

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

DISSERTATION

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

Das Renin-Angiotensin-System in menschlicher Haut

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Tanja Wollschläger
aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. B. M. Henz

2. Priv.-Doz. Dr. med. B. Hermes

3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Böhm

Einreichungsdatum: 29. September 2005

Datum der Promotion: 7. April 2006

Erklärung

„Ich, Tanja Wollschläger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Das Renin-Angiotensin-System in menschlicher 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.“

Datum: 29.September 2005

Unterschrift: Tanja Wollschläger

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	3	
Inhaltsverzeichnis	4	
Abbildungsverzeichnis	6	
Tabellenverzeichnis	8	
1	Einleitung	9
1.1	Das Renin-Angiotensin-System	11
1.1.1	Historisches	11
1.1.2	Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems	12
1.2	Renin (EC 3.4.23.15)	13
1.2.1	Renin-Gene	13
1.3	Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) (EC 3.4.15.1)	17
1.3.1	ACE-Gene	17
1.3.2	Proteinstruktur des ACE	18
1.3.3	Lokalisation von ACE	18
1.3.4	ACE 2	19
1.3.5	Metabolisierung von Angiotensinpeptiden	19
1.3.6	Angiotensin-Rezeptoren	20
1.4	Die Haut	25
1.4.1	Funktionelle Morphologie	25
1.4.2	Epidermis (Oberhaut)	27
1.4.3	Dermis (Korium, Lederhaut)	28
1.4.4	Subkutis (Unterhautfettgewebe)	29
1.5	Kutane Zellen	29
1.5.1	Keratinocyten	29
1.5.2	Melanozyten	30
1.5.3	Dermale Fibroblasten	30
1.5.4	Mikrovaskuläre Endothelzellen (MVECs)	31

1.6	In dieser Arbeit untersuchte Dermatosen	31
1.6.1	Psoriasis vulgaris	31
1.6.2	Neoplasien	32
1.7	Das Renin-Angiotensin-System in der Haut	33
2	Fragestellung und Zielsetzung	35
3	Material und Methoden	37
3.1	Material	37
3.1.1	Hautbiopsien	41
3.1.2	Antikörper	41
3.2	Methoden	43
3.2.1	Zellkulturen	43
3.2.2	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	45
3.2.3	Angiotensin II enzymatisches immunometrisches Assay (EIA)	48
3.2.4	Einbettung von Hautbiopsien	52
3.2.5	Herstellung von Gefrierschnitten	52
3.2.6	Alkalische Phosphatase – Anti - Alkalische Phosphatase (APAAP)	52
3.2.7	Versuchsablauf	54
3.2.8	Stammlösungen	58
3.2.9	Titerbestimmungen	58
4	Auswertung	60
4.1	Nachweis der RAS-Komponenten mittels RT-PCR	60
4.1.1	Angiotensinogen, Renin und Angiotensin-Converting-Enzym	60
4.1.2	Angiotensin-Rezeptoren	62
4.2	Angiotensin II Synthese durch Keratinozyten	62
4.3	Nachweis der RAS-Komponenten mittels immunhistochemischer Färbungen	65
4.3.1	Angiotensinogen, Renin und Angiotensin-Converting-Enzym	65
4.3.2	Angiotensin-Rezeptoren	69
4.4	RAS-Komponenten in pathologisch veränderter Haut	71

4.4.1	Psoriasis vulgaris	71
4.5	Tumorerkrankungen der Haut - Basaliom	76
4.5.1	Angiotensinogen	76
4.5.2	Renin	77
4.5.3	Angiotensin-Converting-Enzym	78
4.6	Tumorerkrankungen der Haut - Spinaliom	80
4.6.1	Angiotensinogen	80
4.6.2	Renin	81
4.6.3	Angiotensin-Converting-Enzym	82
5	Diskussion	83
5.1	Nachweis der RAS-Komponenten	84
5.2	Angiotensin II Synthese durch Keratinozyten	87
5.3	Mögliche physiologische Bedeutung des kutanen RAS	88
5.4	Mögliche pathophysiologische Bedeutung des kutanen RAS	88
5.5	Expression der RAS-Komponenten bei Psoriasis vulgaris	89
5.6	Expression der RAS-Komponenten beim Basaliom	91
5.7	Expression der RAS-Komponenten beim Spinaliom	92
6	Zusammenfassung	94
Literaturliste	96	
Danksagung	113	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Renin Angiotensin System	15
Abbildung 2: Morphologie der Haut aus www.essentialdayspa.com/Skin_Anatomy_and_Physiology.htm , gezeichnet von dem Künstler F. Netter	26
Abbildung 3: Beispiel Plattenformat	51
Abbildung 4: Schematische Darstellung der APAAP Technik	53
Abbildung 5: Schematisches Diagramm der amplifizierten APPAP Technik	54

- Abbildung 6: Angiotensinogen mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen) 60
- Abbildung 7: Renin mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen) 61
- Abbildung 8: ACE mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen) 61
- Abbildung 9: AT1 mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen) 62
- Abbildung 10: AT2 mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen) 62
- Abbildung 11: Synthese von Ang II in Keratinozyten 64
- Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt acht untersuchten. 65
- Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 25µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt acht untersuchten Präparaten. 66
- Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt acht untersuchten. S=Schweißdrüsen, G=Gefäßwand. 67
- Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt acht untersuchten. 68
- Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem polyklonalen Antikörper gegen den humanen AT1 Rezeptor; scale bar 20µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt fünf untersuchten Präparaten. 69
- Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem polyklonalen Antikörper gegen den humanen AT2 Rezeptor; scale bar 20µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt fünf untersuchten. G=Gefäßwand. 70
- Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt sieben untersuchten Präparaten. P=Papillenspitze. 71
- Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt sieben untersuchten Präparaten. 73

Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 50µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt sieben untersuchten.	74
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt sieben untersuchten Präparaten.	75
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung eines Basalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt elf untersuchten Präparaten. R=Randbetonung.	76
Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung eines Basalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt elf untersuchten.	77
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung eines Basalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt elf untersuchten Präparaten.	78
Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung eines Spinalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt neun untersuchten Präparaten.	80
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung eines Spinalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 200µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt neun untersuchten Präparaten.	81
Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung eines Spinalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 200µm (a) bzw. scale bar 100µm (b). Die Abb. zeigen ein repräsentatives von insgesamt neun untersuchten Präparaten. G=Gefäßwand.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beeinflussung des Plasma-Angiotensinogenspiegels	13
Tabelle 2: Beeinflussung des Plasma-Reninspiegels	17
Tabelle 3: Verteilung der Angiotensin-Rezeptoren beim Menschen	21
Tabelle 4: Herstellernachweis der verwendeten Materialien	37
Tabelle 5: Benutzte Antikörper und ihre Subklassen, Spezifitäten und Hersteller	42
Tabelle 6: Benutzte Primer mit Sequenz, Länge und Zyklenzahl	46
Tabelle 7: Endverdünnung der Primärantikörper	59
Tabelle 8: Synthese von Ang II in Keratinozyten; angegeben sind jeweils drei unabhängige Messwerte, der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Einheit: pg/ml	64

1 Einleitung

Das **Renin-Angiotensin-System** gehört zu den am längsten und genauesten untersuchten hormonellen Systemen bei Säugetieren und beim Menschen. Schon Ende des 19. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass in der Niere eine blutdrucksteigernde Substanz synthetisiert wird. In den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts begann die schrittweise Identifizierung des gesamten Systems mit seinen verschiedenen, teils enzymatisch wirksamen Komponenten **Angiotensinogen** (das Vorläufermolekül), **Renin** und **Angiotensin Converting Enzym** (spaltende Enzyme), **Angiotensin I** (Spaltprodukt von Angiotensinogen) und **Angiotensin II** (Spaltprodukt von Angiotensin I und wichtigstes Effektorhormon) (Freis, 1995).

Das **Renin-Angiotensin-System (RAS)** ist ein klassischer endokriner Regulationsmechanismus zur Konstanthaltung bzw. Normalisierung von Plasmavolumen, -osmolarität und Blutdruck (Lavoie und Sigmund, 2003). Bis in die 90er Jahre hinein wurden diese Effekte als alleinige, wesentliche Wirkungen des RAS angesehen. Die Entwicklung von spezifischen Antagonisten für die Angiotensin-Rezeptor-Subtypen AT_1 und AT_2 Ende der 80er Jahre ermöglichte dann jedoch zum einen den Nachweis der Existenz verschiedener Rezeptor-Subtypen, zum anderen die Unterscheidung von AT_1 - bzw. AT_2 -Rezeptor vermittelten Angiotensin-Wirkungen (de Gasparo et al., 2000). Hierbei stellte sich heraus, dass die bis dahin bekannten, „klassischen“ Angiotensin-Wirkungen, also die Regulation von Plasmavolumen, -osmolarität und Blutdruck, fast ausschließlich über den AT_1 -Rezeptor vermittelt werden. Angiotensin II wirkt über den AT_1 -Rezeptor außerdem fördernd auf Zellproliferation und -hypertrophie, Extrazelluläre-Matrix-(EZM)-Synthese und inflammatorische Prozesse (de Gasparo et al., 2000). Die heute bekannten, AT_2 -Rezeptor vermittelten Wirkungen umfassen ein Spektrum „neuer“, damals noch nicht mit Angiotensin in Verbindung gebrachter Effekte wie Anti-Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Anti-Fibrose und Anti-Inflammation, die zum

großen Teil den AT₁-Rezeptor vermittelten Effekten entgegengesetzt sind. Durch diese Gegensätzlichkeit der Wirkungen kann Angiotensin II in einem Gewebe je nach aktuell dominierendem Rezeptor-Subtyp völlig unterschiedliche Effekte auslösen (de Gasparo et al., 2000).

Das RAS wurde ursprünglich als ein „zirkulierendes“ Hormonsystem beschrieben. Die Bildung der Hauptkomponenten erfolgt in unterschiedlichen Organen (Angiotensinogen in der Leber, Renin in der Niere, Angiotensin-Converting-Enzym in Gefäßendothelzellen der Lunge), die Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II findet im Plasma statt (Montani und van Vliet, 2004).

Neben diesem Plasma-RAS wurden in den letzten zwei Jahrzehnten auch eine Reihe von sogenannten Gewebe-Renin-Angiotensin-Systemen beschrieben. Hierunter versteht man die Expression aller RAS-Komponenten in einem Gewebe, so dass „vor Ort“, unabhängig von der Versorgung mit Komponenten aus dem Plasma und unter dem Einfluss lokaler Regulationsmechanismen, Angiotensin II gebildet werden kann. Solche Gewebe-RASs sind beispielsweise beschrieben für das Herz, für die Gefäßwand, die Niere und Nebenniere, das Gehirn und die Leber (Lavoie und Sigmund, 2003).

Für die Haut gab es bisher nur einzelne, zum Teil widersprüchliche Untersuchungen zur Expression der RAS-Komponenten. Insbesondere über **humane Haut** war in dieser Hinsicht so gut wie nichts bekannt. Die Haut ist aber ein Organ, in dem sich viele Prozesse abspielen, für die von anderen Organen bekannt ist, dass sie durch Angiotensin II beeinflusst werden. So gehören z. B. die Keratinozyten der Epidermis zu den Zellen des Körpers mit der höchsten Proliferationsrate (Generationszeit: ca. 28 Tage) (Fritsch, 1998 c). Gleichzeitig durchlaufen die Keratinozyten während ihrer Wanderung von der Basalmembran zur Hornschicht einen komplexen Differenzierungsprozess. Die Fibroblasten der Dermis sind selbstverständlich zur Synthese von EZM-Komponenten fähig, und natürlich spielen sich auch in der Haut entzündliche Prozesse ab, die unterschiedlichster

Pathogenese sein können (Wunden; entzündliche Hauterkrankungen; Tumoren; allergische Reaktionen).

Daher erschien es naheliegend zu überprüfen, ob in **humaner Haut** ein Gewebe-RAS vorhanden ist, das in die lokale, autokrine bzw. parakrine Regulation all der o.g. Prozesse involviert sein könnte.

1.1 Das Renin-Angiotensin-System

1.1.1 Historisches

1898 entdeckten Tigerstedt und Bergmann den blutdrucksteigernden Effekt eines Nierenextraktes und nannten die verantwortliche Substanz (die damals noch nicht isoliert werden konnte) Renin (Tigerstedt und Bergmann, 1898).

1934 entwickelten Goldblatt und Mitarbeiter das erste Tiermodell für Bluthochdruck, indem sie unilateral die Nierenarterie eines Hundes mittels eines Metallklips verschlossen. Dieses Modell eröffnete der RAS-Forschung neue, experimentelle Möglichkeiten und findet bis heute Verwendung (Goldblatt et al., 1934).

Um 1940 berichteten Page und Helmer sowie Braun-Menendez et al. über enzymatische Fähigkeiten des Renins. Zur gleichen Zeit identifizierten Page et al. das Renin Substrat Angiotensinogen als Plasmaprotein und deuteten das RAS als funktionelle Einheit (Page und Helmer, 1940; Braun-Menendez et al., 1940).

1956 beschrieben Skeggs et al. in den Lungen das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welches die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II katalysiert (Skeggs et al., 1956).

1958 berichtete Gross über den Zusammenhang zwischen dem RAS und der Aldosteronsekretion in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. ANG II stimuliert die Aldosteronsekretion und verstärkt dadurch die Natriumretention (Gross, 1958).

In den folgenden Jahren wurden lokale RASs u.a. in Herz, Niere, Nebenniere, Gefäßwand und Gehirn entdeckt (Unger et al., 1988; Campbell, 1987; Dzau, 1988).

1.1.2 Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems

Die enzymatische Kaskade des Renin-Angiotensin-Systems beginnt mit der Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I (Ang I) von Angiotensinogen durch das Enzym Renin. Das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) verkürzt Ang I um weitere zwei Aminosäuren, und es entsteht das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II). Ang II bindet an spezifischen Rezeptoren, wobei die Subtypen 1 und 2 (AT₁, AT₂) zum heutigen Zeitpunkt am besten charakterisiert sind (Lavoie und Sigmund, 2003).

1.1.2.1 *Angiotensinogen*

1.1.2.1.1 Angiotensinogen-Gene

Angiotensinogen-Gene wurden in Ratten (Ohkubo et al., 1983) und anderen Spezies (Clouston et al., 1988; Gaillard et al., 1989) isoliert und charakterisiert. Das Rattenangiotensinogen-Gen besteht aus fünf Exons und vier Introns und ist etwa 11,8 Kilobasen lang. Es ist auf Chromosom 19q lokalisiert. Durch differenzielles Splicing können offensichtlich bis zu vier verschiedene mRNA-Varianten entstehen (Campbell et al., 1984). Das menschliche Angiotensinogen-Gen befindet sich dagegen in der q4-Region auf Chromosom 1 (Gaillard-Sanchez et al., 1990), enthält aber ebenfalls fünf Exons und vier Introns (Gaillard et al., 1989).

1.1.2.1.2 Proteinstruktur des Angiotensinogens

Im Gegensatz zur kodierenden mRNA liegt das Angiotensinogen Protein nur in einer Molekülgröße vor. Es entsteht durch Abspaltung von 24 Aminosäuren aus dem Vorläuferprotein Präangiotensinogen, das sich beim Menschen aus 485 Aminosäuren zusammensetzt (Kageyama et al., 1984).

Angiotensinogen gehört zur α_2 -Globulinfraktion der Serumproteine, hat ein Molekulargewicht von 54 000 bis 60 000 Dalton und dient als Reninsubstrat (Ménard et al., 1983).

1.1.2.1.3 Biosynthese des Angiotensinogens

Angiotensinogen wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und gespeichert. Allerdings wurden Angiotensinogen mRNA und -Protein auch in anderen Organen wie Gehirn, Herz, Niere, Ovarien und Hoden nachgewiesen (Campbell, 1987; Campbell und Habener, 1986; Gomez et al., 1988; Cassis et al., 1988).

1.1.2.1.4 Regulation der Angiotensinogen-Freisetzung

Tabelle 1: Beeinflussung des Plasma-Angiotensinogenspiegels

Anstieg des Plasma-Angiotensinogenspiegels	Abfall des Plasma-Angiotensinogenspiegels
Schwangerschaft	Bei hohem Reninspiegel wie bei: Nebenniereninsuffizienz, ACE Inhibition , kongestivem Herzversagen
Therapie mit Östrogenen, oralen Kontrazeptiva, Glukokortikoiden	Leberzirrhose
vermehrte Glukokortikoidsekretion aus der Nebenniere (z.B. bei Stress)	nephrotisches Syndrom
maligner und essentieller Hypertonus	

In der Niere bestehen außerdem Wechselwirkungen zwischen Angiotensinogen mRNA-Expression und Natriumstatus: Durch hohe Natriumaufnahme sinkt die Angiotensinogen mRNA-Expression, während sie bei niedriger Natriumaufnahme steigt (Pratt et al., 1989).

1.2 Renin (EC 3.4.23.15)

1.2.1 Renin-Gene

Bei Menschen (Soubrier et al., 1983; Hardman et al., 1984; Miyazaki et al., 1984) und Ratten (Burnham et al., 1987; Fukamizu et al., 1988) wird Renin von zwei unabhängigen Genen kodiert,

während bei Mäusen zwei Gene Ren-1 und Ren-2 vorkommen (Rougeon et al., 1981; Mullins et al., 1982; Burt et al., 1985). Der Hauptunterschied zwischen beiden Genen liegt im Vorhandensein einer Glykosylierungsregion auf Ren-1. Das menschliche Renin-Gen sowie beide Maus-Gene befinden sich auf Chromosom 1 (Chirgwin et al., 1984 a+b; Abel und Gross, 1988), das der Ratte auf Chromosom 13 (Pravenec et al., 1991).

1.2.1.1 Proteinstruktur des Renins

Das Enzym Renin entstammt der Gruppe der Aspartylproteasen. Sein Molekulargewicht beträgt je nach Spezies 34 000 bis 42 000 Dalton. Die aktive Form besteht aus zwei Polypeptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. So entsteht eine zweilappige Struktur mit einer aktiven Seite (Morris, 1989). Die höchste Aktivität zeigt Renin - anders als andere Aspartylproteasen – bei neutralem pH. Die Halbwertszeit liegt bei 30 Minuten. Eine sehr hohe Spezifität besteht für Angiotensinogen, welches das einzige bekannte endogene Reninsubstrat ist.

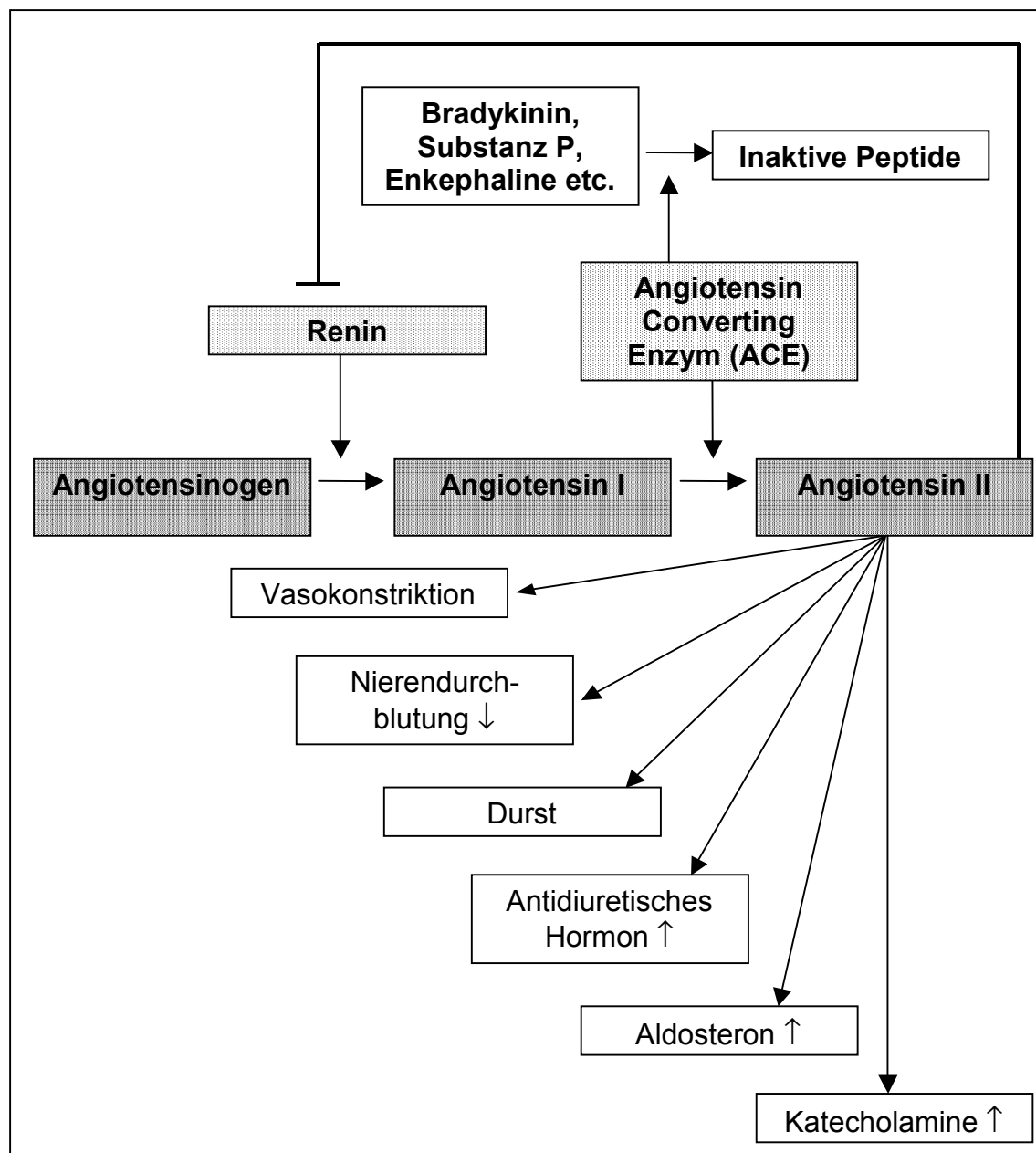


Abbildung 1: Das Renin Angiotensin System

1.2.1.2 Biosynthese von Renin

In granulierten Epitheloidzellen in der Media des Vas afferens des juxtaglomerulären Apparates der Niere wird Renin produziert und gespeichert. Eine extrarenale Synthese gibt es u.a. in Uterus, Leber und im Gefäßsystem.

Vorläufer des Renins ist das enzymatisch inaktive Prorenin mit einem Molekulargewicht von 57 000 Dalton, welches aus einem aus 340 Aminosäuren aufgebauten Präprorenin entsteht. Durch Ansäuerung (Hsueh et al., 1981) oder verlängerte

Kühlung (Leckie und McGhee, 1980) kann Prorenin zu Renin aktiviert werden. In vitro gelingt diese Transformation mittels Proteasen wie Trypsin, Kallikrein, Plasmin, Pepsin und Kathepsin D.

Bei über 80% des zirkulierenden Renins handelt es sich um Prorenin (Sealey et al., 1980). Im Gegensatz zu den Nieren, die zehnmal mehr Prorenin als Renin sezernieren (Sealey und Rubattu, 1989), wird Prorenin aus extrarenalem Gewebe nur in sehr geringen Mengen sezerniert.

1.2.1.3 Regulation der Renin-Freisetzung

(Hackenthal et al., 1990)

1.2.1.3.1 Intrarenale Mechanismen

Minderdurchblutung der Niere (z.B. bei akutem Blutdruckabfall bzw. Abfall des zirkulierenden Plasmavolumens oder infolge einer Nierenarterienstenose) und Chloridmangel im Bereich der Macula densa an der Spitze des aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (z.B. bei Natriumchloridverlust oder nach Verabreichung von Schleifendiuretika) stimulieren die Reninausschüttung.

1.2.1.3.2 Sympathische Mechanismen

Die Stimulation renaler Nerven oder die Infusion β -adrenerger Agonisten führt zu einer gesteigerten Reninausschüttung durch Erhöhung des intrazellulären cAMP in juxtaglomerulären Zellen.

Stimulation durch α -adrenerge Agonisten senkt die Reninausschüttung.

1.2.1.3.3 Humorale Mechanismen

Angiotensin II hemmt die Reninfreisetzung durch negative Rückkoppelung. Hierbei beeinflusst Angiotensin II selbst in kleinsten Dosen die juxtaglomerulären Zellen direkt. Außerdem fördert es die Arginin-Vasopressin-Ausschüttung aus der Hypophyse. Das Arginin-Vasopressin (AVP) wiederum hat eine direkte Wirkung auf die juxtaglomerulären Zellen und senkt ebenfalls die Reninfreisetzung. Auch Atriales Natriuretisches Peptid (ANP), welches bei Volumenüber-

schoß aus den Vorhöfen des Herzens freigesetzt wird, und Kalium in hohen Konzentrationen hemmen die Reninfreisetzung.

Prostaglandine, Histamine, Dopamine und β -Adrenorezeptoragonisten stimulieren die Reninausschüttung über einen Anstieg des intrazellulären Second Messengers cAMP.

Tabelle 2: Beeinflussung des Plasma-Reninspiegels

Anstieg des Plasma-Reninspiegels	Abfall des Plasma-Reninspiegels
aufrechte Körperhaltung	liegende Körperhaltung
Natriummangel, Dehydratation, Hypovolämie, Hämorrhagie	vermehrte Natriumaufnahme
Nebenniereninsuffizienz	Mineralkortikoidüberschuss
Nierenarterienstenose	Glucokortikoidüberschuss
maligner Hypertonus	Hyporeninämischer Hypoaldosteronismus
reninsezernierende Tumore	Therapie mit β -Blockern, α -Methyldopa
Therapie mit ACE-Hemmern, ANG II - Antagonisten, Renin-Hemmern, Diuretika, Vasodilatoren	
Schwangerschaft	
Nahrungsaufnahme	
proteinreiche Diät	

1.3 Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) (EC 3.4.15.1)

1.3.1 ACE-Gene

Das ACE-Gen wurde von mehreren Spezies kloniert und die Nukleotidsequenz bestimmt (Soubrier et al., 1988). Beim Menschen ist es auf Chromosom 17 lokalisiert, bei der Ratte auf Chromosom 10.

Bei spontan hypertensiven Ratten wurde eine Korrelation zwischen der Hypertonie und dem Abschnitt auf Chromosom 10, der das ACE-Gen enthält, nachgewiesen (Jacob et al., 1991). Klinische Studien konnten aber nie zweifelsfrei unter-

mauern, dass dieser Sachverhalt auch auf die Hypertonie bei Menschen übertragbar ist. Lediglich ein Zusammenhang zwischen einem erhöhtem Herzinfarktrisiko und einer spezifischen Mutation des ACE-Gens konnte belegt werden (Cambien et al., 1992).

1.3.2 Proteinstruktur des ACE

ACE ist eine Dipeptidyl-Peptidase mit einem Molekulargewicht von 150 Kilo-dalton, die durch Abspaltung des Dipeptids Histidyl-Leucin- (His-Leu-) Ang I in Ang II umwandelt.

ACE besitzt zwei aktive katalytische Regionen. Eine am Carboxylende, die andere nahe des Aminoendes. Lediglich das testikuläre ACE besitzt nur einen C-terminalen Katalysepunkt.

Identisch mit ACE ist die Kininase II (Yang et al., 1970), welche das vasodilatatorisch wirkende Bradykinin spaltet und inaktiviert. ACE/Kininase II spaltet außerdem LH-releasing Hormone (LHRH), die β -Kette des Insulin, Substanz P und Enkephaline und ist damit ein eher unspezifisches Enzym (Unger et al., 1990).

1.3.3 Lokalisation von ACE

ACE wurde zuerst im Gefäßendothel nachgewiesen (Caldwell et al., 1976). In dieser Lokalisation ist es offenbar Teil des zirkulierenden RAS, indem es Plasma-Ang I zu Ang II konvertiert; es ist aber auch Teil eines vaskulären Gewebe-RAS. ACE wurde aber auch in zahlreichen anderen Geweben und Organen wie in den Epithelzellen der Nieren, dem proximalen Nierentubulus (Skidgel et al., 1987), den Mitral- und Trikuspidalklappen des Rattenherzens (Yamada et al., 1991), in Nebennierenmark und -rinde, Gehirn und Reproduktionsorganen gefunden (Rix et al., 1981; Chai et al., 1987; Correa et al., 1985; Paul et al., 1985; Jackson et al., 1988). In hohen Konzentrationen existiert es außerdem in den germinativen Zellen des Hodens und in den Ovarfollikeln (Langford et al., 1991).

1.3.4 ACE 2

Im Jahr 2000 wurde ein weiteres, humanes Angiotensin konvertierendes Enzym beschrieben, welches als „ACE 2“ oder als „ACEH“ (angiotensin-converting enzyme homologue) bezeichnet wird (Tipnis et al., 2000; Donoghue et al., 2000). Das ACE 2-Gen befindet sich auf dem X-Chromosomenband Xp 22. Die Sequenzanalyse ergibt 18 Exons, von denen die ersten 17 in ihrer Größe denen des bekannten humanen ACE deutlich ähneln.

Das ACE 2 Protein zeigt 42 % Homologie mit dem „klassischen“ ACE-Molekül. Es hat im Gegensatz zum „normalen“ ACE nur eine katalytische Domäne am Carboxylende und spaltet Angiotensin I (zu Ang 1-9), Angiotensin II, des-Arg-Bradykinin und Neurotensin. Da Ang 1-9 nicht zu Ang II gespalten werden kann, trägt ACE 2 nicht zur Ang II Synthese bei. Im Unterschied zum „klassischen“ ACE führt ACE 2 auch nicht zur Spaltung und damit zum Abbau von Bradykinin, und es ist nicht durch ACE-Inhibitoren hemmbar. Auch für das ACE 2 konnte keine Assoziation zu essentieller Hypertonie beim Menschen nachgewiesen werden (Benjafeld et al., 2004).

1.3.5 Metabolisierung von Angiotensinpeptiden

Zahlreiche Aminopeptidasen, sog. Angiotensinasen, bauen Angiotensin II schnell ab (Johnston, 1990). Angiotensin II hat daher nur eine Halbwertszeit von 2,8 bis 3,2 Minuten (Admiraal et al., 1993).

So spaltet die Aminopeptidase A die N-terminale Aspartatsäure vom Ang II ab und bildet dadurch das Heptapeptid Angiotensin III (Semple et al., 1976).

Angiotensin-(1-7) als eine weitere bioaktive Komponente des RAS wird endogen in der Zirkulation und in verschiedenen Geweben durch mehrere enzymatische Wege entweder aus Angiotensin I oder II gebildet (Chappell et al., 1998 a+b). Seine Bildung unterliegt der Kontrolle von mindestens drei Endopeptidasen (Chappell et al., 1998 a+b). Es dient vermutlich ebenso wie Angiotensin I und Bradykinin als

endogenes Substrat für ACE. Es gibt eine Reihe von Publikationen, nach denen Angiotensin-(1-7) mitverantwortlich ist für Blutdruckregulation und antiproliferative Effekte des RAS (Buczko et al., 2000).

Es scheint also, dass eine ganze Reihe von Endopeptidasen, Aminopeptidasen und Carboxypeptidasen beim Stoffwechsel der Angiotensin-Peptide involviert sind (Gohlke et al., 1992; Johnson und Drummer, 1988; Ryan, 1989; Abhold et al., 1987).

1.3.6 Angiotensin-Rezeptoren

Durch Bindungsstudien mit spezifischen Peptid- und Non-Peptid-Antagonisten konnten unterschiedliche Angiotensin-Rezeptor-Subtypen identifiziert und charakterisiert werden, von denen die bedeutendsten als AT₁- und AT₂-Rezeptor bezeichnet werden. Rezeptoren mit der höchsten Affinität zu Losartan (und anderen AT₁-Rezeptor-Antagonisten) und der niedrigsten Affinität zu AT₂-Rezeptor-Liganden CGP42112A und PD123177 werden als AT₁ bezeichnet. Rezeptoren mit der höchsten Affinität zu CGP42112A und PD123177 und der niedrigsten Affinität zu Losartan werden als AT₂ bezeichnet (de Gasparo et al., 2000).

1.3.6.1 Verteilung der Angiotensin-Rezeptoren im Gewebe

AT₁- und AT₂-Rezeptoren kommen in zahlreichen Geweben vor und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verteilung.

AT₁-Rezeptoren sind beim gesunden Menschen in den meisten Geweben der dominierende Rezeptor-Subtyp. Sie werden u.a. von Herz, Gefäßen, Niere, Lunge, Leber, Plazenta, Blase, Gastrointestinaltrakt und im Gehirn exprimiert (de Gasparo et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Verhältnissen in adultem Gewebe dominiert in fetalem Gewebe der AT₂-Rezeptor, was auf eine Rolle bei der Organogenese hindeutet. Nach der Geburt sinkt die AT₂-Rezeptor Expression deutlich ab, und der Rezeptor kommt im gesunden Organismus nur noch in einigen ausgewählten Organen

wie Nebenniere, Herz, Niere, Pankreas, Myometrium, Ovarien und spezifischen Hirnregionen vor (de Gasparo et al. 2000).

Bei pathologischen Ereignissen allerdings, insbesondere bei Prozessen mit Gewebszerstörungen wie z.B. Apoplex, Herzinfarkt oder Nervenläsionen, ist die AT_2 -Rezeptor-Expression hochreguliert (Rosenstiel et al., 2002).

1.3.6.2 AT_1 -Rezeptoren

Tabelle 3: Verteilung der Angiotensin-Rezeptoren beim Menschen

Lokalisation	AT_1 -Rezeptor	AT_2 -Rezeptor
Gehirn	++	+
Herz	++	+
Lunge	++	+
Nebenniere	++	+
Niere	++	+
Gefäßwände	++	+
Uterus	-	+

(Review-Artikel zu diesem Thema: de Gasparo et al., 2000 und Kaschina und Unger, 2003).

Der humane AT_1 -Rezeptor besteht aus 359 Aminosäuren und sein Gen befindet sich auf Chromosom 3q22. Die AT_1 -Rezeptoren der Ratte und der Maus besitzen ebenfalls 359 AS. Im Gegensatz zum Menschen existieren bei Ratte und Maus zwei Subtypen des AT_1 -Rezeptors, AT_{1A} und AT_{1B} , deren Gene sich bei der Ratte auf den Chromosomen 17 und 2 und bei der Maus auf den Chromosomen 13 und 3 befinden.

1.3.6.2.1 Signaltransduktion des AT_1 -Rezeptors

AT_1 -Rezeptoren sind klassische Vertreter der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen.

G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt zu Phosphatidylinositolhydrolyse, Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol-(DAG)-Akkumulation. IP3 führt zu einem Anstieg des intrazellulären Calci-

ums, resultierend in der Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen und Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aktivierung der Proteinkinase C durch DAG führt zur Phosphorylierung der Schlüsselproteine, die bei Gefäßkontraktion ebenso wie bei Zellwachstum eine wichtige Rolle spielen.

Außerdem übt Ang II seine Wirkungen über Aktivierung von Tyrosinkinasen aus, die wiederum viele, in der Kaskade später gelegene Proteine phosphorylieren, z. B. Proteine in der ras/raf/mitogen aktivierten Proteinkinase-(MAPK)-Kaskade oder Proteine, die bei der Translokation der MAPK in den Nukleus beteiligt sind. Die meisten Signalwege mit Beteiligung von MAPK wurden mit Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung, Transformation und Gefäßkontraktion in Zusammenhang gebracht (Touyz und Schiffrin, 2000).

Weitere AT_1 -gekoppelte Signaltransduktionswege sind der JAK/STAT-Signalweg, der erstmals im Zusammenhang mit Zytokinen beschrieben wurde, die Freisetzung von Arachidonsäure sowie die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen.

1.3.6.2.2 Funktionelle Bedeutung des AT_1 -Rezeptors

Die klassischen Funktionen von AT_1 sind: generalisierte Vasokonstriktion, Zellwachstum in den Gefäßen und im linken Herzventrikel, Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde und höhere Natriumabsorption im proximalen Nierentubulus sowie Erhöhung von Herzfrequenz und Kontraktilität durch Noradrenalinfreisetzung von sympathischen Nervenendigungen (Unger, 2000). Über den auf glatten Gefäßmuskelzellen lokalisierten AT_1 -Rezeptor bewirkt Ang II die Kontraktion präkapillärer Arteriolen und in geringerem Maße postkapillärer Venolen. (Laragh, 1987). Ang II wirkt auf glatte Gefäßmuskelzellen mitogen und bewirkt über die Produktion von Wachstumsfaktoren die Synthese von extrazellulärer Matrix. Es gibt Hinweise für eine Beteiligung des AT_1 -Rezeptors bei der Herzhypertrophie, bei kardialen Umbauvorgängen und bei der Abstimmung der Matrixproduktion durch Herzfibroblasten (Tokioka-Akagi et al., 2001; Sanada et al., 2001, Malmqvist et al.,

2001). Ang II stimuliert die Synthese verschiedener Extrazelluläre-Matrix (ECM)-Komponenten wie Proteoglykane, Fibronectin, Kollagen Typ 1, Glykosaminoglykane, Tenascin und Chondroitin-/ Dermatansulphate, die unter anderem am kardialen und renalen Remodeling beteiligt sind (Dubey et al., 1997; Sasamura et al., 2001; Fischer et al., 2001).

Ang II verstärkt adrenerge Stimuli durch erhöhte Freisetzung von Noradrenalin aus den terminalen sympathischen Nervenendigungen und durch verbessertes Ansprechen der Gefäße auf Noradrenalin. Der Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung kommt durch präsynaptische AT_1 -Rezeptoren zustande (Balt et al., 2001).

Der AT_1 -Rezeptor scheint auch einen Einfluß auf die Erregungsüberleitung im Herzen zu haben. Kardiale Überexpression von AT_1 -Rezeptoren bei Mäusen führt unter anderem zu Bradykardie und Überleitungsstörungen (Hein et al., 1997).

1.3.6.3 AT_2 -Rezeptoren

(Review-Artikel zu diesem Thema: de Gasparo et al., 2000 und Kaschina und Unger, 2003).

Die Sequenz des AT_2 -Rezeptors ist nur zu 34 Prozent homolog mit der des AT_1 -Rezeptors. Der AT_2 -Rezeptor besteht aus 363 Aminosäuren (AS), sein Gen befindet sich auf dem X-Chromosom bei q22-q23 (Hein et al., 1995). Das AT_2 -Gen besteht aus drei Exons, wovon das dritte Exon die gesamten kodierenden Sequenzen enthält (Mukoyama et al., 1993; Kambayashi et al., 1993). Lokalisation des Gens und Molekülgröße des Proteins sind bei Mensch, Maus und Ratte identisch, die AS-Sequenz von Maus und Ratte zeigt jeweils eine ca. 92 prozentige Übereinstimmung mit der des humanen AT_2 -Rezeptors.

1.3.6.3.1 Signaltransduktion des AT_2 -Rezeptors

Die Signaltransduktionsmechanismen der AT_2 -Rezeptoren unterscheiden sich fast gänzlich von denen der AT_1 -Rezeptoren und sind noch nicht vollständig verstanden. Es gilt aber inzwischen als erwiesen, dass die Aktivierung von Protein-Phosphatasen eine zentrale Rolle in der Vermittlung AT_2 -Rezeptor-gekoppelter

Effekte spielt. Bislang konnten drei spezifische Phosphatasen identifiziert werden, die durch Stimulation des AT₂-Rezeptors aktiviert werden: die Serin/Threonin-Phosphatase PP2A (Protein-Phosphatase 2A), die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (SH2-domain containing phosphatase 1) und die Tyrosin/Threonin-Phosphatase MKP-1 (Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase 1) (Nouet und Nahmias, 2000). Diese Phosphatasen dephosphorylieren unter anderem auch Moleküle, die durch AT₁-Rezeptor stimulierte Kinasen phosphoryliert werden, so dass an dieser Stelle auf Signaltransduktionsebene ein Crosstalk zwischen den Effekten des AT₁- bzw. des AT₂-Rezeptors besteht.

Ein weiterer, wichtiger Signaltransduktionsweg scheint die vermehrte Bildung von NO und cGMP, möglicherweise unter Einschluss einer Aktivierung von Bradykinin-Rezeptoren zu sein. Cyclisches GMP wiederum vermittelt viele der biologischen Aktionen von NO wie Vasodilatation, Natriuresis und Wachstums- hemmung und Differenzierung (Gohlke et al., 1998; Nouet und Nahmias, 2000).

Bei der AT₂-Rezeptor induzierten Zelloptose besteht ein Teil der Signalkaskade in der vermehrten Synthese von Ceramiden, die wahrscheinlich die Aktivierung von Caspase 3 induzieren (Gallinat et al., 1999; Lehtonen et al., 1999).

1.3.6.3.2 Funktionelle Bedeutung des AT₂-Rezeptors

Auf zellulärer Ebene wirkt der AT₂-Rezeptor proliferationshemmend und apoptose-induzierend. Der antiproliferative Effekt des AT₂-Rezeptors wurde erstmals von Stoll und Koautoren in koronaren Endothelzellen in vitro beobachtet (Stoll et al., 1995). Der über den AT₂-Rezeptor geförderte Stillstand der Zellteilung bzw. des Zellzyklus ist Voraussetzung für die nachfolgende Zelldifferenzierung (Laflamme et al., 1996; Meffert et al., 1996; Stroth et al., 1998; Rodriguez-Pallares et al., 2004) und - unter adäquaten Bedingungen - Apoptose.

Bei verschiedensten pathologischen Ereignissen, die mit einem Gewebedefekt einhergehen, wie z.B. Myokardinfarkt, Hirninfarkt, Nervenläsionen oder Verlet-

zungen der Haut, ist die Expression des AT₂-Rezeptors deutlich verstärkt – in manchen Geweben ist der AT₂-Rezeptor nur unter diesen pathologischen Bedingungen nachweisbar (Busche et al., 2000; Nio et al., 1995; Gallinat et al., 1998; Makino et al., 1996; Viswanathan und Saveedra, 1992). Die genaue Bedeutung dieses Phänomens ist noch nicht geklärt. Jedoch werden dem AT₂-Rezeptor über seine anti-fibrotischen und anti-inflammatorischen Effekte gewebeprotective Eigenschaften zugeschrieben (Min et al., 2004; Wu et al., 2001; Lucius et al., 1998; Li et al., 2005).

Bei der Blutdruckregulation scheint dem AT₂-Rezeptor die Rolle eines Modulators zuzukommen. AT₂^{-/-} Mäuse haben einen leicht erhöhten Blutdruck, begleitet von einer leicht verminderten Natriumausscheidung; die Abweichung des mittleren, arteriellen Drucks fällt aber kaum ins Gewicht (Siragy et al., 1999). Infundiert man diesen Mäusen allerdings Ang II, so ist die resultierende Blutdrucksteigerung ausgeprägter, „ungebremster“ als in AT₂^{+/+} Kontrolltieren (Hein et al., 1995).

Zusammenfassend gesagt, scheint es auf funktioneller Ebene (Unger, 1999) und auf der des intrazellulären Signalwegs (Carey et al., 2000; Sadoshima, 2000) einen negativen Crosstalk zwischen AT₂- und AT₁-Rezeptoren zu geben. Auf diese Art und Weise moduliert der AT₂-Rezeptor verschiedene physiologische und pathophysiologische AT₁-Rezeptor gekoppelte Effekte, und er hat möglicherweise im Falle einer Überstimulation des AT₁-Rezeptors eine protektive Wirkung im betroffenen Gewebe.

1.4 Die Haut

1.4.1 Funktionelle Morphologie

Mit einer Dicke von 1-4 mm, einer Fläche von 1,5-2 m² und einem Gewicht von 3,5-10 kg zählt die Haut neben dem Darm zu den größten Organen des Menschen und hat zahlreiche Funktionen. Sie bietet dem darunter liegenden Gewebe mechanischen, chemischen und immunologischen Schutz und dient als Sinnes- und Wärmeregulationsorgan.

Die Haut ist, von außen nach innen, aus drei Schichten aufgebaut:

- Epidermis
- Dermis
- Subkutis

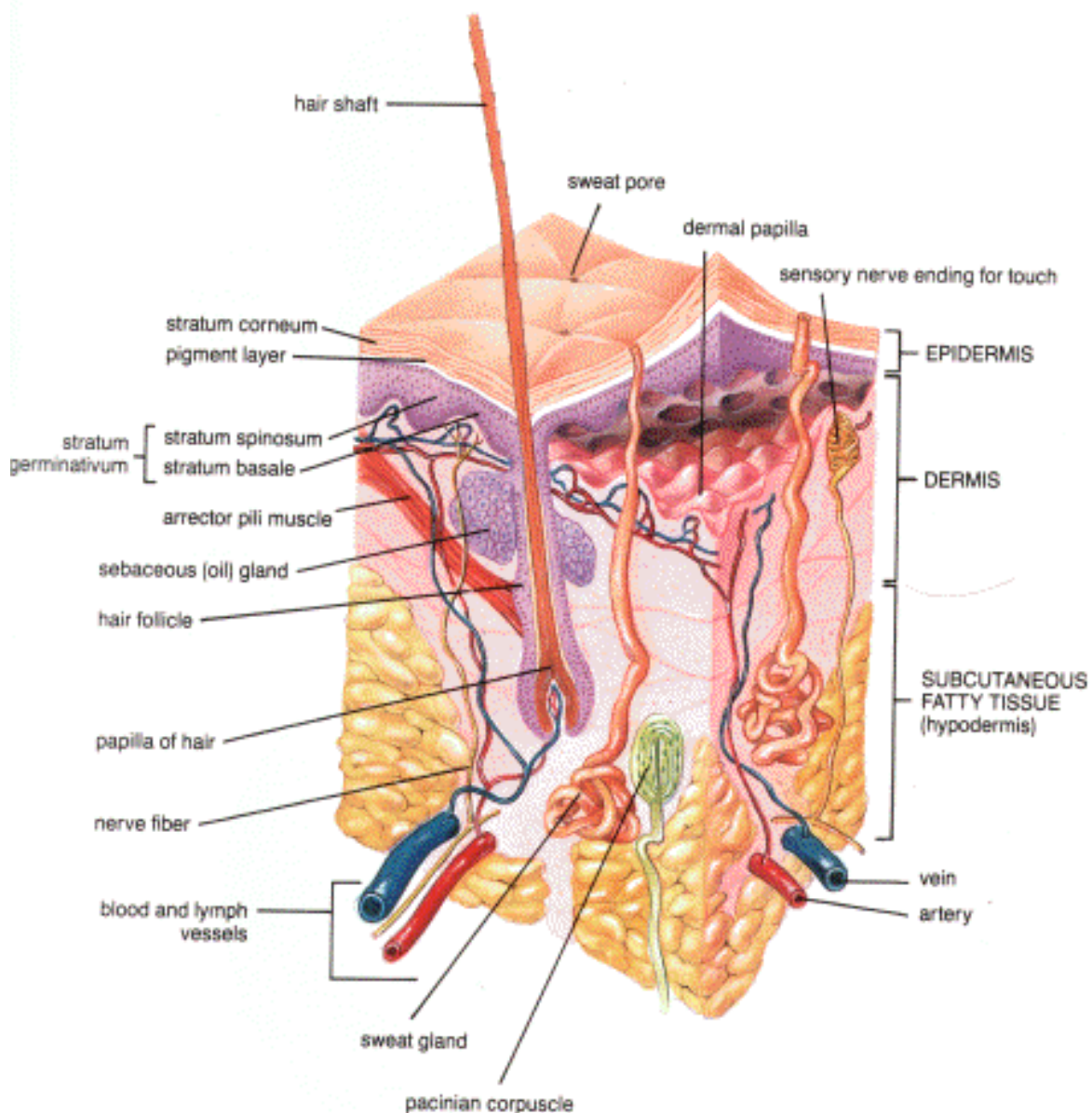


Abbildung 2: Morphologie der Haut aus www.essentialdayspa.com/Skin_Anatomy_and_Physiology.htm, gezeichnet von dem Künstler F. Netter

1.4.2 Epidermis (Oberhaut)

Die Epidermis ist 0,04-1,5 mm dick. Sie besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, dessen Hauptanteil (90%) hornbildende Keratinozyten ausmachen. Diese dienen der mechanischen Widerstandsfähigkeit an der Hautoberfläche. Zwischen ihnen finden sich außerdem Melanozyten zur Bildung von Melaninpigment, Merkelzellen zur Vermittlung von Tastempfindungen sowie Langerhans-Zellen und T-Lymphozyten für zellvermittelte Immunreaktionen. Die Epidermis setzt sich von basal nach apikal aus fünf horizontalen Schichten zusammen, die hinsichtlich Dicke und Aufbau regionale Unterschiede aufweisen (Junqueira und Carneiro, 1991 a):

1. Stratum basale
2. Stratum spinosum
3. Stratum granulosum
4. Stratum lucidum
5. Stratum corneum

Der Basalmembran unmittelbar angrenzend liegt einlagig das Stratum basale, das aus zylindrischen Zellen besteht, deren Längsachsen senkrecht zur Hautoberfläche ausgerichtet sind.

Im sich anschließenden zwei- bis fünfzähligen Stratum spinosum (Stachelzellschicht) erfolgt eine Zunahme des Zellvolumens und eine horizontale Umorientierung der Zellachse. Die Verknüpfung der Nachbarzellen erfolgt durch Desmosomen. Durch Tonofibrillen (Keratinfilamente), die den Interzellularspalt nicht kreuzen, halten die Keratinozyten Druck- und Scherkräften stand. Stratum basale und Stratum spinosum bilden gemeinsam das Stratum germinativum, in dem die Regeneration des Epithels stattfindet. Diese ist bereits im Normalzustand nötig, da es an der Hautoberfläche ständig unbemerkt zum Abschuppen einzel-

ner Korneozyten kommt (Desquamatio insensibilis). Die Wachstumsphase der Keratinozyten beträgt etwa 14 Tage, die Entwicklung zum verhornten Korneozyten dauert weitere 14 Tage.

Über dem Stratum spinosum befindet sich das ein- bis fünflagige Stratum granulosum (Körnerschicht) mit stark verdichteten Tonofibrillen, basophilen Keratohyalinkörpern und membranumschlossenen Granula. Nur in dicker Epidermis wie z.B. an den Fußsohlen findet sich zusätzlich das dünne Stratum lucidum.

Die äußerste Schicht mit Barrierefunktion ist das Stratum corneum (Hornschicht). Sie besteht aus kernlosen Keratinozyten (Korneozyten). Beim Vorgang der Verhornung gehen die Zellorganellen zugrunde, das Keratin bleibt erhalten. Je nach Körperregion ist die Schicht aus 10 bis zu mehreren hundert Lagen aufgebaut.

1.4.3 Dermis (Korium, Lederhaut)

Die Dermis ernährt die Epidermis, in ihr verlaufen Gefäße und Nerven. Sie stellt Abwehrzellen bereit und ist durch ihre hohe Reißfestigkeit und Elastizität verantwortlich für die mechanische Festigkeit der Haut. Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten (Junqueira und Carneiro, 1991 b):

1. Stratum papillare

2. Stratum reticulare

Das subepidermale weiche Stratum papillare besteht aus einem lockeren Geflecht dünner Kollagenfasern und ist zell- und gefäßreich. Die sichere Verbindung zur Epidermis wird durch die Junktionszone gewährleistet. Die fingerförmigen Ausläufer des Stratum papillare bilden Papillen, die je von einer eigenen Kapillarschlinge aus dem subpapillären Gefäßplexus versorgt werden. Perivascularlär finden sich Mastzellen und Lymphozyten.

Das darunter liegende derbe Stratum reticulare ist ein zellarmes, scherengitterartiges Netz aus Kollagenfaserbündeln. Dazwischen sind elastische Fasernetze beherbergt, die durch ihre Elastizität bei Entspannung einer Hautpartie den alten Formzustand wiederherstellen. Außerdem finden sich im Stratum reticulare Nerven und Gefäße sowie Hautanhangsgebilde (Haar-, Talgdrüsenfollikel, Schweißdrüsenausführungsgänge).

1.4.4 Subkutis (Unterhautfettgewebe)

Die Subkutis ist quantitativ regional unterschiedlich stark ausgebildet und dient als Wärmeisolation, mechanisches Schutzpolster und Energiespeicher. Außerdem befestigt sie die Haut auf ihrer Unterlage. Die Subkutis enthält Fettgewebsläppchen, die durch Bindegewebssepten getrennt sind, welche das straffe Grundgerüst bilden. Die Septen stellen die Kommunikation mit der Dermis sicher, in ihnen finden sich Nerven und Gefäße.

1.5 Kutane Zellen

1.5.1 Keratinozyten

Keratinozyten machen 90% der Zellen der Epidermis aus. Sie entstehen in Stammzellen der Basalschicht, durchwandern die Epidermis und durchlaufen dabei einen streng regulierten Differenzierungsgang. Neben den regulären Zellorganellen wie Golgi-Apparat, RER, Mitochondrien usw. enthalten die Keratinozyten mehrere für sie charakteristische Strukturen wie z.B.:

1. Zytoplasmatische Filamente (Zytoskelett) für mechanische Aufgaben:
 - a. Keratinfilamente (Tonofilamente) für das Verspannungssystem der Keratinozyten
 - b. Aktinfilamente für Zellfestigkeit sowie Adhärenz und Lokomotion
2. Adhäsionsorganellen (Zellverbindungen, „junctions“)
 - c. Untereinander sind die Keratinozyten durch Desmosomen und Adhärenzkontakte verbunden

- d. Hemidesmosomen sorgen für die Adhärenz an der Basalmembran
- e. „gap-junctions“ sind Kommunikationskanäle zwischen den Keratinozyten

1.5.2 Melanozyten

Melanozyten sind dendritische Zellen neuroektodermalen Ursprungs. Sie kommen in geringer Anzahl in der Epidermis vor. Je nach Körperregion kommt in erheblicher Variationsbreite ein Melanozyt auf 5-8 Keratinozyten des Stratum basale und Stratum spinosum. Die Dichte variiert zwischen 1000-2000/mm² Hautoberfläche. Das Gesamtgewicht der Melanozyten beträgt ca. 1,5g. Melanozyten bilden Melanin als Antwort auf verschiedene Stimuli, insbesondere UV-Licht, und sind damit hauptverantwortlich für die Eigenfarbe der Haut. Die Pigmentierung der Haut erfolgt durch Transfer von Melanosomen in die benachbarten Keratinozyten. Verschiedene Adhäsionsmoleküle verbinden die Melanozyten mit der Basalmembran. Melanozyten sind etwas größer als Keratinozyten, haben einen runden Zelleib und lange unregelmäßige Fortsätze. Jeder Melanozyt entsendet 10-20 Dendriten durch den Interzellularraum und steht mit ca. 30 Keratinozyten in Kontakt (Fritsch, 1998 a). Das Zytoplasma der Melanozyten ist relativ hell, hat nur wenige Filamente, aber zahlreiche Mitochondrien, ein gut entwickeltes RER und einen deutlichen Golgi-Apparat.

1.5.3 Dermale Fibroblasten

Fibroblasten zählen zu den ortsständigen Bindegewebszellen. Sie haben viele irreguläre zytoplasmatische Fortsätze. Die Zellkerne sind oval, groß und hell mit feinem Chromatin und deutlichem Nukleolus. Im Zytoplasma findet sich reichlich granuläres endoplasmatisches Retikulum. Ihr Golgi-Apparat ist gut entwickelt. Fibroblasten weisen eine intensive Synthesetätigkeit auf. Sie bilden Prokollagen sowie Glykosaminoglykane als wichtigsten Bestandteil der Grundsubstanz. Prokollagene sind Vorstufen, die nach enzymatischer Abspaltung von P-Peptiden in Kollagen überführt werden. Derzeit sind über 17 Kolla-

gentypen bekannt. Die Dermis enthält etwa 10 Typen, von denen die wichtigsten die Typen I, III, IV, VI und VII sind (Fritsch, 1998 b). Außerdem wird von den Fibroblasten das Enzym Kollagenase gebildet, welches den physiologischen Abbau von Kollagen synthetisiert.

1.5.4 Mikrovaskuläre Endothelzellen (MVECs)

Endothelzellen sind sehr flach (0,1-1µm dick) und kleiden u.a. das Lumen der Kapillaren aus. Ihr Zytoplasma enthält meist nur wenige Zellorganellen. Charakteristisch sind sog. Weibel-Palade-Körper, die den von Willebrand-Faktor als Kofaktor der Blutplättchenaggregation enthalten. Im Rahmen des Stoff- und Gasaustauschs sind Endothelzellen sowohl für Gase, als auch für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile durchlässig. Endothelzellen mit überwiegend metabolischen Eigenschaften bilden Kollagen, Elastin, Proteoglykane sowie Stoffe, die bei der Blutgerinnung (z.B. von-Willebrand-Faktor und Prostazyklin), bei der Angiogenese (Wachstumsfaktoren) und für glatte Muskelzellen eine Rolle spielen.

1.6 In dieser Arbeit untersuchte Dermatosen

1.6.1 Psoriasis vulgaris

Die *Psoriasis vulgaris* ist eine chronisch-entzündliche Dermatose mit epidermaler Hyperproliferation. Diese Verhornungsstörung ist weltweit verbreitet. Von der westeuropäischen Bevölkerung sind 1-3% betroffen. Charakteristisch ist die Ausbildung erythematöser Plaques mit groblamellärer, silbrig glänzender Schuppung an Streckseiten der Ellenbogen und Knie, behaartem Kopf, Bauchnabel und Sakralregion. Die histologische Untersuchung ergibt eine ausgeprägte epidermale Akanthose mit Hyper- oder Parakeratose und verlängerten Reteleisten. Pathognomonisch können in der Epidermis subkorneal sog. Munro-Mikroabszesse auftreten (Sterry und Paus, 2004 a).

1.6.2 Neoplasien

Durch verändertes Freizeitverhalten, wie z.B. Anstieg der sportlichen Aktivitäten im Freien und zahlreichen Fernreisen, kommt es zu einer starken Zunahme der Inzidenz von Hautkrebs. So gehören die epithelialen Hautkarzinome **Basaliom** und **Spinaliom** zu den häufigsten Neoplasien überhaupt.

1.6.2.1 Basaliom

Das **Basaliom** ist ein semimaligner Tumor mit lokal destruierendem Wachstum, aber ohne Metastasierungstendenz. Chronische UV- und Arsenexposition, Immunsuppression, genetische Prädisposition und ionisierende Strahlen begünstigen die Entstehung eines **Basalioms**. Es tritt meist im Gesicht älterer Menschen auf, ist aber auch an Stamm oder Extremitäten zu finden.

Histologisch zeichnet sich das **Basaliom** durch seine stark basophilen, relativ monomorphen Tumorzellen aus, die Zellnester mit Palisadenstellung der Randpopulation ausbilden (Stery und Paus, 2004 b).

1.6.2.2 Spinaliom (Plattenepithelkarzinom, spinozelluläres Karzinom)

Das **Spinaliom** ist ein maligner Tumor der Haut, der sich am häufigsten nach chronischer Lichtexposition (aus aktinischen Keratosen) und Röntgenbestrahlung entwickelt. Weitere Entstehungsfaktoren sind: Chemokanzerogene (Arsen, Teer), Immunsuppression und humane Papillomviren (v.a. Typ 16 und 18). Meist findet sich das **Spinaliom** im Bereich chronisch lichtexponierter Haut älterer Menschen. Es imponiert oft als rötlicher Tumor, der unscharf begrenzt und von Schuppenkrusten bedeckt oder zentral exulzerierend ist. Allerdings kann das klinische Bild stark variieren, ebenso wie das Wachstumsverhalten. Die Metastasierung erfolgt primär lymphogen.

In der Histologie präsentieren sich eosinophile Keratinozyten aus dem Stratum spinosum mit deutlichen Kern- und Zellatypien. Eine starke Horninselbildung korreliert mit einem hohen Differenzierungsgrad, während eine fehlende Ver-

hornung mit einer Entdifferenzierung und schlechten Prognose korreliert. Zwischen den Kollagenfaserbündeln ist invasives Wachstum sichtbar (Sterry und Paus, 2004 c).

1.7 Das Renin-Angiotensin-System in der Haut

Über die mögliche Existenz eines Gewebe-RAS in der Haut gab es vor Beginn der hier vorgestellten Arbeiten nur vereinzelte Daten: in der Haut von Ratten wurden Angiotensin II selbst sowie die Angiotensinogen- und ACE-kodierenden mRNAs gefunden (Phillips et al., 1994). In menschlicher Haut wurde die Expression und enzymatische Aktivität von ACE beschrieben (Hera et al., 1982). In beiden Fällen wurden jedoch Blutgefäße mituntersucht, von denen bekannt ist, dass ihre Wände ein Gewebe-RAS inklusive Angiotensin-Rezeptoren enthalten (Swales und Heagerty, 1987). Daher können diese Daten nicht als eindeutig hautspezifisch interpretiert werden.

Kutane Ang II-Rezeptoren wurden erstmals an Affen- und Rattenfeten sowie in menschlicher, fetaler Haut beschrieben (Millan et al., 1989, Zemel et al., 1990, Tsutsumi et al., 1991, Johnson und Aguilera, 1991, Feuillan et al., 1993). Eine starke Expression von AT₂-Rezeptoren während der Fetalperiode ist von vielen, auch humanen Geweben bekannt und liefert keinen Hinweis auf die Situation in adultem Gewebe, da die Expression der AT₂-Rezeptoren postnatal im gesamten Organismus stark zurückgeht. Bei den bisherigen Publikationen zum Thema Angiotensin-Rezeptoren in kutanem Gewebe erwachsener Tiere oder Menschen ist das Bild wesentlich uneinheitlicher. In der Haut erwachsener Ratten scheinen AT₁-Rezeptoren zu überwiegen (Phillips et al., 1994, Abiko et al., 1996); es existieren jedoch auch Publikationen, die entweder AT₁- und gleichzeitig AT₂-Rezeptoren (Viswanathan et al., 1991) oder die gar keine Angiotensin-Rezeptoren beschreiben (Sun et al., 1994).

Es existieren mehrere Publikationen, in denen die Angiotensin-Rezeptor Expression auf dermalen Fibroblasten der Ratte oder der Maus in vitro beschrieben ist. In mindestens zwei dieser Publikationen wird das Vorhandensein von AT₁- und

AT₂-Rezeptoren gezeigt (Phillips et al., 1994, Johnson und Aguilera, 1991, Min et al., 2004; Takeda et al., 2004). In anderen wird aber auch über das völlige Fehlen der Expression von Angiotensin Rezeptoren (Takayanagi et al., 1994), bzw. die Expression von AT₁-Rezeptoren und einer Bindungsstelle für Angiotensin 1-7, aber keiner AT₂-Rezeptoren (Nickenig et al., 1997) berichtet, so dass auch hier das Bild uneinheitlich ist.

Insgesamt sind alle bisherigen Publikationen zum Thema RAS in der Haut – insbesondere in menschlicher Haut – Einzelberichte. Eine systematische Untersuchung zu diesem Thema fehlt bislang.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war der Nachweis eines kompletten lokalen RAS in menschlicher Haut sowie die Gewinnung erster Erkenntnisse über mögliche Veränderungen im Expressionsmuster des RAS bei ausgewählten Dermatosen.

Zu einem kompletten, lokalen RAS gehören die zur Ang II Synthese notwendigen Faktoren - also das Vorläuferprotein Angiotensinogen sowie die Enzyme Renin und ACE – sowie die Rezeptoren für Ang II, das sind im wesentlichen die Subtypen AT₁ und AT₂. Diese RAS Komponenten sollten auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. In einem ausgewählten Zelltyp, den Keratinozyten, sollte darüber hinaus der direkte Nachweis von Ang II als ultimativer Beweis für die Fähigkeit kutanen Gewebes zur Ang II Synthese erbracht werden.

Die Expression aller genannten RAS Komponenten auf mRNA-Ebene wurde in Primärkulturen verschiedener Zelltypen (Keratinozyten, Melanozyten, dermalen Fibroblasten und dermalen mikrovaskulären Endothelzellen) mittels RT-PCR untersucht. Auf Gewebe-Biopsien wurde an dieser Stelle bewusst verzichtet, da diese Gefäße enthalten würden und von Gefäßendothelien bekannt ist, dass sie alle Komponenten des RAS enthalten. Damit wäre keine spezifische Aussage über die Verhältnisse in der Haut mehr möglich.

Zusätzlich sollte die Expression von Angiotensinogen, Renin und ACE sowie der Angiotensin-Rezeptoren auf Protein-Ebene immunhistochemisch mittels APAAP-Färbungen untersucht werden.

Abschließend sollte das so ermittelte Expressionsmuster der RAS-Komponenten in gesunder Haut mit dem in pathologisch veränderter Haut verglichen werden, um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob das RAS unter pathophysiologischen Bedingungen möglicherweise Änderungen unterliegt. Wegen des erwiesenen Einflusses von Ang II auf Zellproliferation und –differenzierung wurden drei

Dermatosen ausgewählt, zu deren Charakteristika unter anderem eine gestörte Keratinozytenproliferation gehört.

Folgende Erkrankungen wurden ausgewählt:

1. Hyperkeratotische Erkrankung

- Psoriasis vulgaris

2. Tumorerkrankungen

- Basaliom (semi-maligne)
- Spinaliom (maligne)

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 4: Herstellernachweis der verwendeten Materialien

Verwendete Materialien	Hersteller
AB-Serum	Behring, Marburg, Deutschland
Abzug (Hyperclean)	Shandon, England
ACE-Hemmer	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Adenine: $1,8 \cdot 10^{-4}$ M	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Agarosegel: Agarose Electrophoresis Grade	Gibco BRL Life Technolgy, Eggenstein, Deutschland
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
3-Aminopropyltriethoxy-silane	Sigma, Deideshofen, Deutschland
APAAP mouse monoklonal	DAKO, Glostrup, Dänemark
Aqua destillata	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Brutschrank: CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Holding GmbH, Osterode/Harz, Deutschland
cDNA-Synthesis Kit	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Centrifuge 5402, 14.000U/min	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Choleratoxin (10^{-10} M)	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Dispase	Boehringer, Mannheim, Deutschland

Verwendete Materialien	Hersteller
DMEM Medium (angereichert mit 5% fetalem Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Sodium Bicarbonate	Gibco, Grand-Island, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium and Magnesium, w/o Sodium Bicarbonate	Gibco, Grand-Island, USA
ECGF	Sigma, Deideshofen, Deutschland
EIA-Reagenzien	Cayman Chemical, Michigan, USA
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
FAD Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gelkammer: Horizon 11.14	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison (0,5µg/ml)	Sigma, Deideshofen, Deutschland
IL 6	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Insulin (5µg/ml)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kamera: Polaroid Quick Shooter, Modell QSR	Kodak Company, Cambridge, USA
Kollagenase Typ 4	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Kryomatrix	Tissue Tek, O.C.T., USA
Küvette	Assistent, Sodheim/Rhön, Deutschland
Levamisole	Sigma, Deideshofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Lyse-Puffer „Buffer RLT“	RNEasy Kit, Qiagen, Chatsworth, CA, USA
Master Mix	Boehringer, Mannheim, Deutschland

Verwendete Materialien	Hersteller
MEM-nicht essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA
Mikroskop	Carl-Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrotiter-Platten-Messpektrometer	Dynatech, Chantilly, VA, USA
Mikrowelle: Mikromat	AEG, Berlin, Deutschland
Minifuge RF, r=14,09cm, 1200U/min	Heraeus Sepatech, Osterode/ Harz, Deutschland
Mitomycin-C	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Naphtol AS-BI Phosphoric Acid	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Natriumpyruvat (1mM)	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer: 0,1mm, Fläche 9mm ²	Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland
Neufuchsin	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
PAP-Pen	Science Services, München, Deutschland
PBS	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
PCR-Puffer	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Peptid-spezifische Säulen	Waters, Massachusetts, USA-
Petrischale (Kollagen A bedeckt)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten und -spitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Puffer (MgCl ₂ , KCl, RNAsin, deoxyNTP, random primers, M-MVL Reverse Transcriptase)	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
QIA-shredder Säule	Qiagen, Hilden, Deutschland

Verwendete Materialien	Hersteller
Rabbit anti-mouse Immunglobulin	DAKO, Glostrup, Dänemark
Reverse Transcriptase Superscript	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
Rinderserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
RNase Inhibitor	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Rneasy Kit	Qiagen, Valencia, USA
RPE-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPMI 1640 without L-Glutamine	Gibco, Grand-Island, USA
RT-Puffer	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein, Deutschland
RW1-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Safe lock Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spin Phase Lock tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank, Mikrobiologische Sicherheitskabine	Karl Bleyemehl, Reinraumtechnik GmbH, Berlin, Deutschland
3T3 Zellen	F.Watt. ICRF, London, England
TAE Puffer	Selbstansatz: 242g Tris Base, 57,1ml Essigsäure, 100ml 0,5M EDTA (pH 8,0) auf 1000ml Aqua bidest.
Taq DNA Polymerase, native	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
TGF β	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Thermocycler 60	Bio-med Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Tissue Tec (OCT-Compound)	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
TNF α	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Tris-Base	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Tris-HCL	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin EDTA	Biochrom/Seromed, Berlin, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator	Branson Ultrasonic Corp, Danbury, USA

Verwendete Materialien	Hersteller
Waage: MA AF 200	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbäder: MS/M6 Lauda	MS Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Zellschaber	Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland

3.1.1 Hautbiopsien

Als Versuchsmaterial dienten 35 Hautbiopsien aus der Gewebebank der Klinik für Dermatologie und Allergologie, Charité, Universitätsmedizin-Berlin. Die Biopsien wurden zu diagnostischen oder kurativen Zwecken nach Einholen des schriftlichen Einverständnisses der Patienten entnommen. Dabei handelte es sich um: 7 x Psoriasis, 11 x **Basaliom** und 9 x **Spinaliom**. Für die Kontrollgruppe wurden Biopsien gesunder Haut von 8 Patienten herangezogen.

3.1.2 Antikörper

Der benutzte Antikörper MAB 4051 ist spezifisch gegen ACE (N-terminal) und von Chemicon International Inc., Temecula, CA entwickelt. Es handelt sich um einen monoklonalen Maus-Anti-ACE-Antikörper vom Isotyp IgG1. Anwendung findet er in der Immunhistochemie, Immunzytochemie, bei Immunoblot, Immunpräzipitation und ELISA.

Auch die Darstellung mit Maus-Anti-ACE-Antikörper MAB 4055 und MAB 4056 wurde initial versucht, aber wegen unbefriedigender Ergebnisse wieder aufgegeben.

Die Antikörper Anti-Angiotensinogen (VH-68), -Renin 2 und -Renin 3 wurden freundlicherweise von J. Peters und U. Hilgenfeldt, Institut für Pharmakologie,

Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei VH-68 um einen Kaninchen-Antikörper vom Isotyp IgG1 und bei den Renin-Antikörpern um polyklonale Kaninchen-Antikörper.

Die polyklonalen Antikörper Anti- AT₁-/ AT₂-Rezeptor wurden von Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA entwickelt und sind vom Isotyp IgG.

Tabelle 5: Benutzte Antikörper und ihre Subklassen, Spezifitäten und Hersteller

Antikörper Anti-	Subklasse	Spezifität	Hersteller
ACE (MAB 4051)	IgG ₁	ACE (N-terminal) von Menschen, Affen, Ratten, Hamster und Katzen	Chemicon International Inc., Temecula, CA
ACE (MAB 4055)	IgG ₁	ACE (N-terminal) von Menschen und Affen	Chemicon International Inc., Temecula, CA
ACE (MAB 4056)	IgG ₁	ACE (N-terminal) von Menschen	Chemicon International Inc., Temecula, CA
Angiotensinogen (VH-68-8)	IgG ₁	Humanes Angiotensinogen	Peters J, Hilgenfeldt U, Institut für Pharmakologie, Universität Heidelberg
Renin (Renin 2)	IgG ₁	Humanes Renin	Peters J, Hilgenfeldt U, Institut für Pharmakologie, Universität Heidelberg
Renin (Renin 3)	IgG ₁	Humanes Renin	Peters J, Hilgenfeldt U, Institut für Pharmakologie, Universität Heidelberg
AT ₁ -Rezeptor	IgG	Humaner AT ₁ -Rezeptor	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
AT ₂ -Rezeptor	IgG	Humaner AT ₂ -Rezeptor	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

3.2.1.1 Feeder Layer Zellen

Für optimale Wachstumsbedingungen wurden die Keratinozyten auf einem Feeder Layer aus 3T3 Maus-Fibroblasten (J2 Klone) kultiviert. Diese Zellen wurden in DMEM Medium unter Zusatz von 100 IU/ml Penicillin, 100 µg Streptomycin und 10 % FCS kultiviert und einmal wöchentlich im Verhältnis 1:10 geteilt. Wegen der spontanen Transformation und Alterung der 3T3 Zellen wurden alle drei Monate die alten Zellen verworfen und durch neue aus niedriger Passage ersetzt. Vor der Verwendung als Feeder-Layer wurde die Proliferation der konfluenten 3T3 Zellen durch zweistündige Inkubation mit Mitomycin C (4µg/ml) inhibiert. Anschließend folgte die Auslösung aus den Kulturflaschen mit Trypsin-EDTA, die Teilung im Verhältnis 1:3 und die Neuaussaat. Am Folgetag wurden die Keratinozyten auf die so generierten Feeder-Layer aufgebracht.

3.2.1.2 Keratinozyten

Die humanen Keratinozyten wurden nach Aufklärung und Einverständniserklärung der Eltern aus den Präputien von 14 Tage bis 10 Jahre alten Kindern nach Circumcision aus medizinischen oder religiösen Gründen gewonnen. Die Hautproben wurden in 70 % -iger Ethanol-Lösung 1 min vorsichtig steril gewaschen und anschließend vom subkutanen Fett befreit. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Hautstücke in schmale Streifen geschnitten und in einer Dispase Lösung (3mg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die mit Dispase behandelten Hautproben mehrfach in PBS (ohne Ca- und Mg) gewaschen. Mit einer Pinzette wurde die Epidermis vorsichtig von der Dermis getrennt und in einer 0,25 % igen Trypsin Lösung für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Keratinozyten wurden über einen 40µm Filter in ein Falcon Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Trypsins mit FCS, und die Keratinozyten wurden nach mehrmaligem Waschen mit PBS in Wachstumsmedium

aufgenommen. Mittels Trypitanblaufärbung wurde die Viabilität der Keratinozyten überprüft. Dann wurden die Keratinozyten auf die Mitomcyin C behandelten 3T3 Feeder-Layer mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro 75 cm^2 ausgesät. Das Wachstumsmedium für die Keratinozyten (FAD-Medium) hatte folgende Zusammensetzung: drei Teile Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) plus ein Teil F12 Medium angereichert mit Adenin ($1,8 \times 10^{-4} \text{ M}$), Hydrocortison ($0,5 \text{ µg/ml}$), Insulin (5 µg/ml), Cholera toxin (10^{-10} M) und EGF (10 mg/ml). Ein Austausch des Wachstumsmediums fand dreimal pro Woche statt. Wenn die Keratinozyten eine Dichte von 70 % erreicht hatten, wurden die 3T3 Feeder Layer Zellen zuerst mit 0.02 % EDTA entfernt und daraufhin der Feeder-Layer anschließend mit Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin; 0.02 % EDTA) abgelöst. Die Keratinozyten wurden im Verhältnis 1:3 geteilt und wieder ausgesät. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen in Passage 3-5 verwendet.

3.2.1.3 Melanozyten

Die Melanozytenisolierung aus der Epidermis erfolgte nach dem gleichen Schema wie die der Keratinozyten. Für die Kultivierung der Melanozyten sind keine Feeder Layer notwendig. 1 bis 2×10^6 Zellen aus der Keratinozyten-Präparation wurden auf Kollagen beschichtete Petrischalen in einem Volumen von 10 ml eines speziellen Melanozyten-Mediums ausgesät. Durch Zusatz von PMA wurde das Wachstum der gleichzeitig ausgesäten Keratinozyten in den Melanozytenkulturen inhibiert, so dass die Melanozytenkulturen nach zwei Passagen 100% rein waren. Als Kulturmedium wurde ein serumfreies Melanozytenwachstumsmedium verwendet, das mit bovinem Hypophysenextrakt und Phorbol ester angereichert war.

3.2.1.4 Dermale Fibroblasten

Für die Isolierung der dermalen Fibroblasten wurde die Haut zuerst über Nacht mit Dispase behandelt. Nach Abtrennung der Epidermis von der Dermis wurde die Dermis mit Hilfe einer Schere in 2-4 mm große Stücke geschnitten und in

einer Kollagenase Lösung (10 mg/g Dermis) bei 37 °C unter Schütteln eine Stunde verdaut. Ungelöste Gewebereste wurden durch Filtration über einen 40µm Filter entfernt. Anschließend wurden die so gewonnenen Fibroblasten in DMEM Medium unter Zusatz von Antibiotika und FCS (5%) kultiviert.

3.2.1.5 *Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (MVECs)*

Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen wurden ebenfalls aus Präputien gewonnen. Die Haut wurde in kleine Stücke geschnitten und in 0.25 % Trypsin/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen der Hautstücke mit PBS und die vorsichtige Trennung der Epidermis von der Dermis. Endothelzellen wurden mit Hilfe eines stumpfen, runden Skalpells vorsichtig aus der Dermis ausgepresst, durch einen 100µm Nylon-Filter in ein Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert, mit ECGF, 1mM Natriumpyruvat, MEM-nicht essentiellen Aminosäuren sowie Heparin 50U/ml ergänzt und auf Kollagen A bedeckte Petrischalen ausgesät. Nach 10 Minuten wurden die Überstände abgegossen, um die nicht adhärenen Zellen aus den Petrischalen zu entfernen. Anhaftende MVECs wurden in Endothelzellmedium bis zur dritten Passage kultiviert. Durch immunhistochemische Färbungen (Cytospins) mit Antikörpern gegen von-Willebrand Faktor erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Zellreinheit, die immer über 95% erreichte.

3.2.2 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

3.2.2.1 *Prinzip der RT-PCR*

Die PCR wurde erstmalig 1984/1985 durch Kary B. Mullis, Kalifornien, als Verfahren beschrieben (Saiki et al., 1985). Sie beruht auf dem Doppelstrang-Prinzip der DNA und ermöglicht die Amplifizierung beliebiger DNA-Abschnitte und damit den Nachweis bestimmter Gensequenzen bzw. auch ganzer Gene. Heute ist die RT-PCR das meistverbreitete Verfahren zur Charakterisierung und zum quantitativen Nachweis von mRNA in verschiedenen Proben (Orlando et al., 1998).

3.2.2.2 Primer bei der RT-PCR

Tabelle 6: Benutzte Primer mit Sequenz, Länge und Zyklenzahl

Primer, spezifisch für-	Sequenz	Länge	Zyklus- zahl
ACE	Upstream 5'-AGG TTG AGA CTG DGC AGG TGC TTG G-3' Downstream 5'-GGA CGC GGA GGA TGT TTA AGG-3'	388 bp	38
Renin	Upstream 5'-ACC TCA AGA CTG GTG TCT GGC-3' Downstream 5'-CCA ATG CGG TTG TTA CGC CG-3'	426 bp	38
Angiotensinogen	Upstream 5'-AGC CTC ACT ATG CCT CTG ACC TGG-3' Downstream 5'-TGA CAC ATC GCT GAT TTG TCC G-3'	526 bp	38
AT ₁ -Rezeptor	Upstream 5'-CCC AAA GCT GGA AGG CAT AAT T-3' Downstream 5'-GAC GCT GGC TGA AGC AAT CTT-3'	270 bp	38
AT ₂ -Rezeptor	Upstream 5'-CTG CTG TTG TTC TGG CCT TCA T-3' Downstream 5'-ACT CTC TCT TTT CCC TTG GAG CC-3'	263 bp	38

3.2.2.3 Durchführung der RT-PCR

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den verschiedenen Zelltypen wurde mit dem „RNA Isolation Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Die unterschiedlichen Zellen wurden in 350µl Lyse-Puffer lysiert. Danach wurden die Proben auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen) gegeben und bei 14000

U/min 3 min bei 4°C zentrifugiert. Es folgte die Mischung des RNA-haltigen Zentrifugats mit 70% igem Ethanol im Verhältnis 1:1. Anschließend wurde dieses Gemisch auf eine RNeasy spin-Säule gegeben und für 15 Sekunden mit 10000 U/min zentrifugiert. Dadurch wurde die Bindung der RNA an das Säulenmaterial erreicht. Nun folgte die Entfernung der genomischen DNA aus der Säule. Zu diesem Zweck wurde nach dem ersten Waschen mit dem RW1 Puffer 1µl DNase I in 80 µl DNase-Puffer auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Danach wurde die Säule nochmal mit RW1 und schließlich zweimal mit RPE-Puffer gewaschen. Die Gesamt-RNA wurde aus der Säule mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Eine weitere Reinigung der RNA von der DNase erfolgte durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion der Proben. Die Phenol-Phase wurde durch Zentrifugation der Proben über ein Phase-Lock System (Fa. Roche) von der wässrigen Phase quantitativ getrennt. Anschließend wurde RNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 3 M K-Acetat und ein Co-präzipitations-System isoliert, nach Waschen mit Ethanol getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen. Die Gesamtmenge der RNA wurde spektrophotometrisch mit einer UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Auf einem mit Ethidiumbromid angefärbten 1.5 % igen-Agarosegel wurde die Qualität der RNA untersucht.

Die Transkription der RNA in cDNA wurde mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Roche) für RT-PCR (AMV) wie folgt durchgeführt:

Es wurde ein Mix aus 2.0µl 10x Reaktions-Puffer, 4.0µl 25mM MgCl₂, 2.0µl Desoxynukleotid-Mix, 2.0µl Random Primer, 1.0µl RNase Inhibitor, 0.8 µl Reverse Transkriptase und abhängig von der RNA Konzentration ca. 5µl RNA Proben hergestellt und mit sterilem Wasser auf 20.0µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden zuerst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert.

Amplifiziert wurde die cDNA durch PCR in einem Endvolumen von 50µl mit 25 µl Master-Mix und je 2.5µl spezifischen Primern für Gene von ACE, Renin, Angiotensinogen, AT₁- und AT₂-Rezeptoren. Die PCRs liefen über 38 Zyklen.

Für die PCR von ACE, Renin und Angiotensinogen wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt: 5 min 94°C, 38 Zyklen 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 65°C, 45 sec 72°C, anschließend 10 min bei 72°C.

Für die PCR von AT₁ und AT₂ wurde ein Touch-Down Programm durchgeführt.

Dabei wurde die Annealing Temperatur bei den ersten zehn Zyklen von 65°C jeweils um ein Grad bis auf 55°C heruntersgesetzt und anschließend mit 55°C bei weiteren 28 Zyklen amplifiziert.

3.2.3 Angiotensin II enzymatisches immunometrisches Assay (EIA)

Das Prinzip dieser Bestimmung liegt in der Bindung von aus den Zellen extrahiertem Ang II an Ang II spezifische, monoklonale Antikörper, die an eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte gebunden sind. Nach immunologischer Reaktion von Ang II mit dem Antikörper wird der entstandene Komplex kovalent mit Hilfe von Glutaraldehyd über seine Aminogruppen an die Platte vernetzt. Der quantitative Angiotensin-Nachweis erfolgt schließlich spektrophotometrisch (Volland et al., 1999).

Im Einzelnen werden folgende Schritte durchgeführt:

3.2.3.1 Vorbereitung der Keratinozyten-Kulturen

Vor der Messung einer etwaigen spontanen Angiotensin Synthese der Keratinozyten wurden die Zellen 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber (Renner GmbH, Deutschland) in 1ml PBS von den Kulturschalen abgekratzt und mit einem Ultraschall-Homogenisator (Branson Ultrasonic, USA) homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate zentrifugiert und bei -80°C aufbewahrt. Die

Messung der Angiotensinkonzentration erfolgte in den Homogenaten und im Zellkultur-Überstand.

Für die Identifikation möglicher Stimuli der Ang II Synthese in humanen, primären Keratinozyten wurden die Zellen für 24 Stunden mit 2 ng/ml Interleukin-6 (IL-6), 10 ng/ml EGF (epidermal growth factor), 50 pg/ml TNF α (tumor necrosis factor α) oder 50 pg/ml TGF β (transforming growth factor β) inkubiert. Die Inkubationen erfolgten mit und ohne Zusatz von 10⁻⁵ M ACE-Hemmer, um zwischen bereits vorhandenem Ang II und in der Stimulationsphase tatsächlich neu gebildetem Ang II zu unterscheiden.

3.2.3.2 Extraktion des Angiotensin II aus Zellhomogenaten

Zu diesem Zweck wurden die Homogenate in PBS verdünnt und anschließend auf Peptid-spezifische Säulen (Waters, USA) aufgetragen.

Im einzelnen wurden die Säulen zunächst mit 1 ml Methanol und anschließend mit 1 ml Wasser vorgespült. Dann wurde 1 ml Zellhomogenat auf die Säulen aufgetragen und mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Peptide wurden anschließend mit 0,5 ml Methanol von der Säule eluiert. Mit Hilfe einer Vakuum-Zentrifugation erfolgte die Entfernung der Methanolphase, die Probe wurde in 0,5 ml EIA Puffer aufgenommen und bei 3000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

3.2.3.3 Vorbereitung der EIA Reagenzien

EIA Puffer:

Dem in dem Kit enthaltene Lyophilisat wurden 50 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, die Mischung fünf Minuten stehen gelassen und anschließend vorsichtig bis zur kompletten Lösung aller Bestandteile gerührt.

Angiotensin II Standard:

Der im Kit enthaltene Flascheninhalt wurde in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Die Konzentration des Standards betrug 125 pg/ml. Durch weitere

Verdünnungen wurde dann folgende Standardreihe hergestellt: 125 pg/ml (S1), 62.5 pg/ml (S2), 31.25 pg/ml (S3), 15.63 pg/ml (S4), 7.81 pg/ml (S5), 3.91 pg/ml (S6), 1.95 pg/ml (S7) und 0.98 (S8) pg/ml.

Qualitätskontrolle:

Als Qualitätskontrolle wurde eine vorgegebene Konzentration von 2pg/ml Angiotensin II in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst und mitgemessen.

Anti-Angiotensin II IgE:

Anti-Angiotensin II IgE wurde in 10 ml EIA Puffer aufgenommen.

Glutaraldehyd:

100µl Glutaraldehyd wurden mit 5 ml verdünntem Waschpuffer gemischt.

Boran-Trimethylamin:

Kurz vor Gebrauch wurde Boran-Trimethylamin in 5 ml einer 2N HCl/Methanol (50/50, v/v) Lösung aufgenommen.

Ellman`s Reagenz:

Fünf Minuten vor Gebrauch wurde Ellman`s Reagenz in 1 ml konzentriertem Waschpuffer aufgenommen und anschließend auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Waschlösung:

2 ml konzentrierter Waschpuffer wurden auf 0.8 l Endvolumen mit Wasser verdünnt und mit 400µl Tween 20 versetzt.

Plattenvorbereitung:

Vor Gebrauch wurden die Platten mit 300µl Waschpuffer fünfmal gewaschen und die Restflüssigkeit durch Abklopfen der Platten entfernt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	12	12	12	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	SB	SB	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Abbildung 3: Beispiel Plattenformat

Blk : Blank (leer)

NSB : Nicht-Spezifische Bindung

B₀ : Maximale Bindung

TA : Total Aktivität

S1-S8 : Standards 1-8

1-24 : Proben oder Qualitätskontrolle

3.2.3.4 Inkubation und Waschen der Platten

Jeweils 100µl Standard und Proben wurden auf die Platten aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde in jedes Well (außer Blank) 50µl Glutaraldehyd-Lösung gegeben und weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Boran-Trimethylamin (50 µl pro Well [außer Blank]), und die Proben wurden für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt.

Die Platten wurden fünfmal mit Waschpuffer (300µl pro Well) gewaschen und - um die Flüssigkeitsreste zu entfernen - heftig mit der Oberseite nach unten auf Papiertücher geklopft. Nach Zugabe von 100 µl anti-Angiotensin II IgG (außer Blank) wurden die Platten mit einem Parafilm bedeckt und über Nacht bei 4°C

inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer (300µl) gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden in jedes Well nochmals 300µl Waschpuffer hinzugegeben und für weitere fünf Minuten inkubiert.

Nach der Entfernung der Restflüssigkeit wurden jeweils 200 µl Ellman's Reagenz in jedes Well hinzugefügt und für weitere 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten in einem Mikrotiter-Platten-Messspektrometer (Dynatech, USA) bei 405 nm gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Graph-Prism 2.

3.2.4 Einbettung von Hautbiopsien

Die Exzisate wurden nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff im Gefriermikrotom (Kryostat) in Kryomatrix (Tissue Tek, USA) eingebettet und dann bei -80°C gelagert.

3.2.5 Herstellung von Gefrierschnitten

Mittels Kryostat wurden von den Hautbiopsien bei etwa -28°C 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese Gefrierschnitte wurden dann auf mit Aminosilane-Lösung beschichtete Objektträger aufgebracht, 2 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für 10 Minuten bei -20°C in 10% Acetonlösung fixiert. Nach wiederholter Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden sie bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.6 Alkalische Phosphatase – Anti - Alkalische Phosphatase (APAAP)

3.2.6.1 *Prinzip der APAAP – Technik*

Diese von Cordell et al. 1984 erstmals beschriebene immunenzymatische Färbemethode nutzt eine Enzym-Substratreaktion, um farblose Chromogene in ein gefärbtes Endprodukt umzuwandeln. Das Enzym Alkalische Phosphatase stammt aus dem Darm von Kälbern.

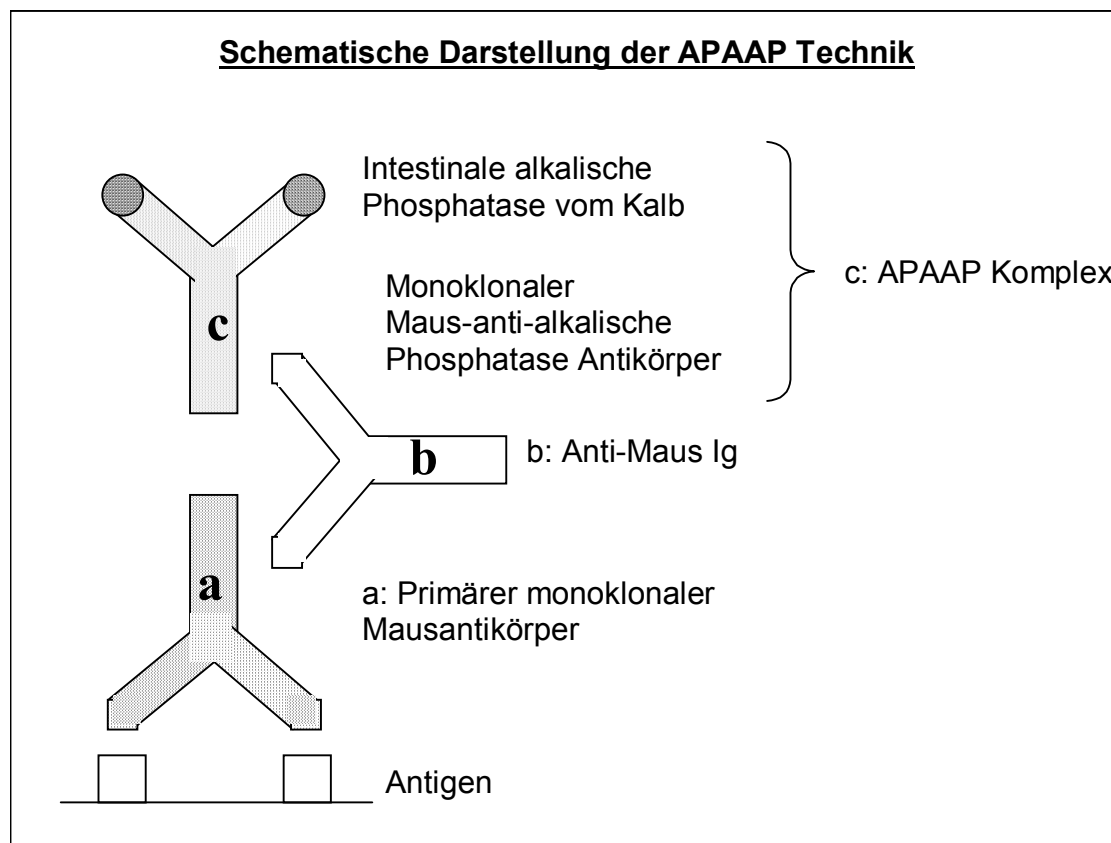


Abbildung 4: Schematische Darstellung der APAAP Technik

Die Primärantikörper gegen die gesuchten Antigene werden mit einem Medium versetzt, welches Rinderalbumin enthält. Dieses lagert sich an elektrisch geladene Gewebeelemente an und verhindert so eine Adsorption der Antikörper. Hat der Antikörper an das Antigen gekoppelt, lagert sich der APAAP-Komplex an die Antikörper-Antigen-Verbindung an. Um eine Bindungsstelle des Antikörpers für diesen Maus-APAAP-Komplex freizuhalten, muss Brückenantikörper im Überschuss dazugegeben werden. Eine unspezifische Kreuzreaktion des Brückenantikörpers mit dem humanen Gewebe wird durch humanes AB-Serum verhindert, welches im Verdünnungsmedium für Brückenantikörper und APAAP-Komplex enthalten ist. Durch diese Brückenantikörper und den APAAP-Komplex bildet sich in mehreren Inkubationszyklen eine komplexe Verbindung, wenn das gesuchte Antigen vorhanden ist (siehe Abb.4 und Abb.5). Wiederholte Inkubationen führen zu zusätzlichen Anlagerungen der Enzymmoleküle an die Antigen-Bindungsstelle und bewirken so eine gesteigerte Farbreaktion (rot) bei

Entwicklung in hexazotierter Astraneufuchsin-Entwicklungslösung, einer chromogenen Substratlösung für Alkalische Phosphatase. Eine Gegenfärbung zur Kontrastdarstellung erfolgt mit Mayers saurem Hämalaun.

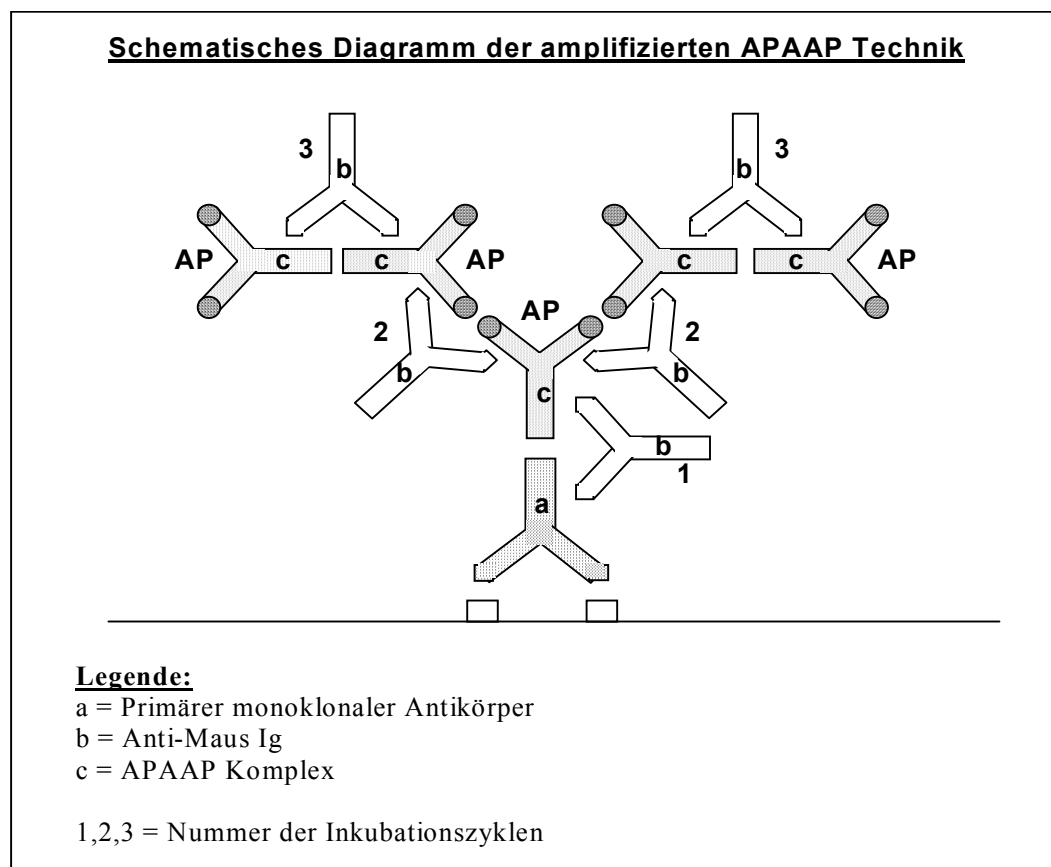


Abbildung 5: Schematisches Diagramm der amplifizierten APPAP Technik

3.2.7 Versuchsablauf

3.2.7.1 Vorbereitung

Die aufgetauten und luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden flach in den mit feuchtem Tuch ausgelegten APAAP-Kasten (Feuchtkammer) gelegt, und jeder Gewebespot wurde mit einem hydrophoben PAP-Pen umkreist, um das Auseinanderfließen der später aufgetropften Reagenzien zu vermeiden.

3.2.7.2 Inkubation mit dem Primär-Antikörper

Auf jeden Gewebespot wurden 40 µl des jeweiligen Primärantikörpers gegeben. Mit einem Medium aus 2,5 ml RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin, 22,5 ml destilliertem Wasser und 2,5 ml Rinderserum (vor Gebrauch inaktiviert im Was-

serbad bei 56°C für 30 min.) wurden die Primärantikörper entsprechend ihrer bestimmten Titer verdünnt (s. Titerbestimmung). Nun erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei geschlossenem Deckel und Raumtemperatur.

Als Negativkontrolle diente ein Präparat, das nur mit Verdünnungslösung ohne Primärantikörper inkubiert wurde.

3.2.7.3 Spülung der Gewebeschnitte in TBS

Die Schnitte wurden entnommen und in den Objektträgerständer gestellt. Die Präparate wurden sorgfältig gespült, indem sie nacheinander in vier mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) 0,05M gefüllten Küvetten geschwenkt wurden.

TBS 0.05 M wurde folgendermaßen hergestellt:

1,80 g Tris-Base

13,76 g Tris-Hydrochlorid und

17,56 g Natriumchlorid

Die pH-Einstellung auf 7,4-7,6 erfolgte mit 2 N HCl bzw. 2 N NaOH. Die überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig abgeklopft und die Objektträger wurden wieder nebeneinander flach in den APAAP-Kasten gelegt.

3.2.7.4 Zwischeninkubation bei polyklonalen Antikörpern

Im Falle von Angiotensinogen, Renin 2 und Renin 3 war der Antikörper nicht von der Maus, sondern vom Kaninchen, so dass vor den Inkubationen eine 30 minütige „mousefication“ erforderlich war. Hierbei wurde der polyklonale Antikörper mit einer sogenannten mouse-anti-rabbit-Antikörperlösung (m.a.r.; Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Ig, DAKO, Glostrup/Dänemark) mit demselben Verdünnungsmedium auf 1:200 verdünnt, das auch beim Primärantikörper verwendet wurde. Auf jeden Gewebespot wurden 40 µl mouse-anti-rabbit-Antikörperlösung aufgetragen. Die 30 minütige Inkubation zur Überführung in das monoklonale Maus-System und anschließende Spülung erfolgten wie zuvor.

3.2.7.5 Inkubation mit dem Brückenantikörper

Die Schnitte wurden nun mit 40 µl Brückenantikörper Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin, DAKO, Glostrup/ Dänemark) benetzt, das durch Mischung mit einem Medium (pH 7,4 – 7,6) aus 25ml RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin und 5 ml humanem AB-Serum (vor Gebrauch inaktiviert im Wasserbad bei 56°C für 30 min.) in einer Verdünnung von 1:40 vorlag. Wieder folgte eine 30 minütige Inkubation gefolgt von fünf fünfminütigen Spülungen in TBS, vorsichtigem Abklopfen der überschüssigen Flüssigkeit und Zurücklegen der Objektträger in den APAAP-Kasten.

3.2.7.6 Inkubation mit dem APAAP-Komplex

Nun wurden die Schnitte mit 40 µl APAAP-Komplex (APAAP, Mouse Monoclonal, DAKO, Glostrup/Dänemark), der mit dem gleichen Verdünnungsmedium des Brückenantikörpers auf 1:40 verdünnt war, wieder für 30 Minuten inkubiert und fünf Mal in TBS gewaschen (siehe oben).

3.2.7.7 Wiederholte Inkubation mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex

Erneut wurden 40 µl Brückenantikörper (1:40) aufgetragen, 10 Minuten inkubiert und gespült.

Eine abschließende 10 minütige Inkubation wurde nochmals mit dem APAAP-Komplex (40 µl, 1:40) durchgeführt.

Bis zur Entwicklung konnten die Präparate im TBS-Puffer stehenbleiben.

3.2.7.8 Färbung in hexazotierter Astraneufuchsin-Entwicklungslösung

Zunächst wurden folgende Lösungen angesetzt:

Lösung A)

62,5 ml Propandiol-Stammlösung 0,2 M wurden mit 175 ml Tris-Puffer aus

0,98 g Tris-Base

0,30 g Tris-HCl und

1,74 g NaCl

in 200ml destilliertem Wasser verrührt. Davon wurden 175 ml entnommen und mit 100 mg Levamisole (inhibiert die endogene Alkalische Phosphatase) auf dem Magnetrührer vermischt.

Lösung B)

125 mg Naphthol AS-BI Phosphat (Substrat) wurden in 1,5 ml NN-Dimethylformamid (DMF) gelöst.

Lösung C)

50 mg Natriumnitrit wurden in 1250 µl destilliertem Wasser aufgelöst. Anschließend wurden 500 µl Neufuchsin tropfenweise innerhalb von 60 sec. dazugegeben (Natriumnitrit aktiviert Neufuchsin zu rotem Farbstoff).

Waren die Lösungen A, B und C vorbereitet, wurde Lösung C zu A gegeben. Das Gemisch wurde verrührt und anschließend Lösung B hinzugegeben. Mit 2N Salzsäure wurde der pH-Wert mittels pH-Meter auf 8,8 eingestellt. Die Lösung wurde durch Filterpapier in eine Küvette gefiltert. Der Objektträgerständer mit den Gewebeschnitten wurde in diese Küvette hineingestellt. Die 30 minütige Entwicklung fand auf dem Schüttler statt. War das spezifische Antigen vorhanden, kam es durch die im APAAP Komplex enthaltene Alkalische Phosphatase zur Umsetzung von Neufuchsin zu einem roten Farbstoff und damit zur spezifischen Anfärbung der das Antigen enthaltenden Gewebestrukturen.

Nach abgeschlossener Entwicklung wurden die Schnitte in TBS mehrmals gewaschen.

3.2.7.9 Gegenfärbung mit Mayer`s saurem Hämaun

Die Gegenfärbung erfolgte für 5 Minuten in einer mit Mayer`s saurem Hämaun gefüllten Küvette. Anschließend wurde nochmals drei bis fünf Mal mit TBS-Puffer gewaschen.

3.2.7.10 Eindecken

Die überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig abgeklopft und um die Gewebespots herum abgewischt. Die Schnitte wurden mit ein bis zwei Tropfen Kaisers Glyceringelatine und Deckplättchen luftblasenfrei eingedeckt.

3.2.8 Stammlösungen

Die benutzten Stammlösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Aminosilane Lösung 0,2%:

200 µl 3-Aminopropyltriethoxy-silane wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Propandiol-Stammlösung 0,2 M:

21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol wurden in 1 l Aqua dest. gelöst und bei 4°C in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

Neufuchsin-Stammlösung:

5 g Neufuchsin wurden in 100 ml 2N Salzsäure auf dem Schüttler gelöst und ebenfalls bei 4°C in einer dunklen Flasche gelagert.

Mayer's saures Hämalaun:

1 g Hämatoxilin, 0,2 g Natriumjodat und 50 g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat) wurden über Nacht in 1 l Aqua dest. auf dem Magnetrührer gelöst. Vorsichtig wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat) hinzugefügt und wieder über Nacht auf dem Schüttler gelöst. Vor Verarbeitung musste das Gemisch dann für mindestens sieben Tage in einer dunklen Flasche reifen. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.9 Titerbestimmungen

In Voruntersuchungen wurde der Verdünnungstiter der benutzten Primärantikörper festgelegt. Hierzu erfolgte die Färbung nach APAAP-Technik mit den Primärantikörpern in unterschiedlichen Titrationsreihen an Gefrierschnitten gesunder Haut. Ziel war es, die größte spezifische Farbintensität bei minimaler Hinter-

grundfärbung zu erlangen. Die ermittelten Titer für jeden Primärantikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 7: Endverdünnung der Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung
MAB 4051 ACE	1:1000
VH 68-8 Angiotensinogen	1:2000
Renin 2	1:1000
Renin 3	1:2000
AT ₁ -Rezeptor	1:100
AT ₂ -Rezeptor	1:200

4 Auswertung

4.1 Nachweis der RAS-Komponenten mittels RT-PCR

4.1.1 Angiotensinogen, Renin und Angiotensin-Converting-Enzym

Mittels RT-PCR wurde in allen kutanen Zellen in Primärkultur (Keratinozyten, Melanozyten, dermalen Fibroblasten und MVECs) die Expression der mRNA für alle drei RAS Komponenten (Angiotensinogen, Renin und ACE) untersucht.

4.1.1.1 Angiotensinogen

Bei der Amplifikation von cDNA aus Keratinozyten, Melanozyten, Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen zeigte sich bei Einsatz von Primern zur Detektion von Angiotensinogen ein Signal für ein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe von 524 bp.

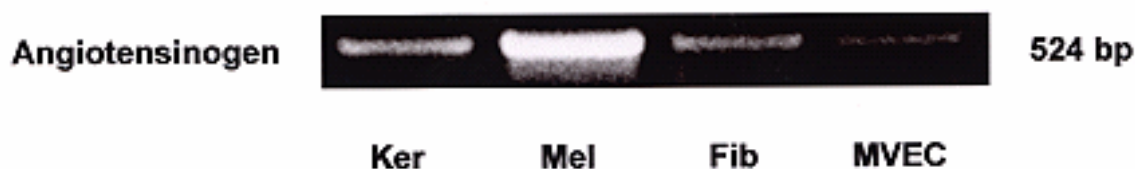


Abbildung 6: Angiotensinogen mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen)

Die Angiotensinogen-Expression war besonders ausgeprägt in Melanozyten; in den MVECs fand sich nur ein schwaches Signal. Eine genaue quantitative Aussage ist bei diesem Versuchsansatz jedoch nicht möglich (nicht-quantitative RT-PCR) und wurde auch nicht angestrebt.

4.1.1.2 Renin

Bei Einsatz von Primern zur Detektion von Renin zur Amplifikation von cDNA aus Keratinozyten, Melanozyten, Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen zeigte sich ein Signal für ein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe von 426 bp.

Das Signal für Renin mRNA war in allen untersuchten Zellen, außer in Melanozyten, stark ausgeprägt.



Abbildung 7: Renin mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen)

4.1.1.3 Angiotensin-Converting-Enzym

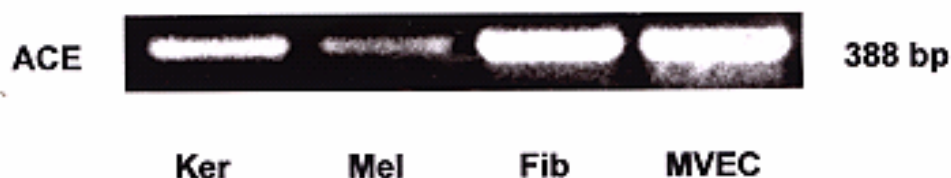


Abbildung 8: ACE mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen)

Die Amplifikation von cDNA zur Detektion von Angiotensin-Converting-Enzym erbrachte in allen untersuchten Zellen ein positives Signal für ein Produkt der erwarteten Größe von 388bp. Wie schon Renin scheint auch ACE in Melanozyten am schwächsten exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass alle zur Ang II Synthese nötigen Komponenten des RAS in allen untersuchten kutanen Zellen vorhanden sind.

4.1.2 Angiotensin-Rezeptoren

4.1.2.1 AT_1 -Rezeptor

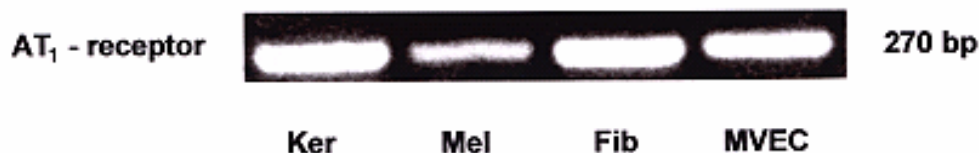


Abbildung 9: AT_1 mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen)

Die Amplifikation der cDNA aus primären Keratinozyten, Melanozyten, dermalen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen mit Primern zum Nachweis des AT_1 -Rezeptors erbrachte für alle Zellen ein deutlich positives Signal für ein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe von 270 bp.

4.1.2.2 AT_2 -Rezeptor

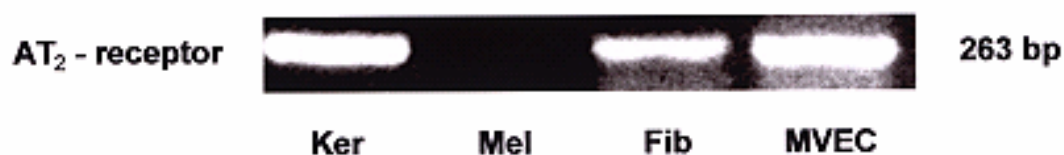


Abbildung 10: AT_2 mRNA Expression in kutanen Zellen (Ker=Keratinozyten, Mel=Melanozyten, Fib=Fibroblasten, MVEC=mikrovaskuläre Endothelzellen)

Die Amplifikation von cDNA zur Detektion des AT_2 -Rezeptors erbrachte in Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen ein positives Signal für ein Produkt der erwarteten Größe von 263bp. Melanozyten scheinen den AT_2 -Rezeptor nicht zu exprimieren.

4.2 Angiotensin II Synthese durch Keratinozyten

Zum Nachweis der Fähigkeit kutaner Zellen zur autonomen Ang II Synthese wurde exemplarisch das Vorkommen bzw. die Konzentration von Ang II in Homogenaten von Keratinozyten mittels enzymatischem immunometrischem Assay gemessen.

Die Messungen ergaben eine mittlere basale Konzentration von 9,75 pmol/mg Angiotensin II. Ang II war darüber hinaus auch in den Überständen der Keratinozyten nachweisbar und zwar in einer Konzentration von 30 pg/ml.

Die Ang II Synthese war durch Inkubation der Zellen mit 2 ng/ml Interleukin-6 (Il-6) und 10 ng/ml EGF (epidermal growth factor) um etwa 100% stimulierbar. Diese Stimulation konnte durch Koinkubation mit 10^{-5} M ACE-Hemmer verhindert werden. Je 50 pg/ml TNF α und TGF β hatten keinen Einfluss auf die Ang II Synthese. Die in diesen Versuchen um etwa eine Zehnerpotenz niedrigere Konzentration von Ang II in den Überständen ist mit einer geringeren Zelldichte während des Versuches erklärbar.

Tabelle 8: Synthese von Ang II in Keratinozyten; angegeben sind jeweils drei unabhängige Messwerte, der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Einheit: pg/ml

	ohne ACE-Hemmer	mit ACE-Hemmer	ohne ACE-Hemmer	mit ACE-Hemmer	ohne ACE-Hemmer	mit ACE-Hemmer
	Messwerte	Messwerte	Mittelwert	Mittelwert	Standardabweichung	Standardabweichung
basal	2,9	3,7				
basal	3,1	3,7	2,93	3,65	0,15	0,09
basal	2,8	3,55				
TNFα	3,8	4,2				
TNFα	4,1	4,25	3,90	4,08	0,17	0,25
TNFα	3,8	3,8				
IL-6	6,5	2,6				
IL-6	6,15	2,6	6,30	2,57	0,18	0,06
IL-6	6,25	2,5				
TGFβ	2,95	4,2				
TGFβ	3,2	4,3	3,05	4,23	0,13	0,06
TGFβ	3	4,2				
EGF	6,2	2,6				
EGF	6,25	2,75	6,35	2,63	0,22	0,10
EGF	6,6	2,55				

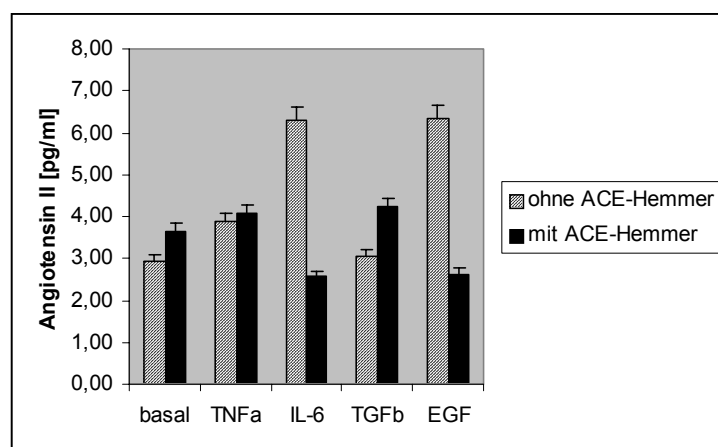


Abbildung 11: Synthese von Ang II in Keratinozyten

4.3 Nachweis der RAS-Komponenten mittels immunhistochemischer Färbungen

4.3.1 Angiotensinogen, Renin und Angiotensin-Converting-Enzym

4.3.1.1 Angiotensinogen

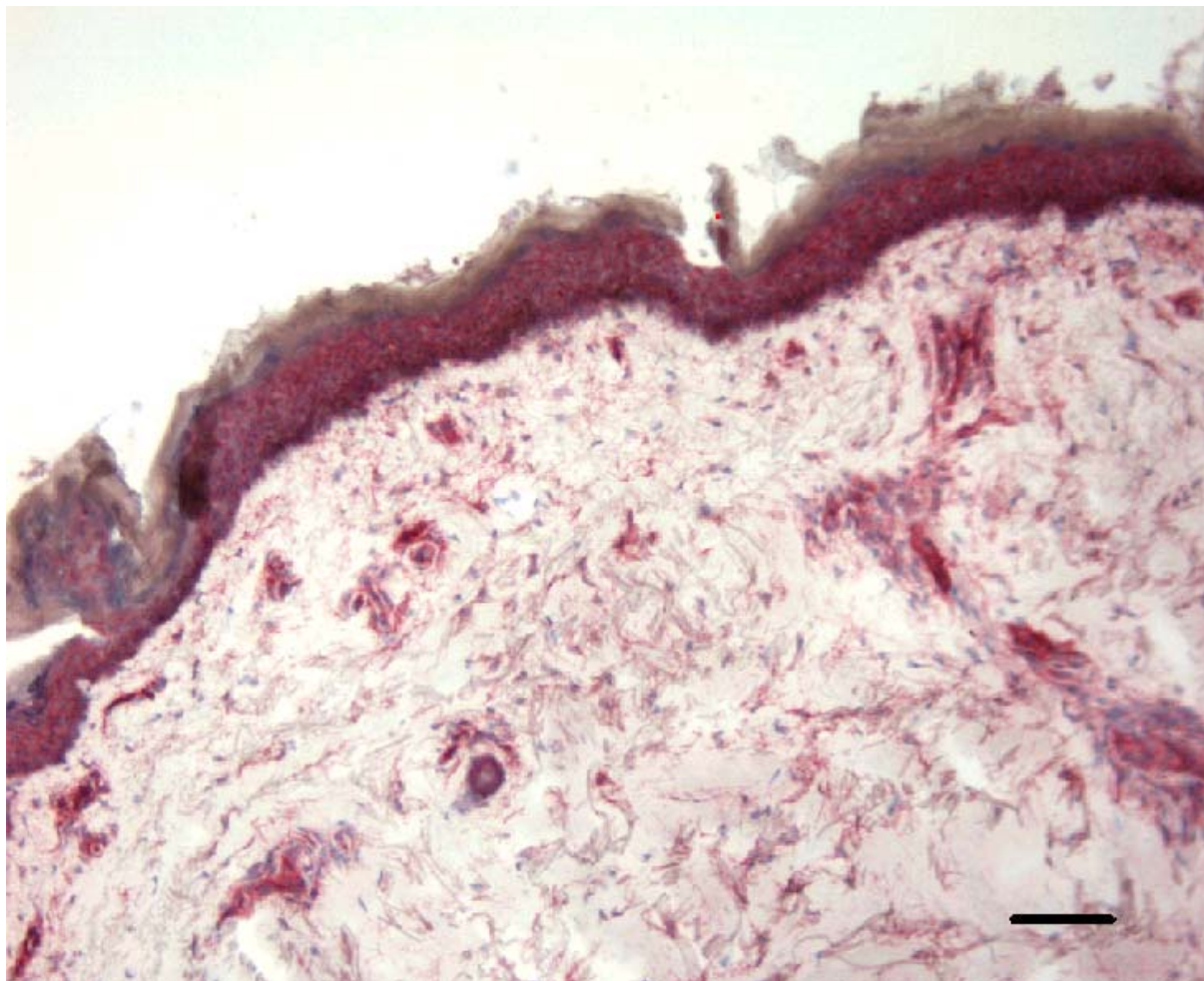


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt acht untersuchten.

Abbildungen 12 und 13 sind typische Beispiele für Inkubationen mit Antikörpern gegen Angiotensinogen. Die gesamte Epidermis ist von Stratum basale über Stratum spinosum bis Stratum granulosum homogen durchfärbt. Im Stratum corneum fehlt jegliche Anfärbung. In der Dermis zeigen die Gefäßwände ein deutlich positives Signal.

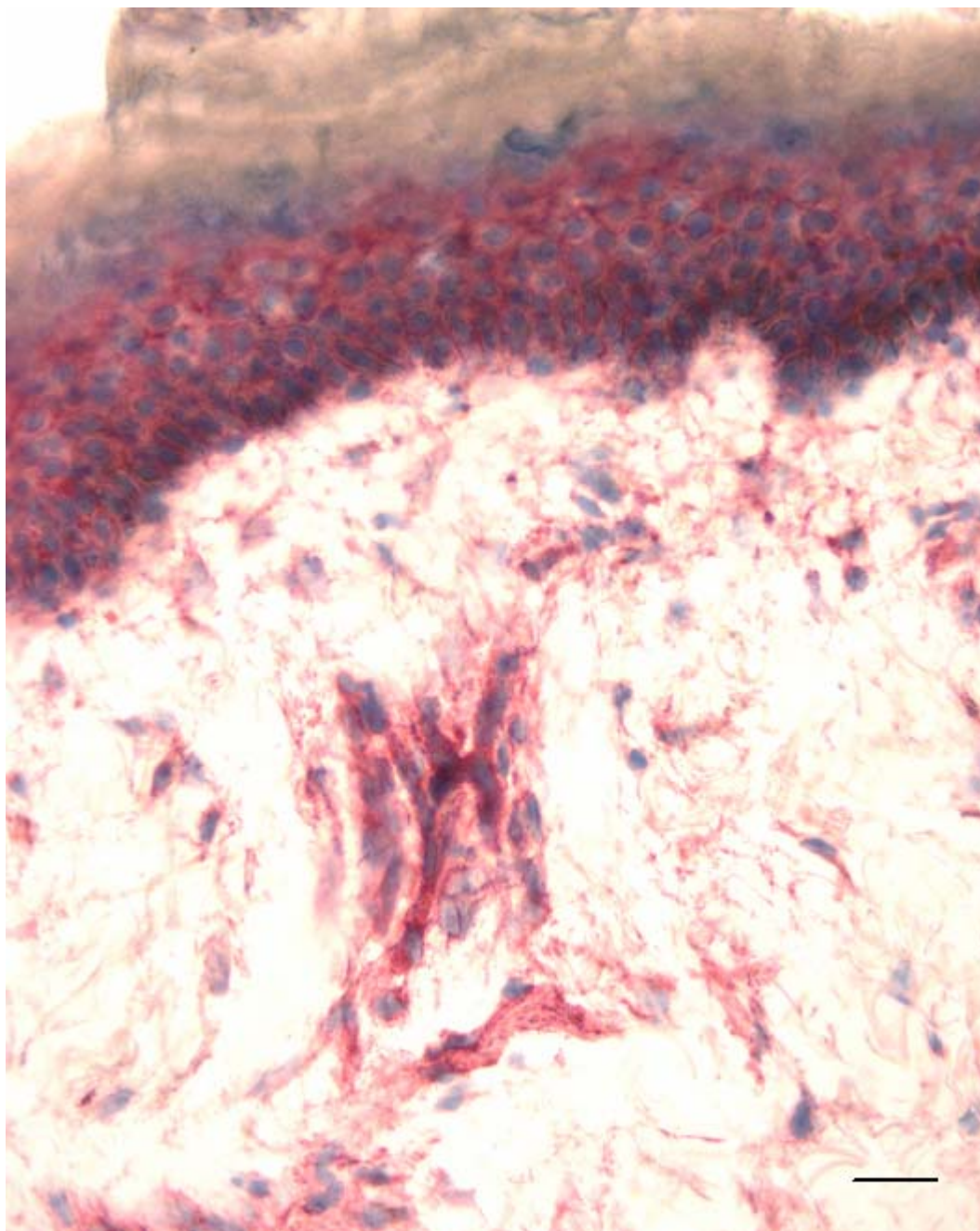


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 25 μ m. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt acht untersuchten Präparaten.

4.3.1.2 Renin

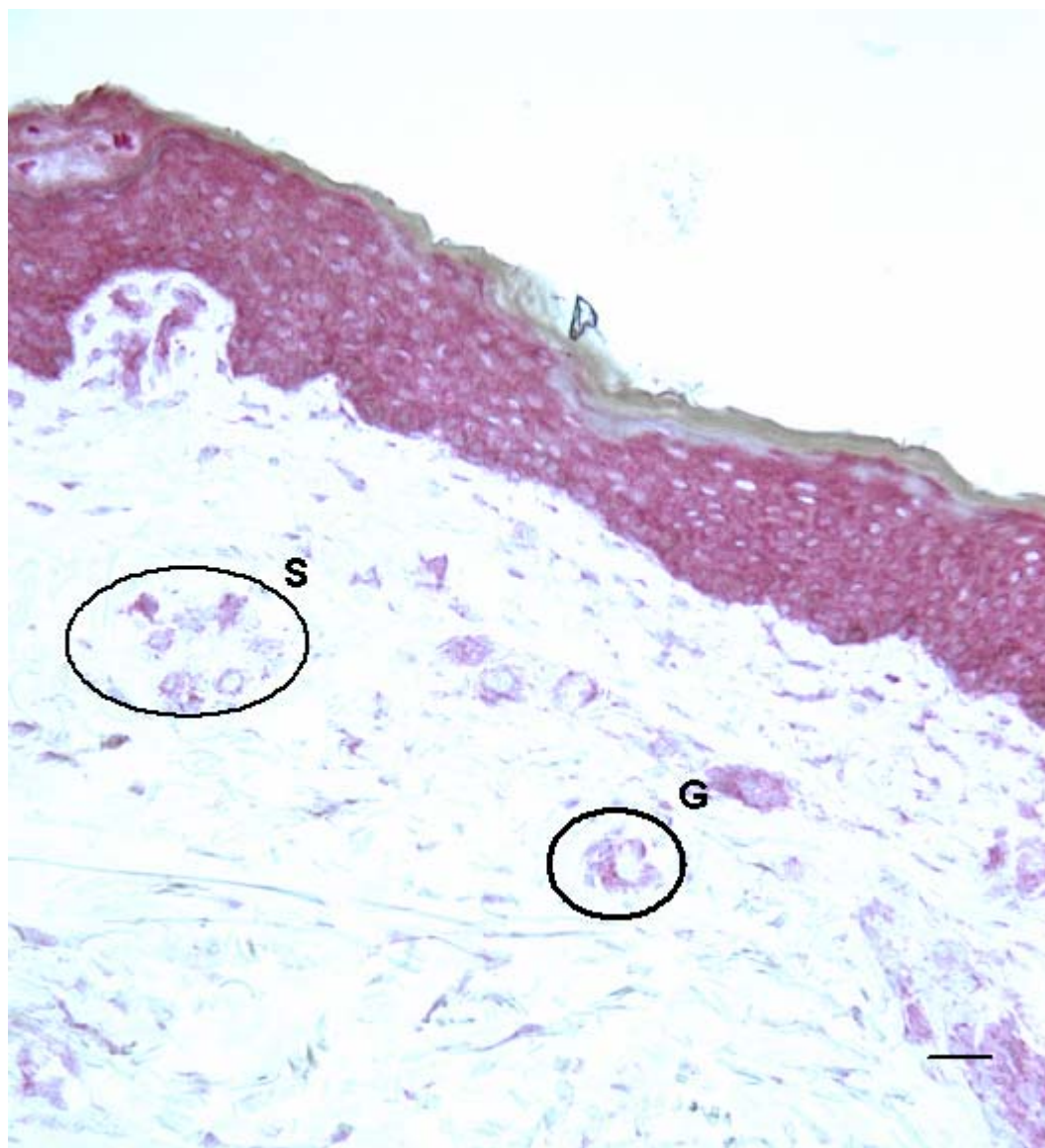


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt acht untersuchten. S=Schweißdrüsen, G=Gefäßwand.

Auch bei Nutzung von Antikörpern gegen Renin zeigte sich in der gesamten Epidermis bis auf das Stratum corneum eine deutliche Farbreaktion. Wie in Abbildung 14 (Markierung S) ersichtlich, zeigen die Schweißdrüsen der Dermis positive Signale. Auch die Gefäßwände (G) exprimieren Renin.

4.3.1.3 Angiotensin-Converting-Enzym

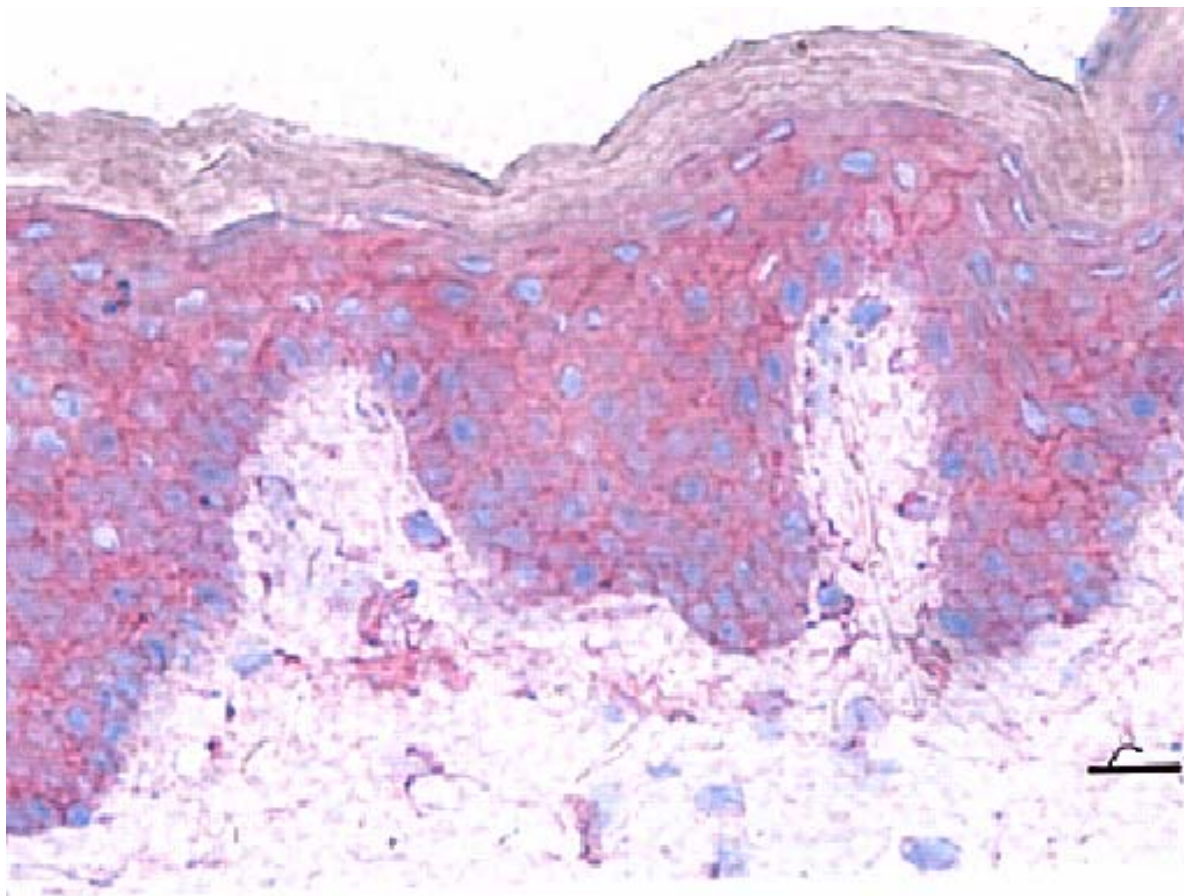


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt acht untersuchten.

Auch bei Verwendung von Antikörpern gegen ACE zeigte sich ein ähnliches Bild: wie im Falle der Expression von Angiotensinogen und Renin ist auch hier die gesamte Epidermis durchfärbt. In der Dermis finden sich dagegen positive Signale nur in Gefäßwänden und Hautanhangsgebilden.

Die Versuche zur Expression der zur Ang II Synthese notwendigen RAS-Komponenten in normaler Haut erbrachten also, dass Angiotensinogen, Renin und ACE in der gesamten Epidermis exprimiert sind, während in der Dermis nur Gefäßwände, Haarfollikel und Schweißdrüsen positive Signale zeigten.

4.3.2 Angiotensin-Rezeptoren

4.3.2.1 AT_1 -Rezeptor

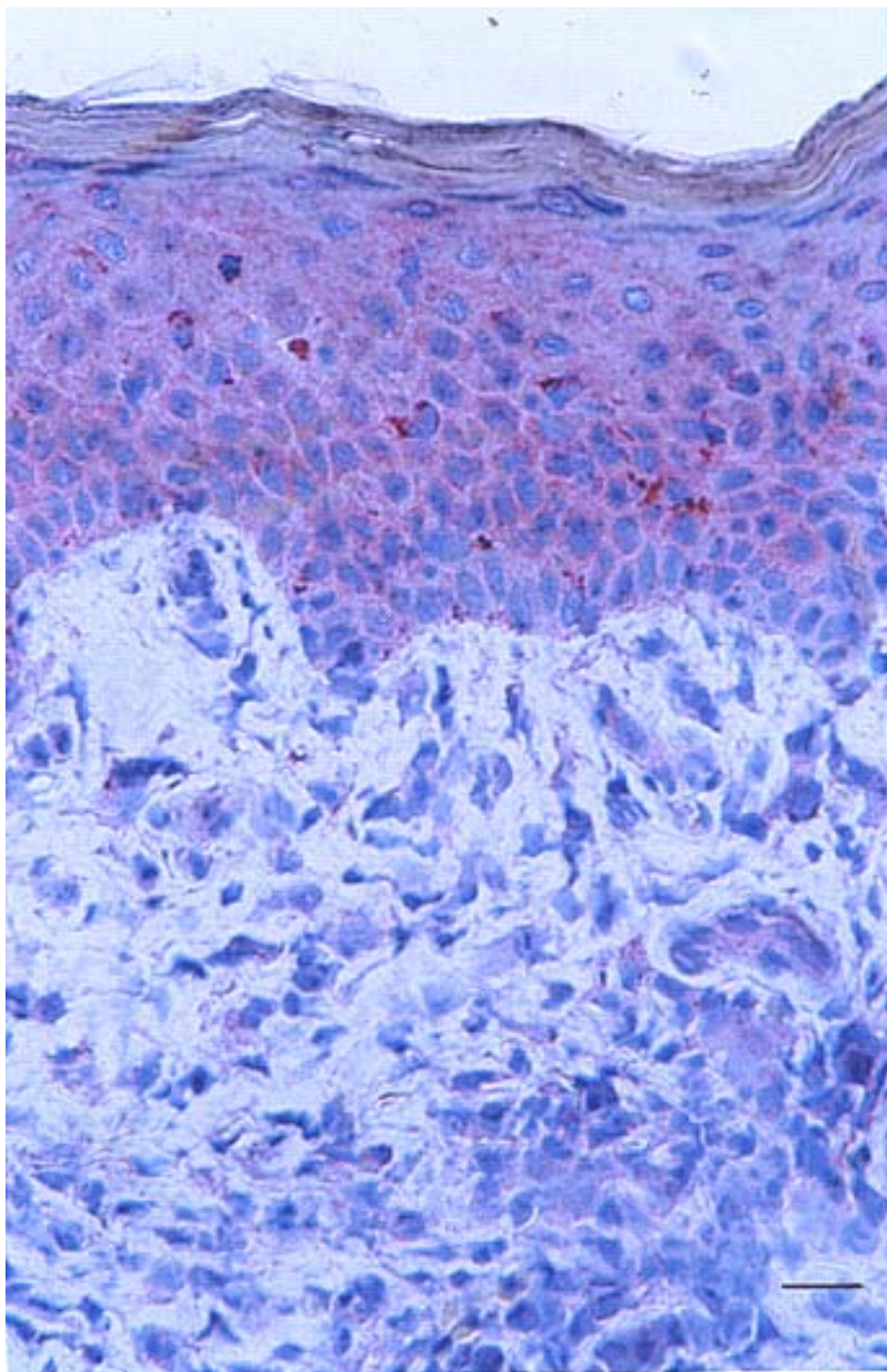


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem polyklonalen Antikörper gegen den humanen AT_1 Rezeptor; scale bar 20 μ m. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt fünf untersuchten Präparaten.

Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Angiotensin-Rezeptoren zeigten ein sehr ähnliches kutanes Anfärbungsmuster wie das des Angiotensin II-Vorläufers Angiotensinogen und der zur Angiotensin II-Synthese benötigten Enzyme Renin und ACE.

Bei Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen den menschlichen AT₁-Rezeptor fanden sich in der gesamten Epidermis positive Signale im Zytoplasma der Keratinozyten, während in der Dermis nur bestimmte Strukturen wie Gefäßwände angefärbt waren.

4.3.2.2 AT₂-Rezeptor

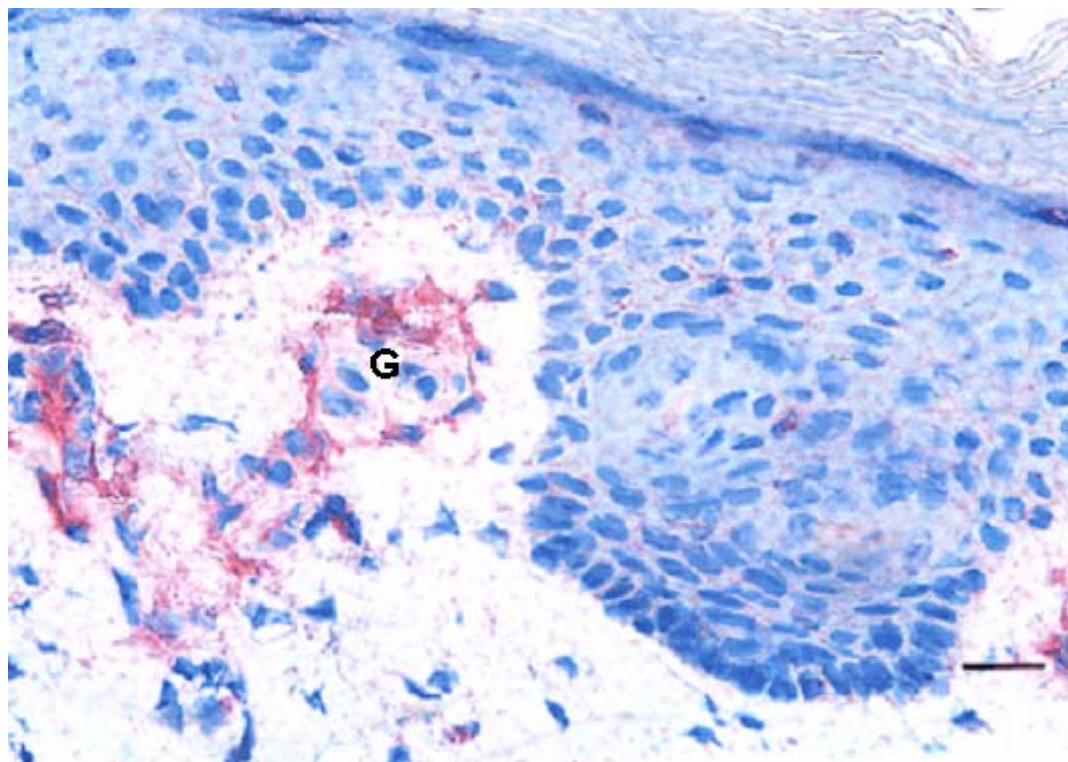


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut mit einem polyklonalen Antikörper gegen den humanen AT₂ Rezeptor; scale bar 20µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt fünf untersuchten. G=Gefäßwand.

Anfärbung eines Großteils der Epidermalzellen. Im Gegensatz zum AT₁-Rezeptor waren nur die Plasmamembranen und nicht das Zytoplasma angefärbt. In den Gefäßwänden (G) der Kapillaren in den dermalen Papillenspitzen zeigten sich ebenfalls positive Signale.

4.4 RAS-Komponenten in pathologisch veränderter Haut

4.4.1 Psoriasis vulgaris

4.4.1.1 Angiotensinogen



Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt sieben untersuchten Präparaten. P=Papillenspitze.

Schnittfärbungen von psoriatisch veränderter Haut mit Antikörpern gegen Angiotensinogen erbrachten wie in normaler Haut deutlich positive Signale in der Epidermis sowie in Gefäßwänden und Schweißdrüsen der Dermis. Im Bereich der Epidermis zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen dem Anfärbungsmuster in psoriatisch veränderter verglichen mit normaler Haut. Während in normaler Haut die gesamte Epidermis vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum homogen angefärbt ist, ist die Anfärbung in psoriatischer Haut im Bereich des oberen Stratum spinosum und des Stratum granulosum deutlich reduziert, teilweise nicht mehr nachweisbar.

Die Dermis unterscheidet sich bei der *Psoriasis vulgaris* von normaler Haut insbesondere durch ausgeprägte Gefäßproliferationen sowie Infiltrate im Bereich der Papillenspitzen (siehe Abbildung 18, Markierung P). Sowohl die papillären Gefäßkonvolute, als auch die Infiltratzellen zeigen deutlich positive Signale bei Anfärbung mit dem Antikörper gegen Angiotensinogen.

4.4.1.2 Renin

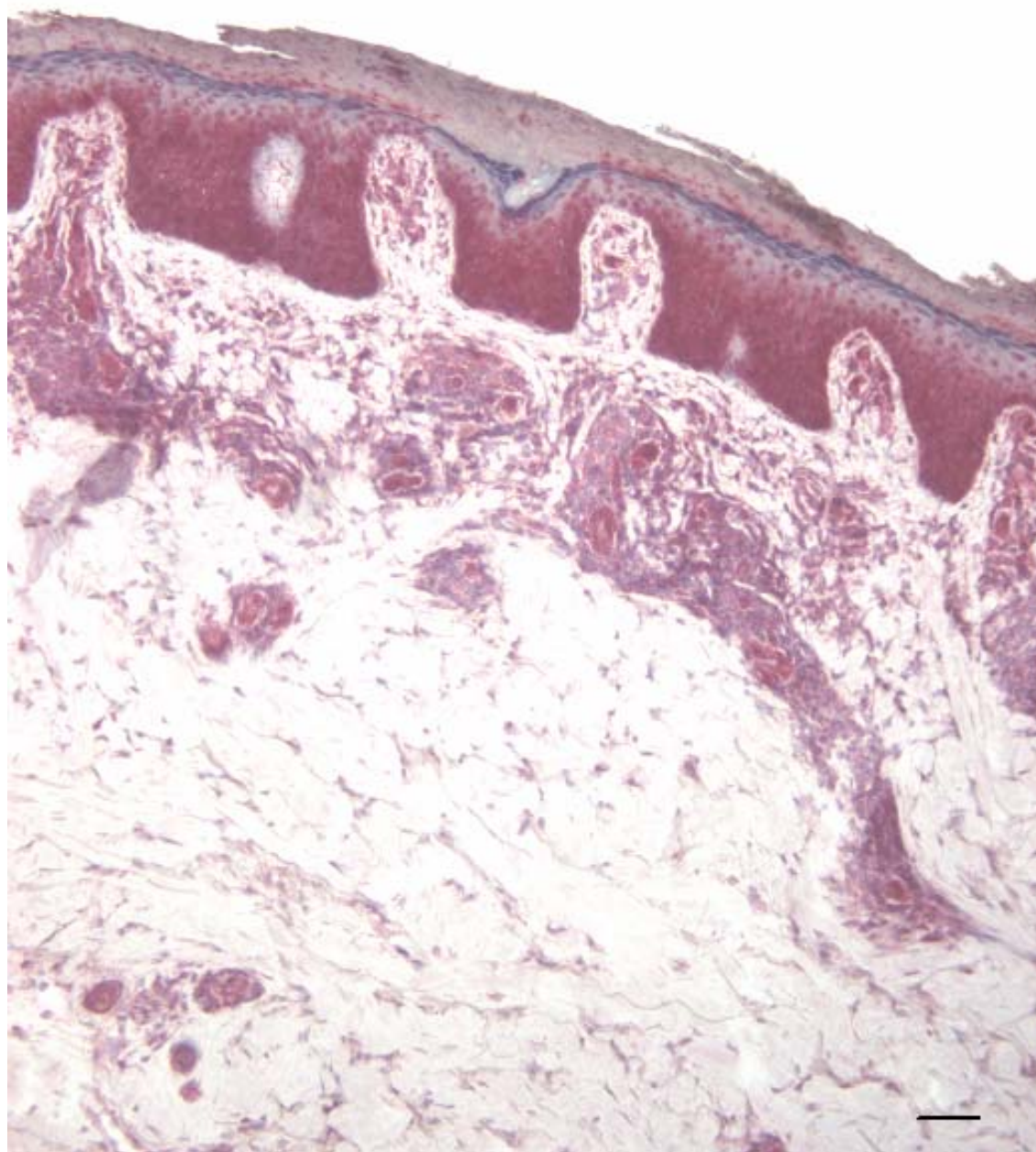


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 100 μ m. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt sieben untersuchten Präparaten.

Wie in Abbildungen 19 und 20 dargestellt, findet sich bei Verwendung eines Antikörpers gegen Renin in psoriatisch veränderter Haut ein fast identisches Anfärbungsmuster wie bei Verwendung eines Antikörpers gegen Angiotensinogen, wobei die Betonung der unteren Schichten der Epidermis noch ausgeprägter er-

scheint. In der Dermis sind wiederum die Zellen des entzündlichen Infiltrats sowie Gefäßwände und Schweißdrüsen angefärbt.

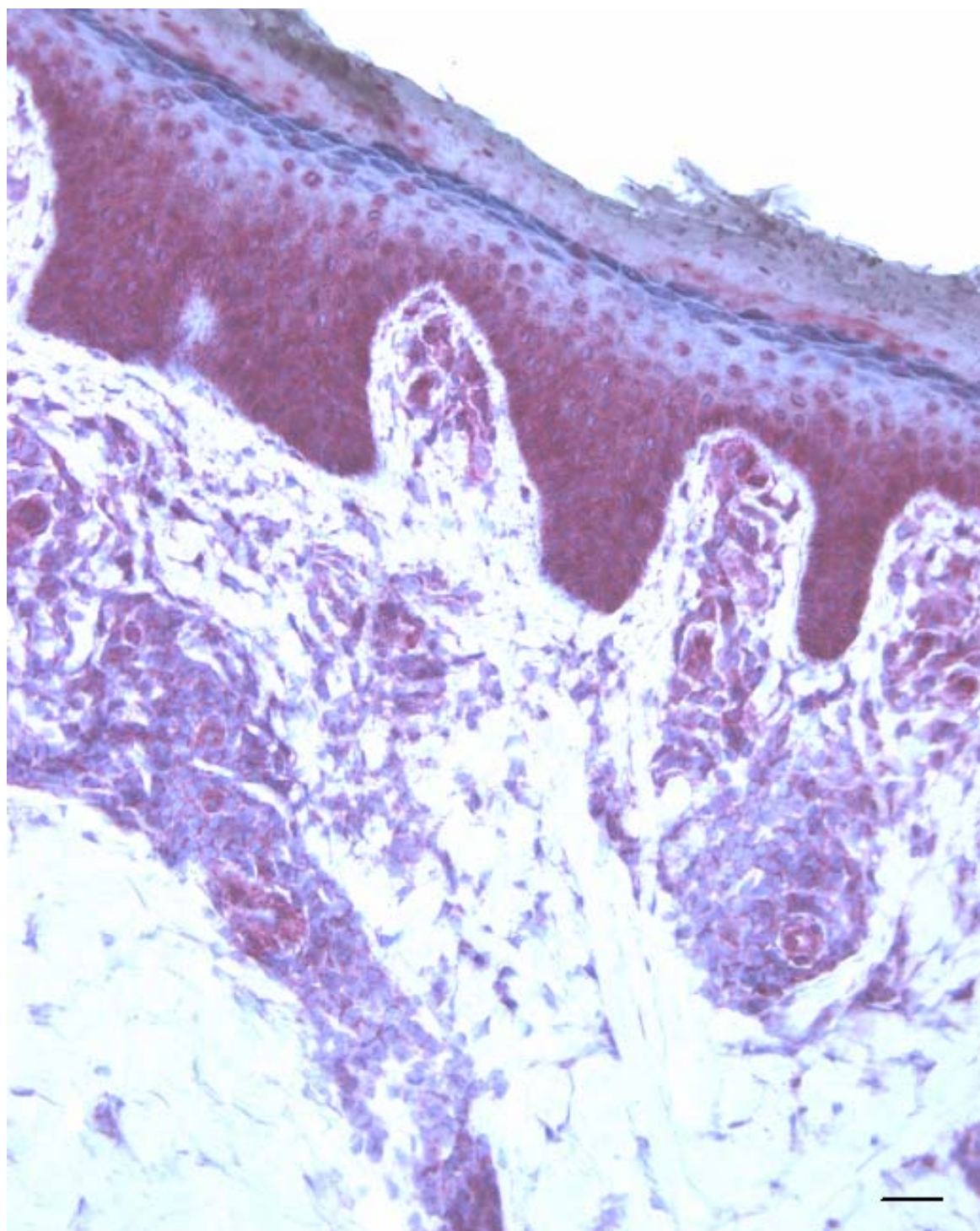


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 50 μ m. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt sieben untersuchten.

4.4.1.3 Angiotensin-Converting-Enzym

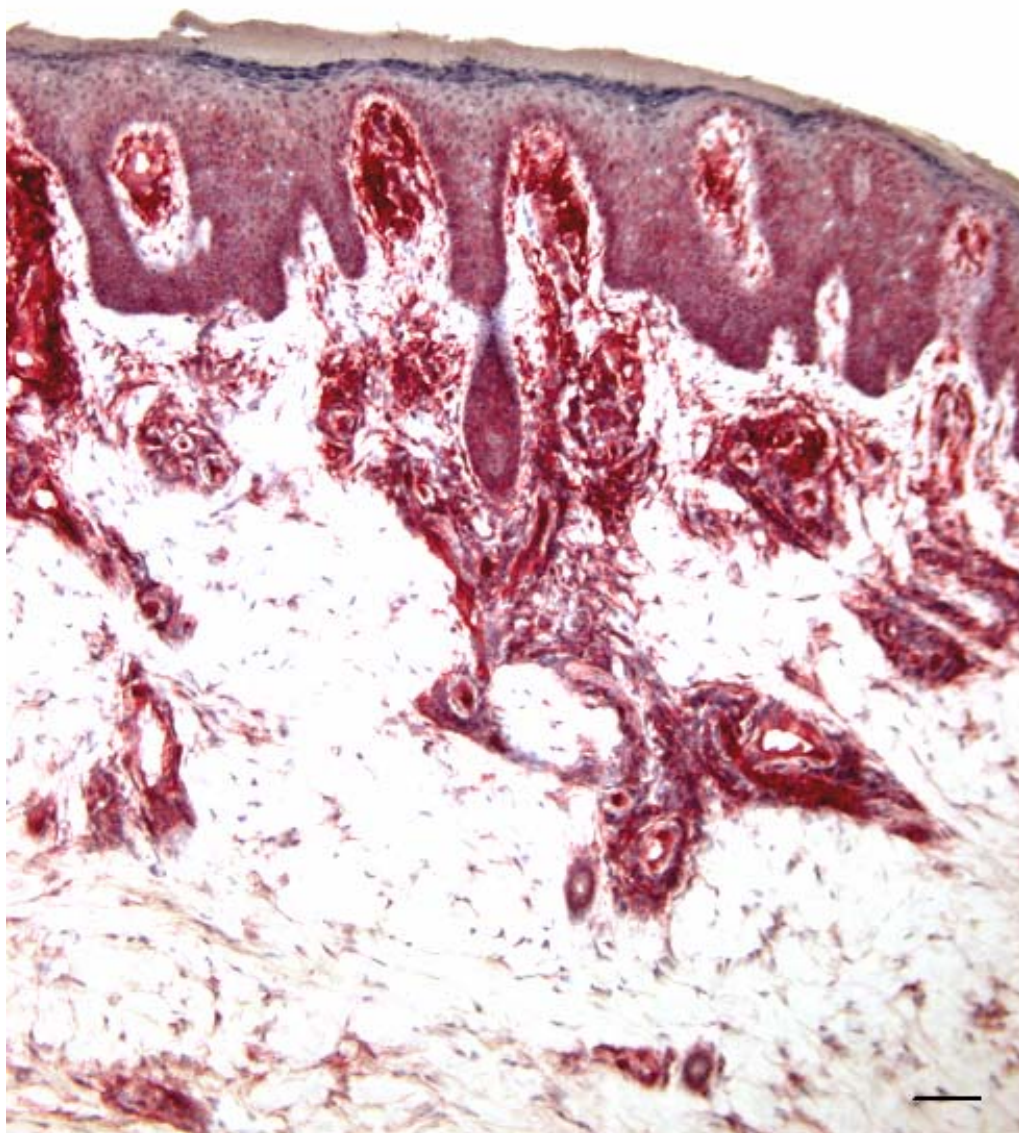


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung von psoriatisch veränderter Haut mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt sieben untersuchten Präparaten.

Auch bei Verwendung eines Antikörpers gegen ACE zeigt sich bei der **Psoriasis vulgaris** in der Epidermis eine deutliche Betonung des Stratum basale und des unteren Stratum spinosum. Die positiven Signale nehmen aber auch hier zu den oberen Schichten hin ab.

Besonders intensive Anfärbungen waren in den Infiltraten der Dermis sowie in den Gefäßwänden erkennbar.

4.5 Tumorerkrankungen der Haut - Basaliom

4.5.1 Angiotensinogen

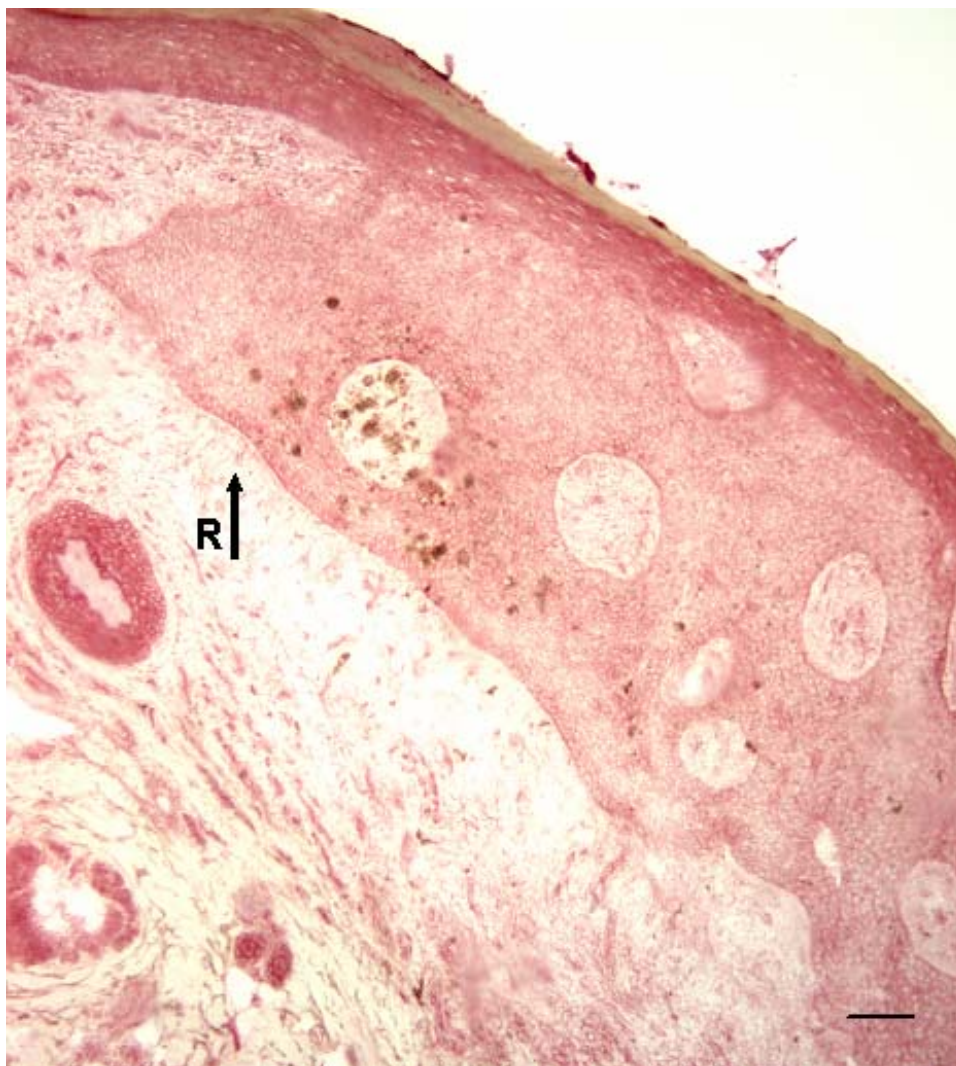


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung eines Basalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt elf untersuchten Präparaten. R=Randbetonung.

In Schnittfärbungen von **Basaliomen** mit Antikörpern gegen Angiotensinogen fällt auf, dass die Signalstärke im Tumorgewebe im Vergleich zur Epidermis eindrucksvoll vermindert ist. Es zeigt sich eine leichte Randbetonung im Bereich des Basaliomgewebes (Markierung R). Im Vergleich dazu findet sich in der angrenzenden gesunden Epidermis - wie von den Schnitten aus normaler Haut bekannt - eine homogene Durchfärbung, während das unmittelbar an den Tumorgrenzende dermale Gewebe nur schwach bis gar nicht angefärbt ist.

4.5.2 Renin

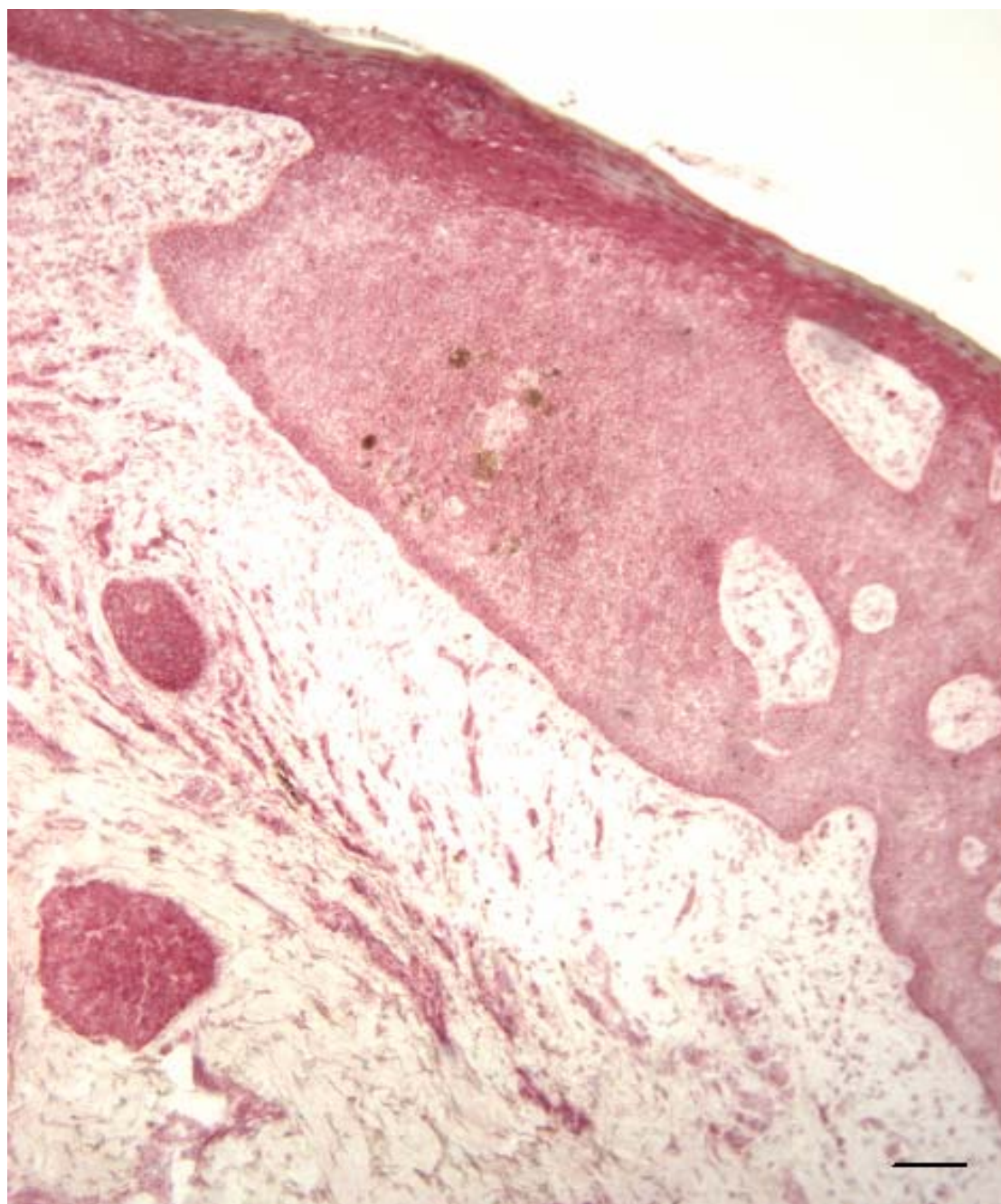


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung eines Basalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 100 μ m. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Präparat von insgesamt elf untersuchten.

Bei Verwendung eines Antikörpers gegen Renin findet sich ein identisches Anfärbungsmuster im Bereich des **Basalioms** wie bei Angiotensinogen: ein vermindertes Signal im Tumorgewebe mit leicht randbetonter Anfärbung.

4.5.3 Angiotensin-Converting-Enzym

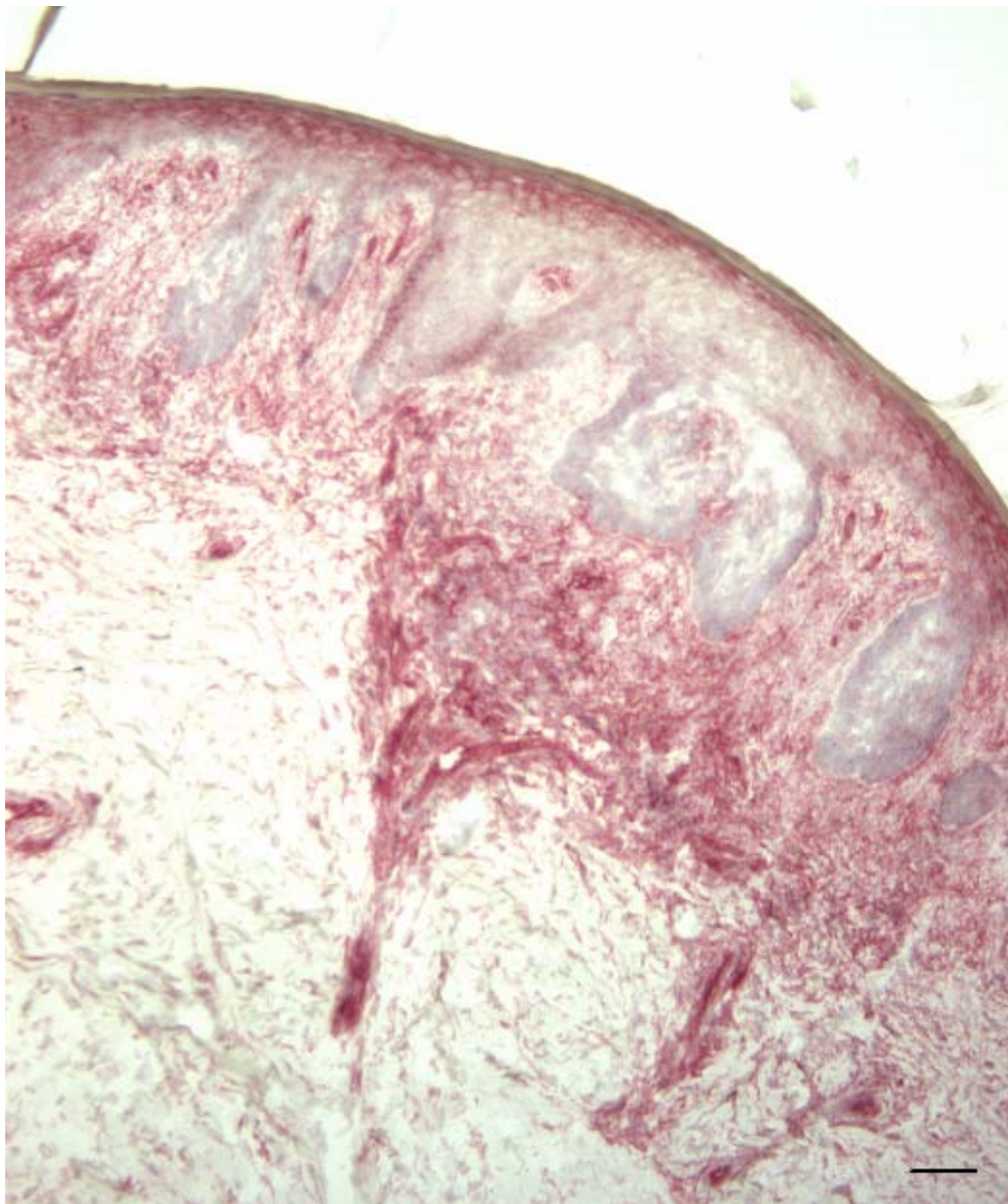


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung eines Basalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt elf untersuchten Präparaten.

Wie in Abbildung 24 ersichtlich, sind beim **Basaliom** unter Benutzung eines Antikörpers gegen ACE die positiven Signale in den Tumorbereichen deutlich vermindert, teilweise nicht mehr nachweisbar. Die angrenzende gesunde Epidermis

ist in ihrer Gesamtheit durchfärbt, wie bereits von den Schnitten an normaler Haut bekannt. Das Expressionsmuster von ACE im Tumorgewebe und in der Epidermis entspricht also im wesentlichen dem von Angiotensinogen und Renin.

Im Gegensatz zu den für den Nachweis von Angiotensinogen und Renin verwendeten Präparaten ist bei dieser Biopsie das peritumorösen Gewebe um das Basaliom deutlich angefärbt. Diese Anfärbung könnte entweder durch ein peritumoröses Infiltrat verursacht sein oder aber eine Induktion des ACE im Bindegewebe widerspiegeln. Diese Frage kann nur durch immunhistochemische Doppelfärbungen eindeutig geklärt werden, die aber nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, sondern von der Arbeitsgruppe im Rahmen weiterer Untersuchungen geplant sind.

4.6 Tumorerkrankungen der Haut - Spinaliom

4.6.1 Angiotensinogen

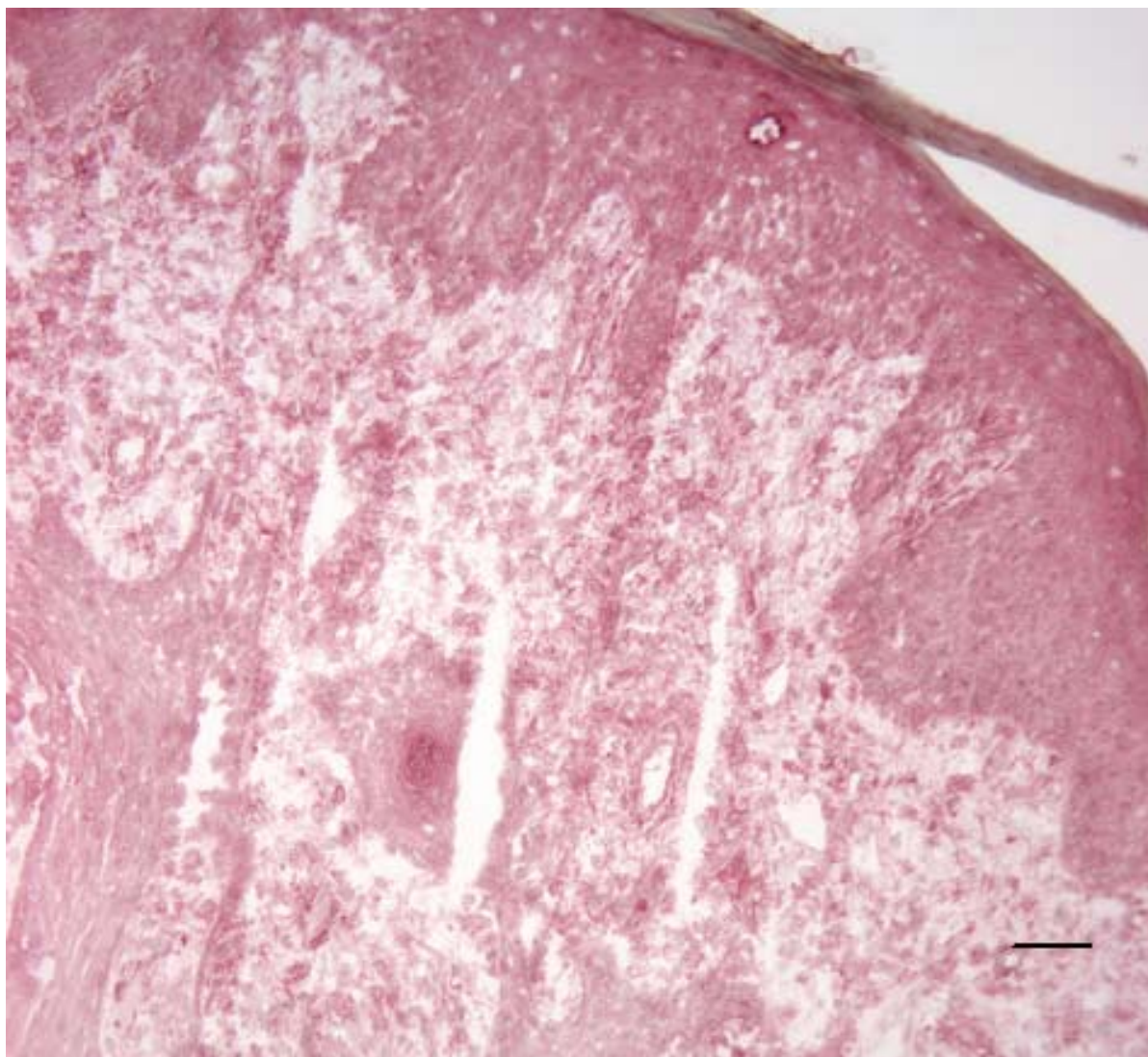


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung eines Spinalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Angiotensinogen; scale bar 100µm. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt neun untersuchten Präparaten.

Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen humanes Angiotensinogen zeigte sich bei Schnittfärbungen von **spinaliomen** die gesamte Epidermis vom Stratum basale über Stratum spinosum bis Stratum granulosum homogen durchfärbt, während im Stratum corneum jegliche Anfärbung fehlte. Im Tumorgewebe war die Signalstärke vergleichbar mit der in der gesunden Epidermis. In der Umgebung der Tumorzellen fanden sich ebenfalls keine Auffälligkeiten.

4.6.2 Renin

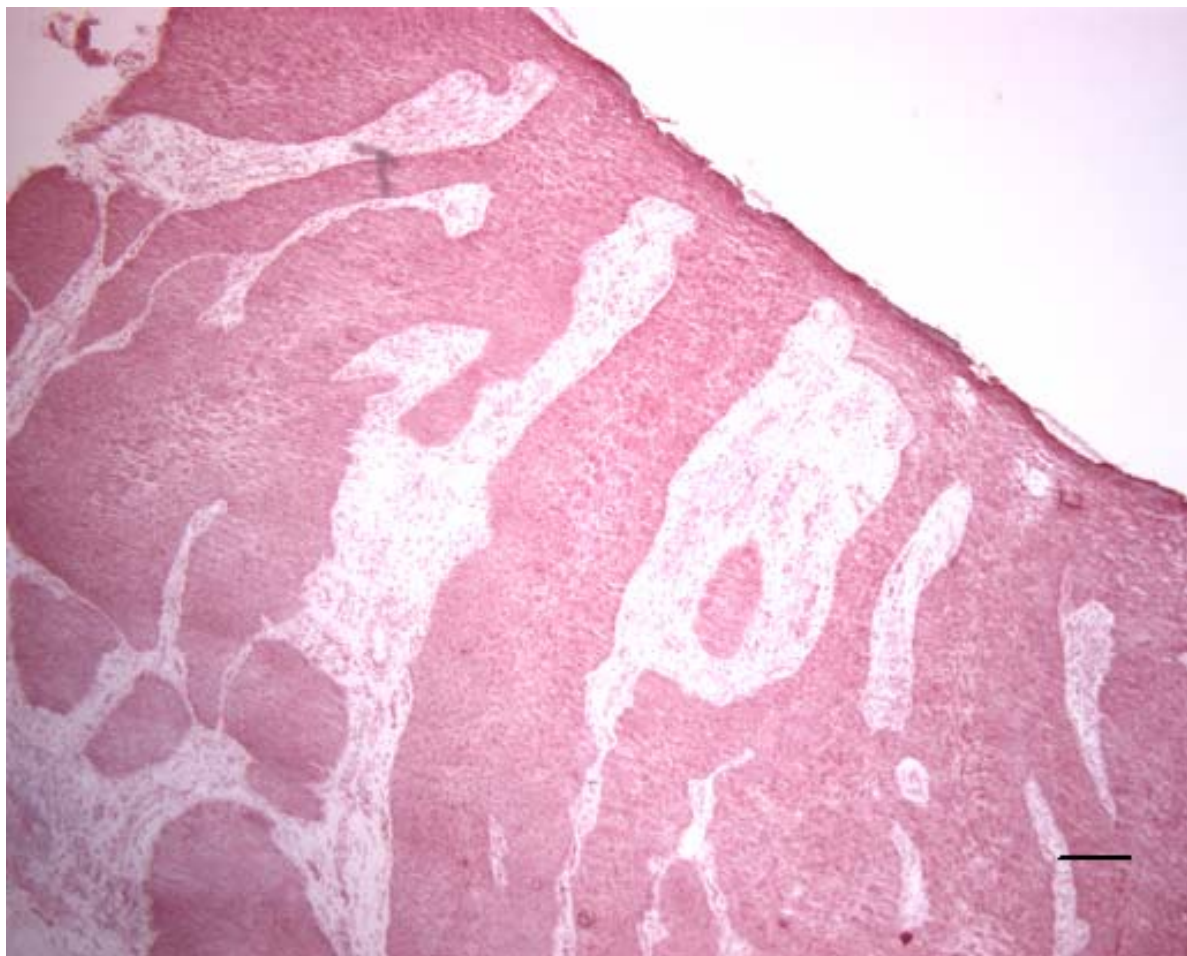


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung eines Spinalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Renin; scale bar 200 μ m. Die Abb. zeigt ein repräsentatives von insgesamt neun untersuchten Präparaten.

Auch bei Inkubationen mit monoklonalem Antikörper gegen humanes Renin sind in Biopsien von **spinaliomen** ganz homogene Anfärbungen in der Epidermis und dem Tumorgewebe zu sehen. Wieder ist das peritumoröse Gewebe unauffällig.

4.6.3 Angiotensin-Converting-Enzym

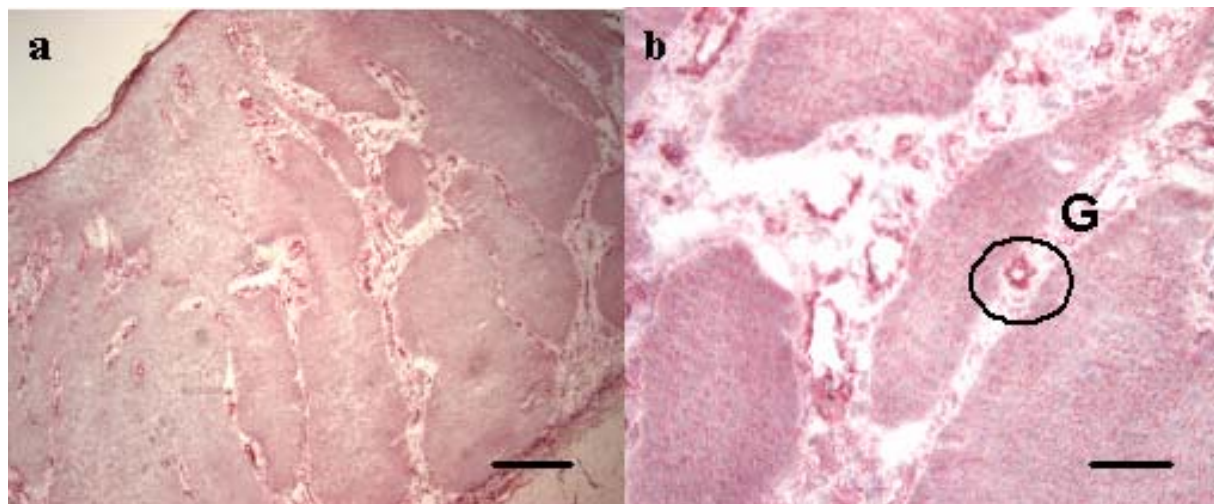


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung eines Spinalioms mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ACE; scale bar 200µm (a) bzw. scale bar 100µm (b). Die Abb. zeigen ein repräsentatives von insgesamt neun untersuchten Präparaten. G=Gefäßwand.

Wie in Abbildung 27 ersichtlich, sind beim *spinaliom* unter Benutzung eines Antikörpers gegen ACE homogene Anfärbungen in den Tumorbereichen nachweisbar, die eine leichte Randbetonung erkennen lassen. Auch die Gefäßwände (G) in der Dermis exprimieren ACE, wie bereits aus gesunder Haut bekannt.

5 Diskussion

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) wurde ursprünglich als systemisches, zirkulierendes, endokrines System beschrieben (Montani und van Vliet, 2004). Das Vorläufermolekül Angiotensinogen wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert, das zur Spaltung von Angiotensinogen notwendige Enzym Renin entstammt dem juxtaglomerulären Apparat der Niere, und die eigentliche Bildung des Effektorhormons Angiotensin II (Ang II) erfolgt durch gefäßendothelständiges Angiotensin-Converting-Enzym (ACE).

Neben diesem systemischen RAS, das anscheinend für die kurzfristigen, systemischen Effekte des RAS z.B. bei der Blutdruck- und Volumenregulation verantwortlich ist, sind in zahlreichen Organen sogenannte lokale oder Gewebe-RASs beschrieben worden (Lavoie und Sigmund, 2003). In diesen Organen sind alle zur Ang II Synthese notwendigen Komponenten in eng benachbarter Lokalisation vorhanden, so dass von einer lokalen Ang II Bildung, einer lokalen, spezifischen Regulation der Ang II Synthese und von lokal begrenzten, autokrinen und parakrinen Effekten ausgegangen werden kann. Zu den Organen/Geweben mit Gewebe-RAS gehören u.a. das Herz, die Gefäßwand, die Niere und Nebenniere, das Gehirn und die Leber.

Da es zu Beginn der hier präsentierten Arbeiten nur wenige, zum Teil widersprüchliche Aussagen über Expression und mögliche Funktionen eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) in der Haut, insbesondere in menschlicher Haut gab, war es Ziel dieser Arbeit, diesen offenen Fragen systematisch nachzugehen.

Der Nachweis des Effektorpeptids Ang II selbst im Gewebe ist schwierig und technisch sehr aufwendig. Es wird aber allgemein davon ausgegangen, dass bei Vorliegen aller zur Angiotensin II Synthese notwendigen Komponenten, also des

Vorläuferproteins Angiotensinogen sowie der Enzyme Renin und ACE in enger Nachbarschaft eine lokale Ang II Synthese stattfindet, so dass der Nachweis all dieser einzelnen Komponenten in einem Gewebe als indirekter Nachweis einer lokalen Ang II Bildung anerkannt ist.

Essentiell für eine Wirkungsentfaltung von Ang II vor Ort ist außerdem natürlich das Vorhandensein von Angiotensin-Rezeptoren.

5.1 Nachweis der RAS-Komponenten

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente erbrachten, dass in der Tat alle Komponenten des RAS (Angiotensinogen, Renin, ACE, AT₁- und AT₂-Rezeptoren) von **humaner Haut** exprimiert werden.

Der Nachweis erfolgte auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR an humanen Keratinozyten, Melanozyten, dermalen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen *in vitro* (alle Zellen in Primärkultur). Alle RAS-Komponenten wurden von allen Zelltypen exprimiert mit einer einzigen Ausnahme: Melanozyten scheinen keine AT₂-Rezeptoren zu exprimieren.

Die immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten gesunder Haut, also die Darstellung der RAS-Komponenten auf Protein-Ebene, bestätigten im wesentlichen diese Ergebnisse: die Epidermis, die überwiegend aus Keratinozyten besteht, in der aber auch die kutanen Melanozyten angesiedelt sind, zeigte eine homogene, alle Schichten umfassende Expression aller RAS-Komponenten. In der Dermis war eine deutliche Anfärbung vaskulärer Endothelzellen nach Inkubation mit Antikörpern gegen alle RAS-Komponenten festzustellen. Auch in einigen Hautanhangsgebilden wie Haarfollikeln und Schweißdrüsen scheinen alle RAS-Komponenten exprimiert zu sein. Nicht eindeutig feststellbar war jedoch die Bindung der Antikörper an dermale Fibroblasten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen mittels RT-PCR, die die Expression von mRNA in primären, dermalen Fibroblasten gezeigt hatten. Möglicherweise wer-

den RAS-Komponenten in dermalen Fibroblasten nur als Reaktion auf ein stimulierendes Ereignis wie z.B. eine Gewebsverletzung gefunden. Dieses Phänomen wurde bereits für einige Faktoren wie z.B. connective tissue growth factor (CTGF) beschrieben (Leask et al., 2001). Die Bedingungen in vitro mit einer „unnatürlich“ hohen Proliferationsrate entsprechen in der Tat eher denen bei Schließung eines Gewebedefektes als denen in normaler Haut. Weiterführende, in dieser Arbeit nicht dargestellte Experimente haben in der Zwischenzeit Hinweise darauf geliefert, dass zumindest die Ang II Rezeptoren AT₁ und AT₂ im Bereich eines Gewebedefektes von Fibroblasten stark exprimiert werden.

Während der Durchführung dieser Versuche hat die Arbeitsgruppe um Takeda et al. drei Artikel veröffentlicht, in denen die Expression von AT₁-Rezeptoren in normaler menschlicher Haut, Haarfollikeln, Schweißdrüsen und verschiedenen Hauttumoren immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (Takeda und Kondo, 2001 a, 2001 b, Takeda et al., 2002). Die Expression von Angiotensinogen, Renin und ACE wurde von dieser Arbeitsgruppe nicht untersucht.

Die Resultate von Takeda et al. widersprechen in zwei wesentlichen Punkten den Ergebnissen dieser Arbeit. Zum einen berichtet die Arbeitsgruppe um Takeda, in den immunhistochemischen Färbungen normaler Haut keine positiven Signale für AT₂-Rezeptoren gefunden zu haben. In den hier durchgeführten immunhistochemischen Versuchen war dagegen eine zwar nicht sehr starke, aber reproduzierbare Färbung der gesamten Epidermis und einiger Hautanhangsgebilde sowie vaskulärer Endothelzellen mit Antikörpern gegen den AT₂-Rezeptor zu sehen. Reproduzierbar war außerdem das charakteristische Anfärbungsmuster, nämlich eine Anfärbung der Zelloberflächen und nicht – wie beim AT₁-Rezeptor – des Zytoplasmas. Für die Richtigkeit dieser Ergebnisse spricht weiterhin der positive Nachweis von AT₂-Rezeptor kodierender mRNA in primären humanen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen.

Der zweite Widerspruch liegt in dem Verteilungsmuster des AT₁-Rezeptors in der Epidermis. In der Mehrheit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebeschnitte war die Epidermis nach Inkubation mit anti- AT₁-Antikörpern vollständig und homogen positiv gefärbt. Die von Takeda et al. berichtete Aussparung der basalen Schichten wurde hier nicht gesehen.

Da von Takeda und Mitarbeitern die gleichen Antikörper gegen AT₁- und AT₂-Rezeptoren benutzt wurden wie bei den hier vorliegenden Versuchen, gibt es keine naheliegende Erklärung für diese Diskrepanzen. Um den Widerspruch aufzuklären, ist wahrscheinlich die Untersuchung einer wesentlich größeren Anzahl an Gewebeschnitten, eingeteilt nach Lokalisation sowie Alter und Geschlecht des Patienten/ Donors notwendig.

Die Arbeiten von Takeda et al. sind (außer den eigenen) die einzigen derzeit bekannten, die die Expression von Angiotensin Rezeptoren in der gesamten adulten, humanen Haut zum Gegenstand hatten. Es existieren aber einzelne, weitere in vitro Ergebnisse. So konnten Nickenig et al. in humanen, dermalen Fibroblasten mittels Bindungsstudien den AT₁-Rezeptor nachweisen sowie zusätzlich eine Bindungsstelle für Ang 1-7 (Nickenig et al., 1997). Der AT₂-Rezeptor wurde in dieser Arbeit nicht gefunden. Takayanagi et al. dagegen fanden in humanen, dermalen Fibroblasten keinerlei Hinweis auf das Vorhandensein von Angiotensin Rezeptoren (Takayanagi et al., 1994). Steckelings et al. konnten in früheren Experimenten mit Bindungsstudien an primären, humanen Keratinozyten ebenfalls nur den AT₁-Rezeptor sowie einen non- AT₁-non- AT₂-Rezeptor nachweisen (Steckelings et al., 1996). In der Zwischenzeit wurden jedoch die Kulturbedingungen für die Keratinozyten optimiert, so dass die neueren, in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse als gültig angesehen werden sollten.

Neben den hier genannten Studien an adulter Haut bzw. an Zellen in vitro liegen auch Studien an fetaler Haut von Affen und Ratten vor, die hier aber nicht weiter zum Vergleich herangezogen werden, da die Angiotensin Rezeptor Verteilung

sich in fetalem Gewebe grundlegend von der in adultem Gewebe unterscheidet (Millan et al., 1989, Zemel et al., 1990, Tsutsumi und Saavedra, 1991, Tsutsumi et al., 1991, Johnson und Aguilera, 1991, Feuillan et al., 1993, de Gasparo et al., 2000).

5.2 Angiotensin II Synthese durch Keratinozyten

Wie im vorhergehenden Text bereits mehrfach erläutert, gilt der Nachweis von Angiotensinogen, Renin und ACE in eng benachbarter Lokalisation bzw. in einer Zelle als starkes Indiz für die Fähigkeit dieses Gewebes/dieser Zelle, eigenständig, also ohne Zufuhr weiterer Komponenten aus der Zirkulation, Ang II zu synthetisieren. Da der Nachweis von Ang II selbst insbesondere im Gewebe technisch sehr anspruchsvoll bzw. kostenintensiv ist, hat sich die vorliegende Arbeit darauf beschränkt, die Ang II Synthese lediglich in humanen, primären Keratinozyten in vitro direkt zu überprüfen und zwar mit einem enzymatischen immunometrischen Assay. Mit Hilfe dieser Technik konnte sowohl in Zellhomogenaten als auch in Überständen der Keratinozyten Ang II nachgewiesen werden. Die Ang II Synthese war durch IL-6 und EGF stimulierbar, und diese Stimulation wiederum durch Ko-Inkubation mit einem ACE-Hemmer um ca. 60% hemmbar. Keratinozyten scheinen also zumindest in vitro in der Tat in der Lage zu sein, Ang II selbst zu synthetisieren. Der endgültige Beweis, dass dem auch in vivo so ist, steht allerdings noch aus.

Auch in der Haut der Ratte konnte schon Ang II selbst nachgewiesen werden, allerdings wurden hierbei Hautbiopsien verwendet, die auch Gefäße enthielten, so dass dieses Ergebnis nicht als streng hautspezifisch angesehen werden kann (Phillips et al., 1994).

Mit dem Nachweis, dass **humane Haut** offensichtlich sowohl Quelle als auch Zielorgan von Ang II ist, stellt sich die Frage nach der physiologischen bzw. pathophysiologischen Funktion dieses Gewebe-RAS.

5.3 Mögliche physiologische Bedeutung des kutanen RAS

Eine mögliche physiologische Funktion des kutanen RAS könnte in der Regulation von Keratinozytenproliferation und –differenzierung in der normalen Epidermis bestehen.

90 % aller epidermalen Zellen sind Keratinozyten. Die epidermale Basalschicht besteht zum großen Teil aus teilungsfähigen Stammzellen, aus denen sich alle neugebildeten Keratinozyten rekrutieren. Innerhalb von etwa 28 Tagen wandern die Keratinozyten durch alle Schichten der Epidermis, vom Stratum basale zum Stratum corneum, und durchlaufen dabei einen kontinuierlichen Prozess der Differenzierung, der schließlich in der Apoptose der Zellen mündet. Die Proliferationsrate der Stammzellen sowie der Prozess der Keratinozytendifferenzierung unterliegen komplexen Regulationsmechanismen, und Störungen dieser Mechanismen führen zu Hautkrankheiten wie *Psoriasis vulgaris* (Karasek, 1999).

Von anderen Geweben ist bekannt, dass das RAS regulatorisch auf Prozesse der Zellproliferation und -differenzierung einwirken kann. Während Ang II über den AT₁-Rezeptor in der Regel proliferationsfördernd und anti-apoptotisch wirkt, vermittelt der AT₂-Rezeptor Antiproliferation und fördert Apoptose (Stoll et al., 1995, Meffert et al., 1996, Yamada et al., 1996). Da Keratinozyten nach den vorliegenden Ergebnissen beide Rezeptor-Subtypen exprimieren, wäre es denkbar, dass Keratinozytenproliferation bzw. -differenzierung durch eine Änderung des Rezeptorverhältnisses in der Epidermis modifiziert werden können.

5.4 Mögliche pathophysiologische Bedeutung des kutanen RAS

Falls diese Hypothese sich als richtig erweisen sollte, müsste man erwarten, dass bei Hauterkrankungen mit veränderter/gestörter Keratinozytenproliferation bzw. –differenzierung Änderungen des kutanen RAS zu beobachten sind. In erster Linie gilt dies natürlich für die Verteilung der Angiotensin Rezeptoren. Experimente hierzu werden momentan von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Teil

der hier vorgelegten Arbeit waren Untersuchungen zur Expression der übrigen RAS Komponenten bei Dermatosen mit veränderter Keratinozytenproliferation, denn auch eine lokal gesteigerte oder verminderte Ang II Synthese könnte regulatorische Effekte auf die Keratinozyten haben.

Als Modelle für eine gestörte Keratinozytenproliferation und/oder -differenzierung wurden zunächst drei Dermatosen ausgewählt: die „klassische“ Dermatose dieses Formenkreises, die Psoriasis vulgaris, sowie zwei Neoplasien (Basaliom und Spinaliom).

5.5 Expression der RAS-Komponenten bei Psoriasis vulgaris

Bei der *Psoriasis vulgaris* ist die Zeit der Durchwanderung der Epidermis vom Stratum basale bis zum Stratum corneum durch die Keratinozyten von normalerweise ca. 28 Tagen auf etwa vier Tage reduziert. Ein wesentliches pathophysiologisches Charakteristikum der *Psoriasis vulgaris* ist also eine Proliferationsstörung der Keratinozyten, die mit einer Differenzierungsstörung einhergeht. Charakteristisch ist weiterhin eine inflammatorische Reaktion, die sich insbesondere durch Infiltrate im Bereich der Papillenspitzen und sogenannte Munro-Mikroabszesse äußert. Noch immer sind jedoch Ätiologie und Pathogenese der *Psoriasis vulgaris* weitgehend unverstanden (Sterry und Paus, 2004 a).

Bei den immunhistochemischen Färbungen im Rahmen dieser Arbeit mit Antikörpern gegen Angiotensinogen, Renin und ACE zeigte sich im Gegensatz zu normaler Haut keine durchgehend homogene Anfärbung der Epidermis, sondern eine sehr starke Anfärbung der unteren Epidermialschichten, während in den oberen Schichten, insbesondere im Stratum granulosum und im oberen Stratum spinosum fast kein positives Signal mehr nachweisbar war.

In der Dermis fand sich eine deutliche Gefäßproliferation sowie ein entzündliches Infiltrat in den Papillenspitzen, das Infiltrat teilweise auch in der darunter

liegenden Dermis. Die Infiltratzellen und Gefäßendothelzellen zeigten in den meisten Fällen eine deutliche Expression aller RAS-Komponenten.

Über die mögliche Rolle des RAS bei der *Psoriasis vulgaris* gibt es bislang keinerlei Daten. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine verstärkte Ang II Synthese im Bereich der basalen, epidermalen Schichten hin. Da Ang II einen proliferationsfördernden Effekt auf Keratinozyten ausübt, könnte eine erhöhte, lokale Ang II Konzentration zu der gesteigerten Proliferationsrate der psoriatisch veränderten Keratinozyten beitragen. Umgekehrt scheint in den oberen epidermalen Schichten die Ang II Synthese im Vergleich zu normaler Haut reduziert zu sein. Eine mögliche Deutung hinsichtlich der Ursache hierfür wäre, dass durch die verstärkte Proliferation die Syntheserate der Zellen abfällt, hinsichtlich der pathophysiologischen Bedeutung, dass ein modulierender Effekt von Ang II auf die Keratinozytendifferenzierung ausfällt. Für eine spezifischere Deutung der vorliegenden Ergebnisse wäre es allerdings von Nutzen, das Verteilungsmuster der Ang II Rezeptoren in psoriatischer Haut zu kennen, da die durch Ang II ausgelösten Effekte je nach dominierendem Rezeptor-Subtyp entscheidend differieren können.

Auffallend bei den Gewebeschnitten aus psoriatischer Haut war weiterhin die deutlich erkennbare Expression von Angiotensinogen, Renin und ACE in den Zellen der Papillenspitzeninfiltrate. Diese Beobachtung kann dahingehend interpretiert werden, dass mit der Kapillarproliferation in den Papillenspitzen die Einwanderung von Infiltratzellen in diesem Bereich verstärkt ist und somit eine weitere Quelle der Ang II Bildung in dem Gewebe angereichert wird. Welche Bedeutung diesem zusätzlichen lokalen RAS zukommt, ist noch unklar. Es ist jedoch bekannt, dass Ang II die Expression von Cytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen beeinflusst, so dass denkbar ist, dass Ang II auch die inflammatorische Reaktion im Rahmen einer Psoriasis in vielfältiger Weise beeinflusst.

5.6 Expression der RAS-Komponenten beim Basaliom

Die meisten Tumoren entstehen durch Teilung aus einer Ursprungszelle, bei der aufgrund somatischer Mutationen, z.B. in Protoonkogenen, oft auch Entwicklungskontrollgene aktiviert und Tumorsuppressorgene und Differenzierungsgene durch entsprechende Deletionen inaktiviert werden. Ist erst einmal ein Baustein aus dem ursprünglichen chromosomalen Gefüge gestört, folgen weitere Verluste an zellregulatorischer Information, so dass die natürlichen Zellreparationsmechanismen ausfallen und die Zelle entarten kann. Bei Basaliompatienten wird eine genetisch determinierte Verringerung der Reparaturkapazität UV-Licht induzierter DNS-Schäden diskutiert (Wie et al., 1994).

An der Entstehung eines Tumors sind in unterschiedlicher Gewichtung sämtliche Faktoren beteiligt, die bei der Embryogenese und Regeneration den Proliferations- und Differenzierungsstoffwechsel steuern (Lodish et al., 1995).

Dies ist ein wichtiger Ansatzpunkt für die Hypothese einer möglichen Beteiligung des RAS bei der Pathogenese des **Basalioms**, da die Komponenten des RAS nachweislich Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung bis hin zur Apoptose nehmen (Meffert et al., 1996, Horiuchi et al., 1997, Stoll et al., 1995, Nakajima et al., 1995).

In den immunhistochemischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen Angiotensinogen und Renin ist die Anfärbung des Tumorgewebes im Vergleich zur gesunden Epidermis deutlich reduziert. Es zeigt sich eine leichte Randbetonung der Tumornester.

Auch unter Verwendung von Antikörpern gegen ACE findet sich ein ähnliches Anfärbungsmuster - die Tumorbereiche sind in diesem Fall eher noch weniger angefärbt, teilweise sogar negativ. Das umgebende, dermale Bindegewebe zeigt dagegen deutliche, positive Signale vermutlich aufgrund eines peritumorösen Infiltrats, welches bei den anderen untersuchten, hier nicht gezeigten **Basaliomen** weniger stark ausgeprägt war.

Inkubationen des Tumorgewebes mit Antikörpern gegen Angiotensin Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, sind aber geplant.

Takeda et al. publizierten 2002 immunhistochemische Untersuchungen von **Basaliomen** mit Antikörpern gegen AT₁- und AT₂-Rezeptoren, führten aber keine Anfärbungen mit Antikörpern gegen weitere RAS-Komponenten durch (Takeda et al., 2002). Trotzdem ist bemerkenswert, dass auch in den Experimenten von Takeda et al. in Basaliom-Tumorgewebe keine Anfärbungen festzustellen waren (außer im Zentrum follikulär differenzierender **Basaliome**, welche eine relativ seltene Untergruppe darstellen). Das kutane Gewebe-RAS scheint also im Basaliomgewebe auf allen Ebenen (d.h. im Bereich der für die Ang II Synthese notwendigen Komponenten und im Bereich der Rezeptoren) durch noch zu eruiende Mechanismen deutlich inhibiert bis völlig ausgeschaltet zu sein. Über die pathophysiologische Bedeutung dieser Beobachtung kann bislang nur spekuliert werden. Eine mögliche Interpretation läge in der Annahme, dass die Minderexpression des RAS in der Tumorzelle zu einem weitgehenden Wegfall des modulierenden Einflusses des RAS auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose führt. Neben zahlreichen weiteren Ursachen könnte das möglicherweise ein wichtiger Auslöser für ungehemmtes Tumorwachstum der **Basaliome** sein. Die Unreife und die starke Proliferation der Zellen wiederum könnten die verminderte Synthese der RAS Komponenten erklären. Falls sich die Beobachtung von Takeda et al. (die in eigenen Versuchen bisher nicht geteilt werden konnte) bestätigen sollte, dass die RAS-Komponenten in den Basalzellen der Epidermis weniger stark exprimiert sind als in höheren Schichten, so würde sich in der im Vergleich zur Epidermis geringen Anfärbung der **Basaliome** vielleicht auch deren zellulärer Ursprung widerspiegeln.

5.7 Expression der RAS-Komponenten beim Spinaliom

Das Plattenepithelkarzinom der Haut wird als maligner Tumor der Keratinozyten definiert. Es ist nach dem **Basaliom** die zweithäufigste bösartige Neubildung

der Haut. **Spinaliome** der Haut finden vermutlich ihren Ursprung in den normalen Stachelzellen des Stratum spinosum der Epidermis. Ein wesentliches feingewebliches Merkmal ist die Differenzierung in Richtung nichtfollikulärer Epidermisstrukturen mit der Fähigkeit zur Verhornung. Im Gegensatz zur gesunden Epidermis ist die normale Schichtung aufgehoben und vor allem die Zahl der Keratinozyten deutlich erhöht.

Die immunhistochemischen Anfärbungen von Gewebeschnitten aus humanen **Spinaliomen** im Rahmen dieser Arbeit erbrachten bei Anfärbung mit allen Antikörpern (anti-Angiotensinogen, anti-Renin und anti-ACE) eine deutliche, homogene Anfärbung der gesamten Tumormasse.

Bisher sind in der Literatur keine weiteren Arbeiten zur Expression von Angiotensinogen, Renin und ACE beim **Spinaliom** erschienen. Takeda et al. publizierten allerdings die Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen AT₁- und AT₂-Rezeptoren in Plattenepithelkarzinomen (Takeda und Kondo, 2001 a). In 88% der untersuchten Fälle (insgesamt wurden 50 Fälle untersucht) war eine starke (74%) bis mittel-starke (14%) homogene Anfärbung der gesamten Tumormasse feststellbar. Obwohl sich diese Daten natürlich nicht direkt mit den vorliegenden vergleichen lassen, so ist doch bemerkenswert, dass in allen hier und in der Gruppe von Takeda durchgeführten Anfärbungen übereinstimmend die Expression der RAS-Komponenten in **Spinaliomen** deutlich ausgeprägt, in **Basaliomen** dagegen verringert war.

Auch über die Bedeutung der starken Expression des RAS im Bereich von **Spinaliomen** kann nur spekuliert werden. Eine starke Ang II Synthese verbunden mit einer erhöhten Expression von AT₁-Rezeptoren könnte natürlich zu der erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen beitragen. Ob dem wirklich so ist, muss allerdings noch in weiteren Experimenten geklärt werden.

6 Zusammenfassung

In den hier dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen aus der Epidermis (Keratinozyten, Melanozyten) und Dermis (Fibroblasten, mikrovaskuläre Endothelzellen) menschlicher Haut alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, also Angiotensinogen, Renin, ACE, AT₁- und AT₂-Rezeptoren exprimieren. Einzige Ausnahme: Melanozyten exprimieren keine AT₂-Rezeptoren. Da also alle Komponenten des RAS in enger Lokalisation vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass in **humaner Haut** ein Gewebe-RAS vorhanden ist und dass **humane Haut** in der Lage ist, unabhängig von der Zufuhr zusätzlicher Komponenten und von regulatorischen Einflüssen aus der Zirkulation, Angiotensin II zu bilden. Die autonome Bildung von Ang II konnte im Rahmen dieser Arbeit direkt in Keratinozyten gezeigt werden und war durch IL-6 und EGF stimulierbar.

Die Arbeiten zeigten außerdem eine starke Expression der RAS-Komponenten in **Spinaliomen** und eine verminderte Expression in **Basaliomen**. In psoriatisch veränderter Haut war das Anfärbungsmuster innerhalb der Epidermis gegenüber normaler Haut verändert; im Gegensatz zur homogenen Expression aller untersuchten Komponenten in normaler Epidermis war in psoriatischen Läsionen die Expression im Bereich der oberen Schichten, insbesondere im Bereich des Stratum granulosum, vermindert. Außerdem zeigten die Infiltratzellen in den Papillenspitzen ein deutliches, positives Signal bei Inkubation mit allen verwendeten Antikörpern.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass **humane Haut** ein komplettes, lokales RAS besitzt. Ang II kann in verschiedenen Zellen der Haut an spezifische Rezeptoren binden und so auf physiologische und pathophysiologische kutane Prozesse Einfluss nehmen. Zu den physiologischen Prozessen könnte die Regu-

lation der Keratinozyten-Proliferation und -Differenzierung gehören. Bezüglich der pathophysiologischen Bedeutung ergaben sich deutliche Hinweise auf eine Fehlregulation des kutanen RAS in der Epidermis psoriatisch veränderter Haut. Dies könnte ein Hinweis auf eine pathogenetische Rolle des RAS für die gestörte Keratinozyten-Proliferation und -Differenzierung im Rahmen einer *Psoriasis vulgaris* sein. Das Expressionsmuster in den untersuchten Tumoren war uneinheitlich (*Basaliom*: verminderte Expression; *spinaliom*: starke Expression), so dass eine Interpretation der Bedeutung des RAS für kutane Tumore ohne weitere Untersuchungen noch kaum möglich erscheint.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Existenz eines kompletten hormonellen Systems, des Renin-Angiotensin-Systems, in *humaner Haut* belegt. Diese neue Erkenntnis sollte zum weiteren Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen in der Haut beitragen und möglicherweise zur Aufklärung pathogenetischer Zusammenhänge im Rahmen verschiedener Dermatosen wie z. B. der *Psoriasis vulgaris* führen.

Literaturliste

Abel und Gross, 1988

Abel KJ, Gross KW.

Close physical linkage of the murine Ren-1 and Ren-2 loci.

Nucleic Acids Res. 1988 Mar 25; *16*(5):2111-26.

Abhold et al., 1987

Abhold RH, Sullivan MJ, Wright JW, Harding JW.

Binding, degradation and pressor activity of angiotensin II and III after amino peptidase inhibition with amastatin and bestatin.

J Pharmacol Exp Ther 1987; *242*:957-62.

Abiko et al., 1996

Abiko M, Rodgers KE, Campeau JD, Nakamura RM, Dizerega GS.

Alterations of angiotensin II receptor levels in sutured wounds in rat skin.

Invest Surg 1996; *9*:447-453.

Admiraal et al., 1993

Admiraal PJJ, Danser AHJ, Sjoukje-Jong M, Pieterman H, Derkx FHM, Schalekamp MADH.

Regional angiotensin II production in essential hypertension and renal artery stenosis.

Hypertension 1993; *21*:173-84.

Balt et al., 2001

Balt JC, Mathy MJ, Nap A, Pfaffendorf M, van Zwieten PA.

Effect of the AT1-receptor antagonists losartan, irbesartan, and telmisartan on angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery.

J Cardiovasc Pharmacol 2001; *38*(1):141-8.

Benjafield et al., 2004

Benjafield AV, Wang WY, Morris BJ.

No association of Angiotensin-converting-enzyme 2 gene (ACE2) polymorphism with essential hypertension.

Am J Hypertens 2004; *17*(7):624-8.

Braun-Menendez et al., 1940

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir JF, Munoz JM.

The substance causing renal hypertension.

J Physiol 1940; *98*:283-98.

Buczko et al., 2000

Buczko W, Kucharewicz I.

Angiotensin-(1-7). One step forward?

Pol J Pharmacol [2000](#); [52](#) (2):[75-81](#)

Burnham et al., 1987

Burnham CE, Hawelu-Johnson CL, Frank BM, Lynch KR.

Molecular cloning of rat renin cDNA and its gene.

Proc Natl Acad Sci USA [1987](#); [84](#):[5605-9](#).

Burt et al., 1985

Burt DW, Beecroft LJ, Mullins JJ, et al.

Mouse renin gene structure, evolution and function.

In: Kosta V, ed. Aspartic proteinases and their inhibitors. Berlin: Walter de Gruyter & Co. [1985](#): [355-77](#).

Busche et al., 2000

Busche S, Gallinat S, Bohle RM, Reinecke A, Seebeck J, Franke F, Fink L, Zhu M, Summers C, Unger T.

Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study.

Am J Pathol [2000](#); [157](#):[605-611](#).

Caldwell et al., 1976

Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL.

Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization.

Science [1976](#); [191](#):[1050-51](#).

Cambien et al., 1992

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al.

Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction.

Nature. [1992](#) Oct 15; [359](#)(6396):[641-4](#).

Campbell et al., 1984

Campbell DJ, Bouhnik J, Ménard J, Corvol P.

Identity of angiotensinogen precursors in rat brain and liver.

Nature [1984](#); [308](#):[206-8](#).

Campbell und Habener, 1986

Campbell DJ, Habener JF.

Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat.

J Clin Invest [1986](#); [78](#):[31-39](#).

Campbell, 1987

Campbell DJ.

Circulating and tissue angiotensin systems.

J Clin Invest [1987](#); [79](#): [1-6](#).

Carey et al., 2000

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM.

Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function.

Hypertension [2000](#); [35\(1 Pt 2\)](#):[155-63](#).

Cassis et al., 1988

Cassis LA, Saye JA, Peach MJ.

Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA.

Hypertension [1988](#); [11](#):[591-96](#).

Chai et al., 1987

Chai SY, McKinley MJ, Mendelsohn FAO.

Distribution of angiotensin converting enzyme in sheep hypothalamus and medulla oblongata visualized by in vitro autoradiography.

Clin Exper Theory and Practice [1987](#); [A9\(2&3\)](#):[449-60](#).

Chappell et al., 1998 a

Chappell MC, Iyer SN, Diz DI, Ferrario CM.

Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7).

Braz J Med Biol Res [1998](#); [31\(9\)](#):[1205-12](#).

Chappell et al., 1998 b

Chappell MC, Diz DI, Yunis C, Ferrario CM.

Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney.

Kidney Int Suppl [1998](#); [68](#):[S3-6](#).

Chirgwin et al., 1984 a

Chirgwin JM, Schaefer IM, Rotwein PS, Piccini N, Gross KW, Naylor SL.

Human renin gene is on chromosome one.

Somat Cell Mol Genet [1984](#) Jul; [10\(4\)](#):[415-21](#).

Chirgwin et al., 1984 b

Chirgwin JM, Schaefer IM, Diaz JA, Lalley PA.

Mouse kidney renin gene is on chromosome one.

Somat Cell Mol Genet [1984](#) Nov; [10\(6\)](#):[633-7](#).

Clouston et al., 1988

Clouston WM, Evans BA, Haralambidis J, Richards RI.

Molecular cloning of the mouse angiotensinogen gene.

Genomics [1988](#); [2](#):[240-48](#).

Cordell et al., 1984

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY.

Immunoenzymatic Labeling of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes).

J Histochem Cytochem [1984](#); [32](#):219-229.

Correa et al., 1985

Correa FMA, Plunkett LM, Saavedra JM, Hichens M.

Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme (kininase II) binding in individual rat brain nuclei with 125I-351A, a specific enzyme inhibitor.

Brain Res [1985](#); [347](#):192-95.

de Gasparo et al., 2000

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T.

International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.

Pharmacol Rev [2000](#); [52](#):415-472.

Donoghue et al., 2000

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S.

A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.

Circ Res. [2000](#) Sep 1; [87](#)(5) :E1-9.

Dubey et al., 1997

Duby RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB.

Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells.

Curr Opin Nephrol Hypertens [1997](#); [6](#)(1):88-105.

Dzau, 1988

Dzau VJ.

Circulating versus local renin-angiotensin in cardiovascular homeostasis.

Circulation [1988](#); [77](#) [suppl.1]: I-4-I-13.

Feuillan et al., 1993

Feuillan PP, Millan MA, Aguilera G.

Angiotensin II binding sites in the rat fetus: characterization of receptor subtypes and interaction with guanyl nucleotides.

Regul Pept [1993](#); [44](#):159-169.

Fischer et al., 2001

Fischer JW, Stoll M, Hahn AW, Unger T. Differential regulation of thrombospondin-I and fibronectin by

angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells.

Cardiovasc Res [2001](#); [51\(4\):784-91](#).

Freis, 1995

Freis ED. Historical development of antihypertensive treatment, in Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management(Laragh JH and Brenner BM eds), Raven Press Ltd, New York, [1995](#); pp [2741-2751](#)

Fritsch, 1998 a

Fritsch P. Melanozyten.

Dermatologie und Venerologie Lehrbuch und Atlas. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York [1998](#); [18-21](#).

Fritsch, 1998 b

Fritsch P. Kollagen.

Dermatologie und Venerologie Lehrbuch und Atlas. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York [1998](#); [29-31](#).

Fritsch, 1998 c

Fritsch P. Epidermale Kinetik.

Dermatologie und Venerologie Lehrbuch und Atlas. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York [1998](#); [9-12](#).

Fukamizu et al., 1988

Fukamizu A, Nishi K, Cho T, et al. Structure of the rat renin gene.

J Mol Biol [1988](#); [201:443-50](#).

Gaillard et al., 1989

Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene.

DNA [1989](#); [8:87-99](#).

Gaillard-Sanchez et al., 1990

Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene.

Hum Genet [1990](#) Mar; [84\(4\):341-3](#).

Gallinat et al., 1998

Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger T, Herdegen T. Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves.

Brain Res Mol Brain Res [1998](#); [57\(1\):111-22](#).

Gallinat et al., 1999

Gallinat S, Busche S, Schutze S, Kronke M, Unger T. AT2-receptor stimulation and uses generation of ceramids in PC12W cells.

FEBS Lett [1999](#); [443 \(1\): 75-9](#).

Gohlke et al., 1992

Gohlke P, Bünning P, Unger T. Distribution and metabolism of angiotensin I and II in the blood vessel wall.

Hypertension [1992](#); [20](#):[151-57](#).

Gohlke et al., 1998

Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism.

Hypertension [1998](#); [31](#):[349-355](#).

Goldblatt et al., 1934

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summervill WW. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia.

J Exp. Med [1934](#); [59](#):[347-79](#).

Gomez et al., 1988

Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, et al. Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney.

Am J Physiol [1988](#); [254](#):[F582-F587](#).

Gross, 1958

Gross F. Renin und Hypertensin, physiologische und pathophysiologische Wirkstoffe.

Klin Wochenschr [1958](#); [36](#):[693-705](#).

Hackenthal et al., 1990

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion.

Physiol Rev [1990](#) Oct; [70\(4\)](#):[1067-116](#).

Hardman et al., 1984

Hardman JA, Hort YJ, Catanzaro DF, et al. Primary structure of the human renin gene.

DNA [1984](#); [3](#):[457-67](#).

Hein et al., 1995

Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice.

Nature. [1995](#) Oct 26; [377\(6551\)](#):[744-7](#). Erratum in : Nature [1996](#) Mar 28; [380\(6572\)](#):[366](#).

Hein et al., 1997

Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block.

Proc Natl Acad Sci USA [1997](#); [94\(12\)](#):[6391-6](#).

Hera et al., 1982

Hera A, Fukuyama K, Epstein WL. Partial purification and characterization of angiotensin-converting enzyme in mouse and human skin.

J Invest Dermatol. 1982; 78:503-507.

Horiuchi et al., 1997

Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide.

Circ Res 1997; 81: 970-976.

Hsueh et al., 1981

Hsueh WA, Carlson EJ, Israel-Hagman M. Mechanism of acid-activation of renin: role of kallikrein in renin activation.

Hypertension. 1981 May-Jun;3(3 Pt 2):122-9.

Hsueh et al., 1995

Hsueh WA, Do YS, Anderson PW, Law RE. Angiotensin II in cell growth and matrix production.

Adv Exp Med Biol 1995; 377: 217-223.

Jackson et al., 1988

Jackson B, Cubela RB, Sakaguchi K, Johnston CI. Characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) in the testis and assessment of the in vivo effects of the ACE inhibitor perindopril.

Endocrinology 1988; 123:50-55.

Jacob et al., 1991

Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat.

Cell. 1991 Oct 4; 67(1):213-24.

Johnson und Drummer, 1988

Johnson H, Drummer OH. Hydrolysis of angiotensin I by peptidase in homogenates of rat lung and aorta.

Biochem Pharmacol 1988; 37:1131-36.

Johnson und Aguilera, 1991

Johnson MC, Aguilera G. Angiotensin-II receptor subtypes and coupling to signaling systems in cultured fetal fibroblasts.

Endocrinology 1991; 129:1266-1274.

Johnston, 1990

Johnston CI. Biochemistry and Pharmacology of the Renin-Angiotensin System.

Drugs 39 (Suppl. 1): 21-31 (1990).

Junqueira u. Carneiro, 1991 a

Junqueira LC, Carneiro J. Epidermis.

In: Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1991; 413.

Junqueira u. Carneiro, 1991 b

Junqueira LC, Carneiro J. Dermis.

In: Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1991; 420-423.

Kageyama et al., 1984

Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence.

Biochemistry. 1984 Jul 31;23(16):3603-9.

Kambayashi et al., 1993

Kambayashi Y, Bardhan S, Tkahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition.

J Biol Chem 1993; 268:24543-6.

Karasek, 1999

Karasek MA. Progress in our understanding of the biology of psoriasis.

Cutis 1999; 64: 319-322.

Kaschina und Unger, 2003

Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.

Blood Press. 2003;12(2):70-88. Review.

Laflamme et al., 1996

Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors.

J Biol Chem 1996; 271(37):22729-35.

Langford et al., 1991

Langford KG, Shai SY, Howard TE, Kovac MJ, Overbeek PA, Bernstein KE. Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin converting enzyme.

J Biol Chem 1991; 266:15559-62.

Laragh, 1987

Laragh JH. Two forms of vasoconstriction in systemic hypertension.

Am J Cardiol 1987; 60(12):82G-93G.

Lavoie und Sigmund, 2003

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview : overview of the renin-angiotensin system - an endocrine and

paracrine system.

Endocrinology. [2003 Jun](#); [144\(6\):2179-83](#). Review.

Leask et al., 2001

Leask A, Sa S, Holms A, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ. The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and sclerodermal fibroblasts.

Mol Pathol [2001](#); [54 \(3\): 180-183](#).

Leckie und McGhee. 1980

Leckie BJ, McGhee NK. Reversible activation-inactivation of renin in human plasma.

Nature [1980](#); [288:702-4](#).

Lehtonen et al., 1999

Lehtonen JY, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ. Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates Angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis.

J Biol Chem [1999](#); [274\(24\):16901-6](#).

Li et al., 2005

Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury.

FASEB J [2005 Apr](#); [19 \(6\): 617-9](#). Epub [2005 Jan 21](#).

Lodish et al., 1995

Lodish H, Baltimore D, Burke A, Lipurski SL, Matsudaira P, Darnell J. Cancer.

In: Lodish H Molecular Cell Biology. WH Freeman & Co (New York) [1995](#), [1201-1295](#).

Lucius et al., 1998

Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T H. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats.

J Exp Med [1998](#); [188: 661-670](#).

Makino et al., 1996

Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Furuwara M, Furakawa T. Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain.

Neuropeptides [1996](#); [30:596-601](#).

Malmqvist et al., 2001

Malmqvist K, Kahan T, Edner M, et al. Regression of left ventricular hypertrophy in human hypertension with irbesartan.

J Hypertens [2001](#); [19\(6\): 1167-76](#).

Ménard et al., 1983

Ménard J, Bouhik J, Clauser E, Richoux JP, Corvol P. Biochemistry and regulation of angiotensinogen.

Clin Exp Hypertens A. [1983](#); [5\(7-8\):1005-19](#).

Meffert et al., 1996

Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT₂-receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells.

Moll Cell Endocrinol [1996](#); [122](#): [59-67](#).

Millan et al., 1989

Millan MA, Carvallo P, Izumi S, Zemel S, Catt KJ, Aguilera G. Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus.

Science [1989](#); [244](#):[1340-1342](#).

Min et al., 2004

Min LJ, Cui TX, Yahata Y, et al. Regulation of collagen synthesis in mouse skin fibroblasts by distinct angiotensin II receptor subtypes.

Endocrinology [2004](#); [145](#):[253-60](#).

Miyazaki et al., 1984

Miyazaki H, Fukamizu A, Hirose S, et al. Structure of the human renin gene.

Proc Natl Acad Sci USA [1984](#); [81](#):[5999-6003](#).

Montani und van Vliet, 2004

Montani JP, van Vliet BN. General Physiology and Pathophysiology of the Renin-Angiotensin System. In: Unger T, Schoelkens BA (eds) Angiotensin Vol. I, [1st edn](#). Springer, Berlin Heidelberg New York (Handbook of experimental pharmacology, vol 163/I, [pp 4-7](#)).

Morris, 1989

Morris BJ. Human renin protein and gene structures: present and future targets for a renin blockade in treatment of hypertension.

J Hypertens [1989](#); [7\(2\)](#):[S9-S14](#).

Mukoyama et al., 1993

Mukoyama M, Kakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven transmembrane receptors.

J Biol Chem. [1993](#); [268](#):[24539-42](#).

Mullins et al., 1982

Mullins JJ, Burt DW, Windass JD, McTurk P, George H, Brammar WJ. Molecular cloning of two distinct renin genes from the DBA/2 mouse.

EMBO J [1982](#); [1](#):[1461-66](#).

Nakajima et al., 1995

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M et al. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer.

Proc Natl Acad Sci USA [1995](#); [92](#): [10663-10667](#).

Nickenig et al., 1997

Nickenig G, Geisen G, Vetter H, Sachinidis A. Characterization of angiotensin receptors on human skin fibroblasts.

J Mol Med 1997; 75:217-222.

Nio et al., 1995

Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial.

J Clin Invest 1995; 95:46-54.

Nouet und Nahmias, 2000

Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin AT2 receptor.

Trends Endocrinol Metab 2000; 11:1-6.

Ohkubo et al., 1983

Ohkubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen.

Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:2196-200.

Orlando et al., 1998

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR.

Clin Chem Lab Med 1998, 36(5): 255-69.

Page und Helmer, 1940

Page IH, Helmer OM. Angiotensin activator, renin, and angiotonin inhibitor and the mechanism of angiotonin tachyphylaxis in normal, hypertensive, and nephrectomized animals.

J Exp Med 1940; 71:4485-519.

Paul et al., 1985

Paul M, Printz M, Harms E, Unger T, Lang RE, Ganten D. Localization of renin (EC 3.4.23) and converting enzyme (EC 3.4.15.1) in nerve endings of rat brain.

Brain Res 1985; 334:315-24.

Phillips et al., 1994

Phillips MI, Kimura B, Gyurko R. Angiotensin receptor stimulation of transforming growth factor- β in rat skin and wound healing. In: Saavedra J M, Timmermans P.M.W.M, eds. Angiotensin receptors.

York: Plenum Press, 1994: 377-396.

Pratt et al., 1989

Pratt RE, Zou WM, Naftilan AJ, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Altered sodium regulation of renal Angiotensinogen mRNA in the spontaneously hypertensive rat.

Am J Physiol 1989 Mar; 256(3 Pt 2):F469-74.

Pravenec et al., 1991

Pravenec M, Simonet L, Kren V, Kunes J, Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Kurtz T. The rat renin gene: as-

signment to chromosome 13 and linkage to the regulation of blood pressure.

Genomics [1991](#) Mar; [9\(3\):466-72.](#)

Rix et al., 1981

Rix E, Ganten D, Schüll B, Unger T, Taugner R. Converting-enzyme in the choroid plexus, brain, and kidney: immunocytochemical and biochemical studies in rats.

Neurosci Lett [1981](#); [22:125-30.](#)

Rodriguez-Pallares et al., 2004

Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors.

Eur J Neurisci [2004](#); [20:1489-98.](#)

Rosenstiel et al., 2002

Rosenstiel P, Gallinat S, Arlt A, Unger T, Sievers J, Lucius R. Angiotensin AT(2) Receptor Ligands :Do They Have Potential as Future Treatment for Neurological Disease?

CNS Drugs [2002](#); [16\(3\):145-53.](#)

Rougeon et al., 1981

Rougeon F, Chambraud B, Foote S, Panthier JJ, Nageotte R. Molecular cloning of a mouse submaxillary gland renin cDNA fragment.

Proc Natl Acad Sci USA [1981](#); [78 :6367-71.](#)

Ryan, 1989

Ryan JW. Peptidase enzymes of the pulmonary vascular surface.

Am J Physiol [1989](#); [257:L53-L60.](#)

Sadoshima, 2000

Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II (editorial; comment).

Circ Res [2000](#); [86\(12\):1187-9.](#)

Saiki et al., 1985

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.

Science [1985](#); [230, 1350.](#)

Sanada et al., 2001

Sanada S, Kitakaze M, Node K, et al. Pain threshold, learning and formation of brain edema in mice lacking the angiotensin II type 2 receptor.

Life Sci [2000](#); [67\(21\):2577-85.](#)

Sasamura et al., 2001

Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Nakaya H, Saruta T. Effects of AT1 receptor antagonist on proteoglycan gene expression in hypertensive rats.

Hypertens Res [2001](#); [24\(2\):165-72.](#)

Schutz et al., 1996

Schutz S, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the rennin-angiotensin-system in human development.

Am J Pathol [1996](#); [149\(6\):20667-79](#).

Sealey et al., 1980

Sealey JE, Atlas SA, Laragh JH. Prorenin and other large molecular weight forms of renin.

Endocr Rev [1980](#); [1:365-92](#).

Sealey und Rubattu, 1989

Sealey JE, Rubattu S. Prorenin and renin as separate mediators of tissue and circulating systems.

Am J Hypertens [1989](#); [2:358-66](#).

Semple et al., 1976

Semple PF, Boyd AS, Dawes PM, Morton JJ. Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8), and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man.

Circ Res [1976](#) Nov; [39\(5\):671-8](#).

Siragy et al., 1999

Siragy HM, Inagami T, Ichiki T, Carey RM. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor.

Proc Natl Acad Sci USA [1999](#); [96\(11\):6506-10](#).

Skeggs et al., 1956

Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensive converting enzyme.

J Exp Med [1956](#); [103:295-99](#).

Skidgel et al., 1987

Skidgel RA, Schulz WW, Tam LT, Erdös EG. Human renal angiotensin I converting enzyme and neutral endopeptidase.

Kidney Int [1987](#); [31 \(suppl. 20\):S45-S48](#).

Soubrier et al., 1983

Soubrier F, Panthier JJ, Corvol P, Rougeon F. Molecular cloning and nucleotide sequence of a human renin cDNA .

Nucleic Acid Res [1983](#); [11: 7181-90](#).

Soubrier et al., 1988

Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning.

Proc Natl Acad Sci USA [1988](#); [85:9386-90](#).

Steckelings u. Czarnetzki, 1995

Steckelings UM, Czarnetzki BM. The renin-angiotensin-system in the skin.
Exp Dermatol 1995; 4: [329-334](#) © Munksgaard, 1995.

Steckelings et al., 1996

Steckelings UM, Artuc M, Paul M, Stoll M, Henz BM. Angiotensin II Stimulates Proliferation of Primary Human Keratinocytes via a Non-AT1, Non AT2 Angiotensin Receptor.
Biochemical and Biophysical Research Communications 229, [329- 333](#) (1996) Article No. 1801.

Sterry und Paus, 2004 a

Sterry W, Paus R. Psoriasis.
Checkliste Dermatologie, [5. Auflage](#), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2004; [296-309](#).

Sterry und Paus, 2004 b

Sterry W, Paus R. Maligne Tumoren der Epidermis, Basalzellkarzinom.
Checkliste Dermatologie, [5. Auflage](#), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2004; [414-417](#).

Sterry und Paus, 2004 c

Sterry W, Paus R. Maligne Tumoren der Epidermis, Plattenepithelcarcinom.
Checkliste Dermatologie, [5. Auflage](#), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999; [417-418](#).

Stoll et al., 1995

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Unger TH. Antiproliferative actions of Angiotensin II in endothelial cells.
J Clin Invest 1995; 95: [651-657](#).

Stoll et al., 2001

Stoll M, Unger T. Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old system.
Regul Pept 2001; [99\(2-3\):175-82](#).

Stroth et al., 1998

Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T. Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 receptor.
Brain Res Mol Brain Res 1998; [53\(1-2\):187-95](#).

Sun et al., 1994

Sun Y, Diaz-Arias AA, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme, bradykinin, and angiotensin II receptor binding in rat skin, tendon, and heart valves : an in vitro, quantitative autoradiographic study.
J Lab Clin Med 1994; [123:372-377](#).

Swales und Heagerty, 1987

Swales JD, Heagerty AM. Vascular renin-angiotensin-system: the unanswered questions.
J Hypertens Suppl 1987; [5:S1-5](#).

Takayanagi et al., 1994

Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Ikuyama S, Nawata H. Molecular cloning and characterization of the

promoter for human type-1 angiotensin II receptor gene.

Biochem Biophys Res Commun [1994](#); [200](#):[1264-1270](#).

Takeda und Kondo, 2001 a

Takeda H, Kondo S. Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression.

Am J Pathol [2001](#); [158\(5\)](#):[1633-7](#).

Takeda und Kondo, 2001 b

Takeda H, Kondo S. Immunohistochemical study of angiotensin receptors in normal human sweat glands and eccrine poroma.

Br J Dermatol [2001](#); [144](#): [1189-1192](#).

Takeda et al., 2002

Takeda H, Katagata Y, Kondo S. Immunohistochemical study of angiotensin receptors in human anagen hair follicles and basal carcinoma.

Br J Dermatol [2002](#); [147](#): [276-280](#).

Takeda et al., 2004

Takeda H, Katagata Y, Hozumi Y, Kondo S. Effects of angiotensin II receptor signaling during skin wound healing.

Am J Pathol. [2004](#) Nov; [165\(5\)](#):[1653-62](#).

Tigerstedt und Bergmann, 1898

Tigerstedt R, Bergmann PG. Niere und Kreislauf.

Scand Arch Physiol [1898](#); [8](#):[223-71](#).

Tipnis et al., 2000

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of Angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.

J Biol Chem. [2000](#) Oct 27; [275\(43\)](#):[33238-43](#)

Tokioka-Akagi et al., 2001

Tokioka-Akagi T, Fujimori A, Shibasaki M, Inagaki O, Yanagisawa I. Comparison of the angiotensin II type 1-receptor antagonist YM358 and the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril in rats with cardiac volume overload.

Jpn J Pharmacol [2001](#); [86\(1\)](#):[79-85](#).

Touyz und Schiffrin, 2000

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanism mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells.

Pharmacol Rev [2000](#); [52\(4\)](#):[639-72](#).

Tsutsumi et al., 1991

Tsutsumi K, Stromberg C, Viswanathan M, Saavedra JM. Angiotensin-II receptor subtypes in fetal tis-

sue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis.

Endocrinology [1991](#); [129](#):[1075-1082](#).

Tsutsumi und Saavedra, 1991

Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain.

Am J Physiol [1991](#); [261](#):[R209-R216](#).

Unger et al., 1988

Unger T, Badoer E, Ganten D, Lang RE, Rettig R. Brain angiotensin: pathways and pharmacology.

Circulation [1988](#); [77 \[suppl.I\]](#): [I-40-I-54](#).

Unger et al., 1990

Unger T, Gohlke P, Gruber MG. Converting enzyme inhibitors.

In: Ganten D, Mulrow PJ, eds. Handbook of experimental pharmacology, vol. 93. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. [1990](#):[377-481](#).

Unger, 1999

Unger T. The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme.

J Hypertens [1999](#); [17\(12 Pt 2\)](#): [1775-86](#).

Unger, 2000

Unger T. Neurohormonal modulation in cardiovascular disease.

Am Heart J [2000](#); [139\(1 Pt 2\)](#):[S2-8](#).

Viswanathan et al., 1991

Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development.

Biochem Biophys Res Commun [1991](#); [179](#):[1361-67](#).

Viswanathan u. Saavedra, 1992

Viswanathan M, Saavedra JM. Expression of angiotensin AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing.

Peptides [1992](#); [13](#):[783-786](#).

Volland et al., 1999

Volland H, Pradelles Ph, Ronco P, Azizi M, Simon D, Créminon C, Grassi J. A solid-phase immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) permitting very sensitive and specific measurement of angiotensin II in plasma.

Journal of Immunological Methods [1999](#); [228](#): [37-47](#).

Wie et al., 1994

Wie Q, Matanoski GM, Farmer ER, Hedayati MA, Grossman L. DNA repair and susceptibility to basal

cell carcinoma: a case control study.

Am J Epidemiol [1994](#), *140*: [598-607](#).

Wu et al., 2001

Wu L, Iwai M, Nakagami H, Li Z, Chen R, Suzuki J, Akishita M, de Gasparo M, Horiuchi M. Roles of Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Associated With Selective Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade With Valsartan in the Improvement of Inflammation-Induced Vascular Injury. *Circulation* [2001](#); *104*:[2716-2721](#).

Yamada et al., 1991

Yamada H, Fabris B, Allen AM, Jackson B, Johnston CI, Mendelsohn FAO. Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ Res* [1991](#); *68*:[141-49](#).

Yamada et al., 1996

Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* [1996](#) Jan 9; *93*(1):[156-60](#).

Yang et al., 1970

Yang HYT, Erdos EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et Biophysica Acta* *214* : [374-376](#), [1970](#).

Zemel et al., 1990

Zemel S, Millan MA, Feillan P, Aguilera G. Characterization and distribution of angiotensin-II receptors in the primate fetus. *J Clin Endocrinol Metab* [1990](#); *71*:[1003-1007](#).

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Professor Dr. B. Henz für die Bereitstellung des Themas.

Frau Dr. U.M. Steckelings und Herrn Dr. M. Artuc danke ich für die Einarbeitung im Labor und die umfassende Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Bei Frau C. Wesendahl bedanke ich mich für die gute Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbemethoden und den ständigen Beistand im Labor.

Meinem Mann danke ich für die ausdauernde Motivation und große Hilfe.