



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

# Master Thesis

## Das Biopsie-Hautmodell für Untersuchungen der humanen Pigmentierung

vorgelegt von

Tim Kopplin

Matrikelnummer: 2009970

zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science im Studiengang  
Pharmaceutical Biotechnology

Gutachter:

Prof. Dr. Oliver Ullrich

Dr. André Mahns

Hamburg, April 2013

Die Masterarbeit wurde betreut und erstellt im Labor „Sensitive and Ethnic Skin“ im Arbeitsbereich „Applied Skin Biology“ der Beiersdorf AG in Hamburg.

*„Es ist nicht genug, zu wissen,  
man muss auch anwenden.  
Es ist nicht genug, zu wollen,  
man muss auch tun.“*

(Johann Wolfgang von Goethe - Wilhelm Meisters Wanderjahre)



**Thema der Master-Thesis:**

**Das Biopsie-Hautmodell für Untersuchungen der humanen Pigmentierung**

**Verfasser:** Tim Kopplin  
**1. Betreuer:** Prof. Dr. O. Ullrich  
**2. Betreuer:** Dr. A. Mahns

**Kurzfassung:**

Die Haut ist nicht nur das größte, sondern auch eines der komplexesten Organe des menschlichen Körpers und weist zudem zahlreiche Funktionen auf. Bei der Pigmentierung der Haut, Haare und der Augen spielt die Melanogenese die Schlüsselrolle. Sie beruht auf der Synthese von Melanin in der äußeren Hautschicht, bei der eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer Reaktionen in Melanosomen und Melanozyten ablaufen. Das hieran beteiligte Schlüsselenzym ist die Tyrosinase. Um den komplexen Prozess der Melanogenese besser verstehen zu können, sind in der Hautforschung *in vivo* nahe Hautmodelle gefragt, um Prozesse wie z.B. Wundheilung und Hautkrankheiten zu erforschen oder die Unbedenklichkeit und Wirksamkeit neuer Produkte zu beweisen.

In dieser Masterarbeit wurden Biopsie-Hautmodelle, auf Grund beobachteter nicht-stimulierter Melanogenese durch die alleinige Kultivierung, für Untersuchungen der postinflammatorischen Hyperpigmentierung (PIH) eingesetzt und geprüft, ob es als PIH-Modell angesehen werden kann. Außerdem wurde der Einfluss von Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) auf die Melanogenese, sowohl an Biopsie-Hautmodellen, als auch an Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen und Melanozyten Monolayern untersucht. Des Weiteren wurde die Phagozytoseleistung von Keratinozyten untersucht, um ein Assay-System zur Untersuchung des Einflusses proinflammatorischer Mediatoren auf den Melanosomentransfer zu entwickeln.

Durch den Einsatz eines Tyrosinase-Inhibitors konnte gezeigt werden, dass es sich um Melanogenese handelt. Der Verdacht der PIH konnte hingegen nicht eindeutig bewiesen werden. Außerdem konnte der positive Effekt von  $PGF_{2\alpha}$  auf die Melanogenese in Biopsie-Modellen nicht gezeigt werden, hingegen aber in Kokulturen und Monolayern. Ein Assay zur Untersuchung der Phagozytoseleistung konnte entwickelt werden, wobei der Einfluss proinflammatorischer Mediatoren auf den Melanosomentransfer noch weitergehend geprüft werden muss.

**Schlüsselwörter: Melanogenese, Hautmodelle, PIH, Phagozytose**



**Title of Master-Thesis:**

**The biopsy skin model for investigations of human pigmentation**

**Author:** Tim Kopplin  
**1. Examiner:** Prof. Dr. O. Ullrich  
**2. Examiner:** Dr. A. Mahns

**Abstract:**

The skin is not only the largest, but also one of the most complex organs of the human body with various functions. In the process of pigmentation of skin, hair and eyes the melanogenesis plays the key role. The melanogenesis, with its key enzyme tyrosinase, is based on the synthesis of melanin in the outer dermal layer. Within this process in melanosomes and melanocytes are lapsing a lot of enzymatic and non-enzymatic reactions. To better understand the complex action of melanogenesis, there is sought after *in vivo* near skin models in skin research to investigate, e.g. wound healing and skin diseases, and to proof the harmlessness and efficacy of new products.

In this master thesis, biopsy skin models where used due to the observations of non-stimulated melanogenesis in consequence of sole cultivation, for investigations of the postinflammatory hyperpigmentation (PIH) and to test the applicability as a PIH-model. Furthermore the influence of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) on the melanogenesis in both biopsy skin models and melanocyte-fibroblast-cocultures and melanocyte monolayers was examined. In addition the phagocytosis efficiency of keratinocytes was analysed to develop an assay system for investigations of the influences of proinflammatory mediators on the melanosome transfer process.

By using a tyrosinase inhibitor it could be shown that it is melanogenesis, however the suspicion of PIH could not be proved clearly. Furthermore the positive effect of  $PGF_{2\alpha}$  on the melanogenesis in biopsy skin models could not be shown, in contrast to cocultures and monolayers.

An assay system for investigations of the phagocytosis efficiency could be designed, at which the influences of proinflammatory mediators on the melanosome transfer must be further reviewed.

**Keywords: melanogenesis, skin models, PIH, phagocytosis**

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe.

Die verwendeten Literaturquellen sind im Literaturverzeichnis vollständig zitiert.

Hamburg, den 1. April 2013

Adresse: Ebelingplatz 2  
20537 Hamburg

Unterschrift: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>I Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>III Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Struktur der Haut.....	1
1.2 Grundlagen der Melanogenese .....	5
1.3 Dreidimensionale Vollhautmodelle / Biopsie-Modelle .....	6
1.4 Postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) .....	8
1.5 Zielsetzung.....	11
<b>2 Material .....</b>	<b>12</b>
2.1 Laborgeräte .....	12
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.3 Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.4 Assay-Kit.....	15
2.5 Medien und Lösungen.....	16
<b>3 Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1 Sicherheit und Abfallentsorgung.....	17
3.2 Zellkultur und Kultivierung .....	17
3.3 Isolation primärer Zellen aus Hautabschnitten .....	18
3.3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Melanozyten und Keratinozyten	19
3.3.2 Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten.....	20
3.4 Kryokonservierung und Wiederinkulturnahme primärer Zellen .....	21
3.5 Zellzahlbestimmung mittels NucleoCounter .....	22
3.6 Vitalitätbestimmung mittels LDH-Assay .....	22
3.7 Herstellung von Kokulturen aus Melanozyten und Fibroblasten.....	23
3.8 Herstellung von Kollagengel zur Einbettung der Hautexplantate .....	24
3.9 Herstellung und Kultivierung von Biopsie-Hautmodellen aus Hautexplantaten .....	24

---

3.10	Durchflusszytometrie (FACS) .....	25
3.10.1	Phagozytose-Assay.....	26
3.11	Bestrahlung mit sonnensimuliertem Licht (SSR) .....	27
3.12	Quantifizierung der Melanogenese .....	28
3.12.1	Melaninbestimmung durch Absorptionsmessung .....	28
3.12.2	Tyrosinase-Aktivitäts-Assay .....	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1	Bestimmung der Melanogenese im Randbereich versus Zentrum von Hautbiopsien in Kultur .....	32
4.2	Bestimmung der Melanogenese in Hautbiopsien und in Kokulturen unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ .....	36
4.2.1	Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Melanogenese von Biopsie-Hautmodellen .	36
4.2.2	Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Melanogenese in Kokulturen und Melanozyten-Monolayern .....	38
4.3	Aufbau eines Assay-Systems zur Untersuchung der Phagozytoseleistung primärer humaner Keratinozyten.....	45
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1	Untersuchungen der Rand- und Mittelebereiche von Hautbiopsien auf postinflammatorische Hyperpigmentierung.....	54
5.2	Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Melanogenese von Biopsie-Hautmodellen sowie Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen und Melanozyten-Monolayer.....	58
5.3	Assay-System zur Untersuchung der Phagozytoseleistung primärer humaner Keratinozyten.....	61
5.4	Ausblick.....	65
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>76</b>

## I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt der Haut. ....	2
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt der Epidermis. ....	3
Abbildung 3: Der Melaninsyntheseweg.....	6
Abbildung 4: Postinflammatorische Hyperpigmentierung bei Fitzpatrick Hauttyp IV versus VI. ....	9
Abbildung 5: Aufbau eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (FACS). ....	26
Abbildung 6: Prinzip des Stanzens der Rand- und Mittelebereiche für PIH Untersuchungen.....	33
Abbildung 7: Vitalität von Hautbiopsien in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. ..	33
Abbildung 8: Melaninbestimmung von Hautbiopsien in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. ....	35
Abbildung 9: Vitalität von Hautbiopsien unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. ....	37
Abbildung 10: Melaninbestimmung von Hautbiopsien unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.....	38
Abbildung 11: Tyrosinase-Aktivität der Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen und Melanozyten-Monolayer mit Inserts unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.....	40
Abbildung 12: Tyrosinase-Aktivität der Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen ohne Inserts unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. ....	41
Abbildung 13: Melaninbestimmung von Melanozyten aus Melanozyten-Fibroblasten- Kokulturen und Melanozyten-Monolayer mit Inserts unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. ....	42
Abbildung 14: Melaninbestimmung von Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen ohne Inserts unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. ....	44
Abbildung 15: Phagozytoseleistung unbehandelter Keratinozyten in Vollmedium. .	46
Abbildung 16: Phagozytoseleistung mit Inhibitor vorbehandelten Keratinozyten in Vollmedium. ....	47
Abbildung 17: Phagozytoseleistung behandelter Keratinozyten in Vollmedium. ....	48

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 18: Einfluss von Voll- und Magermedium auf die Phagozytoseleistung unbehandelter Keratinozyten. ....	50
Abbildung 19: Phagozytoseleistung behandelter Keratinozyten in Magermedium. .	51

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Groß- und Kleingeräte. ....	12
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	14
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	14
Tabelle 4: Medien- und Pufferzusammensetzungen in der Zellkultur.....	16
Tabelle 5: Entsprechende Volumina je Flaschentyp bei der Trypsinierung .....	21
Tabelle 6: Zellzahlen für die Kryokonservierung.....	21

### III Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®	eingetragene Marke
°C	Temperatur in Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol pro Liter
bar	Druck
bFGF/ FGF-2	Basic Fibroblast Growth Factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DCT	Dopachrom-Tautomerase
ddH <sub>2</sub> O	bi-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fully Automated Cell Sorter
FCS	fötales Kälberserum
FGF-7/KGF	Fibroblast Growth Factor-7/Keratinocyte Growth Factor
FITC-A	Fluoresceinisothiocyanat-A
FP	PGF <sub>2α</sub> -Rezeptor
FSC	forward scatter
h	Stunde(n)
H <sup>+</sup>	positiv geladenes Ion des Wasserstoffs (Kation)
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
IL	Interleukin
KBM	Keratinocyte Basal Medium

## Abkürzungsverzeichnis

---

KGM	Keratinocyte Growth Medium
kW	Kilowatt
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanin
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar; Mol pro Liter
mAU	milli-absorbance-units
MBM	Melanocyte Basal Medium
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinhydrizon
mg	Milligramm
MGM	Melanocyte Growth Medium
min	Minute(n)
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
NaPi	Natriumphosphat Puffer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAH	Phenylalanin Hydroxylase
PAR-2	2-Furoyl-LIGRLO-amid-Trifluoroacetat-Salz
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PGE/ F <sub>2α</sub>	Prostaglandin E/ F <sub>2α</sub>
PIH	postinflammatorische Hyperpigmentierung
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
rE	relative Einheit(en)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

## Abkürzungsverzeichnis

---

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SSC	side scatter
SSR	sonnensimuliertes Licht
TH	Tyrosinase Hydroxylase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRP	Tyrosine-related protein
TX	Thromboxan
$t_x$	Kultivierungszeit zum Zeitpunkt x Tage
<sup>TM</sup>	eingetragene Marke
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
W	Watt
w/o	without
w/v	Gewicht pro Volumen
W630	Whitening-Wirkstoff 630
z.B.	zum Beispiel

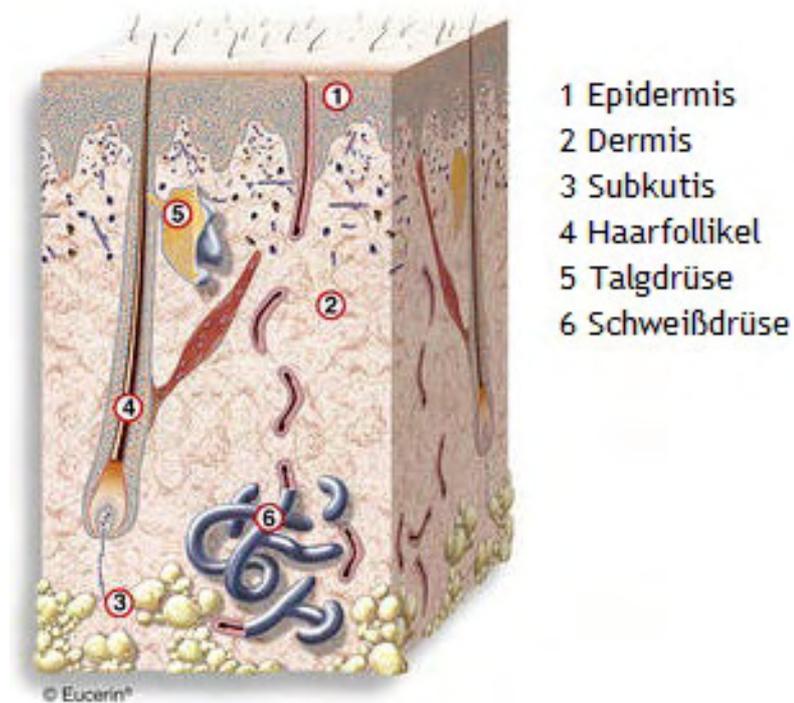
### 1 Einleitung

Ein wichtiger Schutzmechanismus der humanen Haut vor ultravioletter (UV) Strahlung ist die Pigmentierung. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Hautfarbe und dem Risiko an Hautkrebs zu erkranken. Je dunkler der Hauttyp, desto geringer das Risiko (ORTONNE, 2002). In der westlichen Welt wird gebräunte Haut mit Gesundheit und Erfolg assoziiert, weshalb sich immer mehr Menschen nicht nur vermehrt der Sonne, sondern auch künstlichen UV-Strahlen aussetzen, wodurch die Hautkrebserkrankungen drastisch gestiegen sind (BRENNER ET. AL., 2009). Deshalb werden Erforschungen der Pigmentierungsreaktionen und den damit verbundenen biochemischen und zellulären Mechanismen immer bedeutender. In der Grundlagenforschung kommen hierbei Hautmodelle zum Einsatz, die physiologisch möglichst der der nativen Haut entsprechen, um pigmentierungsrelevante Parameter zu untersuchen und näher zu charakterisieren.

#### 1.1 Aufbau und Struktur der Haut

Die Haut ist mit 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> nicht nur das größte, sondern auch eines der komplexesten Organe des Menschen mit ebenso komplexen Funktionen (MADIGAN ET. AL., 2001). Sie stellt die erste Schutzbarriere vor äußeren mechanischen, chemischen, physikalischen, thermischen oder auch mikrobiologischen Einflüssen dar und leistet wichtige Aufgaben bei der Homeostase. Durch die Ausgänge der Schweiß- und Talgdrüsen an der Hautoberfläche ist der Erhalt des Hydrolipidfilms gewährleistet. Hautschädigungen (z.B. durch Verbrennungen) begünstigen Wasser-, Elektrolyt- und Proteinverluste und machen das Eindringen von z.B. Bakterien möglich. Außerdem dient sie als Sinnesorgan zur Reizaufnahme äußerer Einflüsse. Sie ist u.a. mit Vater-Pacini-Körperchen (Vibration), Merkel-Zellen (Druck), Meissnerschen Körperchen (Berührung) und freien Nervenendigungen (Schmerz) ausgestattet. Weitere Funktionen der Haut sind z.B. der Gasaustausch und die Regulation der Körpertemperatur. Des Weiteren ist sie ein wichtiger Teil des Immunsystems und übernimmt mit Hilfe der Langerhans-Zellen somit eine weitergehende wichtige Funktion (TOBIN, 2006; WENDT ET. AL., 2011).

Die Haut besteht aus drei Schichten - der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Corium oder Lederhaut) und der Subkutis (Unterhaut) (KANITAKIS, 2002). Die sogenannten Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel und Drüsen) sind ebenfalls funktionell der Haut zuzuordnen. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der Haut.



**Abbildung 1: Schematischer Querschnitt der Haut.**

Zu sehen ist ein Querschnitt der Haut, mit: 1) Epidermis, 2) Dermis, 3) Subkutis, 4) Haarfollikel, 5) Talgdrüse, 6) Schweißdrüse (INFORMATIONSPROSPEKT EUCERIN®, BEIERSDORF AG, HAMBURG).

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten (ca. 90 %), die durch Desmosomen zusammengehalten werden. Die Epidermis bildet die Schutzhülle gegenüber der Umwelt und wird wiederum in fünf Schichten unterteilt, welche die Differenzierungsstadien der Keratinozyten widerspiegeln (Abbildung 2).

Die einzelnen Schichten sind die Hornschicht (*Stratum corneum*), Glanzschicht (*Stratum lucidum*), Körnerschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und die Basalschicht (*Stratum basale*).

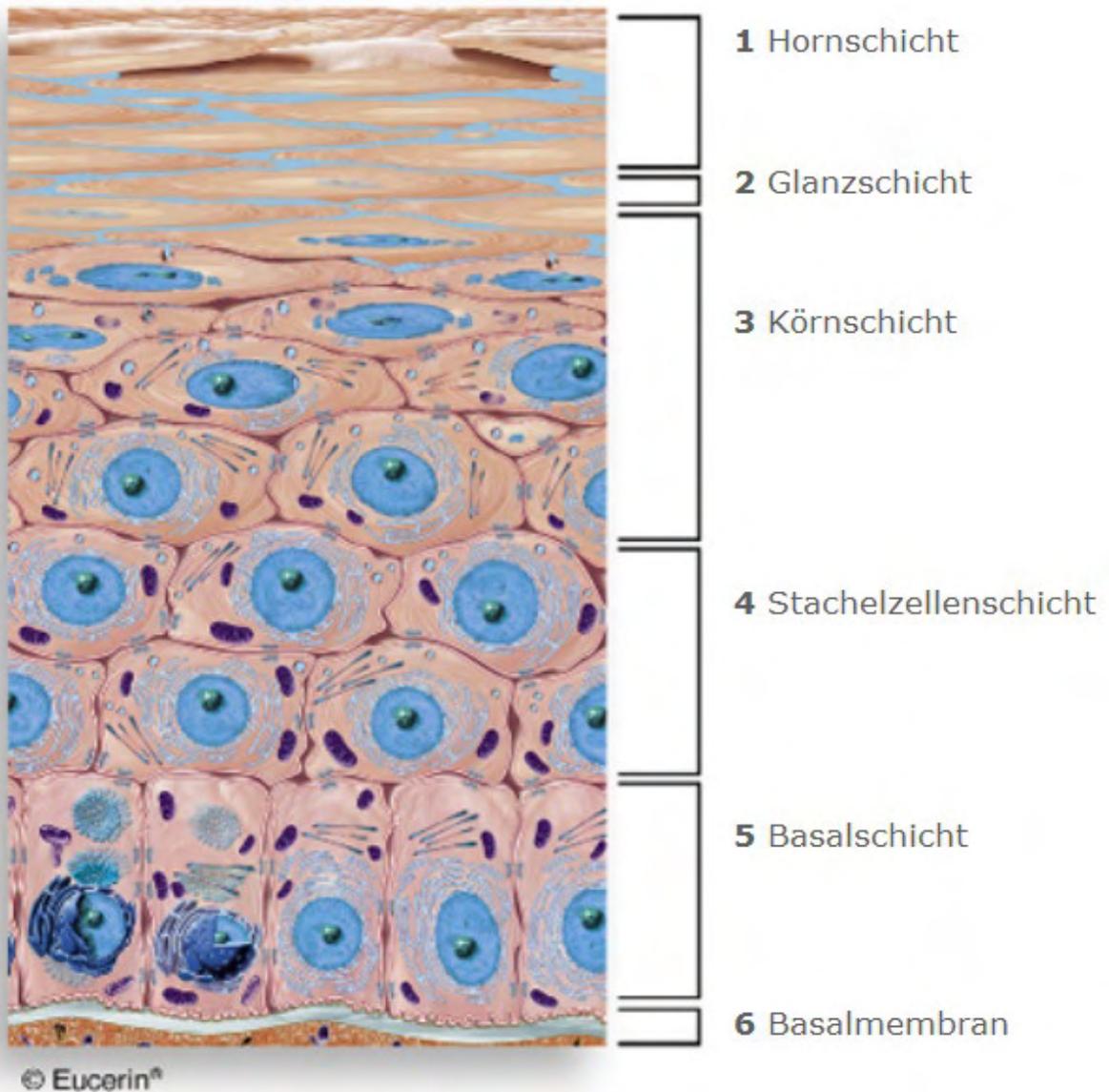


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt der Epidermis.

Zu sehen sind die fünf Schichten der Epidermis. Von oben nach unten: Hornschicht (*Stratum corneum*), Glanzschicht (*Stratum lucidum*), Körnerschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellenschicht (*Stratum spinosum*) und Basalschicht (*Stratum basale*). Die Basalmembran stellt die Abgrenzung zur darunter gelegenen Dermis dar (INFORMATIONSPROSPEKT EUCERIN®, BEIERSDORF AG, HAMBURG).

Die Keratinozyten in der untersten Schicht der Epidermis (*Stratum basale*; Basalschicht) besitzen eine hohe mitotische Aktivität und tragen so zur kontinuierlichen Erneuerung des epidermalen Gewebes bei. Die Keratinozyten vollziehen hier eine asymmetrische Teilung, was bedeutet, dass sich nur eine Zelle aus den beiden bei der Mitose entstehenden Tochterzellen erneut teilt, während die andere binnen etwa 30 Tagen zur Hautoberfläche wandert (SCHOPPMAYER, 2007). Hier befinden sich auch die pigmentbildenden Zellen, die Melanozyten und die Merkel Zellen.

In der darauffolgenden Schicht (*Stratum spinosum*; Stachelzellenschicht) beginnt die Verhornung der Keratinozyten. Sie sind etwas größer, rundlicher und über ihre stachelartigen Fortsätze über Desmosomen miteinander verbunden.

In der Körnschicht (*Stratum granulosum*) sind die Keratinozyten abgeflacht und die Kerne weisen degenerative Änderungen auf.

Das *Stratum lucidum* (Glanzschicht) besitzt lichtbrechende Eigenschaften, die Keratinozyten sind stark abgeplattet und weisen keinerlei subzelluläre Kompartimente mehr auf.

Die Hornschicht (*Stratum corneum*) bildet die oberste Schicht der Epidermis und besteht aus Hornzellen, die sehr stark abgeflacht sind.

Die Basalmembran dient der Verbindung der Epidermis mit der Dermis und besteht aus Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen.

Die darunter gelegene Dermis ist kollagenreich, besteht aus Bindegewebsfasern und dient der Festigkeit, Elastizität und Ernährung der Epidermis. Der überwiegende Anteil der Dermis ist die extrazelluläre Matrix, welche aus Fibroblasten entsteht (WENDT ET. AL., 2011; COSTIN & HEARING, 2007). In der Dermis befinden sich die meisten Sinneszellen sowie Hautanhangsgebilde.

Das Unterhautfettgewebe, welches aus lockerem Bindegewebe und Adipozyten besteht, bezeichnet man als Subkutis. Da sie stark mit Blutgefäßen durchzogen ist, ist die schnelle Weiterleitung von Nährstoffen gewährleistet. Außerdem soll sie den Körper vor Kälte oder auch Stößen schützen.

Alle drei Schichten werden von Schweiß- und Talgdrüsen sowie Haaren durchzogen (WENDT ET. AL., 2011).

## 1.2 Grundlagen der Melanogenese

Die Hautfarbe bzw. Bräunung der humanen Haut beruht auf der Synthese von Melanin, das in der äußeren Hautschicht - der Epidermis - von Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen, synthetisiert wird. Melanin ist der natürliche Sonnenschutz der Haut. Der Prozess der Melaninproduktion wird Melanogenese genannt und durch UV Strahlung induziert, wobei das Schlüsselenzym Tyrosinase aktiviert wird. Tyrosinase ist ein Glykoprotein das in der Membran der Melanosomen (Zellorganellen von Melanozyten) lokalisiert ist. Histidinreste in der katalytischen Region der Tyrosinase binden Kupferionen und sind zur Aktivität der Tyrosinase wichtig. Es werden zwei Typen von Melanin synthetisiert - Eumelanin (schwarz-bräunlich) und Pheomelanin (rot-gelb). Tyrosinase und auch Tyrosinase Hydroxylase (TH-1) katalysieren die ersten beiden Schritte der Melaninproduktion. Im ersten Schritt wird L-Tyrosin zu L-DOPA hydroxyliert und weiter zu Dopaquinon oxidiert (GILLBRO & OLSSON, 2011; LIN ET. AL., 2011). L-Tyrosin kann nur durch unterstützte Diffusion in die Melanosomen transportiert werden. Somit ist die Konzentration an L-Tyrosin abhängig von der durch die Phenylalanin Hydroxylase (PAH) katalysierten Umformung von L-Phenylalanin zu L-Tyrosin. Denn im Gegensatz zu L-Tyrosin wird L-Phenylalanin aktiv durch die Membran der Melanosomen transportiert. Nach der L-DOPA Produktion verzweigt sich der Melaninsyntheseweg in die Eumelanogenese oder die Pheomelanogenese. TRP-2 (DCT; tyrosine-related protein-2) und TRP-1 spielen bei der Eumelanogenese eine Rolle. Bisher wurden keine spezifischen Enzyme mit der Pheomelanogenese in Verbindung gebracht (GILLBRO & OLSSON, 2011).

Es folgt ein Transfer der Melanosomen aus den Melanozyten in die Keratinozyten. Das Melanin lagert sich nun zum Schutz um die DNA der Zellkerne und wird durch die Epidermiszellen an die Hautoberfläche transportiert.

Die synthetisierte Menge an Melanin wird maßgeblich bestimmt, durch die Höhe der Tyrosinaseaktivität in der Zelle (MAKPOL ET. AL., 2009).

Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt schematisch den Melaninsyntheseweg.

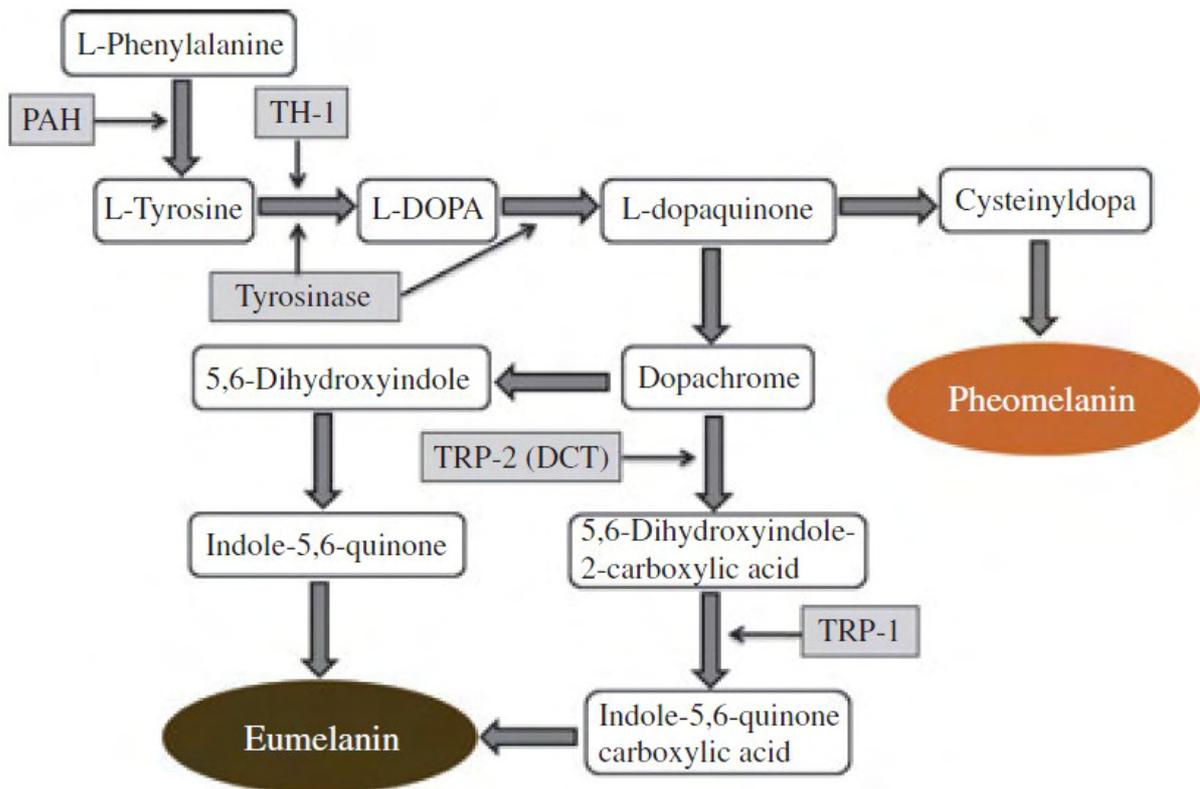


Abbildung 3: Der Melaninsyntheseweg.

Die Synthese beginnt mit der Umwandlung von L-Phenylalanin durch die Phenylalanin Hydroxylase zu L-Tyrosin. L-Tyrosin wird durch Tyrosinase und Tyrosin Hydroxylase zu L-DOPA hydroxyliert und weiter zu L-Dopaquinon oxidiert. Im Weiteren sind bei der Eumelanogenese die Enzyme TRP-2 (DCT) und TRP-1 beteiligt, während der Pheomelanogenese bisher noch keine spezifischen Enzyme zugeordnet werden konnten (GILLBRO & OLSSON, 2011).

### 1.3 Dreidimensionale Vollhautmodelle / Biopsie-Modelle

Da der Bedarf an Spenderhaut und künstlicher Haut, bedingt durch chronische Hautkrankheiten und Transplantationen immer weiter steigt, spielen künstliche Hautäquivalente eine immer größere Rolle. Der Anspruch hierbei ist, dass diese Modelle histologisch und physiologisch möglichst der natürlichen humanen Haut entsprechen. Außerdem lassen sich z.B. Wundheilungsprozesse und Hautkrankheiten besser erforschen und verstehen (WENDT ET. AL., 2011).

Diese Hautmodelle müssen europäischen Bestimmungen gerecht werden, welche einerseits den Nachweis der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit kosmetischer Produkte verlangen und andererseits Tierversuche mit wirksamen kosmetischen Produkten verbieten. Hautäquivalente sind daher von großem Interesse um die

Wirksamkeit verschiedener Substanzen auf die Epidermis und Dermis zu testen. Solche Modelle finden Anwendung in der klinischen Dermatologie, in der Hautkosmetik und in der Grundlagenforschung. So sind z.B. Krankenhausärzte daran interessiert Brandopfern Hautrekonstruktionen auf die Epidermis zu transplantieren um eine bessere Funktionalität bzw. Wundheilung der Haut zu erreichen. In der Hautkosmetik sind bestmögliche physiologische Modelle gefragt, um die Unbedenklichkeit und Wirksamkeit der Produkte zu belegen, wobei es in der Grundlagenforschung darum geht, physiologische Mechanismen und interzelluläre Interaktionen in der Haut aufzuklären oder die Entwicklung während der Alterung oder verschiedene pathologische Prozesse besser zu verstehen (AUXENFANS ET. AL., 2009). Einen großen Anteil machen auch Toxizitätstest aus, bei denen im Rahmen der REACH-Verordnung Chemikalien auf schädliche Nebenwirkungen getestet werden.

Es kommen, je nach Anspruch, verschiedenartige solcher Modelle zum Einsatz. 3-D-Hautmodelle können zum Einen mit einem Grundgerüst, wie Kollagengel (Bell-Modell), das menschliche dermale Fibroblasten enthält, auf dem primäre menschliche Keratinozyten wachsen und an einer Luft-Medium-Grenzschicht kultiviert wird, generiert werden. So entsteht an der Luft-Medium-Übergangszone durch Differenzierung eine mehrschichtige Epidermis mit Hornschicht (*Stratum corneum*). Zum Anderen ohne Grundgerüst, indem die Fibroblasten auf „Plastiksubstrat“ kultiviert werden. Bei letzt genannter Methode wird dem Kulturmedium Serum und Vitamin C zugesetzt, was die Bildung von Komponenten der extrazellulären Matrix (wie z.B. Kollagen) zur Folge hat (MERTSCHING ET. AL., 2008; AUXENFANS ET. AL., 2009).

Solche Modelle erlauben Studien in der Wundheilung, der Melanomforschung sowie der Infektionsbiologie und lassen Aussagen über die Zellvitalität, Biokompatibilität, Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, Permeationsrate, der Proliferation und biochemischen Veränderungen zu. So erlauben sie Penetrations-, Irritations- und Wundheilungsstudien und es kann beispielsweise bei Wundheilungsprozessen die IL-1 $\alpha$  Konzentration über der Zeit gemessen werden. Im Übrigen können bei Tumor-Modellen die Auswirkungen von Wachstumsfaktoren gegenüber Therapeutika (Inhibitoren) getestet werden (MERTSCHING ET. AL., 2008/ 2009). Ein alternativer neuer Ansatz Hautmodelle zu entwickeln, besteht darin, Spinnenfäden als Matrix zu

verwenden, die auf einen Rahmen gewoben werden auf dem dann das Modell entsteht (WENDT ET. AL., 2011).

Ebenso lassen sich auch pigmentierte Hautmodelle erzeugen. Hierbei werden der Melanozyten-Monolayer-Kultur Mitogene, wie z.B. TPA und bFGF zugesetzt. Diese Mitogene sind für die Entwicklung und Proliferation der Melanozyten, die vorher ebenfalls ausgesät und kultiviert werden, essentiell, da diese sonst ihre charakteristische Morphologie verlieren würden. Werden den Melanozyten-Monolayern Keratinozyten zugesetzt, proliferieren sie nicht nur ohne Mitogene, sondern behalten ihre Morphologie und sind in der Lage den Keratinozyten ihre Dendriten entgegenzustrecken. Mit diesen Modellen lassen sich die Mechanismen während der Melanogenese und auch der Pigmentierung besser verstehen. Melanozyten sind in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert und behalten in diesen Modellen ihre Funktionalität. Sie proliferieren, synthetisieren und sekretieren erst dann Melanin wenn dieser Vorgang durch UV Strahlen induziert wird. In der Pharmakotoxikologie sind solche Modelle gefragt, um Substanzen auf ihren Sonnenschutz zu testen, indem die Färbung der Haut mit Proben verglichen wird, die mit UVB bestrahlt wurden. Indem man Pigment-Hautmodelle mit Fibroblasten und Keratinozyten aus Biopsien von Patienten mit Hautflecken anfertigt, kann man auch angeborene Pigmentstörungen erforschen (AUXENFANS ET. AL., 2009).

### **1.4 Postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH)**

Eine Entzündungsreaktion wird durch Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen und verschiedenen von Gewebszellen und Leukozyten freigesetzten Entzündungsmediatoren (plasmatische Enzymsysteme, Zellen des Immunsystems, Produkte der Pathogene) gesteuert (MALE, 2005). Die postinflammatorische Hyperpigmentierung, bezeichnet einen Zustand, bei dem eine erhöhte Pigmentierung, als Folge einer kutanen Inflammation auftritt. Die exakte Pathogenese ist noch unklar und die betroffenen Personen können in ihrer Lebensqualität enorm beeinträchtigt sein (EIMPUNTH ET. AL., 2013). Die Ursachen für eine PIH können jedoch exogene oder endogene

Faktoren sein (EPSTEIN, 1989). So können z.B. entzündliche Dermatosen, Infektionen, allergische Reaktionen, mechanische Verletzungen und Reaktionen auf medikamentöse bzw. therapeutische Behandlungen die Ursachen einer PIH sein (TAYLOR ET. AL., 2009). Dabei spielt das Alter und Geschlecht keine Rolle, aber es ist bekannt, dass sie verstärkt in dunkelhäutigeren Personen, mit einem Fitzpatrick Hauttyp III-VI auftritt (LACZ ET. AL., 2004; CALLENDER ET. AL., 2011). Dabei wurden in Studien, basierend auf Mäusen (Haare/ Augen), 150 Gene identifiziert die bei der Pigmentierung beteiligt sind (BENNETT & LAMOREUX, 2003). Abbildung 4 verdeutlicht den Einfluss der Hautfarbe auf die PIH. Hier sind zwei Patientinnen unterschiedlichen Hauttyps im Vergleich.



**Abbildung 4: Postinflammatorische Hyperpigmentierung bei Fitzpatrick Hauttyp IV versus VI.**

Links die eine PIH in Hauttyps IV zu sehen, rechts in Hauttyp VI. Man kann erkennen, dass in dunklerer Haut die Intensität sehr viel höher ist (aus DAVIS & CALLENDER, 2010).

Es gibt zwei Arten einer PIH. Zum Einen eine in der Epidermis und zum Anderen eine in der Dermis lokalisierten PIH (TOMITA ET. AL., 1992). Die Pathogenese geht, durch die Auslöser des Entzündungsprozesses, mit einer vermehrten Melaninsynthese der Melanozyten einher. Für die Pigmentierung bzw. die Melanozyten-Stimulation, die durch eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird, sind v.a. aus Arachidonsäure abgeleitete chemische Mediatoren wie Eicosanoide, speziell Prostaglandine ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), Thromboxane ( $\text{TXB}_2$ ) und Leukotriene ( $\text{LTC}_4$  und  $\text{LTD}_4$ ) verantwortlich. Diese Stoffe erhöhen die Tyrosinase-Aktivität (COSTIN & HEARING, 2007).

Bei der epidermalen PIH, ist der Transfer der Melanosomen von den Melanozyten zu den Keratinozyten erhöht (CALLENDER ET. AL., 2011). Wenn die Basalzellschicht, bzw. die basalen Keratinozyten verletzt werden, geben sie eine hohe Menge Melanin frei, welches dann von Makrophagen bzw. Melanophagen in der oberen Dermis phagozytiert werden. Hier spricht man von einer dermalen PIH, die eine blaue Verfärbung der Haut zur Folge hat. (MASU & SEIJI, 1983; LACZ ET. AL., 2004). Dabei ist der Grad der PIH, bei anhaltenden und immer wiederkehrenden Inflammationen höher, im Vergleich zu kurzzeitigen akuten Entzündungen (Ruiz-Maldonado & Orozco-Covarrubias, 1997). So wurde vermutet, dass der Grad der Hyperpigmentierung direkt mit dem Schweregrad der Inflammation bzw. dem Grad der Verletzung der Basalzellschicht zusammenhängt (HO ET. AL., 2011; TAKIWAKI ET. AL., 1994).

## 1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Masterarbeit stand zum Einen die Messung der stimulierten Melanogenese und Untersuchungen zur postinflammatorischen Hyperpigmentierung (PIH) in Biopsie-Hautmodellen im Vordergrund und zum Anderen sollte ein Assay-System entwickelt werden, um die Phagozytoseleistung von Keratinozyten zu bestimmen. Konkret waren die Ansprüche:

- a) Prüfung, ob das Biopsiemodell als ein Modell der postinflammatorischen Hyperpigmentierung dienen kann. Dies war insofern interessant, als dass hier *ex vivo* mechanistische Untersuchungen und Wirkstoff-Testungen stattfinden könnten. Hierzu wurden insbesondere genaue örtliche Untersuchungen der Melanogenese-Aktivität der Randbereiche (Exzisionstelle/ Wundheilung) versus den Mittelebereichen der Biopsie durchgeführt.
- b) Untersuchungen zur Beurteilung, inwieweit das Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) einen Einfluss auf den Prozess der Melanogenese hat und ob dieser Parameter ein interessanter Mediator der postinflammatorischen Hyperpigmentierung sein könnte. Diese Untersuchungen sollten sowohl im Melanozyten-Monolayer, einer Melanozyten-Fibroblasten-Kokultur und im Biopsie-Modell durchgeführt werden, um hier insbesondere die Rolle des „*crosstalks*“ zwischen Fibroblasten und Melanozyten zu beurteilen.
- c) Etablierung eines Assay-Systems, welches die Phagozytoseleistung von primären, humanen Keratinozyten quantifiziert. Dies dient der Untersuchung, inwieweit Mediatoren des Prozesses der PIH, in die Aufnahme von Melanosomen durch die Keratinozyten eingreifen, als ein Modell der Modulation des Melanosomentransfers. Um zeitaufwendige Melanosomenisolationen und anschließende Markierungen zu umgehen, wurden fluoreszierende Beads der Größe  $0,5 \mu\text{m}$  als Melanosomenersatz verwendet. Die Aufnahmeleistung der Keratinozyten sollte mittels FACS-Analyse bestimmt werden.

## 2 Material

Im folgenden Kapitel sind die Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, Assay-Kits, Chemikalien und Reagenzien sowie die verwendeten Puffer und Lösungen zusammengefasst.

### 2.1 Laborgeräte

In Tabelle 1 sind die verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Groß- und Kleingeräte.

Gerät	Modell (-nummer)	Hersteller/Bezugsquelle
Absaugpumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences, Chur (CH)
Analysewaage	CP225 D	Sartorius, Göttingen
Autoklaven	Technoklav Varioklav 135	IBS Integra Biosciences, Chur (CH) SH + P, Oberschleißheim
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra-Eismaschinen, Iserhagen
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Gerät zur Zellzahlbestimmung	NucleoCounter	Chemometec, Allerød (DK)
Inkubator	HERAcell 150	Heraeus, Hanau
Kühlgeräte	+4 °C -20 °C -80 °C Ultra Low Temperature Freezer -196 °C Cryostorage System K10	Handelsübliche Geräte Handelsübliche Geräte New Brunswick Scientific, NJ (USA) Taylor-Wharton, Theodore, AL (USA)
Laborwaage	3713MP	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Kehlheim
Mehrkanalpipette	8-Kanal, 30 - 300 µl	Eppendorf, Hamburg

## Material

Mikropipetten	Reference 100 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Reference 20 - 200 µl	Eppendorf, Hamburg
	Reference 10 - 100 µl	Eppendorf, Hamburg
	Reference 2 - 20 µl	Eppendorf, Hamburg
	Reference 0,5 - 10 µl	Eppendorf, Hamburg
	Reference 0,1 - 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
	Axiovert S100	
Pipettierhilfe	Pipetboy accu	IBS Integra Biosciences, Chur (CH)
Reinstwasseranlage	Milli-Q academic	Millipore, Eschhorn
Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
	REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
	MS2 Minishaker	IKA, Wilmington, NC (USA)
	Polymax 1040	Heidolph, Kehlheim
Spektralphotometer	Safire <sup>2</sup>	Tecan, Crailsheim
Sterilwerkbänke	HERAsafe	Heraeus, Hanau
	HERAsafe KS 12	Heraeus, Hanau
UV-Dosimeter	IL-1700	Int. Light, Newsburyport, MA (USA)
UV-Sonnensimulator	Model 91294 1kW Solar Simulator	Oriel Instruments, Stratford, CT (USA)
Vakuumpumpe	Typ 026.3 AN. 18	Günther Wilke, Hamburg
Wasserbad	Typ 1002	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
	miniSpin	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
6-, 12-, 24-, 96- und 384-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Filtereinsätze für 6- und 12-Loch-Platten (0,4 und 3 µm)	Falcon, Meerbusch
Gewebekulturflaschen (SoloFlasks 75, 185 und TripleFlask 500 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Roskilde (DK)
KryoVials 2 ml	Nunc, Wiesbaden
Messröhrchen für FACS-Analysen	Greiner, Nürtingen
Mikroreaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
NucleoCassette™	Chemometec, Allerød (DK)
Pasteurpipetten, gestopft und ungestopft	VWR, Darmstadt
Pipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Stanzen „Biopsy Punch“ für Explantate (5 und 8 mm <sup>2</sup> )	Stiefel, Offenbach
Sterilfilter Ministart	Sartorius, Göttingen
Zellsieb 70 µm	BD BioScience, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner, Nürtingen

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien und Reagenzien zusammengefasst.

**Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien**

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
2-Furoyl-LIGRLO-amid-Trifluoroacetat-Salz (PAR-2-Aktivator)	Sigma, Taufkirchen
Albumin, bovines	Sigma, München
Calciumchlorid	Sigma, München
Cyclohexan	Merck, Darmstadt
Cytochalasin B und D	Sigma, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt

## Material

Dispase II (2,0 U/ml)	Roche, Mannheim
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco´s PBS w/o (1x)	PAA, Linz (AT)
Essigsäure konz.	Sigma, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
FluoSpheres® Fluorescent Microspheres	Invitrogen/ Upstate (USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz (AT)
Glutamax I (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS) (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Fibroblast Growth Factor-7/Keratinocyte Growth Factor (FGF-7/KGF)	Millipore/ Upstate (USA)
Keratinocyte Growth Medium-2 (KGM® -2)	Clonetics, San Diego, CA (USA)
KGM® -2 Single Quots	Clonetics, San Diego, CA (USA)
Kollagen Typ I	Sigma, München
L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)	Sigma, München
L-Tyrosin	Merck, Darmstadt
Melanozyten Basal Medium (MBM)	CellSystems, St. Katharinen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natrium Deoxycholat (RIPA)	Sigma, München
Natriumchlorid	Sigma, München
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml, 5000 µg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Prostaglandin F <sub>2α</sub> (PGF <sub>2α</sub> )	Sigma, München
Trypsin (2,5 %)	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA-Lösung (1x)	PAA, Linz (AT)

### 2.4 Assay-Kit

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche, Mannheim verwendet.

## 2.5 Medien und Lösungen

In folgender Tabelle 4 sind die Zusammensetzungen für die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Medien beschrieben.

Tabelle 4: Medien- und Pufferzusammensetzungen in der Zellkultur.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Lagerung
Fibroblasten-Kulturmedium (DMEM <sup>+++</sup> )	500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml Glutamax I 5 ml Penicillin/Streptomycin	4 °C
Keratinocyten-Kulturmedium (KGM <sup>®</sup> -2)	500 ml KBM <sup>®</sup> -2 500 µL 0,1 M CaCl <sub>2</sub> KGM <sup>®</sup> -2 Single Quots	4 °C
Melanozyten-Kulturmedium (MGM)	500 ml MBM 5 ml Melanocyte Growth Supplement 1 ml Melanocyte Antibiotic Supplement	4 °C
Stopp-Lösung	500 ml PBS 50 ml FCS	4 °C
Biopsie-Modell-Medium (5x) (M1)	250 ml DMEM <sup>+++</sup> 250 ml KGM <sup>®</sup> -2 56,6 mg L-Tyrosin → bei RT rühren, sterilfiltrieren	4 °C
Biopsie-Modell-Medium (1x) (M2)	200 ml DMEM <sup>+++</sup> 200 ml KGM <sup>®</sup> -2 100 ml M1	4 °C
Fibroblasten-Einfriermedium	72,5 % (v/v) DMEM <sup>+++</sup> 7,5 % (v/v) DMSO 20 % (v/v) FCS	-20 °C
Keratinocyten-Einfriermedium	72,5 % (v/v) KGM <sup>®</sup> -2 7,5 % (v/v) DMSO 20 % (v/v) FCS	-20 °C
Melanozyten-Einfriermedium	72,5 % (v/v) MGM 7,5 % (v/v) DMSO 20 % (v/v) FCS	-20 °C

### **3 Methoden**

Im folgenden Kapitel sind die in dieser Master Thesis angewendeten Methoden beschrieben.

#### **3.1 Sicherheit und Abfallentsorgung**

Kontaminierte Gefäße und Lösungen, Lösemittelreste und biologischer Abfall wurden getrennt gesammelt und vorschriftsmäßig entsorgt. Eine Hitzesterilisation biologischen Materials wurde bei 121 °C, für 20 min und 1 bar Überdruck durchgeführt. Arbeiten mit humanen Zellen und Biopsiematerial wurden nur in den dafür vorgesehenen Zellkulturlaboratorien der Sicherheitsstufe S2 nach Biostoffverordnung durchgeführt. Die Chemikalien wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen R- und S-Sätzen verwendet.

#### **3.2 Zellkultur und Kultivierung**

Alle Arbeitsschritte wurden im Zellkulturlabor der Hautforschung - „Sensitive and Ethnic Skin“, unter einer Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Des Weiteren wurden ausschließlich sterile Medien sowie autoklavierte Glas- und Plastikwaren benutzt.

Sowohl die Primärzellen als auch die Hautexplantate wurden aus chirurgischen Hautabschnitten generiert, die aus einer Klinik für ästhetische Chirurgie stammten und chirurgische „Abfallprodukte“ darstellen. Die Entnahme erfolgte, gemäß der Deklaration von Helsinki, ausschließlich durch Ärzte. Alle Spender haben zuvor der wissenschaftlichen Verwendung ihrer Haut freiwillig zugestimmt. Hierbei hat die Beiersdorf AG keinen Einfluss auf die Menge, Art/Areal oder den Zeitpunkt der Hautlieferungen. Die Haut stammte aus den Bereichen Augenlider, Brust oder Abdomen.

Die Kultivierung und Subkultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer Begasung mit 7 % CO<sub>2</sub> sowie einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Die isolierten Zellen wurden in Zellkulturflaschen und mit vorgewärmtem Medium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

### **3.3 Isolation primärer Zellen aus Hautabschnitten**

Die Spenderhaut aus den chirurgischen Eingriffen wurde in DMEM angeliefert und bei 4 °C gelagert. Die Isolation primärer Hautzellen erfolgte in der Regel noch am selben Tag, spätestens jedoch am Folgetag. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle folgenden Arbeitsschritte in 6-Loch-Platten durchgeführt.

Zunächst wurde das Fettgewebe und evtl. Haare in einer mit PBS befüllten, 10 cm Petrischale, mittels steriler Pinzette und Schere entfernt und die Biopsie, mit Hilfe eines sterilen Skalpell schachbrettartig auf der Epidermisseite eingeritzt. Die Haut wurde anschließend für 5 s in 70 % Ethanol desinfiziert, in PBS gewaschen und zur Separation der Dermis von der Epidermis in 3 ml Dispase II (2 U/ml) überführt und entweder für 2 - 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dispase II ist eine Protease, welche die Bindungen zwischen den Fibronektinen, Integrinen sowie Kollagen löst und es somit ermöglicht die Epidermis, die über die Basalmembran mit der Dermis verknüpft ist, zu lösen.

Nach Beendigung des Dispaseverdaus wurde die Epidermis, mittels zweier Pinzetten, von der Dermis getrennt. Die Epidermisstücke wurden kurz in PBS gewaschen und für die Isolierung der Melanozyten/Keratinocyten in 3 ml 0,5 % Trypsin für 10 min bei 37 °C inkubiert (siehe Kapitel 3.3.1). Zur Isolation der Fibroblasten wurde die Dermis in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 2 - 3 mm geschnitten und in eine 6-Loch-Platte transferiert (siehe Kapitel 3.3.2).

### 3.3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Melanozyten und Keratinozyten

Nach ca. 5 min Inkubation mit Trypsin wurde mit dem Triturieren mittels einer gestopften 1000 µl -Pipette mit abgeschnittener Spitze begonnen, um die Zellen zu vereinzeln. Nach maximal 10 min wurde die Trypsinreaktion mit 5 ml Stopp-Medium (vgl. Tabelle 4) gestoppt, noch im Verband befindliche Zellreste entfernt und die Zellsuspension durch ein Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um möglichst viele Zellen zu gewinnen, wurde die Kavität der 6-Loch-Platte mit weiteren 3 ml Stopp-Medium gespült, ebenfalls durch das Zellsieb in das Röhrchen überführt und für 5 min bei 1.300 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zur ausschließlichen Isolation und Kultivierung primärer Keratinozyten das Pellet vereinzelter, epidermaler Zellen in 2 ml KGM<sup>®</sup>-2 resuspendiert. Diese Suspension wurde auf zwei 75 cm<sup>2</sup>-Zellkultur-Flaschen aufgeteilt und jede Flasche auf 20 ml Gesamtvolumen mit KGM<sup>®</sup>-2 aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert. Die Zellen befanden sich nun in Passage 0. Die Kultur in diesem Keratinozytenmedium führte zum Absterben der Melanozyten, so dass nach einigen Passagen eine Keratinozyten-Reinkultur erzielt wurde.

Sollten hingegen sowohl die primären Keratinozyten als auch die primären Melanozyten aus der Epidermis isoliert werden, so wurde das Zellpellet in 10 ml MGM-Medium aufgenommen und diese Suspension auf zwei 185 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Nach Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 30 ml MGM-Medium pro Zellkulturflasche wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert. Dieses Melanozytenmedium befähigt sowohl die Keratinozyten als auch Melanozyten zur Expansion. Laut Erfahrung machen ca. 2/3 der Gesamtzellen Keratinozyten aus. Um jedoch beide Zelltypen voneinander zu trennen, erfolgte nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 Wochen, bzw. einer 60 %-igen Konfluenz die differenzielle Trypsinierung. Dazu wurde das MGM-Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA (Volumina siehe Tabelle 5) für ca. 1 min bzw. 5 min bei 37 °C inkubiert. Melanozyten lösen sich nach ca. 1 min, Keratinozyten erst nach >5 min ab. Das Ablösen wurde deshalb unter dem Mikroskop überwacht.

Hatten sich die Melanozyten nach ca. 1 min abgelöst, wurde die Trypsinreaktion mit dem 3-fachen Volumen Stopp-Medium gestoppt und die abtrypsinieren

Melanozyten daraufhin für 5 min bei 1.300 Upm und RT zentrifugiert. Die Melanozyten aus einer 185 cm<sup>2</sup>-Flasche wurden dann wiederum in einer 185 cm<sup>2</sup>-Flasche aufgenommen (Passage 1), bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % expandiert und nach dem Trypsinieren auf drei 500 cm<sup>2</sup>-Triple-Flaschen umgesetzt (Passage 2). In der Regel wurden die Zellen in Passage 2 oder 3 kryokonserviert.

Die übriggebliebenen Keratinozyten wurden einmal mit PBS gewaschen, erneut bis zum Ablösen (ca. 5 min) mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend die Trypsinreaktion mit dem 3-fachen Volumen Stopp-Medium gestoppt. Die Vereinzelung der Keratinozyten erfolgte während der Trypsinreaktion durch leichtes Schlagen gegen den Flaschenrand. Nach Stoppen der Trypsinreaktion mit Stopp-Medium und 5-minütiger Zentrifugation bei RT und 1.300 Upm, wurden die Keratinozyten im Flächenverhältnis 1:2 bis 1:3 ausgesät, bzw. in Passage 2 - 3 eingefroren. Bei Keratinozyten war, auf Grund ihres klonalen Wachstums, darauf zu achten, dass die Aussaatdichte in Passage 0 hoch genug war. Ansonsten würden zu viele Zellen ausdifferenzieren, bevor eine gewünschte Konfluenz von 70 % erreicht wäre. Die verschiedenen Volumina je Flaschentyp bei der Trypsinierung sind Tabelle 5 zu entnehmen.

### 3.3.2 Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten

Zur Isolation primärer Fibroblasten wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte 4 - 8 Dermispartikel aus dem Hautabschnitt (siehe Kapitel 3.3) für ca. 20 - 30 min antrocknen gelassen. Dann wurden vorsichtig 3 ml DMEM<sup>+++</sup> pro Kavität gegeben und die auswachsenden Fibroblasten bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert (Passage 0). Vor dem ersten Trypsinieren wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und dann mit 1x Trypsin/EDTA für max. 10 min bei 37 °C inkubiert (Volumina vgl. Tabelle 5). Bei einer Zellkulturflasche lassen sich die Fibroblasten durch leichtes Klopfen an den Flaschenrand ablösen, bei einer 6-Loch-Platte bietet sich das Ablösen durch Resuspendieren mit Hilfe einer (Pasteur-) Pipette an. Die Trypsinreaktion wurde mit dem 5-fachen Volumen DMEM<sup>+++</sup> gestoppt und die Dermispartikel entfernt. Die Zellen aus je drei Kavitäten einer 6-Loch-Platte wurden auf eine 185 cm<sup>2</sup>-Flaschen umgesetzt und weiter expandiert. Eine Zentrifugation nach dem Trypsin-Verdau war hier nicht notwendig, da der Trypsin-

Inhibitor-Anteil im FCS-haltigen DMEM<sup>+++</sup> gegenüber dem Trypsin im Überschuss vorliegt. Das Flächenverhältnis bei der Aussaat betrug ca. 1:3. Die Kryokonservierung erfolgte in Passage 3.

Tabelle 5: Entsprechende Volumina je Flaschentyp bei der Trypsinierung

Flaschentyp	Trypsin [ml]	Stopp-Medium [ml]	Medium [ml]
6-Loch-Platte	0,5 ml / Kavität	2,5 ml / Kavität	3 ml / Kavität
SoloFlask 75 cm <sup>2</sup>	2	10	20
SoloFlask 185 cm <sup>2</sup>	4	20	30
TripleFlask 500 cm <sup>2</sup>	10	40	75

### 3.4 Kryokonservierung und Wiederinkulturnahme primärer Zellen

Für eine Kryokonservierung wurden die Zellen in der entsprechenden Passage und im entsprechenden auf Eis vorgekühlten Einfrier-Medium (Tabelle 4) aufgenommen und anschließend in KryoVials zu je 1 ml aliquotiert. Die Zellen wurden mit ca. 1 °C pro Minute von RT auf -80 °C heruntergekühlt und konnten anschließend in der Gasphase flüssigen Stickstoffs für längere Zeit gelagert werden. Die Zellzahlen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Zellzahlen für die Kryokonservierung.

Zelltyp	Zellzahl / ml
Keratinocyten	2 x 10 <sup>6</sup>
Melanozyten	5 x 10 <sup>6</sup>
Fibroblasten	1 x 10 <sup>6</sup>

Zur Wiederinkulturnahme wurden die Zellen dem Flüssigstickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der Inhalt eines KryoVials wurde in 10 ml entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und bei 1.300 Upm und RT für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert, in eine 185 cm<sup>2</sup>-Flasche überführt und auf 30 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Um mögliche DMSO-Reste herauszuwaschen, folgte am nächsten Tag ein Mediumwechsel.

### **3.5 Zellzahlbestimmung mittels NucleoCounter**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe des NucleoCounters der Firma Chemometec. Zunächst wurden 50 µl der zuvor trypsinierten und in Stopp-Medium resuspendierten Zellen in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben, 50 µl Lysispuffer (Reagenz A) hinzugegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Anschließend wurden 50 µl Anti-Aggregationspuffer (Reagenz B) hinzugegeben und ebenfalls gevortext. Die so vorbereitete Probe wurde nun in eine speziell dafür entwickelte Küvette (NucleoCassette™) eingesaugt, in den Strahlengang des NucleoCounters eingesetzt und nach Drücken der Starttaste vermessen. Die Kassette enthält den immobilisierten Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid, der in DNA einlagert und so die Zellkerne anfärbt. Das Gerät gibt die Anzahl der Zellen pro ml wieder. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor 3 und dem Volumen der gesamten Zellsuspension multipliziert werden. Der optimale Messbereich liegt zwischen  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  Zellen/ml.

### **3.6 Vitalitätsbestimmung mittels LDH-Assay**

Zur Untersuchung der Zellvitalität wurde bei jedem Mediumwechsel der Lactatdehydrogenase (Zytotoxizitäts-)-Test durchgeführt.

Bei einer Beschädigung der Zellmembran, wird ein zytoplasmatisches Enzym - die Lactatdehydrogenase (LDH) - ins Medium abgegeben und kann dort detektiert werden. Somit stellt die Aktivität der LDH im Überstand einen Indikator für die Vitalität der Zellen, bzw. die Integrität der Zellmembran dar. So deutet beispielsweise eine zunehmende Aktivität auf eine Abnahme der Zellvitalität bzw. lysierte Zellen hin, was unter anderem durch zytotoxische Substanzen hervorgerufen werden kann.

Der Assay beruht auf einer zweistufigen Reaktion. Im ersten Reaktionsschritt katalysiert die LDH unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  und  $\text{H}^+$  die Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Im zweiten Schritt katalysiert eine im Assay Kit enthaltene Diaphorase, mit Hilfe des neu geformten  $\text{NADH}$  und  $\text{H}^+$ , die Reduktion eines Tetrazolium-Salzes zu farbigem Formazan, welches eine starke Absorption bei 490 - 520 nm aufweist (PARHAMIFAR ET. AL., 2013). Die LDH-Aktivität im Medienüberstand korreliert hierbei direkt mit dem gebildeten Formazan.

Der LDH-Assay wurde in einer 96-Loch-Platte in Doppelbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden je Probe und Kavität 50  $\mu\text{l}$  Medienüberstand in die 96-Loch-Platte überführt und mit je 50  $\mu\text{l}$ /Kavität Reaktionslösung (Katalysator/Färbelösung) inkubiert. Die Inkubation erfolgte auf einem Laborschüttler und im Dunkeln für 20 min bei 300 Upm und RT. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 490 nm am Spektralphotometer Safire<sup>2</sup>.

### **3.7 Herstellung von Kokulturen aus Melanozyten und Fibroblasten**

Für einige Versuche wurden Kokulturen aus Fibroblasten und Melanozyten hergestellt. Diese waren so gestaltet, dass Fibroblasten in einem Insert ausgesät wurden und diese dann auf die in der Kulturschale befindlichen Melanozyten platziert wurden. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die zuvor isolierten und kultivierten Melanozyten (siehe Kapitel 3.3.1), wurden in Passage 4 trypsiniert und gezählt. Es wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte 250.000 Melanozyten in 3 ml MGM ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die isolierten und kultivierten Fibroblasten (siehe Kapitel 3.3.2) in Passage 4 trypsiniert und gezählt. Das MGM wurde abgesaugt und je Kavität 2 ml DMEM<sup>+++</sup> vorgelegt. Es wurde ein Platzhalter und Membran-Inserts eingesetzt und pro Insert 250.000 Fibroblasten in 1 ml DMEM<sup>+++</sup> ausgesät. Nach 3 Tagen wurden die Kokulturen schließlich für Versuche verwendet.

### **3.8 Herstellung von Kollagengel zur Einbettung der Hautexplantate**

Um die Hautbiopsien zu kultivieren, wurden sie in Inserts einer 12-Loch-Platte mit Platzhalter in Kollagengel eingebettet. Dabei wurden pro Biopsiestanze 200 µl Kollagengel benötigt. Das für das Gel benötigte Kollagen stammt aus Rattenschwänzen und wurde fertig bezogen. Zur Herstellung der Kollagenlösung wurden unter sterilen Bedingungen 120 mg Kollagen mit 40 ml 0,1 % Essigsäure für 3 Tage bei 4 °C gerührt bis die Lösung frei von Luftblasen war. Diese Lösung konnte dann bei 4 °C gelagert werden. Zur Herstellung des eigentlichen Kollagengels wurden die Kollagenlösung (80 % (v/v)), HBSS (10 % (v/v)) und FCS (10 % (v/v)) unter sterilen Bedingungen, auf Eis und unter Rühren vermischt. Zur Neutralisation der Essigsäure wurde dieses Gemisch mit 1 M NaOH bis zum Farbumschlag nach violett titriert.

### **3.9 Herstellung und Kultivierung von Biopsie-Hautmodellen aus Hautexplantaten**

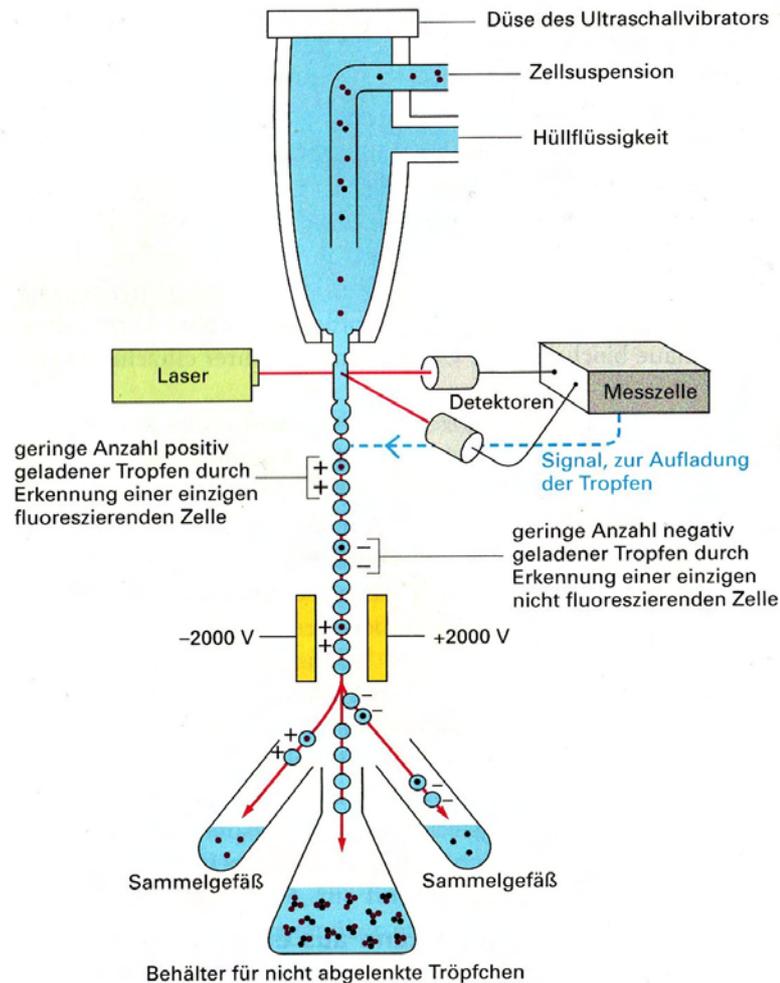
Nachdem der Großteil des subkutanen Fettgewebes der Spenderhaut entfernt wurde, erfolgte das Stanzen für die Biopsie-Modelle. Die Größe der Stanzen variierte je nach Versuch zwischen 5 und 8 mm<sup>2</sup>. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst keine Haut mit Rötungen (Entzündungsreaktionen durch chirurgischen Eingriff) verwendet wurde. Anschließend wurde die Haut desinfiziert und so lange in PBS zwischengelagert, bis die 12-Loch-Platten zur Einbettung vorbereitet waren. Hierzu wurde die entsprechende Menge Kollagengel frisch zubereitet und in jedes Insert 200 µl vorgelegt. Nachdem das Kollagengel nach ca. 10 min bei 37 °C leicht geliert war, wurden die Biopsien trocken getupft und unter leichtem Druck mit der Dermisseite nach unten in das Gel gesetzt, so dass die Dermisanteile weitestgehend vom Gel umschlossen waren. Nach weiteren 10 min bei 37 °C wurden je Kavität 2 ml M2-Medium + MMP-Inhibitor (1:167, Stock 1 mg/ml) pipettiert und die eingebetteten Biopsien für 10 bis 14 Tage kultiviert. Mit jedem Mediumwechsel wurde frischer Wirkstoff zugesetzt und die Vitalität durch den LDH-Assay untersucht.

### 3.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Um die Phagozytoseleistung von Keratinozyten zu untersuchen, wurde das Durchflusszytometer FACSCanto (FACS = Fully Automated Cell Sorter) der Firma BD Biosciences eingesetzt.

Hierbei sollten gelb-grün fluoreszierende Beads (Anregungswellenlänge 488 nm;  $\varnothing$  0,5  $\mu$ m) die Melanosomen imitieren. Melanosomen werden während der Melanogenese von den Melanozyten an die Keratinozyten übertragen und eingelagert. Die synthetisierte Menge an Melanin ist hierbei proportional der Höhe der Tyrosinaseaktivität in der Zelle. Keratinozyten wurden hierzu entweder mit potentiellen Phagozytose-Stimulatoren oder -Inhibitoren vorbehandelt und anschließend mit den fluoreszierenden Beads inkubiert. Nach Ende der Inkubationsdauer (variierte je Versuch) wurden die Keratinozyten geerntet und per FACS die Phagozytoseleistung gemessen. Die Auswertung des Phagozytose-Assays wurde mit Hilfe der Software FlowJo durchgeführt.

Bei der Messung werden die zu analysierenden Zellen in das Gerät gesaugt, in einem Hüllstrom verdünnt und im 90° Winkel an einem Laserstrahl vorbeigeführt (vgl. Abbildung 5). Hierbei ergeben sich, in Abhängigkeit der Probenvorbereitung, durch Lichtstreuung und Fluoreszenzen charakteristische Lichtsignale. Man unterscheidet zwischen Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC), welches Aufschluss über die Zellgröße gibt und in Richtung des ursprünglichen Strahls gemessen wird, sowie Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC), welches Aufschluss über die Granularität gibt und etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen wird. Werden nun die Zellen mit den fluoreszierenden Beads an dem Laser vorbeigeführt und angeregt, erhält man auf Grund der im Gerät eingebauten Filter, eine Trennung der Emissionsspektren, hier FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-A (ROTHE ET. AL., 2007). Die Geschwindigkeit des Probenstromes wurde hierbei auf 10.000 Ereignisse/Messdaten pro Sekunde eingestellt. Vor jedem Versuch wurde die Messzelle des Durchflusszytometers durch das Starten verschiedener Reinigungsprogramme gereinigt und entgast, sowie die Filter auf Luftblasen untersucht und gegebenenfalls ebenfalls entgast. Die Proben wurden vor der Messung mit 600  $\mu$ l PBS verdünnt, um dem Verstopfen der Leitungen vorzubeugen.



**Abbildung 5: Aufbau eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (FACS).**

Die zu analysierende Zellsuspension wird in das Gerät eingesaugt, durch einen Hüllstrom verdünnt und im 90° Winkel an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Dabei werden die Zellen vereinzelt, so dass von den Detektoren immer nur eine Zelle erfasst wird. Je nach dem ob eine Fluoreszenz detektiert wurde, erhalten die Zellen eine Ladung. So können fluoreszierende von nicht fluoreszierenden Zellen unterschieden und getrennt werden (ALBERTS ET. AL., 2005).

### 3.10.1 Phagozytose-Assay

Um die Phagozytoseleistung messen zu können, wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte 150.000 Keratinozyten in 3 ml KGM<sup>®</sup>-2 ausgesät und am nächsten Tag für Versuche verwendet. Zur Einstellung des Durchflusszytometers wurden separat  $1 \times 10^6$  Zellen in eine 185 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät. Um die Phagozytoseaktivität einerseits zu stimulieren oder andererseits zu hemmen, wurden die Keratinozyten zeitgleich für eine Stunde mit verschiedenen Substanzen sowohl in Voll- als auch

Magermedium behandelt. Unter den verschiedenen Substanzen waren als Negativkontrolle Phagozytose-Hemmer (Cytochalasin B und D) und neben UV-Licht auch KGF und ein PAR-2-Aktivator, die jeweils in der Literatur als Stimulatoren der Phagozytose beschrieben wurden. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen in DMSO gelöst. Anschließend wurden die Keratinozyten mit den fluoreszierenden Beads inkubiert (Arbeitskonzentration  $72 \times 10^7$  Partikel/ml) und ihre Phagozytoseleistung über die Aufnahme dieser Beads zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach ihrer Zugabe über FACS gemessen.

Vorbereitend hierzu mussten die Beads (Stock:  $3,2 \times 10^{11}$  Partikel/ml) in entsprechendes Keratinozyten-Medium umgepuffert werden damit das enthaltende Natriumazid entfernt wurde. Dazu wurden die Beads für 2 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 13.500 Upm pelletiert und anschließend in KGM<sup>®</sup>-2 aufgenommen. Zur Einstellung des FACS-Gerätes werden beim ersten Mal ebenfalls Beads benötigt, die in PBS umgepuffert wurden.

Zur Messung, der durch die Keratinozyten phagozytierten Beads, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen vorsichtig zweimal mit 3 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml 1x Trypsin/EDTA trypsiniert. Die Trypsinreaktion wurde mit 2,5 ml Stopp-Medium gestoppt und die Keratinozyten bei 1.300 Upm für 5 min und RT abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die  $1 \times 10^6$  Zellen zur Einstellung des Gerätes wurden ebenfalls trypsiniert und in 600  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Nach der Einstellung des Durchflusszytometers mit den Keratinozyten und Beads, erfolgte die Vermessung der Proben.

### **3.11 Bestrahlung mit sonnensimuliertem Licht (SSR)**

Für alle Bestrahlungsversuche wurde als UV Quelle der Oriol UV-Sonnensimulator eingesetzt. Als Filter wurde ein Attenuator eingesetzt, welcher die atmosphärische Abschwächung simuliert und das generierte Licht im UV-Bereich ( $<400\text{ nm}$ ) so weitestgehend dem Sonnenspektrum gleicht. Um die gewünschte Dosis zu ermitteln, wurde mit dem Dosimeter die Leistung des UV-B-Anteils gemessen, die entsprechende Bestrahlungszeit berechnet und eingestellt. Die Xenon-Lampe sollte

ca. 20 min vor Bestrahlungsbeginn eingeschaltet werden. Die Keratinozyten wurden mit einer Dosis von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt, was bei einem beispielhaft gemessenen Wert mit der UV-B-Sonde von  $1,21 \times 10^{-4} \text{ W}$ , eine Bestrahlungsdauer von 6 min und 53 s ergab:

$$\triangleright \frac{(0,001 \times 50 \text{ mJ})}{0,000121 \text{ W}} \div 60 = 6,887 \triangleright 6 \text{ min}$$

$$\triangleright 6,887 - 6 = 0,887$$

$$\triangleright 0,887 \times 60 = 53,22 \triangleright 53 \text{ s.}$$

Für die Bestrahlung wurden die 6-Loch-Platten mit einer Quarzglasplatte abgedeckt, welche kein UV-Licht absorbiert. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen vorsichtig mit 3 ml PBS gewaschen, mit 0,5 ml 1x Trypsin/EDTA trypsinisiert, mit 2,5 ml Stopp-Medium gestoppt und bei 1.300 Upm für 5 min und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

### 3.12 Quantifizierung der Melanogenese

Die Melaninsynthese (Melanogenese) ist ein komplexer Prozess. Um diesen näher zu quantifizieren, kann man zum Einen das Endprodukt, also das Melanin quantifizieren oder aber die Aktivität des Schlüsselenzyms der Melanogenese (Tyrosinase) untersuchen. Beide Methoden fanden in dieser Arbeit Anwendung und werden im Folgenden beschrieben.

#### 3.12.1 Melaninbestimmung durch Absorptionsmessung

Melanin besitzt lichtabsorbierende Eigenschaften und kann deshalb photometrisch vermessen werden. Zur Messung der Melaninmenge in Hautbiopsien wurden die separierten Epidermishäutchen in 100  $\mu\text{l}$  7,5 M NaOH überführt und ü.N. bei 550 Upm und 99 °C aufgeköcht. Am nächsten Tag wurden die Mikroreaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt und gevortext. Um eventuell verbliebene Lipidbestandteile oder

sonstige unpolare Verbindungen zu lösen und somit das Risiko von Störfaktoren bei der Absorptionsmessung zu mindern, wurden jeweils 100 µl Cyclohexan hinzugegeben, gevortext und für 1 h inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.500 Upm und 8 °C für 5 min, um die beiden Phasen zu trennen. Anschließend wurde das Melanin vorsichtig aus der unteren Phase entnommen und in eine 384-Loch-Platte überführt. Der Melaninscan erfolgte in einem Bereich von 320 - 550 nm in Doppelbestimmung.

Für die Melaninbestimmung der Kokulturen, wurden die Melanozyten pro Kavität einer 6-Loch-Platte mit 0,5 ml 1x Trypsin/EDTA für 2 min bei 37 °C trypsinisiert und die Reaktion mit DMEM<sup>+++</sup> gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 min und RT. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert, die Melanozyten am NucleoCounter gezählt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl RIPA-Puffer resuspendiert und nach 5-minütiger Inkubation bei 4 °C gevortext und bis zur Vermessung bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die entsprechenden Ansätze gepoolt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4 °C konnten die Überstände für den L-DOPA-Assay (siehe Kapitel 3.12.2) und die Pellets zur Melaninbestimmung verwendet werden. Hierzu wurden die Pellets in 200 µl 7,5 M NaOH resuspendiert und ü.N. bei 99 °C und 550 Upm aufgekocht. Am nächsten Tag wurden die Mikroreaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt, kurz anzentrifugiert und gevortext. Je Probe wurden 200 µl Cyclohexan hinzugegeben, gevortext und für 1 h inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13.500 Upm und 8 °C für 5 min, wurden 40 µl der untersten Phase entnommen und auf eine 384-Loch-Platte überführt. Der Scan erfolgte zwischen 320 und 550 nm in Dreifachbestimmung.

### **Auswertung**

#### **a) Biopsien zur Untersuchung auf PIH:**

Es wurde die Summe von 370 bis 440 nm gebildet und der Mittelwert (MW1) berechnet. Von 490 bis 500 nm wurde ebenfalls die Summe gebildet und der Mittelwert (MW2) errechnet. Anschließend wurde MW2 von MW1 subtrahiert, der Blindwert (NaOH) abgezogen, erneut die Mittelwerte gebildet, auf die jeweilige Fläche bezogen und auf die Kontrolle (Mitte  $t_0$ ) relativiert.

**b) Biopsien zur Untersuchung auf den Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ :**

Es wurde die Summe von 370 bis 440 nm gebildet und der Mittelwert (MW1) berechnet. Von 490 bis 500 nm wurde ebenfalls die Summe gebildet und der Mittelwert (MW2) errechnet. Anschließend wurde MW2 von MW1 subtrahiert, der Blindwert (NaOH) abgezogen, erneut die Mittelwerte gebildet und auf die Kontrolle zum Zeitpunkt der Inkulturnahme ( $t_0$ ) relativiert.

**c) Kokulturen unter Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ :**

Es wurde die Summe von 370 bis 440 nm gebildet und der Mittelwert (MW1) berechnet. Von 490 bis 500 nm wurde ebenfalls die Summe gebildet und der Mittelwert (MW2) errechnet. Anschließend wurde MW2 von MW1 subtrahiert, der Blindwert (RIPA-Puffer) abgezogen, erneut die Mittelwerte gebildet, auf die jeweilige Zellzahl bezogen, gepoolt und auf die unbehandelte Kontrolle (Mel+Fib - bzw. Mel -) relativiert.

**3.12.2 Tyrosinase-Aktivitäts-Assay**

Während der Melanogenese wird Tyrosin durch die Tyrosinase zu Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hydroxyliert und in weiteren Schritten zu Melanin umgewandelt. Die Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase ist hierbei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und gibt so Aufschluss über die gebildete Melaninmenge. Die Tyrosinase katalysiert die Oxidation von L-DOPA zum Reaktionsprodukt L-DOPACHINON. Das bei diesem Assay eingesetzte MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinhydrazon) reagiert mit dem gebildeten L-DOPACHINON zu einem stabilen roten Farbstoff, dessen Absorption detektiert werden kann.

Für die Bestimmung der Tyrosinaseaktivität der Kokulturen, wurden die Melanozyten pro Kavität einer 6-Loch-Platte mit 0,5 ml 1x Trypsin/EDTA für 2 min bei 37 °C trypsiniert und die Reaktion mit DMEM<sup>+++</sup> gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 min und RT. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert, die Melanozyten am NucleoCounter gezählt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl RIPA-Puffer resuspendiert und nach 5-minütiger Inkubation bei 4 °C gevortext und bis zur Vermessung bei

-20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die entsprechenden Ansätze gepoolt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4 °C konnten die Überstände für den L-DOPA-Assay verwendet werden. Die Überstände wurden 1 h auf Eis inkubiert und mehrmals gevortext. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.200 Upm und 4 °C für 10 min. Anschließend wurden die Proben mit RIPA Puffer so verdünnt, dass in allen Ansätzen dieselbe Zellzahl vorlag. Es wurden je Probe 50 µl der Zellsuspension abgenommen und für den L-DOPA-Assay in eine 96-Loch-Platte in Doppelbestimmung vorgelegt. Je Probe wurden 200 µl Reaktionslösung hinzugegeben und bei 510 nm vermessen.

Für 10 Proben in Doppelbestimmung wurde die Lösung wie folgt angesetzt:

- 5 ml aus 15 mM L-DOPA-Stock
- 1 ml DMSO
- 1 ml NaPi Puffer
- 600 µl ddH<sub>2</sub>O
- 400 µl aus 100 mM MBTH-Stock.

Zur Auswertung wurde von den Messungen 10 bis 21 die Steigung in mAU/min bestimmt, die Mittelwerte gebildet und der Blindwert (RIPA-Puffer) subtrahiert.

## 4 Ergebnisse

Zunächst werden die Ergebnisse der Untersuchungen auf postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) gezeigt. Hier sollte untersucht werden, ob das Biopsie-Modell als ein PIH-Modell gesehen werden kann (Kapitel 4.1).

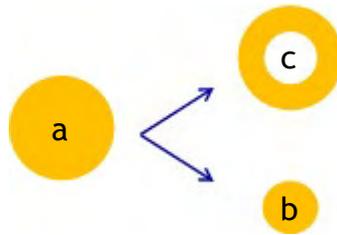
Im weiteren Verlauf wird dann der Einfluss von Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) auf die Melanogenese, von einerseits Biopsie-Hautmodellen und andererseits auf Kokulturen, bestehend aus Melanozyten und Fibroblasten sowie auf Melanozyten-Monolayer, gezeigt (Kapitel 4.2).

Im letzten Teil werden dann die Ergebnisse der Phagozytoseuntersuchungen von Keratinozyten zusammengefasst. Hierbei lag der Fokus hinsichtlich der PIH insbesondere darauf, die Phagozytoseleistung von Keratinozyten unter Einfluss verschiedener Substanzen zu untersuchen (Kapitel 4.3).

### 4.1 Bestimmung der Melanogenese im Randbereich versus Zentrum von Hautbiopsien in Kultur

Bei diesen Versuchen sollten Hautbiopsien auf postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) untersucht und geprüft werden ob dieses Biopsie-Hautmodell als ein PIH-Modell gesehen werden kann, da eine kontinuierliche Pigmentierung während der Kultivierung beobachtet wurde. Konkret stellte sich also die Frage, ob die Randbereiche (Exzisionstelle/ Wundbereiche) stärker pigmentieren als die Mittelebereiche

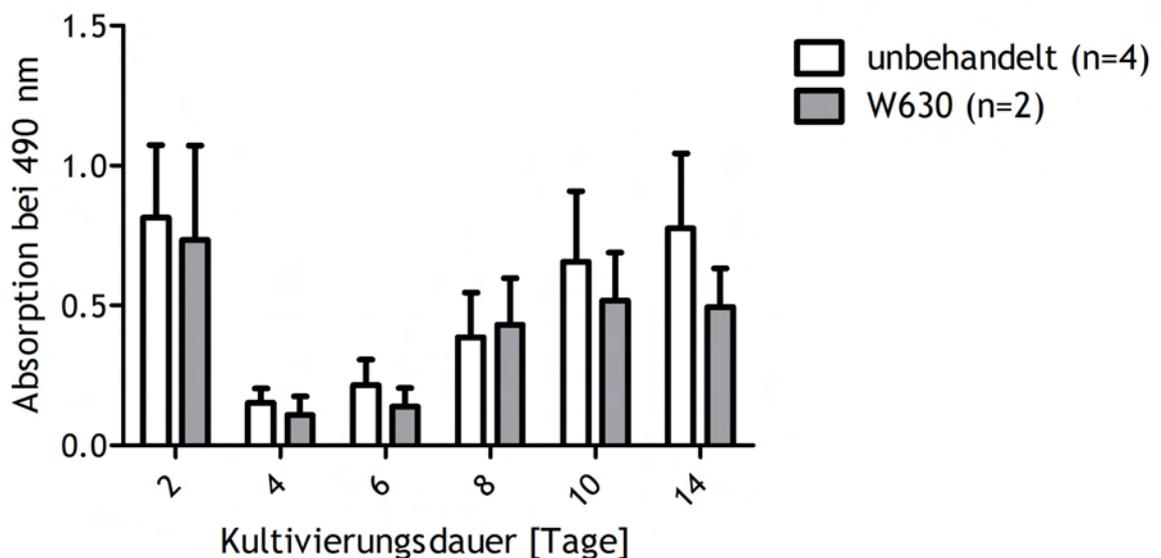
Hierzu wurden die Randbereiche, bei denen vermutet wird, dass dort PIH durch verletztes Gewebe auftritt, getrennt von den Mittelebereichen auf Melanin untersucht. Der Durchmesser der Biopsien betrug 8 mm (vgl. Abbildung 6). Diese Biopsien (a) wurden für 7 oder 14 Tage im Kollagengel kultiviert (vgl. Kapitel 3.9). Zur Melaninbestimmung am Ende der Kultivierung wurden daraus mittels 5 mm Stanzen die Mittelebereiche (b) entnommen und getrennt von den Randbereichen (c) analysiert.



**Abbildung 6: Prinzip des Stanzens der Rand- und Mittelebereiche für PIH-Untersuchungen**

Die Biopsien aus den operativen Eingriffen wurden mit einer 8 mm-Stanze (a) gestanzt und für 7 oder 14 Tage in Kultur gehalten. Zur Melaninbestimmung wurde die Mitte (b) mit einer 5 mm Stanze entnommen und Rand (c) und Mitte (b) auf Melanin untersucht.

Um herauszufinden, ob es sich tatsächlich um Melanogenese handelt, wurde ein Tyrosinase-Inhibitor (W630; Einsatzkonzentration 16,67  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Bei jedem Mediumwechsel erfolgte zur Überwachung der Vitalität ein LDH-Assay, dessen Ergebnisse in nachfolgender Abbildung 7 dargestellt sind.



**Abbildung 7: Vitalität von Hautbiopsien in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.**

Die Hautbiopsien wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen in Kultur gehalten. Ein Teil der Biopsien wurde zudem mit dem Tyrosinase-Inhibitor W630 (Einsatzkonzentration 16,67  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Mediumproben entnommen und über den LDH-Assay die Vitalität bestimmt. Die LDH-Aktivitätssmessung erfolgte bei 490 nm. Je Ansatz wurden zwei Biopsien in Doppelbestimmung vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von vier unbehandelten und zwei mit W630 behandelten Spendern. Eine hohe Absorption ist ein Maß reduzierter Vitalität.

Die Hautmodelle zeigen 2 Tage nach Inkulturnahme eine deutlich reduzierte Vitalität im Gegensatz zu den Biopsien nach 4 bzw. 6 Tagen Kultivierung. Bis 6 Tage Kultivierungsdauer bleibt die Vitalität erhalten, danach ist eine erhöhte LDH-Sekretion als Zeichen sinkender Integrität und Vitalität zu beobachten. Eine Behandlung mit W630 zeigt keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Biopsien. Nach 8 Tagen sinkt die Vitalität der Biopsien bis Kultivierungsende deutlich.

Die Ergebnisse der Melaninbestimmung der Rand- und Mittelebereiche sind Abbildung 8 dargestellt und jeweils auf die Mittelebereiche am Tag der Inkulturnahme (Mitte  $t_0$ ) bezogen.

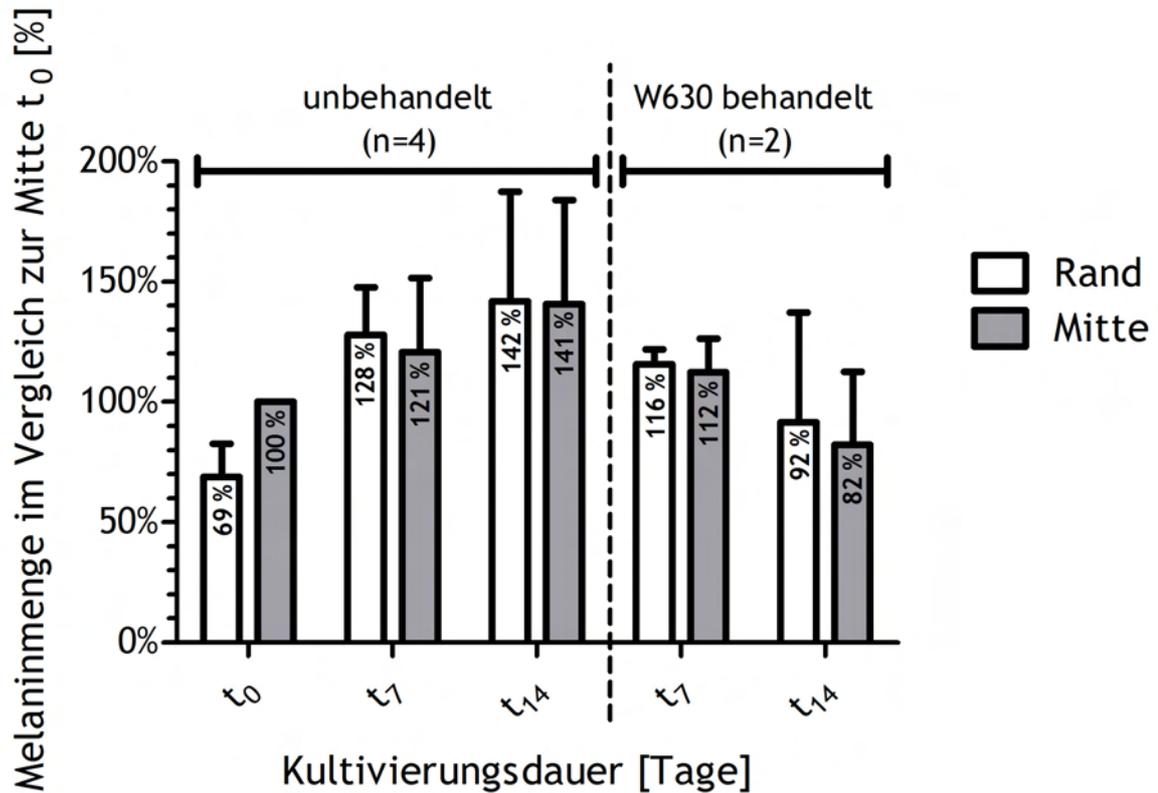


Abbildung 8: Melaninbestimmung von Hautbiopsien in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

Die Hautbiopsien wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen in Kultur gehalten. Ein Teil der Biopsien wurde zudem mit dem Tyrosinase-Inhibitor W630 (Einsatzkonzentration 16,67  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Biopsien geerntet, die Mitte herausgestanzt und der Melaningehalt der Rand- bzw. Mittebereiche bestimmt. Je Zeitpunkt und Spender wurden zwei Biopsien in Doppelbestimmung vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung bezogen auf die Mittebereiche am Tag der Inkulturnahme (Mitte t<sub>0</sub>) von vier unbehandelten bzw. zwei W630-behandelten Spendern.

Am Tag der Inkulturnahme (t<sub>0</sub>) zeigen die Randbereiche im Vergleich zur Mitte eine um 31 % reduzierte Melaninmenge. Nach 7 Tagen Kultivierungsdauer steigt das detektierte Melanin in den Randbereichen der unbehandelten Biopsien etwas stärker als in den Mittebereichen. In beiden Arealen wurde mehr Melanin gemessen, als am Tag der Inkulturnahme. Beide Areale zeigen nach zwei Wochen Kultivierung eine weitere Steigerung, gleichen sich jedoch an (Rand: 142 %; Mitte: 141 %). Bei Biopsien, die mit Tyrosinase-Inhibitor W630 behandelt wurden, zeigt sich mit steigender Kultivierungsdauer eine deutlich inhibierende Wirkung auf die

Melanogenese, in sowohl den Rand- als auch den Mittelebereichen. Nach 7 Tagen W630-Behandlung wurde immer noch mehr Melanin detektiert als am Tag der Inkulturnahme, jedoch weniger als nach 7 Tagen unbehandelter Biopsien. Erst nach 14 Tagen Behandlung sinken die Melaninmengen in beiden Arealen unter Kontrollniveau (Abbildung 8).

### **4.2 Bestimmung der Melanogenese in Hautbiopsien und in Kokulturen unter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$**

Zunächst werden die Ergebnisse des Einflusses von Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) auf die Melanogenese von Biopsie-Hautmodellen vorgestellt. Es ist bekannt, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die Aktivität und Expression von Tyrosinase anregt (CALLADINE & HARRISON, 2007, COSTIN & HEARING, 2007). Anschließend wird der Einfluss dieses Prostaglandins auf die Melanogenese von Melanozyten in Kokultur mit Fibroblasten vorgestellt. Dies sollte aufzeigen, inwieweit das Vorhandensein von Fibroblasten für den  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Effekt auf die Melanogenese notwendig ist, wie es Untersuchungen von Anbar *et. al.* zeigten. Zum Vergleich wurden Melanozyten ohne Fibroblasten auf diesen Effekt hin untersucht.

#### **4.2.1 Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Melanogenese von Biopsie-Hautmodellen**

Um den Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auf Biopsie-Hautmodelle zu untersuchen, wurden die Biopsiestanzen in Kollagen eingebettet (vgl. Kapitel 3.9), für 10 Tage kultiviert und je Spender zwei Konzentration  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M) zugesetzt. Bei jedem Mediumwechsel erfolgte die Vitalitätsbestimmung mittels LDH-Test und frische Zugabe des Prostaglandins. Am Versuchsende folgte die Melaninbestimmung.

Der Einfluss der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Behandlung auf die Vitalität ist in Abbildung 9 dargestellt.

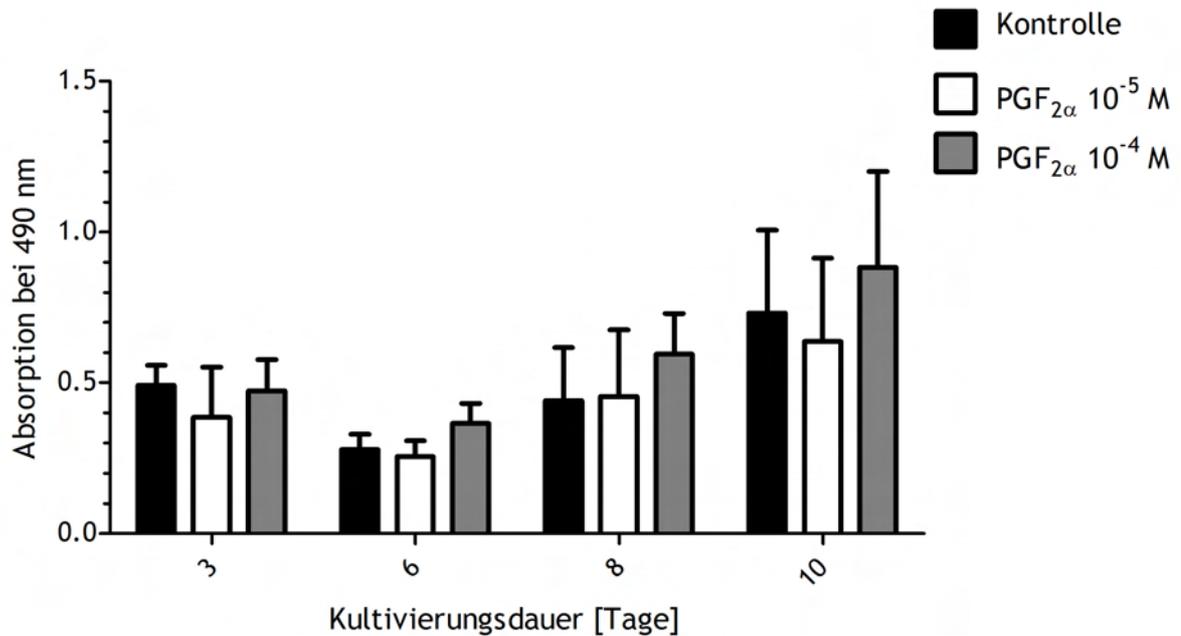


Abbildung 9: Vitalität von Hautbiopsien unter Einfluss von PGF<sub>2α</sub> in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

Die Hautbiopsien wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen in Kultur gehalten. Ein Teil der Biopsien wurde zudem mit PGF<sub>2α</sub> behandelt (Einsatzkonzentration entweder 10<sup>-5</sup> oder 10<sup>-4</sup> M). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Mediumproben entnommen und über den LDH-Assay die Vitalität bestimmt. Die LDH-Aktivitätssmessung erfolgte bei 490 nm. Je Ansatz wurden zwei Biopsien in Doppelbestimmung vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von drei Spendern. Eine hohe Absorption stellt ein Maß reduzierter Vitalität dar.

Der LDH-Test in Abbildung 9 zeigt keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Biopsien im Vergleich zur Kontrolle (Schwankungsbreiten). Nach 8 Tagen sinkt die Vitalität bis Kultivierungsende.

In Abbildung 10 ist die Auswertung der Melaninbestimmung dargestellt. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> (Inkulturnahme) bezogen.

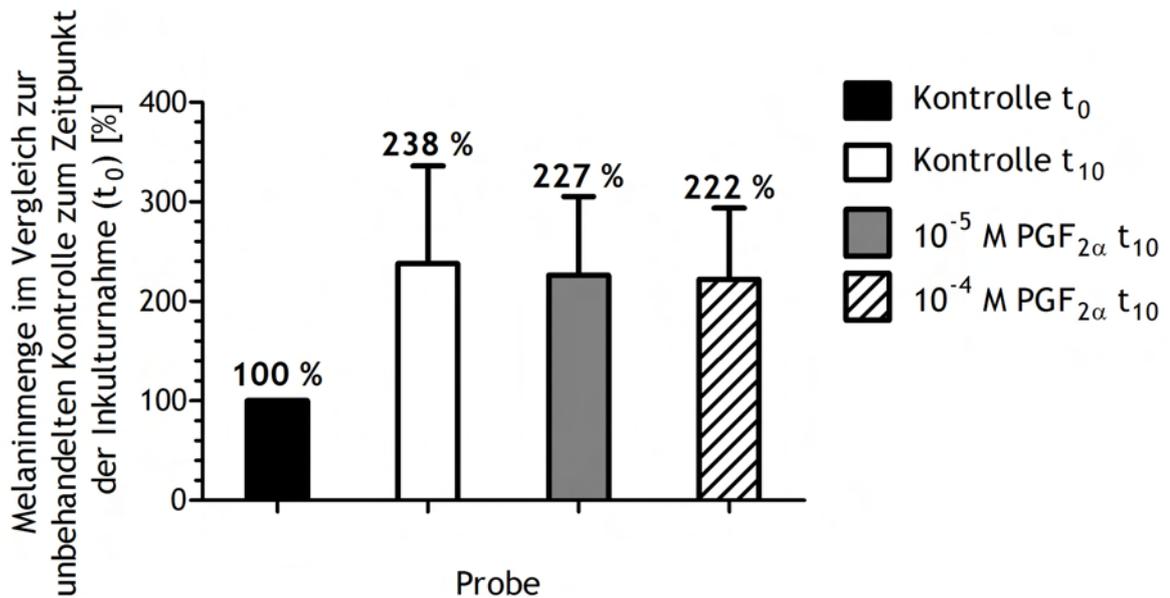


Abbildung 10: Melaninbestimmung von Hautbiopsien unter Einfluss von PGF<sub>2α</sub> in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

Die Hautbiopsien wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen in Kultur gehalten. Mit jedem Mediumwechsel wurde frisches PGF<sub>2α</sub> zugeführt (Einsatzkonzentration entweder 10<sup>-5</sup> oder 10<sup>-4</sup> M). Am Ende der Kultivierungsdauer wurden die Biopsien geerntet und der Melaninbestimmung unterzogen. Je Ansatz wurden zwei Biopsien in Doppelbestimmung vermessen. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte + Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche bzw. Spender bezogen auf den Zeitpunkt der Inkulturnahme (Kontrolle t<sub>0</sub>).

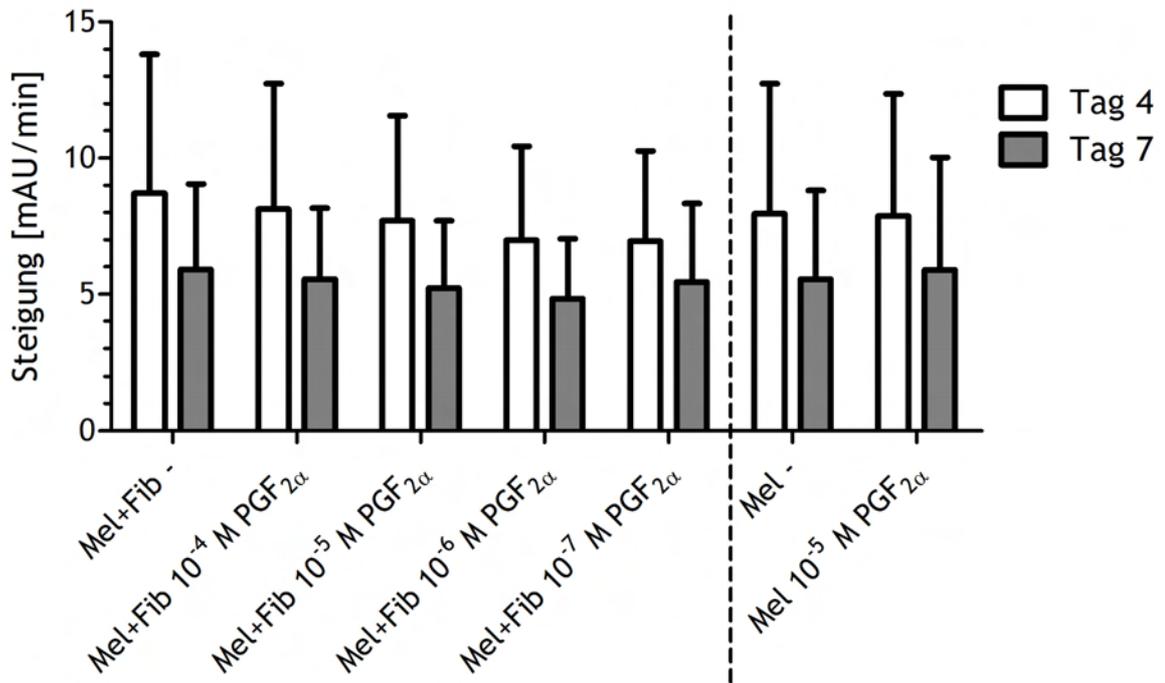
Die Melaninbestimmung in Abbildung 10 zeigt nach 10 Tagen Kultivierung der unbehandelten Probe (Kontrolle t<sub>10</sub>), im Gegensatz zur Kontrolle t<sub>0</sub> (Zeitpunkt der Inkulturnahme), eine deutliche Melaninsteigerung auf 238 %. Die beiden mit PGF<sub>2α</sub> behandelten Proben zeigen nach 10 Tagen Kultivierung jedoch einen leichten Rückgang der produzierten Melaninmenge im Vergleich zur Kontrolle t<sub>10</sub>.

#### 4.2.2 Einfluss von PGF<sub>2α</sub> auf die Melanogenese in Kokulturen und Monolayern

Es ist bekannt dass Latanoprost, ein PGF<sub>2α</sub> Analogon, die Melanogenese der Iris stimuliert. Dies geschieht jedoch nicht direkt, sondern über Fibroblasten (SMITH-THOMAS ET. AL., 2004). Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde PGF<sub>2α</sub> in vier verschiedenen Konzentrationen (10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-4</sup> M) auf Melanozyten-Fibroblasten-

Kokulturen (vgl. Kapitel 3.7), bzw. auf Melanozyten-Monolayer ( $10^{-5}$  M) gegeben und der Einfluss auf die Melanogenese untersucht. Die Kokulturen wurden entweder unter Zuhilfenahme von Zellkultur-Inserts angesetzt (Melanozyten Monolayer am Boden einer 6-Loch-Platte, Fibroblasten im Insert) oder ohne Insert, wobei Melanozyten mit Fibroblasten vermischt direkt in die Kavitäten ausgesät wurden. Die Zellernte erfolgte an Tag 4 und 7. Anschließend folgte ein Tyrosinase-Aktivitäts-Test (siehe 3.12.2) sowie die Melaninbestimmung (siehe 3.12.1).

Der Tyrosinase-Aktivitäts-Test der Kokulturen mit Membran-Inserts ist in Abbildung 11 dargestellt.



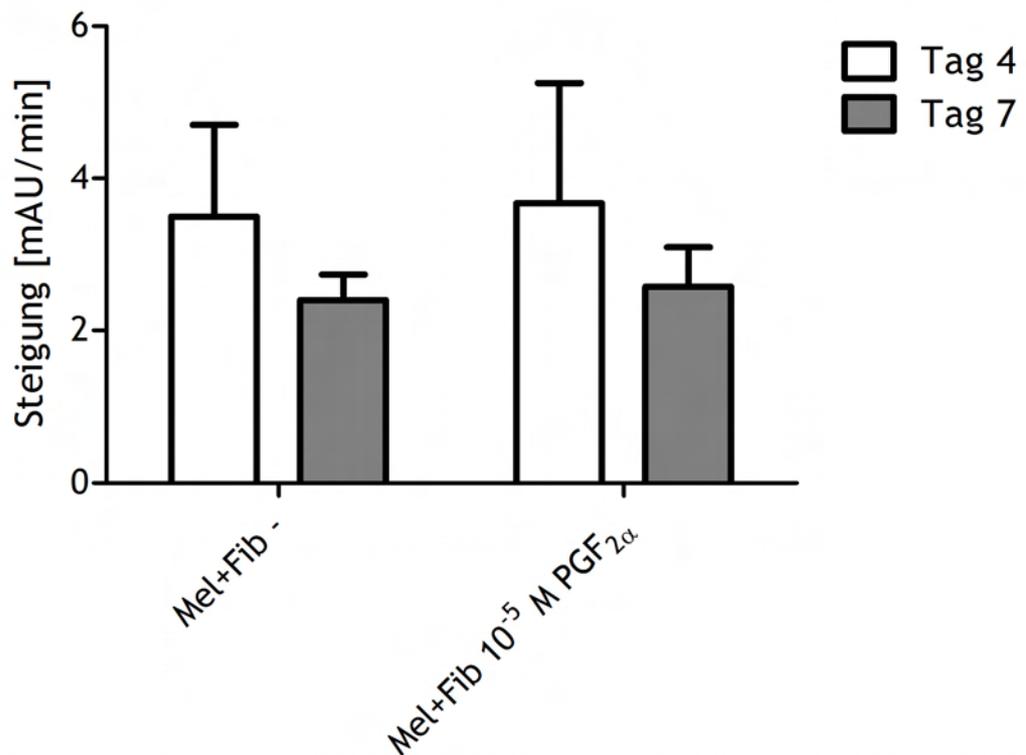
**Abbildung 11: Tyrosinase-Aktivität der Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen und Melanozyten-Monolayer mit Inserts unter Einfluss von PGF<sub>2α</sub> in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.**

Die Kokulturen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen in Kultur gehalten und mit vier Konzentrationen PGF<sub>2α</sub> behandelt (Einsatzkonzentrationen 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-7</sup> M). Ein Mediumwechsel und frische PGF<sub>2α</sub>-Zugabe erfolgte an Tag 4. Nach 4 und 7 Tagen wurden die Melanozyten geerntet und dem Tyrosinase-Aktivitäts-Test unterzogen. Je Ansatz wurden die Zellen zweier Kavitäten einer 6-Loch-Platte gepoolt und die Tyrosinase-Aktivität in Doppelbestimmung ermittelt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 510 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Steigungen + Standardabweichung von vier Spendern im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Mel = Melanozyten, Fib = Fibroblasten, - = unbehandelt.

Der Tyrosinase-Aktivitäts-Test in Abbildung 11 zeigt für alle Proben eine geringere Tyrosinase-Aktivität nach 7 Tagen im Vergleich zu 4 Tagen. Vergleicht man die unbehandelte Kokultur (Mel+Fib -) mit den mit PGF<sub>2α</sub> behandelten Kokulturen nach 4 Tagen sowie 7 Tagen, ist mit sinkender PGF<sub>2α</sub> Konzentration eine sinkende Tyrosinase-Aktivität zu beobachten. Vergleicht man nur unbehandelte Melanozyten (Mel -) mit behandelten Melanozyten (Mel 10<sup>-5</sup> PGF<sub>2α</sub>) sind sowohl nach 4, als auch nach 7 Tagen keine Veränderungen zu sehen.

## Ergebnisse

Betrachtet man die Kokulturen ohne Membran-Insert (Abbildung 12), bei denen die Fibroblasten zusammen mit den Melanozyten in einer Kavität einer 6-Loch-Platte kultiviert wurden, so ist weder nach 4 noch nach 7 Tagen eine Steigerung der Tyrosinase-Aktivität der mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelten Kultur im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu sehen. Vergleicht man die Aktivität der einzelnen Ansätze, ist eine Aktivitätsminderung über die Zeit zu beobachten.



**Abbildung 12: Tyrosinase-Aktivität der Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen ohne Inserts unter Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.**

Die Kokulturen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen in Kultur gehalten und ein Ansatz mit  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelt. Ein Mediumwechsel und frische  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Zugabe erfolgte an Tag 4. Nach 4 und 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und dem Tyrosinase-Aktivitäts-Test unterzogen. Je Ansatz wurden die Zellen zweier Kavitäten einer 6-Loch-Platte gepoolt und die Tyrosinase-Aktivität in Doppelbestimmung ermittelt. Die Absorptionmessung erfolgte bei 510 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Steigungen + Standardabweichung von vier Spendern im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Mel = Melanozyten, Fib = Fibroblasten, - = unbehandelt.

## Ergebnisse

Zur Melaninbestimmung wurden die Zellzahlen der Melanozyten, bei Kultivierungen ohne Inserts die Gesamtzellzahl nach der Ernte bestimmt, die Melaninmittelwerte darauf bezogen und auf die unbehandelte Kontrolle relativiert. Die prozentualen Melaninänderungen der Kokulturen und Monolayer mit Inserts im Vergleich zur Kontrolle sind in Abbildung 13 dargestellt, die der Kokulturen ohne Inserts in Abbildung 14.

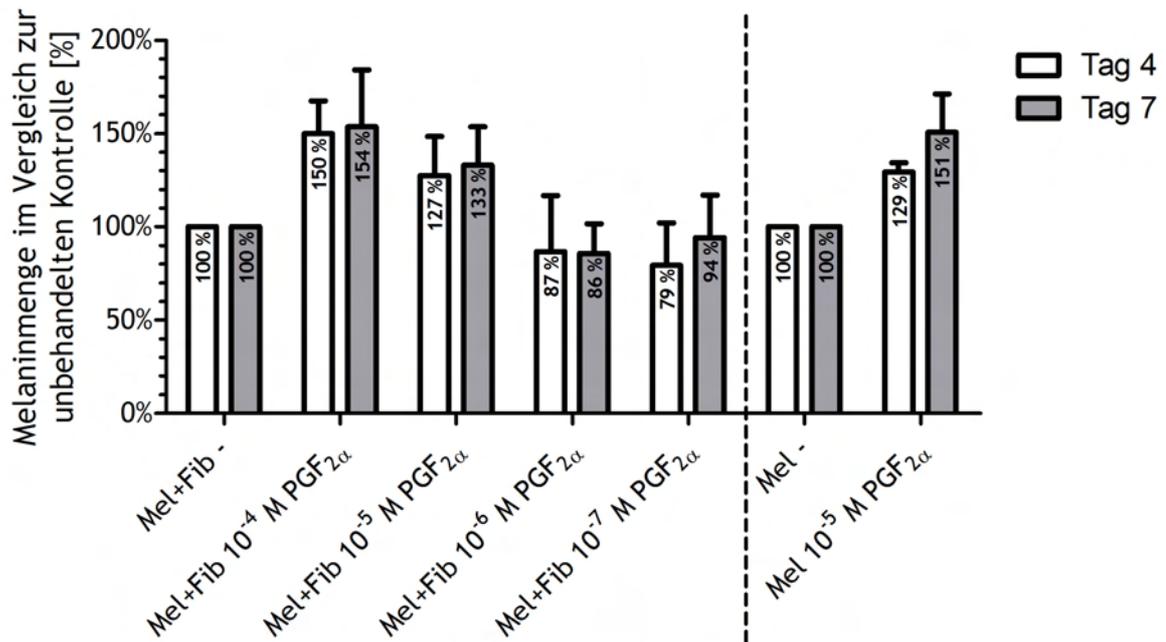


Abbildung 13: Melaninbestimmung von Melanozyten aus Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen und Melanozyten-Monolayer mit Inserts unter Einfluss von PGF $_{2\alpha}$  in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

Die Kokulturen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen in Kultur gehalten und mit vier Konzentrationen PGF $_{2\alpha}$  behandelt (Einsatzkonzentrationen  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  M). Ein Mediumwechsel und frische PGF $_{2\alpha}$ -Zugabe erfolgte an Tag 4. Nach 4 und 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und der Melaninbestimmung unterzogen. Je Ansatz wurden die Melanozyten bzw. das Zellgemisch aus zwei Kavitäten einer 6-Loch-Platte gepoolt und der Melaningehalt in Dreifachbestimmung vermessen. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte + Standardabweichung von vier Spendern bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Mel+Fib - bzw. Mel -).

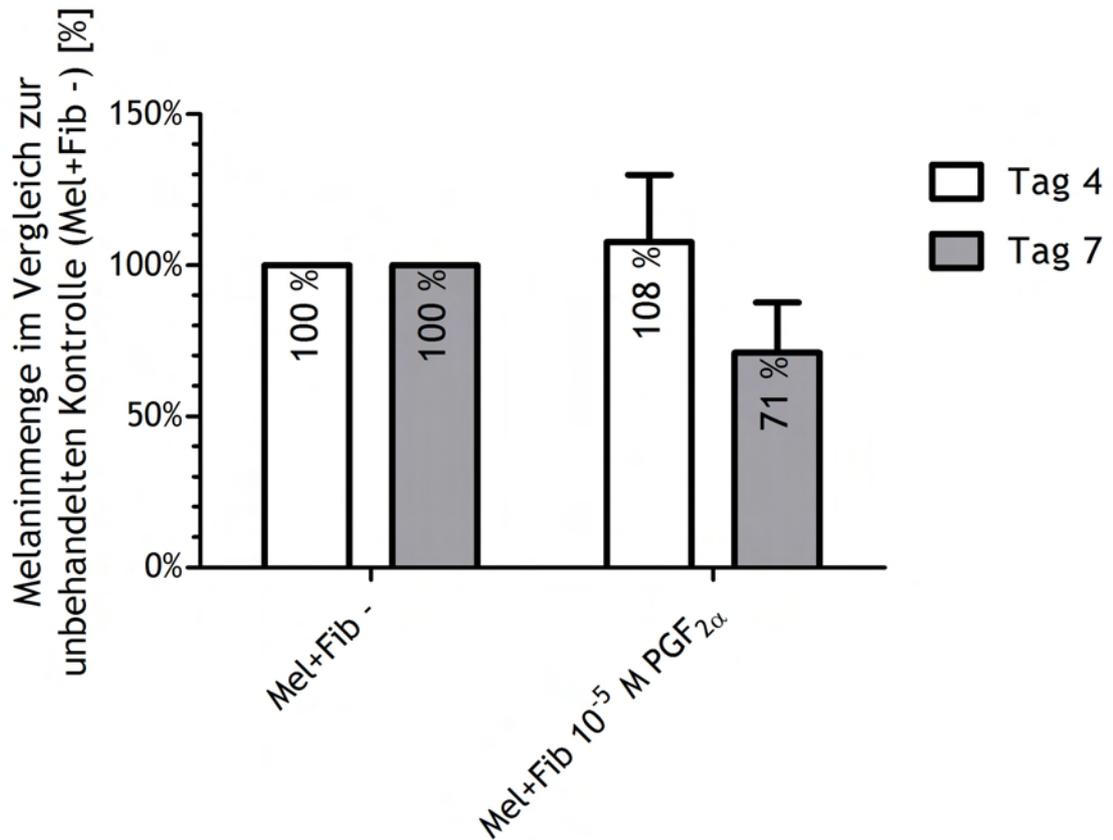
Mel = Melanozyten, Fib = Fibroblasten, - = unbehandelt.

Nach 4 Tagen und einer Behandlung mit  $10^{-4}$  M PGF $_{2\alpha}$  ist eine Steigerung der Melaninmenge auf 150 % und nach 7 Tage auf 154 % zu beobachten. Je geringer die

Konzentrationen an  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , desto weiter sinkt der Melaningehalt. Bei einer Behandlung mit  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ist immer noch eine Steigerung im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Bei  $10^{-6}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  wurde ein Melaningehalt von 87 % und bei  $10^{-7}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  von 79 % erreicht. Beide Ansätze liegen somit im Bereich des Kontrollniveaus.

Betrachtet man die Melaninveränderung über die Kultivierungsdauer, stellt man fest, dass bis  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  eine leichte Steigerung von Tag 4 auf Tag 7 zu sehen ist. Melanozyten ohne Fibroblasten zeigen bei einer Behandlung mit  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  im Gegensatz zu unbehandelten Melanozyten nach 4 Tagen eine Steigerung, mit einem weiteren Anstieg nach 7 Tagen auf 151 % (Abbildung 13).

Vergleicht man die prozentualen Melaninveränderungen ohne Inserts nach 4 Tagen (Abbildung 14), zeigen die behandelten Ansätze eine minimale Steigerung auf 108 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 7 Tagen ist jedoch eine Minderung bei den behandelten Ansätzen gegenüber der Kontrolle zu sehen.



**Abbildung 14: Melaninbestimmung von Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen ohne Inserts unter Einfluss von PGF<sub>2α</sub> in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.**

Die Kokulturen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen in Kultur gehalten und mit 10<sup>-5</sup> M PGF<sub>2α</sub> behandelt. Ein Mediumwechsel und frische PGF<sub>2α</sub>-Zugabe erfolgte an Tag 4. Nach 4 und 7 Tagen wurde das Zellgemisch geerntet und der Melaninbestimmung unterzogen. Je Ansatz wurden die Zellen zweier Kavitäten einer 6-Loch-Platte gepoolt und der Melaningehalt in Dreifachbestimmung vermessen. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte + Standardabweichung von vier Spendern bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Mel+Fib -).

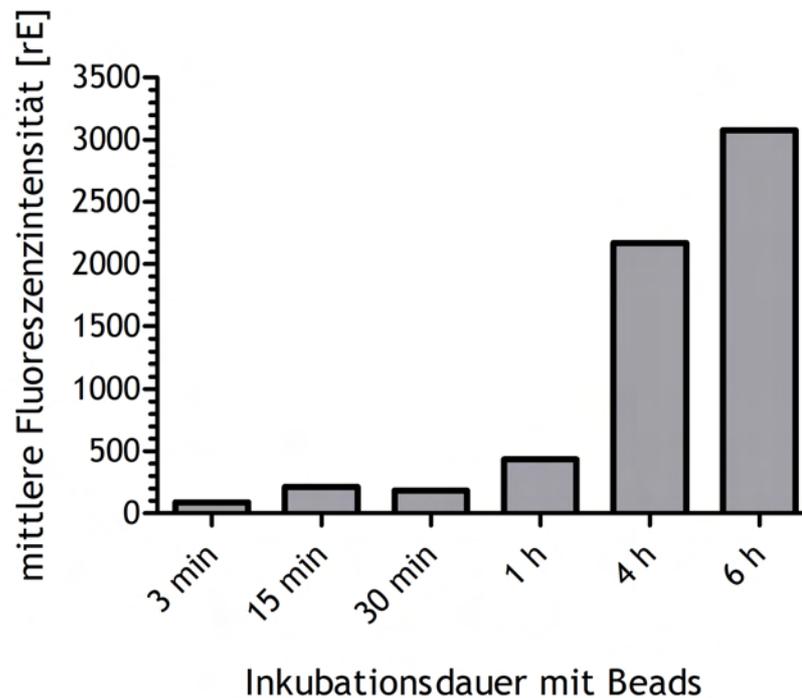
Mel = Melanozyten, Fib = Fibroblasten, - = unbehandelt.

### **4.3 Aufbau eines Assay-Systems zur Untersuchung der Phagozytoseleistung primärer humaner Keratinozyten**

Da der genaue Transfervorgang von Melanosomen zu Keratinozyten und die Melanozyten-Keratinozyten-Interaktion während des Transferprozesses noch nicht vollständig charakterisiert ist (MA ET. AL., 2010), sollte ein Assay-System etabliert werden, welches die generelle bzw. substanzinduzierte Phagozytoseleistung von primären, humanen Keratinozyten untersucht. Als Kontrolle wurde ein Phagozytose-Inhibitor eingesetzt, der auf die Aktinpolymerisation wirkt.

Zunächst stand im Vordergrund die generelle Kinetik der Phagozytose primärer Keratinozyten zu bestimmen. Daher wurden zu den Zellen fluoreszierende Beads gegeben und die Aufnahme dieser in Abhängigkeit der Zeit mittels FACS gemessen (vgl. Abbildung 15). Insbesondere der 3 min-Wert diente als eine Kontrolle, um die passive Adhärenz der Beads an den Keratinozyten zu vermessen, da innerhalb eines so kurzen Zeitraumes nicht viele Beads aktiv phagozytiert werden können.

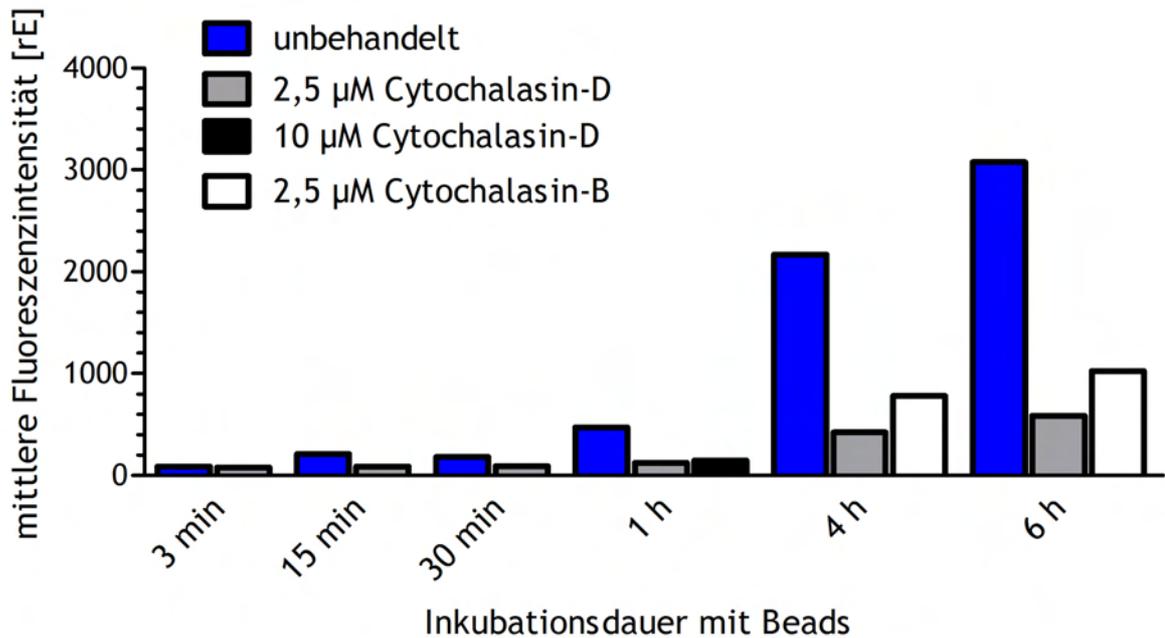
In den ersten Versuchen erfolgte die Inkubation unbehandelter Keratinozyten mit Beads für 3 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h und 6 h um die optimale Inkubationsdauer eingrenzen zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 zusammengefasst. Es ist deutlich zu sehen, dass mit steigender Inkubationsdauer vermehrt Phagozytose stattfindet. Je höher die Fluoreszenzintensität, desto mehr Beads wurden von den Keratinozyten aufgenommen.



**Abbildung 15: Phagozytoseleistung unbehandelter Keratinozyten in Vollmedium.**

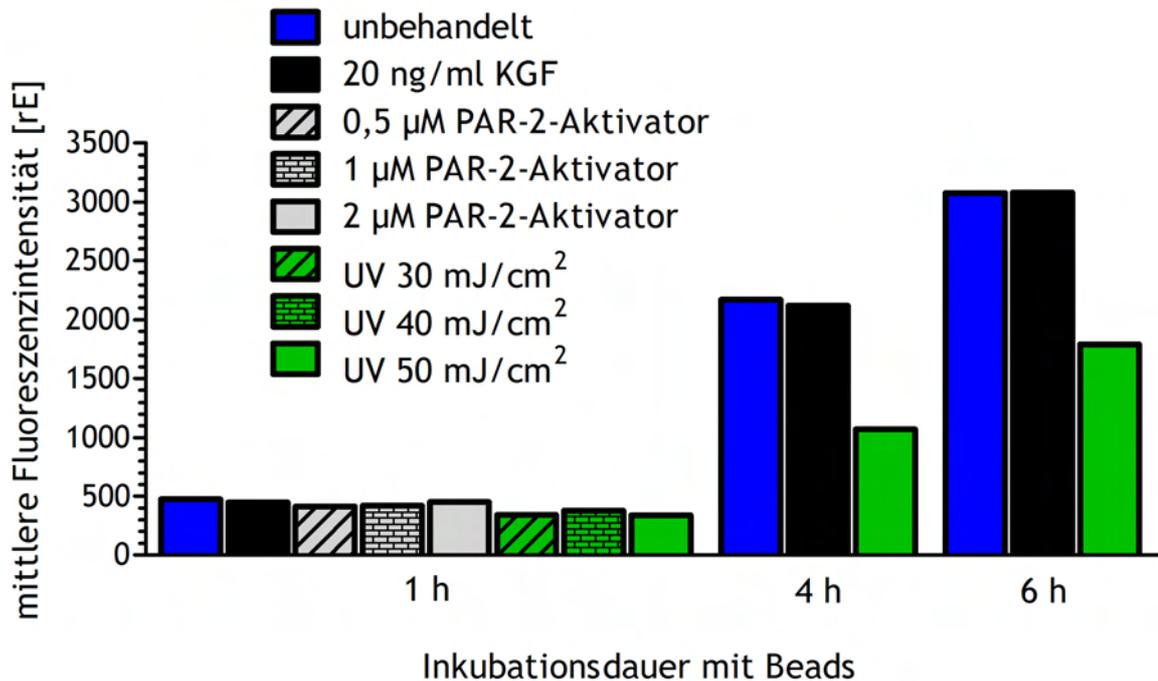
Unbehandelte Keratinozyten wurden mit fluoreszierenden Beads ( $0,5 \mu\text{m}$ ) unterschiedlich lange inkubiert. Die Phagozytoseleistung, d.h. die Menge aufgenommener Beads wurde mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten der gemessenen Keratinozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Ansteigende Intensitäten beschreiben eine vermehrte Phagozytose der fluoreszierenden Beads durch die Keratinozyten.

Um nochmals sicher zu stellen, dass es sich um aktive Phagozytose handelt, wurde ein auf die Aktinpolymerisation wirkender Phagozytose-Inhibitor (Cytochalasin) hinzugegeben und die Phagozytoseleistung der Keratinozyten zur unbehandelten Kontrolle betrachtet. Hierzu kam Cytochalasin-D und als Vergleich Cytochalasin-B zum Einsatz. Abbildung 16 zeigt, dass je länger die Bead-Inkubation, desto stärker die Inhibierung. Ebenfalls ist zu entnehmen dass Cytochalasin-D, im Vergleich zu Cytochalasin-B, der potentere Inhibitor ist (siehe 4 und 6 h). Außerdem ist festzuhalten, dass eine Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  Cytochalasin-D, im Vergleich zu  $2,5 \mu\text{M}$  Cytochalasin-D, zu keiner stärkern Inhibition führt (siehe 1 h).



**Abbildung 16: Phagozytoseleistung mit Inhibitor vorbehandelten Keratinozyten in Vollmedium.** Keratinozyten wurden entweder mit Cytochalasin-D (Einsatzkonzentration 2,5 µM und 10 µM) oder Cytochalasin-B (Einsatzkonzentration 2,5 µM) für 1 h vorbehandelt und unterschiedlich lange mit fluoreszierenden Beads (0,5 µm) inkubiert. Die Phagozytoseleistung, d.h. die Menge aufgenommener Beads wurde mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten der gemessenen Keratinozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Ansteigende Intensitäten beschreiben eine vermehrte Phagozytose der fluoreszierenden Beads durch die Keratinozyten.

Im nächsten Schritt wurden die Keratinozyten mit verschiedenen potentiellen Phagozytose-Stimulatoren für 1 h vorbehandelt und anschließend unterschiedlich lange inkubiert. Auf Grund zu geringer Signale bei Bead-Inkubationszeiten < 1 h, wurde sich in den folgenden Versuchen auf 1 h, 4 h und 6 h fokussiert. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse nach 1 h Vorbehandlung mit KGF und nach UV-Bestrahlung mit einer Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> und anschließender Bead-Inkubation für 1 h, 4 h und 6 h. Außerdem wurde ein PAR-2-Aktivator (drei Konzentrationen) und UV-Bestrahlungen (30 und 40 mJ/cm<sup>2</sup>) für anschließende Bead-Inkubationen von 1 h getestet.



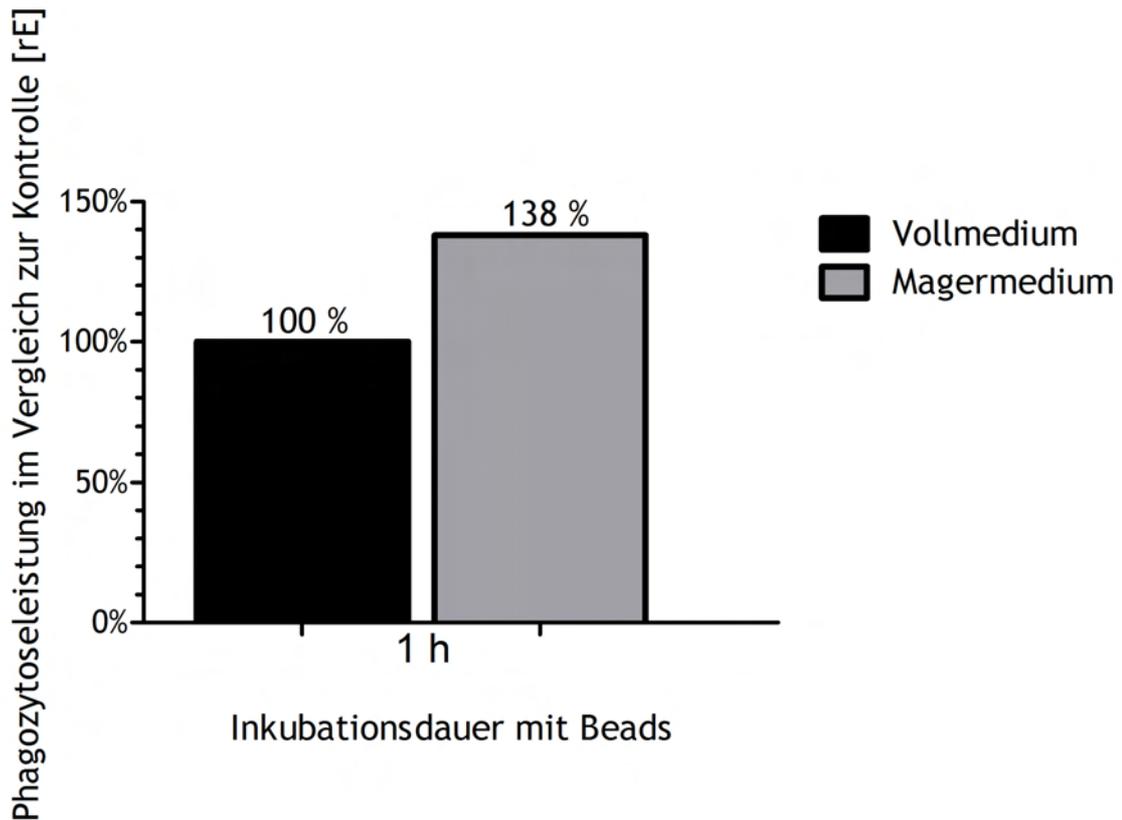
**Abbildung 17: Phagozytoseleistung behandelter Keratinozyten in Vollmedium.**

Keratinozyten wurden entweder mit KGF (Einsatzkonzentration 20 ng/ml) oder einem PAR-2-Aktivator (Einsatzkonzentration 0,5 µM, 1 µM, 2 µM) für 1 h vorbehandelt und anschließend unterschiedlich lange mit fluoreszierenden Beads (0,5 µm) inkubiert. Nach der Bestrahlung mit UV-Licht (Einsatzdosen 30 mJ/cm<sup>2</sup>, 40 mJ/cm<sup>2</sup>, 50 mJ/cm<sup>2</sup>) erfolgte die Bead-Inkubation 1 h später ebenfalls über die angegebenen Zeiträume. Die Phagozytoseleistung, d.h. die Menge aufgenommener Beads, wurde nach 1 h, 4 h oder 6 h mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten der gemessenen Keratinozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Ansteigende Intensitäten beschreiben eine vermehrte Phagozytose der fluoreszierenden Beads durch die Keratinozyten.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass nach 1 h Vorbehandlung mit allen drei eingesetzten Konzentrationen PAR-2-Aktivator, die Fluoreszenzsignale unter Kontrollniveau bleiben. Es ergab sich lediglich eine Konzentrationsabhängigkeit, mit dem besten Ergebnis für 2 µM PAR-2-Aktivator. Nach 1 h Vorbehandlung mit KGF, bewegen sich die Signale für alle drei Bead-Inkubationszeiten auf Höhe der unbehandelten Kontrollen. Durch UV-Bestrahlung lässt sich keine Dosis-Abhängigkeit feststellen und es wurde sogar eine Phagozytoseinhibierung beobachtet.

Es stellte sich nun die Frage, was als adäquate Positivkontrolle anzusehen wäre. Deshalb wurde untersucht, inwieweit das Kultivierungsmedium Einfluss auf die Phagozytose von Keratinozyten hat und ob eine Kultivierung in Magermedium zu einer höheren Bead-Aufnahme im Gegensatz zu einer Kultivierung in Vollmedium führt. Dazu wurde 1 Tag nach Aussaat der Keratinozyten in Vollmedium, auf Magermedium gewechselt und mit Keratinozyten verglichen die ausschließlich in Vollmedium kultiviert wurden. Außerdem wurde sich im weiteren Verlauf auf eine Bead-Inkubationszeit von 1 h beschränkt, da zwischen 4 und 6 h kaum Unterschiede zu verzeichnen waren, sehr hohe Melanosomenaufnahmen gemessen wurden und somit ein positives Beeinflussen der Phagozytoseleistung kaum noch möglich war. Bei 1 h Bead-Inkubation phagozytieren die Keratinozyten nachweislich immer noch sehr gut und die Möglichkeit ist gegeben, die Phagozytose weiter zu stimulieren.

In nachfolgender Abbildung 18 sind die Ergebnisse unbehandelter Keratinozyten nach 1 h Bead-Inkubation in Voll- und Magermedium gegenübergestellt.



**Abbildung 18: Einfluss von Voll- und Magermedium auf die Phagozytoseleistung un behandelter Keratinozyten.**

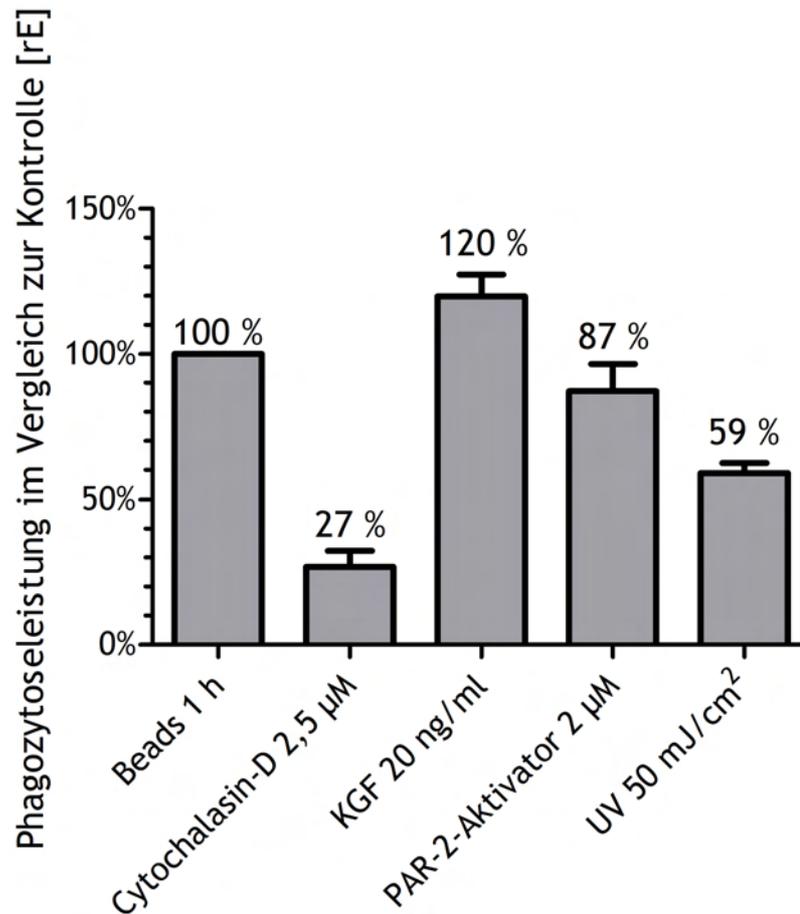
Unbehandelte Keratinozyten wurden entweder in Voll- oder Magermedium mit fluoreszierenden Beads (0,5  $\mu\text{m}$ ) für 1 h inkubiert. Die Phagozytoseleistung, d.h. die Menge aufgenommener Beads wurde mittels FACS bestimmt. Dargestellt ist die Phagozytoseleistung der gemessenen Keratinozyten nach 1 h im Vergleich zur Kontrolle (Inkubation in Vollmedium). Je höher die Phagozytoseleistung, desto höher die aufgenommene Menge fluoreszierender Beads durch die Keratinozyten. Die Phagozytoseleistung ist in Magermedium, im Vergleich zur Kontrolle in Vollmedium, um 38 % verbessert.

Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass bei einer Kultivierung in Magermedium eine gesteigerte Phagozytoseleistung un behandelter Keratinozyten um 38 %, in Bezug auf eine Kultivierung in Vollmedium (100 %), erreicht wurde.

Auf Grund der bisher gezeigten Ergebnisse, wurden die Keratinozyten in den nächsten Versuchen ausschließlich in Magermedium kultiviert und die Inkubation mit Beads erfolgte weiterhin für 1 h. Außerdem wurden eine Bestrahlungsdosis von

50 mJ/cm<sup>2</sup> und eine PAR-2-Aktivator-Konzentration von 2 µM festgelegt. Die Konzentrationen von KGF (20 ng/ml) sowie Cytochalasin-D (2,5 µM) blieben unverändert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst.



**Abbildung 19: Phagozytoseleistung behandelter Keratinozyten in Magermedium.**

Keratinozyten wurden in Magermedium entweder mit KGF (Einsatzkonzentration 20 ng/ml), einem PAR-2-Aktivator (Einsatzkonzentration 2 µM) oder mit Cytochalasin-D (Einsatzkonzentration 2,5 µM) für 1 h vorbehandelt und anschließend für 1 h mit fluoreszierenden Beads (0,5 µm) inkubiert. Nach der Bestrahlung mit UV-Licht (Einsatzdosis 50 mJ/cm<sup>2</sup>) erfolgte die Bead-Inkubation 1 h später ebenfalls für 1 h. Die Phagozytoseleistung, d.h. die Menge aufgenommener Beads wurde mittels FACS bestimmt und aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten die Phagozytoseleistung berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von drei Spendern.

Es ist eine deutliche Inhibierung durch die Behandlung mit Cytochalasin-D zu sehen. Die Phagozytoseleistung ist im Vergleich zur Kontrolle um 73 % geringer. Auch eine Bestrahlung mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  (59 % Phagozytoseleistung) und eine Behandlung mit PAR-2-Aktivator (87 % Phagozytoseleistung) wirken sich hemmend auf die Phagozytose aus. KGF wirkt sich hingegen stimulierend aus und bewirkt eine 20 % höhere Phagozytoserate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19).

## 5 Diskussion

Ziel dieser Master-Thesis war es zum Einen die Methodenentwicklung eines Biopsie-Hautmodells aus Hautexplantaten für Melanogenese-Untersuchungen abzuschließen und abzuschätzen, inwiefern sich das Hautmodell als ein *ex vivo* Modell für die Target-Identifizierung/-Validierung für postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) nutzen lässt. Denn nach wie vor stellt die Identifizierung PIH-spezifischer Targets ein großes Potential für die Behandlung des „even skin tones“ dar. Hierbei stand die Erhebung der Parameter der Melaninsynthese sowie Vitalität im Vordergrund. Zum Anderen sollte überprüft werden, ob ein Prostaglandin ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) in der Lage ist, die Melanogenese zu beeinflussen und inwieweit Fibroblasten für dieses Phänomen von Bedeutung sind.

Außerdem sollten Untersuchungen angestellt werden, inwieweit sich die Melanosomenaufnahme durch Keratinozyten durch proinflammatorische Mediatoren steuern lässt.

Im Labor Ethnic Skin/ Sun Care der Beiersdorf AG, wurden über die Jahre etliche Hautmodelle entwickelt und hinsichtlich pigmentierungsrelevanter Parameter sowie der Stabilisierung der Vitalität und der *in vivo* nahen Charakteristika weiter optimiert.

All diese Modelle zeigen jedoch die Gemeinsamkeit, dass sie während der Kulturdauer eine erhöhte Melanogenese aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob es sich hierbei um eine durch die Stanzung induzierte postinflammatorische Hyperpigmentierung handelt, um ein *ex vivo* Modell für dieses Phänomen zur Target-Identifizierung/ -Validierung zu haben.

## 5.1 Untersuchungen der Rand- und Mittelebereiche von Hautbiopsien auf postinflammatorische Hyperpigmentierung

Im Rahmen einer Diplomarbeit (DENZEL, 2005) wurde ein pigmentiertes Vollhautmodell, bestehend aus humanen Keratinozyten und Melanozyten, die auf einem Kollagengel mit integrierten Fibroblasten (Dermisäquivalent) kultiviert wurden, entwickelt. Hiermit konnten erste pigmentierungsrelevante Parameter, wie z.B. eine Abhängigkeit der Tyrosinaseaktivität durch Stimulation mit sonnensimuliertem Licht, untersucht werden. Da aber Melanozyten kaukasischer Spender kaum durch sonnensimuliertes Licht stimulierbar sind, die Ergebnisse eine unbefriedigende Streuung aufzeigten und ein solches Modell mit sehr viel Arbeitsaufwand verbunden ist, eignet sich ein solches Modell für Routineeinsätze eher nicht. Dieser Sachverhalt wird auch in einigen Publikationen beschrieben, wo zudem eine unzureichende *in vivo*-Nähe von Hautmodellen aus Kokulturen bemängelt wird (UCHINO ET. AL., 2009).

So wurde im Labor Ethnic Skin/ Sun Care (Beiersdorf AG) 2009 ein *in vivo*-nahes Pigmentierungsmodell aus Hautabschnitten für Untersuchungen der Modulation der Melanogenese entwickelt, bei der die Induzierbarkeit durch UV-Licht im Vordergrund stand (VON MACH, 2009). Die Hautabschnitte wurden mit der Dermisseite nach unten in Membran-Inserts kultiviert und durch die permeable Membran mit Medium versorgt. Eine UV-Induzierbarkeit der Melaninsynthese sowie die weitestgehende Erhaltung der Morphologie konnten hier nachgewiesen werden. Allerdings besaßen die Biopsien hierbei keine einheitliche Größe (Zuschneiden mittels Schere) und zeigten nach bereits einer Woche Kultivierung einen Vitalitätsverlust. Dieses Problem wurde auch in der Literatur beschrieben (NATH ET. AL., 2007; CHEN ET. AL., 2010). Ein weiterer Nachteil war die große Menge an Biopsie-Material die hier benötigt wurde.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen beschäftigte sich N. Stümer in Ihrer Bachelor-Arbeit 2011 mit der Etablierung und Charakterisierung eines Hautmodells, das v.a. die *in vivo*-Nähe möglichst lange aufrechterhalten und zudem eine deutlich stabilere Vitalität zeigen sollte. Hier wurden aus den Hautabschnitten mit Biopsie-Stanzen einheitliche Größen erzeugt, in Membran-Inserts auf Kollagen gebettet und

kultiviert. Die Untersuchungen zeigten hinsichtlich UV-Responsivität sowie über eine Kultivierungsdauer über eine Woche hinaus gute Ergebnisse. Dies wurde auch in einer anschließenden Bachelor-Arbeit (CHOPRA, 2011) gezeigt, wo die Modelle sogar bis drei Wochen Kultivierung die *in vivo*-nahen Charakteristika beibehielten. Zudem konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass diese Modelle UV- und Wirkstoff-Responsivität im Sinne der Melanogenese zeigten.

Solche Hautmodelle, mit Erhaltung der Morphologie und Funktionsfähigkeit hinsichtlich pigmentierungsrelevanter Stoffwechselfvorgänge und Parameter, sind gerade im Hinblick auf z.B. Wirkstofftests mit Melanogenese-stimulierenden/-hemmenden Eigenschaften, die oft erst nach längerer Inkubationszeit Resultate zeigen, von großer Bedeutung. Nicht zuletzt können so, schon vor Beginn von Probandenstudien, potentielle Wirkstoffe an Hautmodellen näher untersucht und charakterisiert werden.

Überdies ist der Regulationsmechanismus der Melaninsynthese, einschließlich der Hyperpigmentierung durch Entzündungsreaktionen, bis jetzt noch nicht vollständig geklärt (TOMITA ET. AL., 1987; COSTIN & HEARING, 2007).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit dienten zum Einen dem „proof-of-concept“, mit dem Ziel herauszufinden, ob es sich bei der beobachteten Melaninsteigerung mit steigender Kultivierungsdauer um PIH handelt und zum Anderen ein Modell zur Target-Identifizierung/ -Validierung für die PIH zu entwickeln. Dabei stand die nicht-stimulierte Melanogenese im Vordergrund, wie sie durch die alleinige Kultur von Hautbiopsien über längere Zeit zu beobachten ist. Die Hypothese war, dass es sich hierbei um eine vorrangig im Randbereich (Exzisionstelle) ablaufende PIH handelt. Um dies zu prüfen, wurden genaue örtliche Untersuchungen auf Vitalität und Melanogenese (Randbereiche (Exzisionstelle/ Wundheilung) versus Zentrum) durchgeführt. Zudem wurden Untersuchungen mit einem potenten Tyrosinase-Inhibitor durchgeführt, um zu überprüfen, ob es tatsächlich Melanogenese ist die in der Kultur der Biopsien abläuft und mit den Ergebnissen der nicht-stimulierten Melanogenese verglichen.

Durch die operationsbedingte Exzision befinden sich die Hautexplantate in einem chronisch entzündlichen Zustand (SEN, 2009). Deshalb wurde darauf geachtet, dass die Hautabschnitte mit einer erkennbaren Rötung gemieden wurden. Der Grund für

diese Entzündungsreaktion/ Wundheilung sind die durch das Schneiden bzw. Stanzen verletzten Hautzellen, die dadurch vermehrt passiv LDH sezernieren. Apoptotische Zellen geben aktiv LDH in ihre Umgebung ab und kann dort detektiert werden. Dies zeigt der LDH-Test in Abbildung 7. Die gestanzten 8 mm Biopsien wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen in Kultur gehalten, ein Teil mit einem Tyrosinase-Inhibitor behandelt (W630) und zu unterschiedlichen Zeitpunkt die LDH-Aktivität im Mediumüberstand gemessen. 2 Tage nach Inkulturnahme wurde eine erhöhte Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms LDH ins Medium detektiert, was auf die Stanzung zurückgeführt werden kann. Nach 4 Tagen scheint es, dass die Vitalität steigt, was aber daran liegt, dass das sezernierte LDH durch den Mediumwechsel eliminiert wurde. Danach bleibt die Vitalität über 6 Tage stabil, bis dann wiederum ein Anstieg der LDH-Konzentration detektiert wurde, was ein Indiz dafür ist, dass die Zellen nun in Apoptose gehen und aktiv LDH freisetzen. Vergleicht man die mit W630 behandelten Biopsien mit den Unbehandelten, so kann man erkennen dass der Wirkstoff sich nicht negativ auf die Vitalität auswirkt (Abbildung 7).

Um Melanin zu bestimmen, wurden die 8 mm Biopsien für 7 bzw. 14 Tage auf Kollagen in Membran-Inserts kultiviert und am Versuchsende vermessen. Um herauszufinden, ob hier tatsächlich Melanogenese abläuft, wurden einige Biopsien mit einem Tyrosinase-Inhibitor (W630) behandelt. Nach Ablauf der jeweiligen Kultivierungszeit wurden die 8 mm Biopsien geerntet, die Epidermis abgelöst, die Mittelebereiche herausgestanzt (5 mm) und beide Bereiche (Rand/ Mitte; vgl. Abbildung 6) auf Melanin untersucht (Abbildung 8).

Betrachtet man die Melanindaten in Abbildung 8, so lässt sich feststellen dass entgegen den Erwartungen in den Mittelebereichen zum Zeitpunkt der Inkulturnahme ( $t_0$ ) mehr Melanin detektiert wurde als in den Randbereichen. Es wurde eine 31 % höhere Melaninmenge in den Mittelebereichen detektiert als in den Randbereichen. Da bei verletztem Gewebe nicht nur die direkt beschädigten Zellen betroffen, sondern auch benachbarte bei einem Wundheilungsprozess beteiligt sind, könnte in den Mittelebereichen bereits PIH vorliegen. Andererseits ist sehr wahrscheinlich, dass die Zellen im Randbereich (Verletzung durch Stanzung), das Melanin bzw. die Melanosomen freigesetzt haben und somit auch nicht detektiert werden kann. Betrachtet man die W630 behandelten Biopsien im Vergleich zu den

Unbehandelten, so lässt sich nach sowohl 7, als auch 14 Tagen ein Rückgang der Melaninmenge feststellen.

Es ist nicht eindeutig zu klären, ob es sich um eine vorwiegend im Randbereich ablaufende PIH handelt, da die komplette Biopsie pigmentiert. Zwar konnte durch den Tyrosinase-Inhibitor W630 gezeigt werden, dass es sich um Melanogenese handelt, doch schwanken wie gezeigt, die Melaninwerte der Spender sehr unterschiedlich. Es kann einerseits sein, dass es sich hier nicht um PIH, sondern um eine durch das Kultivierungsmedium/ Wachstumsfaktoren bedingte Steigerung der Melanogenese handelt oder dass die gesamte Biopsie einer PIH unterliegt. Dies könnte so erklärt werden, dass die Biopsie so klein ist, dass Mediatoren, die von der Exzisionstelle austreten und eine PIH verursachen, in die gesamte Biopsie diffundieren und so auch die Mitte in der Melanogenese beeinflussen.

In der Literatur ist ein Zusammenhang von Prostaglandinen und PIH beschrieben (CALLADINE & HARRISON, 2007; TOMITA ET. AL., 1992). Hiernach wird durch die Aktivierung des PAR-2 („proteinase-activated-receptor-2“) die Ausschüttung von z.B. PGE<sub>1</sub> und PGF<sub>2α</sub> stimuliert. Außerdem soll ebenso PGE<sub>2</sub> für die Induktion einer PIH in Frage kommen (TOMITA ET. AL., 1987). So könnte z.B. eine Untersuchung auf diese beteiligten Prostaglandine folgen.

Da bekannt ist, dass PIH häufiger bei dunkleren Hauttypen (Fitzpatrick Hauttypen IV bis VI) auftritt (DAVIS & CALLENDER, 2010; LUDMAN ET. AL., 2012), könnten nachfolgende Untersuchungen auf diese Hauttypen fokussiert werden, zumal die Spender in dieser Arbeit maximal Hauttyp III waren. Eine weitere Methode um eine PIH zu identifizieren, wäre z.B. eine Alzianblau-Färbung. Es wurden Vakuolisierungen in Basalzellen und bandartige Ablagerungen von Mucin in PIH betroffenen Arealen beobachtet, die durch eine solche Färbung sichtbar gemacht werden können (NOTO ET. AL., 1998).

## 5.2 Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Melanogenese von Biopsie-Hautmodellen sowie Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen

$\text{PGF}_{2\alpha}$  ist bekannt dafür, die Aktivität und Expression der Tyrosinase zu stimulieren. Es erhöht sowohl die Fähigkeit der Melanozyten, Dendriten zu bilden, als auch die Melaninsynthese anzuregen (CALLADINE & HARRISON, 2007, COSTIN & HEARING, 2007). Die Mechanismen dieser Effekte sind jedoch nicht aufgeklärt (PROTA ET. AL., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass Latanoprost, ein  $\text{PGF}_{2\alpha}$  Analogon, die Melanogenese der Iris stimuliert, jedoch nicht direkt, sondern über Fibroblasten (SMITH-THOMAS ET. AL., 2004). 2011 wurde auf der „International Pigment Cell Conference“ (IPCC) berichtet, dass im Melanozyten-Monolayer  $\text{PGE}_2$  die Melanogenese stimuliert,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aber keinen Effekt hat. Im Tiermodell sieht dies allerdings genau anders aus. Hier hat  $\text{PGE}_2$  keinen Effekt, dagegen stimuliert  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die Melanogenese (ANBAR ET. AL., 2011). Der Grund hierfür ist unbekannt. Dies legt jedoch die Vermutung nahe, dass der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Effekt nur im Tiermodell zu beobachten ist, weil hierfür Fibroblasten notwendig sind.

Auf Grund dessen wurden Untersuchungen durchgeführt, wie sich Biopsien und Kokulturen (Melanozyten/Fibroblasten) unter Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  verhalten und die Melanogenese bzw. Tyrosinase-Aktivität gemessen.

Ein positiver Einfluss auf Biopsien im Sinne der Melaninsynthese konnte mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nicht festgestellt werden. Die schon zuvor beobachtete Melaninsteigerung durch alleinige Kultivierung wurde zwar nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen bestätigt (Melaninsteigerung um 138 %), jedoch konnte eine weitere Steigerung durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nicht erreicht werden. Es ist sogar ein leichter Rückgang des Melaningehalts zu beobachten (Abbildung 10). Durch den LDH-Assay wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  keinen negativen Effekt auf die Vitalität hat (Abbildung 9). Obwohl dadurch keine weitere Melaninsteigerung erreicht werden konnten, erwies sich unter Berücksichtigung der Vitalität, eine Kultivierung mit  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  als am besten.

Da die Hautbeschaffenheiten (v.a. die unterschiedlichen Schichtdicken) der einzelnen Spender sehr unterschiedlich sind, kann keine Standardmethode entwickelt werden bei der man das Fettgewebe so optimal entfernt, dass tatsächlich nur noch der Dermisanteil übrig bleibt. So kann es vorkommen, dass bei

einigen Spendern zu viel oder zu wenig subkutanes Gewebe entfernt wurde, was sich sehr stark auf die Stoffwechselwege und Interaktionen in der Haut auswirken kann.

Dass eine Stimulation der Melanogenese durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in Biopsien nicht mehr möglich ist, könnte ebenso daran liegen, dass die intrinsische Melanogenese hier nach 10 Tagen Kultivierung bereits zu hoch ist. Daher wurde der Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auf die Melanogenese von Kokulturen untersucht.

Kokulturen wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelt ( $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M) und nach 4 bzw. 7 Tagen die Tyrosinase-Aktivität bestimmt, sowie das gebildete Melanin gemessen. Bei der Messung der Tyrosinase-Aktivität konnte keine Steigerung durch eine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  Behandlung erreicht werden, aber eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass die Tyrosinase-Aktivität nur eine Momentaufnahme darstellt und es kann sein, dass die Aktivität zu einem früheren Zeitpunkt höher war. Somit müsste die Kinetik näher untersucht werden.

Außerdem wurde bestätigt, dass die Interaktion der Melanozyten und Fibroblasten für die Tyrosinase-Aktivität wichtig ist (vgl. Abbildung 11). Hier ist zu sehen, dass unbehandelte Kokulturen (Mel+Fib -), im Gegensatz zu alleinig kultivierten unbehandelten Melanozyten (Mel -), höhere Aktivitäten zeigen.

Des Weiteren kann man feststellen, dass nach sowohl 4, als auch 7 Tagen und Behandlungen mit  $10^{-5}$  bzw.  $10^{-4}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  höhere Melaninmengen im Vergleich zur Kontrolle erreicht wurden (Abbildung 13). Geringere Konzentrationen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  bleiben nach sowohl 4 als auch 7 Tagen unter Kontrollniveau.

Eine Kultivierung ohne Inserts (Abbildung 14) wirkt sich ebenfalls positiv auf die Melaninsynthese nach 4 Tagen aus (8 % Steigerung für  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), jedoch ist der Einfluss hier, im Vergleich zur Kultivierung mit Inserts, deutlich geringer. Auf die Tyrosinaseaktivität lässt sich kaum Einfluss feststellen (vgl. Abbildung 12). Es lässt sich also festhalten, dass bei 7 Tagen Kultivierung mit Inserts die besten Ergebnisse für  $10^{-4}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Melaninsteigerung um 54 %) und  $10^{-5}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Melaninsteigerung um 33 %) erreicht wurden. Bei 4 Tagen Kultivierung wurden die besten Ergebnisse mit einer Behandlung von  $10^{-4}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erreicht.

Außerdem konnte, entgegen den Publikationen von Smith-Thomas *et. al.* und Anbar *et. al.* gezeigt werden, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auch die Melanogenese von Melanozyten in alleiniger Kultur stimuliert und Fibroblasten somit nicht notwendig sind (Abbildung 13). Smith-Thomas *et. al.* verwendeten Melanozyten aus der Iris und haben beschrieben, dass hier sehr große Unterschiede in der Melaninsynthese auftreten, je nachdem welche Augenfarbe die Spender hatten. Außerdem wird der Einfluss des Kultivierungsmediums beschrieben, wonach eine höhere Melaninsynthese von Melanozyten in Green's Medium (im Gegensatz zu MCDM 153) erreicht wurde. Hier ist mehr Calcium enthalten (physiologischer Level), höhere Mengen L-Tyrosin, L-Phenylalanin und Melaninvorstufen. Auch ist der Ursprung der Fibroblasten von Bedeutung, je nach dem ob sie dermalen oder okularen Ursprungs waren, ergaben sich große Unterschiede in der Melaninsynthese. Ebenso wurde gezeigt, dass Fibroblasten sich sogar negativ auf die Melaninsynthese in Kokulturen auswirken können.

Wie eingangs erwähnt, stimuliert  $\text{PGF}_{2\alpha}$  die Melanozyten Dendriten zu bilden. Dies bestätigen auch Anbar *et. al.* *in vitro*. Es stellt sich trotzdem die Frage, ob dies ausreichend für eine Melanogenese-Stimulierung in Melanozyten ohne Fibroblasten ist oder ob auch das verwendete Medium tatsächlich großen Einfluss hat. Denn die Ergebnisse von Smith-Thomas *et. al.*, hinsichtlich des Mediums, sind noch nicht statistisch signifikant. Außerdem konnte eine positive Interaktion zwischen Fibroblasten und Melanozyten nur für eine Konzentration von  $10^{-7}$  M gezeigt werden, was in dieser Masterarbeit ebenfalls widerlegt wurde.

Um die gezeigten Ergebnisse zu festigen wäre es von Bedeutung die Untersuchungen fortzuführen und weitere Konzentrationen zu testen. Mögliche Steigerungen könnten evtl. mit einer noch höheren Konzentration  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erreicht werden oder einer anderen Porengröße der Membran-Inserts bei Kokulturen. Letzteres könnte aber Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit von z.B. Substanzen/ Wirkstoffen haben.

### **5.3 Assay-System zur Untersuchung der Phagozytoseleistung primärer humaner Keratinozyten**

Phagozytose beschreibt im Allgemeinen die Aufnahme von zellulären Partikeln mit einer Größe zwischen 0,5 und 1 µm Durchmesser und ist rezeptorvermittelt (SEIBERG, 2001).

In dieser Arbeit sollte ein Assay-System zur Untersuchung der Phagozytoseleistung von primären, humanen Keratinozyten etabliert werden. Es sollte hierzu mit bekannten Phagozytose-stimulierenden Substanzen untersucht werden, ob die Phagozytoseleistung in diesem System noch zu steigern ist, um zukünftig Phagozytose-fördernde Substanzen identifizieren zu können (Positivkontrolle). Dazu wurden Keratinozyten mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt, anschließend mit fluoreszierenden Beads (0,5 µm) inkubiert und die Phagozytoserate mittels FACS bestimmt.

Der genaue Transfer von Melanosomen von Melanozyten zu Keratinozyten und die Melanozyten-Keratinozyten-Interaktion während des Transferprozesses sind noch nicht vollständig charakterisiert ist (MA ET. AL., 2010).

Bei der Phagozytose spielt der Proteinase-aktivierte-Rezeptor-2 (PAR-2) eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass PAR-2 in Keratinozyten, aber nicht in Melanozyten exprimiert wird und an der Regulierung der Pigmentierung beteiligt ist. Die einzig bekannten natürlichen Aktivatoren von PAR-2 sind Trypsin und Mastzelltryptase (PAINE ET. AL., 2001). Die Aktivierung von PAR-2 beeinflusst die Phagozytoseleistung von Keratinozyten positiv (SHARLOW ET. AL., 2000). Doch auch UV-Strahlung ist an der Regulation von PAR-2 beteiligt (SCOTT ET. AL., 2001) und ist bekannt dafür, die Phagozytoseleistung von Keratinozyten positiv zu beeinflussen (VIRADOR ET. AL., 2002; COSTIN & HEARING, 2007). Außerdem ist publiziert, dass UV-Strahlung (UV-B) eine Tyrosinphosphorylierung des KGF-Rezeptors (KGFR) auslöst und zu einer schnellen intrazellulären Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. ROS wiederum sind fähig die Aktivierung und Internalisierung des KGFR auszulösen. Dieser Vorgang ist ähnlich dem, der durch KGF induziert wird und die Aktivierung und Internalisierung des aktiven KGFR zur Folge hat (MARCHESE ET. AL., 2003). KGF ist ein potentes Mitogen und wird von dermalen Fibroblasten sekretiert,

bindet an den KGFR und unterdrückt die terminale Differenzierung sowie die Apoptose (CARDINALI ET. AL., 2005/ 2008; CAPONE ET. AL., 2000).

In der Literatur sind diverse Phagozytose-Assays beschrieben. Manche wurden mit Kokulturen aus Melanozyten und Keratinozyten durchgeführt (PAINE ET. AL., 2001), andere benutzten isolierte Melanosomen (VIRADOR ET. AL., 2002; SEIBERG ET. AL., 2000). In dieser Arbeit wurde ein Assay entwickelt, bei dem fluoreszierende Beads (0,5  $\mu\text{m}$ ) als Melanosomen-Imitate zum Einsatz kamen (CARDINALI ET. AL., 2005/ 2008).

Um erst einmal generell die Phagozytoseleistung zu untersuchen, wurden Keratinozyten mit fluoreszierenden Beads (0,5  $\mu\text{m}$ ) unterschiedlich lange inkubiert und die Phagozytoseleistung mittels FACS bestimmt. Hierbei zeigte sich eine mit steigender Bead-Inkubationsdauer steigende Phagozytoserate (Abbildung 15).

Um eine passive Adhärenz der Beads auszuschließen und um noch einmal deutlich zu zeigen, dass es sich bei den gemessenen Fluoreszenzintensitäten um ein Resultat des aktiven Prozesses der Phagozytose handelt, wurde diese mittels Cytochalasin-D inhibiert. Cytochalasin-D wirkt auf die Aktinpolymerisation und die inhibierende Wirkung auf die Phagozytose wurde bereits von Cardinali *et. al.* 2008 publiziert. Als Vergleich kam Cytochalasin-B zum Einsatz. Die Ergebnisse zeigten eine mit steigender Bead-Inkubationsdauer stärkere Inhibierung. Hierbei stellte sich heraus, dass Cytochalasin-D, im Vergleich zu Cytochalasin-B, der potentere Inhibitor ist und eine 4-fach höhere Konzentration Cytochalasin-D (10  $\mu\text{M}$ ) zu keiner stärkeren Inhibierung führt (vgl. Abbildung 16). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich hier um einen aktiven Phagozytoseprozess durch die Keratinozyten handelt. Als Gegenbeweis wurden die Überstände der einzelnen Ansätze vermessen (Daten nicht gezeigt). Die Überstände stellen hierbei die „Waschfraktion“ nach Ernte und Zentrifugation der Keratinozyten dar, bevor diese wieder für die Vermessung am FACS in PBS resuspendiert wurden. Die Überstände lieferten Fluoreszenzintensitäten, die auch die reinen Beads zeigten.

Da nun die Frage der passiven Adhärenz geklärt war, wurde versucht die Phagozytoseleistung in diesem Assay-System zu steigern, um eine Positivkontrolle für zukünftige Phagozytoseuntersuchungen zu identifizieren. In dieser Arbeit kamen

als potentielle Phagozytose-Stimulatoren KGF und ein PAR-2-Aktivator (LIGRLO) zum Einsatz. Hierzu wurden Keratinozyten 1 h mit den Phagozytose-Stimulatoren vorbehandelt, anschließend mit Beads inkubiert und die Phagozytoseleistung per FACS vermessen. Außerdem wurde als potentieller Stimulator UV-Licht eingesetzt. Die Inkubation mit Beads erfolgte nach UV-Bestrahlung 1 h später. Weil Bead-Inkubationszeiten < 1 h zu geringe Signale lieferten, wurde sich auf 1 h, 4 h und 6 h fokussiert.

Es hat sich gezeigt, dass weder eine Bestrahlung mit UV-Licht (30, 40 und 50 mJ/cm<sup>2</sup>) noch der PAR-2-Aktivator (0,5, 1 und 2 µM) die Phagozytose stimulieren können. Vorbehandlungen mit KGF brachten Fluoreszenzsignale auf Kontrollniveau (vgl. Abbildung 17).

Da in der Literatur (CARDINALI ET. AL., 2008) von einer Kultivierung in Magermedium (serumfrei) die Rede ist und die bisherigen Versuche ausschließlich in Vollmedium durchgeführt wurden, wurde im nächsten Schritt der Einfluss des Kultivierungsmediums getestet. Hierzu erfolgte ein Tag nach Zellaussaat der Wechsel von Voll- auf Magermedium. Weil Bead-Inkubationszeiten von 4 und 6 h kaum Unterschiede aufzeigten, die Phagozytose bei 1 h nachweislich immer noch sehr gut ist und die Möglichkeit gegeben ist, weiter zu stimulieren, wurde sich ausschließlich auf Bead-Inkubationen von 1 h beschränkt.

Es konnte gezeigt werden, dass Kultivierungen in Magermedium eine verbesserte Phagozytoseleistung brachten als eine Kultivierung in Vollmedium. Die Phagozytoseleistung war in Magermedium um 38 % höher (Abbildung 18).

Diese Ergebnisse führten dazu, dass die Folgeversuche ausschließlich in Magermedium durchgeführt wurden. Bei einer Bead-Inkubationsdauer von 1 h in Magermedium konnte die positive Wirkung von KGF gezeigt werden. Es war eine um 20 % verbesserte Phagozytoseleistung im Vergleich zur Kontrolle zu messen. Auch die Wirkung von Cytochalasin-D konnte in Magermedium nachgewiesen werden. Es wurde eine Inhibierung von 73 % erreicht. Der PAR-2-Aktivator und eine UV-Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> zeigten jedoch keinen positiven Effekt auf die Phagozytose und konnte somit nicht bestätigt werden (Abbildung 19).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich eine Kultivierung in Magermedium positiv auf die Phagozytoseleistung von Keratinozyten auswirkt und mit KGF, wie in der Literatur oft beschrieben, noch gesteigert werden kann. Es konnte somit eine Positivkontrolle für zukünftige Phagozytoseuntersuchungen für dieses Assay-System gefunden werden.

Ebenso könnte eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium die Phagozytoseleistung noch weiter verbessern, weil dadurch die Expression von KGFR noch oben reguliert wird (CAPONE ET. AL., 2000). Dass eine Kultivierung in Magermedium oft besser funktioniert, lässt sich damit erklären, dass die Zellen durch das „Hungern“ eher gewillt sind externe Stoffe aufzunehmen. Dass eine positive Wirkung durch den PAR-2-Aktivator nicht gezeigt werden konnte, liegt möglicherweise daran, dass ein Melanozyten-Keratinozyten-Kontakt sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* für eine Aktivierung des Rezeptors unabdingbar ist (VAN DEN BOSSCHE ET. AL., 2006). Außerdem wurde gezeigt dass PAR-2 in verschieden farbigen Häuten unterschiedlich stark exprimiert wird. Je dunkler desto höher die Expression. Zudem wird vermutet, dass bei hellhäutigeren Menschen möglicherweise noch zusätzlich andere alternative Stoffwechselwege aktiviert werden müssen (CARDINALI ET. AL., 2008). Die UV-Strahlungen wurden in Medium anstatt in PBS durchgeführt, was möglicherweise einen Einfluss haben könnte. Außerdem wurden die Beads erst 1 h nach Bestrahlung hinzugegeben. In der Literatur ist hingegen zu lesen, dass die Beads direkt nach Bestrahlung auf die Keratinozyten gegeben wurden (VIRADOR ET. AL., 2002). Warum jedoch eine inhibierende Wirkung zu beobachten ist, ist nicht vollständig aufzuklären.

## 5.4 Ausblick

Da es ist nicht eindeutig zu klären war ob es sich, wie vermutet, um eine vorwiegend im Randbereich ablaufende PIH handelt und die Melaninauswertung große Schwankungen ergaben, sollten noch weitere Untersuchungen folgen, um eine klare Aussage treffen zu können. Um nicht zu viel Druck auf die Hautbiopsien auszuüben, sollte evtl. für jede Biopsie eine neue Stanze verwendet werden, da diese sehr schnell stumpf werden. Ein histologischer Abgleich auf Proteinebene mit ausgewählten Kandidaten aus den Expressionsanalysen aus PIH-Arealen (Saugblasen-induzierte Hyperpigmentierung) wäre sinnvoll, wenn die Frage der PIH eindeutig geklärt ist. Außerdem sollte der Zusammenhang von Prostaglandinen näher untersucht werden. So könnte z.B. eine Untersuchung auf diese beteiligten Prostaglandine ( $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) folgen. Da PIH häufiger bei dunkleren Hauttypen (Fitzpatrick Hauttypen IV bis VI) auftritt könnten nachfolgende Untersuchungen auf diese Hauttypen fokussiert werden.

Um den Einfluss von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auf Kokulturen näher zu untersuchen könnte man in weiteren Schritten Saugblasenflüssigkeiten auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  untersuchen. Falls sich dieser Zusammenhang dann auch in humaner Haut bestätigt, könnte man gegebenenfalls über die Stanzen aus Saugblasen-induzierten PIH-Studien, „downstream“ des FP-Rezeptors, in den Fibroblasten schauen (z.B. FGF-2-Expression). Dies würde sich auf die Epidermis bzw. die Melanozyten auswirken und die Melanogenese in Gang setzen. Guo *et. al.* zeigten dass humane Fibroblasten aus Fruchtblasen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produzieren und FP-Rezeptoren exprimieren. Dies wurde ebenso in okularen Fibroblasten beobachtet (SMITH-THOMAS ET. AL., 2004).

Ein Assay-System zur Untersuchung der Phagozytoseleistung von Keratinozyten konnte entwickelt werden und eine Positivkontrolle identifiziert werden (KGF). In weiteren Versuchen könnten nun die Frage beantwortet werden, inwieweit die PIH durch proinflammatorische Mediatoren gesteuert werden kann. Hierzu würde man beispielsweise IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , LPS, Trypsin oder Mastzellüberstände auf die Keratinozyten geben und die Phagozytose messen.

## 6 Zusammenfassung

In dieser vorliegenden Masterarbeit wurde ein Biopsie-Hautmodell zur Untersuchung der humanen Pigmentierung eingesetzt. Es sollte geprüft werden, ob sich dieses Hautmodell auch als ein PIH (postinflammatorische Hyperpigmentierung)-Modell ansehen lässt, da durch alleinige Inkulturnahme eine erhöhte Melanogenese über die Zeit zu beobachten war. Hierzu standen Analysen der Biopsie-Randbereiche (Exzisionstelle/ Wundheilung) versus den Mittelebereichen im Fokus. Als Kontrolle der Melanogenese, wurde ein Tyrosinase (Schlüsselenzym der Melanogenese)-Inhibitor eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Randbereiche nicht stärker pigmentieren als die Mittelebereiche. Zwar konnte durch den Tyrosinase-Inhibitor bewiesen werden, dass es sich um Melanogenese handelt, doch ob das Hautmodell auch als PIH-Modell angesehen werden kann, konnte nicht eindeutig beantwortet werden. Hier könnten Untersuchungen, auf beispielsweise die beteiligten Prostaglandine (z.B. PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub>) folgen, um diese Frage eindeutig beantworten zu können.

Außerdem wurde das Biopsie-Modell genutzt, um den Einfluss von PGF<sub>2α</sub>, einem Prostaglandin, das die Melanogenese stimulieren soll, zu untersuchen. Dieser Einfluss wurde nicht nur an Hautmodellen untersucht sondern auch an Melanozyten-Fibroblasten-Kokulturen und Melanozyten Monolayern. Der positive Einfluss von PGF<sub>2α</sub>, auf die Melanogenese in Biopsie-Hautmodellen, konnte nach 10 Tagen Kultivierung nicht gezeigt werden. Es wird vermutet, dass die intrinsische Melanogenese der unbehandelten Biopsien nach 10 Tagen bereits so hoch ist, dass eine Stimulation durch PGF<sub>2α</sub> nicht mehr möglich ist. Bei Kokulturen wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit 10<sup>-5</sup> und 10<sup>-4</sup> M PGF<sub>2α</sub> möglich ist. Auch konnte gezeigt werden, dass für diesen Effekt keine Fibroblasten notwendig sind. Es wurde auch bei Melanozyten Monolayern für 10<sup>-5</sup> M PGF<sub>2α</sub> eine Steigerung der Melanogenese erreicht.

Des Weiteren wurde die Phagozytoseleistung von Keratinozyten untersucht um mit Stimulatoren eine Positivkontrolle der Phagozytose in diesem Assay-System, für

zukünftige Phagozytose-fördernde Substanzen, zu identifizieren. Hierzu wurden fluoreszierende Beads (Melanosomen-Imitate) auf vorbehandelte Keratinozyten gegeben und per FACS vermessen.

Das Assay-System zur Untersuchung der Phagozytoseleistung von Keratinozyten wurde erfolgreich etabliert und steht für nachfolgende Untersuchungen mit proinflammatorischen Mediatoren zur Verfügung.

## 7 Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, *et al.* (2005) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 3. Auflage WILEY-VCH: Weinheim. p. 345-346. ISBN 3-527-31160-2.

Anbar TS, Rendall D, Abdel-Raouf H, El-Ammawi TS, Barakat M, Abdel-Rahman AT, *et al.* (2011) The paradox of the effects of PGF<sub>2</sub>alpha on pigmentation in vivo and in vitro. In: Research PCM, editor. XXIst International Pigment Cell Conference (IPCC); 20-24 September 2011; Bordeaux - France: Blackwell Publishing Ltd; p. 811.

<http://www.ifpcs.org/ipcc2011/programme/abstract/364/The%20paradox%20of%20the%20effects%20of%20PGF2alpha%20on%20pigmentation%20in%20vivo%20and%20in%20vitro.html>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-148X.2011.00885.x/abstract>

Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, *et al.* (2009) Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *European journal of dermatology : EJD*, 19(2): 107-113.

Bennett DC, Lamoreux ML. (2003) The color loci of mice--a genetic century. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 16(4): 333-344.

Brenner M, Coelho SG, Beer JZ, Miller SA, Wolber R, Smuda C, *et al.* (2009) Long-lasting molecular changes in human skin after repetitive in situ UV irradiation. *The Journal of investigative dermatology*, 129(4): 1002-1011.

Calladine D, Harrison RJ. (2007) Severe darkening of a facial skin graft from latanoprost. *Archives of ophthalmology*, 125(10): 1427-1428.

- Callender VD, St Surin-Lord S, Davis EC, Maclin M. (2011)** Postinflammatory hyperpigmentation: etiologic and therapeutic considerations. *American journal of clinical dermatology*, **12**(2): 87-99.
- Capone A, Visco V, Belleudi F, Marchese C, Cardinali G, Bellocci M, et al. (2000)** Up-modulation of the expression of functional keratinocyte growth factor receptors induced by high cell density in the human keratinocyte HaCaT cell line. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, **11**(11): 607-614.
- Cardinali G, Bolasco G, Aspite N, Lucania G, Lotti LV, Torrissi MR, et al. (2008)** Melanosome transfer promoted by keratinocyte growth factor in light and dark skin-derived keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, **128**(3): 558-567.
- Cardinali G, Ceccarelli S, Kovacs D, Aspite N, Lotti LV, Torrissi MR, et al. (2005)** Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, **125**(6): 1190-1199.
- Chen N, Hu Y, Li WH, Eisinger M, Seiberg M, Lin CB. (2010)** The role of keratinocyte growth factor in melanogenesis: a possible mechanism for the initiation of solar lentigines. *Experimental dermatology*, **19**(10): 865-872.
- Chopra N. (2011)** 3D Hautmodelle für die Testung von Melanogenese-stimulierenden Substanzen. Bachelorarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.
- Costin GE, Hearing VJ. (2007)** Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**(4): 976-994.

- Davis EC, Callender VD. (2010)** Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, **3(7)**: 20-31.
- Denzel M. (2005)** Modellsysteme der menschlichen Haut: Etablierung eines pigmentierten Vollhautmodells und vergleichbare Charakterisierung pigmentierter Epidermismodelle. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Eimpunth S, Wanitphadeedecha R, Manuskiatti W. (2013)** A focused review on acne-induced and aesthetic procedure-related postinflammatory hyperpigmentation in Asians. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, **27 Suppl 1**: 7-18.
- Epstein JH. (1989)** Postinflammatory hyperpigmentation. *Clinics in dermatology*, **7(2)**: 55-65.
- Gillbro JM, Olsson MJ. (2011)** The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. *International journal of cosmetic science*, **33(3)**: 210-221.
- Guo CM, Kasaraneni N, Sun K, Myatt L. (2012)** Cross talk between PKC and CREB in the induction of COX-2 by PGF<sub>2</sub>alpha in human amnion fibroblasts. *Endocrinology*, **153(10)**: 4938-4945.
- Ho SG, Yeung CK, Chan NP, Shek SY, Kono T, Chan HH. (2011)** A retrospective analysis of the management of acne post-inflammatory hyperpigmentation using topical treatment, laser treatment, or combination topical and laser treatments in oriental patients. *Lasers in surgery and medicine*, **43(1)**: 1-7.
- Kanitakis J. (2002)** Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD*, **12(4)**: 390-399; quiz 400-391.

- Lacz NL, Vafaie J, Kihiczak NI, Schwartz RA. (2004) Postinflammatory hyperpigmentation: a common but troubling condition. *International journal of dermatology*, 43(5): 362-365.
- Lin VC, Ding HY, Tsai PC, Wu JY, Lu YH, Chang TS. (2011) In vitro and in vivo melanogenesis inhibition by biochanin A from *Trifolium pratense*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(5): 914-918.
- Ludman S, Penagos M, Brough HA, Flohr C, Fox AT. (2012) Postinflammatory hyperpigmentation after skin prick testing. *The World Allergy Organization journal*, 5(5): 57-58.
- Ma HJ, Zhao G, Zi SX, Li DG, Liu W, Yang QQ. (2010) Efficacy of quantifying melanosome transfer with flow cytometry in a human melanocyte-HaCaT keratinocyte co-culture system in vitro. *Experimental dermatology*, 19(8): e282-285.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. (2001) *Brock Mikrobiologie*, 2. Auflage Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg/ Berlin: Berlin. p. 866-867. ISBN 3-8274-0566-1.
- Makpol S, Nadia Mohd Arifin N, Ismail z, Hui CK, Anum Mohd Yusof Y, Zurinah Wan Ngah W. (2009) Modulation of melanin synthesis and its gene expression in skin melanocytes by palm tocotrienol rich fraction. *Academic Journals*, 3(12): 385-392.  
[www.academicjournals.org/ajbr/pdf/Pdf2009/Dec/Makpol%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/ajbr/pdf/Pdf2009/Dec/Makpol%20et%20al.pdf)
- Male D. (2005) *Immunologie auf einen Blick*, 1. Auflage Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag: München. p. 90-91. ISBN 3-437-41312-0
- Marchese C, Maresca V, Cardinali G, Belleudi F, Ceccarelli S, Bellocchi M, *et al.* (2003) UVB-induced activation and internalization of keratinocyte growth factor receptor. *Oncogene*, 22(16): 2422-2431.

- Masu S, Seiji M. (1983) Pigmentary incontinence in fixed drug eruptions. Histologic and electron microscopic findings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 8(4): 525-532.
- Mertsching H, Weimer M, Kersen S, Brunner H. (2008) Human skin equivalent as an alternative to animal testing. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, 3(1): Doc11.
- Mertsching HK, M.; Saxler, J.; Gehrman, A. L. (2009) Haut aus der Maschine. *labor&more*: 7-8.
- Nath RK, Xiong W, Humphries AD, Beri R. (2007) Treatment with antisense oligonucleotide reduces the expression of type I collagen in a human-skin organ-wound model: implications for antifibrotic gene therapy. *Annals of plastic surgery*, 59(6): 699-706.
- Noto G, Pravata G, Arico M. (1998) Reticulate postinflammatory hyperpigmentation with band-like mucin deposition. *International journal of dermatology*, 37(11): 829-832.
- Ortonne JP. (2002) Photoprotective properties of skin melanin. *The British journal of dermatology*, 146 Suppl 61: 7-10.
- Paine C, Sharlow E, Liebel F, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M. (2001) An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway. *The Journal of investigative dermatology*, 116(4): 587-595.
- Parhamifar L, Andersen H, Moghimi SM. (2013) Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. *Methods in molecular biology*, 948: 13-22.

- Prota G, Vincensi MR, Napolitano A, Selen G, Stjernerchantz J. (2000)** Latanoprost stimulates eumelanogenesis in iridial melanocytes of cynomolgus monkeys. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, **13(3)**: 147-150.
- Rothe G, Sack U, Tárnok A. (2007)** Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik*. Basel: Karger. pp. 27-70.  
[http://content.karger.com/ProdukteDB/Katalogteile/isbn3\\_8055/\\_79/\\_28/Zell\\_02.pdf](http://content.karger.com/ProdukteDB/Katalogteile/isbn3_8055/_79/_28/Zell_02.pdf)
- Ruiz-Maldonado R, Orozco-Covarrubias ML. (1997)** Postinflammatory hypopigmentation and hyperpigmentation. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, **16(1)**: 36-43.
- Schoppmeyer MA. (2007)** *Anatomie und Physiologie: Kurzlehrbuch für Pflegeberufe*, 3. Auflage Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag. ISBN 3437265318, 9783437265310.
- Scott G, Deng A, Rodriguez-Burford C, Seiberg M, Han R, Babiarz L, et al. (2001)** Protease-activated receptor 2, a receptor involved in melanosome transfer, is upregulated in human skin by ultraviolet irradiation. *The Journal of investigative dermatology*, **117(6)**: 1412-1420.
- Seiberg M. (2001)** Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, **14(4)**: 236-242.

- Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, *et al.* (2000) Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *The Journal of investigative dermatology*, 115(2): 162-167.
- Sen CK. (2009) Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(1): 1-18.
- Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M. (2000) The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *Journal of cell science*, 113 ( Pt 17): 3093-3101.
- Smith-Thomas L, Moustafa M, Spada CS, Shi L, Dawson RA, Wagner M, *et al.* (2004) Latanoprost-induced pigmentation in human iridial melanocytes is fibroblast dependent. *Experimental eye research*, 78(5): 973-985.
- Stümer N. (2011) Humane Hautexplantate als Pigmentierungsmodell: Untersuchungen zur Melaninbildung und Charakterisierung. Bachelorarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.
- Takiwaki H, Shirai S, Kohno H, Soh H, Arase S. (1994) The degrees of UVB-induced erythema and pigmentation correlate linearly and are reduced in a parallel manner by topical anti-inflammatory agents. *The Journal of investigative dermatology*, 103(5): 642-646.
- Taylor S, Grimes P, Lim J, Im S, Lui H. (2009) Postinflammatory hyperpigmentation. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 13(4): 183-191.
- Tobin DJ. (2006) Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chemical Society reviews*, 35(1): 52-67.

- Tomita Y, Iwamoto M, Masuda T, Tagami H. (1987) Stimulatory effect of prostaglandin E2 on the configuration of normal human melanocytes in vitro. *The Journal of investigative dermatology*, **89**(3): 299-301.
- Tomita Y, Maeda K, Tagami H. (1992) Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, **5**(5 Pt 2): 357-361.
- Uchino T, Takezawa T, Ikarashi Y. (2009) Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **23**(2): 333-337.
- Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. (2006) The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic*, **7**(7): 769-778.
- Virador VM, Muller J, Wu X, Abdel-Malek ZA, Yu ZX, Ferrans VJ, *et al.* (2002) Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **16**(1): 105-107.
- von Mach TM. (2009) Studien zur humanen Hautpigmentierung: Langzeituntersuchungen zur Vitalität und Melaninbildung von Hautexplantaten in Kultur. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Wendt H, Hillmer A, Reimers K, Kuhbier JW, Schafer-Nolte F, Allmeling C, *et al.* (2011) Artificial skin--culturing of different skin cell lines for generating an artificial skin substitute on cross-weaved spider silk fibres. *PloS one*, **6**(7): e21833.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herr Prof. Dr. K.-P. Wittern, Herr Dr. H. Wenck und Herr Dr. F. Stüb möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Masterarbeit in der Abteilung Hautforschung der Beiersdorf AG anfertigen zu dürfen.

Ich danke Herrn Dr. Ludger Kolbe und Herrn Dr. André Mahns für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Ohne Ihre Förderung, Engagement und stetige Diskussionsbereitschaft sowie fachlich kompetente Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Betreuung dieser Arbeit seitens der HAW Hamburg und seine unkomplizierte Unterstützung

Frau Dipl.-Ing. Karen tom Dieck möchte ich besonders danken. Sie stand mir stets geduldig und mit großem Engagement zur Seite. Ihr Interesse am Fortgang der Arbeit hat zum Gelingen wesentlich beigetragen.

Allen Angehörigen der Abteilung Hautforschung der Beiersdorf AG möchte ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung „Sensitive and Ethnic Skin“ Aljona, Anja, Kerstin, Tobias, Wolfram, Jan, Christoph und Eckhard, die mir stets mit Rat und Tat stets zur Seite standen.

Außerdem danke Andreas für seine guten Ratschläge und Tipps während meiner Arbeiten im Labor. Ein besonderer Dank gilt Inga und Ulla für die kompetente und freundliche Unterstützung während meiner Arbeiten am FACS.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, ohne die das Studium nicht möglich gewesen wäre und die immer an mich geglaubt haben und mich auch in schwierigen Zeiten stets aufgemuntert und unterstützt haben. Auch meinem Bruder Fabian möchte ich für seine konstruktiven Rückmeldungen und seine mich immer wieder anspornenden Worte bedanken.

Bei meiner Freundin Stephi möchte ich mich für Ihre Geduld, die sie mir in den letzten Wochen und Monaten entgegen gebracht hat, sowie für ihre emotionale Unterstützung bedanken.