

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Dermatologie und Venerologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Ch. Marsch)

**Vergleich der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5
und D-Glutamat bei humanen Keratinozyten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katharina Monika Waltermann
geboren am 03.03.1976 in Münster (Westf.)

Betreuer: PD Dr. med. habil. Matthias Fischer

Gutachter: 1. PD Dr. med. habil M. Fischer
2. Prof. Dr. med. M. Buerke
3. Prof. Dr. med. R. A. Herbst

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 08.09.2009

Datum der Verteidigung: 24.06.2010

Referat und bibliographische Beschreibung

Seitdem in letzter Zeit festgestellt wurde, dass auch Keratinozyten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren tragen, sind diese zunehmend in den Fokus der experimentellen Dermatologie gerückt. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptoren einen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von Keratinozyten haben. Über die Wirkung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten ist dabei wenig bekannt. Für den bisher verwendeten, in der neurologischen Forschung etablierten „Standard“-NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 gibt es Hinweise, dass er am keratinozytären NMDA-Rezeptor nur schwach antagonistisch wirksam ist. Zusätzlich sprechen einige Untersuchungen für eine NMDA-Rezeptor-agonistische Wirkung sowie für ein zytotoxisches Potenzial von MK-801 bei Keratinozyten. Für andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten gibt es bisher kaum Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung der NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat bei kultivierten normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) bezüglich Zytotoxizität, NMDA-Rezeptor-antagonistischer Wirkung sowie des eigenen Einflusses auf die intrazelluläre Calciumkonzentration untersucht und verglichen. In den mittels Kristallviolett-Methode durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigte dabei keiner der Antagonisten eine zytotoxische Wirkung. Der Einfluss der drei Effektoren auf den durch NMDA induzierten Calciumeinstrom wurde mittels Fluoreszenzmessung am Laser-Scanning Mikroskop untersucht. Dabei wiesen alle Substanzen eine signifikante Inhibition des NMDA-induzierten Calciumeinstroms auf. Für AP 5 konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Calciuminfluxes nachgewiesen werden. Bezüglich des Einflusses der drei Antagonisten selber auf die intrazelluläre Calciumkonzentration zeigte sich interessanterweise, dass sowohl MK-801 als auch D-Glutamat zu einer Erhöhung derselben führen, während AP 5 die Calciumkonzentration unbeeinflusst lässt. Insgesamt sprechen unsere Daten dafür, dass AP 5 für den Einsatz als NMDA-Rezeptor-Antagonist bei Keratinozyten besonders gut geeignet ist und bei Untersuchungen zur NMDA-Rezeptor-abhängigen Calciumhomöostase der Verwendung von MK-801 und D-Glutamat vorgezogen werden sollte.

Waltermann, Katharina: Vergleich der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat bei humanen Keratinozyten. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

Referat und bibliographische Beschreibung	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Rezeptorgesteuerte Signalübertragung.....	1
1.2. Neurogene Rezeptoren der Epidermis.....	3
1.3. Glutamatrezeptoren	4
1.3.1. Allgemeiner Aufbau und Funktion von Glutamatrezeptoren.....	4
1.3.2. Aufbau und Funktion des NMDA-Rezeptors.....	5
1.3.3. Agonisten am NMDA-Rezeptor	6
1.3.4. Antagonisten am NMDA-Rezeptor.....	8
1.4. NMDA-Rezeptoren in der Haut	10
1.4.1. NMDA-Rezeptoren bei Keratinozyten - Verteilung, Funktion und Bedeutung ...	10
1.4.2. Antagonisten an keratinozytären NMDA-Rezeptoren	13
2. Fragen und Ziele der Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Zellkultur.....	17
3.2. NMDA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten	18
3.3. Zytotoxizitätsmessung.....	18
3.4. Messung des Einflusses von NMDA und den verschiedenen NMDA-Rezeptor- Antagonisten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von NHEK.....	19
4. Ergebnisse	22
4.1. Zytotoxisches oder proliferatives Potenzial von NMDA und den verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei NHEK	22
4.1.1. Ouabain	22
4.1.2. NMDA.....	23
4.1.3. MK-801	25
4.1.4. AP 5.....	27
4.1.5. D-Glutamat.....	28
4.2. Einfluss der verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von NHEK	30
4.2.1. MK-801	30

4.2.2. AP 5.....	32
4.2.3. D-Glutamat.....	34
5. Diskussion	36
5.1. Zytotoxisches Potenzial und Einfluss von NMDA und den verschiedenen NMDA- Rezeptor-Antagonisten auf die intrazelluläre keratinozytäre Calciumkonzentration	36
5.1.1. NMDA.....	36
5.1.2. MK-801	37
5.1.3. AP 5.....	44
5.1.4. D-Glutamat.....	47
6. Zusammenfassung	51
7. Literatur	53
8. Thesen der Arbeit	64
Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

AP 5	2-Amino-5-phosphonovalerat
AP 7	2-Amino-7-phosphonoheptanoat
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
ANOVA	Varianzanalyse (englisch: analysis of variance)
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
C	Celsius
C-	Carboxyl-
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CaR	Calcium Sensing Receptor
CGP 39653	(RS)-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentanoic acid
CGS 19755	(2RS, 4SR)-4-phosphonomethyl-2-piperidine carboxylic acid
CO ₂	Kohlendioxid
CPP	4-(3-phosphonopropyl)piperazine-2-carboxylic acid
D-	Dextro-
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (englisch: epidermal growth factor)
EDTA	Ethylendiamino-N, N, N', N'-tetraessigsäure
g	Gramm
G-	Guaninnucleotid-bindendes-
h	Stunde
HaCaT	Human adult low calcium high temperature
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IP ₃	Inositoltrisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
l	Liter
L-	Levo-
M	Molar
max.	maximal
Mg ²⁺	Magnesium
μ g	Mikrogramm
Min.	Minuten
MK-801	Dizocilpin
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
μ mol	Mikromol
μ M	Mikromolar
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm

NGF	Nerve Growth Factor
NHEK	Normale Humane Epidermale Keratinozyten
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
NR1	R1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (konstanter Bestandteil)
NR2	R2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (variabler Bestandteil)
NR3	R3-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (variabler Bestandteil)
N-	Amino-
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch: phosphate-buffered Saline)
PCP	Phencyclidin
pH	potentia Hydrogenii
POC	perfusion, open and closed cultivation
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRP-	Transient Receptor Potenzial-
TRPC	Transient Receptor Potenzial Channel
w. E.	willkürliche Einheiten
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Rezeptorgesteuerte Signalübertragung

Für das Überleben eines vielzelligen Organismus ist die Kommunikation der Zellen untereinander unablässlich. Nur durch den Informationsaustausch der Gewebe und Organe ist die Regulierung von Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel möglich.

Dabei spielen Rezeptoren eine zentrale Rolle. Ein *Rezeptor* ist ein Protein-Molekül oder ein Cluster aus Protein-Molekülen, an das ein Ligand an einer für ihn spezifischen Stelle bindet, wodurch der Rezeptor aktiviert und eine zelluläre Reaktion vermittelt wird [Mutschler et al. 2001; Humphrey 1997]. Rezeptorproteine können in der Zellmembran, im Zytosol oder im Zellkern lokalisiert sein [Lodish et al. 2001]. Bei den Liganden, die an sie binden, kann es sich beispielsweise um Hormone, Neurotransmitter oder Vitamine handeln. Die Art der Signaltransduktion und die ausgelöste Zellantwort ist je nach Rezeptortyp sehr unterschiedlich. Bei den membranständigen Rezeptoren kann man diesbezüglich drei Klassen unterscheiden [Mutschler et al. 2001]:

- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Durch Bindung des Liganden wird ein G-Protein aktiviert, welches entweder selbst direkten Einfluss auf die Öffnung von Ionenkanälen hat oder über Bildung eines second messengers wirkt [z.B. cAMP (cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat), IP₃ (Inositoltrisphosphat)]. Beispiele für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind Adrenalin- oder Serotonin-Rezeptoren.
- Liganden-gesteuerte Ionenkanäle oder Ionenkanalrezeptoren: Das Rezeptormolekül besitzt selber einen Ionenkanal, der durch Bindung des Liganden geöffnet wird. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist ein typischer Vertreter dieser Rezeptorgruppe.
- Enzym-assoziierte Rezeptoren: Rezeptoreigene zytosolische enzymatische Domänen oder an die Rezeptoren gekoppelte intrazelluläre Enzyme werden durch Bindung des Liganden aktiviert. Beispiele sind Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität wie der Insulinrezeptor.

Außer dem endogenen, physiologischen Liganden können andere, exogene Liganden wie Pharmaka mit dem Rezeptor interagieren. Dabei werden alle Stoffe, die an den Rezeptor binden und eine Signaltransduktion durch ihn stimulieren, als *Agonisten* bezeichnet. Substanzen, die zwar eine Bindung mit dem Rezeptor eingehen, aber dadurch keine Signalübertragung hervorrufen, werden *Antagonisten* genannt [Mutschler et al. 2001]. Ein wichtiges Maß zur Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten ist ihre *Affinität* zum

Rezeptor. Je höher die Affinität einer Substanz zum Rezeptor ist, desto größer ist ihr Bindungsbestreben zu diesem. Die Fähigkeit, nach der Bindung an einen Rezeptor eine Wirkung zu vermitteln, ist die *intrinsic activity* (der deutsche Begriff „Wirkaktivität“ hat sich nicht durchgesetzt). Ein Agonist muss also sowohl Affinität als auch *intrinsic activity* an einem Rezeptor besitzen. Anhand der Höhe der relativen *intrinsic activity* kann man *volle* und *partielle Agonisten* unterscheiden [Mutschler et al. 2001]. Volle Agonisten besitzen eine relative *intrinsic activity* von 1 und sind damit in der Lage, den im biologischen System maximal möglichen Effekt auszulösen, während Partialagonisten mit einer relativen *intrinsic activity* <1 (>0) nur einen Teil der Wirkung des vollen Agonisten erzielen. Sie besitzen also sowohl agonistische als auch antagonistische Fähigkeiten. Bei Anwesenheit eines vollen Agonisten in ausreichender Konzentration, schwächt der Partialagonist dessen Wirkung ab, wirkt also bezogen auf das biologische System teilweise antagonistisch. In Abwesenheit eines vollen Agonisten oder bei niedrigeren Konzentrationen desselben wirkt der Partialagonist hingegen agonistisch.

Bei den Antagonisten kann man *kompetitive* von *nicht-kompetitiven* Antagonisten unterscheiden. Erstere konkurrieren mit dem Agonisten um die gleiche Bindungsstelle, besitzen also eine Affinität zum Rezeptor. Sie können aber selber den Rezeptor nicht aktivieren, besitzen also keine *intrinsic activity*. Nicht-kompetitive Antagonisten interagieren dagegen mit einer anderen Stelle des Rezeptors als der Agonist. Sie verlegen beispielsweise den Ionenkanal des Rezeptors oder erschweren über eine Konformationsänderung der Agonisten-Bindungsstelle dessen Bindung an den Rezeptor [Klinke 2005; Mutschler et al. 2001].

Mit Hilfe der Rezeptorforschung können physiologische und pathophysiologische Vorgänge in Organen und Organsystemen verstanden werden. Die Rezeptoren werden so auch zu einem zentralen Angriffspunkt der pharmakologischen Forschung. Die Selektivität, mit der Agonisten und Antagonisten an einen bestimmten Rezeptor binden, macht sie interessant für die Entwicklung von Medikamenten. Durch die Entwicklung von Hormon- oder Transmitteranaloga, aber auch durch die Neuentwicklung synthetischer Agonisten und Antagonisten können gezielt bestimmte Rezeptoren oder Rezeptorsubtypen in ihrer Aktivität beeinflusst werden [Black 1998].

In den letzten zwanzig Jahren hat sich auch die dermatologische Forschung verstärkt der Identifizierung sowie der Funktions- und Bedeutungsanalyse von Rezeptoren in der Epidermis zugewandt, die ein reiches Netzwerk aus Rezeptoren verschiedener Art besitzt:

Rezeptoren für Zytokine [Ansel et al. 1990], Wachstumsfaktoren [Hashimoto 2000], Vitamine [Zouboulis 2000], Hormone [Zouboulis 2000], Neuropeptide und Neurotransmitter [Pincelli, Marconi 2000, Song et al. 2000, Schallreuter 1997, Pullar et al. 2006]. Die Liganden wie Hormone oder Neurotransmitter entstammen dabei einerseits aus anderen Organsystemen und gelangen über das Nerven- oder Blutsystem in die Epidermis. Andererseits besitzt die Haut und insbesondere die Epidermis als autonomes Organ selber viele Selbstregulierungsmechanismen mit eigener Produktion von Liganden, die autokrin oder parakrin wirken. Wichtige Vertreter von Liganden, welche auf Keratinozyten wirken, bzw. von ihnen produziert werden, sind z.B. IGF-1 (Insulin-like growth factor 1; Förderung der keratinozytären Proliferation), α -MSH (α -Melanozyten-stimulierendes Hormon; Stimulation von Zellproliferation und Histamin-Ausschüttung bei Keratinozyten, Modulation der keratinozytären Zytokinproduktion), Glukokortikoide (keratinozytäre Differenzierung), Vitamin D (antiproliferative, antiinflammatorische, und differenzierungsfördernde Wirkung auf Keratinozyten), Retinoide (antiproliferativ, differenzierungsfördernd) und TNF α (Tumornekrosefaktor α ; proinflammatorisch, Apoptose-induzierend) [Aufiero et al. 2007, Zouboulis 2000, Xie et al. 2002]. In letzter Zeit wurde das Augenmerk der epidermalen Rezeptorforschung verstärkt auf *neurogene Rezeptoren* gelenkt, also Rezeptoren, die vorwiegend im Nervensystem vorkommen oder hier zuerst beschrieben wurden und an denen Neurotransmitter oder Neuropeptide als Liganden fungieren.

1.2. Neurogene Rezeptoren der Epidermis

In der aktuellen Literatur werden eine Reihe neurogener Rezeptoren bei Keratinozyten beschrieben wie muskarinische und nikotinische Acetylcholinrezeptoren [Grando et al. 2006], α - und β -Adrenozeptoren [Grando et al. 2006], Neurokininrezeptoren [Song et al. 2000] und NGF-Rezeptoren (Nerve growth factor-Rezeptoren) [Pincelli, Marconi 2000]. Ihre Funktionen und Wirkmechanismen sind vielfältig. Über eine Regulierung der intrazellulären Calciumkonzentration üben viele vermutlich einen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten aus. Einen weiteren Vertreter neurogener Rezeptoren in der Epidermis stellt die Familie der Glutamatrezeptoren dar, welche zunehmend in der experimentellen Dermatologie untersucht werden [Morhenn et al. 1994, Morhenn et al. 2004, Nahm et al. 2004, Fuziwara et al. 2003, Fischer et al. 2004 a +b, Fischer et al. 2006].

1.3. Glutamatrezeptoren

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem (ZNS). Etwa 50% der Neuronen besitzen Glutamatrezeptoren, mit der größten Dichte im Telenzephalon und Hippocampus [Klinke 2005]. Daneben kommen Glutamatrezeptoren aber auch im peripheren Nervensystem sowie in nicht-neuronalen Geweben vor, z.B. in den Inselzellen des Pankreas, Osteoblasten, Osteoklasten, Megakaryozyten und Keratinozyten [Skerry, Genever 2001].

1.3.1. Allgemeiner Aufbau und Funktion von Glutamatrezeptoren

Es können zwei Klassen von Glutamatrezeptoren unterschieden werden: ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren (Abbildung 1) [Kew, Kemp 2005].

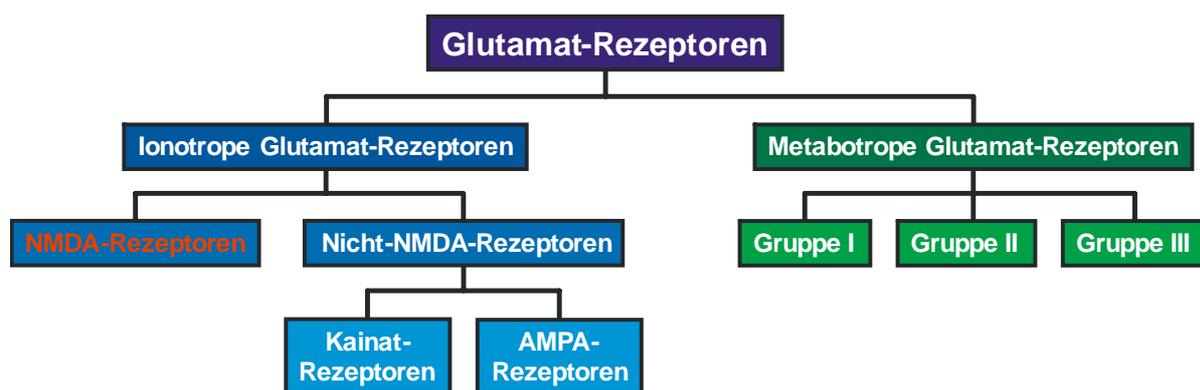


Abbildung 1: Subtypen der Glutamatrezeptoren

Metabotrope Glutamatrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über die Aktivierung von second messengern (IP_3) Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum freisetzen oder auch direkt über die G-Proteine Ionenkanäle öffnen können [Kew, Kemp 2005; Skerry, Genever 2001]. Die metabotropen Glutamatrezeptoren wurden erst 1991 identifiziert [Masu et al. 1991, Houamed et al. 1991], über sie ist daher bislang wenig bekannt. Ihnen wird eine eher regulierende Rolle im Nervensystem zugesprochen.

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte nicht-selektive Kationenkanäle. Sie vermitteln einen Natrium- und Calcium-Einstrom vom Extrazellularraum in die Zelle. Es handelt sich um Tetra- oder Pentamere, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen. Der

N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Dazwischen liegen drei transmembranöse Domänen (M1, M3, M4), sowie eine auf der zytoplasmatischen Seite gelegene, in die Membran eintretende, aber sie nicht durchquerende Schleife (M2) [Dingledine et al. 1999]. Diese Schleife stellt die Ionenkanal-formierende Domäne dar [Kew, Kemp 2005]. Die Liganden-Bindungsstelle wird von Polypeptiden des N-Terminus (S1-Region) und Polypeptiden der extrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 (S2-Region) gebildet [Mayer, Armstrong 2004; Armstrong et al. 1998] (Abbildung 2). Die ionotropen Glutamaterezeptoren werden nach den ursprünglich an ihnen als selektive Agonisten identifizierten Stoffen in drei Gruppen eingeteilt: AMPA- (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat), Kainat- (2-Carboxy-3-Carboxymethyl-4-Isopropenylpyrrolidin) und NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren (Abbildung 1).

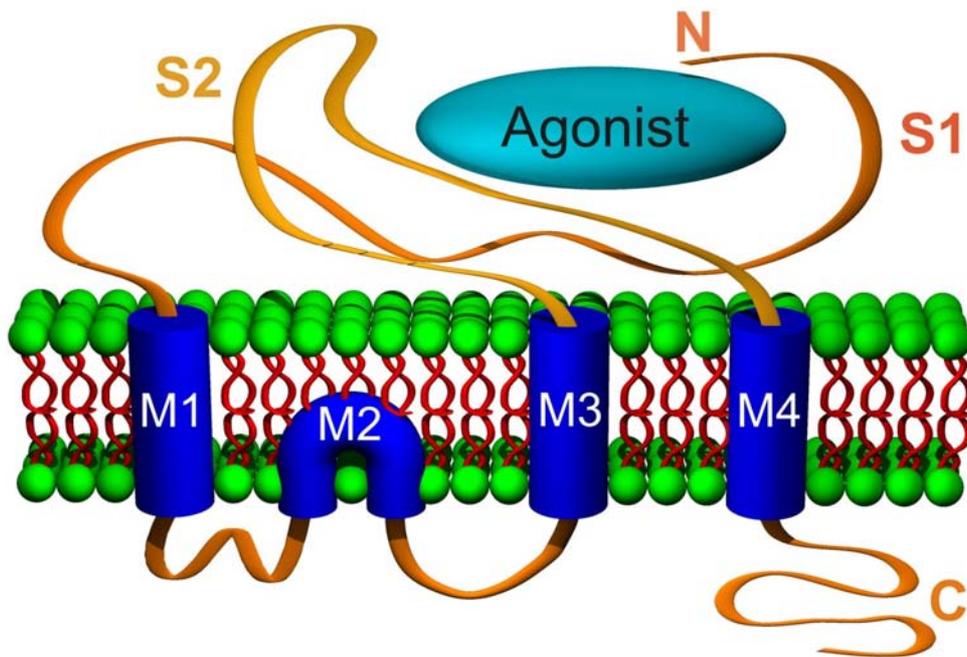


Abbildung 2: Schematischer Aufbau ionotroper Glutamaterezeptoren

1.3.2. Aufbau und Funktion des NMDA-Rezeptors

NMDA-Rezeptoren sind heteromere Komplexe, also aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Rezeptoren. Es existieren drei Klassen von Untereinheiten (NR1, NR2, NR3), die wiederum mehrere Varianten umfassen (NR2 A-D, NR3 A und B) [Kew, Kemp 2005] (Abbildung 3). Funktionelle NMDA-Rezeptoren bestehen dabei aus NR1 und mindestens einer Variante von NR2 [Kutsuwada et al. 1992; Monyer et al. 1992], zusätzlich dazu kann noch NR3 beteiligt sein [Sun et al. 1998; Kew, Kemp 2005]. Bei einem

funktionierenden Rezeptormolekül handelt es sich mindestens um ein Tetramer, also ein aus vier Untereinheiten bestehendes Molekül. Dieses setzt sich meist aus zwei NR1-Untereinheiten und zwei NR2-Untereinheiten zusammen, ggf. kann eine NR2- durch eine NR3-Untereinheit ausgetauscht werden, oder es kann zusätzlich noch eine NR2- oder NR3-Untereinheit hinzukommen, so dass es sich dann um ein Pentamer handelt [Al-Hallaq et al. 2002; Kew, Kemp 2005]. Die Art der Kombination der verschiedenen Untereinheiten ist je nach Ort und Zeit unterschiedlich [Al-Hallaq et al. 2002]. So sind beispielsweise NR2A und NR2B vorrangig im Vorderhirn, NR2C im Kleinhirn und NR2D v.a. im Mittelhirn und Diencephalon lokalisiert [Monyer et al. 1992, 1994; Kutsuwada et al. 1992; Ishii et al. 1993; Rigby et al. 1996]. NR3A und NR2C werden v.a. während der Hirnentwicklung exprimiert [Kew, Kemp 2005]. Die unterschiedlichen NR2- und NR3-Subtypen in einem Rezeptorkomplex bilden die Basis für die funktionellen Unterschiede der Rezeptoren. So sind die verschiedenen NR2-Untereinheiten für Differenzen in der Affinität und Effektivität von Agonisten und Antagonisten sowie der Sensitivität für die Magnesium-Blockade (s.u.) verantwortlich [Ishii et al. 1993]. Rezeptoren mit einer NR3-Untereinheit haben eine geringere Calcium-Permeabilität [Kew, Kemp 2005].

Die Funktion von NMDA-Rezeptoren ist am besten im ZNS untersucht. Über eine Beeinflussung der synaptischen Plastizität sind NMDA-Rezeptoren an höheren Prozessen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt [Asztély, Gustafsson 1996; Maren, Baudry 1995]. Weiterhin kann der NMDA-Rezeptor durch übermäßige Stimulation, z.B. während einer Ischämie bei einem Schlaganfall, zu Nervenschädigungen führen (Exzitotoxizität) [Meldrum, Garthwaite 1990; Doble 1999]. Auch an neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer sind NMDA-Rezeptoren vermutlich beteiligt [Doble 1999].

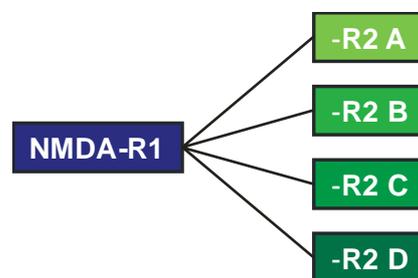


Abbildung 3: Komponenten des NMDA-Rezeptors

1.3.3. Agonisten am NMDA-Rezeptor

Neben dem namensgebenden NMDA, einem synthetischen Analogon von Aspartat, binden auch das physiologisch im Nervensystem vorkommende L-Aspartat und L-Glutamat als

Agonisten an den NMDA-Rezeptor [Dingledine et al. 1999; McBain, Mayer 1994]. Die S1- und S2-Region bilden eine Art Bindungstasche für diese Agonisten (Abbildung 2) [Mayer, Armstrong 2004]. Ihre Bindung bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls und dadurch eine Öffnung des Ionenkanals [Mayer, Armstrong 2004]. Durch ihn gelangen Calcium- und Natrium-Ionen vom Extra- in den Intrazellularraum und umgekehrt Kalium-Ionen vom Intra- in den Extrazellularraum. Die Bindungsstelle für Glutamat, NMDA und Aspartat ist auf der NR2-Untereinheit lokalisiert (Abbildung 4) [Laube et al. 1997; Anson et al. 1998].

Zu seiner Aktivierung benötigt der NMDA-Rezeptor neben einem Agonisten an der Glutamat-Bindungsstelle noch Glycin. Dabei hat offenbar Glutamat die maßgebende Neurotransmitter-Rolle, da es aktivitätsabhängig von den präsynaptischen Endigungen ausgeschüttet wird, während Glycin mit einer konstanteren Konzentration im synaptischen Spalt vorhanden ist und also mehr modulierend wirkt [Johnson, Ascher 1987; Kemp, Leeson 1993]. Für einen funktionellen NMDA-Rezeptor werden zwei Glutamat- und zwei Glycin-Bindungsstellen benötigt [Benveniste, Mayer 1991; Priestley, Kemp 1994]. Die Glycin-Bindungsstelle ist dabei im Gegensatz zur Glutamat-Bindungsstelle auf der NR1-Untereinheit lokalisiert (Abbildung 4) [Hirai et al. 1996; Kuryatov et al. 1994]. Ein NMDA-Rezeptor besteht also wie oben genannt in der Regel aus zwei NR1- und zwei NR2-Untereinheiten.

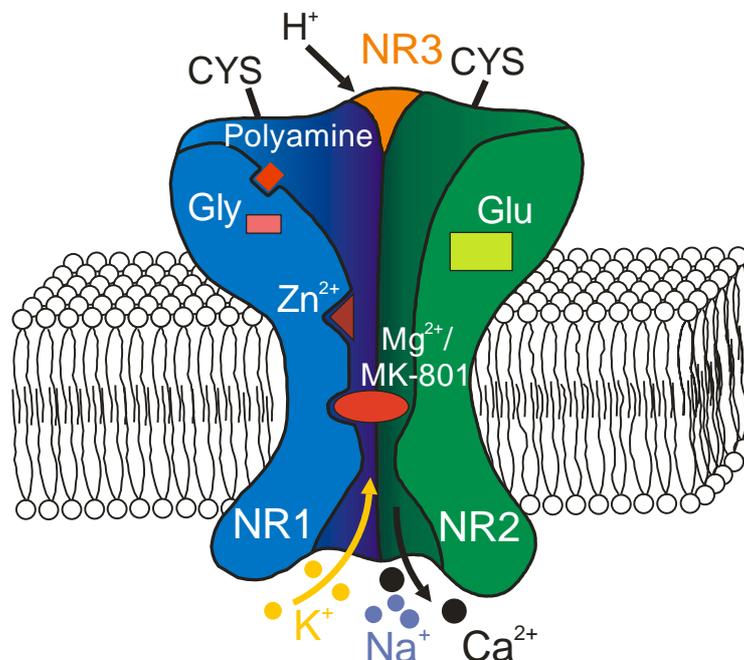


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptors (nach [Kemp, Kew 1998])

1.3.4. Antagonisten am NMDA-Rezeptor

Mit seiner komplexen Struktur bietet der NMDA-Rezeptor mehrere Angriffspunkte für verschiedene Antagonisten. Die Glutamat- und Glycin-Bindungsstellen sind Ziele kompetitiver Antagonisten. Der Ionenkanal kann durch nicht-kompetitive Antagonisten verlegt werden. Darüberhinaus besitzt der NMDA-Rezeptor mehrere Stellen, an denen endogene und exogene Modulatoren angreifen. So kann neben dem oben genannten spannungsabhängigen Block durch Magnesium auch eine Blockierung durch Zink erfolgen [Peters et al. 1987; Westbrook, Mayer 1987; Christine, Choi 1990]. Weiterhin können Protonen [Tang et al. 1990], Polyamine [Rock, Macdonald 1995] sowie die Reduktion und Oxidation extrazellulärer Cystein-Reste [Aizenman et al. 1989] einen Einfluss auf die NMDA-Rezeptor-Aktivität haben (Abbildung 4).

Die bestuntersuchten nicht-kompetitiven Antagonisten sind die dissoziativen Anästhetika Ketamin, Phencyclidin (PCP) und Dizocilpin (MK-801). Es handelt sich um Ionenkanal-Blocker, welche alle an derselben Stelle im Kanal binden [Hiramatsu et al. 1989; Kemp, Kew 1998]. Am etabliertesten und am meisten verwendet in der neurologischen Forschung ist dabei MK-801. MK-801 hat eine hohe Affinität zum NMDA-Rezeptor, was mit einer hohen antagonistischen Potenz korreliert [Wong et al. 1986, Woodruff et al. 1987]. In verschiedenen Studien zeigte sich MK-801 zwei- bis zehnmals bzw. 20-40mal wirksamer als PCP [Koek et al. 1988, Hiramatsu et al. 1989]. Eine vollständige Unterdrückung der NMDA-Antwort durch MK-801 bei neuronalen Zellen ist schon bei niedrigen Konzentrationen (75 nM) möglich [Wong et al. 1986]. Die Blockade von MK-801 ist nutzungsabhängig, d.h. MK-801 bindet an durch Glutamat oder andere Agonisten aktivierte, also offene Rezeptoren, was damit erklärt werden kann, dass MK-801 nur bei offenem Ionenkanal an seine Bindungsstelle im Kanal gelangen kann [Wong et al. 1986; Huettner, Bean 1988; MacDonald et al. 1991; Foster, Wong 1987; Halliwell et al. 1989, Woodruff et al. 1987]. Auch die Aufhebung der Blockade ist wiederum von der Anwesenheit von Agonisten abhängig, da nur bei offenem Kanal eine Dissoziation von der Bindungsstelle im Kanal möglich ist [Huettner, Bean 1988; Halliwell et al. 1989]. Ein weiteres Merkmal von MK-801 ist, dass die Lösung der MK-801-vermittelten Blockade spannungsabhängig ist [Huettner, Bean 1988; MacDonald et al. 1991, Halliwell et al. 1989]. Bei positiven Membranpotenzialen löst sich MK-801 schneller von seiner Bindungsstelle im Kanal. Während zunächst angenommen wurde, dass dies mit der positiven Ladung von MK-801 zusammenhängt [Huettner, Bean 1988], wurde später festgestellt, dass die Spannungsabhängigkeit nicht mit der Ladung der Kanal-Blocker korreliert und es wurde postuliert, dass der bei positiven Potenzialen vorliegende zellauswärts gerichtete

Kationenstrom MK-801 von seiner Bindungsstelle löst [MacDonald et al. 1991]. MK-801 ist bei Neuronen an Glutamatrezeptoren sehr selektiv und wirkt hier nur an NMDA-Rezeptoren [Wong et al. 1986].

Die Nutzungsabhängigkeit von MK-801 und anderen Ionenkanalblockern bietet einen möglichen therapeutischen Vorteil. Indem aktive Rezeptoren geblockt werden, während ruhende Rezeptoren unbeeinflusst bleiben, könnte ein guter neuroprotektiver Effekt mit nur geringen Nebenwirkungen erzielt werden. Dem gegenüber steht jedoch die hohe Affinität der NMDA-Ionenkanalblocker, welche eine geringe Reversibilität der Blockung und somit Nebenwirkungen zur Folge hat [Kemp, Kew 1998].

Die Grundlage für eine Großzahl kompetitiver Antagonisten an der Glutamatbindungsstelle bilden die Beginn der 1980er Jahre von Watkins und Mitarbeitern entwickelten D-Aminosäure- ω -Phosphonsäure-Analoga von Glutamat, D-2-Amino-5-phosphonovalerat (D-AP 5) und D-2-Amino-7-phosphonoheptanoat (D-AP 7). Es handelt sich hierbei um Phosphono-Derivate kurzkettiger Aminosäuren mit polarer Struktur [Kemp, Kew 1998; Dingledine et al. 1999]. Diese macht das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke schwer, ist aber offenbar Voraussetzung für die hohe Affinität der Antagonisten zum NMDA-Rezeptor [Kew, Kemp 2005; Jane et al. 1995]. In der Regel besitzen diese Antagonisten keine ausgeprägte NMDA-Rezeptor-Subtypen-Selektivität. AP 5 ist ein hochpotenter und selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonist [Davies et al. 1981; Evans et al. 1982; Evans, Watkins, 1981] und gehört heute in der experimentellen Neurologie nach wie vor zu den am häufigsten eingesetzten Vertretern dieser Gruppe [Jafari-Sabet 2006; Blaise et al. 2005; Baunez, Amalric 1996]. Es existieren zwei optische Isomere von AP 5: D- und L-AP 5. Von diesen besitzt D-AP 5 die höhere antagonistische Potenz [Davies, Watkins 1982]. Hohe Konzentrationen scheinen auch eine antagonistische Wirkung an einer Subpopulation von Quisqualat-Rezeptoren zu haben, wobei die L-Form hier stärker wirksam ist [Raigorodsky, Urca 1990]. Einzelne Berichte über NMDA-Rezeptor-agonistische Effekte von AP 5 bei in vivo-Untersuchungen existieren [Hara et al. 1997; Carrozza et al. 1992]. Klinische Studien kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonisten mussten bisher wegen der starken Nebenwirkungen abgebrochen werden [Kemp, Kew 1998].

In jüngerer Zeit wurde das Augenmerk verstärkt auf die Entwicklung atypischer nicht-kompetitiver Antagonisten mit einer Selektivität für bestimmte NMDA-Rezeptor-Subtypen gelegt. Zu nennen sind hier das Phenylethanolamin Ifenprodil und seine neueren Analoga [Reynolds, Miller 1989; Fischer et al. 1997]. Der Wirkmechanismus ist nicht vollständig geklärt, vermutlich bindet es nahe der Polyamin-Bindungsstelle bzw. überlappend mit dieser

[Kemp, Kew 1998]. Ein weiterer Vorteil neben der Subtypselektivität ist wie bei MK-801 die nutzungsabhängige Aktivität dieser Antagonisten, welche zur Minderung eventueller Nebenwirkungen beitragen kann.

1.4. NMDA-Rezeptoren in der Haut

Über NMDA-Rezeptoren in der Haut ist bislang noch wenig bekannt. Man kann unterscheiden zwischen NMDA-Rezeptoren im Nervensystem der Haut und NMDA-Rezeptoren an nicht-neuronalen Zellen der Haut. Erstere sind bisher genauer untersucht. So wurden z.B. an unmyelinisierten Axonen der epidermo-dermalen Junctionszone NMDA-Rezeptoren gefunden [Davidson et al. 1997; Kinkelin et al. 2000]. Diese sind an der Modulation der Nozizeption und der mechanischen und thermischen Sensitivität beteiligt [Davidson et al. 1997; Du et al. 2003]. Auch Merkel-Zellen der Epidermis übertragen mechano-elektrische Signale an in der Epidermis lokalisierte Nervenendigungen über einen Glutamat-medierten Mechanismus [Fagan, Cahusac 2001].

1.4.1. NMDA-Rezeptoren bei Keratinozyten - Verteilung, Funktion und Bedeutung

1994 wurde von Morhenn et al. erstmals ein NMDA-Rezeptor an Keratinozyten nachgewiesen [Morhenn et al. 1994 (NMDAR1-mRNA in humanen Keratinozyten)]. Seitdem sind NMDA-Rezeptoren von Keratinozyten zunehmend in den Fokus der experimentellen dermatologischen Forschung gerückt. Die Existenz von NMDA-Rezeptoren bei Keratinozyten konnte von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden [Genever et al. 1999 (NMDAR1-, NMDAR2A/B-Protein in Rattenkeratinozyten); Fischer et al. 2004a; Morhenn et al. 2004; Nahm et al. 2004 (jeweils NMDAR1-Protein in humanen Keratinozyten)]. Als epidermaler NMDA-Rezeptor-Subtyp in humanen Keratinozyten wurde kürzlich NMDAR2D identifiziert, was mit bestimmten Eigenschaften des keratinozytären NMDA-Rezeptors wie Agonisten- und Antagonisten-Affinität sowie Ausmaß der Blockung durch Magnesium-Ionen verknüpft sein kann [Fischer et al. 2006]. Als Hinweis auf die Funktionalität und Relevanz der NMDA-Rezeptoren wurden zusätzlich verschiedene Glutamattransporter in Keratinozyten gefunden [Genever et al. 1999].

Über die Verteilung der NMDA-Rezeptoren innerhalb der Epidermis existieren unterschiedliche Ergebnisse. Fischer et al. konnten in menschlicher gesunder Haut die größte Dichte der NMDA-Rezeptoren im Stratum granulosum messen [Fischer et al. 2004a, 2004b].

In einer anderen Studie von Genever et al. wurden dagegen NMDA-Rezeptoren in neonataler und adulter Rattenhaut nur im Stratum basale nachgewiesen [Genever et al. 1999]. Nahm et al. stellten NMDA-Rezeptoren in der gesamten menschlichen Epidermis fest, mit Akkumulation im Stratum basale [Nahm et al. 2004]. In embryonaler Rattenhaut ist der NMDA-Rezeptor in der gesamten Epidermis gleich verteilt zu finden [Genever et al. 1999]. Die genannten Unterschiede sind vermutlich durch den verschiedenen Ursprung der Gewebe (Mensch, Ratte) sowie den unterschiedlichen Entwicklungsgrad der Keratinozyten (embryonal, neonatal, adult) bedingt [Fischer et al. 2004a, 2004b; Genever et al. 1999; Nahm et al. 2003]. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen von Fischer und Nahm könnte durch die kürzere Inkubationszeit des primären Antikörpers von 1h bei Nahm im Gegensatz zu 12h Fischer erklärt werden [Fischer et al. 2004a, 2004b; Nahm et al. 2003].

Auch bei Keratinozyten vermitteln NMDA-Rezeptoren eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration [Fischer et al. 2004a, Morhenn et al. 2004, Fuziwara et al. 2003, Nahm et al. 2004]. Bei normalen, aus neonataler humaner Vorhaut stammenden Keratinozyten kann durch Stimulation mit NMDA bei bis zu 100% der Zellen ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen werden (Nahm et al.: 100%, Fischer et al.: 95.5%), bei Human adult low calcium high temperature (HaCaT)-Keratinozyten, einer immortalisierten Keratinozytenzelllinie, ist der Anteil etwas geringer (84,6%) [Fischer 2004a; Nahm et al. 2004]. Ähnliche Zahlen wie bei den HaCaT-Zellen wurden auch bei Neuronen festgestellt (bis zu 86% reaktive Zellen bei Hippocampus-Neuronen in Kultur) [Takahashi et al. 2002]. Es existieren jedoch auch niedrigere Zahlen bei Fuziwara et al. (31% reaktive Zellen; humane Keratinozyten unklaren Ursprungs) und Morhenn et al. (40% reaktive Zellen; humane Keratinozyten in Suspension, Stimulation mit Glutamat).

Dass Calcium eine bedeutende Rolle bei der Regulierung von Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten spielt, ist seit längerem bekannt [Hennings et al. 1980]. Dabei wurde das Augenmerk bisher vor allem auf die Verknüpfung von extra- und intrazellulärer Calciumkonzentration gerichtet. Es wurde festgestellt, dass die Anhebung der extrazellulären Calciumkonzentration über 0,1mM den Differenzierungsprozess induziert und die Proliferation hemmt [Hennings et al. 1980; Hennings, Holbrook 1983; Eckert 1989]. Dies wird vermittelt über eine der extrazellulären Calciumkonzentrationserhöhung folgende Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration, die für die Induktion der Expression von Differenzierungsmarker-Genen sorgt (z.B. für Filaggrin und Transglutaminase). Für die Vermittlung zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Calciumkonzentrationsanstieg wurde der Calcium Sensing Receptor (CaR) als wichtiges Signalprotein identifiziert [Oda et

al. 1998; Bikle et al. 1996; Tu et al. 2001]. Der CaR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der über die Aktivierung von Phospholipase C und Inositoltrisphosphat (IP3) mit Bindung von IP3 am IP3-Rezeptor intrazellulärer Calciumspeicher schließlich eine Calciumfreisetzung aus diesen Speichern induziert, welche wiederum, wie oben genannt, einen transmembranösen Calciuminflux aus dem Extrazellularraum triggert [Chattopadhyay et al. 1996; Hebert, Brown 1995].

Dass die Calciumkonzentration einen Einfluss auf die Differenzierung hat, wird gestützt durch die Existenz eines intrazellulären intraepidermalen Calciumgradienten mit höchsten Werten im Stratum granulosum [Elias et al. 1998; Menon et al. 1985]. Dieser Gradient deckt sich ebenfalls mit der von Fischer festgestellten höchsten Dichte der NMDA-Rezeptoren im Stratum granulosum [Fischer et al. 2004a].

In den letzten Jahren konnte die Annahme, dass eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors die Differenzierung der Keratinozyten fördert, in einigen Studien erhärtet werden. So wurde gezeigt, dass der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 die Verhornung und die Expression der Differenzierungsmarker Filaggrin und Cytokeratin 10 hemmt [Fischer et al. 2004a + b]. Mit MK-801 behandelte Keratinozyten in Kultur zeigen weiterhin morphologisch eine Hemmung der Differenzierung [Fischer et al. 2004a; Morhenn et al. 2004]. Bezüglich des Einflusses von NMDA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation sind die Ergebnisse sehr heterogen. Es gibt Hinweise darauf, dass NMDA keinen Einfluss auf die Keratinozyten-Proliferation hat [Fischer et al. 2004a], aber auch dafür, dass NMDA die Proliferation hemmt [Nahm et al. 2004] oder die (Hyper-) Proliferation steigert [Fujiwara 2003], ebenso wie dafür, dass MK-801 die Proliferation inhibiert [Genever et al. 1999, Morhenn et al. 2004]. Insgesamt überwiegen jedoch eher Daten, die dafür sprechen, dass NMDA die Proliferation hemmt bzw. keinen Einfluss auf die Proliferation hat. Auch auf die Wundheilung und die Wiederherstellung der Hautbarriere nach deren Schädigung scheint der NMDA-Rezeptor einen Einfluss zu haben. Die Daten sprechen dabei bisher eher für eine hemmende Wirkung von NMDA auf diese Prozesse [Nahm et al. 2004; Fujiwara et al. 2003].

Über seinen Einfluss auf die epidermale Calciumhomöostase ist der NMDA-Rezeptor offenbar in viele physiologische Prozesse der Haut wie Differenzierung, Proliferation, Wundheilung und Barrierehomöostase miteinbezogen und wird damit auch zu einer möglichen Ursache pathophysiologischer Vorgänge mit der Möglichkeit deren pharmakologischer Beeinflussung. Es existieren erste Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren bei Hauterkrankungen, die mit einer

Parakeratose einhergehen. So sind Erkrankungen wie die Psoriasis vulgaris von einem Verlust des Stratum granulosum und damit auch von NMDA-Rezeptoren gekennzeichnet. Die bei der Psoriasis bekannte gestörte Calciumhomöostase mit fehlendem intraepidermalem Calciumgradienten könnte daher mit dem Fehlen der NMDA-Rezeptoren zusammenhängen und für die parakeratotische Verhornung verantwortlich sein [Fischer et al. 2004b]. Auch bei anderen Erkrankungen, wie z.B. der atopischen Dermatitis oder Hautalterungsprozessen wird eine gestörte Calciumhomöostase vermutet [Forslind et al. 1999], so dass auch hier ein Zusammenhang mit NMDA-Rezeptoren denkbar wäre.

1.4.2. Antagonisten an keratinozytären NMDA-Rezeptoren

Wie in der neurologischen Forschung wird auch in der experimentellen Dermatologie bisher der „Standard“-NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 verwendet. Morhenn et al. konnten erstmals 1994 eine Bindung von MK-801 an Keratinozyten nachweisen. Später konnte gezeigt werden, dass MK-801 in der Lage ist, den NMDA-induzierten Calciumeinstrom in Keratinozyten zu hemmen [Nahm 2004] und dass auch bezüglich Proliferation und Differenzierung eine NMDA-antagonistische Wirkung von MK-801 bei Keratinozyten verzeichnet werden kann [Fuziwara 2003, Morhenn 2004, Fischer 2004 a +b]. Insgesamt scheint MK-801 jedoch bei Keratinozyten im Vergleich zu Nervenzellen eine schwächere antagonistische Wirkung zu haben. So wurde von Morhenn et al. anhand von Sättigungskurven eine geringere Bindungsaffinität von MK-801 bei Keratinozyten im Vergleich zu Neuronen nachgewiesen [Morhenn 1994]. Es gibt jedoch auch im Gehirn Hinweise auf eine MK-801-Bindungsstelle mit niedriger Affinität, welche der Bindungsstelle bei Keratinozyten entsprechen könnte [Kornhuber et al. 1989]. Weiterhin wurde gezeigt, dass MK-801 bei Keratinozyten in Suspension nicht, wie zu erwarten, den Calciuminflux hemmt, sondern im Gegenteil selber zu einem Calciumeinstrom führt, der sogar stärker ist als der durch Glutamat induzierte (95% reaktive Zellen versus 40% reaktive Zellen) [Morhenn et al. 2004].

Bezüglich der Hemmung des NMDA-induzierten Calciumeinstroms bei konfluenten Keratinozyten in Kultur gibt es Daten, die auf eine eher schwächere NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung von MK-801 bei Keratinozyten hinweisen. Fischer et al. konnten zeigen, dass MK-801 in üblichen Konzentrationen (100µM) bei normalen neonatalen humanen Keratinozyten zwar den NMDA-induzierten Calciuminflux signifikant hemmt, 44,4% der Zellen von MK-801 jedoch unbeeinflusst bleiben und eine NMDA-vermittelte Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration aufweisen [Fischer et al. 2004a]. Bei

HaCaT-Zellen scheint MK-801 eine höhere Potenz zu besitzen. Die gleiche MK-801-Konzentration hemmt hier bei einem höheren Zellanteil den Calciuminflux als bei normalen Keratinozyten, es bleiben aber auch hier 23,1% der Zellen noch reaktiv, was jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle darstellt [Fischer et al. 2004a]. Um eine fast komplette Inhibition des NMDA-vermittelten Calciumeinstroms zu erzielen, benötigt man bei HaCaT-Zellen eine MK-801-Konzentration von 300µM (5,3% reaktive Zellen) [Fischer et al. 2004a]. Ab Konzentrationen von 200µM wurde jedoch ein zytotoxisches Potenzial für MK-801 nach 24-stündiger Inkubation der Keratinozyten (HaCaT) beschrieben [Fischer et al. 2004a]. Auch bei normalen neonatalen humanen Keratinozyten wurde eine zytotoxische Wirkung nach 48-stündiger Behandlung mit MK-801 ab einer Konzentration von 50µM gezeigt [Fischer et al. 2004b].

In einem Versuch von Morhenn et al., in dem der Einfluss von NMDA und MK-801 auf die Keratinozyten-Morphologie verglichen wurde, konnte weiterhin ein ähnlicher und nicht ein gegensätzlicher Effekt beider Liganden (netzartiges Wachstum) festgestellt werden, was ebenfalls dafür spricht, dass MK-801 bei Keratinozyten anders wirkt als bei Nervenzellen [Morhenn et al. 1994].

Der bisher bei Keratinozyten am häufigsten verwendete und am besten untersuchte NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 scheint also aufgrund der aktuellen Datenlage als Antagonist bei Keratinozyten aufgrund seiner schwachen antagonistischen Potenz bzw. laut einer Studie sogar fraglichen agonistischen Eigenschaften sowie des möglichen zytotoxischen Potenzials für die experimentelle Dermatologie und ggf. auch für den möglichen pharmakologischen Einsatz nicht optimal zu sein. Über die Wirkung weiterer NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten gibt es nur wenige Daten. Der kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist AP 5 wurde bisher in zwei Studien eingesetzt, in denen er in Bezug auf die keratinozytäre Calciumkonzentration und Hautbarrierewiederherstellung eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung zeigte [Fuziwara et al. 2003, Nahm et al. 2004]. Weiterhin wurde in einer der beiden Studien auch D-Glutamat, aus der Neurologie eigentlich als unspezifischer NMDA-Rezeptor-Agonist bekannt, eingesetzt und zeigte hier in Bezug auf die Barrierefunktion der Haut eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Aktivität. Eine abschließende Bewertung der Wirksamkeit der verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten ist aufgrund der Datenlage aktuell nicht möglich. Diese Arbeit hat daher zum Ziel, die antagonistischen (und möglichen agonistischen) Eigenschaften der aus der Neurologie bekannten NMDA-Rezeptor-Liganden MK-801, D-Glutamat und AP 5 an Keratinozyten zu

untersuchen und zu vergleichen und so der Frage nachzugehen, ob es einen geeigneteren NMDA-Rezeptor-Antagonisten als MK-801 für Keratinozyten gibt.

2. Fragen und Ziele der Arbeit

Wie oben ausgeführt, gibt es Hinweise darauf, dass MK-801 am keratinozytären NMDA-Rezeptor nur schwach antagonistisch wirksam ist. Auch gibt es Untersuchungen, die für eine NMDA-Rezeptor-agonistische Wirkung sowie für ein zytotoxisches Potenzial von MK-801 bei Keratinozyten sprechen. Andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten sind bei Keratinozyten bisher kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen untersucht und beantwortet werden:

1. Besitzen die NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat bei Keratinozyten ein zytotoxisches Potenzial?
2. Haben die NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat auch bei Keratinozyten einen hemmenden Einfluss auf den NMDA-induzierten Calciumeinstrom? Besteht ggf. ein Unterschied in der antagonistischen Wirkstärke?
3. Beeinflussen die NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat selber die keratinozytäre Calciumkonzentration?

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Alle Untersuchungen wurden an normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) (PromoCell GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Dabei handelt es sich um Keratinozytenkulturen, welche aus normaler menschlicher Vorhaut stammen, die bei Operationen gewonnen wurde. Die Zellen sind nicht transformiert. Die Lebensdauer in vitro ist begrenzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C mit einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 90%. Als Kulturmedium wurde Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Katalog-Nr. C-20011) unter Verwendung eines Antibiotikum-Antimykotikum-Zusatzes verwendet. In dem so hergestellten Medium waren enthalten: Rinderhypophysenextrakt 0,004 ml/ml, Humaner rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor (*englisch* epidermal growth factor, EGF) 0,125 ng/ml, humanes rekombinantes Insulin 5,0 µg/ml, Hydrocortison 0,33 µg/ml, Transferrin 10,0 µg/ml, Epinephrin 0,39 µg/ml, CaCl₂ 0,15 mM, Phenol Rot 0,62 ng/ml, 50 µg/ml Gentamicin, 50 ng/ml Amphotericin B. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach etwa fünf Tagen Kultivierung wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt. Im Anschluss wurden die Zellen durch zehnmünütige Inkubation mit 2ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (*englisch* phosphate-buffered saline, PBS) und 0,05% Trypsin im Brutschrank vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Zur Inaktivierung der Trypsinaktivität wurden 2 ml Medium hinzugegeben. Durch wirbelndes Pipettieren wurde eine Zellvereinzlung erzielt. Für die Zellzahlbestimmung wurde das Gesamtvolumen der Suspension ermittelt, 100µl der Suspension in 1ml Thyrode-Eosinlösung gegeben, durchmischt und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Nach Auszählung und Addition von fünf Gruppenquadranten vitaler (farbloser) und avitaler (roter) Zellen wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Dazu wurde die Summe der gezählten Zellen mit 1000 (Kammerindex), mit 5 (Verdünnung) und mit dem Volumen (ml) der Gesamtsuspension multipliziert.

Für die Zytotoxizitätsmessungen wurden die Zellen in 96er Mikrotitrierplatten mit einer Dichte von 15000 Zellen pro 200µl je well eingesät. Für die Calciummessungen wurden die Zellen auf Deckgläser in Kulturschalen mit einer Einsaatdichte von 3×10^3 Zellen pro 5 ml Medium je Schale gegeben. Die Messungen wurden jeweils nach etwa drei Tagen an semikonfluenten bis konfluenten Zellen durchgeführt.

3.2. NMDA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Sowohl für die Zytotoxizitätsuntersuchungen als auch die Calciumkonzentrationsmessungen wurde N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. M3262) als NMDA-Rezeptor-Agonist verwendet.

Als NMDA-Rezeptor-Antagonisten wurden eingesetzt:

- Dizocilpin (MK-801) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. M107)
- DL-2-Amino-5-phosphonovalerat (AP 5) (Axxora Deutschland GmbH, Lörrach, Deutschland, Katalog-Nr. ALX-550-034)
- D-Glutamat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. G1001)

Weiterhin wurde als Positivkontrolle für die Zytotoxizitätsmessungen Ouabain Octahydrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; Katalog-Nr. O3125) verwendet.

3.3. Zytotoxizitätsmessung

Das zytotoxische Potenzial von NMDA, MK-801, AP-5 und D-Glutamat wurde mittels Kristallviolett-Methode bestimmt [Gillies et al. 1986]. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass sich bei adhären wachsenden Zellen abgestorbene Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösen und weggespült werden. Die verbleibenden vitalen Zellen werden mit Kristallviolett angefärbt, der Farbstoff in der Folge ausgewaschen und mit einem Absorptionsreader vermessen werden. Die gemessene Extinktion korreliert mit der Zahl vitaler Zellen.

Dazu wurden den mit semikonfluenten NHEK bestückten 96er Mikrotitrierplatten die genannten Substanzen mit folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

- NMDA, MK-801, D-Glutamat: 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M.
- AP 5: 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M.

Als Positivkontrolle für Zytotoxizität wurde Ouabain in einer Konzentration von 100 μ M verwendet. Außerdem wurde jeweils eine Negativkontrolle mit der Lösungssubstanz, in dem die jeweiligen Effektoren gelöst waren [HBS (HEPES buffered saline) oder PBS] mitgeführt. Jeweils acht wells einer Mikrotitrierplatte wurden mit derselben Konzentration des jeweiligen Effektors (NMDA, MK-801, AP 5, D-Glutamat) sowie der Positiv- und Negativkontrolle versehen. Im Anschluss wurden die Platten 24h bzw. 48h bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Medium-Überstand dekantiert und in jedes well wurden 100 μ l 100%-iges Methanol zur Fixierung der Zellen pipettiert. 20 Min.

später wurde das Methanol entfernt und die wells mit Leitungswasser gespült. Danach wurde 50µl 0,1%-ige Kristallviolettlösung [0,5 g Gentianaviolett (Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland, Bestell-Nr. 32674) gelöst in 10ml absolutem Ethanol, ad 500ml deionisiertes Wasser] in jedes well gegeben und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung entfernt und die wells wiederum mit Leitungswasser gespült. Nach Trocknen der wells wurde je well 100µl 0,1M Tri-Natrium-Citrat-Puffer hinzugegeben und nach 20 Min. am Absorptionsreader (Labsystems iEMS Reader MF, Helsinki, Finnland) die Extinktion bei 620 nm gemessen. Der Mittelwert der Extinktionen der Negativkontrolle wurde gleich 100% gesetzt und der Mittelwert der Extinktionen der behandelten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die statistische Auswertung wurde anhand Einwegvarianzanalyse (ANOVA) mit Dunnett`s Test durchgeführt.

3.4. Messung des Einflusses von NMDA und den verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von NHEK

Die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration der kultivierten Keratinozyten erfolgte mittels Messung Calcium-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop modifiziert nach Lipp und Niggli [Lipp, Niggli 1993], entsprechend Untersuchungen von Fischer et al. [Fischer et al. 2004a]. Dabei wurde die Calciumkonzentration nicht direkt, sondern indirekt über die relative Änderung der Fluoreszenz gemessen.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden semikonfluente NHEK auf Deckgläsern in 60mm-Kulturschalen verwendet (s. 3.1.). Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt, durch Fluoreszenzfarbstofflösung ersetzt und die Zellen 30 Min. bei 37°C darin inkubiert. Als Grundlage der Farbstofflösung wurde HBS (HEPES buffered saline) verwendet. HBS wurde in dreifach destilliertem Wasser hergestellt und enthielt Glucose 5mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, EDTA 0,2 mM, freies Ca²⁺ 1mM, freies Mg²⁺ 1mM und HEPES 5mM. Der pH-Wert lag bei 7,4 [Glaesser et al. 1984]. Auf den Zusatz von Glycin oder das Weglassen von Magnesium wurde verzichtet, da beide Modifikationen in Versuchen von Fischer et al. an HaCaT keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration aufwiesen [Fischer et al. 2004a]. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten Fluo-3 und Fura-Red (Zusammensetzung der Färbepufferlösung: Fura-Red 2µmol/l, Fluo-3 1µmol/l, Pluronic µl/l (20% in DMSO) in HBS). Nach der 30-minütigen Inkubation in der genannten Farbstofflösung wurde diese

entfernt und gegen reines HBS ausgetauscht, worin nochmals eine Inkubation bei 37°C über 30 Min. erfolgte. Im Anschluss wurden die mit den Keratinozyten beschichteten Deckgläser aus den Kulturschalen genommen, in die POC-Kammer (perfusion, open and closed cultivation) des Laser Scanning Mikroskopes eingespannt und mit 1ml HBS überschichtet. An den so vorbereiteten Zellen erfolgten nun die Calciumkonzentrationsmessungen. Die Messungen erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von insgesamt 20 Min., wobei alle 10 Sekunden eine Messung erfolgte. Zunächst wurde die spontane Schwankung der intrazellulären Calciumkonzentration über 20 Min. ohne Zugabe von Effektoren gemessen und die prozentuale dreifache Standardabweichung des Durchschnitts der intrazellulären Calciumkonzentration berechnet, welche 18,2% betrug. Daraufhin wurde für die übrigen Messungen ein Anstieg der Calciumkonzentration um mehr als 18% des Ausgangswertes als positive Reaktion definiert. Im Anschluss erfolgten die Messungen des Einflusses der jeweiligen Effektoren auf die Calciumkonzentration. Dabei wurde zu Beginn jeder Messung zunächst ein individueller Ausgangswert für jede Zelle bestimmt, der sich aus dem Mittelwert dreier Messungen vor Zugabe des Effektors berechnete. Dieser Mittelwert wurde gleich 100% gesetzt und alle weiteren Messwerte nach Zugabe der jeweiligen Effektoren dazu in Relation gesetzt. Die absolute Zahl der reaktiven Zellen, d.h. Zellen mit einem Calciumkonzentrationsanstieg > 18% des Ausgangswertes, wurde mit der absoluten Zahl der nicht reaktiven Zellen während des gesamten Beobachtungszeitraums verglichen. Zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede wurde Fisher's exakter Test verwendet. Es wurden dabei nach den genannten Leerwert-Messungen jeweils die folgenden NMDA-Rezeptor-Antagonisten mit folgenden Endkonzentrationen in die POC-Kammer gegeben:

- MK-801: 10µM, 50µM, 100µM, 200µM.
- D-Glutamat: 10µM, 50µM, 100µM, 200µM.
- AP 5: 0,1 µM, 1µM, 10µM, 50µM, 100µM, 200µM.

Die Calciumkonzentrationen wurden nun wie oben genannt über 10 Min. im Abstand von 10 Sekunden gemessen. Im Anschluss daran wurde jeweils NMDA (50µM) zu den jeweiligen Antagonisten hinzugegeben und es wurde über weitere 10 Min. die Calciumkonzentration in 10-sekündigen Abständen erfasst.

Zusätzlich wurde der Einfluss von NMDA (50µM) allein auf die Calciumkonzentration über 20 Min. ermittelt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica DM IRE2, Leica, Bensheim, Deutschland) mit einem Öl-Immersion-Objektiv (HCX PL APO CS 40 x 1,25, Leica, Bensheim, Deutschland) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die

Anregung erfolgte mit einem Argonlaser bei 488nm. Emissionen zwischen 510-540 nm und 640-670 nm wurden erfasst und einer rechnerischen Verarbeitung zugeführt. Die intrazellulären Calciumkonzentrationen wurden nicht direkt gemessen, sondern aus der relativen Änderung der Fluoreszenz-Intensitäten berechnet. Dabei führte ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Zunahme der durch Fluo-3 vermittelten grünen Fluoreszenz (525 nm) und gleichzeitig zu einer Abnahme der durch Fura-Red verursachten roten Fluoreszenz (660 nm). Die Ermittlung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte dann über die Berechnung des Verhältnisses der Fluoreszenz-Intensitäten:

$$\text{Intrazelluläre Calciumkonzentration (w.E.)} = F_{525} / F_{660},$$

wobei F_{525} die Fluoreszenz-Intensität bei 525nm und F_{660} die Fluoreszenz-Intensität bei 660nm bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Zytotoxisches oder proliferatives Potenzial von NMDA und den verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei NHEK

4.1.1. Ouabain

Zur Validitätsprüfung der verwendeten Kristallviolett-Methode wurde Ouabain als Positiv-Kontrolle für Zytotoxizität eingesetzt. Es zeigte sich sowohl nach 24h als auch nach 48h ein signifikant geringerer Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle und somit ein deutlich zytotoxischer Effekt (24h: 45,2%; 48h: 69,6%) (Abbildungen 5 und 6).

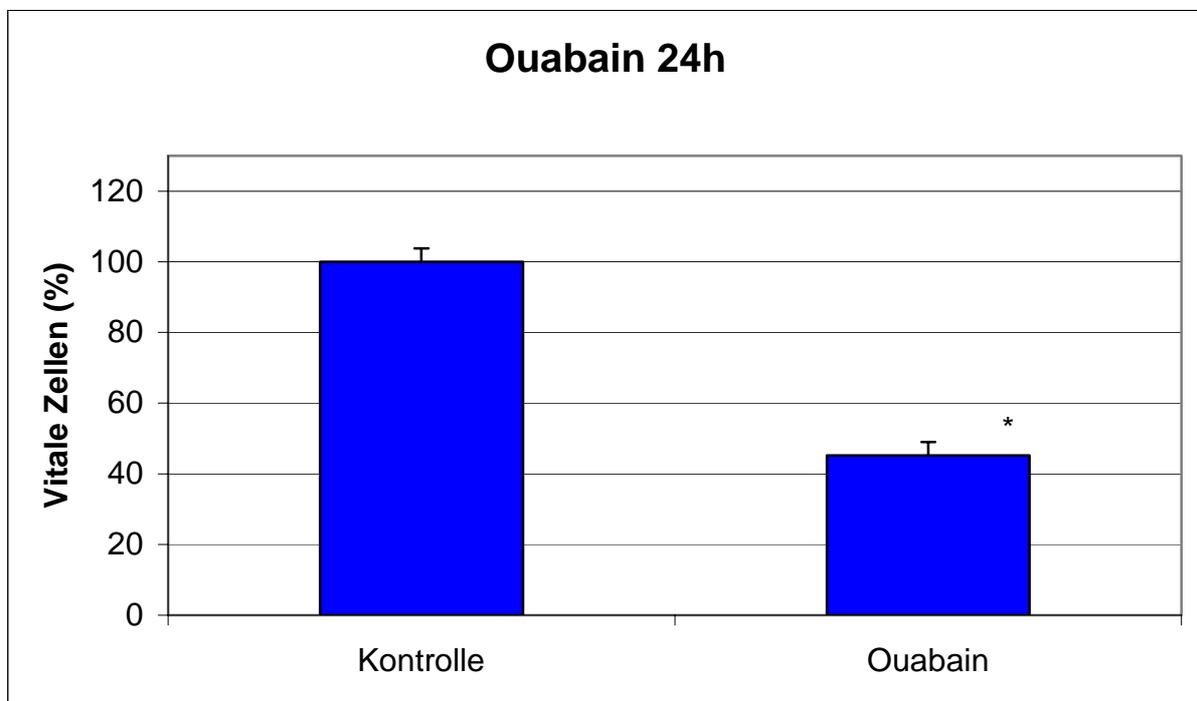


Abbildung 5: Anteil vitaler Keratinozyten nach 24h Inkubation mit Ouabain 100 μ M im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). * = p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

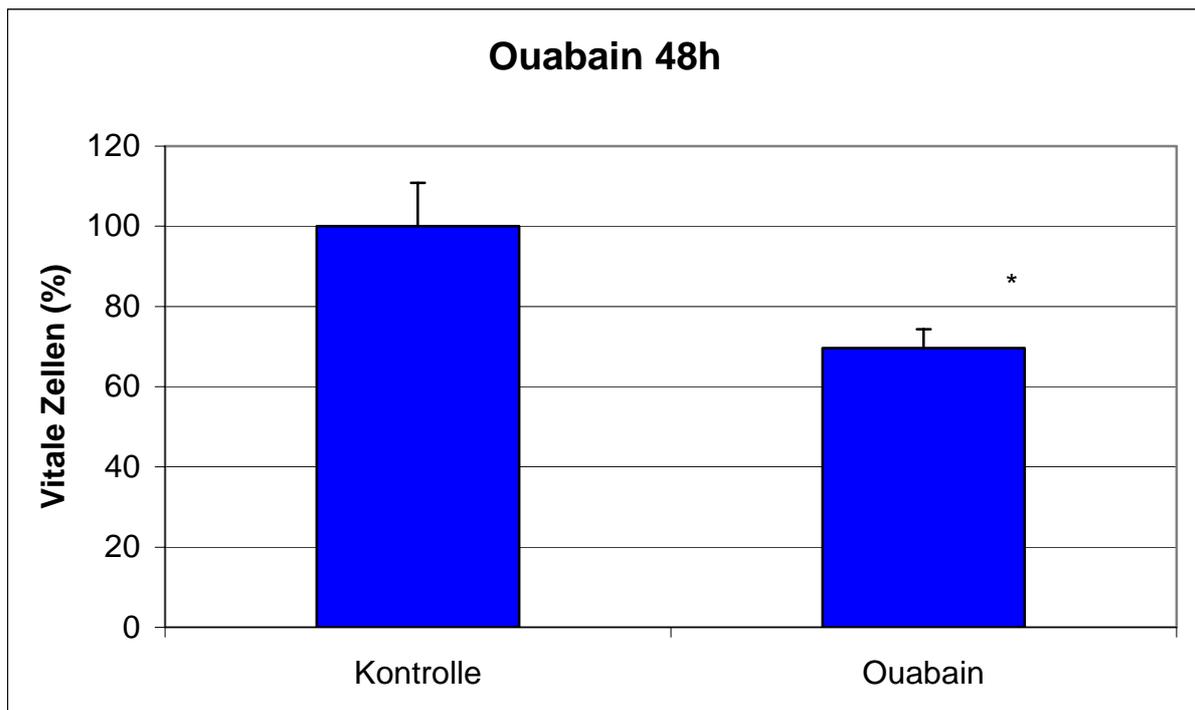


Abbildung 6: Anteil vitaler Keratinozyten nach 48h Inkubation mit Ouabain 100µM im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.1.2. NMDA

Nach 24h Inkubation der NHEK mit NMDA in den Konzentrationen von 10 bis 200µM war keine zytotoxische Wirkung von NMDA zu verzeichnen. Im Gegenteil zeigte sich bei allen Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: 100%, NMDA 10µM: 123,4%, NMDA 50µM: 111,6%, NMDA 100µM: 117,3%, NMDA 200µM: 114%; $p < 0,05$) und somit ein proliferativer Effekt. Eine Konzentrationsabhängigkeit bestand nicht (Abbildung 7).

Nach 48h Inkubation der Keratinozyten mit NMDA in den gleichen Konzentrationen war der proliferative Effekt im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr sichtbar. Es zeigte sich aber auch weiterhin kein zytotoxisches Potenzial von NMDA. Zwischen NMDA in den verschiedenen Konzentrationen und der Kontrolle bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 8).

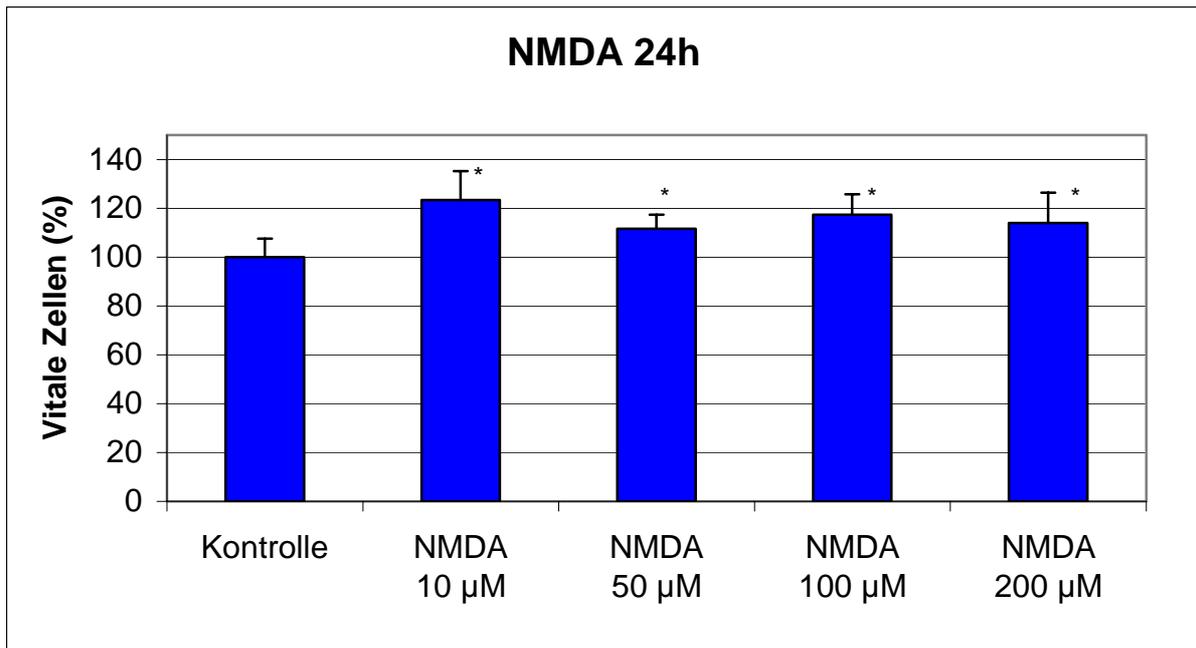


Abbildung 7: Anteil vitaler Keratinozyten nach 24h Inkubation mit NMDA in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Proliferativer Effekt für alle NMDA-Konzentrationen. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

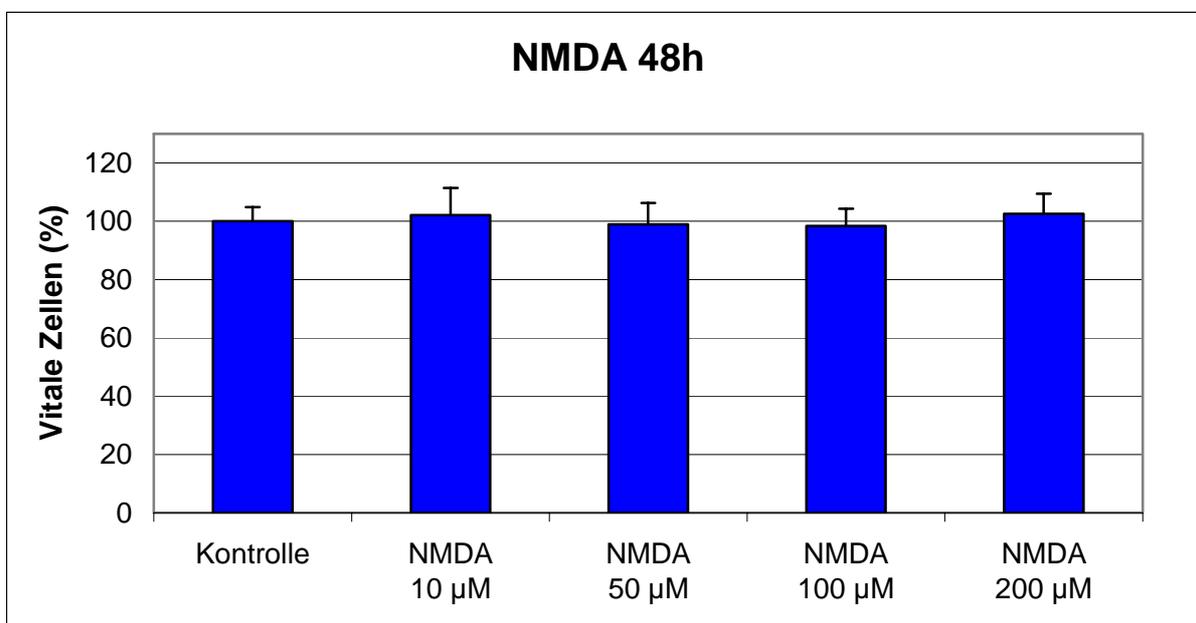


Abbildung 8: Anteil vitaler Keratinozyten nach 48h Inkubation mit NMDA in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Kein proliferativer Effekt und kein zytotoxischer Effekt.

4.1.3. MK-801

Nach 24-stündiger Inkubation der NHEK mit MK-801 in den Konzentrationen zwischen 10 und 200 μ M war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Kontrolle 100%, MK-801 10 μ M: 96,7%, MK-801 50 μ M: 80,3%, MK-801 100 μ M: 108,4%, MK-801 200 μ M: 92,6%) (Abbildung 9).

Auch nach 48h zeigte sich weder ein signifikanter zytotoxischer noch ein proliferativer Effekt bei den mit MK-801 behandelten Keratinozyten im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle 100%, MK-801 10 μ M: 80,9%, MK-801 50 μ M: 98,6%, MK-801 100 μ M: 90,8%, MK-801 200 μ M: 88,4%) (Abbildung 10).

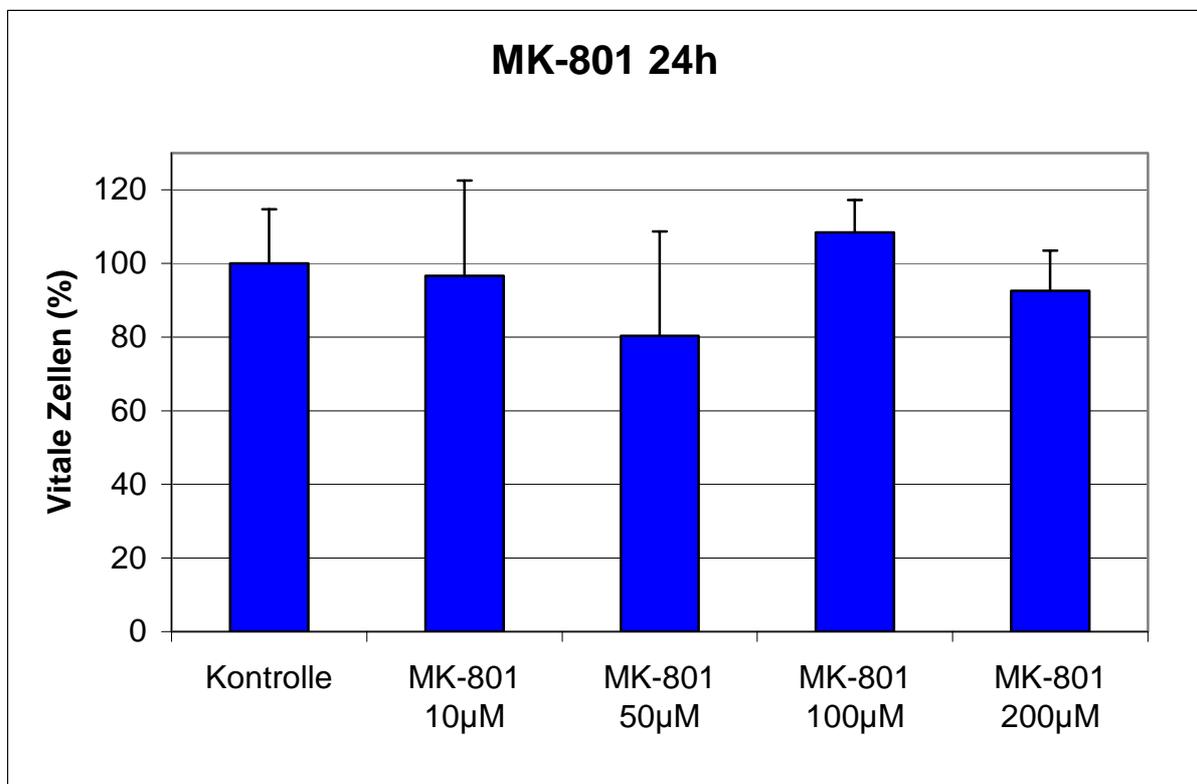


Abbildung 9: Anteil vitaler Keratinozyten nach 24h Inkubation mit MK-801 in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Kein zytotoxischer oder proliferativer Effekt.

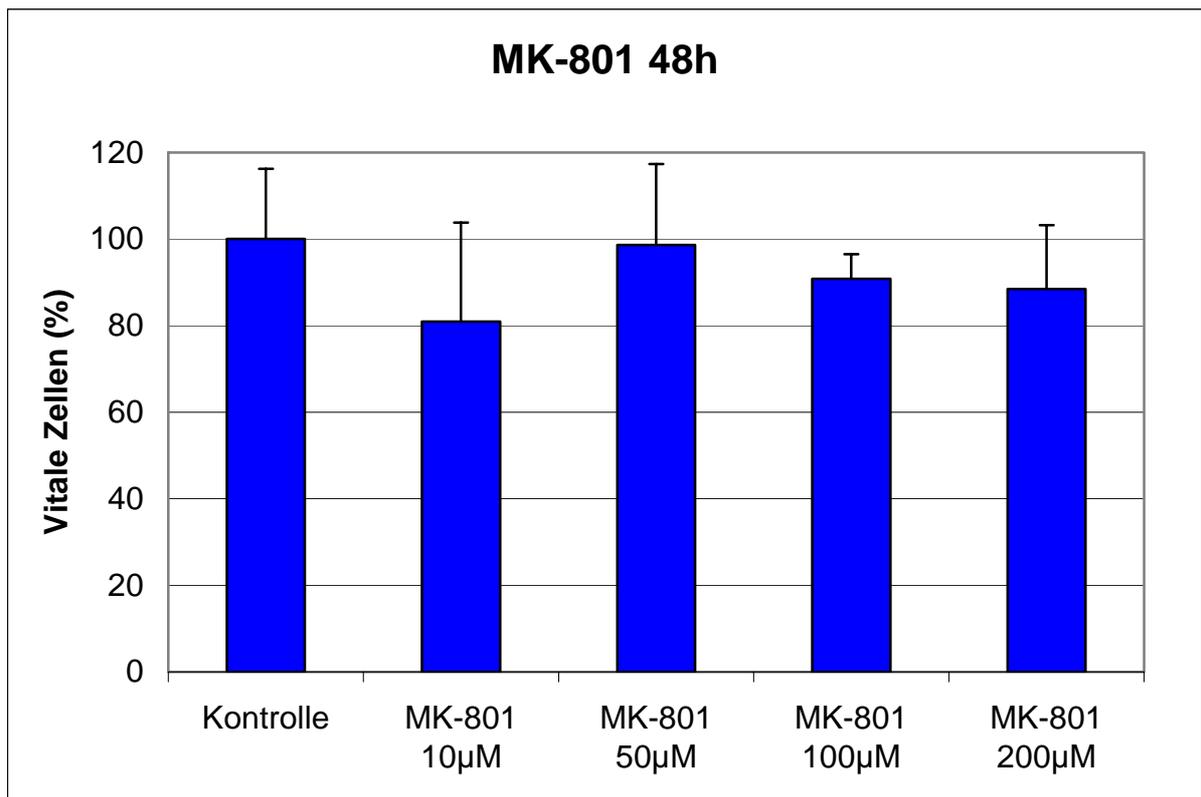


Abbildung 10: Anteil vitaler Keratinozyten nach 48h Inkubation mit MK-801 in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Kein zytotoxischer oder proliferativer Effekt.

4.1.4. AP 5

Nach 24h Inkubation der NHEK mit AP 5 in den Konzentrationen von 1 bis 200 μ M war für die Konzentration 50 μ M AP 5 ein signifikanter Anstieg des Anteils vitaler Zellen (111,2%) im Vergleich zur Kontrolle (100%) sichtbar ($p < 0,05$). Für die übrigen Konzentrationen bestand kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, wenngleich bei den Konzentrationen 100 und 200 μ M doch ein gewisser Anstieg der Zahl vitaler Zellen zu verzeichnen war (105,9% und 107,6%). Zwischen diesen Konzentrationen und AP 5 50 μ M bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 11). Auch nach 48-stündiger Inkubation war für die Konzentration 50 μ M AP 5 ein signifikanter proliferativer Effekt sichtbar (111,4%, $p < 0,05$), während bei allen anderen AP 5-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle bestand (Abbildung 12). Ein zytotoxisches Potenzial von AP 5 konnte weder nach 24- noch nach 48-stündiger Inkubationszeit nachgewiesen werden.

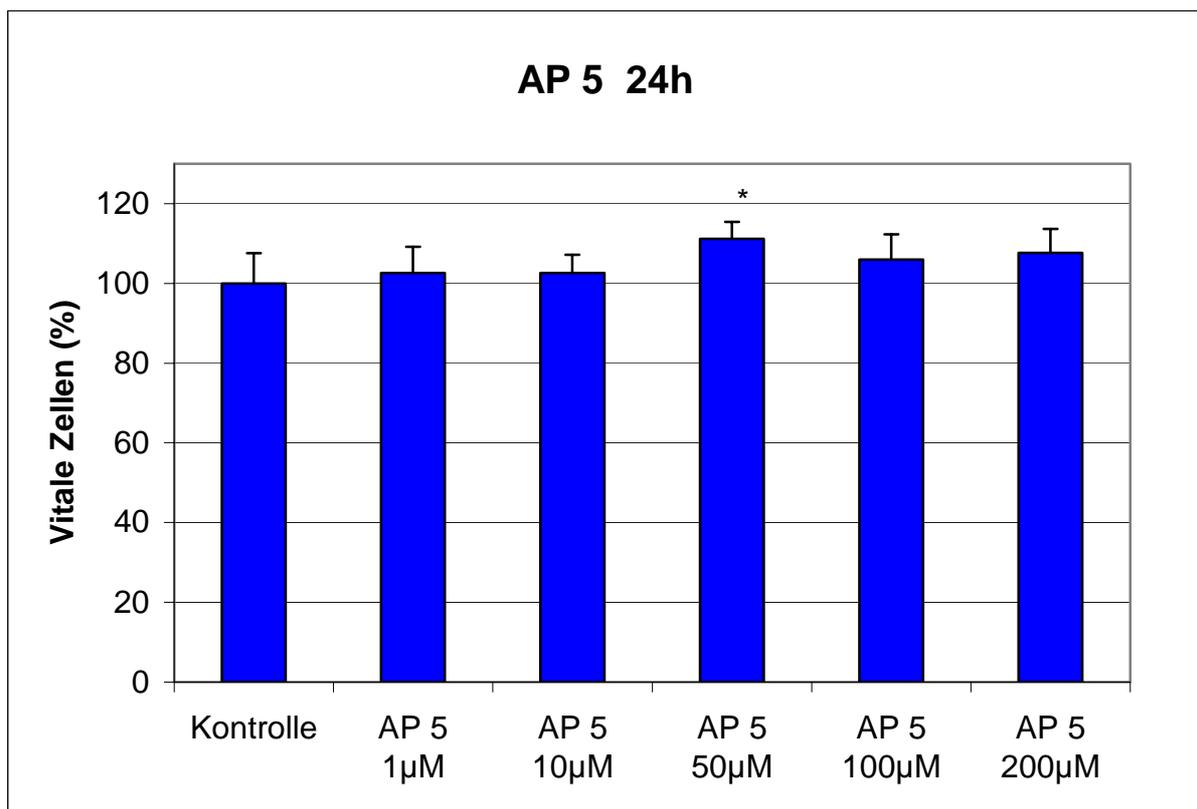


Abbildung 11: Anteil vitaler Keratinozyten nach 24h Inkubation mit AP 5 in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Proliferativer Effekt bei 50 μ M AP 5. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

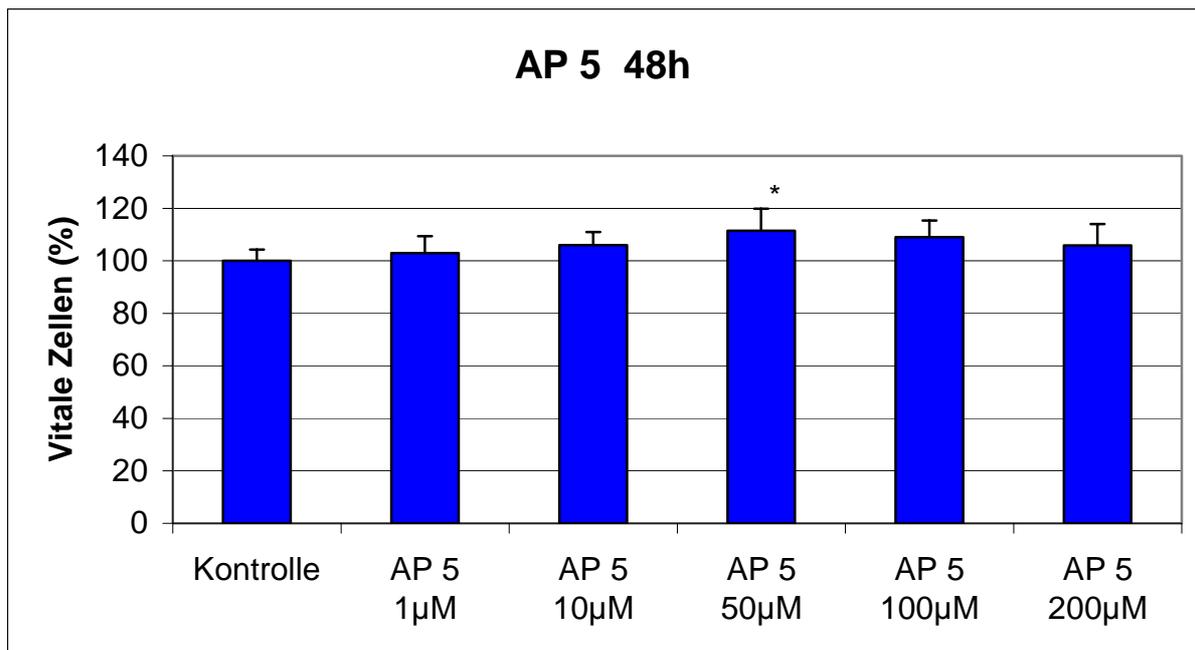


Abbildung 12: Anteil vitaler Keratinozyten nach 48h Inkubation mit AP 5 in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Proliferativer Effekt bei 50 µM AP 5. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.1.5. D-Glutamat

Nach 24-stündiger Behandlung der NHEK mit D-Glutamat in den Konzentrationen von 10 bis 200µM zeigte sich bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 13).

Das Ergebnis änderte sich auch nach 48-stündiger Inkubation nicht. Es zeigte sich weder ein proliferativer noch ein zytotoxischer Effekt von D-Glutamat (Abbildung 14).

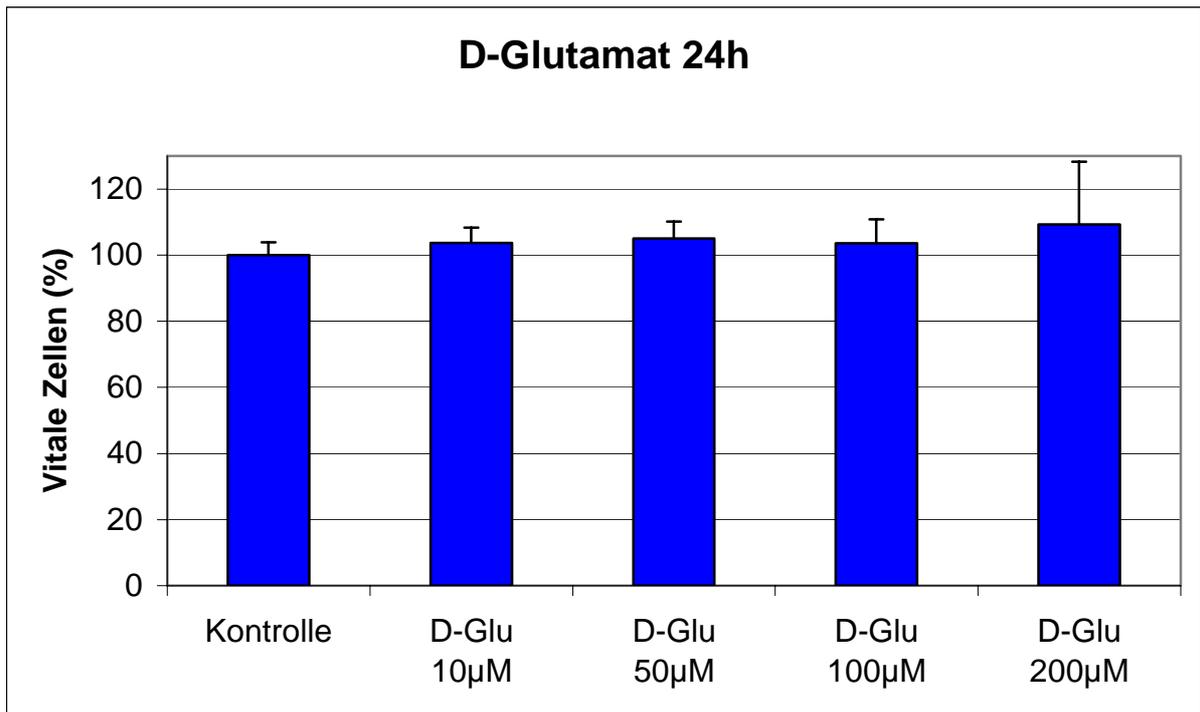


Abbildung 13: Anteil vitaler Keratinozyten nach 24h Inkubation mit D-Glutamat in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Kein proliferativer Effekt. Kein zytotoxischer Effekt.

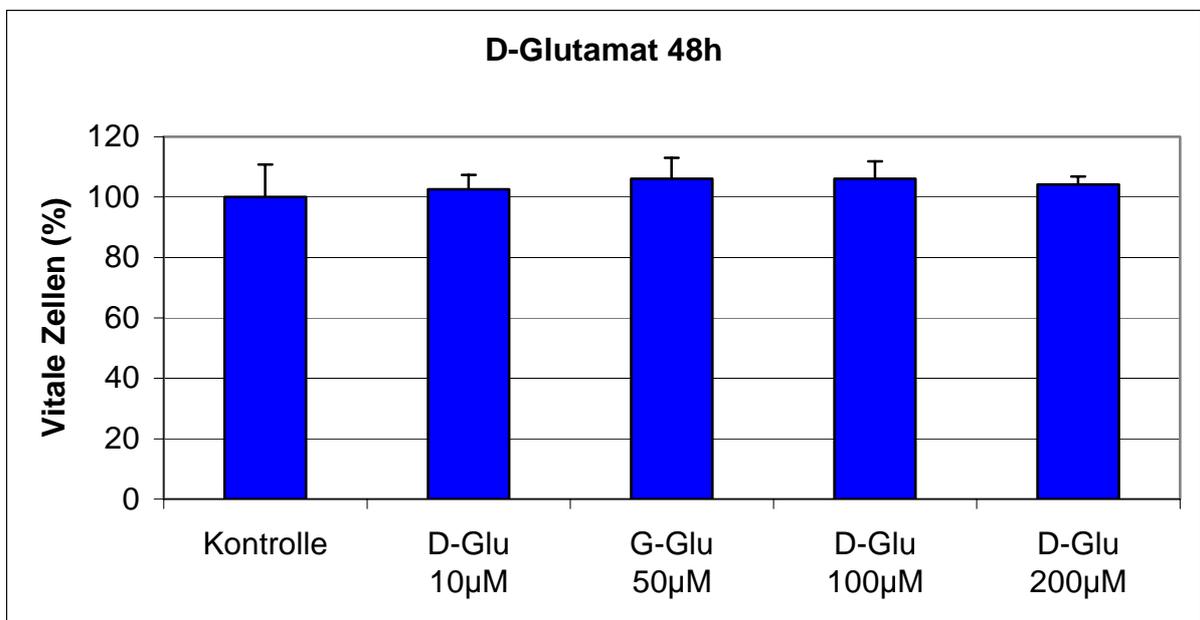


Abbildung 14: Anteil vitaler Keratinozyten nach 48h Inkubation mit D-Glutamat in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Kristallviolett-Methode). Kein proliferativer Effekt und kein zytotoxischer Effekt.

4.2. Einfluss der verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von NHEK

4.2.1. MK-801

Bei der Negativkontrolle zeigten 8,9% der Zellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration um >18% des Ausgangswertes.

Bei der Positivkontrolle mit NMDA 50µM war ein Calciumkonzentrationsanstieg um >18% des Ausgangswertes bei 64,5% der Zellen zu verzeichnen (Abbildung 15).

Die Zugabe von MK-801 führte bei allen verwendeten Konzentrationen (10µM bis 200µM) zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhten Zellzahl mit Calciumkonzentrationsanstieg um > 18% des jeweiligen Ausgangswertes. Die Anzahl reaktiver Zellen nahm dabei mit steigender MK-801-Konzentration zu (10µM: 29,6%; 50µM: 30,6%; 100µM: 43,6%; 200µM: 56,4%). Bei den Konzentrationen von 100 und 200µM bestand dabei kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle mit NMDA 50µM (Abbildung 15).

Nach Zugabe von NMDA 50µM zu den mit MK-801 in den o.g. unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubierten Zellen war kein signifikanter Anstieg der Zellzahl mit Calciumerhöhung zu beobachten (MK-801 10µM + NMDA 50µM: 29,6%; MK-801 50µM + NMDA 50µM: 36,7%; MK-801 100µM + NMDA 50µM: 33,3%; MK-801 200µM + NMDA 50µM: 46,2%). Bei allen Konzentrationen war die Zellzahl mit Calciumanstieg signifikant höher als bei der Negativkontrolle. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit NMDA 50µM war bei den Konzentrationen von MK-801 10µM + NMDA 50µM bis MK-801 100µM + NMDA 50µM eine signifikant geringere Zahl reaktiver Zellen zu verzeichnen. Bei der Konzentration MK-801 200µM + NMDA 50 µM bestand kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle mit NMDA 50µM (Abbildung 15).

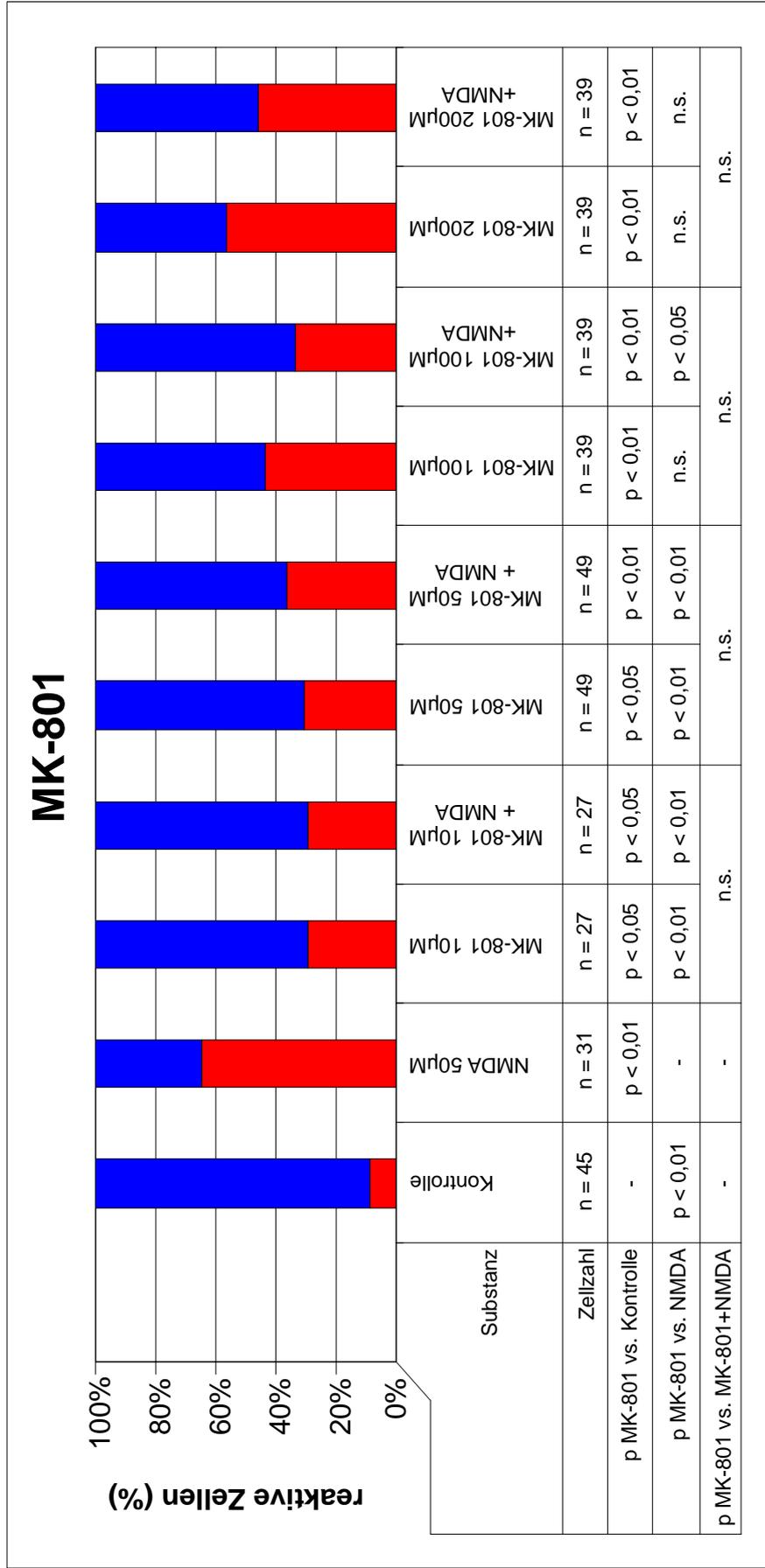


Abbildung 15: Anzahl von NHEK (rot) mit Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration um >18% im Vergleich zum Ausgangswert nach Stimulation mit MK-801 bzw. MK-801+NMDA. Eigenwirkung von MK-801. Signifikante Inhibition von NMDA durch MK-801.

4.2.2. AP 5

Es wurde die gleiche Negativkontrolle wie für MK-801 verwendet (8,9% reaktive Zellen).

Bei der Positivkontrolle mit NMDA 50 μ M waren 65,3% reaktive Zellen zu verzeichnen (Abbildung 16).

AP 5 bewirkte in allen gemessenen Konzentrationen (0,1 μ M bis 200 μ M) im Vergleich zur Negativkontrolle keinen signifikanten Anstieg der Zellzahl mit Erhöhung der Calciumkonzentration um > 18% des jeweiligen Ausgangswertes (AP 5 0,1 μ M: 25%; AP 5 1 μ M: 20%; AP 5 10 μ M: 13,7 %; AP 5 50 μ M: 5,1%; AP 5 100 μ M: 15,2%; AP 5 200 μ M: 21,6%). AP 5 allein zeigte somit keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration (Abbildung 16).

Nach Zugabe von NMDA 50 μ M zu den jeweiligen AP 5-Konzentrationen (0,1 μ M bis 200 μ M) wurde der zu erwartende NMDA-vermittelte Calciumanstieg ab einer AP 5-Konzentration von 10 μ M komplett inhibiert (AP 5 0,1 μ M + NMDA 50 μ M: 41% reaktive Zellen; AP 5 1 μ M + NMDA 50 μ M: 50%; AP 5 10 μ M + NMDA 50 μ M: 14,3 %; AP 5 50 μ M + NMDA 50 μ M: 2,9%; AP 5 100 μ M + NMDA 50 μ M: 8,9%; AP 5 200 μ M + NMDA 50 μ M: 10,5%). Die Anzahl der Zellen mit Calciumanstieg unterschied sich ab einer AP 5-Konzentration von 10 μ M nicht mehr signifikant von der Negativkontrolle. AP 5 in den Konzentrationen 0,1 μ M und 1 μ M hemmte den NMDA-vermittelten Calciumeinstrom noch nicht komplett. Es bestand hier kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle mit NMDA 50 μ M (Abbildung 16).

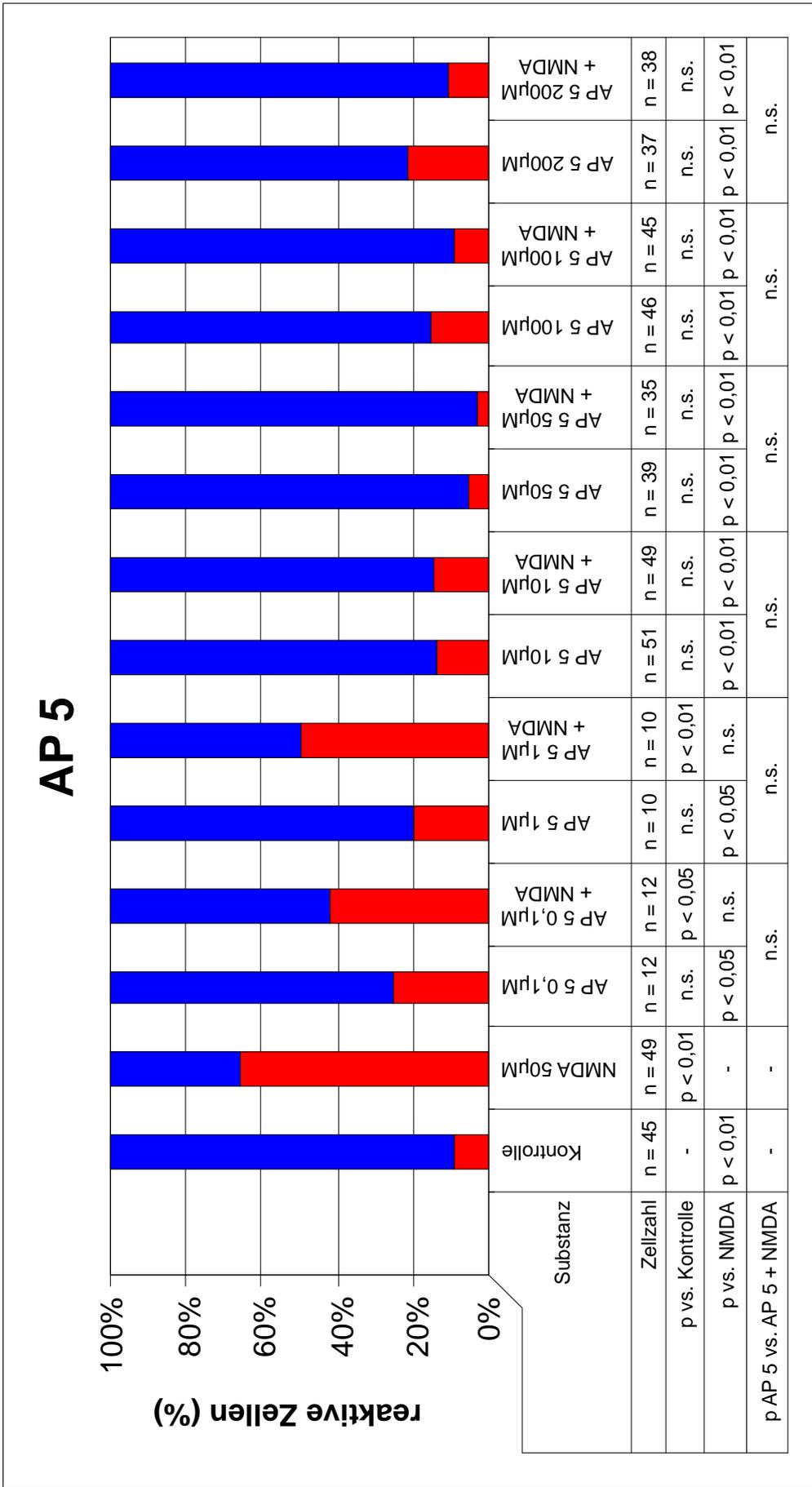


Abbildung 16: Anzahl von NHEK (rot) mit Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration um >18% im Vergleich zum Ausgangswert nach Stimulation mit AP 5 bzw. AP 5 + NMDA. Keine Eigenwirkung von AP 5. Vollständiger Antagonismus ab einer AP 5-Konzentration von 10µM.

4.2.3. D-Glutamat

Es wurde die gleiche Negativ- und Positivkontrolle wie bei AP 5 verwendet (8,9% bzw. 65,3% reaktive Zellen).

D-Glutamat führte in allen gemessenen Konzentrationen zu einer Zunahme der Zellzahl mit Calciumkonzentrationsanstieg um >18% des Ausgangswertes (D-Glutamat 10 μ M: 31,2%; D-Glutamat 50 μ M: 40%; D-Glutamat 100 μ M: 18,2%; D-Glutamat 200 μ M: 31,6%). Im Vergleich zur Negativkontrolle war dieser Unterschied für alle Konzentrationen außer 100 μ M statistisch signifikant. Im Vergleich zu NMDA 50 μ M war die Anzahl der reaktiven Zellen jedoch bei allen Konzentrationen signifikant geringer (Abbildung 17).

Nach Zugabe von NMDA 50 μ M wurde der zu erwartende NMDA-vermittelte Anstieg der Zellzahl mit erhöhter Calciumkonzentration bei allen D-Glutamat-Konzentrationen signifikant inhibiert, zwischen D-Glutamat allein und D-Glutamat + NMDA 50 μ M bestand in den verschiedenen Konzentrationen jeweils kein signifikanter Unterschied (D-Glutamat 10 μ M + NMDA 50 μ M: 17,2%; D-Glutamat 50 μ M + NMDA 50 μ M: 37,5%; D-Glutamat 100 μ M + NMDA 50 μ M: 22,6%; D-Glutamat 200 μ M + NMDA 50 μ M: 39,5%). Im Vergleich zur Positivkontrolle mit NMDA 50 μ M war die Zahl reaktiver Zellen signifikant geringer. Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle waren mehr Zellen reaktiv, wobei dieser Unterschied für die D-Glutamat-Konzentrationen 50- und 100 μ M signifikant, für 10 und 100 μ M jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 17).

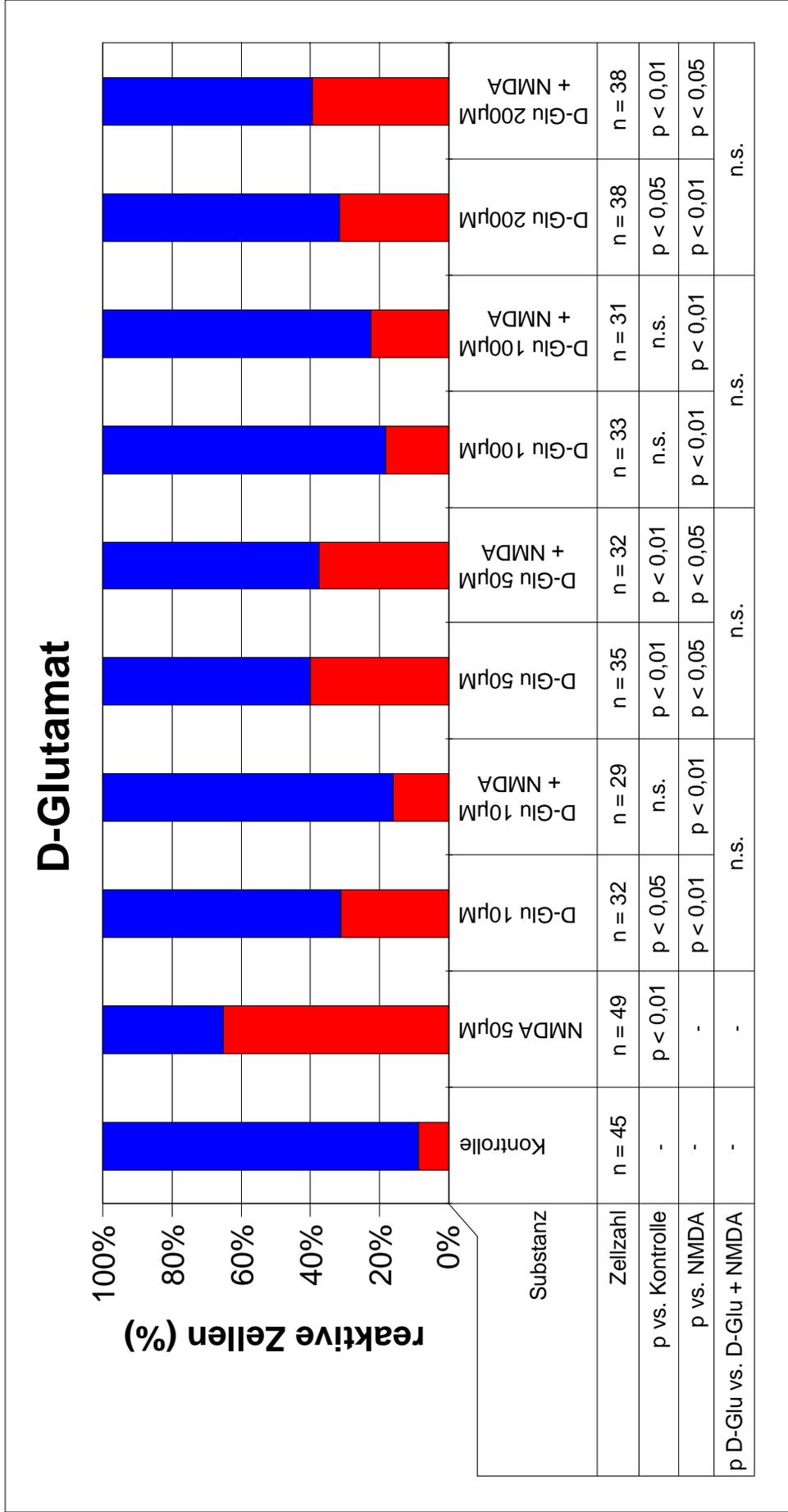


Abbildung 17: Anzahl von NHEK (rot) mit Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration um >18% im Vergleich zum Ausgangswert nach Stimulation mit D-Glutamat bzw. D-Glutamat + NMDA. Eigenwirkung von D-Glutamat. Signifikante Inhibition von NMDA durch D-Glutamat.

5. Diskussion

5.1. Zytotoxisches Potenzial und Einfluss von NMDA und den verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die intrazelluläre keratinozytäre Calciumkonzentration

5.1.1. NMDA

Als Grundlage der Experimente mit den verschiedenen NMDA-Rezeptor-Antagonisten wurde zunächst das zytotoxische Potenzial und der Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von NMDA bei NHEK untersucht. NMDA zeigte sich hier als nicht-zytotoxische Substanz. Dabei war nach 24h sogar ein proliferatives Potenzial zu verzeichnen, welches aber nach 48h nicht mehr nachweisbar war. Der Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde aufgrund vorhergehender Erfahrungen mit NMDA bei Keratinozytenkulturen in einer NMDA-Konzentration von 50 μ M gemessen [Fischer et al. 2004a]. Dabei zeigte sich in unseren aktuellen Versuchen NMDA bei NHEK als NMDA-Rezeptor-Agonist, wobei eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei 65% der Zellen zu verzeichnen war.

Dass NMDA in den getesteten Konzentrationen bei Keratinozyten kein zytotoxisches Potenzial besitzt, stimmt mit den Daten von Fischer et al. bei HaCaT-Zellen überein [Fischer et al. 2004a]. Aus der neurologischen Forschung ist bekannt, dass bei Neuronen sowohl eine übermäßige NMDA-Rezeptor-Stimulation im Sinne einer Exzitotoxizität als auch eine zu geringe NMDA-Rezeptor-Stimulation, z.B. durch Einsatz von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, zum Zelltod führen können [Hardingham, Bading 2003]. Dafür besteht aufgrund unserer Untersuchungen bei den getesteten NMDA-Konzentrationen bei NHEK kein Anhalt und somit konnte auch die Gefahr einer möglichen Verfälschung der Calciumkonzentrationsmessungen aufgrund einer eventuellen Zytotoxizität von NMDA ausgeschlossen werden.

Anhand der Zytotoxizitätstests zeigte sich weiterhin kein anhaltendes proliferatives Potenzial von NMDA. Die Daten legen zwar einen vorübergehenden proliferationsfördernden Effekt von NMDA nahe, aufgrund des fehlenden Effektes nach 48h ist dieser jedoch nicht gesichert. In der Literatur sind die Daten bezüglich des Einflusses von NMDA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation von Keratinozyten bisher sehr heterogen. So gibt es sowohl für NMDA-Rezeptor-Agonisten als auch für NMDA-Rezeptor-Antagonisten Hinweise, dass diese proliferationshemmend wirken [Nahm et al. 2004; Genever et al 1999;

Morhenn et al. 2004]. Für NMDA gibt es sowohl Daten, die besagen dass es proliferationshemmend ist [Nahm et al. 2004], als auch Daten, die für eine (Hyper-) Proliferationsförderung [Fujiwara et al. 2003] oder gar keinen Einfluss auf die Proliferation sprechen [Fischer et al. 2004a]. Insgesamt überwiegen jedoch eher Daten, die für eine Proliferationshemmung bzw. keinen Einfluss von NMDA auf das Wachstum von Keratinozyten sprechen [Fischer et al. 2004a, Nahm et al. 2004]. Die Gründe für die heterogenen Daten könnten in den unterschiedlichen Methoden der Untersuchungen (Genever, Fischer und Morhenn: Zellkulturen; Nahm: bioengineered skin construct, Messung der Proliferation nach Schädigung; Fujiwara: Messung der Proliferation nach Hautbarriereschädigung in vivo bei haarlosen Mäusen) sowie den unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den Effektoren liegen (Fischer NMDA: 24h; Morhenn MK-801: 6 Tage). Weitere Untersuchungen hierzu werden notwendig sein.

Dass NMDA in unseren Versuchen einen Anstieg der Calciumkonzentration bei einem signifikanten Anteil (65%) der Keratinozyten bewirkte, steht im Einklang mit Daten aus der Literatur [Fischer et al. 2004a, Morhenn et al. 2004, Fujiwara et al. 2003, Nahm et al. 2004]. Die Höhe des Anteils der Zellen mit Calciumkonzentrationsanstieg ist dabei jedoch relativ heterogen und reicht von 100% bei Nahm et al. (normale humane Keratinozyten aus neonataler Vorhaut) über 95,5% (normale humane Keratinozyten aus neonataler Vorhaut) und 84,6% (HaCaT-Zellen) bei Fischer et al. bis zu 31% bei Fujiwara et al. (humane Keratinozyten unklaren Ursprungs) [Fischer et al. 2004a, Fujiwara et al. 2003, Nahm et al. 2004]. Bei unseren aktuellen Versuchen wurden als Keratinozytenkultur NHEK verwendet, wobei es sich um eine nicht-transformierte Kultur von Keratinozyten aus normaler humaner Vorhaut handelt. Über das Alter der Spender sind keine Angaben vorhanden. Die Quantitätsunterschiede bei den Calciummessungen der einzelnen Autoren sind vermutlich durch die unterschiedlichen Zellkulturen und unterschiedlichen Untersuchungszeiträume (Fischer et al.: 20 Min., Fujiwara et al.: 1 Min., Nahm et al.: 30 Sekunden) zu erklären. Festzuhalten bleibt, dass NMDA in einer Konzentration von 50 μ M auch in unseren Versuchen bei NHEK nicht zytotoxisch war und zu einem Calciumkonzentrationsanstieg bei einer signifikanten Zellzahl führte und sich somit für die folgenden Versuche mit den NMDA-Rezeptor-Antagonisten eignete.

5.1.2. MK-801

In unseren Untersuchungen zeigte sich MK-801 bei NHEK als nicht-zytotoxische Substanz mit antagonistischer Wirkung am NMDA-Rezeptor. Weiterhin wurde demonstriert, dass MK-

801 selber konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei NHEK führt.

Bei den Zytotoxizitätsexperimenten war weder nach 24h noch nach 48h eine zytotoxische Wirkung von MK-801 zu verzeichnen. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Fischer et al., bei denen ein zytotoxisches Potenzial von MK-801 in Konzentrationen ab 200 μ M nach 24-stündiger Inkubation bei HaCaT-Zellen sowie in Konzentrationen ab 50 μ M nach 48-stündiger Inkubation bei normalen neonatalen humanen Keratinozyten nachgewiesen wurde [Fischer et al. 2004a + b]. Ergebnisse von Morhenn et al. 2004 zeigten ein geringes Apoptose-förderndes Potenzial von MK-801 nach 24-stündiger Inkubation humaner kultivierter Keratinozyten in Konzentrationen von 10 und 100 μ M (15% apoptotische Zellen im Gegensatz zu 10% apoptotischen Zellen bei der Kontrolle). Über den Ursprung der Keratinozyten wird allerdings keine Auskunft gegeben. Die Unterschiede zwischen unseren aktuellen Daten und den Daten von Fischer et al. sowie den Ergebnissen von Morhenn könnten in den unterschiedlichen Keratinozytenkulturen begründet sein. Insbesondere bei HaCaT-Zellen ist ein andersartiges biologisches Verhalten als bei normalen humanen Keratinozyten denkbar, da es sich hier um eine immortalisierte Keratinozytenzelllinie handelt. Weiterhin demonstrieren unsere Ergebnisse, dass MK-801 eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Aktivität bei NHEK besitzt. Dies wurde dadurch gezeigt, dass nach Zugabe von NMDA zu den mit MK-801 inkubierten Zellen keine signifikante Erhöhung der Zellzahl mit Calciumanstieg zu beobachten war. Dabei war keine Konzentrationsabhängigkeit sichtbar, bereits ab der geringsten verwendeten MK-801-Konzentration von 10 μ M war die Antagonisierung des NMDA-vermittelten Calciuminfluxes komplett, lediglich bei 50 μ M wurde nach Zugabe von NMDA ein leicht, aber nicht signifikant höherer Anteil der Zellen mit Calciumkonzentrationsanstieg festgestellt. Bei den Konzentrationen von 100 bzw. 200 μ M MK-801 war nach Zugabe von NMDA der Anteil der Zellen mit Anstieg der Calciumkonzentration sogar etwas niedriger als bei den allein mit MK-801 inkubierten Zellen, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Dass MK-801 auch bei Keratinozyten als NMDA-Rezeptor-Antagonist wirkt, steht im Einklang mit den bisher in der Literatur vorhandenen Daten. So zeigten Nahm et al. mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie, dass MK-801 in einer Konzentration von 10 μ M den durch NMDA hervorgerufenen Calciumeinstrom in kultivierte Keratinozyten neonataler Vorhaut komplett hemmt [Nahm et al. 2004]. Die Arbeitsgruppe um Fuziwara beobachtete ebenfalls anhand von Laser-Scanning Mikroskopie eine signifikante Hemmung des NMDA-vermittelten Calciuminfluxes bei Keratinozyten in Kultur durch MK-801 in einer Konzentration von 50 μ M

[Fuziwara et al. 2003]. Weitere MK-801-Konzentrationen wurden jeweils nicht geprüft. Fischer et al. untersuchten erstmals unterschiedliche MK-801-Konzentrationen von 1 – 300µM bei HaCaT-Zellen und stellten eine Konzentrationsabhängigkeit der NMDA-Rezeptor-Blockade durch MK-801 fest. Ab einer Konzentration von 50µM MK-801 konnte eine signifikante Hemmung des NMDA-induzierten Calciumeinstroms festgestellt werden (MK-801 50µM: 40% reaktive Zellen versus NMDA 50µM 81,6% reaktive Zellen). Eine dosisabhängige Steigerung der Hemmung durch MK-801 konnte weiterhin verzeichnet werden (MK-801 100µM: 23,1% reaktive Zellen, 300µM: 5,3% reaktive Zellen; Messung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie) [Fischer et al. 2004a]. In der gleichen Studie wurde auch die Wirkung von MK-801 in einer Konzentration von 100µM bei NHEK untersucht. Hier zeigten sich nach Zugabe von NMDA noch 44,4% der Zellen reaktiv [Fischer et al. 2004a]. Dass MK-801 in diesen beiden letztgenannten Versuchen offenbar eine schwächere Wirksamkeit zeigt als in der vorliegenden Arbeit, könnte in der kürzeren Inkubationszeit mit MK-801 bei Fischer et al. begründet sein (5 Min. im Vergleich zu 20 Min. bei unseren Versuchen). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass, zumindest bei Neuronen, festgestellt wurde, dass zwei Bindungskinetiken mit unterschiedlichen Halbwertszeiten für die Bindung von MK-801 an den Rezeptor existieren [Javitt, Zukin 1989: ca. 10 Min. und 3h; Kloog et al. 1988: 5-8 Min. und 70 Min.] Dies weist auf zwei verschiedene Wege hin, auf denen MK-801 an seine Bindungsstelle gelangt: den bekannten, schnellen, hydrophilen Weg durch den offenen Kanal des Rezeptors und einen langsamen, hydrophoben Weg durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran und durch hydrophobe Domänen des Rezeptors oder durch den geschlossenen Rezeptor-Schließmechanismus. Wenn man davon ausgeht, dass die Inkubation mit MK-801 ohne Anwesenheit exogener Antagonisten stattfindet und so vorwiegend geschlossene Rezeptoren vorliegen, wird die Bedeutung des langsamen, durch Diffusion durch die Zellmembran und Teile des Rezeptors stattfindenden Weges und damit die Bedeutung der Dauer der Inkubationszeit deutlich. Dies wird dadurch unterstrichen, dass beispielsweise von Nahm et al., in deren Versuchen eine starke Wirksamkeit von MK-801 festgestellt wurde, eine relativ lange Inkubationszeit mit MK-801 von einer Stunde gewählt wurde [Nahm et al. 2004]. Da die o.g. Halbwertszeiten allerdings deutlich länger sind als die beispielsweise in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inkubationszeiten, aber auch hier eine potente NMDA-Rezeptor-Antagonisierung durch MK-801 festgestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass MK-801 auch auf dem klassischen Weg durch den geöffneten Rezeptor an seine Bindungsstelle im Kanal gelangt. Dies wäre entweder durch die Annahme zu erklären, dass bei Keratinozyten, anders als bei Neuronen, auch im Ruhezustand geöffnete Rezeptoren

vorliegen, was allerdings spekulativ ist, oder aber, dass durch Anwesenheit endogener Agonisten die Öffnung der Rezeptoren gewährleistet wird, wofür es durchaus Anhaltspunkte gibt: nach Daten aus unserer Arbeitsgruppe sowie nach Untersuchungen von Hoogduijn et al. wird L-Glutamat von Keratinozyten selbst freigesetzt und könnte so für eine Öffnung von NMDA-Rezeptoren in den Zellkulturen sorgen [Fischer et al. (im Druck); Hoogduijn et al. 2006]. Eine weitere Erklärung der unterschiedlichen Wirksamkeit von MK-801 bei den Versuchen von Fischer et al. mit HaCaT-Zellen und unseren Untersuchungen mit NHEK könnten die unterschiedlichen verwendeten Zellkulturen sein. Verschiedene NMDA-Rezeptor-Subtypen in anderer Dichte und Verteilung könnten die unterschiedliche Wirkstärke von MK-801 bei den beiden Zellkulturen erklären. In einer ersten Untersuchung von Fischer et al. konnte allerdings bei beiden Zelllinien der Subtyp NMDAR2D identifiziert werden, für den eine schwache Bindungsaffinität von MK-801 im Vergleich zu anderen NMDA-Rezeptor-Subtypen bekannt ist [Fischer et al. 2006].

Die einzigen Untersuchungen zur Affinität von MK-801 zu seiner Bindungsstelle am keratinozytären NMDA-Rezeptor, welche ja mit der antagonistischen Potenz korreliert (vorausgesetzt MK-801 besitzt keine intrinsic activity), wurden bisher von Morhenn et al. durchgeführt [Morhenn et al. 1994]. Verglichen mit den bisher aus der experimentellen Neurologie bekannten Werten, zeigen die Daten eine geringere Affinität von MK-801 zum NMDA-Rezeptor bei Keratinozyten, sprechen also für eine eher schwache antagonistische Potenz von MK-801 bei Keratinozyten. Es besteht aber in dieser Untersuchung eine Differenz zwischen niedriger Affinität und offenbar hoher Bindungskapazität, die nicht aufgeklärt werden konnte, was evtl. für eine in Wirklichkeit höhere Affinität als die gemessene oder eine Bindung an andere Rezeptoren sprechen könnte. Die Untersuchungen wurden außerdem an präkonfluenten Keratinozytenkulturen durchgeführt, während bei unseren Versuchen semikonfluente bis konfluente Zellen verwendet wurden. Dies könnte von Bedeutung sein, da von Nahm et al. festgestellt wurde, dass nicht-konfluente Keratinozyten ihre NMDA-Rezeptoren verlieren [Nahm et al. 2004] und es insgesamt wahrscheinlich ist, dass sich die biologischen Eigenschaften von konfluenten und nicht-konfluenten Zellen unterscheiden.

Weiterhin existieren funktionelle Untersuchungen (Keratinozytenkulturen, Tierversuche) zur Wirkung von MK-801 auf Proliferation, Differenzierung und Hautbarrierewiederherstellung. In den meisten Fällen konnte hier eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung von MK-801 bestätigt werden. Während NMDA die Differenzierung von Keratinozyten fördert, konnten Fischer et al. bei Keratinozytenkulturen eine Hemmung der Expression der Differenzierungsmarker Filaggrin und Cytokeratin 10 durch MK-801 feststellen [Fischer et

al. 2004 a + b]. Auch Morhenn et al. konnten eine MK-801-vermittelte Hemmung der Differenzierung bei Keratinozyten nachweisen: in Zellkulturen zeigten mit MK-801 behandelte Keratinozyten nicht die für Calcium-induzierte Differenzierung typischen morphologischen Veränderungen [Morhenn et al. 2004]. Fuziwara et al. untersuchten den Einfluss von NMDA-Rezeptor-Agonisten und NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die Hautbarrierewiederherstellung bei Nacktmäusen. Während erstere die Barrierewiederherstellung verzögerten, beschleunigten letztere, unter ihnen auch MK-801, die Wiederherstellung der Hautbarriere [Fuziwara et al. 2003].

In der Studie von Morhenn et al. von 1994 gibt es jedoch auch Hinweise auf eine gleichartige Wirkung von NMDA und MK-801 auf das Wachstum von Keratinozyten. Nach 14-tägiger Inkubation änderte sich die Morphologie sowohl der mit NMDA als auch der mit MK-801 behandelten Keratinozyten hin zu einem gitterartigen Netzwerk, wobei der Effekt bei den mit NMDA behandelten Zellen geringfügig stärker ausgeprägt war [Morhenn et al. 1994].

Dieses Phänomen lässt sich vielleicht durch den zweiten Teil unserer MK-801-Versuche erklären. Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse nämlich, dass MK-801 selber konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration normaler humaner Keratinozyten führt, wobei bei höheren Konzentrationen (ab 100µM) der Effekt vergleichbar mit NMDA (50µM) ist.

Die Beobachtung, dass MK-801 selber die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht, steht zunächst einmal im Gegensatz zu Untersuchungen bei neuronalen Zellen in Kultur, bei denen MK-801 allein keine Wirkung zeigte. Bei diesen Studien wurde jedoch nicht die Calciumkonzentration selber, sondern deren Auswirkung auf das Membranpotenzial gemessen. Das heißt, MK-801 führte hier nicht wie NMDA zu einer (calciumvermittelten) Depolarisation, sondern zeigte gar keinen Einfluss auf die transmembranöse Spannung [Wong et al. 1986, Huettner, Bean 1988]. Auch in-vivo-Versuche mit systemischer Verabreichung von MK-801 bei Ratten bewirkten ähnliche Verhaltenseffekte (z.B. Ataxie) wie andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten auch (PCP, DL-AP 5, Ketamin), ohne Hinweise auf spezifische NMDA-Rezeptor-agonistische Effekte [Hiramatsu 1989; Koek, Ornstein 1987; Koek et al. 1988].

Bei Keratinozyten wurde die Eigenwirkung von MK-801 auf die Calciumkonzentration bisher nur in einer Studie von Morhenn et al. gemessen [Morhenn 2004]. Rückschlüsse von der antagonistischen Potenz auf eine eventuelle Eigenwirkung sind bei den anderen Studien aufgrund der Mess- und Auswertungsmethode nicht möglich. So wurden sowohl in den Untersuchungen von Nahm et al., Fuziwara et al. als auch von Fischer et al. relative

Änderungen der Ca-Konzentration nach Zugabe von NMDA untersucht, wobei die Zellen vorab mit MK-801 inkubiert wurden [Fischer et al. 2004a, Fuziwara et al. 2003, Nahm et al. 2004]. Daher ist aus diesen Daten kein Rückschluss auf eine etwaige Eigenwirkung von MK-801 möglich. Die einzige explizite Untersuchung des Effekts von MK-801 allein auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von Keratinozyten wurde außer in der vorliegenden Arbeit wie oben genannt von Morhenn et al. durchgeführt [Morhenn et al. 2004]. Die Calciumkonzentration wurde dabei an humanen Keratinozyten mittels Flow-Zytometrie gemessen, d.h. an Keratinozyten ohne Zell-zu-Zell-Kontakt. MK-801 (100 μ M) bewirkte hier eine Erhöhung der Calciumkonzentration bei 95% der Zellen, was eine stärkere Erhöhung als durch Glutamat und Glycin bedeutete (40% der Zellen). Da von Nahm et al. wie oben bereits genannt festgestellt wurde, dass Keratinozyten ohne Zell-zu-Zell-Kontakt keine NMDA-Rezeptoren mehr an der Zelloberfläche tragen, handelt es sich hierbei vermutlich um einen NMDA-Rezeptor-unabhängigen Effekt [Nahm et al. 2004]. MK-801 führt also wahrscheinlich über andere Kanäle als den NMDA-Rezeptor zu einem Anstieg der Calciumkonzentration. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass Morhenn et al. anhand von Bindungsstudien an Keratinozytenkulturen zwei verschiedene Bindungsstellen von MK-801 mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten (K_d 1: 0,1 μ M, K_d 2: 38,1 μ M) an Keratinozyten festgestellt haben [Morhenn et al. 1994]. Welcher Art die zweite Bindungsstelle ist, ist bisher nicht bekannt. Anhand des aktuellen Kenntnisstandes über die Calciumhomöostase von Keratinozyten wären mehrere Möglichkeiten zu diskutieren.

Beispielsweise führt die Stimulierung von β_2 -Adrenozeptoren zu einem Calcium-Influx über spannungsabhängige Calciumkanäle, welche vermutlich über cAMP und Proteinkinase C aktiviert werden [Denda et al. 2003]. Eine Bindung von MK-801 an diese Rezeptoren wurde jedoch bisher nicht beschrieben, im Gegenteil gibt es Daten von Wong et al., die zeigen, dass MK-801 und Noradrenalin nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren [Wong et al. 1986]. Indirekt hat MK-801 aber möglicherweise doch Einfluss auf Adrenozeptoren. So konnten Nishimura et al. zeigen, dass MK-801 bei embryonalen Nierenzellen Monoamintransporter blockt und so zu einer Erhöhung der Noradrenalin-, Dopamin-, und Serotoninkonzentration führt, wobei vermutlich die strukturelle Ähnlichkeit von MK-801 und Monoaminen (aromatischer Ring und Stickstoffatom) für die, wenn auch geringe, Affinität von MK-801 zum Monoamintransporter verantwortlich ist [Nishimura et al. 1998]. Diese Feststellung deckt sich mit früheren Untersuchungen, in denen bereits ein Einfluss von MK-801 auf das Monoamin-System im Sinne einer Konzentrationserhöhung von Dopamin, Serotonin und Noradrenalin oder einer Steigerung pro-dopaminerger, -serotonerger, und -

noradrenerger Effekte nachgewiesen wurde [Löscher, Hönack 1992; Whitton et al. 1992; Hiramatsu et al. 1989]. So wäre also durch MK-801 über eine Erhöhung der NoradrenalinKonzentration mit nachfolgender Stimulierung von β_2 -Adrenozeptoren eine Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration zu erreichen. Da auch Serotoninrezeptoren in der Epidermis beschrieben sind, könnte MK-801 auch auf diese Rezeptoren über die Erhöhung der Serotoninkonzentration einen Einfluss haben und so für einen Calciuminflux in die Zelle sorgen [Lundeberg et al. 2002]. Andererseits wurde für Serotoninrezeptoren als ionotrope Rezeptoren auch festgestellt, dass MK-801 hier eine antagonistische Aktivität entfalten kann. MK-801 kann also bei Serotoninrezeptoren offenbar sowohl (direkt) antagonistisch, als auch (indirekt) agonistisch wirken, wobei der letztendliche Effekt auf die Calciumkonzentration vom sich einstellenden Gleichgewicht dieser beiden Aktivitäten abhängen wird.

Weitere Möglichkeiten zur Beeinflussung der Calciumhomöostase durch MK-801 stellen beispielweise der CaR oder der kapazitative Calciumstrom (durch Leerung der intrazellulären Speicher getriggert) Calciumstrom aus dem Extrazellularraum) dar [Putney 2001, Putney et al. 2001]. Bei letzterem sind die Calciumkanäle, über die der Calciumstrom in die Zelle stattfindet, noch nicht genau identifiziert. Die neuesten Untersuchungen sprechen dafür, dass zwei Kanäle aus der transient receptor Potenzial (TRP)-Familie, TRPC1 und TRPC4, die Hauptkanäle für den kapazitativen Calciumstrom bei Keratinozyten darstellen [Tu et al. 2007]. Da die physiologische Funktionsweise der TRP-Kanäle beim kapazitativen Calciumstrom noch nicht ganz geklärt ist, ist auch eine Aussage über eine etwaige Interaktion von MK-801 mit diesen Kanälen schwer zu treffen.

Zuletzt wäre auch ein Angreifen von MK-801 als Agonist an der physiologischen Bindungsstelle von Glutamat bzw. NMDA am NMDA-Rezeptor selber denkbar. Dafür spricht, dass MK-801 seine Struktur mit einem hydrophoben aromatischen Teil und einem basischen Stickstoffatom mit vielen anderen im ZNS aktiven Substanzen gemeinsam hat, welche nicht im Ionenkanal, sondern an den physiologischen Bindungsstellen ihrer Rezeptoren binden [Leeson et al. 1990]. Ein eindeutiger Beweis für eine solche Bindung von MK-801 am NMDA-Rezeptor fehlt jedoch bisher.

Insgesamt ist die Anzahl der transmembranösen Calciumkanäle bei Keratinozyten groß und es sind noch lange nicht alle Kanäle identifiziert. Allein die TRP-Familie beinhaltet viele verschiedene Kanäle, die durch unterschiedlichste Mechanismen, wie Leerung der intrazellulären Calciumspeicher, second messenger [IP₃, Diacylglycerin (DAG)], aber auch

Temperatur, Osmolarität und Protonen aktiviert werden können [Mauro 2003]. Welchen Calcium-Kanal oder welche Calcium-Kanäle MK-801 beeinflusst, bleibt noch zu klären.

Die beschriebene durch MK-801 vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration birgt weiterhin einen interessanten Aspekt zur ergänzenden Erklärung der NMDA-Rezeptor-antagonistischen Wirkung von MK-801 bei Keratinozyten. Durch die Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration könnte es zu einer Membrandepolarisation kommen, welche wiederum eine Affinitätsminderung von NMDA zu seinem Rezeptor zur Folge haben könnte. Dies könnte auch erklären, dass MK-801 bei Keratinozyten trotz des bei ihnen vorherrschenden Rezeptor-Subtypen NMDAR2D, für den MK-801 eine eher schwache Affinität besitzt [Fischer et al. 2006, Lynch et al. 1994], die NMDA-Wirkung suffizient inhibiert.

Insgesamt zeigt sich MK-801 in unseren Versuchen als starker NMDA-Rezeptor-Antagonist, dessen hemmende Wirkung auf den NMDA-induzierten Calciumeinstrom jedoch gleichzeitig durch die ebenfalls durch MK-801 selber verursachte Erhöhung der keratinozytären Calciumkonzentration überlagert wird. Die Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration wird dabei vermutlich durch andere Kanäle als den NMDA-Rezeptor vermittelt. Bei niedrigen MK-801-Konzentrationen ist dabei in der Summe noch eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung in Bezug auf die Calciumkonzentration zu verzeichnen, bei Konzentrationen ab 100 μ M überwiegt in unseren Versuchen der jedoch der Eigeneffekt und ist mit dem von NMDA 50 μ M vergleichbar.

5.1.3. AP 5

In unseren Versuchen zeigte sich AP 5 bei NHEK als wirksamer NMDA-Rezeptor-Antagonist ohne zytotoxisches Potenzial und ohne eigenen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration.

Es handelt sich bei unseren Untersuchungen nach Lage der Literatur um die ersten Untersuchungen zur möglichen Zytotoxizität von AP 5 bei Keratinozyten. Anhand unserer Ergebnisse konnte keine Zytotoxizität von AP 5 bei NHEK nachgewiesen werden. Auffällig war, dass bei einer Konzentration von 50 μ M sowohl nach 24h als auch nach 48h ein proliferativer Effekt von AP 5 zu verzeichnen war. Proliferation findet bei Keratinozyten v.a. bei niedriger extrazellulärer Calciumkonzentration statt, welche mit einer niedrigen intrazellulären Calciumkonzentration verknüpft ist [Kruszewski et al. 1991; Landsdown 2002]. Zusätzlich kann auch ein kurzfristiger intrazellulärer Calciumkonzentrationsanstieg eine proliferative Wirkung haben [Sharpe et al. 1989; Sharpe et al. 1993]. Die Bedingungen

niedriger intrazellulärer Calciumkonzentration müssten durch AP 5 gegeben sein. Dass dennoch nur bei 50 μ M eine Proliferation sichtbar ist, könnte an einem „on/off-Mechanismus“ liegen: bei niedrigen Konzentrationen (<50 μ M) ist die Wirkstärke von AP 5 noch nicht ausreichend, um eine hinreichend geringe intrazelluläre Calciumkonzentration zu induzieren, bei höheren Konzentrationen (>50 μ M) wird die AP 5-Wirkung durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus wiederum abgeschwächt. Da es sich hier nur um eine einzige Konzentration handelt, ist dieser Erklärungsansatz aber vielleicht etwas spekulativ. Zudem widerspricht dies augenscheinlich zunächst unseren Calciumkonzentrationsmessungen, in denen auch bei AP 5-Konzentrationen <50 μ M und >50 μ M die Blockierung des Calciumeinstroms komplett war. Hier war aber der Messzeitraum wesentlich kürzer (20 Min.) als bei den Zytotoxizitäts-/Proliferationsversuchen (48h). Zu bedenken ist außerdem, dass dieses Erklärungsmodell zur Voraussetzung hat, dass in den verwendeten Keratinozytenkulturen immer eine gewisse Menge an NMDA-Rezeptor-Agonisten, z.B. Glutamat, vorhanden ist, da sonst die Anwesenheit von AP 5 überhaupt keine Auswirkungen hätte. Die zweifelsohne wichtigste Aussage der Zytotoxizitätsuntersuchungen zu AP 5 ist jedoch, dass AP 5 in den gemessenen Konzentrationen bei NHEK kein zytotoxisches Potenzial aufwies und so eine Grundvoraussetzung für die etwaige Anwendung als NMDA-Rezeptor-Antagonist in der experimentellen Dermatologie erfüllt.

Weiterhin zeigte sich AP 5 in den Calciumkonzentrationsmessungen als potenter NMDA-Rezeptor-Antagonist. Dabei war eine Konzentrationsabhängigkeit der antagonistischen Wirkung von AP 5 zu verzeichnen. Ab einer Konzentration von 10 μ M hemmte AP 5 den zu erwartenden NMDA-induzierten Calciumkonzentrationsanstieg komplett.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der neurologischen in vitro-Forschung. AP 5 und AP 7 stellen die „Leitsubstanzen“ in der Entwicklung der meisten kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten dar. Ausgehend von ihrer Grundstruktur, einer 5- bzw. 7-kettigen ω -Phosphono- α -Carboxyl-Aminosäure, wurden eine Reihe anderer kompetitiver Antagonisten entwickelt. Für die antagonistische Potenz sind dabei mehrere strukturelle Faktoren entscheidend: 1. die Kettenlänge: diese muss länger als Glutamat sein, die optimale Länge für eine hohe antagonistische Potenz liegt bei 3 (AP 5) oder 5 (AP 7) Atomen zwischen den Säuregruppen, 2. optische Isomerie: D-Formen sind in der Regel 10-50 mal stärker wirksam als die L-Formen, 3. der Substituent am ω -Ende: am effektivsten ist hier eine Phosphono-Gruppe [Olverman et al. 1988; Jane et al. 1995]. Ein Erklärungsmodell für die antagonistische Wirkung derart konfigurierter Aminosäuren ist, dass sie den Ionenkanal verlegen, wenn sie an der Glutamatbindungsstelle binden. Dies wäre für kürzere Ketten oder längere Ketten in L-

Konfiguration nicht möglich. Bis heute ist AP 5 einer der potentesten Vertreter dieser kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Nur wenige neuere Entwicklungen wie das AP 7-Analog CPP [4-(3-phosphonopropyl)piperazine-2-carboxylic acid], oder die AP 5-Analoga CGP 39653 [(RS)-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentnoic acid] und CGS 19755 [(2RS, 4SR)-4-phosphonomethyl-2-piperidine carboxylic acid] besitzen eine höhere Affinität zum NMDA-Rezeptor als AP 5 selbst [Jane et al. 1995]. In der neurologischen Forschung wurde die Wirksamkeit von AP 5 geprüft, indem die Affinität zum NMDA-Rezeptor sowie die Inhibitionsfähigkeit NMDA-induzierter elektrischer Potenziale gemessen wurde [Olverman et al. 1988; Evans et al. 1982]. Der direkte Einfluss auf die Calciumkonzentration einzelner Zellen, wie in unseren Experimenten, wurde nicht gemessen, ein Vergleich der Potenz von AP 5 bei Neuronen und Keratinozyten (beispielsweise Schwellenkonzentrationsvergleich der Hemmung) ist also nicht direkt möglich. Bei beiden Zellarten ist aber konzentrationsabhängig eine komplette Hemmung der NMDA-vermittelten Effekte möglich [Davies et al. 1981]. Neben der hohen antagonistischen Potenz zeichnet sich AP 5 in neurologischen *in vitro*-Experimenten durch seine strenge Selektivität für den NMDA-Rezeptor aus [Foster, Fagg 1987], was sowohl im experimentellen Bereich, als auch bei einem eventuellen medikamentösen Einsatz von Vorteil ist. Allerdings gibt es bei *in vivo*-Versuchen auch Hinweise auf eine mögliche agonistische Potenz von AP 5 [Hara et al. 1997] sowie eine antagonistische Wirkung an einer Subpopulation von Quisqualat-Rezeptoren [Raigorodsky, Urca 1990]. Eine Erklärung für letzteres könnte sein, dass Quisqualat in höheren Konzentrationen auch an NMDA-Rezeptoren bindet, dass es sich also auch in diesem Fall um NMDA-Rezeptoren und nicht um „Quisqualat-Rezeptoren“ gehandelt haben könnte, an die AP 5 gebunden hat. Zudem sind *in vivo*-Versuche durch eine ungleich höhere Komplexität als *in vitro*-Versuche gekennzeichnet, was eindeutige Interpretationen der Ergebnisse schwieriger macht. Weitere Untersuchungen sind hier sicherlich notwendig. Explizite Untersuchungen zur Selektivität von AP 5 bei Keratinozyten fehlen bisher.

Die Wirkung von AP 5 bei Keratinozyten wurde bisher erst in zwei Arbeiten beschrieben [Fuziwara et al. 2003; Nahm et al. 2004]. Die Daten aus diesen Untersuchungen stimmen mit unseren Daten überein, die AP-5 als potenten NMDA-Rezeptor-Antagonisten zeigen. Fuziwara et al. untersuchten den Effekt von NMDA, D-AP 5 und MK-801 auf die Hautbarrierewiederherstellung bei haarlosen Mäusen. Während NMDA die Barrierewiederherstellung verzögerte, wurde dieser Prozess von AP 5 und MK-801 beschleunigt. Dabei zeigte AP 5 eine stärkere Wirksamkeit als MK-801 [Fuziwara et al. 2003]. Auch gibt es keinen Hinweis auf eine NMDA-Rezeptor-agonistische Aktivität von AP

5 bei Keratinozyten, wenngleich dieses aufgrund der Versuchsmethode aber auch nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Nahm et al. testeten bei kultivierten Keratinozyten mittels Fluoreszenzmessungen den Einfluss von NMDA, DL-AP 5 und MK-801 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Der durch NMDA induzierte Calciumkonzentrationsanstieg wurde hier durch AP 5 (100 μ M) komplett inhibiert, der gleiche Effekt wurde aber auch von MK-801 (10 μ M) erzielt. Eine Aussage über eine NMDA-Rezeptor-agonistische Wirkung von AP 5 kann aus methodischen Gründen (Messung relativer Änderung der Calciumkonzentration nach Inkubation mit AP 5) nicht getroffen werden [Nahm et al. 2004].

Bemerkenswert ist, dass sowohl in unseren Versuchen, als auch in denen von Nahm et al. DL-AP 5 und nicht die zumindest bei Neuronen wirksamere reine D-Form verwendet wurde. Die Affinität von D-AP 5 zum NMDA-Rezeptor ist bei Neuronen etwa 65 mal höher als für L-AP 5 [Olverman et al. 1988]. Dennoch zeigte DL-AP 5 bei Keratinozyten eine hohe antagonistische Potenz, ausreichend für die komplette Blockung der NMDA-Wirkung schon in niedrigen Konzentrationen. Dies könnte für eine geringere Stereospezifität von AP 5 beim keratinozytären NMDA-Rezeptor, also dem Rezeptorsubtyp NMDAR2D sprechen.

Zusammenfassend stellt AP 5 anhand unserer Daten bei Keratinozyten einen potenten NMDA-Rezeptor-Antagonisten ohne zytotoxische Wirkung und ohne eigenen Einfluss auf die Calciumkonzentration dar, was ihn für einen zukünftigen Einsatz als NMDA-Rezeptor-Antagonisten in der experimentellen Dermatologie interessant macht.

5.1.4. D-Glutamat

D-Glutamat erwies sich in der vorliegenden Arbeit bei NHEK als nicht-toxische Substanz mit NMDA-Rezeptor-antagonistischer Wirkung. Weiterhin bewirkte D-Glutamat aber auch selber eine Steigerung der intrazellulären keratinozytären Calciumkonzentration.

In den Zytotoxizitätsuntersuchungen wies D-Glutamat dabei weder nach 24h noch nach 48h in den gemessenen Konzentrationen bis 200 μ M ein zytotoxisches Potenzial auf. Auch eine proliferative Wirkung konnte anhand unserer Untersuchungen nicht verzeichnet werden. Unsere Experimente stellen laut Literaturlage bisher die ersten Untersuchungen zur möglichen Zytotoxizität von D-Glutamat bei Keratinozyten dar. Die Ergebnisse für D-Glutamat sind mit denen von MK-801 vergleichbar (weder Zytotoxizität noch Proliferation). Beide Substanzen haben eine ähnliche Wirkung auf die intrazelluläre keratinozytäre Calciumkonzentration (einerseits NMDA-Rezeptor-antagonistische Aktivität, andererseits eigene Erhöhung der Calciumkonzentration), was mit dem ähnlichen Verhalten bezüglich Zytotoxizität und Proliferation verknüpft sein könnte. Entscheidend für unsere Versuche ist

jedoch die Feststellung, dass kein Anhalt für eine Zytotoxizität von D-Glutamat bestand und somit auch keine Verfälschungen der Calciumkonzentrationsmessungen zu erwarten waren. Die bereits beschriebene NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung von D-Glutamat wurde in unseren Versuchen daraus ersichtlich, dass sich bei den Calciumkonzentrationsmessungen nach Zugabe von NMDA zu den mit D-Glutamat inkubierten Zellen keine weitere statistisch signifikante Zunahme der Calciumkonzentration zeigte. D-Glutamat zeigte somit eine starke NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung. Andererseits hatte D-Glutamat, wie bereits genannt, selber einen steigernden Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit bei der Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration sowie bei der Hemmung des Calciuminfluxes konnte dabei nicht festgestellt werden. Der eigene Einfluss auf die Calciumkonzentration war insgesamt etwas geringer als der von MK-801 (D-Glutamat: max. 40% reaktive Zellen; MK-801: max. 56% reaktive Zellen) und auch in jeder Konzentration signifikant geringer als der von NMDA 50 μ M.

Insgesamt legen die Daten nahe, dass es sich bei D-Glutamat um einen Partialagonisten am NMDA-Rezeptor handelt, also um einen Liganden mit sowohl agonistischen als auch antagonistischen Eigenschaften. Dass D-Glutamat prinzipiell eine agonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor hat, steht im Einklang mit den Ergebnissen der neurologischen Forschung. Hier ist D-Glutamat als unspezifischer Glutamatrezeptor-Agonist bekannt. Gemessen wurde in den meisten Studien der Einfluss auf das Membranpotenzial von Neuronen. Hier zeigte D-Glutamat wie L-Glutamat, NMDA und andere exzitatorische Aminosäuren auch, eine exzitatorische Wirkung [Curtis, Watkins 1963; Watkins 1986; Curtis et al. 1961]. Angaben über die Stärke der Wirkung variieren. Einige Studien zeigen eine gleichstarke exzitatorische Potenz von L- und D-Glutamat [Watkins 1986; Curtis et al. 1961], andere sprechen für eine geringere Wirksamkeit von D-Glutamat im Vergleich zu L-Glutamat [Olverman et al. 1988; Curtis, Watkins 1963], wobei von Olverman et al. die Affinität zur Bindungsstelle und nicht die Aktivität gemessen wurde. Die Affinität unterschied sich jedoch deutlich [Dissoziationskonstante (K_d) D-Glutamat: 49 μ M; K_d L-Glutamat: 0,9 μ M]. Im Vergleich zu NMDA war die Affinität/Aktivität von D-Glutamat jedoch immer geringer, was für D-Glutamat als Partialagonisten am NMDA-Rezeptor spricht [Curtis et al. 1961; Olverman et al. 1988; Curtis, Watkins 1963]. Dass die exzitatorische Wirkung von D-Glutamat bei Neuronen (zumindest teilweise) auch tatsächlich auf eine Bindung an den NMDA-Rezeptor zurückzuführen ist, wird in einigen Untersuchungen dadurch belegt, dass D-Glutamat mit spezifischen NMDA-Rezeptor-Antagonisten um dieselbe Bindungsstelle konkurriert

[Olverman et al. 1988; Watkins, Evans 1981]. Aber auch eine Bindung an andere Rezeptoren ist möglich. Hier kommen insbesondere andere ionotrope oder metabotrope Glutamatrezeptoren in Betracht. In einer Studie gibt es Hinweise darauf, dass D-Glutamat an Rezeptoren angreift, an denen Quisqualat bindet, also v.a. an AMPA-Rezeptoren und metabotropen Rezeptoren [Watkins, Evans 1981]. Prinzipiell kommen diese verschiedenen Möglichkeiten der D-Glutamat-Wirkung auch als Erklärungsmodell für den durch D-Glutamat verursachten Calciuminflux bei Keratinozyten in Frage. Außer unseren Untersuchungen existieren bei Keratinozyten keine Daten bezüglich des Einflusses von D-Glutamat auf die Calciumkonzentration. In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe haben wir jedoch die Auswirkung von L-Glutamat auf die Calciumkonzentration kultivierter Keratinozyten (NHEK) sowie deren Antagonisierung durch AP 5 untersucht. Es zeigte sich, dass L-Glutamat und D-Glutamat in quantitativ vergleichbarer Weise zu einer Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration führen (L-Glutamat bis zu 44% reaktive Zellen, D-Glutamat bis zu 40% reaktive Zellen) [Fischer et al. 2007]. Im Vergleich zu NMDA stellt dies jedoch eine geringere Potenz von D- und L-Glutamat dar, was auf eine schwächere agonistische oder partialagonistische Wirkung von D- und L-Glutamat schließen lässt. Interessanterweise wurde der L-Glutamat vermittelte Calciumkonzentrationsanstieg nicht komplett durch AP 5 verhindert (noch 20% reaktive Zellen), was dafür spricht, dass auch bei Keratinozyten andere Rezeptoren als der NMDA-Rezeptor durch L-Glutamat und dann vermutlich auch durch D-Glutamat stimuliert werden [Fischer et al. 2007].

Ob ein Stoff eine agonistische oder antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor hat, hängt wesentlich mit der Kettenlänge zusammen. Aminosäuren, die eine kurze Kette besitzen, mit zwei oder drei Atomen zwischen den Säureenden wie Aspartat oder Glutamat, haben im Allgemeinen eine agonistische Aktivität, wobei hier kein wesentlicher Unterschied zwischen den D- und L-Formen besteht. Stoffe mit längeren Ketten besitzen dagegen eine antagonistische Wirkung, wobei hier die D-Formen die höhere Aktivität haben (s.o.) [Olverman et al. 1988]. Glutamat mit einer Kettenlänge von drei Atomen zwischen den Säureresten könnte somit in seiner D-Form den Übergang zwischen der Agonist- und Antagonist-Struktur bilden und damit beide Eigenschaften besitzen, also Partialagonist sein [Jane et al. 1995]. Dass dies allein den Grund für die Inhibierung der NMDA-Aktivität darstellt, ist jedoch fraglich, da bisherige Untersuchungen dafür sprechen, dass NMDA eine höhere Affinität zum NMDA-Rezeptor besitzt als D-Glutamat. Anhand unserer Ergebnisse müsste die Affinität von D-Glutamat aber größer sein als die von NMDA, so dass D-Glutamat die Bindung von NMDA also suffizient hemmt, jedoch selber eine geringere intrinsic activity

als NMDA besitzt und daher zu einem im Vergleich mit NMDA geringeren Calciumeinstrom führt. Dies scheint eher unwahrscheinlich, ist aber zu diskutieren, da es sich um Keratinozyten handelt und über die Wirkung von D-Glutamat an dem kürzlich hier identifizierten Subtyp NMDAR2D bisher nichts bekannt ist.

Eine andere plausible Erklärung wäre, dass D-Glutamat die Affinität von NMDA zu seinem Rezeptor mindert oder andersartig das NMDA-Rezeptor-Verhalten beeinflusst. Wie oben aufgeführt, ist es wahrscheinlich, dass D-Glutamat außer an den NMDA-Rezeptor auch an andere Glutamatrezeptoren bindet und so beispielsweise das Membranpotenzial beeinflussen könnte, was wiederum eine Auswirkung auf die Bindung von NMDA zum NMDA-Rezeptor haben könnte.

Außer in der vorliegenden Arbeit wurde bisher nur in einer Arbeit von Fuziwara et al. die Wirkung von D-Glutamat auf Keratinozyten untersucht [Fuziwara et al. 2003]. Es handelt sich hier um funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung von NMDA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die Hautbarrierewiederherstellung. Der Einfluss auf die Calciumkonzentration wurde nicht gemessen. In dieser Studie zeigte D-Glutamat eine schwache, aber signifikante Beschleunigung der Hautbarrierewiederherstellung, was für eine schwache NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung spricht und prinzipiell mit unseren Ergebnissen von D-Glutamat als Partialagonisten bei Keratinozyten vereinbar ist.

Insgesamt handelt es sich bei D-Glutamat nach unseren Ergebnissen um einen Partialagonisten am keratinozytären NMDA-Rezeptor und nicht um einen reinen Antagonisten, was ihn für den Einsatz als NMDA-Rezeptor-Antagonisten in der dermatologischen Forschung problematisch erscheinen lässt.

6. Zusammenfassung

In letzter Zeit wurden zunehmend Rezeptoren neurogenen Ursprungs in der Epidermis beschrieben. Einen Vertreter dieser Gruppe stellt der NMDA-Rezeptor dar. Durch eine Regulierung der Calciumkonzentration von Keratinozyten besitzt er vermutlich einen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Epidermis. Über die Wirkung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten ist dabei wenig bekannt. Bisher wurde in der experimentellen Dermatologie der „Standard“-NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 verwendet, wobei es in der Literatur Hinweise gibt, dass MK-801 am keratinozytären NMDA-Rezeptor nur schwach antagonistisch wirksam ist sowie möglicherweise selbst einen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hat und ein zytotoxisches Potenzial bei Keratinozyten besitzt. Für andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten gibt es bisher kaum Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung der NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat bei NHEK bezüglich Zytotoxizität, NMDA-Rezeptor-antagonistischer Wirkung sowie des eigenen Einflusses auf die intrazelluläre Calciumkonzentration untersucht und verglichen.

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden mittels Kristallviolett-Methode durchgeführt. Dabei wiesen weder MK-801, noch AP 5 oder D-Glutamat eine zytotoxische Wirkung auf.

Der Einfluss von MK-801, AP 5 und D-Glutamat auf den durch NMDA induzierten Calciumeinstrom wurde mittels Fluoreszenzmessung am Laser-Scanning Mikroskop untersucht. Dabei zeigten alle Substanzen eine signifikante Inhibition des NMDA-induzierten Calciumeinstroms, also eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung. Für AP 5 konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Calciuminfluxes nachgewiesen werden.

Der Einfluss der drei Antagonisten selber auf die intrazelluläre keratinozytäre Calciumkonzentration wurde ebenfalls mittels Laser-Scanning Mikroskopie gemessen. Hier führten interessanterweise sowohl MK-801 als auch D-Glutamat zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, während AP 5 keinen Einfluss auf die Calciumkonzentration hatte. Dabei wird der MK-801-induzierte Calciumeinstrom vermutlich durch andere Calciumkanäle als den NMDA-Rezeptor vermittelt. Die durch D-Glutamat bedingte Calciumkonzentrations-Erhöhung ist wahrscheinlich auf die partialagonistischen Eigenschaften von D-Glutamat am NMDA-Rezeptor und anderen Glutamatrezeptoren der Keratinozyten zurückzuführen.

Insgesamt zeigen unsere Untersuchungen, dass AP 5 aufgrund seiner starken NMDA-Rezeptor-antagonistischen Wirkung ohne eigenen Einfluss auf die Calciumkonzentration und

ohne zytotoxisches Potenzial für den Einsatz als NMDA-Rezeptor-Antagonist bei Keratinozyten besonders gut geeignet ist und MK-801 bzw. D-Glutamat bei Studien zur NMDA-Rezeptor-abhängigen Calciumhomöostase von Keratinozyten vorgezogen werden sollte.

7. Literatur

1. Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 1989; 2: 1257-1263.
2. Al-Hallaq RA, Jarabek BR, Fu Z, Vicini S, Wolfe BB, Yasuda RP. Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1119-1127.
3. Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 101S-107S.
4. Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 1998; 18: 581-589.
5. Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E. Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 1998; 395: 913-917.
6. Asztély F, Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 1996; 12: 1-11.
7. Aufiero B, Guo M, Young C, Duanmu Z, Talmar H, Lee HK, Murakawa JM. *Staphylococcus aureus* induces the expression of tumor necrosis factor- α in primary human keratinocytes. *Int J Dermatol* 2007; 46: 687-694.
8. Baunez C, Amalric M. Evidence for functional differences between entopeduncular nucleus and substantia nigra: effects of APV (DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid) microinfusion on reaction time performance in the rat. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 1972-1982.
9. Benveniste M, Mayer ML. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys J* 1991; 59: 560-573.
10. Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, Harris J, Pillai S. Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 1996; 97: 1085-1093.
11. Black J. Introduction. In: Leff P (Ed) *Receptor-based drug design*. Marcel Dekker, New York, 1998. S. 3-5.
12. Blaise M-C, Sowdhamini R, Pradhan N. Comparative analysis of different competitive antagonists interaction with NR2A and NR2B subunits of N-methyl-D-aspartate (NMDA) ionotropic glutamate receptor. *J Mol Model* 2005; 11: 489-502.

13. Carrozza DP, Ferraro TN, Golden GT, Reyes PF, Hare TA. In vivo modulation of excitatory amino acid receptors: microdialysis studies on N-methyl-D-aspartate-evoked striatal dopamine release and effects of antagonists. *Brain Res* 1992; 574: 42-48.
14. Chattopadhyay N, Mithal A, Brown E. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr Rev* 1996; 17: 289-307.
15. Christine CW, Choi. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* 1990; 10: 108-116.
16. Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. Actions of amino-acids on the isolated hemisectioned spinal cord of the toad. *Br J Pharmacol* 1961; 16: 262-283.
17. Curtis DR, Watkins JC. Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J Physiol* 1963; 166: 1-14.
18. Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport* 1997; 8: 941-946.
19. Davies J, Francis AA, Jones AW, Watkins JC. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci Lett* 1981; 21: 77-81.
20. Davies J, Watkins JC. Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord. *Brain Res* 1982; 235: 378-386.
21. Denda M, Fuziwara S, Inoue K. β 2-adrenergic receptor antagonist accelerates skin barrier recovery and reduces epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 142-148.
22. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61.
23. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative diseases: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 81: 163-221.
24. Du J, Zhou S, Coggeshall RE, Carlton SM. N-methyl-D-aspartate-induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. *Neuroscience* 2003; 118: 547-562.
25. Eckert RL. Structure, function and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 1989; 69: 1316-1346.

26. Elias PM, Nau P, Hanley K, Cullander C, Crumrine D, Bench G, Sideras-Haddad E, Mauro T, Williams ML, Feingold KR. Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 399-404.
27. Evans RH, Francis AA, Jones AW, Smith DA, Watkins JC. The effects of a series of ω -phosphonic α -carboxylic amino acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations. *Br J Pharmacol* 1982; 75: 65-75.
28. Evans RH, Watkins JC. Pharmacological antagonists of excitant amino acid action. *Life Sci* 1981; 28: 1303-1308.
29. Fagan BM, Cahusac PM. Evidence for glutamate receptor mediated transmission at mechanoreceptors in the skin. *Neuroreport* 2001; 12: 341-347.
30. Fischer G, Mutel V, Trube G, Malherbe P, Kew JN, Mohacsi E, Heitz MP, Kemp JA. Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterisation in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1285-1292.
31. Fischer M, Fiedler E, Seidel C, Meiss F, Klapperstück T, Helmbold P, Dammann R. Cultivated keratinocytes express N-methyl-D-aspartate receptors of the NMDAR2D type. *Arch Dermatol Res* 2006; 297: 316-318.
32. Fischer M, Glanz D, Urbatzka M, Brzoska T, Abels C. Keratinocytes: a source of the transmitter l-glutamate in the epidermis. *Exp Dermatol* (im Druck).
33. Fischer M, Glanz D, William T, Klapperstück T, Wohlrab J, Marsch WC. N-methyl-D-aspartate receptors influence the intracellular calcium concentration of keratinocytes. *Exp Dermatol* 2004a; 13: 512-519.
34. Fischer M, Waltermann K, Fiedler E, Glanz D, Presek P, Brzoska T, Abels C. The effect of D-glutamate and L-glutamate on cultured human keratinocytes. *Int J Cosmet Sci* 2007; 29: 223.
35. Fischer M, William T, Helmbold P, Wohlrab J, Marsch WC. Expression of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR1) depends on formation of the granular layer – analysis in diseases with parakeratotic cornification. *Arch Dermatol Res* 2004b; 296: 157-162.
36. Forslind B, Werner-Linde Y, Lindberg M, Pallon J. Elemental analysis mirrors epidermal differentiation. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 12-17.

37. Foster AC, Fagg GE. Comparison of L-[³H]glutamate, D-[³H]aspartate, DL-[³H]AP 5 and [³H]NMDA as ligands for NMDA receptors in crude postsynaptic densities from rat brain. *Eur J Pharmacol* 1987; 133: 291-300.
38. Foster AC, Wong EH. The novel anticonvulsant MK-801 binds to the activated state in the N-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 1987; 91: 403-409.
39. Fuziwara S, Inoue K, Denda M. NMDA-type glutamate receptor is associated with cutaneous barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 1023-1029.
40. Genever PG, Maxfield SJ, Kennovin GD, Maltman J, Bowgen CJ, Raxworthy MJ, Skerry TM. Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 337-342.
41. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986; 159: 109-113.
42. Glaesser D, Iwig M, Ngoli D, Udelnow C. Alkalinization stimulates Ca²⁺-dependent spreading during the activation of resting lens epithelial cells in primary culture. *Cell Tissue Kinet* 1984; 17: 557-571.
43. Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1948-1965.
44. Halliwell RF, Peters JA, Lambert JJ. The mechanism of action and pharmacological specificity of the anticonvulsant NMDA antagonist MK-801: a voltage clamp study on neuronal cells in culture. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 480-494.
45. Hara S, Mukai T, Kuriwa F, Iwata N, Yanase T, Kano S, Endo T. Distinct effects of MK-801 and (±)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid on N-methyl-D-aspartate-induced rise of brain temperature in rats. *Life Sci* 1997; 61: PL289-PL294.
46. Hardingham GE, Bading H. The yin and yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 2003; 26: 81-89.
47. Hashimoto K. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Derm Sci* 2000; 24: S46-S50.
48. Hebert S, Brown E. The extracellular calcium receptor. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 484-492.
49. Hennings H, Holbrook KA. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res* 1983; 143: 127-142.

50. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980; 19: 245-254.
51. Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6031-6036.
52. Hiramatsu M, Cho AK, Nabeshima T. Comparison of the behavioral and biochemical effects of the NMDA receptor antagonists, MK-801 and phencyclidine. *Eur J Pharmacol* 1989; 166: 359-366.
53. Hoogduijn MJ, Hitchcock IS, Smit NP, Gillbro JM, Schallreuter KU, Genever PG. Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF. *Pigment Cell Res* 2006; 19: 58-67.
54. Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, Hagen FS. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 1991; 252: 1318-1321.
55. Huettner JE, Bean BP. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 1307-1311.
56. Humphrey PPA. The characterisation and classification of neurotransmitter receptors. In: Trist DG, Humphrey PPA, Lett P, Shankley NP (Eds) *Receptor classification. The integration of operational, structural, and transductional information.* *Ann N Y Acad Sci* 1997; 812: 1-13.
57. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S. Molecular characterization of the family of the N-Methyl-D-Aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 1993; 268: 2836-2843.
58. Jafari-Sabet M. NMDA receptor antagonists antagonize the facilitatory effects of post-training intra-basolateral amygdala NMDA and physostigmine on passive avoidance learning. *Eur J Pharmacol* 2006; 529: 122-128.
59. Jane DE, Olverman HJ, Watkins JC. Agonists and competitive antagonists: structure-activity and molecular modelling studies. In: Collinridge GL, Watkins JC (Eds) *The NMDA Receptor. 2. Auflage.* Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1995. S. 31-104.

60. Javitt DC, Zukin SR. Biexponential kinetics of [³H]MK-801 binding: evidence for access to closed and open N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Mol Pharmacol* 1989; 35:387-393.
61. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987; 325: 529-531.
62. Kemp JA, Leeson PD. The glycine site of the NMDA receptor – five years on. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 20-25.
63. Kemp JA, Kew JNC. NMDA receptor antagonists. In: Leff P (Ed) *Receptor-based drug design*. Marcel Dekker, New York, 1998. S. 297-321.
64. Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 2005; 179: 4-29.
65. Kinkelin I, Bröcker EB, Koltzenburg M, Carlton SM. Localization of ionotropic glutamate receptors in peripheral axons of human skin. *Neurosci Lett* 2000; 283: 149-152.
66. Klinker R. Erregungsübertragung in Zellverbänden. In: Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S (Hrsg) *Physiologie*. 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2005, S. 79-99.
67. Kloog Y, Nadler V, Sokolowsky M. Mode of binding of [³H]dibenzocycloalkenimine (MK-801) to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and its therapeutic implication. *FEBS Letters* 1988; 230: 167-170.
68. Koek W, Ornstein P. A simple and rapid method for assessing similarities among directly observable behavioral effects of drugs: PCP-like effects of 2-amino-5-phosphonovalerate in rats. *Psychopharmacology* 1987; 91: 297-304.
69. Koek W, Woods JH, Winger GD. MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 969-974.
70. Kornhuber J, Mack-Burkhardt F, Kornhuber ME, Riederer P. [³H]MK-801 binding sites in post-mortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1989; 162: 483.
71. Kruszewski FH, Hennings H, Yuspa SH, Tucker RW. Regulation of intracellular free calcium in normal murine keratinocytes. *Am J Physiol* 1991; 261: C767-C773.
72. Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. Mutation analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 1994; 12: 1291-1300.

73. Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, Mishina M. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 1992; 358: 36-41.
74. Landsdown AB. Calcium: a Potenzial central regulator in wound healing in the skin. *Wound Rep Reg* 2002; 10: 271-285.
75. Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 1997; 18: 493-503.
76. Leeson PD, Carling RW, James K, Smith JD, Moore KW, Wong EH, Baker R. Role of hydrogen bonding in ligand interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel. *J Med Chem* 1990; 33: 1296-1305. Lipp P, Niggli E. Radiometric confocal Ca^{2+} -measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. *Cell Calcium* 1993; 14: 359-372.
78. Lodish H, Berg A, Zipursky SL, Matsudeira P, Baltimore D, Damell JE. *Molekulare Zellbiologie*. Aus dem Englischen übersetzt von Lange C, Mahlke K, Seidler L, Träger L. 4. Auflage. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, 2001, S. 917-983.
79. Löscher W, Hönack D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 1992; 215: 199-208.
80. Lundeberg L, El-Nour H, Mohabbat S, Morales M, Azmitia E, Nordlind K. Expression of serotonin receptors in allergic contact eczematous human skin. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 393-398.
81. Lynch DR, Anegawa NJ, Veerdorn T, Pritchett DB. N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 540-545.
82. MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, Schneiderman JH, Pennefather PS. Actions of Ketamine, Phencyclidine and MK-801 on NMDA Receptor currents in cultured mouse hippocampal neurons. *J Physiol* 1991; 432: 483-508.
83. Maren S, Baudry M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 1995; 63: 1-18.
84. Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 1991; 349: 760-765.

85. Mauro T. "The discovery channel": CRAC'king the code of calcium influx. *J Invest Dermatol* 2003; 121: IX-X.
86. Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 161-181.
87. McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Pharmacol Rev* 1994; 74: 723-760.
88. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trend Pharmacol Sci* 1990; 11: 379-387.
89. Menon G, Grayson S, Elias P. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localisation by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 508-512.
90. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakman B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12: 529-540.
91. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256: 1217-1221.
92. Morhenn VB, Murakami M, O'Grady T, Nordberg J, Gallo RL. Characterization of the expression and function of N-methyl-D-aspartate receptor in keratinocytes. *Exp Dermatol* 2004; 13: 505-511.
93. Morhenn VB, Waleh NS, Mansbridge JN, Unson D, Zolotorev A, Cline P, Toll L. Evidence for an NMDA receptor subunit in human keratinocytes and rat cardiocytes. *Eur J Pharmacol* 1994; 268: 409-414.
94. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen*. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001, S. 62-77.
95. Nahm WK, Philpot BD, Adams MM, Badiavas EV, Zhou LH, Butmarc J, Bear MF, Falanga V. Significance of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated signaling in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2004; 200: 309-317.
96. Nishimura M, Sato K, Okada T, Schloss P, Shimada S, Tohyama M. MK-801 blocks monoamine transporters expressed in HEK cells. *FEBS Letters* 1998; 423: 376-380.
97. Oda Y, Tu CL, Pillai S, Bikle DD. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 1998 ; 273: 23344-23352.

98. Olverman HJ, Jones AW, Mewett KN, Watkins JC. Structure/activity relations of N-methyl-D-aspartate receptor ligands as studied by their inhibition of [³H]D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid binding in rat brain membranes. *Neuroscience* 1988; 26: 17-31.
99. Peters S, Koh J, Choi DW. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* 1987; 236: 589-593.
100. Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Derm Sci* 2000; 22: 71-79.
101. Priestley T, Kemp JA. Kinetic study of the interaction between the glutamate and glycine recognition sites on the N-methyl-D-aspartic acid receptor complex. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 1191-1196.
102. Pullar CE, Rizzo A, Isseroff RR. β -Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem* 2006; 281: 21225-21235.
103. Putney JW Jr. The pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv* 2001; 1: 84-94.
104. Putney JW Jr, Broad LM, Braun F-J, Lievremont J-P, Bird GSJ. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 2001; 114: 2223-2229.
105. Raigorodsky G, Urca G. Spinal antinociceptive effects of excitatory amino acid antagonists: quisqualate modulates the action of N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol* 1990; 182: 37-47.
106. Reynolds IJ, Miller RJ. Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol Pharmacol* 1989; 36: 758-765.
107. Rigby M, Le Bourdelles B, Heavens RP, Kelly S, Smith D, Butler A, Hammans R, Hills R, Xuereb JH, Hill RG, Whiting PJ, Sirinathsinghji DJ. The messenger RNAs for the N-methyl-D-aspartate receptor subunits show region-specific expression of different subunit composition in the human brain. *Neuroscience* 1996; 73: 429-447.
108. Rock DM, Macdonald PL. Polyamine regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 463-482.
109. Schallreuter KU. Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 37-40.
110. Sharpe GR, Fischer C, Gillespie JJ, Greenwall JR. Growth and differentiation stimuli induce different and distinct increase in intracellular free calcium in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1993; 284: 445-450.

111. Sharpe GR, Gillespie JI, Greenwell JR. An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* 1989; 254: 25-28.
112. Skerry TM, Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 174-181.
113. Song I-S, Bunnett NW, Olerud JE, Harten B, Steinhoff M, Brown JR, Sung KJ, Armstrong CA, Ansel JC. Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp Dermatol* 2000; 9: 42-52.
114. Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS. Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett* 1998; 441: 392-396.
115. Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori TA, Yasumatsu N, Kawato S. Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca^{2+} elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2002; 83: 1441-1451.
116. Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H^+ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6445-6449.
117. Tu C-L, Chang W, Bikle DD. The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 41079-41085.
118. Tu C-L, Chang W, Bikle DD. The role of the calcium sensing receptor in regulating intracellular calcium handling in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1074-1083.
119. Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1981; 21: 165-204.
120. Watkins JC. Twenty-five years of excitatory amino acid research. In: Roberts PJ, Storm-Mathisen J, Bradford HJ (Ed) *Excitatory amino acids*. The Macmillan Press LTD, Houndsmill, Basingstoke, Hampshire (usw.), 1986, S. 1-39.
121. Westbrook GL, Mayer ML. Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 1987; 328: 640-643.
122. Whitton PS, Biggs, CS, Pearce BR, Fowler LJ. MK-801 increases extracellular 5-hydroxytryptamine in rat hippocampus and striatum in vivo. *J Neurochem* 1992; 58: 1573-1575.

123. Wong EHF, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7104-7108.
124. Woodruff GN, Foster AC, Gill R, Kemp AJ, Wong EH, Iversen LL. The interaction between MK-801 and receptors for N-methyl-D-aspartate: functional consequences. *Neuropharmacology* 1987; 26: 903-909.
125. Xie Z, Komuves L, Yu Q-C, Elalieh H, Ng DC, Leary C, Crumrine D, Yoshizawa T, Kato S, Bikle DD. Lack of the vitamin D receptor is associated with reduced epidermal differentiation and hair follicle growth. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 11-16.
126. Zouboulis CC. Human skin: an independent peripheral endocrine organ. *Horm Res* 2000; 54: 230-242.

8. Thesen der Arbeit

1. Auch humane Keratinozyten besitzen NMDA-Rezeptoren, welche über eine Regulierung der intrazellulären Calciumkonzentration vermutlich einen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Epidermis haben.
2. Über die Wirkung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten ist dabei wenig bekannt. Für den bisher in der experimentellen Dermatologie verwendeten „Standard“-NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 gibt es Hinweise, dass er am keratinozytären NMDA-Rezeptor nur schwach antagonistisch wirksam ist sowie möglicherweise selbst einen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hat und ein zytotoxisches Potenzial besitzt. Über andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei Keratinozyten ist bisher wenig bekannt.
3. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung der NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat bei NHEK bezüglich Zytotoxizität, NMDA-Rezeptor-antagonistischer Wirkung sowie des eigenen Einflusses auf die intrazelluläre Calciumkonzentration untersucht und verglichen.
4. Mittels Kristallviolett-Methode wurde gezeigt, dass weder MK-801 noch AP 5 oder D-Glutamat eine zytotoxische Wirkung bei NHEK besitzen.
5. In den mittels Fluoreszenzmessungen am Laser Scanning Mikroskop durchgeführten Calciummessungen wiesen alle Effektoren eine signifikante Inhibition des NMDA-induzierten Calciumeinstroms, also eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkung auf. Für AP 5 konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Calciumeinstroms nachgewiesen werden.
6. Sowohl MK-801 als auch D-Glutamat führten selber zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.
7. Der MK-801-induzierte Calciumeinstrom wird vermutlich durch andere Calciumkanäle als den NMDA-Rezeptor vermittelt. Die durch D-Glutamat bedingte Calciumkonzentrations-Erhöhung ist wahrscheinlich auf die partialagonistischen Eigenschaften von D-Glutamat am NMDA-Rezeptor und anderen Glutamatrezeptoren zurückzuführen.
8. AP 5 besaß selber keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration.
9. Anhand unserer Ergebnisse ist AP 5 für den Einsatz als NMDA-Rezeptor-Antagonist bei Keratinozyten gut geeignet und sollte bei Untersuchungen zur NMDA-Rezeptor-abhängigen Calciumhomöostase MK-801 und D-Glutamat vorgezogen werden.

Anhang

Curriculum vitae

Zur Person

Name	Katharina Monika Waltermann
Geburtsdatum	03.03.1976
Geburtsort	Münster
Familienstand	ledig; keine Kinder

Berufliche Tätigkeit

01/2004 - 03/2007	Assistenzärztin an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 12/2007	Assistenzärztin an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsklinik Essen

Universitätsstudium

10/1996 – 11/2003	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
27.11.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1999 – 09/2000	Studium der Humanmedizin an der Universität de Valencia (Spanien) im Rahmen des Sokrates-Studentenaustauschprogramms
10/1995 – 09/1996	Studium der Sozialwissenschaften an der Universität Hannover

Schulbildung

1986 - 1995	Gymnasium Augustinianum in Greven
13.06.1995	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Publikationen

- Waltermann K. Amantadin-induzierte Livedo. J Dtsch Dermatol Ges 2005; 3(S1): S40. (Abstract)
- Waltermann K, Meiß F, Meykadeh N, Marsch WC, Fischer M. Peristomale Dermatitis - eine Herausforderung in Diagnostik und Therapie. J Dtsch Dermatol Ges 2005; 3(S1): S196. (Abstract)
- Waltermann K, Glanz D, Meiss F, Meykadeh N, Presek P, Fischer M. Comparison of the N-methyl-D-aspartate-receptor antagonists MK-801 und AP 5 in keratinocytes. Exp Dermatol 2006; 15: 252. (Abstract)
- Waltermann K, William T, Marsch WC, Fischer M. Spektrum kutaner unerwünschter Wirkungen von 5-Fluorouracil - ein Fallbeispiel. J Dtsch Dermatol Ges 2007; 5(S2): S212. (Abstract)
- Waltermann K, Marsch WC, Kreft B. Kontaktallergie durch Bufexamac unter dem Bild einer chronischen Pigmentpurpura. Hautarzt 2009; 60: 424-427.
- Fischer M, Waltermann K, Fiedler E, Glanz D, Presek P, Brzoska T, Abels C. The effect of D-glutamate and L-glutamate on cultured human keratinocytes. Int J Cosmet Sci 2007; 29: 223.
- Meykadeh N, Waltermann K, Schaller M, Marsch WC, Fischer M. Bullous ulcerating tinea. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2008 [Epub ahead of print]
- Lange D, Oeder C, Waltermann K, Mueller A, Oehme A, Rohrberg R, Marsch W, Fischer M. Bacillary angiomatosis. J Dtsch Dermatol Ges. 2009 [Epub ahead of print]

Mitgliedschaft in wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaft

- Deutsche Dermatologische Gesellschaft

Halle, den 20.07.2009

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

Vergleich der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten MK-801, AP 5 und D-Glutamat bei humanen Keratinozyten

selbständig verfasst habe. Die Arbeit wurde bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich als Dissertation vorgelegt.

Halle, den 20.07.2009

Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

- Waltermann K, Glanz D, Meiss F, Meykadeh N, Presek P, Fischer M. Comparison of the N-methyl-D-aspartate-receptor antagonists MK-801 und AP 5 in keratinocytes. *Exp Dermatol* 2006; 15: 252. (Abstract)
- Fischer M, Waltermann K, Fiedler E, Glanz D, Presek P, Brzoska T, Abels C. The effect of D-glutamate and L-glutamate on cultured human keratinocytes. *Int J Cosmet Sci* 2007; 29: 223.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. habil. W. Ch. Marsch, dem Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Promotion an seiner Klinik. Die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die kontinuierliche Motivation haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Privatdozent Dr. med. habil. Matthias Fischer, der das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Herr PD Dr. Fischer hat die Voraussetzungen geschaffen, diese Arbeit neben dem Klinikalltag bewerkstelligen zu können. Weiterhin möchte ich für das außergewöhnlich große Engagement danken, mit dem Herr PD Dr. Fischer mich sowohl in allen praktischen experimentellen Belangen als auch theoretischen Fragen unterstützt hat. Die wiederholten kritischen Diskussionen haben diese Arbeit maßgeblich geprägt.

Herrn Dr. Dagobert Glanz aus dem Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich herzlichst für die unermüdliche und hervorragende Unterstützung am Laser-Scanning Mikroskop danken.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Frau Annett Thate für ihren engagierten und kompetenten Einsatz in der Zellzucht und bei den Kristallviolett-Versuchen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meinem Freund Jörg und meinen Freunden danken, ohne deren Unterstützung und Rückhalt diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.