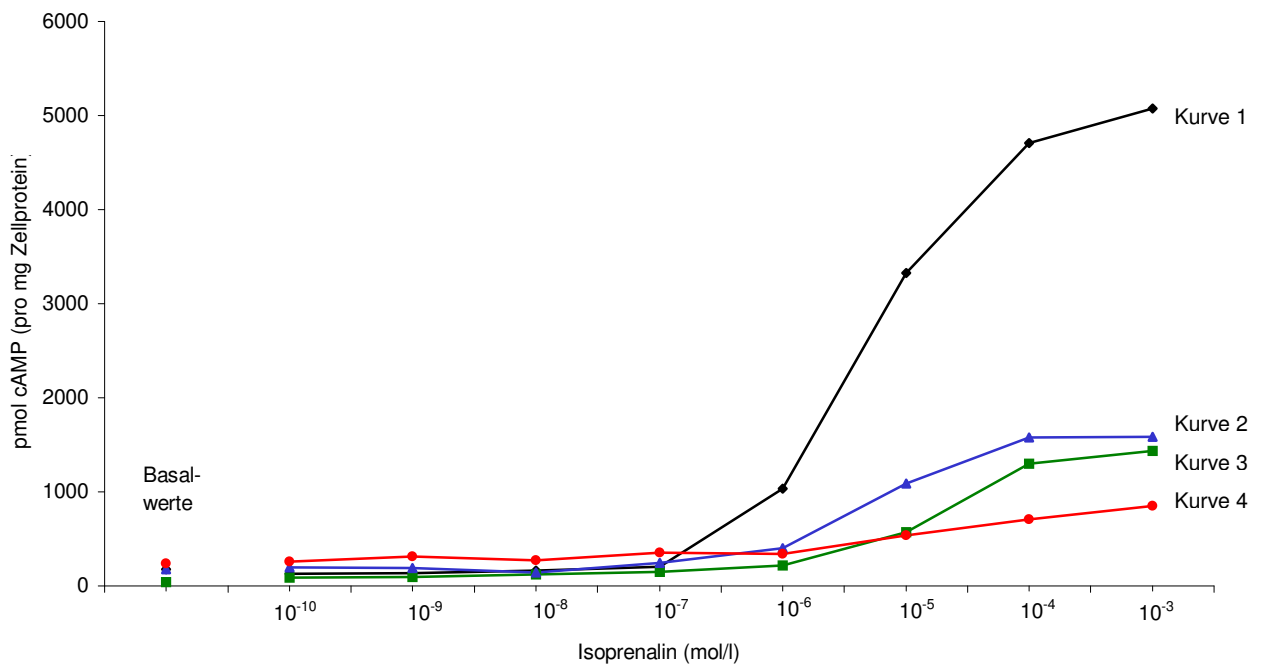


Abbildung 3.7: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der cAMP-Produktion von
 -Kurve 1-: HaCaT-Keratinozyten
 -Kurve 2-: Keratinozyten aus Primärkulturen von gesunder, menschlicher Vorhaut
 -Kurve 3-: Keratinozyten aus Primärkulturen von psoriatischer, nicht-läsionaler Haut
 -Kurve 4-: Keratinozyten aus Primärkulturen von psoriatischer, läsionaler Haut

In Abbildung 3.7 sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HaCaT-Keratinozyten (Kurve 1), von Keratinozyten aus Primärkulturen von gesunder, menschlicher Vorhaut (Kurve 2) und von Keratinozyten aus Primärkulturen von menschlicher, psoriatischer, nicht-läsionaler (Kurve 3) und läsionaler (Kurve 4) Haut gemeinsam dargestellt (vergleiche Abbildung 3.1, 3.3 und 3.5).

Dabei markiert die Abszisse wieder die Konzentration von ($\pm$)-Isoprenalin mit der stimuliert wurde und die Ordinate die jeweilige intrazellulär gemessene cAMP-Konzentration der Keratinozyten in pmol/mg Zellprotein.

Alle Datenpunkte stellen Mittelwerte dar, die Basalwerte wurden ohne Inkubation mit Isoprenalin gemessen.

Bei der gemeinsamen Darstellung der Kurven für die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der HaCaT-Keratinozyten, der Keratinozyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Vorhaut sowie der Keratinozyten aus Primärkulturen von nicht-läsionaler und läsionaler, psoriatischer Haut zeigt sich deutlich der gleichsinnige Verlauf aller Kurven. Im Bereich niedriger Konzentrationen von ($\pm$)-Isoprenalin (10^{-10} bis 10^{-7} mol/l) sieht man den flachen Verlauf der Kurve, die gemessenen Werte entsprechen den basalen cAMP-Werten, die ohne Stimulation von ($\pm$)-Isoprenalin ermittelt wurden.

Bei einer ($\pm$)-Isoprenalin-Konzentration von 10^{-6} mol/l zeigen die Kurven dann einen Anstieg, welcher ab der Konzentration von 10^{-4} mol/l in einem Plateau endet.

Allerdings zeigt sich durch die Abweichung der erreichten Maximalwerte bei der cAMP-Produktion deutlich, die sehr unterschiedliche Stimulierbarkeit der einzelnen Zellarten.

4 DISKUSSION

Keratinocyten stellen die quantitativ vorherrschende Zellart in der Epidermis dar (Zelickson und Mottaz 1968, Matoltsy 1986). An ihrer Oberfläche sind bisher 4 unterschiedliche Membranrezeptoren bekannt, die über ein stimulatorisches G-Protein an die Adenylzyklase koppeln. Dazu gehören Rezeptoren für Katecholamine (β -Adrenorezeptoren) (Yoshikawa et al. 1975a, Duell 1980a, Orenberg et al. 1983), Histamin (H_2 -Rezeptoren) (Iizuka et al. 1976a, Aoyagi et al. 1981), Adenosin (A_2 -Rezeptoren) (Iizuka et al. 1976b, Duell 1980b) und Prostaglandine (PGE_1 - und PGE_2 -Rezeptoren) (Adachi et al. 1975, Lord und Ziboh 1979).

Das in die Plasmamembran integrierte Enzym Adenylzyklase katalysiert die Umwandlung von ATP zu cAMP. In der menschlichen Haut bewirkt die Stimulation des β -Adrenorezeptors die höchste Ansprechrate des Adenylzyklase-cAMP-Systems (Iizuka et al. 1978a, 1990). β -Adrenorezeptoren konnten an vielen menschlichen Geweben, wie Lunge, Herz, Niere, Haut usw., nachgewiesen werden. Dabei kommen in der Haut mit einer sehr hohen Dichte, ca. 6.000-12.000 Rezeptoren pro Zelle, fast ausschließlich β_2 -Adrenorezeptoren vor (Gazith und Reichert 1982, 1987, Gazith et al. 1983, Steinkraus et al. 1991a, 1992a).

Welche Rolle das Adenylzyklase-cAMP-System in der menschlichen Epidermis spielt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Aber es wurde nachgewiesen, daß die Aktivierung des β -adrenergen-Systems einen sofortigen, vorübergehenden Anstieg des cAMP bewirkt (Orenberg et al. 1983, Cavey et al. 1984, 1986). Es wurde auch ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Kalziums durch β -adrenerge Stimulation gezeigt (Koizumi et al. 1991, Osawa et al. 1991, Yasui et al. 1992).

Da Kalzium verschiedene Zellfunktionen der Epidermis, wie Zellproliferation (Durham und Walton 1982, Boynton 1988, Yuspa et al. 1990) und Zelldifferenzierung (Boyce und Ham 1983, Hennings und Holbrook 1983, Pillai et al. 1990) steuert, läßt dies eine Beteiligung des β -Adrenorezeptors, über eine

Aktivierung des Adenylylzyklase-cAMP-Systems, an der Regulation von Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten vermuten.

Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem HaCaT-Keratinozyten verwendet. Dabei handelt es sich um eine permanente, nicht-tumorigene, menschliche Keratinozytenlinie, welche mit der Expression von Differenzierungsmarkern wie Involucrin, Filaggrin, Keratin 1 und Keratin 10, die Fähigkeit zur vollständigen Differenzierung besitzt (Fusenig 1986) und trotzdem ein uneingeschränktes Wachstumspotential zeigt (Boukamp et al. 1988). Bei Transplantation auf die nackte Maus bilden HaCaT-Keratinozyten ein normal geschichtetes Epithel aus.

Durch Radioliganden-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß HaCaT-Keratinozyten genauso wie humane epidermale Keratinozyten eine sehr hohe Dichte an β_2 -Adrenozeptoren aufweisen (Steinkraus et al. 1991a). Bei den HaCaT-Keratinozyten handelt es sich um ein geeignetes in vitro-Modell zur Untersuchung des β -adrenergen Adenylylzyklase-cAMP-Systems, da es sich, im Gegensatz zu Keratinozyten aus Primärkulturen menschlicher Haut, um eine homogene Zelllinie handelt, die nicht mit anderen Zellen der Epidermis (Merkelzellen, Melanozyten, Langerhanszellen) bzw. der Dermis, wie z.B. Fibroblasten, die selbst β -Adrenozeptoren exprimieren können (Honegger et al. 1986, Eedy et al. 1990), kontaminiert ist.

Außerdem können HaCaT-Keratinozyten ohne Zusatz von Glukokortikoiden, welche die Dichte und Stimulierbarkeit von β -Adrenozeptoren erhöhen können (Fraser und Venter 1980, Iizuka et al. 1980, Iizuka und Ohkawara 1983, Ohkawara und Iizuka 1985, Kajita et al. 1986, Takahashi und Iizuka 1991, Steinkraus et al. 1996), angezüchtet werden.

Allerdings beinhaltet eine permanente Zellkulturlinie wie die HaCaT-Keratinozyten die Gefahr einer Selektion schneller wachsender Subpopulationen, während langsamer wachsende Zellen mit mehr Differenzierungspotential verloren gehen (Steinkraus et al. 1991a). Dies schränkt die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit auf die hier untersuchten Passagen 44-60 ein, und die Anwendung der Daten auf andere Subpopulationen muß zurückhaltend erfolgen.

Bei den Versuchen wurde ($\pm$)-Isoprenalin als Ligand an den β_2 -Adrenozeptoren und damit zur Aktivierung des Adenylylzyklase-cAMP-Systems verwendet. Isoprenalin ist ein sehr potenter β_2 -Rezeptor-Agonist, wobei die Potenzrangfolge für Katecholamine an β_2 -Adrenozeptoren folgendermaßen lautet: Isoprenalin>Adrenalin>Noradrenalin (Lands et al. 1967a, 1967b, Lefkowitz und Hoffman 1980, Minneman et al. 1981, Motulsky und Insel 1982).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, daß die HaCaT-Keratinocyten eine durch Isoprenalin stimulierbare Adenylylzyklase besitzen. Es zeigt sich nach der Inkubation mit ($\pm$)-Isoprenalin eine zeitabhängige Zunahme der von den Keratinocyten gebildeten intrazellulären cAMP-Konzentration. Nach einiger Zeit mündet diese Zunahme in einer Plateauphase. Wahrscheinlich stellt sich dann ein Gleichgewicht zwischen der Produktion von cAMP und dem cAMP-Abbau durch die zelleigene Phosphodiesterase ein.

Außerdem findet sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Bei einer Isoprenalin-Konzentration von 10^{-3} mol/l erreicht diese ein Maximum. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen, die ebenfalls in vitro die Stimulierbarkeit der Adenylylzyklase an Keratinocyten mit β -adrenergen Agonisten nachgewiesen haben (Powell et al. 1971, Voorhees et al. 1974, Cavey et al. 1986).

Zum Vergleich wurde auch die konzentrationsabhängige Stimulierbarkeit der Adenylylzyklase durch ($\pm$)-Isoprenalin an Keratinocyten aus Primärkulturen von klinisch gesunder, menschlicher Haut untersucht.

Dabei fanden sich zu den HaCaT-Keratinocyten qualitativ sehr ähnliche Ergebnisse. Allerdings zeigten sich quantitativ deutlich erniedrigte intrazelluläre cAMP-Spiegel. Bei den HaCaT-Keratinocyten wurden ungefähr dreimal höhere Maximalwerte erreicht. Dies spricht zwar für eine ähnliche Affinität der Rezeptoren für Isoprenalin, aber auch für eine mögliche effektivere Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein bzw. zwischen G-Protein und Adenylylzyklase bei den HaCaT-Keratinocyten.

Da es sich bei HaCaT-Keratinocyten um eine immortalisierte Zelllinie mit uneingeschränkter Teilungsfähigkeit handelt, ist möglicherweise auch eine

erhöhte Dichte an β_2 -Adrenozeptoren, wie sie bei Keratinozyten, die sich in der Phase der Proliferation und Differenzierung befinden (Schallreuter 1997), nachgewiesen wurde, die Ursache für die deutlich höheren cAMP-Werte im Vergleich zu Keratinozyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Haut.

Desweiteren wurde die konzentrationsabhängige Stimulierung des β -adrenergen Adenylzyklase-cAMP-Systems mit ($\pm$)-Isoprenalin ebenfalls an Keratinozyten aus Primärkulturen von befallener psoriatischer und nicht-befallener psoriatischer, menschlicher Haut untersucht.

Dabei zeigten sich im wesentlichen die gleichen Verläufe beim konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulären cAMP wie bei den HaCaT-Keratinozyten und den Keratinozyten aus Primärkulturen von klinisch gesunder Haut. Allerdings fällt bei den Ergebnissen auf, daß bei den Versuchen mit Zellen aus nicht-befallener psoriatischer Haut ähnliche hohe Maximalwerte erreicht werden, wie bei den Keratinozyten aus klinisch gesunder Haut.

Im Gegensatz dazu zeigen sich bei den Keratinozyten aus befallener psoriatischer Haut deutlich erniedrigte cAMP-Spiegel. Der Maximalwert beträgt hier mit 850 pmol cAMP pro mg Protein nur ungefähr ein Sechstel des Maximalwertes von 5000 pmol cAMP bei den HaCaT-Keratinozyten und deutlich weniger als die höchsten Werte bei den Keratinozyten aus gesunder, sowie aus nicht-läsionaler psoriatischer Haut mit Werten von 1400 bzw. 1500 pmol cAMP pro mg Zellprotein.

Dies korreliert gut mit der früher schon beschriebenen niedrigeren Stimulierbarkeit der Keratinozyten in psoriatischer Haut (Hsia et al. 1972, Wright et al. 1973, Halprin et al. 1975, Mahrle und Orfanos 1975a, 1975b, Mui et al. 1975, Yoshikawa et al. 1975b, 1980, Gommans et al. 1979, Iizuka et al. 1981).

Überlegungen, über die pathogenetischen Ursachen dieser erniedrigten Stimulierbarkeit führten zu verschiedenen Untersuchungen.

Arbeiten über die Höhe des cAMP-Gehalts in psoriatischer Epidermis, denen die Überlegung, daß ein Defekt in der β -adrenergen G-Protein-

Adenylylzyklase-cAMP-Kaskade an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sein könnte, zugrunde liegt, zeigten bisher kontroverse Ergebnisse.

Es wurden über niedrigere (Voorhees et al. 1972b, Gommans et al. 1979, Wadskov et al. 1979), unveränderte (Yoshikawa et al. 1975d, Marcelo et al. 1979, Adachi et al. 1980) und erhöhte cAMP-Werte (Härkönen et al. 1974) im Vergleich zur nicht-befallenen und zur klinisch gesunden Haut berichtet.

Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf Effekten durch unterschiedlich lange Ischämiezeiten bei der Hautentnahme, da der cAMP-Gehalt in der Epidermis bereits kurz nach der Biopsieentnahme deutlich ansteigt (Yoshikawa et al. 1975c, Iizuka et al. 1979, Iizuka und Ohkawara 1986). Bei der sofortigen Ausschaltung des Ischämieeffektes nach der Hautentnahme durch sofortiges Aufnehmen der Biopsie in flüssigem Stickstoff zeigten sich unverändert hohe cAMP-Werte in der psoriatischen Epidermis (Marcelo et al. 1979).

Alle Untersucher sind sich aber über eine erniedrigte β -adrenerge Stimulierbarkeit von läsionaler, psoriatischer Haut einig (Hsia et al. 1972, Wright et al. 1973, Halprin et al. 1975, Mahrle und Orfanos 1975a, 1975b, Mui et al. 1975, Yoshikawa et al. 1975b, 1980, Gommans et al. 1979, Iizuka et al. 1981).

Theoretisch können die Unterschiede der cAMP-Spiegel auch durch unterschiedliche Aktivitäten der Phosphodiesterase erklärt werden. Allerdings konnte eine unveränderte Aktivität der Phosphodiesterase in befallener psoriatischer Haut nachgewiesen werden (Iizuka et al. 1978b).

Bei der Interpretation der Meßergebnisse von den Versuchen mit Keratinozyten aus Primärkulturen ist außerdem zu beachten, daß eine Kontamination mit Zellen aus der Dermis, wie zum Beispiel Fibroblasten, nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Allerdings wird durch die Präparationsmethode der Membranen eine erhebliche Anreicherung epidermaler Strukturen gewährleistet. Da die Keratinozyten dabei etwa 90-95% der epidermalen Zellen ausmachen (Zelickson und Mottaz 1968, Matoltsy 1986, Holbrook und Wolff 1987), ist der mögliche Anteil an anderen epidermalen Zellen, wie Merkelzellen, Melanozyten und Langerhanszellen

sehr gering. Von diesen ist bisher nicht bekannt, ob sie ebenfalls β -Adrenozeptoren exprimieren.

Desweiteren zeigten Untersuchungen, daß keine Unterschiede in der Bindungsaffinität der β -Adrenozeptoren für befallene und nicht-befallene psoriatische Haut bestehen, und der Affinität der Rezeptoren in gesunder Haut entsprechen (Steinfath et al. 1991, Steinkraus et al. 1993).

Allerdings fand man eine deutlich erniedrigte Dichte der β -Adrenozeptoren in befallener im Vergleich zu unbefallener psoriatischer Epidermis und klinisch gesunde Haut zeigte eine höhere Rezeptorendichte als in psoriatischer befallener und unbefallener Epidermis (Steinkraus et al 1993). Dieser Befund ist sehr wahrscheinlich pathogenetisch bedeutend für die reduzierte β -adrenerge Stimulierbarkeit der psoriatischen Haut.

Die Bedeutung der β -Adrenozeptoren an Keratinozyten

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die Bedeutung des Adenylzyklase-cAMP-Systems in der menschlichen Epidermis noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte durch die Aktivierung des β -adrenergen-Systems ein sofortiger, vorübergehender Anstieg des intrazellulären cAMP nachgewiesen werden (Orenberg et al. 1983, Cavey et al. 1984, 1986). Außerdem zeigte sich ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Kalziums durch β -adrenerge Stimulation (Koizumi et al. 1991, Osawa et al. 1991, Yasui et al. 1992).

Durch Kalzium werden verschiedene Zellfunktionen der Epidermis, wie Zellproliferation (Hennings et al. 1980, Durham und Walton 1982, Boynton 1988, Yuspa et al. 1990), Zelldifferenzierung (Hennings et al. 1980, Boyce und Ham 1983, Hennings und Holbrook 1983, Pillai et al. 1990), Formation von Desmosomen (Watt et al. 1984, Jones und Goldman 1985, O'Keefe et al. 1987, Duden und Franke 1988) und Veränderungen des Zytoskeletts (Magee et al. 1987, Inohara et al. 1990) gesteuert.

Daraus läßt sich über eine Aktivierung des β -Adrenozeptors eine Beteiligung des Adenylzyklase-cAMP-Systems an der Regulierung von Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten ableiten.

Verschiedene Untersuchungen zu diesen Einflüssen ergaben, daß die Zellteilung in der Epidermis möglicherweise durch Adrenalin gehemmt wird (Bullough und Laurence 1964), und daß das Zellwachstum durch einen Anstieg des intrazellulären cAMP inhibiert werden kann (Ryan und Heidrick 1968, Powell et al. 1971, Marks und Rebien 1972a, Voorhees et al. 1971a, 1971b, 1972a).

Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß durch Stimulation der Adenylylzyklase und die dadurch resultierende vermehrte Bildung von intrazellulärem cAMP, die Spiegel von zelleigenen Markern der Differenzierung, wie Keratin 1, Keratin 10, Involucrin und Transglutaminase erhöht wurden. Die gleiche Studie ergab, daß durch eine Blockade der cAMP-abhängigen Proteinkinase die Bildung dieser Differenzierungsmarker supprimiert wurde (Mammone et al. 1998).

Desweiteren konnte nachgewiesen werden, daß die Dichte von β_2 -Adrenozeptoren an Keratinozyten, die sich in der Phase der Proliferation und Differenzierung befinden, höher ist, als bei ausdifferenzierten Keratinozyten (Schallreuter 1997).

Das alles spricht für eine maßgebliche Beteiligung des β -adrenergen-Adenylylzyklase-cAMP-Systems an Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten.

Dies läßt die Vermutung zu, daß möglicherweise Hauterkrankungen mit gestörter Proliferation der Keratinozyten, wie zum Beispiel die Psoriasis, durch eine Fehlregulation des intrazellulären cAMP-Gehalts und somit durch einen Defekt im Adenylylzyklase-cAMP-System verursacht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen geringeren intrazellulären Anstiege des cAMP-Spiegels nach Stimulation des keratinozytären β -Adrenozeptors in psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut verursachen möglicherweise eine gestörte Hemmungskontrolle des epidermalen Zellwachstums (Ryan und Heidrick 1968, Heidrick und Ryan 1971, Voorhees und Duell 1971a, Marks und Rebien 1972b, Otten et al. 1972) und somit eine überschießende Zellproliferation mit ungenügender Differenzierung.

Ein weiterer Hinweis darauf sind zahlreiche Berichte darüber, daß es bei der systemischen Einnahme von β -Adrenozeptorantagonisten aufgrund einer kardiovaskulären Indikation zur Exazerbation einer vorbestehenden Psoriasis oder zur Erstmanifestation dieser kam (Felix et al. 1974, Bridgen und Almeyda 1976, Day 1975, van Joost und Sillevis Smitt 1981, Neumann und van Joost 1981, Søndergaard et al. 1976, Arntzen et al. 1984, Gawkrödger und Beveridge 1984, Hu et al. 1985, White et al. 1986, Gold et al. 1988, Heng und Heng 1988, Steinkraus et al. 1991c, 1992b).

Daraus läßt sich die Vermutung ableiten, daß bei einer systemischen Anwendung von β -Adrenorezeptorantagonisten auch die keratinozytären β -Adrenozeptoren in ihrer Funktion blockiert werden. Es folgt ein erniedrigter intrazellulärer cAMP-Gehalt und somit eine verminderte Hemmung der epidermalen Proliferation, was dem klinischen Erscheinungsbild einer Psoriasis vulgaris entspricht.

Dieser Zusammenhang wurde durch einige Provokationstests erhärtet, bei denen es nach Absetzen des verabreichten β -Adrenozeptorantagonisten zu einem Verschwinden des Krankheitsbildes kam. Nach erneuter Medikamenteneinnahme kam es dann innerhalb kurzer Zeit zum Wiederauftreten der Läsionen (Jensen et al. 1976, Palatsi 1976, Søndergaard et al. 1976, van Joost und Sillevis Smitt 1981, Neumann und van Joost 1981, Dörfler 1982, White et al. 1986).

Deshalb ist sehr wahrscheinlich, daß systemisch verabreichte β -Adrenozeptorantagonisten sowohl kardiovaskuläre als auch keratinozytäre β -Adrenozeptoren blockieren und so das klinische Erscheinungsbild einer Psoriasis vulgaris auslösen können.

Alle diese Befunde erhärten die Vermutung, daß es durch die Stimulierung der β -Adrenozeptoren der Keratinozyten zu einer Aktivierung des Adenylylzyklase-cAMP-Systems mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP kommt. Nachfolgend wird ein Anstieg des intrazellulären Kalziums ausgelöst, welcher über Kalzium-abhängige Mechanismen wichtige Zellfunktionen steuert, wie die

Hemmung der Zellproliferation und die Förderung der Zellausdifferenzierung von Keratinozyten in der Epidermis.

Auf der anderen Seite kommt es bei Störungen im β -adrenergen-Regelkreis, zum Beispiel durch Rezeptordefekte und nachfolgend erniedrigte Rezeptorendichte oder durch eine Blockade der Rezeptoren, zu einem erniedrigten intrazellulären Kalziumspiegel. Dies hat eine Förderung der Zellproliferation und eine fehlende Ausdifferenzierung der Keratinozyten zur Folge.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die effektive Kopplung der keratinozytären β -Adrenozeptoren an das Adenylylzyklase-cAMP-System von HaCaT-Keratinozyten, Keratinozyten von Primärkulturen aus gesunder menschlicher Haut, aus nichtbefallener psoriatischer sowie befallener psoriatischer Haut.

Allerdings zeigte sich vor allem bei den Keratinozyten aus befallener psoriatischer Haut eine deutlich verminderte β -adrenerge Stimulierbarkeit des Adenylylzyklase-cAMP-Systems. Dies spricht für eine mögliche Beteiligung dieser Regulationsmechanismen bei der Entstehung von hyperproliferativen Hauterkrankungen wie der Psoriasis.

Diese Erkenntnis eröffnet eine Perspektive für weitere Untersuchungen über die mögliche pharmakologische Beeinflussung von Zellfunktionen durch Stimulation oder Blockade des β -adrenergen Systems und die Entwicklung von Therapeutika, welche die Zellproliferation und –differenzierung zu steuern vermögen.

Da diese Funktionen bei einer Vielzahl von Hautkrankheiten gestört sind, ergibt sich daraus ein großer möglicher Einsatzbereich in der dermatologischen Therapie.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Für diese Arbeit wurden HaCaT-Keratinocyten, Keratinocyten aus Primärkulturen gesunder, menschlicher Vorhaut, sowie Keratinocyten aus nichtbefallener, psoriatischer und befallener, psoriatischer Haut gewonnen und kultiviert.

Die Zellen wurden jeweils 5 min mit verschiedenen Konzentrationen des β -Adrenozeptoragonisten ($\pm$)-Isoprenalin inkubiert und anschließend der Gehalt an intrazellulärem cAMP gemessen.

Auf diese Weise konnten die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion von Keratinocyten unterschiedlicher Herkunft miteinander verglichen werden.

Dabei ergaben sich bei den HaCaT-Keratinocyten Werte von bis zu 5000 pmol cAMP/mg Protein. Die maximal gemessenen Konzentrationen bei den Keratinocyten aus gesunder, menschlicher Haut erreichten mit ca. 1400 pmol cAMP/mg Protein nur ein Drittel dieser Werte und entsprachen in etwa der maximal erreichten cAMP-Konzentration bei den Keratinocyten aus unbefallener, psoriatischer Haut. Dagegen wurden bei den Keratinocyten aus befallener, psoriatischer Haut deutlich niedrigere Werte mit einer Höchstkonzentration von 850 pmol cAMP/mg Protein gemessen.

Dies spricht für eine erniedrigte Stimulierbarkeit des β -adrenergen Adenylzyklase-cAMP-Systems in psoriatischer Haut.

Da frühere Untersuchungen zeigten, daß über dieses System der intrazelluläre Kalziumgehalt reguliert wird, und Kalzium für die Steuerung wichtiger Zellfunktionen, wie Proliferation und Differenzierung verantwortlich ist, könnte in dem gestörten β -adrenergen Adenylzyklase-cAMP-Kopplungssystem eine Ursache für hyperproliferative Hauterkrankungen, wie die Psoriasis vulgaris, liegen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abel EA, DiCicco LM, Orenberg EK, Fraki JE, Farber EM (1986) Drugs in exacerbation of psoriasis. **J Am Acad Dermatol** 15: 1007-1022
- Adachi K, Yoshikawa K, Halprin KM, Levine V (1975) Prostaglandins and cyclic AMP in epidermis. **Br J Dermatol** 92: 381-388
- Adachi K, Iizuka H, Halprin KM, Levine V (1980) Epidermal cyclic AMP is not decreased in psoriasis lesions. **J Invest Dermatol** 74: 74-76
- Aoyagi T, Adachi K, Halprin KM, Levine V, Woodyard CW (1981) The effect of histamine on epidermal outgrowth: Its possible dual role as an inhibitor and stimulator. **J Invest Dermatol** 76: 24-27
- Arntzen N, Kavli G, Volden G (1984) Psoriasis provoked by beta-blocking agents. **Acta Derm Venereol (Stockh)** 64: 346-348
- Birnbaumer L, Pohl SL, Rodbell M, Sundby F (1972) The glucagon-sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. VII. Hormonal stimulation: reversibility and dependence on concentration of free hormone. **J Biol Chem** 247: 2038-2043
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol** 106: 761-771
- Bourne HR, Masters SB, Sullivan KA (1987) Mammalian G Proteins: structure and function. **Biochem Soc Trans** 15: 35-38

- Boyce ST, Ham RG (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. **J Invest Dermatol** 81 (suppl. 1): 33s-40s
- Boynton AL (1988) Calcium and epithelial cell proliferation. **Miner Electrolyte Metab** 14: 86-94
- Brigden WD, Almeyda J (1976) Adverse reaction to the beta-adrenergic blocking drugs. **Br J Dermatol** 95: 335-338
- Brønstad GO, Elgjo K, Øye I (1971) Adrenaline increases cyclic 3',5'-AMP-formation in hamster epidermis. **Nature New Biol** 233: 78-79
- Bullough WS, Laurence EB (1964) Mitotic control by internal secretion: The role of the chalone-adrenalin complex. **Exp Cell Res** 33: 176-194
- Cavey MT, Gazith J, Cavey D, Shroot B, Reichert U (1984) Receptor mediated stimulation of adenylate cyclase in cultured human epidermal keratinocytes (abstract). **J Invest Dermatol** 82: 564
- Cavey MT, Cavey D, Shroot B, Reichert U, Gazith J (1986) Receptor-linked adenylate cyclase in the membranes of cultured human epidermal keratinocytes. **Arch Dermatol Res** 278: 293-297
- Day JL (1975) The metabolic consequences of adrenergic blockade: A review. **Metabolism** 24: 987-996
- Dörfler W (1982) Psoriasis provoziert durch Pindolol-Medikation. **Z Hautkr** 57: 1520-1521
- Duden R, Franke WW (1988) Organization of desmosomal plaque proteins in cells growing at low calcium concentrations. **J Cell Biol** 107: 1049-1063

- Duell EA, Voorhees JJ, Kelsey WH, Hayes E (1971) Isoproterenol-sensitive adenylyl cyclase in a particulate fraction of epidermis. **Arch Dermatol** 104: 601-610
- Duell EA (1980a) Identification of a β_2 -adrenergic receptor in mammalian epidermis. **Biochem Pharmacol** 29: 97-101
- Duell EA (1980b) Adenosine-induced alterations in the adenosine 3':5' - monophosphate levels in mammalian epidermis. **Mol Pharmacol** 18: 49-52
- Durham AC, Walton JM (1982) Calcium ions and the control of proliferation in normal and cancer cells. **Biosci Rep** 2: 15-30
- Eedy DJ, Canavan JP, Shaw C, Trimble ER (1990) Beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP is defective in cultured dermal fibroblasts of psoriatic subjects. **Br J Dermatol** 122: 477-483
- Felix RH, Ivey FA, Dahl MG (1974) Cutaneous and ocular reactions to practolol. **Br Med J** 4: 321-324
- Fraser CM, Venter JC (1980) The synthesis of beta-adrenergic receptors in cultured human lung cells: induction by glucocorticoids. **Biochem Biophys Res Commun** 94: 390-397
- Fusenig NE (1986) Mammalian epidermal cells in culture. In: **Biology of the integument**, Vol. 2. Vertebrates. Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A. G., Richards, K. S. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 409-442
- Gawkrodger DJ, Beveridge GW (1984) Psoriasiform reaction to atenolol. **Clin Exp Dermatol** 9: 92-94

- Gazith J, Reichert U (1982) High affinity membrane receptors in cultured human keratinocytes. I. The β -adrenergic receptors. **Br J Dermatol** 107 (suppl. 23): 125-133
- Gazith J, Cavey MT, Cavey D, Braham S, Reichert U (1983) Characterization of beta-adrenergic receptors of cultured human epidermal keratinocytes. **Biochem Pharmacol** 32: 3397-3403
- Gazith J, Reichert U (1987) Adrenergic receptors in the skin. In: **Dermatology in general medicine**, Vol. I. Fitzpatrick, T. B.; Eisen, A. Z.; Wolff, K.; Freedberg, I. M.; Austen, K. F. (eds.). McGraw-Hill, New York, pp. 375-380
- Gilman AG (1984) G-Proteins and dual control of adenylate cyclase. **Cell** 36: 577-579
- Gilman AG (1986) receptor-regulated proteins. **TINS**: 460-463
- Gold MH, Holy AK, Roenigk HH Jr (1988) Beta-blocking drugs and psoriasis. A review of cutaneous side effects and retrospective analysis of their effects on psoriasis. **J Am Acad Dermatol** 19: 837-841
- Gommans JM, Bergers M, van Erp PE, van den Hurk JJ, van de Kerkhof P, Mier PD, Roelfzema H (1979) Studies on the plasma membrane of normal and psoriatic keratinocytes. 2. Cyclic AMP and its response to hormonal stimulation. **Br J Dermatol** 101: 413-419
- Härkönen M, Hopsu-Havu VK, Raij K (1974) Cyclic adenosine monophosphate, adenylyl cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase in psoriatic epidermis, with a comment on urinary cAMP. **Acta Derm Venereol (Stockh)** 54: 13-18

- Halprin KM, Adachi K, Yoshikawa K, Levine V, Mui MM, Hsia SL (1975) Cyclic AMP and psoriasis. **J Invest Dermatol** 65: 170-178
- Heidrick ML, Ryan WL (1971) Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and contact inhibition. **Cancer Res** 31: 1313-1315
- Heng MC, Heng MK (1988) Beta-adrenoceptor antagonist-induced psoriasiform eruption. Clinical and pathogenetic aspects. **Int J Dermatol** 27: 619-627
- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. **Cell** 19: 245-254
- Hennings H, Holbrook KA, (1983) Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. **Exp Cell Res** 143: 127-142
- Holbrook KA, Wolff K (1987) The structure and development of skin. In: **Dermatology in general medicine**, 3rd ed., Vol. I. Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds.). McGraw-Hill, New York, pp 93-131
- Honegger UE, Disler B, Wiesmann UN (1986) Chronic exposure of human cells in culture to the tricyclic antidepressant desipramine reduces the number of beta-adrenoceptors. **Biochem Pharmacol** 35: 1899-1902
- Hsia SL, Wright R, Mandy SH, Halprin KM (1972) Adenyl cyclase in normal and psoriatic skin. **J Invest Dermatol** 59: 109-113
- Hu CH, Miller CM, Peppercorn R, Farber EM (1985) Generalized pustular psoriasis provoked by propranolol. **Arch Dermatol** 121: 1326-1327

- lizuka H, Adachi H, Halprin KM, Levine V (1976 a) Histamine (H₂) receptor-adenylate cyclase system in pig skin (epidermis). ***Biochim Biophys Acta*** 437: 150-157
- lizuka H, Adachi H, Halprin KM, Levine V (1976 b) Adenosine and adenine nucleotides stimulation of skin (epidermal) adenylylase cyclase. ***Biochim Biophys Acta*** 444: 685-693
- lizuka H, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1978 a) Epinephrine activation of pig skin adenylylase cyclase in vivo and subsequent refractoriness to activation. ***J Invest Dermatol*** 70: 119-122
- lizuka H, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1978 b) Cyclic nucleotide-phosphodiesterase in the uninvolved and involved skin of psoriasis. ***J Invest Dermatol*** 70: 246-249
- lizuka H, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1979) Cyclic GMP system in epidermis: I. Effect of ischemia. ***J Invest Dermatol*** 73: 220-223
- lizuka H, Kamigaki K, Nemoto O, Aoyagi T, Miura Y (1980) Effects of hydrocortisone on the adrenaline-adenylate cyclase system of the skin. ***Br J Dermatol*** 102: 703-710
- lizuka H, Umeda K, Koizumi H, Aoyagi T, Miura Y (1981) Epinephrine-induced cyclic AMP accumulation in the psoriatic epidermis. ***Acta Derm Venereol (Stockh)*** 61: 391-395
- lizuka H, Ohkawara A (1983) Effects of glucocorticoids on the beta-adrenergic adenylylase cyclase system of pig skin. ***J Invest Dermatol*** 80: 524-528

- Iizuka H, Ohkawara A (1986) "Ischemic" rise of epidermal cyclic AMP is a beta-adrenergic adenylate cyclase-dependent process. **J Invest Dermatol** 86: 271-274
- Iizuka H, Sakai H, Kinouchi M (1990) Epidermal adenylate cyclase system is regulated by diacylglycerol-protein kinase C signal, but not by calcium signal. **Br J Dermatol** 122: 459-467
- Inohara S, Tatsumi Y, Cho H, Tanaka Y, Sagami S (1990) Actin filament and desmosome formation in cultured human keratinocytes. **Arch Dermatol Res** 282: 210-212
- Jensen HA, Mikkelsen HI, Wadskov S, Søndergaard J (1976) Cutaneous reactions to propranolol (Inderal®). **Acta Med Scand** 199: 363-367
- Jones JC, Goldman RD (1985) Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly. **J Cell Biol** 101: 506-517
- van Joost T, Sillevius Smitt JH (1981) Skin reactions to propranolol and cross sensitivity to beta-adrenoceptor blocking agents. **Arch Dermatol** 117: 600-601
- Kajita S, Iizuka H, Hirokawa M, Tsutsui M, Mizumoto T (1986) Topical application of potent glucocorticoids augments epidermal beta-adrenergic adenylate cyclase response *in vivo*. **Acta Derm Venereol (Stockh)** 66: 491-496
- Koizumi H, Yasui C, Fukaya T, Ohkawara A, Ueda T (1991) Beta-adrenergic stimulation induces intracellular Ca^{2+} increase in human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermatol** 96: 234-237

- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG jr (1967 a) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature** 214: 597-598
- Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ (1967 b) Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. **Life Sci** 6: 2241-2249
- Lefkowitz RJ, Hoffman BB (1980) Adrenergic receptors. **Adv Cyclic Nucleotide Res** 12: 37-47
- Lord JT, Ziboh VA (1979) Specific binding of prostaglandin E₂ to membrane preparations from human skin: receptor modulation by UVB-irradiation and chemical agents. **J Invest Dermatol** 73: 373-377
- Magee AL, Lytton NA, Watt FM (1987) Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. **Exp Cell Res** 172: 43-53
- Mahrle G, Orfanos CE (1975 a) β -adrenerge Stimulation membrangebundener Adenylcyclase in normaler Epidermis und mangelnde Stimulierbarkeit bei Psoriasis. **Arch Dermatol Res** 253: 195-202
- Mahrle G, Orfanos CE (1975 b) Ultrastructural localization and differentiation of membrane-bound ATP utilizing enzymes including adenyl cyclase in normal and psoriatic tissue. **Br J Dermatol** 93: 495-507
- Mammone T, Marenus K, Maes D, Lockshin RA (1998) The induction of terminal differentiation markers by the cAMP pathway in human HaCaT keratinocytes. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol** 11:152-60

- Marcelo CL, Duell EA, Stawiski MA, Anderson TF, Voorhees JJ (1979) Cyclic nucleotide levels in psoriatic and normal keratinized epidermis. **J Invest Dermatol** 72: 20-24
- Marks F, Reibien W (1972 a) The second messenger system of mouse epidermis. I. Properties and β -adrenergic activation of adenylate cyclase *in vitro*. **Biochim Biophys Acta** 284: 556-567
- Marks F, Reibien W (1972 b) Cyclic 3',5'-AMP and theophylline inhibit epidermal mitosis in G₂-phase. **Naturwissenschaften** 59: 41-42
- Matoltsy AG (1986) Structure and function of the mammalian epidermis. In: **Biology of the integument**, Vol. 2. Vertebrates. Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K. S. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 255-271
- Mier PD, Urselmann E (1970) The adenyl cyclase of skin. I. Measurement and properties. **Br J Dermatol** 83: 359-363
- Minneman KP, Pittman RN, Molinoff PB (1981) Beta-adrenergic receptor subtypes: properties, distribution and regulation. **Annu Rev Neurosci** 4: 419-461 (1981)
- Motulsky HJ, Insel PA (1982) Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation and clinical alterations. **N Engl J Med** 307: 18-29
- Mui MM, Hsia SL, Halprin KM (1975) Further studies on adenyl cyclase in psoriasis. **Br J Dermatol** 92: 255-262
- Neumann HA, van Joost T (1981) Adverse reactions of the skin to metoprolol and other beta-adrenoceptor-blocking agents. **Dermatologica** 162: 330-335

- Ohkawara A, Iizuka H (1985) Glucocorticoid-induced alteration of beta-adrenergic adenylate cyclase response of epidermis. ***Arch Dermatol Res*** 277: 88-92
- O'Keefe EJ, Briggaman RA, Herman B (1987) Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. ***J Cell Biol*** 105: 807-817
- Orenberg EK, Pfendt EA, Wilkinson DI (1983) Characterization of α - and β -adrenergic agonist stimulation of adenylate cyclase activity in human epidermal keratinocytes in vitro. ***J Invest Dermatol*** 80: 503-507
- Osawa Y, Koizumi H, Fukaya T, Yasui C, Ohkawara A, Ueda T (1991) Adenylate cyclase induces intracellular Ca^{2+} increase in single human epidermal keratinocytes of the epidermal sheet as measured by digital imaging microscopy using Fura 2-AM. ***Arch Dermatol Res*** 283: 91-95
- Otten J, Johnson GS, Pastan I (1972) Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. Effect of cell density and agents which alter cell growth on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in fibroblasts. ***J Biol Chem*** 247: 7082-7087
- Palatsi R (1976) A skin reaction to pindolol, a beta-blocking drug. ***Ann Clin Res*** 8: 239-240
- Pierce Chemical Company (1984) BCA protein assay reagent. ***Technical Bulletin 23225, Rockford, Illinois***
- Pillai S, Bikle DD, Mancianti M-L, Cline P, Hincenbergs M (1990) Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: Modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. ***J Cell Physiol*** 143: 294-302

- Powell JA, Duell EA, Voorhees JJ (1971) Beta adrenergic stimulation of endogenous epidermal cyclic AMP formation. **Arch Dermatol** 104: 359-365
- Redinbaugh MG, Turley RB (1986) Adaption of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. **Anal Biochem** 153: 267-271
- Rodbell M (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature** 284: 17-22
- Ryan WL, Heidrick ML (1968) Inhibition of cell growth *in vitro* by adenosine 3',5'-monophosphate **Science** 162: 1484-1485
- Schallreuter KU (1997) Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis. **J Invest Dermatol Symp Proc** 2: 37-40
- Søndergaard J, Wadskov S, Jensen HA, Mikkelsen HI (1976) Aggravation of psoriasis and occurrence of psoriasiform cutaneous eruptions induced by practolol (Eraldin®). **Acta Derm Venereol (Stockh)** 56: 239-243
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem** 150: 76-85
- Steinfath M, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Breil I, Hanrath P, Reupcke C, Sigmund M, Lo H-B (1991) Distinct down-regulation of cardiac β_1 - and β_2 -adrenoceptors in different human heart diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 343: 217-220

- Steinkraus V, Körner C, Steinfath M, Mensing H (1991 a) High density of beta₂-adrenoceptors in a human keratinocyte cell line with complete epidermal differentiation capacity (HaCaT). **Arch Dermatol Res** 283: 328-33
- Steinkraus V, Körner C, Achterberg V, Reymann A, Woermann C, Mensing H (1991 b) Beta-adrenergic receptors of intact human keratinocytes display functional coupling to the adenylate cyclase-cAMP system (abstract). **Arch Dermatol Res** 283: 36
- Steinkraus V, Steinfath M, Körner C, Mensing H (1991 c) Direct measurement of beta₂-adrenergic receptors in human epidermal tissue (abstract). **J Invest Dermatol** 96: 1024
- Steinkraus V, Steinfath M, Körner C, Mensing H (1992 a) Binding of beta-adrenergic receptors in human skin. **J Invest Dermatol** 98: 475-480
- Steinkraus V, Steinfath M, Stove L, Körner C, Abeck D, Mensing H (1992 b) Decreased beta-adrenergic binding in psoriatic involved skin (abstract). **Arch Dermatol Res** 284: 40
- Steinkraus V, Steinfath M, Stove L, Korner C, Abeck D, Mensing H (1993) Beta-adrenergic receptors in psoriasis. evidence for down-regulation in lesional skin. **Arch Dermatol Res** 285: 300-4
- Steinkraus V, Mak JC, Pichlmeier U, Mensing H, Ring J, Barnes PJ (1996) Autoradiographic mapping of beta-adrenoceptors in human skin. **Arch Dermatol Res** 288: 549-53
- Stryer L, Bourne HR (1986) G proteins: A family of signal transducers. **Annu Rev Cell Biol** 2: 391-419

Sutherland EW, Rall TW (1960) Relation of adenosine-3'-5'-phosphate and phosphorylase to the action of catecholamines and other hormones. ***Pharmacol Rev*** 12: 265-299

Takahashi H, Iizuka H (1991) Regulation of beta₂-adrenergic receptors in keratinocytes. glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA in foetal rat keratinizing epidermal cells (FRSK cells). ***Br J Dermatol*** 124: 341-347

Voorhees JJ, Duell EA, Kelsey WH, Hayes E (1971 a) Regulation of epidermal proliferation in vitro by epinephrine, adenyl cyclase and cyclic AMP (abstract). ***Fed Proc*** 30: 687

Voorhees JJ, Duell EA, Bass LJ, Kelsey WH (1971 b) Inhibition of epidermal cell division by isoproterenol, dibutyryl cyclic AMP and theophylline (abstract). ***Clin Res*** 19: 682

Voorhees JJ, Duell EA, Kelsey WH (1972 a) Dibutyryl cyclic AMP inhibition of epidermal cell division. ***Arch Dermatol*** 105: 384-386

Voorhees JJ, Duell EA, Lawrence JB, Powell JA, Harrel ER (1972 b) Decreased cyclic AMP in the epidermis of lesions of psoriasis. ***Arch Dermatol*** 105: 695-701

Voorhees JJ, Colburn NH, Stawiski M, Duell EA, Haddox M, Goldberg ND, (1974) Imbalanced cyclic AMP and cyclic GMP levels in the rapidly dividing, incompletely differentiated epidermis of psoriasis. In: ***The Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Regulation of Proliferation in Animal Cells*** Clarkson, B., Baserga, R. (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York

- Voorhees JJ, Mier PD (1974) The epidermis and cyclic AMP. **Br J Dermatol** 90: 223-227
- Voorhees JJ (1982) Commentary: Cyclic adenosine monophosphate regulation of normal and psoriatic epidermis. **Arch Dermatol** 118: 869-874
- Wadskov S, Kassis V, Søndergaard J (1979) Cyclic AMP and psoriasis once more. **Acta Derm Venereol (Stockh)** 59: 525-527
- Watt FM, Matthey DL, Garrod DR (1984) Calcium induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. **J Cell Biol** 99: 2211-2215
- White WB, Schulman P, McCabe EJ (1986) Psoriasiform cutaneous eruptions induced by cetamolol hydrochloride. **Arch Dermatol** 122: 857-858
- Wright RK, Mandy SH, Halprin KM, Hsia SL (1973) Defects and deficiency of adenyl cyclase in psoriatic skin. **Arch Dermatol** 107: 47-53
- Wuttke W (1987) Endokrinologie. In: **Physiologie des Menschen**. Schmidt, R. F.; Thews, G. (Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp. 390-420
- Yasui C, Koizumi H, Fukaya T, Kumakiri M, Ohkawara A, Ueda T (1992) Adenylate cyclase induces intracellular calcium increase in single human epidermal keratinocytes measured by fluorescence microscopy using Fura 2-AM. **Br J Dermatol** 127: 589-594
- Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1975 a) The effects of catecholamine and related compounds on the adenyl cyclase system in the epidermis. **Br J Dermatol** 93: 29-36

- Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1975 b) On the lack of response to catecholamine stimulation by the adenylyl cyclase system in psoriatic lesions. **Br J Dermatol** 92: 619-624
- Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1975 c) Cyclic AMP in skin: effects of acute ischaemia. **Br J Dermatol** 92: 249-254
- Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1975 d) Is the cyclic AMP in psoriatic epidermis low? **Br J Dermatol** 93: 253-258
- Yoshikawa K, Mori N, Hadame K, Sakakibara S (1980) Differences in response of psoriatic epidermis in cyclic AMP accumulation against certain adenylyl cyclase agonists. **Acta Derm Venereol (Stockh)** 60: 95-98
- Yuspa SH, Hennings H, Tucker RW, Jaken S, Kilkenney AE, Roop DR (1988) Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. In: Endocrine, metabolic and immunologic functions of keratinocytes. Vol. 548. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Milstone, L. M.; Edelson, R. L. (eds.) New York Academy of Sciences, New York, pp. 191-196
- Yuspa SH, Hennings H, Roop D, Strickland J, Greenhalgh DA (1990) The malignant conversion step of mouse skin carcinogenesis. **Environ Health Perspect** 88: 193-195
- Zelickson AS, Mottaz JH (1968) Epidermal dendritic cells: A quantitative study. **Arch Dermatol** 98: 652-659

DANKSAGUNG

Bei Herrn Professor Dr. Volker Steinkraus (ehemals kommissarischer ärztlicher und geschäftsführender Direktor der Universitäts-Hautklinik Hamburg-Eppendorf) möchte ich mich ganz besonders für die Ermöglichung dieser Arbeit und für seine freundliche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Dagmar Müller, bei der ich alle zellbiologischen Arbeiten erlernt habe, für die gute Zusammenarbeit und ihre wissenschaftliche Mitbetreuung.

Dem Paul Gerson Unna-Forschungszentrum der Fa. Beiersdorf und dort besonders Herrn Dr. Achterberg und Frau Geldmacher danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und meinem Mann Jochen Betz, die mich mit Geduld und ihrer persönlichen Betreuung unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Name: Susanne Betz, geb. Kleinbrahm

Geburtsdatum: 17. März 1972

Geburtsort: Pforzheim

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung 1978-1981 St. Jacobi Grundschule Osterode
 1981-1982 Lemberg Grundschule Nagold
 1982-1991 Otto-Hahn-Gymnasium Nagold

Schulabschluß: Abitur mit den Leistungskursen Mathematik und Chemie

Studium: Okt. 1991-Nov.1998
 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

01/1999-06/2000 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Anästhesie,
 Intensivmedizin und Schmerztherapie des Evangelischen
 Krankenhauses in Oldenburg

10/2000-06/2001 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie und
 Intensivmedizin des St. Josefs-Hospitals in Wiesbaden

seit 07/2001 Assistenzärztin im Institut für Anästhesiologie und
 operative Intensivmedizin des Zentralkrankenhauses
 Reinkenheide in Bremerhaven

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.