

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuropeptide und Lipide der Haut

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Isabelle Krause

aus Danzig/Polen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. C. Zouboulis
 2. Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann
 3. Prof. Dr. med. J. Reichrath

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhalt

1	Einleitung	9
1.1	Charakterisierung von CRH und den CRH-ähnlichen-Peptiden	13
1.1.1	CRH	13
1.1.2	Urocortin	13
1.1.3	Urotensin	14
1.1.4	Sauvagin	15
1.2	Die Familie der CRH-Rezeptoren	16
1.3	Arbeitshypothese und Fragestellung	18
1.3.1	Experimenteller Teil	18
1.3.2	Klinischer Teil	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Materialien und Reagenzien	21
2.1.2	Zellkulturmedien	22
2.1.3	Laboraausstattung	23
2.2	Methoden – Experimenteller Teil	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.1.1	Humane immortalisierte SZ95-Sebozyten	24
2.2.1.2	HaCaT-Zelllinie	24
2.2.1.3	Zellkultivierung	24
2.2.1.4	Subkultivierung von Zellen	25
2.2.1.5	Zellzahlbestimmung	26
2.2.1.6	Kryokonservierung von Zellen	26

2.2.1.7	Auftauen von Zellen	27
2.2.2	Zellbiologische Methoden	27
2.2.2.1	Messung der Zytotoxizität	27
2.2.2.2	Proliferationsanalyse	29
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.3.1	Messung der Zytokinfreisetzung	29
2.3	Probanden, Patienten und Methoden – Klinischer Teil	31
2.3.1	Probanden- und Patientenkollektiv	31
2.3.1.1	Charakterisierung des Probandenkollektivs	31
2.3.1.2	Charakterisierung der Aknepatienten	32
2.3.1.3	Charakterisierung der Patienten mit atopischer Dermatitis	32
2.3.1.4	Charakterisierung der Patienten mit Altersxerose	32
2.3.2	Durchführung der Messung der Hautoberflächenlipide	32
2.3.3	Durchführung der Lipidextraktion	33
2.3.4	Nachweis der Lipidfraktionen	33
2.3.5	Messung des CRH-Gehaltes in den Lipidextrakten	34
2.4	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Ergebnisse – Experimenteller Teil	36
3.1.1	Zytotoxizität	36
3.1.1.1	SZ95-Sebozyten	36
3.1.1.2	HaCaT-Keratinozyten	36
3.1.2	Proliferation	36
3.1.2.1	SZ95-Sebozyten	36
3.1.2.2	HaCaT-Keratinozyten	38
3.1.3	Versuch der Antagonisierung der proliferationshemmenden Effekte von CRH und Urocortin auf die SZ95-Sebozyten mit α -helicalem CRF	38

3.1.3.1	CRH	38
3.1.3.2	Urocortin	39
3.1.4	Zytokinfreisetzung	39
3.1.4.1	IL-1 α	39
3.1.4.1.1	SZ95-Sebozyten	39
3.1.4.1.2	HaCaT-Keratinocyten	39
3.1.4.2	IL-1 β	40
3.1.4.2.1	SZ95-Sebozyten	40
3.1.4.2.2	HaCaT-Keratinocyten	40
3.1.4.3	IL-6	40
3.1.4.3.1	SZ95-Sebozyten	40
3.1.4.3.2	HaCaT-Keratinocyten	41
3.1.4.4	IL-8	41
3.1.4.4.1	SZ95-Sebozyten	41
3.1.4.4.2	HaCaT-Keratinocyten	43
3.1.5	Versuch der Antagonisierung der IL-6 und IL-8 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten durch CRH mit α -helicalem CRF	43
3.1.5.1	IL-6	43
3.1.5.2	IL-8	44
3.2	Ergebnisse – Klinischer Teil	45
3.2.1	Messung der Hautoberflächenlipide	45
3.2.2	Nachweis der Lipidfraktionen in den beiden Lösungsmitteln	47
3.2.2.1	Aceton	47
3.2.2.2	n-Hexan	50
3.2.3	CRH Bestimmung im Patientensebum	52
4	Diskussion	53
4.1	Diskussion – Experimenteller Teil	53
4.1.1	Zytotoxizität	53

4.1.2	Proliferation	53
4.1.3	Zytokinfreisetzung	55
4.1.3.1	IL-1	55
4.1.3.2	IL-6	56
4.1.3.3	IL-8	57
4.2	Diskussion – Klinischer Teil	58
4.2.1	Probanden- und Patientendaten	58
4.2.2	Ergebnisse der Messung der Hautoberflächenlipide	58
4.2.3	Ergebnisse der Messung der Lipidfraktionen	59
4.2.4	CRH-Nachweis im Patienten- und Probandensebum	62
4.3	Ausblick	64
5	Zusammenfassung	65
	Abkürzungsverzeichnis	67
	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	78
	Lebenslauf	79
	Eidesstattliche Erklärung	82

1 Einleitung

Die Haut ist eines der größten menschlichen Organe und spielt als protektive Barriere zwischen der Umwelt und dem inneren Milieu des Menschen eine strategisch wichtige Rolle. Sie ist permanent multiplen physikalischen, chemischen und biologischen Noxen ausgesetzt, gegenüber denen sie eine effektive schützende Funktion aufrecht erhalten muss. Aufgrund dessen muss die Haut über einen zuverlässigen Verteidigungsmechanismus verfügen, der bereits aktiviert wird, wenn es zu einem lokalen Zell- oder Gewebeschaden gekommen ist, das heißt bevor die systemische Abwehr tätig werden muss (Slominski und Mihm 1996; Slominski et al. 2000). Diese lokalen Voraussetzungen werden durch die systemische Stressantwort nicht erfüllt.

Die primäre Antwort auf systemischen Stress ist die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Deren Aktivierung durch externe oder interne Stressoren wie z. B. starke akute Anforderungen bei körperlicher Arbeit, bei emotionalen und mentalen Belastungen sowie bei akuten Erkrankungen führt zur Produktion von Corticotropin-Freisetzendem-Hormon (CRH), ein Peptid das hauptsächlich in den Nuclei paraventriculares des Hypothalamus synthetisiert wird. Nach seiner Freisetzung in den hypophysären Portalkreislauf stimuliert es die kortikotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens zur Freisetzung von Proopiomelanocortin (POMC) aus dem durch posttranslationales Processing Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), α - und γ -Melanozyten-Stimulierendes-Hormon (MSH), β -Endorphin sowie weitere Teilpeptide entstehen. Durch die Ausschüttung von ACTH in die systemische Zirkulation wird die Synthese und die Sekretion von Glucokortikoiden in der Nebennierenrinde stimuliert (Klinke und Silbernagel 1996/2000; Chrousos und Gold 1992).

CRH und die strukturell ähnlichen Urocortin (UCT) I-III Peptide können als zentrale Koordinatoren von neuroendokrinen Antworten und Verhaltensmaßnahmen als Reaktion auf Stress angesehen werden. Des Weiteren wirken sie an peripheren Organen zusammen mit anderen Faktoren als Modulatoren der Immunantwort und vaskulärer Funktionen. Der generelle Wirkmechanismus dieser Peptide in Organismen von Säugetieren umfasst die Wechselwirkung mit den membran-

gebundenen Rezeptoren CRH-R1 und CRH-R2 sowie mit dem CRH-Binding Protein (CRH-BP) (Dautzenberg und Hauger 2000; Linton et al. 2001; Perrin und Vale 1999; Perrin et al. 1998).

Es wurde postuliert, dass die Haut über ein mit der HPA- Achse vergleichbares System verfügt, welches möglicherweise im Rahmen einer lokalen Stressreaktion der Haut aktiviert wird. Diese These basiert auf der bekannten Fähigkeit der Haut die POMC-Derivate ACTH und MSH zu bilden und lokale Melanocortin (MC)- und Opioid- Rezeptoren zu exprimieren, so dass sie gleichzeitig als Zielorgan für diese Hormone fungiert (Bigliardi et al. 1998; Bigliardi-Qi et al. 2004; Paus et al. 1999).

Die Wirkung von ACTH- und MSH- Peptiden auf die Haut als starke Stimulanzen der Pigmentbildung und möglicherweise auch als Suppressoren des kutanen Stresssystems ist seit langem bekannt (Lerner und McGuire 1961; Luger et al. 1998; Pawelek et al. 1992). Des Weiteren ist die Haut in der Lage CRH und Urocortin zusammen mit den zugehörigen Rezeptoren zu bilden (Ermak und Slominski 1997; Slominski et al. 1995). Dieses CRH/POMC- System könnte als kutanes Stresssystem fungieren, indem es als Koordinator zwischen internen und externen Stimuli wirkt und zu einer peripheren Stressantwort führt (Pisarchik et al. 2001; Slominski 1997; Slominski 1999).

CRH ist ein wichtiger Koordinator der neuroendokrinen Antwort auf Stress und ist möglicherweise auch von entscheidender Bedeutung für die kutane Stressantwort (Zhao et al. 1997; Zouboulis 2000).

In der menschlichen Haut werden CRH-R1 und CRH-BP von fast allen größeren Zellpopulationen in der Dermis, Epidermis und Subkutis exprimiert. Am häufigsten ist die Isoform des CRH-R1 Typ α vertreten, während CRH-R2 vor allem in Haarfollikeln, exokrinen Zellen, Blutgefäßen und Muskelzellen vorzufinden ist (Kono et al. 2001; Perrin und Vale 1999; Slominski et al. 2000; Slominski et al. 2004).

Experimente mit in situ reverse Transkriptase-PCR haben ergeben, dass CRH- und POMC-mRNA in Talgdrüsen exprimiert werden, was auf die Produktion von CRH und POMC in der

Haut hindeutet. Des Weiteren wurde die Expression von CRH-, CRH-BP- und CRH-R-mRNA und Protein in menschlichen Talgdrüsenzellen *in vitro* beschrieben. Der überwiegend vorkommende CRH-Rezeptortyp in Talgdrüsenzellen ist CRH-R1, wobei das Verhältnis zwischen CRH-R1 und CRH-R2 bei 2:1 liegt (Zouboulis et al. 2002).

Die Wirkung von CRH auf die Haut scheint von der Zielzelle auf die es einwirkt abhängig zu sein. Ein Effekt von CRH als lokaler Wachstumsfaktor und als Induktor von Zelldifferenzierung wurde bereits beschrieben (Slominski et al. 2000). *In vitro*-Studien mit menschlichen Talgdrüsenzellen haben gezeigt, dass CRH unmittelbar die Lipidsynthese stimuliert und die Expression von 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase, welche die Umwandlung von Dehydroepiandrosteron in Testosteron fördert, beschleunigt (Zouboulis et al. 2002). Diese Ergebnisse und die Expression von CRH-, CRH-R- und CRH-BP-mRNA und Protein in Sebozyten lassen auf die Existenz eines CRH/CRH-R-Systems in humanen Sebozyten schließen und vermuten, dass sebozytäres CRH die Quelle einer parakrinen Regulation des kutanen CRH/POMC-Systems sein könnte (Kono et al. 2001; Zouboulis et al. 2002).

Diese Untersuchungsergebnisse implizieren die Beteiligung von CRH in der Entstehung von Hauterkrankungen, welche mit einer gestörten Lipidproduktion der Talgdrüsen wie z. B. Akne, Seborrhoe und androgenetische Alopezie einhergehen.

IL-18, ein Mitglied der IL-1 Familie, spielt eine wichtige Rolle als Mediator bei der Entzündungsreaktion und wird von humanen Keratinozyten sezerniert. PARK et al. (2005) konnten durch die Inhibition von p38 MAPK zeigen, dass CRH die IL-18 Produktion in humanen Keratinozyten durch den MAPK Signalweg reguliert. ZBYTEK et al. (2004) zeigten darüber hinaus, dass NF- κ B durch CRH stimuliert wird, wobei NF- κ B von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort ist (Baeuerle und Henkel, 1994). Die Spezifität von CRH wurde durch die Verwendung der CRH-Rezeptorantagonisten Antalarmin und α -helicaem-CRF demonstriert. Die CRH abhängige Stimulation des NF- κ B deckt sich mit den anderen Daten über die Funktion von CRH in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass humane Keratinozyten auf Stimulation mit CRH mit einer erhöhten Ausschüttung des

proinflammatorischen Zytokins IL-6 und des antiinflammatorischen IL-11 sowie mit einer verminderten Ausschüttung von IL-1 β reagieren. Auf die TNF- α Ausschüttung der humanen Keratinozyten zeigt CRH keinen Effekt (Zbytek et al. 2002). Trotzdem ist die genaue pathogenetische Rolle von Stress bei Hauterkrankungen nicht bekannt.

1.1 Charakterisierung von CRH und den CRH-ähnlichen-Peptiden

1.1.1 CRH

Beim Corticotropin-freisetzenden-Hormon (CRH) bzw. Corticotropin-releasing Factor (CRF) handelt es sich um ein Polypeptid, das aus 41 Aminosäuren mit folgender Sequenz besteht:

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

Die molekulare Formel lautet C₂₀₄H₃₃₇N₆₃O₆₄. Die molekulare Masse beträgt 4,7 kDa.

Im Gehirn wird CRH vor allem in den paraventriculären Kernen des Hypothalamus synthetisiert und in den Portalkreislauf abgegeben (Itoi 1998). Außerhalb des ZNS wird CRH im Endometrium, in der Plazenta, im Myometrium, in Zellen des Immunsystems, im Gastrointestinaltrakt, in der Nebenniere und in der Haut produziert (Orth 1992; Owens und Nemeroff 1991; Slominski et al. 2000).

Die Produktion von CRH im ZNS wird durch Neurotransmitter und Neuropeptide wie Serotonin, Acetylcholin, Histamin, Norepinephrin, Epinephrin, Vasopressin, Angiotensin II, Neuropeptid Y, Cholezystokinin, Activin, Enkephalin sowie Leptin stimuliert, während Glukokortikoide, Östrogen, Gammaaminobuttersäure, Dynorphin, Substanz P, und Galanin hemmend auf die Produktion wirken (Inui 1999; Orth 1992; Owens und Nemeroff 1991).

1.1.2 Urocortin

Beim Urocortin handelt es sich um ein strukturell verwandtes Mitglied der CRH-ähnlichen Peptide, das strukturell eine hohe Homologie mit CRH aufweist. Menschliches Urocortin ist dem in Menschen und Ratten vorkommenden CRH zu 45 % homolog und weist eine 63 %ige

Homologie zu Urotensin auf (Donaldson et al. 1996; Vaughan et al. 1995; Park et al. 2000; Zhao et al. 1998).

Das Polypeptid Urocortin besteht aus 40 Aminosäuren mit folgender Sequenz:

Asp-Asn-Pro-Ser-Leu-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Thr-Leu-Leu-Glu-Leu-Ala-Arg-Thr-Gln-Ser-Gln-Arg-Glu-Arg-Ala-Glu-Gln-Asn-Arg-Ile-Ile-Phe-Asp-Ser-Val-NH₂

Die molekulare Formel lautet C₂₀₈H₃₄₄N₆₀O₆₃S₂. Die molekulare Masse beträgt 4,7 kDa.

Im menschlichen Gehirn ist Urocortin weitverbreitet und wurde bisher in allen untersuchten Regionen gefunden mit höchsten Konzentrationen im Frontallappen, Temporallappen, Hypothalamus und im Hypophysenvorderlappen (Kozicz et al. 1998, Yamamoto et al. 1998). Außerhalb des ZNS konnte Urocortin beim Menschen und in Ratten in der Placenta, im Uterus, in Zellen des Immunsystems, im Magen, im Dün- und Dickdarm, im Pankreas, in der Nebenniere, den Hoden und im Herzen nachgewiesen werden (Bamberger et al. 1998; Iino et al. 1998; Muramatsu et al. 2000; Nishikimi et al. 2000; Petraglia et al. 1996).

1.1.3 Urotensin

Das Polypeptid Urotensin gehört ebenfalls zur Gruppe der CRH-ähnlichen Peptide und besteht aus 11 Aminosäuren mit folgender Sequenz:

Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val

Die molekulare Formel lautet C₆₄H₈₅N₁₃O₁₈S₂. Die molekulare Masse beträgt 1,4 kDa.

Urotensin wurde ursprünglich aus dem ZNS von Fischen gewonnen, konnte dann aber auch in den Motoneuronen des menschlichen Rückenmarks nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist Urotensin ein potenter Vasokonstriktor (Conlon 2000; Eckart et al. 1999).

1.1.4 Sauvagin

Das Polypeptid Urotensin gehört ebenfalls zur Gruppe der CRH-ähnlichen Peptide und besteht aus 41 Aminosäuren mit folgender Sequenz:

Glu-Gly-Pro-Pro-Ile-Ser-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Glu-Leu-Leu-Arg-Lys-Met-Ile-Glu-Ile-Glu-Lys-
Gln-Glu-Lys-Glu-Lys-Gln-Gln-Ala-Ala-Asn-Asn-Arg-Leu-Leu-Leu-Asp-Thr-Ile-NH₂

Die molekulare Formel lautet C₂₀₂H₃₄₆N₅₆O₆₃S. Die molekulare Masse beträgt 4,6 kDa.

Sauvagin wurde aus der Haut eines Frosches der Gattung *Phyllomedusa sauvagei* extrahiert und gilt als potenter Stimulator der ACTH- und β -Endorphin-Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen (Eckart et al. 1999).

1.2 Die Familie der CRH-Rezeptoren

Zur Familie der CRH-Rezeptoren gehören der CRH-R1 und der CRH-R2, welche von verschiedenen Genen kodiert werden. CRH-R1 und CRH-R2 verbindet eine Homologie von ca. 70 % und sie gehören zur Familie der an G-Proteine gekoppelten transmembranösen Rezeptoren (Chalmers et al. 1996; Chen et al. 1993; Eckart et al. 1999; Liaw et al. 1996; Lovenberg et al. 1995; Perrin und Vale 1999).

Vom CRH-R1 konnten beim Menschen bisher sechs Isoformen identifiziert werden: CRH-R1 α , CRH-R1 β , CRH-R1c, CRH-R1d, CRH-R1e und CRH-R1f. Am häufigsten ist die Isoform CRH-R1 α vertreten (Chen et al. 1993; Vita et al. 1993).

Vom CRH-R2 sind bisher die Isoformen CRH-R2 α , CRH-R β und CRH-R γ bekannt (Kostich et al. 1998; Valdenaire et al. 1997).

CRH-R1 und CRH-R2 unterscheiden sich hinsichtlich ihres pharmakologischen Ligandenprofils und ihrer Verbreitung im menschlichen Gewebe. CRH-R1 kommt hauptsächlich in der Hypophyse, im ZNS, in der Epidermis und Dermis vor, während CRH-R2 vor allem in der Skelettmuskulatur, im Herzen, in Blutgefäßen, im ZNS und hauptsächlich in den dermalen Anteilen der Haut sowie in Haarfollikeln vorkommt (Chalmers et al. 1996; Perrin und Vale 1999; Slominski et al. 2004; Slominski et al. 2006).

Die Bindung von CRH an einen CRH-Rezeptor aktiviert die Adenylatcyclase mit nachfolgender cAMP Produktion sowie einen PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg. Durch die nachfolgende Produktion von Inositoltriphosphate kommt es zur Aktivierung eines PKC- und Calcium-abhängigen Signaltransduktionsweges (Chalmers et al. 1996; Orth 1992; Owens und Nemeroff 1991; Perrin et al. 1998). Weitere Untersuchungen zeigen, dass die CRH-Signaltransduktion eventuell direkt an Calcium- und Kaliumkanäle gekoppelt sein könnte (Chalmers et al. 1996; Lee und Tse 1997; Orth 1992; Slominski et al. 1999).

CRH-R1 ist im Vergleich zum CRH-R2 deutlich effizienter in der Übertragung des CRH-Signals, da es zu einer größeren intrazellulären Anhäufung von cAMP führt (Chalmers et al. 1996; Perrin und Vale 1999).

CRH und Urocortin wirken beide potenter am CRH-R1 als die CRH-ähnlichen Peptide Urotensin und Sauvagin. Urocortin, Urotensin und Sauvagin bewirken eine stärkere Aktivierung der Adenylatcyclase am CRH-R2 als CRH und sind damit potenter an diesem Rezeptor.

Die Bindungsaffinität von CRH an den CRH-R1 ist ähnlich der von Urocortin und Sauvagin, während die Bindungsaffinität von CRH an den CRH-R2 deutlich geringer ist als die von Urocortin, Urotensin und Sauvagin (Wei et al. 1998).

1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung

1.3.1 Experimenteller Teil

Es wurde postuliert, dass die Haut über ein mit der HPA-Achse vergleichbares System verfügt, welches möglicherweise im Rahmen einer lokalen Stressreaktion der Haut aktiviert wird. In vitro-Studien mit menschlichen Talgdrüsenzellen haben gezeigt, dass CRH unmittelbar die Lipidsynthese stimuliert und die Expression von 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase, welche die Umwandlung von Dehydroepiandrosteron in Testosteron fördert, beschleunigt (Zouboulis et al. 2000). Diese Ergebnisse und die Expression von CRH-, CRH-R- und CRH-BP-mRNA und Protein in Sebozyten lassen auf die Existenz eines CRH/CRH-R-Systems in humanen Sebozyten schließen und vermuten, dass sebozytäres CRH die Quelle einer parakrinen Regulation des kutanen CRH/POMC-Systems sein könnte (Kono et al. 2001; Zouboulis et al. 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CRH die Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen aus humanen Keratinozyten stimuliert (Baeuerle und Henkel 1994; Park et al. 2005; Zbytek et al. 2002; Zbytek et al. 2004).

Diese Untersuchungsergebnisse implizieren die Beteiligung von CRH in der Entstehung von Hauterkrankungen, welche mit einer gestörten Lipidproduktion der Talgdrüsen wie z. B. Akne, Seborrhoe und androgenetische Alopezie einhergehen. Die zugrunde liegenden molekularen Effekte sind bisher nicht geklärt. Allerdings ergeben sich aus den bisherigen Forschungsergebnissen weitere Fragen, die es zu beantworten gilt, um die Regulation des kutanen CRH/POMC-Systems besser verstehen zu können.

In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. **Wie wirken CRH und die CRH-ähnlichen Peptide auf die Proliferation von menschlichen Talgdrüsenzellen und HaCaT-Keratinozyten?**

Die Wirkung von CRH auf die Proliferation wurde bisher an verschiedenen anderen Hautzellen untersucht. So wirkt CRH auf dermale Fibroblasten proliferationssteigernd, während es

auf humane Keratinozyten und Melanozyten proliferationshemmend wirkt. Die Regulation der Proliferation durch CRH ist also abhängig von der Zielzelle (Slominski et al. 2006). Außer den SZ95-Sebozyten sollen HaCaT-Keratinozyten zur Kontrolle mit CRH und den CRH-ähnlichen Peptiden behandelt werden.

2. Wie wirken CRH und die CRH-ähnlichen Peptide auf die Zytokinfreisetzung durch menschliche Talgdrüsenzellen und HaCaT-Keratinozyten?

Untersuchungen haben gezeigt, dass Keratinozyten auf die Behandlung mit CRH mit einer Ausschüttung der pro- und antiinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-11 und IL-18 reagieren (Baeuerle und Henkel 1994; Park et al. 2005; Zbytek et al. 2002; Zbytek et al. 2004). Die Wirkung von CRH und CRH-ähnlicher Peptide auf die Ausschüttung von Zytokinen durch humane Sebozyten ist bisher nicht bekannt. Untersucht werden soll der Einfluss von CRH und den CRH-ähnlichen Peptiden auf die Ausschüttung der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 durch SZ95-Sebozyten und HaCaT-Keratinozyten.

3. Können eventuell auftretende Effekte von CRH und CRH-ähnlichen Peptiden auf menschliche Sebozyten und HaCaT-Keratinozyten durch einen CRH-Antagonisten antagonisiert werden?

Die Untersuchungen sollen darüber Aufschluss geben, ob eventuelle durch CRH und CRH-ähnliche Peptide hervorgerufene Effekte in Hinblick auf die Proliferation und Zytokinausschüttung von menschlichen Sebozyten und HaCaT-Keratinozyten antagonisierbar sind. Dies würde die Spezifität von CRH bzw. der CRH-ähnlichen Peptide für den jeweiligen Effekt nachweisen und ggf. den zuständigen CRH-Rezeptor erkennen lassen.

1.3.2 Klinischer Teil

Die eingangs genannten Untersuchungsergebnisse implizieren eine Beteiligung von CRH an der Entstehung von Hauterkrankungen, die mit einer gestörten Lipidproduktion einhergehen. Darüber hinaus ist bekannt, dass im Sebum von Patienten mit Akne und atopischer Dermatitis die Zusammensetzung der Lipidfraktionen verändert ist, sowie die Sebumexkretionsrate differiert. Patienten mit einer klinisch manifesten Akne weisen je nach Schweregrad eine erhöhte Sebumexkretionsrate (Cunliffe und Shuster 1969) sowie eine Verminderung der freien Fettsäuren und eine Vermehrung der Triclyceride und des Squalens auf (Gloor 1972; Tronnier und Brunn 1972), während Patienten mit atopischer Dermatitis meist zu einer trockenen Haut und einer Verringerung von Ceramid-1 (Yamamoto et al. 1991) sowie zu einer Vermehrung der Cholesterolfraktion neigen (Di Nardo et al. 1998).

Im Rahmen des klinischen Teils dieser Arbeit soll versucht werden erstmalig CRH aus dem Sebum von Patienten und Probanden zu extrahieren, um dann den Zusammenhang zwischen dem CRH-Gehalt im Sebum und der Sebumexkretionsrate bei gesunden Probanden und bei Patienten mit Akne, atopischer Dermatitis und Altersxerose untersuchen, um den bereits *in vitro* nachgewiesenen Effekt der Stimulation der Lipidsynthese durch CRH von menschlichen Talgdrüsenzellen *in vivo* zu überprüfen.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, den Zusammenhang zwischen der kutanen (sebozytären) CRH-Sekretion und der Syntheserate der Talgdrüsenlipide sowie der Zusammensetzung der Lipidfraktionen bei normalem Hautzustand und bei Hauterkrankungen mit Seborrhoe (Akne) sowie mit Sebestase (atopische Dermatitis, Altersxerose) zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien und Reagenzien

Bachem Biochemica (Heidelberg, D)	CRH EIA-Kit
B. Braun (Melsungen, D)	Sterilfilter (0,2 µm)
Biochrom AG (Berlin, D)	Sebomed [®] , Fötale bovines Serum (FBS), Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 %, PBS-Dulbecco (1x) Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Biozym (Oldendorf, D)	Pipetten Tips
Boehringer (Mannheim, D)	LDH-Zytotoxizitäts-Kit
Charité-Universitätsmedizin Berlin (Berlin, D)	V2A-Edelstahlring (Spezialanfertigung)
Courage&Khazaka Electronic (Köln, D)	Sebumeter [®] 815
Falcon, Becton Dickinson Labware (NJ, USA)	Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml), Kryoröhrchen, Serologische Pipetten
Gibco, BRL Invitrogen (Karlsruhe, D)	Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), serumfreies Kerationzytenmedium

Nunc (Wiesbaden, D)	Zellkulturflaschen, 96er-Mikrotiterplatten
R&D Systems (Wiesbaden, D)	Human IL-1 alpha/IL-1F1 Quantikine ELISA-Kit, Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA-Kit, Human IL-6 Quantikine ELISA-Kit, Human IL-8 Quantikine ELISA-Kit
Sigma-Aldrich (München, D)	CRH, Sauvagin, Urocortin, Urotensin, α -helicaler CRF, Gentamycin, CaCl ₂ , Penicillin/Streptomycin, Dimethylsulfoxid (DMSO), Aceton, n-Hexan, Ethanol 4-Methylumbelliferylheptanoate (MUH)

2.1.2 Zellkulturmedien

Sebozytenmedium

Sebomed®

10 % Fötales bovines Serum (FBS)

50 µg/ml Gentamycin

5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

1 mM CaCl₂

Keratinozytenmedium

Serumfreies Keratinozytenmedium

100 UI/ml Penicillin/Streptomycin

5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

50 µg/ml Fötales bovines Serum (FBS)

Einfriermedium

40 % Sebomed®

50 % Fötales bovines Serum (FBS)

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.1.3 Laborausstattung

Autoklav	Webeco (Bad Schwartau, D)
Brutschrank	BB16, Heraeus (Osterode, D)
ELISA-Photometer	Dynatech MR 5000 (Chantilly, VA, USA)
Phasenmikroskop	IMT-2, Olympus (Berlin, D)
Sterile Werkbank	BSB4A, Gelaire Flow Laboratories (Opera, I)
Spectrofluorometer	Molecular Devices SPECTRAMax Gemini (Sunnyvale, USA)
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus (Osterode, D) Biofuge fresco, Heraeus (Osterode, D) Megafuge 1.0 Heraeus (Osterode, D) Uni Vapo 100 H Uni Equip (Martinsried, D)

2.2 Methoden – Experimenteller Teil

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Humane immortalisierte SZ95-Sebozyten

Bei den SZ95-Sebozyten handelt es sich um eine immortalisierte menschliche Talgdrüsenzelllinie gezüchtet aus gewonnenen Talgdrüsenzellen von weiblicher Gesichtshaut, welche gleiche morphologische und funktionelle Eigenschaften aufweisen wie native menschliche Sebozyten (Zouboulis et al. 1999). In die Talgdrüsenzellen wurde ein Plasmid eingeschleust, das die Kodierungsregion für das Simian-Virus T-Antigen enthält. Aus den daraus entstandenen Zellkulturen wurden mehr als 50 Zellpassagen durchgeführt, ohne dass die Zellen sich veränderten bzw. Zeichen einer Zellalterung aufwiesen. Bei den für die Experimente verwendeten Zellkulturen handelte es sich um Passagen von 20 bis 30.

2.2.1.2 HaCaT-Zelllinie

Bei der HaCaT-Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie, die aus gesunder Haut eines männlichen Patienten gewonnen wurde und einem festen Wachstumszyklus unterliegt (Boukamp et al. 1988; Wanner et al. 1999). Die HaCaT-Zelllinie weist im Wesentlichen die Eigenschaften von basalen epidermalen Keratinozyten auf und eignet sich daher als ein gutes Modell für humane Keratinozyten (Ryle et al. 1989). HaCaT-Zellen sind frei von Simian-Virus 40 (SV 40) und frei von onkogenen Typen der Humanen Papilloma-Viren (HPV). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in HaCaT-Zellen trotz hoher Passagezahlen (>300) keine malignen Transformationen vorzufinden sind (Boukamp et al. 1988).

2.2.1.3 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt. Immortalisierte humane SZ95-Sebozyten wurden jeweils in Sebozytenmedium in einer Polyesterolkulturflasche mit einer Kulturfläche von 75 cm² gezüchtet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit und einem Anteil von 5 %

CO₂ bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Die Zellkulturflaschen waren mit einer kontaminations-sicheren Belüftungs-klappe ausgestattet, die sowohl einen optimalen CO₂-Austausch garantiert als auch eine Benetzung des Deckels mit dem Medium verhindert. Als weitere Schutzmaßnahme vor Kontaminierung und um die Wachstumsbedingungen nicht zu verändern, wurden die Zellen nur so kurz wie möglich für die Experimente außerhalb des Brutschrankes belassen. Das alte Medium wurde alle zwei Tage entfernt und durch frisches, angewärmtes Medium ersetzt. Die Entwicklung der Zellen wurde regelmäßig unter dem Phasenmikroskop kontrolliert.

2.2.1.4 Subkultivierung von Zellen

Der richtige Zeitpunkt für die Subkultivierung von Zellen ist, wenn in vitro die Kulturschale als Substrat von den Zellen nahezu vollständig eingenommen ist, da bei zu hoher Zelldichte die Proliferationsrate stark abnimmt. Dies kann schlimmstenfalls zum Absterben der Kultur führen. Daher ist es notwendig die Zellen unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues zu überführen. Dieser Vorgang wird als „Passagieren“ bezeichnet. Hierzu wurde das alte Medium sorgfältig abgezogen und die Zellen zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin/EDTA für ca. 3-10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Trypsin ist ein proteolytisch wirksames Enzym, das die Zellen von der Unterlage löst, während EDTA die Zellen voneinander separiert. Der Trypsinierungsprozess wurde unter dem Phasenmikroskop beobachtet, um die optimale Einwirkzeit festzustellen. Diese ist gegeben, wenn sich die Mehrzahl der Zellen von der Unterlage abgehoben hat und abgerundet in der Trypsinlösung schwimmt. Danach wurden ca. 10 ml serumhaltiges Medium hinzugegeben, da Serumzusatz eine sofortige Inaktivierung des Trypsins bewirkt und auch teilweise das zytotoxische EDTA zu binden vermag. Der Inhalt wurde dann in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1100 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, um die Zellen vom Trypsin/EDTA-Serummedium zu trennen. Der Überstand wurde abpipetiert und frisches serumhaltiges Medium zu den Zellen gegeben. Danach wurde die Zellzahl in der Lösung bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von ca. 10.000 Zellen/cm² in neue 75 cm²-Kulturflaschen ausgesät.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Da für die Wachstumsgeschwindigkeit die anfänglich ausgesäte Zellzahl eine entscheidende Rolle spielt, wurde vor jedem Aussäen eine Zellzählung durchgeführt. Um hierbei auch nur die lebendigen Zellen zu zählen, wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Dazu wurden zu 20 µl Zellsuspension 20 µl Trypanblau (0,4 %) zugefügt, vorsichtig mit einer Pipette durchmischt und dann für ca. 2-5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) unter einem Phasenmikroskop. Ein kleiner Teil der Zellsuspension wurde dafür in die Zählkammer gefüllt, was durch Ansetzen der Pipette an der Kante der Zählkammer geschieht, wobei die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesaugt wird. Danach wurde die Kammer unter das Phasenmikroskop gelegt und solange bewegt bis die Einteilungslinien der Kammer sichtbar wurden. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten mit jeweils einer Fläche von 1 mm². Es wurden vier große Quadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet, wobei zur Vermeidung von doppelter Zählung nur die lebendigen Zellen auf der oberen und linken Linie mitgezählt wurden. Die Zellzahl/ml ergibt sich aus der Multiplikation des Mittelwerts mit 10⁴, die Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Multiplikation mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml.

2.2.1.6 Kryokonservierung von Zellen

Zur Bevorratung wurden die Zelllinien bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert, was sie vor Kontamination, der Variabilität durch Subkultivierung und anderen schädlichen Einflüssen bewahrt. Dabei macht man sich die Erkenntnis zu Nutze, dass unterhalb einer Temperatur von -120 °C keinerlei Stoffwechselprozesse mehr stattfinden. Allerdings müssen dabei verschiedene Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, da die Zellen beim Einfrieren durch Bildung von Eiskristallen, Dehydratation und Schwankungen der Elektrolytkonzentration sowie des pH-Wertes beschädigt werden können. Um die Zellen davor zu bewahren wird DMSO als Schutzsubstanz zu den Zellen gegeben, das die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert, indem es Zellwasser ersetzt und bindet. Serum hat ebenfalls einen günstigen und schützenden Effekt auf die Zellen. Wichtig ist dabei die richtige Konzentration des toxischen Kryoschutzmittels sowie eine kontrollierte und langsame Ein-

frierrate von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Stunde. Die Zellen wurden wie bereits weiter oben bei der Subkultivierung beschrieben zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen und danach trypsinisiert. Nach dem Absaugen des Zellüberstandes wurden die Zellen mit dem Einfriermedium resuspendiert und in ein 1 ml fassendes steriles Kryoröhrchen pipetiert. Die Tiefgefrieröhrchen wurden danach in ein spezielles Gefäß überführt, das mit ca. 200 ml Isopropanol befüllt worden ist, welches die Kryoröhrchen vollständig umgab. Dieses Einfriergefäß wurde dann für ca. 12 h in einen $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrierschrank gestellt. Durch das Isopropanol wurde gewährleistet, dass die Zellen mit einer Einfrierrate von ca. $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Stunde tiefgefroren werden. Nachdem das Einfriergefäß ca. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht hatte, wurden die Kryoröhrchen entnommen und in einen Aufbewahrungsbehälter mit $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.1.7 Auftauen von Zellen

Beim Auftauen von Zellen sollte man wie beim Einfrieren besondere Vorsicht walten lassen, da sonst die Vitalität der Zellen gefährdet werden kann. Aufgrund der Toxizität der Schutzmittel sollte man die Zellen so schnell wie möglich auftauen, jedoch ohne sie zu überhitzen. Dazu wurden die benötigte Anzahl an Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Zellen aus dem N_2 -Behälter entnommen und sofort in ein $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad gehalten. Hier blieben sie solange bis das letzte Eisklumpchen verschwunden war. Danach wurde der Inhalt sofort unter der sterilen Werkbank abpipetiert, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und unter der langsamen Zugabe von angewärmtem Medium auf ca. 10 ml aufgefüllt. Dann wurde die Zellsuspension bei 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und mit 20 ml frischem Medium aufgefüllt. Diese Zellsuspension wurde dann in eine neue 75 cm^2 -Kulturflasche überführt. Die aufgetauten Zellen konnten nach ca. einer Woche für Versuche verwendet werden.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Messung der Zytotoxizität

Bei der Prüfung von Substanzen können die Zellen durch deren Toxizität nekrotisieren. Im Verlauf der Nekrose kommt es durch Ausfall der zellulären Ionenpumpen zu einem unkontrollierten Einstrom von Kalium- und Natriumionen mit einem nachfolgenden osmotischen Einstrom von

Wasser in die Zellen. Dies führt zur Schwellung der Zelle und der Organellen und schließlich zu einem Platzen der Zellen. Hierbei treten normalerweise nur intrazellulär vorkommende Enzyme wie zum Beispiel die Lactatdehydrogenase (LDH) aus. LDH ist ein Enzym, welches die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und die gleichzeitige Umwandlung von NAD^+ zu NADH katalysiert und in allen Zellen vorkommt. Im Gegensatz zu anderen Enzymen, die im Zellkulturmedium sehr schnell abgebaut werden, bleibt LDH über längere Zeit stabil. Die LDH-Aktivität ist somit ein guter Indikator für den Zelluntergang durch Nekrose. Zur Überprüfung der Toxizität der in den Experimenten verwendeten Substanzen wurde das LDH-Zytotoxizitäts-Kit von Boehringer verwendet. Hierbei wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen, indem es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes kommt, der photometrisch gemessen werden kann. Dazu werden die Zellen mit Natriumlactat, NAD^+ , Jodtetrazolchlorid und Diaphorase inkubiert. Das aus den Zellen freigesetzte LDH setzt Natriumlactat mit NAD^+ als Coenzym zu Pyruvat um. Dabei entsteht $\text{NADH}+\text{H}^+$, wobei die Wasserstoffatome der Diaphorase zur Reduktion des Jodtetrazolchlorids eingesetzt werden. Die Extinktion des Formansalzes wird bei 492 nm gemessen, wobei die Intensität der Rotfärbung proportional zur Zahl der lysierten Zellen ist.

Für den LDH-Assay wurden 20.000 Zellen pro Vertiefung auf einer 96er-Mikrotiterplatte ausgesät und für 48 h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium mit und ohne die zu testenden Substanzen hinzugegeben. Nach 24 h wurden die Platten mit 1000 xg für 5 Minuten zentrifugiert und jeweils 100 µg der dadurch gewonnenen Überstände in eine 96er-Mikrotiterplatte überführt. In jede Vertiefung wurden dann 100 µl der Reaktionsflüssigkeit gegeben und die Zellen damit 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde dann bei 492 nm mit einem ELISA-Photometer gemessen. Die Experimente wurden dreifach wiederholt, wobei aus jeweils 10 Vertiefungen für jeden Datenpunkt im Experiment der Mittelwert gebildet worden ist. Die Intensität der Kontrollen wurde dabei als 100 % angenommen und die LDH-Freisetzung dazu prozentual in Relation gesetzt.

2.2.2.2 Proliferationsanalyse

Während des Zellwachstums durchlaufen die Zellen verschiedene Phasen. Zuerst befinden sich die Zellen in der Lag-Phase, die je nach Aussaatdichte, Zelltyp und der Behandlung unterschiedlich lange anhält. Danach wachsen die Zellen exponentiell in der Log-Phase bis sie ein Plateau erreichen und die Zellzahl annähernd gleich bleibt. Die Kulturfläche der Kulturflasche ist dann annähernd vollständig von Zellen eingenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wird 4-Methylumbelliferylheptanoate (MUH) verwendet, ein fluoreszierendes Substrat für Lipase und Esterase, das nur von lebendigen Zellen aufgenommen und im Zytoplasma gespalten wird, wobei Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm emittiert wird.

Für die Proliferationsanalyse wurden 2000 Zellen pro Vertiefung auf einer 96er-Mikrotiterplatte ausgesät und für 2 Tage kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das alte Medium entfernt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und es wurde frisches Medium mit bzw. ohne Zusatz der zu prüfenden Substanz zu den Zellen gegeben. Die Zellproliferation wurde an Tag 0, 1, 3, 5 mit Hilfe des MUH-Fluoreszenz-Assays bestimmt. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und 100 µl von einer 100 µg/ml konzentrierten MUH-Lösung zu den Zellen gegeben. Diese wurden dann für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach die Fluoreszenz als Maß für die Zellzahl mit einem Spectrofluorometer bei einer Wellenlänge von 355 nm zur Anregung und bei 460 nm mit Emissionsfiltern gemessen. Die Experimente wurden dreifach wiederholt, wobei aus jeweils 10 Vertiefungen für jeden Datenpunkt im Experiment der Mittelwert gebildet worden ist.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Messung der Zytokinfreisetzung

Zur Messung der IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 Freisetzung wurden ELISA-Kits von R&D verwendet. Alle Assays funktionieren nach der Methode eines Sandwich-Immunoassays. Für die Versuche wurden 2000 Zellen pro Vertiefung in einer 96er-Mikrotiterplatte ausgesät und für 2 Tage kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das alte Medium entfernt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und es wurde frisches Medium mit bzw. ohne Zusatz der zu prüfenden Substanz zu

den Zellen gegeben. Die Überstände wurden nach 24 h gesammelt und zentrifugiert, um den restlichen Zellüberstand zu entfernen. Die Zytokinfreisetzung wurde mit ELISA-Kits von R&D nach Anleitung des Herstellers gemessen. Hierzu wurden die zu untersuchenden Überstände auf eine mit monoklonalem Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin beschichtete 96er-Mikrotiterplatte aufgebracht. Falls das zu untersuchende Zytokin in den Proben vorkam, wurde es an den Antikörper gebunden. Danach wurden die ungebundenen Substanzen abgewaschen und ein spezifischer enzymgebundener polyklonaler Antikörper für das zu bestimmende Zytokin in die Vertiefungen gegeben. Nach einer weiteren Waschung zur Entfernung von ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexen wurde eine Luminol-Peroxid-Substrat-Lösung zu den Vertiefungen gegeben und das dabei proportional zum gebundenen Zytokin entstehende Licht wurde mit einem ELISA-Photometer bei 450 nm gemessen. Die Experimente wurden zweifach wiederholt, wobei aus jeweils 10 Vertiefungen für jeden Datenpunkt im Experiment der Mittelwert gebildet worden ist.

2.3 Probanden, Patienten und Methoden – Klinischer Teil

2.3.1 Probanden- und Patientenkollektiv

Die Untersuchungen fanden in der Klinik- und Poliklinik für Dermatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin am Campus Benjamin Franklin statt (damaliger Leiter: Prof. Dr. Prof. Dr. h.c. C. E. Orfanos). Die Patienten und Probanden wurden mittels eines Informationsblattes aus den ambulanten Sprechstunden der Poliklinik für Dermatologie sowie aus dem Personal und dem Bekanntenkreis rekrutiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt.

Als gemeinsames Einschlusskriterium für alle Probanden und Patienten galt die schriftliche Einverständnis zur Durchführung der Sebummessung und der Lipidextraktion sowie zur wissenschaftlichen Auswertung und Publikation der gewonnenen Daten in anonymisierter Form. Diese wurde vor der Untersuchung und nach ausführlicher Aufklärung über die Studie von jedem Probanden bzw. Patienten eingeholt. Die Probanden und Patienten wurden gebeten die Gesichtshaut am Tag der Untersuchung nur mit ihrem normalen Reinigungsmittel zu waschen und keine weiteren Pflegemittel oder Kosmetika aufzutragen.

Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Isotretinoin, Acitretin, oralen Kontrazeptiva und Spironolacton sowie das Vorliegen von schwerwiegenden Begleiterkrankungen.

2.3.1.1 Charakterisierung des Probandenkollektivs

Gesunde Frauen und Männer im Alter von mindestens 18 Jahren bis höchstens 80 Jahren. Es wurden 24 gesunde Probanden in die Studie aufgenommen. Davon waren 17 Probanden weiblichen und 7 Probanden männlichen Geschlechts. Sie waren im Mittel 41,7 Jahre alt (Median 37, Streuung 23 bis 69).

2.3.1.2 Charakterisierung der Aknepatienten

Männer und Frauen im Alter von mindestens 14 Jahren bis höchstens 40 Jahren. Es wurden 10 Patienten, die in der Poliklinik für Dermatologie wegen Akne vorstellig wurden, in die Studie aufgenommen. Davon waren 7 Probanden weiblichen und 3 Probanden männlichen Geschlechts. Sie waren im Mittel 22,5 Jahre alt (Median 23, Streuung 14 bis 35).

2.3.1.3 Charakterisierung der Patienten mit atopischer Dermatitis

Männer und Frauen im Alter von mindestens 18 Jahren bis höchstens 80 Jahren. Es wurden 14 Patienten, die in der Poliklinik für Dermatologie wegen einer atopischen Dermatitis vorstellig wurden, in die Studie aufgenommen. Davon waren 10 Probanden weiblichen und 4 Probanden männlichen Geschlechts. Sie waren im Mittel 45,9 Jahre alt (Median 47, Streuung 18 bis 69).

2.3.1.4 Charakterisierung der Patienten mit Altersxerose

Männer und Frauen im Alter von mindestens 45 Jahren bis höchstens 80 Jahren. Es wurden 5 Patienten, die an Altersxerose leiden und deswegen in der Poliklinik für Dermatologie vorstellig wurden, in die Studie aufgenommen. Davon waren alle 5 Probanden weiblichen Geschlechts. Sie waren im Mittel 67,8 Jahre alt (Median 74, Streuung 48 bis 76).

2.3.2 Durchführung der Messung der Hautoberflächenlipide

Die Lipide der Hautoberfläche wurden photometrisch mit dem Sebumeter[®] 815 der Firma Courage&Khazaka Electronic bestimmt. Eine Fettmesskassette, die ein 0,1 mm starkes mattiertes Kunststoffband mit einem 64 mm² großen Messabschnitt enthält, wird für jeweils 30 Sekunden auf die Haut der Probanden gedrückt. Dabei werden die Hautoberflächenlipide durch das Kunststoffband absorbiert. Die dadurch entstehende Änderung der Lichtdurchlässigkeit wird mittels einer Photozelle gemessen und gilt als Maßstab für die Lipidmenge. Das Ergebnis zeigt die Lipidmenge an der gemessenen Stelle in µg/cm² an.

Die erste Lipidmessung (t=0) erfolgte an drei verschiedenen Stellen der Stirn (über der Nasenwurzel und auf beiden Seiten der Stirn über der äußeren Hälfte der Augenbrauen) zur Bestim-

mung der sog. „casual lipids“, womit der Gehalt der auf der Hautoberfläche vorhandenen Lipide (seboglandulärer und epidermaler Herkunft) bezeichnet wird (Lipidgehalt), zu denen je nach Pflegegewohnheiten auch exogene Lipide aus Cremes, Kosmetika etc. kommen. Danach wurde die Stirn mit 80 %igem Ethanol gereinigt, um die bereits vorhandenen Lipide zu entfernen. Die nächste Messung wurde nach 30 Minuten an den selben drei Stellen durchgeführt, an denen vorher die „casual lipids“ bestimmt worden sind. Dieser Wert gibt Auskunft darüber, welche Lipidmenge in der Zeit von 30 Minuten ($t=30$ min) von den Talgdrüsen produziert worden ist (Lipidproduktion). Aus den drei erhobenen Werten wurde der Mittelwert gebildet.

2.3.3 Durchführung der Lipidextraktion

Zur Lipidextraktion wurde ein V2A-Edelstahlring mit einem Innendurchmesser von 22 mm und einer Höhe von 20 mm fest auf die Stirnmitte aufgedrückt. Danach wurden die Lipide in zwei Phasen extrahiert. Hierzu wird der Ring zuerst für 2 Minuten mit Aceton als erstem Lösungsmittel und dann für 2 Minuten mit n-Hexan als zweitem Lösungsmittel befüllt. Nach Ablauf der 2 Minuten wurde das jeweilige Lösungsmittel getrennt abpipetiert und in Kryoröhrchen bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.3.4 Nachweis der Lipidfraktionen

Die Analyse der Lipidfraktionen (Squalen und Cholesterol) erfolgte mit HPTLC. Bei der HPTLC werden die aus der Hautoberfläche extrahierten Lipide aus der Wasserphase des Extrakts während einer zehnmütigen Zentrifugation bei 1600 xg getrennt und in einem Savant Speed-Vac SC 110 A-Vacuum getrocknet. Die Präparate werden in Chloroform/Methanol 2:1 (v/v, 100 μ l) erneut gelöst und dann als $0,7$ cm-Linien mit Hilfe eines CAMAG Linomat IV-Lipidapplikators auf HP-Dünnschichtchromatographie-Platten 10×20 cm aufgetragen. Die Platten werden dann in ausgewählten Lösungsmittelkombinationen in einem CAMAG-Plattenentwicklungsgerät entwickelt. Anschließend werden die HPTLC-Platten für 10 Sekunden in einer Kupfer(II)sulfat $0,6$ M-Wasserlösung mit $8,5$ % Phosphorsäure eingetaucht und die getrennten

Lipidfraktionen bei 150 °C visualisiert. Die Bestätigung der einzelnen Lipidfraktionen erfolgt nach dem Vergleich mit mitlaufenden Standardlipiden (Migrationsabstand, Rf).

Die Bestimmung der Lipidfraktionen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Monica Ottaviani aus dem Cytolab in Rom (Italien) übernommen.

2.3.5 Messung des CRH-Gehaltes in den Lipidextrakten

Zur Messung des CRH-Gehaltes in den Lipidextrakten wurde das CRH EIA-Kit von Bachem Biochemica verwendet. Die Messungen wurden zweifach wiederholt.

2.4 Statistik

Die Versuche wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$) von n unabhängigen Experimenten berechnet. Unterschiede zwischen einzelnen Vergleichsgruppen wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ mittels des t-Tests nach Student für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz geprüft. Als signifikant angesehen wurden p Werte für $\alpha \leq 0,05$. Alle Darstellungen wurden mit dem Programm MS Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse – Experimenteller Teil

3.1.1 Zytotoxizität

3.1.1.1 SZ95-Sebozyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin wirkten in Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-7} M nicht toxisch auf SZ95-Sebozyten, während α -helicaler CRF in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M nicht toxisch auf die SZ95-Sebozyten wirkte.

3.1.1.2 HaCaT-Keratinozyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin wirkten in Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-7} M nicht toxisch auf die HaCaT-Keratinozyten, während α -helicaler CRF in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M nicht toxisch auf die HaCaT-Keratinozyten wirkte.

3.1.2 Proliferation

3.1.2.1 SZ95-Sebozyten

CRH in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M unterdrückten signifikant die Proliferation der SZ95-Sebozyten dosisabhängig am Tag 5. Die maximale Proliferationshemmung wurde bei einer Konzentration von 10^{-8} M (-14 %, $p < 0,001$) erreicht (Abb. 3.1.2.1.1). An Tag 1 und Tag 3 konnte keine Proliferationszunahme oder -abnahme der SZ95-Sebozyten im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.

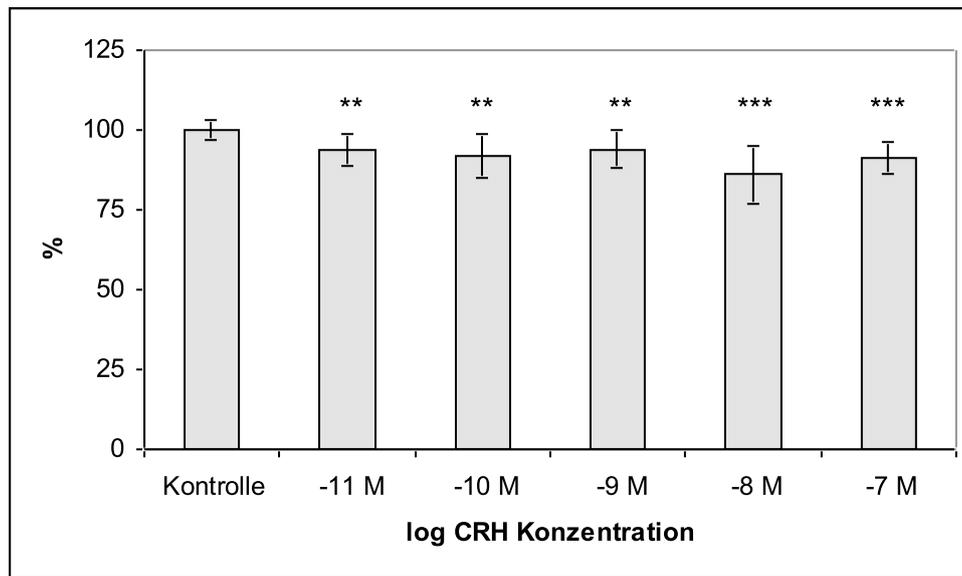


Abb. 3.1.2.1.1: Effekt von CRH in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M auf die Proliferation der SZ95-Sebozyten am Tag 5. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %); ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Urocortin in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-7} M unterdrückte die Proliferation der SZ95-Sebozyten dosisabhängig am Tag 5. Die maximale Proliferationshemmung wurde bei einer Konzentration von 10^{-7} M (-7 %, $p<0,05$) erreicht (Abb. 3.1.2.1.2). An Tag 1 und Tag 3 konnte keine Proliferationszunahme oder -abnahme der SZ95-Sebozyten im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.

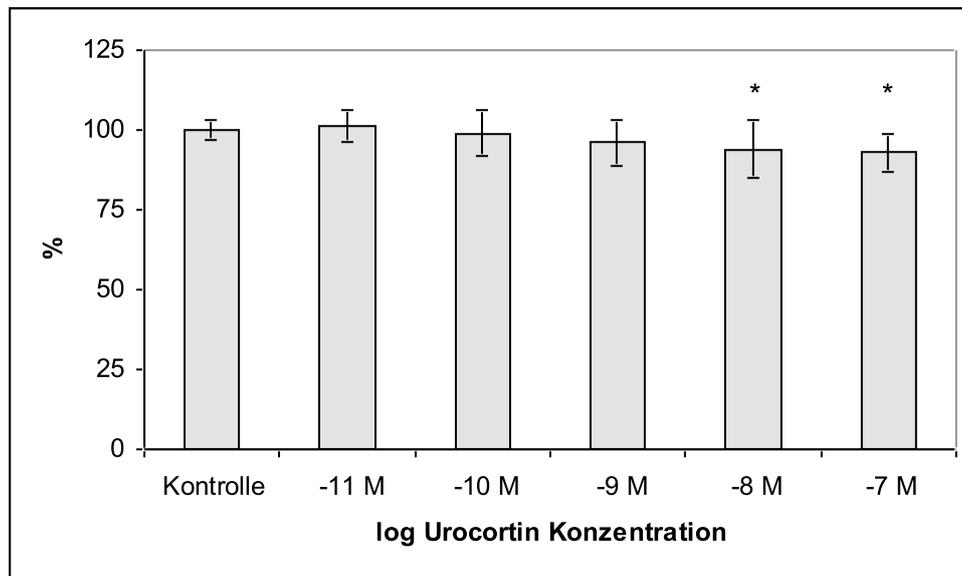


Abb. 3.1.2.1.2: Effekt von Urocortin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M auf die Proliferation der SZ95-Sebozyten am Tag 5. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %); * $p<0,05$.

Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M zeigten keinen Einfluss auf die Proliferation der SZ95-Sebozyten am Tag 1, Tag 3 und Tag 5.

3.1.2.2 HaCaT-Keratinocyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M zeigten keinen Einfluss auf die Proliferation der HaCaT-Keratinocyten am Tag 1, Tag 3 und Tag 5.

3.1.3 Versuch der Antagonisierung der proliferationshemmenden Effekte von CRH und Urocortin auf die SZ95-Sebozyten mit α -helicalem CRF

3.1.3.1 CRH

Der CRH Antagonist α -helicaler CRF hob die proliferationshemmende Wirkung von 10^{-8} M CRH (-12 %, $p<0,01$) auf die SZ95-Sebozyten in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-8} M auf, wobei die optimale Konzentration bei 10^{-8} M (-4 %) lag (Abb. 3.1.3.1.1).

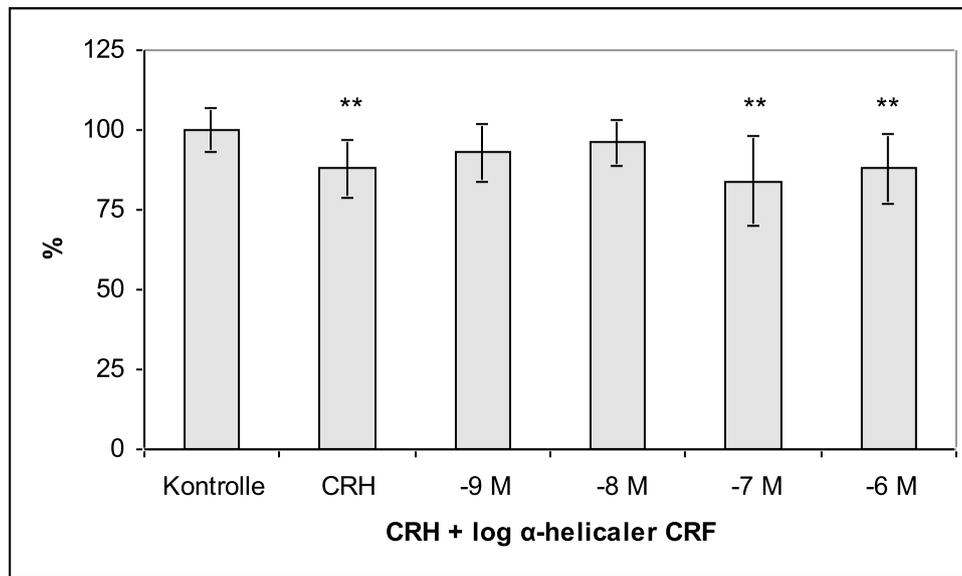


Abb. 3.1.3.1.1: Effekt von 10^{-8} M CRH und in Kombination mit α -helicalem CRF in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M auf die Proliferation SZ95-Sebozyten am Tag 5. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %) sowie zum 10^{-8} M CRH; ** $p<0,01$.

3.1.3.2 Urocortin

Der proliferationshemmende Effekt von Urocortin auf die SZ95-Sebozyten konnte durch den α -helicalen CRF nicht aufgehoben werden.

3.1.4 Zytokinfreisetzung

3.1.4.1 IL-1 α

3.1.4.1.1 SZ95-Sebozyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führten nach 24 h zu keiner vermehrten IL-1 α Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten.

3.1.4.1.2 HaCaT-Keratinocyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führten nach 24 h zu keiner vermehrten IL-1 α Freisetzung durch die HaCaT-Keratinocyten.

3.1.4.2 IL-1 β

3.1.4.2.1 SZ95-Sebozyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führten nach 24 h zu keiner vermehrten IL-1 β Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten.

3.1.4.2.2 HaCaT-Keratinocyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führten nach 24 h zu keiner vermehrten IL-1 β Freisetzung durch die HaCaT-Keratinocyten.

3.1.4.3 IL-6

3.1.4.3.1 SZ95-Sebozyten

CRH in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-7} M führte nach 24 h zu einer vermehrten IL-6 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten. Die maximale IL-6 Freisetzung wurde bei einer Konzentration von 10^{-7} M (+24 %, $p < 0,05$) erreicht (Abb. 3.1.4.3.1.1).

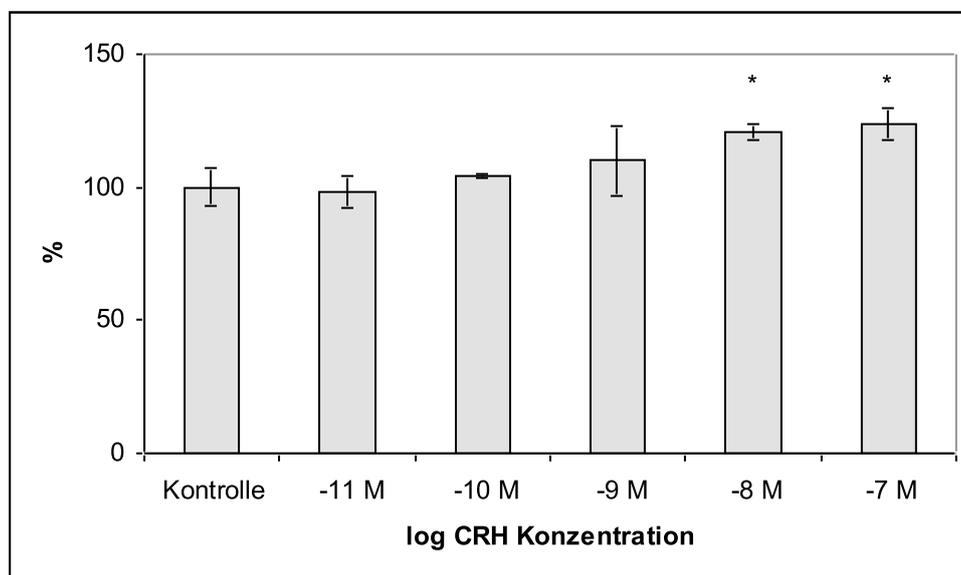


Abb. 3.1.4.3.1.1: Effekt von CRH auf die IL-6 Freisetzung der SZ95-Sebozyten nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei gepoolten Proben aus $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %); * $p < 0,05$.

Urocortin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führte nach 24 h zu keiner signifikant vermehrten IL-6 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten nach 24 h (Abb. 3.1.4.3.1.2).

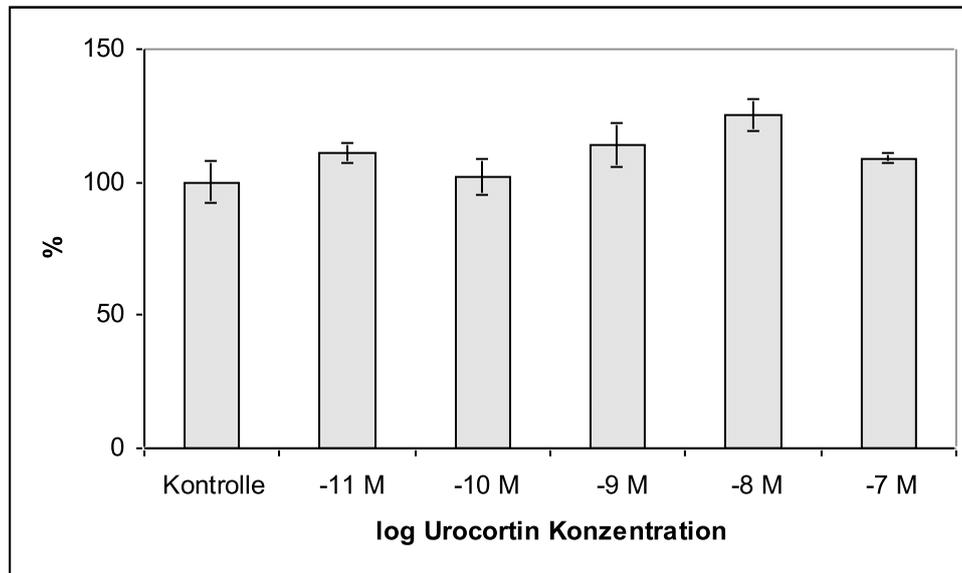


Abb. 3.1.4.3.1.2: Effekt von Urocortin auf die IL-6 Freisetzung der SZ95-Sebozyten nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei gepoolten Proben aus $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %).

Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führten nach 24 h zu keiner vermehrten IL-6 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten.

3.1.4.3.2 HaCaT-Keratinocyten

CRH, Urotensin, Urocortin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führte nach 24 h zu keiner vermehrten IL-6 Freisetzung durch die HaCaT-Keratinocyten.

3.1.4.4 IL-8

3.1.4.4.1 SZ95-Sebozyten

CRH in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-7} M führte nach 24 h zu einer vermehrten IL-8 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten. Die maximale IL-8 Freisetzung wurde bei einer Konzentration von 10^{-7} M (+15 %, $p<0,05$) erreicht (Abb. 3.1.4.4.1.1).

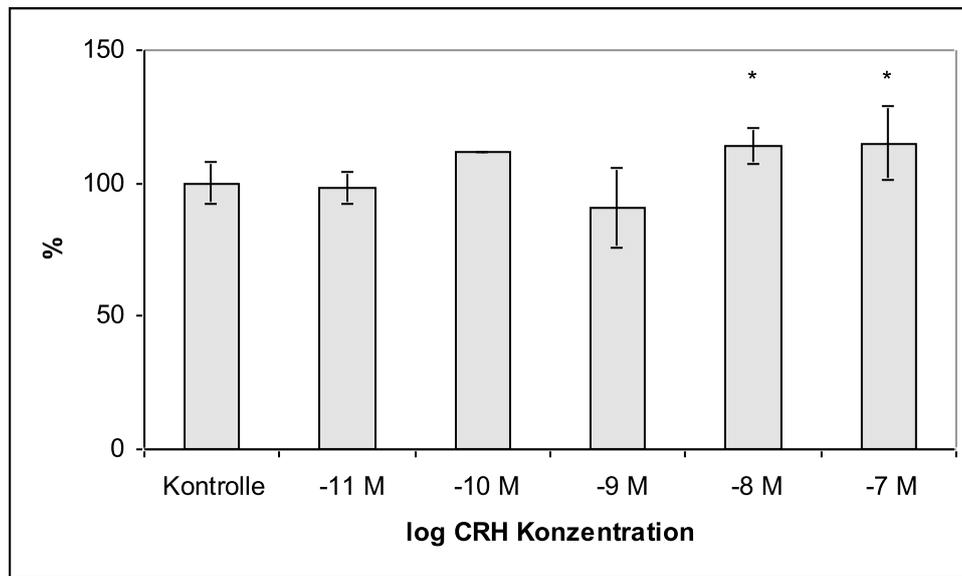


Abb. 3.1.4.4.1.1: Effekt von CRH auf die IL-8 Freisetzung der SZ95-Sebozyten nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei gepoolten Proben aus $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %); * $p<0,05$.

Urocortin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führte nach 24 h zu keiner vermehrten IL-8 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten (Abb. 3.1.4.4.1.2).

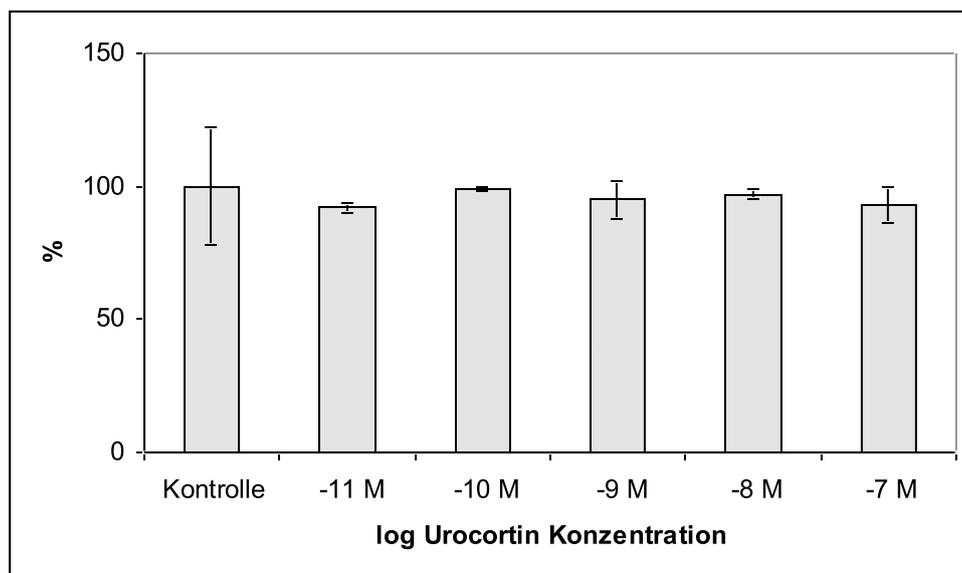


Abb. 3.1.4.4.1.2: Effekt von Urocortin auf die IL-8 Freisetzung der SZ95-Sebozyten nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei gepoolten Proben aus $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %).

Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führte nach 24 h zu keiner vermehrten IL-8 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten.

3.1.4.4.2 HaCaT-Keratinocyten

CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-7} M führten nach 24 h zu keiner vermehrten IL-8 Freisetzung durch die HaCaT-Keratinocyten.

3.1.5 Versuch der Antagonisierung der IL-6 und IL-8 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten durch CRH mit α -helicalem CRF

3.1.5.1 IL-6

Der CRH Antagonist α -helicaler CRF antagonisierte dosisabhängig die Freisetzung von IL-6 der SZ95-Sebozyten durch 10^{-8} M CRH. Interessant ist der biphasische Effekt von α -helicalem CRF mit einem Wirkoptimum bei 10^{-7} M (-14 %, $p < 0,001$) sowie eine Unterdrückung der IL-6 Freisetzung durch 10^{-9} M und 10^{-8} M α -helicalem CRF (-8 bzw. -14 %, $p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.1.5.1.1).

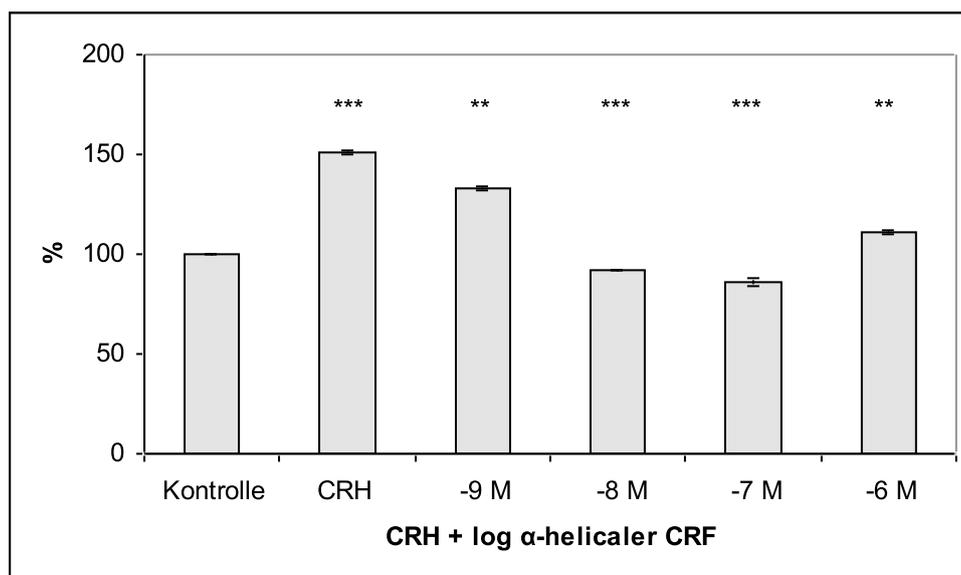


Abb. 3.1.5.1.1: Effekt von 10^{-8} M CRH und in Kombination mit α -helicalem CRF in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M auf die IL-6 Freisetzung der SZ95-Sebozyten nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei gepoolten Proben aus $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %) sowie zum 10^{-8} M CRH; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.5.2 IL-8

Der CRH Antagonist α -helicaler CRF antagonisierte dosisabhängig die Freisetzung von IL-8 der SZ95-Sebozyten durch 10^{-8} M CRH. Auch hier trat der biphasische Effekt von α -helicaem CRF mit einem Wirkoptimum bei 10^{-7} M (-14 %, $p < 0,001$) auf (Abb. 3.1.5.2.1).

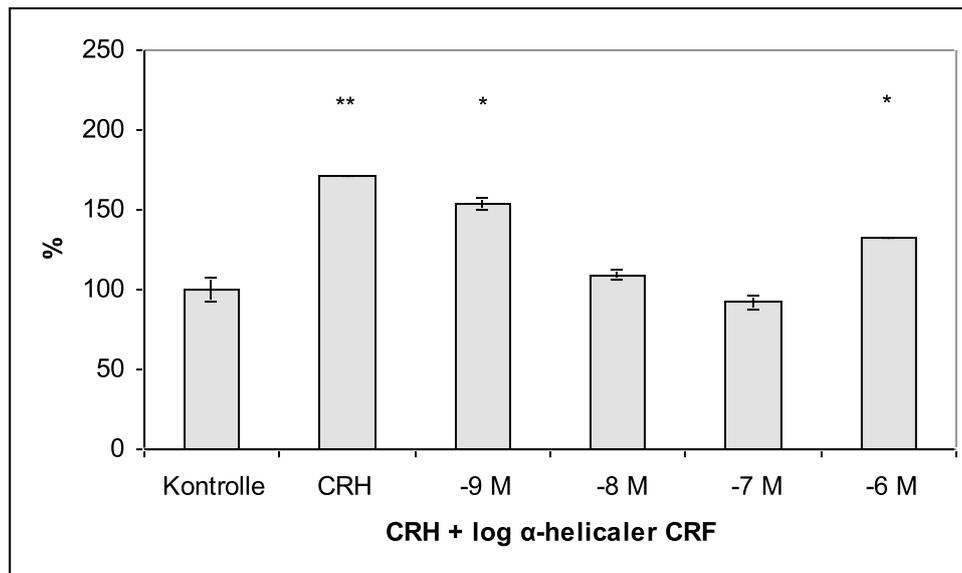


Abb. 3.1.5.2.1: Effekt von 10^{-8} M CRH und in Kombination mit α -helicaem CRF in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M auf die IL-8 Freisetzung der SZ95-Sebozyten nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei gepoolten Proben aus $n=10$ Experimenten in Relation zur Kontrolle (100 %) sowie zum 10^{-8} M CRH; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2 Ergebnisse – Klinischer Teil

3.2.1 Messung der Hautoberflächenlipide

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Messung der Oberflächenlipide der Probanden und der unter gleichen Bedingungen untersuchten Patienten mit Akne, atopischer Dermatitis und Xerosis cutis dargestellt. In die Betrachtung geht die Zusammensetzung der Gruppen hinsichtlich Alter und Geschlecht ein (Tab. 3.2.1.1).

Gruppe	Probanden	Akne	Atopische Dermatitis	Xerosis cutis
Weibliches Geschlecht	17	7	10	5
Männliches Geschlecht	7	3	4	0
Gesamtzahl	24	10	14	5
Alter in Jahren (MW)	41,7 (Streuung 23 bis 67)	22,5 (Streuung 14 bis 35)	45,9 (Streuung 18 bis 69)	67,8 (Streuung 48 bis 76)
Lipidgehalt in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zum Zeitpunkt $t=0$ (MW \pm SD)	197,04 (\pm 52,09)	246,10 (\pm 36,11)	200,88 (\pm 46,23)	100,27 (\pm 46,28)
Lipidproduktion in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zum Zeitpunkt $t=30$ min (MW \pm SD)	118,64 (\pm 39,44)	158,49 (\pm 48,47)	112,26 (\pm 74,68)	35,20 (\pm 29)

Tab. 3.2.1.1: Lipidgehalt in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zum Zeitpunkt $t=0$ und Lipidproduktion in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zum Zeitpunkt $t=30$ min im Vergleich.

Der Lipidgehalt und die Lipidproduktion der Aknepatienten und der Patienten mit Xerosis cutis unterschied sich zu den entsprechenden Zeitpunkten $t=0$ sowie $t=30$ min signifikant von dem der Probanden (Abb. 3.2.1.2, Abb. 3.2.1.3). Der Lipidgehalt der Aknepatienten betrug zum Zeitpunkt $t=0$ +25 % ($p<0,05$) und die Lipidproduktion zum Zeitpunkt $t=30$ min +34 % ($p<0,05$) im Vergleich zu der Probandengruppe. Der Lipidgehalt der Patienten mit Xerosis cutis betrug zum

Zeitpunkt $t=0$ -49 % ($p<0,001$) und die Lipidproduktion zum Zeitpunkt $t=30$ min -61 % ($p<0,001$) im Vergleich zu der Probandengruppe. Zwischen den Patienten mit atopischer Dermatitis und den Probanden bestand zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Der Lipidgehalt der Patienten mit atopischer Dermatitis betrug zum Zeitpunkt $t=0$ +2 % und die Lipidproduktion zum Zeitpunkt $t=30$ min -5 % im Vergleich zu der Probandengruppe.

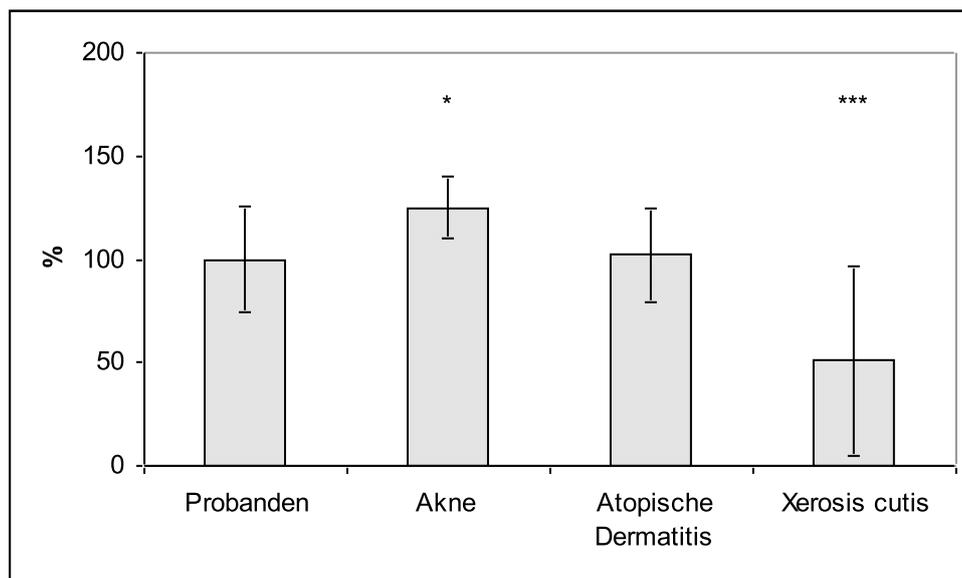


Abb. 3.2.1.2: Lipidgehalt der Haut zum Zeitpunkt $t=0$ aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe (100 %); * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

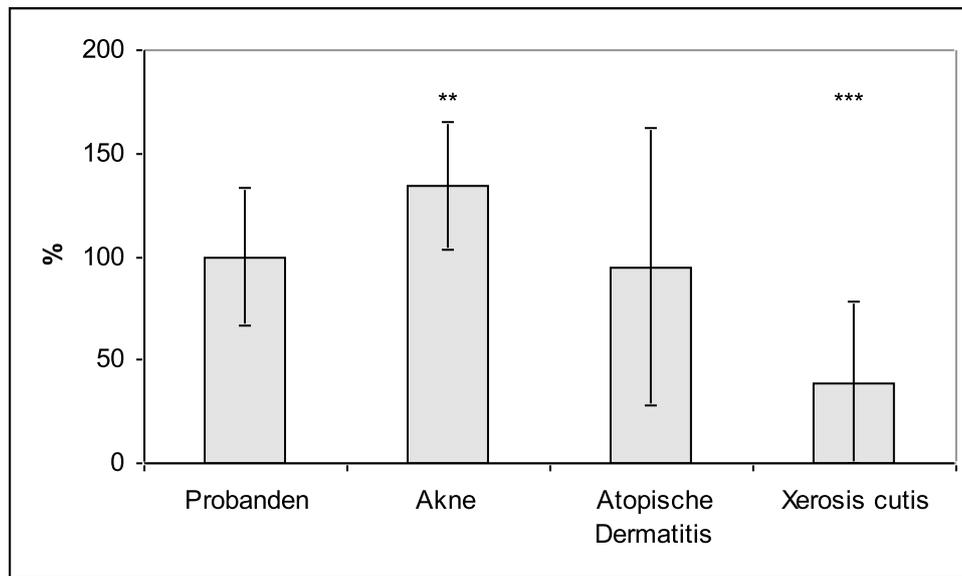


Abb. 3.2.1.3: Lipidproduktion der Talgdrüsen zum Zeitpunkt $t=30$ min aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe (100 %); * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

3.2.2 Nachweis der Lipidfraktionen in den beiden Lösungsmitteln

Es wurden mittels HPTLC die Lipide Squalen und Cholesterol jeweils in den beiden Lösungsmitteln bestimmt.

3.2.2.1 Aceton

In den Acetonproben der Patienten und Probanden wurden jeweils die Lipidfraktionen Squalen und Cholesterol bestimmt.

Der Squalengehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis und Xerosis cutis unterschied sich signifikant von dem der Probanden (Abb. 3.2.2.1.1). Der Squalengehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis betrug -41 % ($p<0,05$) im Vergleich zu der Probandengruppe. Der Squalengehalt im Sebum der Patienten mit Xerosis cutis betrug -77 % ($p<0,01$) im Vergleich zu der Probandengruppe. Der Squalengehalt im Sebum der Aknepatienten betrug +14 % im Vergleich zur Probandengruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

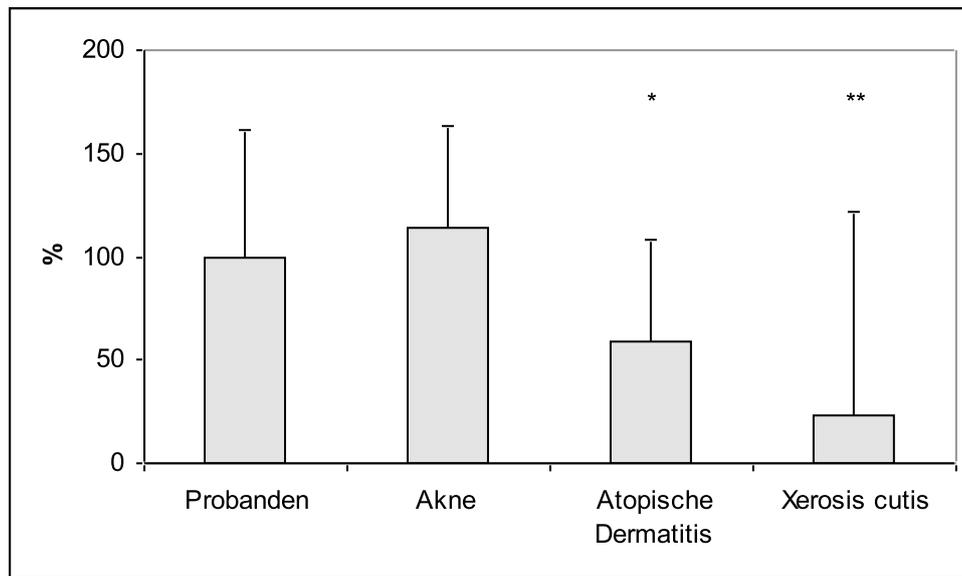


Abb. 3.2.2.1.1: Squalengehalt im Sebum (Lösungsmittel: Aceton) aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe (100 %); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis unterschied sich signifikant von dem der Probanden (Abb. 3.2.2.1.2). Der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis betrug -37 % ($p < 0,05$) im Vergleich zu der Probandengruppe. Der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten mit Xerosis cutis betrug -50 % im Vergleich zu der Probandengruppe, war jedoch statistisch nicht signifikant.

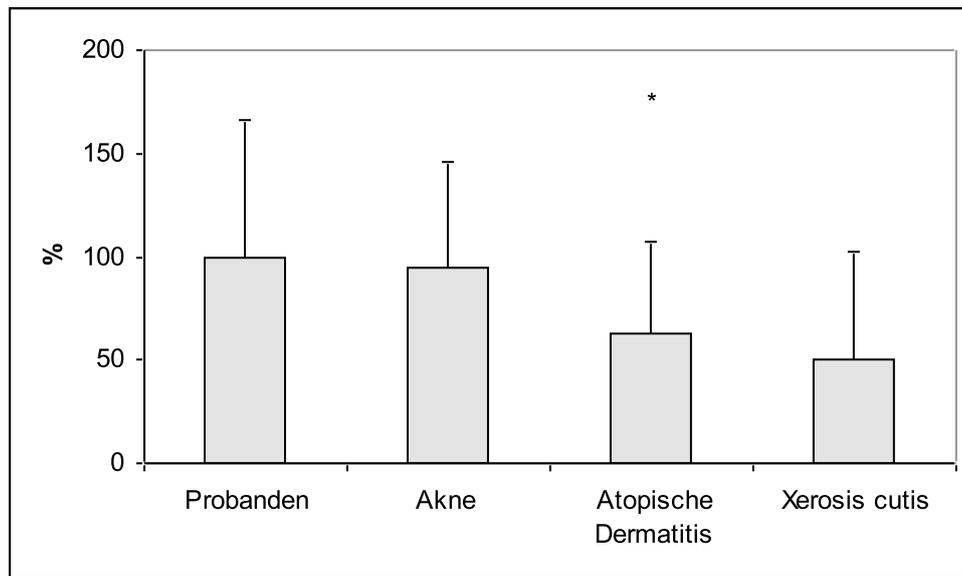


Abb. 3.2.2.1.2: Cholesterolgehalt im Sebum (Lösungsmittel: Aceton) aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte +SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe (100 %); * $p < 0,05$.

Die Relation zwischen den Lipidfraktionen Squalen und Cholesterol verschob sich bei den Patienten mit Xerosis Cutis signifikant zu Gunsten des Cholesterols ($p < 0,01$) im Vergleich zur Probandengruppe (Abb. 3.2.2.1.3).

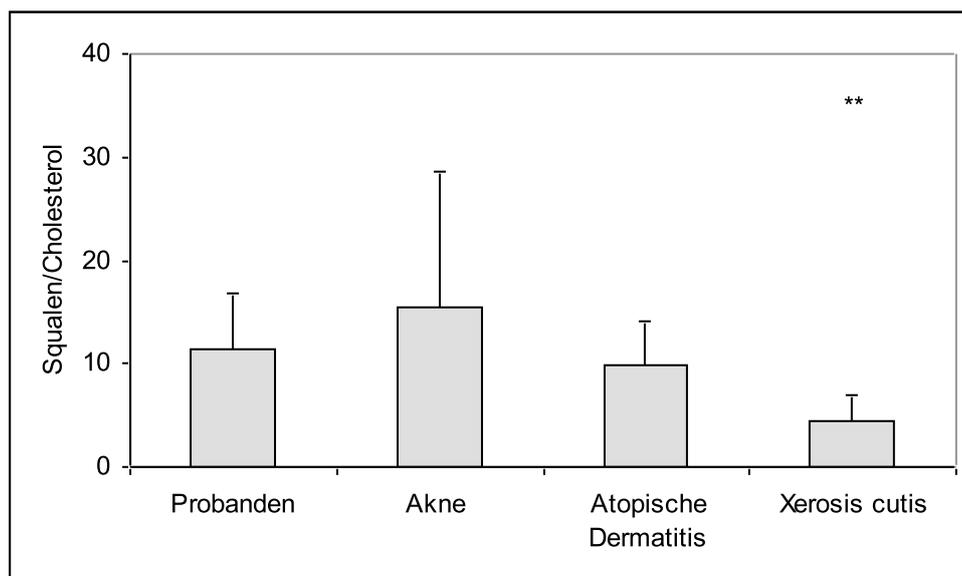


Abb. 3.2.2.1.3: Squalen/Cholesterol-Ratio im Sebum (Lösungsmittel: Aceton) aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt ist der Quotient von Squalen und Cholesterol +SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe; * $p < 0,01$.

3.2.2.2 n-Hexan

In den n-Hexanproben der Patienten und Probanden wurden jeweils die Lipidfraktionen Squalen und Cholesterol bestimmt.

Der Squalengehalt im Sebum der Patienten mit Xerosis cutis unterschied sich signifikant von dem der Probanden (Abb. 3.2.2.2.1). Der Squalengehalt im Sebum der Patienten mit Xerosis cutis betrug -70 % ($p < 0,05$) im Vergleich zu der Probandengruppe. Der Squalengehalt im Sebum der Aknepatienten betrug +36 % im Vergleich zur Probandengruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

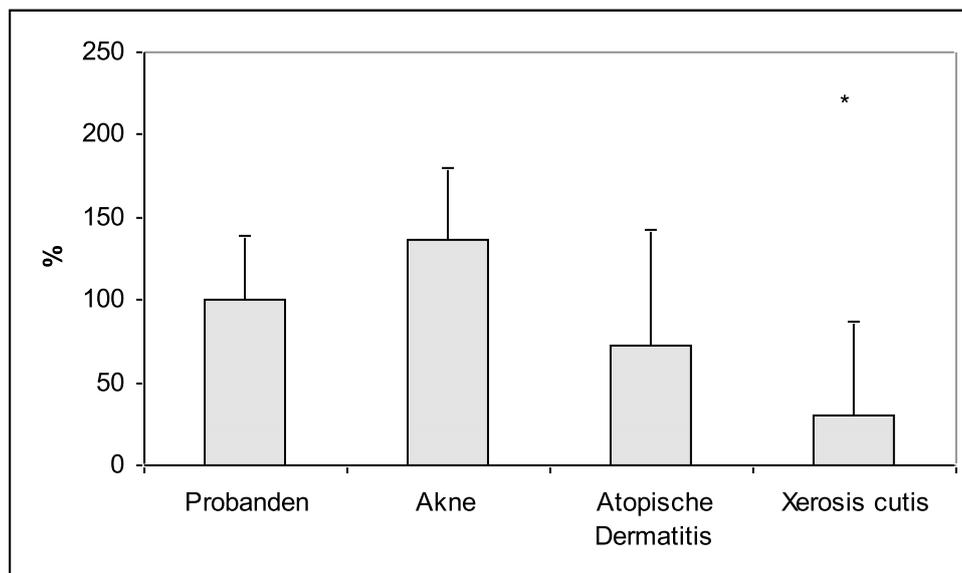


Abb. 3.2.2.2.1: Squalengehalt im Sebum (Lösungsmittel: n-Hexan) aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte +SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe (100 %); * $p < 0,05$.

Der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten unterschied sich nicht signifikant von dem der Probanden (Abb. 3.2.2.2.2). Der Cholesterolgehalt im Sebum der Aknepatienten betrug +40 %, der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis betrug -10 % und der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten mit Xerosis cutis betrug -50 % im Vergleich zur Probandengruppe. Jedoch war keiner dieser Effekte statistisch signifikant.

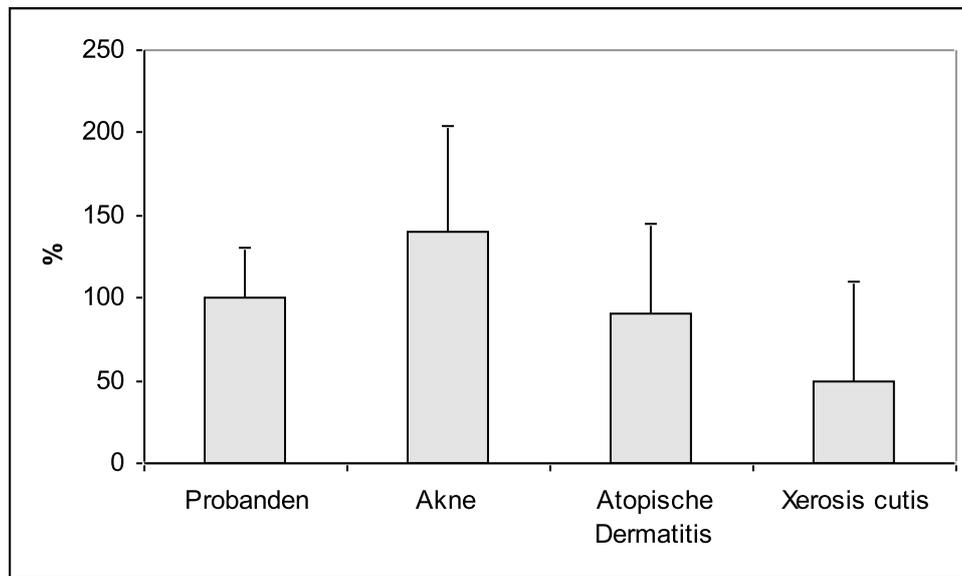


Abb. 3.2.2.2.2: Cholesterolgehalt im Sebum (Lösungsmittel: *n*-Hexan) aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte +SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe (100 %).

Die Relation zwischen den Lipidfraktionen Squalen und Cholesterol änderte sich nicht bei den verschiedenen Patientengruppen im Vergleich zu den Probanden (Abb. 3.2.2.2.3).

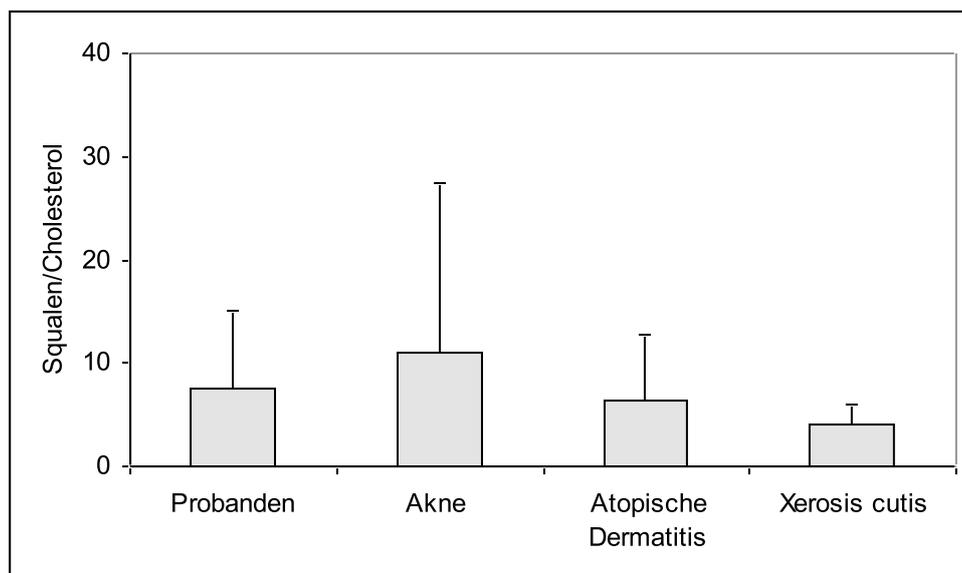


Abb. 3.2.2.2.3: Squalen/Cholesterol-Ratio im Sebum (Lösungsmittel: *n*-Hexan) aufgeteilt nach den untersuchten Gruppen. Dargestellt ist der Quotient von Squalen und Cholesterol +SD der Patientengruppen in Relation zur Probandengruppe.

3.2.3 CRH Bestimmung im Patientensebum

Mit dem CRH-ELISA ließ sich weder in den Acetonproben noch in den n-Hexanproben der Probanden und Patienten CRH nachweisen.

4 Diskussion

4.1 Diskussion – Experimenteller Teil

4.1.1 Zytotoxizität

Alle Substanzen mit denen die SZ95-Sebozyten und HaCaT-Keratinozyten behandelt wurden, sind auf ihre Zytotoxizität getestet worden. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass mit 10^{-7} M CRH, Urocortin, Urotensin und Sauvagin die maximale Konzentration verwendet wurde, die nicht toxisch für die SZ95-Sebozyten und die HaCaT-Keratinozyten ist. Trotzdem waren bei diesen Konzentrationen bereits Effekte zu erwarten. Diese Annahme stützte sich auf die publizierten Versuche zur Stimulation der Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten durch CRH mit einer maximalen Stimulation bei 10^{-7} M (Zouboulis et al. 2002). Beim α -helicalen CRF konnte sogar mit einer maximalen Konzentration von 10^{-6} M gearbeitet werden, da es erst ab einer Konzentration von 10^{-5} M toxisch auf die SZ95-Sebozyten wirkt. Aufgrund der Versuchsanordnung in 96er-Mikrotiterplatten wurden für die Proliferationsassays sowie zur Messung der Zytokinsynthese Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-7} M verwendet, während beim CRH-Antagonisten α -helicalen CRF mit Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-6} M gearbeitet wurde.

4.1.2 Proliferation

Die Proliferation der SZ95-Sebozyten wurde durch CRH und Urocortin dosisabhängig an Tag 5 gehemmt. Durch CRH kam es zu einer signifikant stärkeren Proliferationshemmung als durch Urocortin. Interessant ist hierbei, dass der stärkste Effekt mit einer Proliferationsabnahme von 14 % im Vergleich zur Kontrolle durch 10^{-8} M CRH erreicht wurde, während mit 10^{-7} M Urocortin nur eine maximale Proliferationsabnahme von 7 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht wurde. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass CRH einen stärkeren Effekt als Urocortin auf die Proliferation der SZ95-Sebozyten zu haben scheint, auch wenn beide Peptide eine pro-

liferationshemmende Wirkung entfalten. Ein Erklärungsansatz hierfür ergibt sich aus der unterschiedlichen Rezeptoraffinität und Potenz an den CRH-Rezeptoren von CRH und Urocortin. Zwar binden beide Peptide mit einer ähnlichen Affinität an den CRH-R1, allerdings kommt es durch das Urocortin zusätzlich zu einer stärkeren Stimulation des CRH-R2. Des Weiteren ist die CRH-Signaltransduktion durch den CRH-R1 effektiver als durch Urocortin (Chalmers et al. 1996; Perrin und Vale 1999). Dies könnte dafür sprechen, dass die Proliferationshemmung vor allem durch die Aktivierung des CRH-R1 zustande kommt und CRH durch die bessere Effektivität bei der Signalübertragung zu einem stärkeren Effekt führt. Auch kann die stärkere Aktivierung des CRH-R2 zu einer Abschwächung des Effektes auf die Proliferation durch das Urocortin führen. Die Annahme, dass die Proliferationshemmung durch CRH und Urocortin hauptsächlich über den CRH-R1 zustande kommt, wird auch dadurch gestützt, dass es bei der Behandlung der SZ95-Sebozyten mit Urotensin und Sauvagin zu keiner Veränderung der Proliferationsrate gekommen ist. Diese Peptide wirken deutlich weniger potent am CRH-R1, auch wenn die Bindungsaffinität von Sauvagin an diesen Rezeptor ähnlich der von CRH und Urocortin ist (Wei et al. 1998).

Der proliferationshemmende Effekt von CRH auf die SZ95-Sebozyten ließ sich dosisabhängig durch den peptidischen CRH-Rezeptorantagonisten α -helicaler CRF aufheben. Die optimale Dosis lag bei 10^{-8} M α -helicalen CRF. Dagegen konnte der proliferationshemmende Effekt von Urocortin auf die SZ95-Sebozyten nicht durch den peptidischen CRH-Rezeptorantagonisten α -helicaler CRF aufgehoben werden. Eventuell kann dies auf eine Störwirkung des Signaltransduktionsweges durch die stärkere Aktivierung des CRH-R2 durch das Urocortin zurückgeführt werden.

Auf die Proliferation der HaCaT-Keratinocyten hatten CRH- und die CRH-ähnlichen Peptide Urocortin, Urotensin und Sauvagin keinen Effekt. Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen an humanen Keratinocyten und HaCaT-Keratinocyten. So konnten ZBYTEK et al. (2006) zeigen, dass CRH dosisabhängig einen proliferationshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten ausübt, wobei die benötigte Dosis zur Proliferationshemmung abhängig von der Calciumkonzentration im Serum war. Auch konnten SLOMINSKI et al. (2006) einen proliferati-

onshemmenden Effekt von CRH auf humane Keratinozyten nachweisen. Eine Erklärung dafür könnte eine eventuelle Veränderung der HaCaT-Zelllinie sein, da es beim Passagieren der Zellen immer wieder zu Mutationen kommen kann, so dass diese Zellen leicht veränderte Eigenschaften aufweisen können. Die mit $<0,1$ mM sehr niedrige Calciumkonzentration des von uns verwendeten Serums, ist eine weitere Möglichkeit weswegen ein proliferationshemmender Effekt durch CRH bei unseren Untersuchungen nicht aufgetreten ist. Außerdem müssen die verschiedenen Versuchsaufbauten beachtet werden: So wurden von SLOMINSKI et al. (2006) und ZBYTEK et al. (2006) die Zellen alle 12 h behandelt und die Zellzahl 48 h nach Beginn der Behandlung bestimmt. In unseren Proliferationsassays wurden die Zellen alle 48 h mit frischem Medium sowie den zu untersuchenden Substanzen behandelt und die Zellzahlbestimmung nach 24 h, 72 h und 120 h durchgeführt. Eventuell führen auch die anderen Untersuchungszeitpunkte und die selteneren Gaben der zu prüfenden Substanzen zu der Diskrepanz der Ergebnisse.

4.1.3 Zytokinfreisetzung

Untersucht wurde der Effekt von CRH und den CRH-ähnlichen Peptiden Urocortin, Urotensin und Sauvagin auf die Zytokinfreisetzung von SZ95-Sebozyten und HaCaT-Keratiozyten. Bestimmt wurden die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8.

4.1.3.1 IL-1

IL-1 α und IL-1 β gehören zur IL-1 Familie. Es handelt es sich dabei um proinflammatorische Zytokine, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion lokal und systemisch wirken. Die Synthese von IL-1 kann durch andere Zytokine, bakterielle Endotoxine und Viren induziert werden. Sie werden von fast allen kernhaltigen weißen Blutzellen sowie von diversen Endothel- und Epithelzellen ausgeschüttet. IL-1 wirkt hauptsächlich aktivierend auf T-Helfer-Zellen, auf NK-Zellen, auf Langerhans-Zellen, auf die Proliferation und Immunglobulinsynthese von B-Zellen und ist chemotaktisch für Leukozyten (Brazel et al. 1991; Fibbe et al. 1989). Des Weiteren stimuliert IL-1 die Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen (Hermus und Sweep 1990, Kariagina et al. 2004). Synergistisch mit anderen Zytokinen sind sie potente Mediatoren der Immunantwort.

Weder CRH noch Urocortin, Urotensin oder Sauvagin bewirkten eine vermehrte Ausschüttung von IL-1 α und IL-1 β durch die SZ95-Sebozyten im Vergleich zur Kontrolle. Auch kam es zu keiner vermehrten oder verminderten Freisetzung von IL-1 α und IL-1 β durch die Behandlung mit CRH und den CRH-ähnlichen Peptiden durch die HaCaT-Keratinocyten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungsergebnissen, die zeigen, dass IL-1 α und IL-1 β in die Differenzierung von Keratinocyten involviert sind und von Sebozyten unter Stressbedingungen ausgeschüttet werden (Zouboulis et al. 2005, Zouboulis et al. 1998). Daher ist es nicht zu erklären, warum dieser Effekt nicht durch CRH oder die CRH-ähnlichen Peptide induziert sein soll.

4.1.3.2 IL-6

IL-6 gehört ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird auch als „das Protein“ der akuten Phase bezeichnet. Die akute Phase Reaktion ist die Antwort eines Organismus auf eine Störung der Homöostase aufgrund von Infektion, immunologischem Geschehen, Verletzung oder neoplastischen Wachstums mit dem Ziel die physiologische Homöostase wiederherzustellen. Hierbei kommt es zu einer lokalen Reaktion mit der Aktivierung von immunologisch aktiven Zellen sowie zur Zytokinausschüttung. Diese zieht eine systemische Reaktion nach sich. Unter anderem kommt es zu einer vermehrten Produktion von Cortisol (Heinrich et al. 1990). Ebenso wie IL-1 stimuliert IL-6 die Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen (Hermus und Sweep 1990, Kariagina et al. 2004, Mastorakos et al. 1993). Gleichzeitig hemmt ACTH die Produktion von IL-1, IL-6 sowie TNF- α im Sinne eines negativen Feedbacks (Chesnokova und Melmed 2002).

CRH bewirkte eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 durch die SZ95-Sebozyten. Die maximale IL-6 Freisetzung wurde mit +24 % im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 10^7 M erreicht. Auch Urocortin bewirkte eine vermehrte Freisetzung von IL-6 durch die SZ95-Sebozyten, jedoch war dieser Effekt im Gegensatz zum CRH statistisch nicht signifikant. Dagegen bewirkten Urotensin und Sauvagin keine vermehrte IL-6 Ausschüttung durch die SZ95-Sebozyten. Auf die Ausschüttung von IL-6 durch die HaCaT-Keratinocyten hatten CRH sowie die CRH-ähnlichen Peptide Urocortin, Urotensin und Sauvagin keinen Effekt. Dies spricht für eine hauptsächliche Aktivierung von CRH-R1 bei der Ausschüttung von IL-6 durch die SZ95-Sebozyten.

Der Effekt von CRH auf die Ausschüttung von IL-6 durch die SZ95-Sebozyten ließ sich dosisabhängig in Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-7} M durch den peptidischen CRH-Rezeptor-antagonisten α -helicaler CRF aufheben. Die optimale Dosis lag bei 10^{-7} M α -helicalen CRF, wobei die IL-6 Freisetzung sogar unter die Kontrolle fiel.

4.1.3.3 IL-8

Beim IL-8 handelt es sich um ein Chemokin, da es chemotaktisch auf annähernd alle migrationsfähigen Immunzellen wirkt. Es unterscheidet sich von allen anderen Zytokinen dadurch, dass es in der Lage ist neutrophile Granulozyten spezifisch zu aktivieren (Gimbrone et al. 1989). IL-8 wirkt darüber hinaus antiinflammatorisch und hemmt die Histaminausschüttung durch Basophile (Kuna et al. 1991). IL-8 scheint eine zentrale Rolle bei Regulation der Entzündungsreaktion zu spielen.

CRH bewirkte eine vermehrte Ausschüttung von IL-8 durch die SZ95-Sebozyten. Die maximale IL-8 Freisetzung wurde mit +15 % im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 10^{-7} M erreicht. Dagegen bewirkten Urocortin, Urotensin und Sauvagin keine vermehrte IL-8 Ausschüttung durch die SZ95-Sebozyten. Auf die Ausschüttung von IL-8 durch die HaCaT-Keratinocyten hatten CRH sowie die CRH-ähnlichen Peptide Urocortin, Urotensin und Sauvagin keinen Effekt.

Der Effekt von CRH auf die Ausschüttung von IL-8 durch die SZ95-Sebozyten ließ sich dosisabhängig in Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-7} M durch den peptidischen CRH-Rezeptor-antagonisten α -helicaler CRF aufheben. Die optimale Dosis lag bei 10^{-7} M α -helicalen CRF. Auch dies spricht für die hauptsächliche Aktivierung des CRH-R1 bei der Steigerung der IL-8 Ausschüttung durch das CRH. Ebenso wie beim IL-6 würde dies erklären warum Urocortin sowie Urotensin und Sauvagin zu keiner Steigerung der IL-8 Freisetzung durch die SZ95-Sebozyten führen.

4.2 Diskussion – Klinischer Teil

4.2.1 Probanden- und Patientendaten

Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 41,7 Jahre, wobei diese Zahl dem ungefähren Altersdurchschnitt von 42,62 Jahren der Bevölkerung in der Bundesrepublik Deutschland entspricht (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2007). Das Durchschnittsalter der Patienten mit atopischer Dermatitis betrug 45,9 Jahre und unterschied sich nicht signifikant vom Durchschnittsalter der Probanden. Die Patienten mit Akne waren im Schnitt mit 22,5 Jahren deutlich jünger, was damit zu begründen ist, dass Akne hauptsächlich ein Krankheitsbild des juvenilen Alters ist. Dahingegen waren die Patienten mit Xerosis cutis im Schnitt mit 67,8 Jahren deutlich älter, da dies wiederum ein Krankheitsbild des Senium ist. Unter den Patienten und Probanden waren deutlich mehr Frauen als Männer, was unserer Meinung nach damit zu erklären ist, dass Frauen tendenziell eher bereit sind an Studien teilzunehmen als Männer. Allerdings gestaltete es sich insgesamt sehr schwierig Probanden und vor allem Patienten zu rekrutieren, da es keine finanzielle Entschädigung für die Studienteilnahme gab und diese mit einem Zeitaufwand von ca. 1 h pro Person verbunden war. Des Weiteren nehmen viele Frauen im gebärfähigen Alter hormonelle Kontrazeptiva ein, was jedoch ein Ausschlusskriterium für die Studie war. Insgesamt konnten durch die Rekrutierung im Bekanntenkreis deutlich mehr Probanden rekrutiert werden als Patienten. Trotz der geringen Fallzahlen bei den Patienten mit Akne und vor allem bei denen mit Xerosis cutis waren die Ergebnisse größtenteils statistisch signifikant.

4.2.2 Ergebnisse der Messung der Hautoberflächenlipide

Der Lipidgehalt und die Lipidproduktion der Aknepatienten war zu den entsprechenden Zeitpunkten $t=0$ sowie $t=30$ min signifikant höher als der Lipidgehalt und die Lipidproduktion der Probanden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur, wonach Aknepatienten im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Sebumexkretionsrate aufweisen und war nicht anders zu erwarten (Pochi und Strauss 1974). Dahingegen war der Lipidgehalt und die Lipidproduktion der Patienten mit Xerosis cutis signifikant niedriger zu den entsprechenden Zeitpunkten $t=0$ sowie $t=30$ min als

der Lipidgehalt und die Lipidproduktion der Probanden. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit dem Lehrbuchwissen, da das Charakteristikum dieser Erkrankung eine sehr trockene Haut und damit eine verringerte Lipidproduktion ist. Im Gegensatz zur vorherrschenden Meinung in der Literatur (Sator et al. 2003, Yamamoto et al. 1991) zeigte sich zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der Lipidproduktion von Patienten mit atopischer Dermatitis und den gesunden Probanden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Patienten zum Untersuchungszeitpunkt keine ekzematösen Läsionen der Gesichtshaut zeigten. Laut DI NARDO et al. (1998) scheint bei Patienten ohne aktive atopische Herde die epidermale Barriere normal zu sein und sich das Level der Ceramide und des Cholesterols nicht von dem gesunder Patienten zu unterscheiden, während dies bei Patienten mit ekzematösen Läsionen der Fall ist. Des Weiteren beschreiben TAGAMI et al. (2006), dass bei atopischer Dermatitis zwischen einer „normalen atopischen Haut“ und einer „trockenen atopischen Haut“ unterschieden werden kann, wobei nur bei der „trockenen atopischen Haut“ eine Reduktion des Lipidgehalts, der Ceramidfraktion insbesondere von Ceramid-1 sowie von hydrophilen Aminosäuren zu finden ist. Die „normale atopische Haut“ unterscheidet sich hinsichtlich dieser Punkte nicht von der Haut Gesunder. In der Patientengruppe mit atopischer Dermatitis könnte ein sehr hoher Anteil von Patienten mit „normaler atopischer Haut“ gewesen sein, was erklären würde, warum es keinen Unterschied im Lipidgehalt und in der Lipidproduktion im Vergleich zu den gesunden Probanden gab.

4.2.3 Ergebnisse der Messung der Lipidfraktionen

Die epidermalen Lipide lassen sich aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften in polare und neutrale Lipide sowie in Sphingolipide unterteilen. Zu den polaren Lipiden gehören Cholesterolsulfat und Phospholipide, zu den neutralen Lipiden Sterole, n-Alkane, Squalen, Triglyceride sowie freie Fettsäuren und zu den Sphingolipiden Ceramide sowie Glycosphingolipide. Die prozentuale Zusammensetzung der epidermalen Lipide unterscheidet sich je nach Körperregion. So konnten LAMPE et al. (1983) zeigen, dass die Lipidzusammensetzung im Gesicht zu ca. 66,4 % aus neutralen Lipiden, zu ca. 26,5 % aus Sphingolipiden, zu 3,3 % aus polaren Lipiden und zu 2,7 % aus Cholesterolsulfat besteht.

Cholesterolsulfat entsteht durch die Sulfatierung von Cholesterol mit 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS), dem eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der physiologischen Barriere der Haut zugeschrieben wird. Allerdings ist bis heute die physiologische Funktion des Cholesterolsulfates nicht abschließend geklärt. Cholesterol ist nicht charakteristisch für die Talgdrüse, sondern kommt auch in anderen Organen des menschlichen Körpers als Bestandteil von Zellmembranen vor. Das im menschlichen Sebum vorkommende Cholesterol ist überwiegend keratinozytärer Herkunft.

Beim Squalen handelt es sich um eine Zwischenstufe der Cholesterinbiosynthese. Seinen Namen verdankt es seinem Vorkommen im Haifischleberöl (*Squalus pp.*), welches die größte natürliche Quelle für Squalen darstellt. Ein hoher Squalengehalt ist charakteristisch für die menschliche Talgdrüse, da es hier nur zu einer geringen Umwandlung in Cholesterol kommt. Das im Sebum vorkommende Squalen ist überwiegend sebozytärer Herkunft. Squalen scheint eine schützende Funktion auf die Haut bei oxidativem Stress wie z. B. der Belastung durch UV-Strahlung auszuüben (Kohno Y. et al. 1995). Aus diesem Grund spielt Squalen bei der Herstellung von Hautpflegeprodukten eine sehr große Rolle.

Als Lösungsmittel wurden für die Lipidextraktion Aceton und n-Hexan verwendet. Aceton und n-Hexan unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Polarität voneinander. Beim Aceton handelt es sich im Gegensatz zum unpolaren n-Hexan um ein polares Lösungsmittel. Das heißt, dass sich die polaren Lipide, zu denen Cholesterol zählt, besser im Aceton lösen lassen sollten, während Squalen als neutrales Lipid besser vom n-Hexan zu lösen sein sollte.

Beim Lösungsmittel Aceton war der Squalengehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis und Xerosis cutis signifikant reduziert im Vergleich zum Squalengehalt der Probanden. Auch beim Lösungsmittel n-Hexan unterschied sich der Squalengehalt der Patienten mit Xerosis cutis signifikant von dem der Probanden, während bei den Patienten mit atopischer Dermatitis der Squalengehalt zwar auch deutlich niedriger, dieser Wert jedoch statistisch nicht signifikant war. Dahingegen war der Squalengehalt im Sebum der Aknepatienten im Vergleich zur Probanden-

gruppe bei beiden Lösungsmitteln erhöht, jedoch war auch dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Beim Lösungsmittel Aceton war der Cholesterolgehalt im Sebum der Patienten mit atopischer Dermatitis signifikant reduziert im Vergleich zum Cholesterolgehalt der Probanden. Auch der Cholesterolgehalt der Patienten mit Xerosis cutis war deutlich niedriger als bei den Probanden, jedoch war der Effekt statistisch nicht signifikant. Bei den Aknepatienten gab es keinen Unterschied hinsichtlich des Cholesterolgehaltes im Vergleich zu den Probanden. Dahingegen zeigte sich beim n-Hexan als Lösungsmittel ein erhöhter Cholesterolgehalt im Sebum der Aknepatienten im Vergleich zum Probandenkollektiv, dieser erwies sich jedoch als nicht signifikant. Bei den Patienten mit atopischer Dermatitis und Xerosis cutis war der Cholesterolgehalt reduziert, doch auch hier ohne statistische Signifikanz.

Da die beiden Lösungsmittel hintereinander aufgetragen wurden, ist es möglich, dass die gelösten Lipidfraktionen im n-Hexan als zweitem Lösungsmittel nicht mehr der tatsächlichen Zusammensetzung vor dem Beginn der Lipidextraktion entsprachen wie beim Aceton als erstem Lösungsmittel. Dies könnte die Diskrepanz in der Lipidzusammensetzung zwischen den beiden Lösungsmitteln erklären.

Auch qualitativ änderte sich die Zusammensetzung des Sebums hinsichtlich der beiden Lipidfraktionen kaum. Nur bei den Patienten mit Xerosis cutis zeigte sich beim Lösungsmittel Aceton eine signifikante Verschiebung zu Gunsten des Cholesterols.

In der Literatur werden zum Squalen- und Cholesterolgehalt bei Aknepatienten verschiedene Angaben gemacht. So fanden sich laut RUNKEL et al. (1969) und STRAUSS et al. (1975) keine signifikanten Unterschiede in der Lipidzusammensetzung von Aknepatienten und gesunden Probanden. Dahingegen konnten GLOOR et al. (1972) sowie TRONNIER und BRUNN (1972) einen erhöhten Squalen- und Triglyceridgehalt sowie eine Verminderung der freien Fettsäuren in den Hautoberflächenlipiden von Aknepatienten nachweisen. Allerdings konnten WEEKS et al. (1977) nachweisen, dass Lipaseinhibitoren keine Wirksamkeit bei Akne vulgaris zeigen, was den

Zusammenhang zwischen der Lipidzusammensetzung und der Ätiopathogenese der Akne in den Hintergrund treten lassen.

Aufgrund der geringen Fallzahl in der eigenen Untersuchung mit der damit verbundenen geringen Signifikanz kann keine abschließende Aussage dazu gemacht werden.

4.2.4 CRH-Nachweis im Patienten- und Probandensebum

Eine der zentralen Fragestellungen des klinischen Teils dieser Arbeit war der Zusammenhang zwischen der CRH-Konzentration im Patientensebum und der SER sowie der Lipidzusammensetzung bei den verschiedenen Patientengruppen. Leider ließ sich in den gesammelten Sebumproben kein CRH nachweisen. Vor dem Beginn der Untersuchungen konnten wir CRH per ELISA in Aceton- und n-Hexanproben nachweisen, die wir selbst hergestellt hatten. An einer Interaktion zwischen dem Lösungsmittel und den Chemikalien des CRH-ELISAs von Bachem, der nicht für Lösungsmittel zugelassen ist, kann der fehlende Nachweis von CRH im Patienten- und Probandensebum demnach wahrscheinlich nicht liegen.

Der Grund für den fehlenden Nachweis von CRH muss darin begründet sein, dass kein CRH im uns noninvasiv zugänglichem Sebum vorhanden ist bzw. sehr schnell abgebaut wird oder aber dass eine Ausschüttung von CRH durch die Sebozyten unterbleibt und sich auch kein CRH im Infundibulum der Talgdrüse befindet.

In unpublizierten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte kein Nachweis von CRH im Zellüberstand von SZ95-Sebozyten erbracht werden. Außer der Untersuchung von PERONE et al. (1998), in der gezeigt werden konnte, dass CRH nach seiner Ausschüttung durch transfektierte COS7 Zellen, eine Fibroblastenzelllinie gewonnen aus dem Nierengewebe von grünen Meerkatzen, sehr schnell abgebaut wird, gibt es unseres Wissens nach keinerlei Nachweise einer CRH-Sekretion durch bedeutende Hautzellen. KEMPURAJ et al. (2004) zeigten, dass Mastzellen CRH speichern und es bei einer Aktivierung des IgE-Rezeptors zu einer Sekretion von CRH kommt. Der Trigger

für die Ausschüttung von CRH durch Sebozyten und andere Hautzellen ist bisher noch nicht gefunden worden.

In einer neuen Untersuchung konnten GANCEVICIENE et al. (2009) mittels Immunhistochemie eine starke Reaktion für CRH in Biopsien der Gesichtshaut von Aknepatienten nachweisen, während die Reaktion in gesunder Gesichtshaut schwächer ausfiel. Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass CRH im Sebum zu finden sein müsste, jedoch wahrscheinlich zu schnell abgebaut wird, um es mit den hier verwendeten Methoden nachzuweisen.

Aufgrund des fehlenden Nachweises von CRH im Patienten- und Probandensebum wurde das Sammeln von Proben eingestellt, da kein weiterer Benefit durch die Untersuchung von weiteren Proben zu erwarten war.

4.3 **Ausblick**

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann abgeleitet werden, dass CRH auf die menschlichen Talgdrüsen proliferationshemmend und durch die Ausschüttung der Zytokine IL-6 und IL-8 proinflammatorisch wirkt. Die Steigerung der Lipidsynthese von humanen Sebozyten durch CRH wurde bereits in einer früheren Arbeit gezeigt (Zouboulis et al, 2002). Dass diese Effekte spezifisch für CRH sind, konnte durch das Aufheben der Proliferationshemmung und Zytokinfreisetzung durch den peptidischen CRH Rezeptorantagonisten α -helicaler CRF gezeigt werden. Da es sich dabei um einen nonselektiven CRH-Rezeptorantagonisten handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden, über welchen Rezeptor diese Effekte hauptsächlich reguliert werden. Vieles spricht hauptsächlich für den CRH-R1, jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, um die genauen molekularbiologischen Vorgänge bis ins kleinste Detail zu klären und eine effektive Blockade dieser Effekte zu gewährleisten.

Leider konnte im klinischen Teil unserer Arbeit der Zusammenhang zwischen dem CRH-Gehalt im menschlichen Sebum und der Sebumexkretionsrate sowie der Lipidzusammensetzung nicht geklärt werden. Höchstwahrscheinlich lag dies daran, dass CRH extrazellulär zu schnell abgebaut wird, um es im Sebum nachzuweisen. Weitere Versuche eines Nachweises von CRH ließen sich aber nur durch invasive Untersuchungen von Hautbiopsien von gesunder und erkrankter Haut führen. In einer neuen Untersuchung konnte mittels Immunhistochemie gezeigt werden, dass in Hautbiopsien von Aknepatienten eine stärkere Reaktion auf CRH in allen Bereichen der Talgdrüse zu finden ist als in Hautbiopsien von gesunden Probanden (Ganceviciene et al., 2009).

Auch wenn sich eine weitere Forschung auf diesem Gebiet aufgrund der erforderlichen Invasivität der notwendigen Untersuchungen schwierig gestaltet, sind weitere Untersuchungen um den Zusammenhang von CRH und der Lipidproduktion sowie -zusammensetzung *in vivo* zu erforschen von Interesse.

5 Zusammenfassung

In vitro-Studien mit menschlichen Talgdrüsenzellen haben gezeigt, dass CRH unmittelbar die Lipidsynthese stimuliert und die Expression von 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase, welche die Umwandlung von Dehydroepiandrosteron in Testosteron fördert, beschleunigt (Zouboulis et al. 2000). Diese Ergebnisse und die Expression von CRH-, CRH-R- und CRH-BP-mRNA und Protein in Sebozyten lassen auf die Existenz eines CRH/CRH-R-Systems in humanen Sebozyten schließen und vermuten, dass sebozytäres CRH die Quelle einer parakrinen Regulation des kutanen CRH/POMC-Systems sein könnte. Es wurde postuliert, dass die Haut über ein mit der HPA-Achse vergleichbares System verfügt, welches möglicherweise im Rahmen einer lokalen Stressreaktion der Haut aktiviert wird. Diese Untersuchungsergebnisse implizieren die Beteiligung von CRH in der Entstehung von Hauterkrankungen, welche mit einer gestörten Lipidproduktion der Talgdrüsen wie z. B. Akne, Seborrhoe und androgenetische Alopezie einhergehen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im experimentellen Teil mit der Wirkung von CRH und den CRH-ähnlichen Peptiden Urocortin, Urotensin und Sauvagin auf die Proliferation und die Zytokinfreisetzung von menschlichen Talgdrüsenzellen und Keratinozyten. Im klinischen Teil sollte versucht werden CRH aus dem Sebum von Probanden und Patienten mit atopischer Dermatitis, Akne sowie Xerosis cutis zu extrahieren, um dann den Zusammenhang mit der Sebumexkretionsrate zu untersuchen. Des Weiteren wurden die Lipidfraktionen Squalen und Cholesterol bei den Probanden und Patienten bestimmt.

CRH und Urocortin bewirkten dosisabhängig eine Proliferationshemmung der SZ95-Sebozyten an Tag 5. Darüber hinaus führte die Behandlung mit CRH nach 24 h zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-6 und IL-8 durch die SZ95-Sebozyten. Der proliferationshemmende und zytokin-freisetzende Effekt von CRH auf die SZ95-Sebozyten konnte dosisabhängig durch den peptidischen CRH Rezeptorantagonisten α -helicaler CRF aufgehoben werden.

In die klinische Studie wurden 17 Probanden, 10 Patienten mit Akne, 14 Patienten mit atopischer Dermatitis und 5 Patienten mit Xerosis cutis aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass

Patienten mit Akne eine erhöhte und Patienten mit Xerosis cutis eine reduzierte Sebumexkretionsrate aufweisen. Tendenziell scheinen Patienten mit Xerosis cutis und atopischer Dermatitis einen reduzierten Squalen- und Cholesterolgehalt aufzuweisen, allerdings waren die Ergebnisse aufgrund der geringen Teilnehmerzahl nur bedingt statistisch signifikant. Die Qualität der Lipidfraktionen verschob sich bei den Patienten mit Xerosis cutis zu Gunsten des Cholesterols. Im Sebum der Probanden und Patienten konnte kein CRH nachgewiesen werden.

Um den Zusammenhang von CRH und der Lipidproduktion sowie -zusammensetzung *in vivo* zu erforschen sind weitere Untersuchungen nötig.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CRH	Corticotropin-Freisetzendes-Hormon
CRH-BP	CRH-Binding-Protein
CRH-R	CRH-Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPV	Humanes Papilloma-Virus
IL	Interleukin
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MC	Melanocortin
MSH	Melanozyten-Stimulierendes-Hormon
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
POMC	Proopiomelanocortin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SER	Sebumexkretionsrate
SV40	Simian-Virus 40
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UCT	Urocortin
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79.

Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Ergün S, Beil FU, Schulte HM: Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Feb; 83(2):708-11.

Bigliardi PL, Bigliardi-QiM, Buechner S, Sumanovski LT, Rufli T: Expression of mu-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 Aug;111(2):297-301.

Bigliardi-QiM, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi PL: Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatology.* 2004;209(3):183-9.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 Mar;106(3):761-71.

Brazel D, Nakanishi S, Oster W: Interleukin-1, characterization of the molecule, functional activity, and clinical implications. *Biotechnol Ther.* 1991;2(3-4):241-67.

Chalmers DT, Lovenberg TW, Grigoriadis DE, Behan DP, De Souza EB: Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci.* 1996 Apr;17(4):166-72.

Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW: Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 1;90(19):8967-71.

- Chesnokova V, Melmed S: Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology*. 2002 May;143(5):1571-4.
- Chrousos GP, Gold PW: The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992; 267:1244-1252.
- Conlon JM: Singular contributions of fish neuroendocrinology to mammalian regulatory peptide research. *Regul Pept*. 2000 Sep 25;93(1-3):3-12.
- Cunliffe WJ, Shuster S: Pathogenesis of acne. *Lancet*. 1969 Apr 5;1(7597):685-7.
- Dautzenberg FM, Hauger RL: The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:71-77.
- Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S: Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 1998 Jan;78(1):27-30.
- Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, et al.: Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology*. 1996 Sep;137(9):3896.
- Eckart K, Radulovic J, Radulovic M, et al.: Actions of CRF and its analogs. *Curr Med Chem*. 1999 Nov;6(11):1035-53.
- Ermak G., Slominski A: Production of POMC, CRH-R1, MC1, and MC2 receptor mRNA and expression of tyrosinase gene in relation to hair cycle and dexamethasone treatment in the C57BL/6 mouse skin. *J Invest Dermatol*. 1997 Feb;108(2):160-5.
- Fibbe WE, Schaafsma MR, Falkenburg JH, Willemze R: The biological activities of interleukin-1. *Blut*. 1989 Aug;59(2):147-56.

Ganceviciene R, Graziene V, Fimmel S, Zouboulis CC: Involvement of the corticotropin-releasing hormone system in the pathogenesis of acne vulgaris. *Br J Dermatol.* 2009 Feb;160(2):345-52.

Gloor M, Graumann U, Kionke M, Wiegand I, Friederich HC: Menge und Zusammensetzung der Hautoberflächenlipide bei Patienten mit Acne vulgaris und gesunden Vergleichspersonen. Eine Mitteilung. *Arch Dermatol Forsch.* 1972;242(3):316-22.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990 Feb 1;265(3):621-36.

Hermus AR, Sweep CG: Cytokines and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990 Dec 20;37(6):867-71.

Iino K, Sasano H, Oki Y, et al.: Urocortin expression in the human central nervous system. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999 Jan;50(1):107-14.

Inui A: Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides--mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci.* 1999 Feb;22(2):62-7.

Itoi K, Seasholtz AF, Watson SJ: Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocr J.* 1998 Feb;45(1):13-33.

Kariagina A, Romanenko D, Ren SG, Chesnokova V: Hypothalamic-pituitary cytokine network. *Endocrinology.* 2004 Jan;145(1):104-12.

Kempuraj D, Papadopoulou NG, Lytinas M, et al.: Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology* 2004; 145: 43-48.

Klinke R, Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie.* Georg Thieme Verlag, 1996/2000.

Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S, Takahashi M, Mukai K: Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Apr 28;1256(1):52-6.

Kono M, Nagata H, Umemura S, Kawana S, Osamura RY: In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin. *FASEB J*. 2001 Oct;15(12):2297-9.

Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL: Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol*. 1998 Aug;12(8):1077-85.

Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A: Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1998 Feb 2;391(1):1-10.

Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, et al.: Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res*. 1983 Feb;24(2):120-30.

Lee AK, Tse A: Mechanism underlying corticotropin-releasing hormone (CRH) triggered cytosolic Ca²⁺ rise in identified rat corticotrophs. *J Physiol*. 1997 Oct 15;504 (Pt 2):367-78.

Lerner AB, McGuire JS: Effect of alpha- and betamelanocyte stimulating hormones on the skin colour of man. *Nature*. 1961 Jan 2.1;189:176-9.

Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB: Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*. 1996 Jan;137(1):72-7.

Linton EA, Woodman JR, Asboth G, Glynn BP, Plested CP, Bernal AL: Corticotrophin releasing hormone: its potential for a role in human myometrium. *Exp Physiol* 2001; 86: 273-281.

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, et al.: Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 31;92(3):836-40.

Luger TA, Scholzen T, Brzoska T, Becher E, Slominski A, Paus R: Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 May 1;840:381-94.

Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS: Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Dec;77(6):1690-4.

Muramatsu Y, Fukushima K, Iino K, et al.: Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides*. 2000 Dec;21(12):1799-809.

Nishikimi T, Miyata A, Horio T, et al.: Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Dec; 279(6):H3031-9.

Orth DN: Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocr Rev*. 1992 May;13(2):164-91.

Owens MJ, Nemeroff CB: Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev*. 1991 Dec;43(4):425-73.

Park HJ, Kim HJ, Lee JH, et al.: Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates interleukin-18 expression in human HaCaT keratinocytes by activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Invest Dermatol*. 2005 Apr;124(4):751-5.

Park JH, Lee YJ, Na SY, Kim KL: Genomic organization and tissue-specific expression of rat urocortin. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 29;292(1):45-8.

Paus R, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Mecklenburg L., Luger T, Slominski A: The skin POMC system (SPS). Leads and lessons from the hair follicle. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Oct 20;885:350-63.

Pawelek JM, Chakraborty AK, Osber MP, et al.: Molecular cascades in UV-induced melanogenesis: a central role for melanotropins? *Pigment Cell Res.* 1992 Nov;5(5 Pt 2):348-56.

Perone MJ, Windeatt S, Morrison E, et al.: Intracellular retention of the corticotrophin-releasing hormone (CRH) precursor within COS-7 cells. *J Histochem Cytochem.* 1998 Oct;46(10):1193-7.

Perrin MH, Vale WW: Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 885:312-328.

Perrin MH, Sutton S, Bain DL, Berggren WT, Vale WW: The first extracellular domain of corticotropin releasing factor-R1 contains major binding determinants for urocortin and astressin. *Endocrinology.* 1998 Feb;139(2):566-70.

Petraglia F, Florio P, Gallo R, et al.: Human placenta and fetal membranes express human urocortin mRNA and peptide. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Oct;81(10):3807-10.

Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET: Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J.* 2001 Aug; 15(10):1678-93.

Pochi PE, Strauss JS: Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. *J Invest Dermatol.* 1974 Mar;62(3):191-201.

Runkel RA, Wurster DE, Cooper GA: Investigation of normal and acne skin surface lipids. *J Pharm Sci.* 1969 May;58(5):582-5.

Ryle CM, Breitzkreutz D, Stark HJ, et al.: Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*. 1989 Mar;40(1):42-54.

Sator PG, Schmidt JB, Hönigsmann H: Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Mar;48(3):352-8.

Slominski AT, Botchkarev V, Choudhry M, et al.: Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a "skin stress response system?". *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Oct 20;885:287-311.

Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M: Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett*. 1995 Oct 23;374(1):113-6.

Slominski A, Mihm MC: Potential mechanism of skin response to stress. *Int J Dermatol*. 1996 Dec;35(12):849-51.

Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J: Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 2004; 145: 941-950.

Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S: Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev*. 2000 Jul; 80(3):979-1020.

Slominski A, Zbytek B, Pisarchik A, Slominski RM, Zmijewski MA, Wortsman J: CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206(3):780-91.

Slominski A, Zbytek B, Zmijewski M, et al.: Corticotropin releasing hormone and the skin. *Front Biosci*. 2006 Sep 1;11:2230-48.

Strauss JS, Pochi PE, Downing DT: Skin lipids and acne. *Annu Rev Med.* 1975;26:27-32.

Tagami H, Kobayashi H, O'goshi K, Kikuchi K: Atopic xerosis: employment of noninvasive biophysical instrumentation for the functional analyses of the mildly abnormal stratum corneum and for the efficacy assessment of skin care products. *J Cosmet Dermatol.* 2006 Jun;5(2):140-9.

Tronnier H, Brunn G: Vergleichsuntersuchungen des Hautoberflächenfettes Hautgesunder und Akneerkrankter. *Berufsdermatosen.* 1972 Apr;20(2):79-88.

Valdenaire O, Giller T, Breu V, Gottowik J, Kilpatrick G: A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochim Biophys Acta.* 1997 May 30;1352(2):129-32.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, et al.: Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature.* 1995 Nov 16;378(6554):287-92.

Vita N, Laurent P, Lefort S, et al.: Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett.* 1993 Nov 29;335(1):1-5.

Wanner R, Wolff B, Glowacki F, Kolde G, Wittig B. The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCaT keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res.* 1999 Jun;291(6):346-53.

Weeks JG, McCarty L, Black T, Fulton JE Jr.: The inability of a bacterial lipase inhibitor to control acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* 1977 Aug;69(2):236-43.

Wei ET, Thomas HA, Christian HC, Buckingham JC, Kishimoto T: D-amino acid-substituted analogs of corticotropin-releasing hormone (CRH) and urocortin with selective agonist activity at CRH1 and CRH2beta receptors. *Peptides.* 1998;19(7):1183-90.

Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y: Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 1991;283(4):219-23.

Yamamoto H, Maeda T, Fujimura M, Fujimiya M: Urocortin-like immunoreactivity in the substantia nigra, ventral tegmental area and Edinger-Westphal nucleus of rat. *Neurosci Lett.* 1998 Feb 27;243(1-3):21-4.

Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J: Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci.* 2002 Jan 18;70(9):1013-21.

Zbytek B, Pfeffer LM, Slominski AT: Corticotropin-releasing hormone stimulates NF-kappaB in human epidermal keratinocytes. *J Endocrinol.* 2004 Jun;181(3):R1-7.

Zbytek B, Pikula M, Slominski RM, et al.: Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2005 Mar;152(3):474-80.

Zhao L, Donaldson CJ, Smith GW, Vale WW: The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). *Genomics.* 1998 May 15;50(1):23-33.

Zhao XJ, Hoheisel G, Schauer J, Bornstein SR: Corticotropin-releasing hormone-binding protein and its possible role in neuroendocrinological research. *Horm Metab Res.* 1997 Aug;29(8):373-8.

Zouboulis CC: Human skin: an independent peripheral endocrine organ. *Horm Res.* 2000;54(5-6):230-42.

Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N, et al.: Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 14;99(10):7148-53.

Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE: Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol.* 1999 Dec;113(6): 1011-20.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christos C. Zouboulis für das Überlassen dieses interessanten Themas, seine ausdauernde Betreuung und für die stets konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren danke ich Anna Schnitger, Dr. rer. nat. Sabine Fimmel und Evelyn Glass für die Einführung in die Methoden der Zellkultur und Zellbiologie sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Messreihen.

Für die Analyse der Lipidproben und die freundliche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Frau Dr. Monica Ottaviani aus dem Cytolab in Rom/Italien.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Holger Krause für ihre Unterstützung und den optimistischen Zuspruch. Und auch meiner Freundin Clarissa Richter gebührt Dank für das Korrekturlesen und die wertvollen Hinweise zur formalen Gestaltung.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katharina Isabelle Krause, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuropeptide und Lipide der Haut“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Stahnsdorf, den 01.08.2009