



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Ansatzpunkte für die Modulation der postinflammatorischen
Hyperpigmentierung – Rolle des dermalen entzündlichen
Infiltrats im Vergleich zur UV-induzierten Pigmentierung**

Masterarbeit

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science

vorgelegt von

Kristin Knüppel

Hamburg, 15. April 2013

Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)

Dr. Christoph Smuda (Beiersdorf AG)

Die Masterarbeit wurde betreut und erstellt im Labor Ethnic Skin /Suncare im
Arbeitsbereich Research Skin Care der Beiersdorf AG in Hamburg.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Kristin Knüppel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken die zum Gelingen dieser Masterarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ludger Kolbe und Dr. Christoph Smuda, die mir die Bearbeitung des interessanten Themas bei der Beiersdorf AG ermöglichten und mich mit umfassender wissenschaftlicher Betreuung unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich danke ich für die wissenschaftliche Begleitung seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, sowie für die Übernahme der ersten Korrektur dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Sonja Wessel, für die Beantwortung zahlreicher Fragen, neue Anregungen und die Einführung in die Bildauswertung. Vielen Dank für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Beseitigung von aufgetretenen Fragen oder Problemen jeglicher Art.

Ich möchte mich bei den Kollegen und Kolleginnen des Labors Ethnic Skin/ Suncare für die Diskussionen, die stetige Hilfsbereitschaft und die sehr schöne Zeit bei Beiersdorf bedanken.

Für das Korrektur-Lesen dieser Arbeit von wissenschaftlicher Seite aus möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Christoph Smuda herzlich bedanken. Meiner Schwester Kathleen danke ich besonders für die hilfreiche wissenschaftliche und allgemeine Korrektur. Meinem Papa ein liebes Dankeschön für die allgemeine Durchsicht.

Von Herzen danke ich meiner Familie für den Rückhalt und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Dabei möchte ich meinen Eltern ganz besonders für ihr Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten, das nötige Verständnis für meine Person und meine Überzeugungen und ihre vorbildhafte Aufrichtigkeit bedanken. Meinen Geschwistern Ronald und Kathleen danke ich für ein ständig offenes Ohr und den bedingungslosen Zusammenhalt untereinander.

Mein tiefster Dank gilt meinem Freund Maik, der zu jeder Zeit vorbehaltlos an meiner Seite steht.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	1
1.2 Grundlagen der Pigmentierung	4
1.2.1 Epidermale Melanozyten und Melanin	4
1.2.2 Biosynthese von Melanin	5
1.2.3 UV-induzierte Pigmentierung.....	6
1.3 Postinflammatorische Hyperpigmentierung.....	8
1.4 Immunologie der Haut	9
2 Fragestellung der Arbeit	14
3 Material	15
3.1 Laborgeräte.....	15
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	16
3.3 Chemikalien und Reagenzien	17
3.4 Medien und Lösungen	18
3.5 Kits	20
3.6 Antikörper	20
3.7 Software	21
4 Methoden	23
4.1 Studiendesign des Probenmaterials.....	23
4.1.1 PIH-Studie: Untersuchung der Saugblasen-induzierten postinflammatorischen Hyperpigmentierung (PIH)	23
4.1.2 UV-Studie: Untersuchung der UV-induzierten Pigmentierung	24
4.2 Histologie und Immunhistochemie	26
4.2.1 Fixierung von histologischen Gefrierschnitten.....	26
4.2.2 Automatisierte immunhistochemische Färbung.....	26
4.2.3 Quantifizierung immunhistochemischer Hautdünnschnitte	28

4.2.4	Fontana Masson Färbung.....	29
4.2.5	Automatisierte Immunfluoreszenz	30
4.3	Zellbiologische Methoden	31
4.3.1	Kultivierung der Zellen.....	31
4.3.2	Passagieren der Melanozyten.....	32
4.3.3	Zellzahlbestimmung.....	33
4.3.4	Vitalitätsbestimmung	33
4.4	Inkubation mit konditionierten HMC1-Medium und Substanzen	34
4.4.1	Mastzellstimulierung und Ernte des konditionierten Mediums	34
4.4.2	Melanozytenbehandlung mit konditionierten Medium und synthetischen Substanzen	34
4.5	Bestimmung von Histamin in Zellkulturüberständen.....	35
4.6	Ermittlung des Melaningehalts	35
4.6.1	Bestimmung des Melaningehalts in histologischen Schnitten	35
4.6.2	Ermittlung des Melaningehalts in kultivierten Melanozyten und Kulturüberständen.....	37
4.7	Statistische Auswertung	38
5	Ergebnisse.....	40
5.1	Melaninbildung bei UV-induzierter Pigmentierung.....	40
5.1.1	Melaninneubildung nach repetitiver und folgender 1,5-facher erythemalen Bestrahlung	40
5.1.2	Vergleich der Melaninneusynthese mit <i>in vivo</i> Farbwerten	42
5.1.3	Erfassung der Melanogeneseaktivität durch TRP1.....	43
5.2	Morphologische Untersuchung UV-induzierter Pigmentierung	47
5.2.1	Charakterisierung der Hyperplasie und Verzapfungsgrad	47
5.3	Immunzellstatus in UV-induzierten hyperpigmentierten Hautarealen.....	48
5.3.1	CD45 positive Zellen (CD45+).....	49
5.3.2	CD14 positive Zellen (CD14+).....	53
5.4	Immunzellstatus in Saugblasen-induzierter PIH.....	56
5.4.1	Mastzelltryptase positive Zellen.....	57
5.4.2	CD66b positive Zellen (CD66b+)	60

5.5	Lokalisation von Immunzellen in hyperpigmentierter Haut.....	61
5.6	Induzierbarkeit der Pigmentierung durch HMC1-konditioniertes Medium	64
5.7	Einfluss von Substanzen auf die Melanogenese	67
6	Diskussion	70
6.1	Mechanismen der UV-induzierten Pigmentierung	70
6.1.1	Melanogeneseaktivität und Melaninneubildung nach repetitiver Bestrahlung mit UVA und/oder UVB	70
6.1.2	Induzierter Photoschutz der Haut durch repetitive UVA- und/oder UVB- Strahlung	73
6.1.3	Immun- und Zellstatus nach repetitiver Bestrahlung mit UVA und/oder UVB	74
6.2	Charakterisierung des dermalen entzündlichen Infiltrats in der PIH.....	75
6.3	Dermales Infiltrat in PIH und UV-induzierter Pigmentierung im Vergleich	77
6.4	Untersuchungen zur Modulation der Pigmentierung <i>in vitro</i>	78
7	Zusammenfassung	81
8	Literaturverzeichnis	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Laborgeräteliste	15
Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterial	16
Tabelle 3.3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 3.4: IHC Waschpuffer Ansatz für 1 Liter.....	18
Tabelle 3.5: Silbernitratlösung 10%.....	18
Tabelle 3.6: Fontana Silbernitrat-Stocklösung.....	19
Tabelle 3.7: Fontana Silbernitratlösung.....	19
Tabelle 3.8: Eosinlösung 1%.....	19
Tabelle 3.9: Stopp-Lösung	19
Tabelle 3.10: Melanozyten Kulturmedium	19
Tabelle 3.11: Mastzellmedium (IMDM+)	20
Tabelle 3.12: Verwendete Kits	20
Tabelle 3.13: Primärantikörper	20
Tabelle 3.14: Sekundärantikörper	21
Tabelle 3.15: Verwendete Software.....	21
Tabelle 4.1: Immunhistochemisches Färbeprotokoll am Dako Autostainer Plus	27
Tabelle 4.2: Färbeprotokoll Fontana Masson Färbung.....	30
Tabelle 4.3: Immunfluoreszenz-Färbeprotokoll am Dako Autostainer Plus	31
Tabelle 4.4: Verwendete Volumina für das Passagieren von Melanozyten aus einem 175 cm ² Kulturgefäß.....	32
Tabelle 4.5: Verwendete Volumina für das Trypsinieren von Melanozyten aus 6- Loch-Platten	32
Tabelle 5.1: Verwendete Antikörperkombinationen, Filter und Pseudofarben für IF- Übersichtsfärbung.....	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau der menschlichen Haut.....	2
Abbildung 1.2: Synthesewege der Melanogenese in Melanosomen.....	6
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Arealanordnung in der PIH Studie....	24
Abbildung 4.2: Studiendesign der Saugblasen-induzierten PIH	24
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Arealanordnung in der UV-Studie	25
Abbildung 4.4: Studiendesign der UV-induzierten Pigmentierung.....	25
Abbildung 4.5: Ausschnitt eines mit NuclearQuant quantifizierten Hautdünnschnittes	29
Abbildung 4.6: Versuchsaufbau zur Stimulierung von HMC1-Zellen	34
Abbildung 4.7: Versuchsaufbau für die Behandlung von Melanozyten mit konditioniertem HMC1-Medium und Substanzen.....	35
Abbildung 4.8: Melaninquantifizierung mit ImageJ an Fontana Masson gefärbten Hautschnitten	37
Abbildung 5.1: Neusynthese von Melanin nach repetitiver Bestrahlung und 1,5 MED SSR.....	41
Abbildung 5.2: Unterschiedliche Melaninverteilung in der Epidermis als Ursache für starke Streuung der Ergebnisse	42
Abbildung 5.3: Gegenüberstellung von MelInd und histologisch quantifiziertem Melanin.....	43
Abbildung 5.4: Gegenüberstellung von Melaninneusynthese und Melanogeneseaktivität 7 Tage nach repetitiver Bestrahlung	45
Abbildung 5.5: Gegenüberstellung von Melaninneusynthese und Melanogeneseaktivität nach 1,5 MED SSR.....	46
Abbildung 5.6: Entwicklung der mittleren Epidermisdicke bei UV-induzierter Pigmentierung	48
Abbildung 5.7: Gesamtzellzahl nach repetitiver Bestrahlung	50
Abbildung 5.8: CD45 positive Zellen nach repetitiver Bestrahlung	51
Abbildung 5.9: Vergleich CD45 ⁺ Zellen mit der Melaninneubildung nach repetitiver Bestrahlung	52
Abbildung 5.10: Exemplarische Färbung CD45 ⁺ Zellen	53
Abbildung 5.11: Gesamtzellzahl nach repetitiver Bestrahlung	54
Abbildung 5.12: CD14 positive Zellen nach repetitiver Bestrahlung	55
Abbildung 5.13: Exemplarische Färbung CD14 ⁺ Zellen	56
Abbildung 5.14: Entwicklung der Gesamtzellzahl bei Saugblasen-induzierter Pigmentierung.....	58

Abbildung 5.15: Mastzelltryptase positive Zellen in Saugblasen-induzierter Pigmentierung.....	59
Abbildung 5.16: Exemplarische Färbung Mastzelltryptase ⁺ Zellen.....	60
Abbildung 5.17: Exemplarische Färbung CD66b ⁺ Zellen	61
Abbildung 5.18: Cofärbung von CD45 positiven, Mastzelltryptase positiven und CD14 positiven Zellen; Mosaikaufnahme von der Immunzellverteilung in einem hyperpigmentierten Areal.....	63
Abbildung 5.19: Cofärbung von CD45 positiven, Mastzelltryptase positiven und CD14 positiven Zellen in hyperpigmentierten Arealen; Unterschiede der Immunzellzahl zweier Probanden.....	64
Abbildung 5.20: Histaminkonzentration im Kulturüberstand von Melanozyten behandelt mit konditioniertem HMC1-Medium	66
Abbildung 5.21: Melaningehalt im Kulturüberstand und in den Melanozyten nach Behandlung mit konditioniertem HMC1-Medium	67
Abbildung 5.22: Histaminkonzentration im Kulturüberstand von Melanozyten nach der Behandlung mit Substanzen	68
Abbildung 5.23: Melaningehalt im Kulturüberstand und in den Melanozyten nach Behandlung mit synthetischen Substanzen	69

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	Signifikant ($p \leq 0,05$)
**	Sehr signifikant ($p \leq 0,01$)
***	Höchst signifikant ($p \leq 0,001$)
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
64PP	6,4-Photoprodukt
AK	Antikörper
AKV	Antikörpervedünner
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cm ²	Quadratcentimeter
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
d	Tag
DAPI	4,5-Diamidin-2-phenylindol
DCT	DOPAchromautomerase
ddH ₂ O	Bidestiliertes Wasser
DHI	5,6-Dihydroxyidol
DHICA	5,6-Dihydroxyidol-2-Carbonsäure
DNA	Desoxyribunucleinsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DT	<i>Delayed tanning</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	Latein: und andere
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm und Gravitation
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
h	Stunde
HbInd	Hämoglobin-Index
HMC1	<i>Human mast cell 1</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IF	Immunfluoreszenz

IHC	Immunhistochemie
IMDM	<i>Iscove's Modified Dilbecco's Medium</i>
<i>in vitro</i>	Latein: im Glas
<i>in vivo</i>	Latein: im Lebendigen
IPD	<i>Immediate pigment darkening</i>
K	Kontrolle
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar, mol pro Liter
MBM	<i>Melanocyte Basal Medium</i>
MED	Minimale erythemale Dosis
MelInd	Melanin-Index
MGM	<i>Melanocyte Growth Medium</i>
min	Minute
MITF	Microphtalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Stichprobenumfang
n.s.	Nicht signifikant ($p > 0,05$)
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
nm	Nanometer
OT	Objektträger
p	Signifikanzwert
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Proidiumjodid
PIH	Postinflammatorische Hyperpigmentierung
PPD	<i>Persistent pigment darkening</i>
R	Korrelationskoeffizient
Ref	Referenz
rep. Irr	Repetitive Bestrahlung
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB	Saugblase
SP	Substanz P
SSR	Sonnensimuliertes Licht

TRP oder TYRP	Tyrosinase-assoziierte-Protein
TYR	Tyrosinase
upm	Units pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
w/o	<i>Without</i>
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist die äußerste Abgrenzung des menschlichen Körpers gegenüber der Umwelt. Aufgrund einer durchschnittlichen Oberfläche von 1,5 bis 2 m² und einem Massenanteil von 15 % des Körpergewichts, ist sie das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers (Butnaru und Kanitakis, 2002). Äußeren Einflüssen, mechanischer, chemischer, thermischer oder auch mikrobieller Art, steht die Haut als Schutzbarriere mit einer durchschnittlichen Stärke von 2,5 mm gegenüber (Tobin, 2006). Vor allem die äußerste Hautschicht (Epidermis), die im unmittelbaren Kontakt zur Außenwelt steht, trägt einen großen Anteil zur Schutzfunktion bei. Als Sinnesorgan beherbergt die Haut eine Reihe von Sinneszellen, wie die Mechanorezeptoren für Druck (Merkel-Zellen), Berührung (Meissner-Körperchen) und Vibration (Vater-Pacini-Körperchen) sowie Temperatur- und Schmerzrezeptoren. Wichtige Funktionen der Haut sind die Fähigkeit zur Pigmentierung, als Prävention vor ultravioletter (UV) Strahlung, und die Eigenschaft zum immunologischen Schutz. Zusätzlich ist sie an einer Vielzahl weiterer Funktionen wie Gasaustausch, der Regulation des Elektrolythaushaltes und der Körpertemperatur beteiligt.

Generell lässt sich die Haut in drei Bereiche gliedern. Die Epidermis (Oberhaut) als äußerste Hautschicht, gefolgt von der Dermis (Lederhaut) und abschließend die Subkutis (Unterhaut). Sogenannte Hautanhangsgebilde, wie Haare, Drüsen und Nägel, sind funktionell ebenfalls der Haut zugeordnet. In Abbildung 1.1 ist der Aufbau der Haut mit der Einteilung der Schichten und den enthaltenen Hautanhangsgebilden schematisch dargestellt.

Abhängig von der Hautregion weist die Epidermis eine Dicke von 0,04 bis 1,2 mm auf. Sie ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das sich in fünf Schichten gliedern lässt. Die Schichten bestehen zu 90 % aus Keratinozyten unterschiedlicher

Differenzierungsstadien, diese unterscheiden sich mikroskopisch in Form und Funktion.

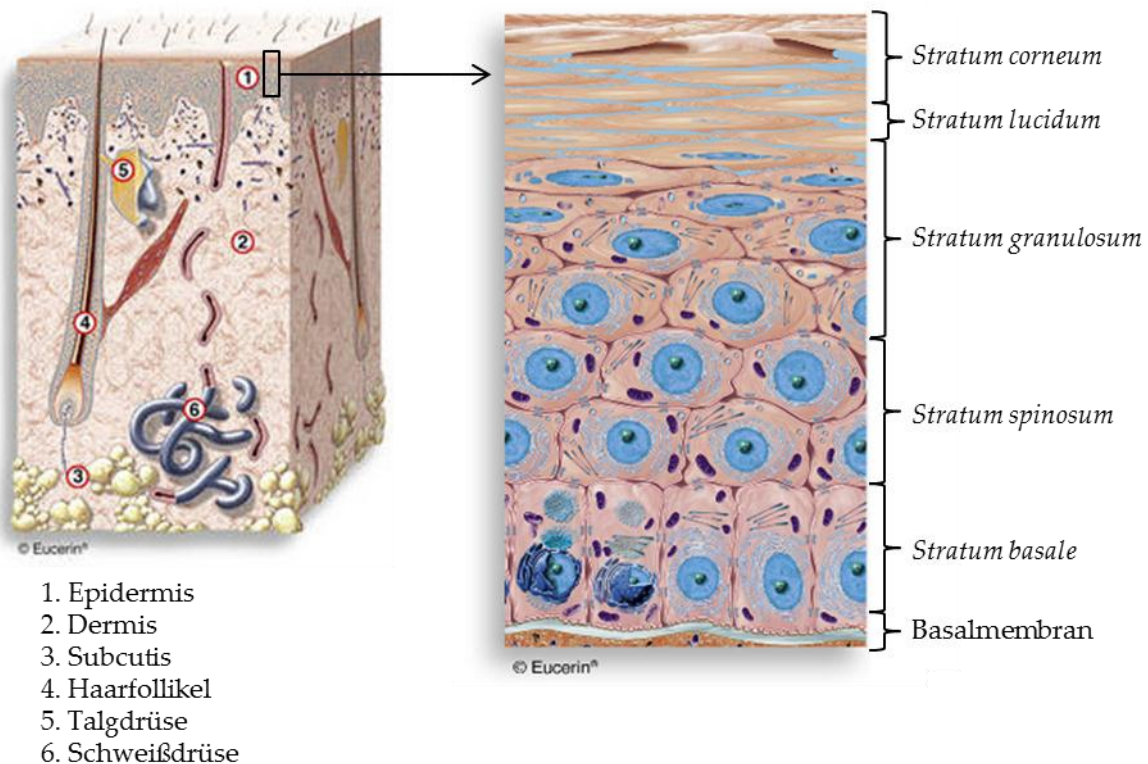


Abbildung 1.1: Aufbau der menschlichen Haut

Schematischer Querschnitt der menschlichen Haut. Einteilung in die drei Schichten Epidermis, Dermis und Subkutis. Der vergrößerte Ausschnitt (rechts) zeigt die unterschiedlichen Schichten der Epidermis. In der Basalzellschicht der Epidermis (*Stratum basale*) befinden sich die Melanin bildenden Melanozyten. (modifiziert nach Informationsprospekt Eucerin®, Beiersdorf AG, Hamburg)

Die unterste Schicht der Epidermis wird als *Stratum basale* (Basalzellschicht) bezeichnet. In der Basalzellschicht tragen die Keratinozyten zur kontinuierlichen Erneuerung des epidermalen Gewebes, durch eine hohe mitotische Aktivität, bei. Es handelt sich hierbei um eine asymmetrische Teilung, bei der sich eine der durch Mitose entstehenden Tochterzellen erneut teilt, während die zweite in ca. 30 Tagen zur Hautoberfläche wandert (Schoppmeyer, 2007). Neben den kleinen, mit ihrer Längsachse senkrecht zum dermoepidermalen Übergang stehenden Keratinozyten, befinden sich hier die pigmentbildenden Melanozyten und Merkel-Zellen. Im *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) bilden die Keratinozyten vergrößerte, runde Zellkörper aus. Die horizontal orientierten Zellen sind über stachelförmige Fortsätze (Desmosomen) verbunden, die ihnen die Kommunikation miteinander ermöglichen.

Stark verzweigte Langerhans-Zellen sind ein weiterer Zelltyp des *Stratum spinosum* und dienen der Antigenpräsentation. Keratinozyten der darauffolgenden Schicht, dem *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), weisen einen stärker abgeflachten Zellkörper mit degenerativen Kernveränderungen auf (Costin und Hearing, 2007). In dessen Zytoplasma befinden sich membranumschlossene Granula (Keratohyalgranula), welche zu den Barriereeigenschaften (Verhornung) der oberen Hautschicht beitragen (Elias, 1983). Im Vergleich zu Keratinozyten eines früheren Differenzierungsgrades besitzen die Keratinozyten des *Stratum lucidum* (Glanzsicht) keine subzellulären Kompartimente mehr. Diese Schicht existiert in Hautbereichen, an denen die Hornschicht besonders stark ausgeprägt ist, wie Fußsohlen und Handflächen. Abschließend wird die Epidermis durch das *Stratum corneum* (Hornschicht) abgegrenzt. Diese äußerste Schicht der Epidermis, und somit der Haut, besteht aus mehreren übereinander gelagerten extrem abgeflachten Hornzellen (Korneozyten), die keine Merkmale lebender Zellen aufweisen.

Direkt unterhalb der Basalmembran (Basallamina) der Epidermis liegt die bindegewebsartige bis zu 4 mm dicke Dermis. Sie verleiht der Haut eine hohe Zugfestigkeit. Außerdem sind in ihr sind die meisten Sinneszellen und Hautanhangsgebilde lokalisiert (Costin und Hearing, 2007). Anteilsmäßig überwiegen Fibroblasten, die elastische und kollagene Fasern synthetisieren (Haake und Holbrook, 1999). In Abhängigkeit von der Faseranordnung der Fibroblasten wird die Dermis in zwei Schichten, das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare*, unterteilt. Zusätzlich zu Fibroblasten enthält die Dermis Zellen des Immunsystems, wie Leukozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen, die Einfluss auf den Ablauf entzündlicher Prozesse nehmen können. Das *Stratum papillare* ist die oberste Schicht der Dermis, die papillenartige, sehr gut vaskularisierte Ausstülpungen in die Epidermis bildet. Das gewährleistet eine bessere Versorgung epidermaler Zellen durch die Vergrößerung der Kontaktfläche. In ihr sind viele Zellen und wenige Fasern enthalten. Im abschließenden *Stratum reticulare* verhält es sich entgegengesetzt, wenige Zellen befinden sich in einer Vielzahl von Fasern.

Die unterste Schicht der Haut, genannt Subkutis, ist eine mit Fett durchzogene lockere Bindegewebsschicht. Durch die enthaltenen Bau- und Depotfette dient diese Schicht der Polsterung und Wärmeisolierung.

1.2 Grundlagen der Pigmentierung

Die Farbe von Haut, Haaren und Augen leitet sich von der Produktion und Verteilung von Biopolymeren, die als Melanin bezeichnet werden, ab. Melanin wird in speziellen von membranumschlossenen Vesikeln, den sogenannten Melanosomen, synthetisiert. Melanosomen werden ausschließlich in Melanozyten und Pigmentepithelzellen der Netzhaut produziert. Der ausgebildete Phenotyp des Gewebes ergibt sich aus der Migration, Verteilung, Differenzierung, Proliferation und Funktion von Melanozyten und deren Vorstufe, den Melanoblasten. In der menschlichen Haut sind Melanozyten in der Basalzellschicht der Epidermis lokalisiert. Jeder Melanozyt weist funktionelle Verbindung mit den in der Dermis lokalisierten Fibroblasten und in der Epidermis befindlichen Keratinozyten auf. Zwischen den drei Zelltypen existiert eine hochfrequente Interaktion und Kommunikation über sekretierte Faktoren, Rezeptoren und durch Zell-Zell-Kontakte, die eine Regulation der Funktion und des Phenotyps der Haut ermöglichen (Kondo und Hearing, 2011).

1.2.1 Epidermale Melanozyten und Melanin

Die pigmentbildenden Zellen sind einzeln und regelmäßig im *Stratum basale* angeordnet. Über ausgebildete Dendriten stehen sie mit umliegenden Keratinozyten in Kontakt. Produziertes Melanin wird in Melanosomen angereichert und über die Dendriten an bis zu 40 umliegende Keratinozyten abgegeben (epidermale Melanineinheit) (Fitzpatrick und Breathnach, 1963). Mittels dieses Mechanismus wird das Melanin in höher gelegene Schichten der Epidermis transportiert. Die Melanosomen werden in Keratinozyten oft kappenartig über dem Perinuklearraum angeordnet, da es sich bei Melanin um einen effizienten Photoadsorber handelt, wirkt diese Anordnung UV-induzierten Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden entgegen (Montagna und Carlisle, 1991). In identischen Hautregionen unterscheidet

sich die Anzahl der Melanozyten bei verschiedenen Individuen mit unterschiedlicher Ethnie nicht. Es bestehen jedoch intra-individuelle Unterschiede in der Dichte des Melanins (Tadokoro *et al.*, 2003). Melanozyten machen anteilig 1 % der gesamten Epidermiszellen aus und nehmen neben den Keratinozyten 10 % der Basalzellschicht ein. Es werden drei Arten von Melanin synthetisiert. Das hellere gelb/rötliche Phäomelanin, das in rothaarigen, sommersprossigen Individuen dominant vorherrscht, und zwei Arten des dunklen braun/schwarzen Eumelanins, dessen Vorkommen vorwiegend in dunkler Haut und schwarzen Haaren dokumentiert ist. Die Farbe der Haut basiert auf einem Gemisch aus allen drei Pigmentarten und den zu Grunde liegenden Mischungsverhältnissen (Wakamatsu *et al.*, 2006).

1.2.2 Biosynthese von Melanin

Melanogenese ist die Biosynthese von Melanin in Melanosomen, in denen biochemische Vorgänge und Signalwege L-Tyrosin in Melanin konvertieren. Mindestens drei melanogenetische Enzyme sind essentiell für die Synthese der drei Arten von Melanin: Die geschwindigkeitsbestimmende Tyrosinase (TYR), die Tyrosin-Hydrolase und DOPA-Oxidase-Aktivität aufweist, und zwei Tyrosinase-assoziierte-Proteine (TYRP, tyrosinase related protein), TYRP1 (auch TRP1 genannt) und DOPACHromautomerase (DCT oder TYRP2), die zusätzlich die Stabilisierung der Tyrosinase an der Melanosomenmembran unterstützen. Tyrosinase katalysiert die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu β -3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) und die folgende Oxidation zu DOPACHinon. Aus DOPACHinon kann durch verschiedene Reaktionen und Bedingungen Phäomelanin oder Eumelanin gebildet werden. Durch Anwesenheit von Cystein wird DOPACHinon in 3- oder 5-CysteinyldOPA umgewandelt. CysteinyldOPA oxidiert und polymerisiert abschließend zu Phäomelanin (Hennessy *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Die Synthese von Eumelanin ist abhängig von der Tyrosinase-Aktivität, wird aber auch durch den Einfluss von TYRP1 und DCT stimuliert. Zwei Eumelanin-Varianten sind Resultat der Synthese, das schwarze DHI-Melanin (5,6-Dihydroxyindol) und das braune DHICA-Melanin (5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure). Für die Synthese von

Eumelanin wird zunächst DOPACHINON in das Zwischenprodukt DOPACHROM umgesetzt. Anschließend kann die Melanogenese zwei Wege durchlaufen. Steht DCT nicht zur Verfügung, wird DOPACHROM über DHI zu Indol-5,6-Chinon und abschließend zum schwarzen DHI-Melanin konvertiert. In Anwesenheit von DCT wird DOPACHROM zu DHICA synthetisiert, welches mit Hilfe von TYRP1 zu Indol-5,6-Chinon-Carbonsäure und schlussendlich zu DHICA-Melanin synthetisiert wird (Ito und Wakamatsu, 2003).

Im Gegensatz zum Eumelanin verfügt Phäomelanin über keine bekannten photoprotektiven Eigenschaften gegenüber UV-Licht. Schwarzes DHI-Melanin zeigt neben starken photoprotektiven Eigenschaften jedoch eine erhöhte Zytotoxizität. Ein Mittel aus beiden Extremen stellt das braune DHICA-Melanin mit einer mittleren Photoprotektion und moderatem zytotoxischen Effekt dar (Urabe *et al.*, 1994).

Die Synthesewege der Melanogenese sind schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt.

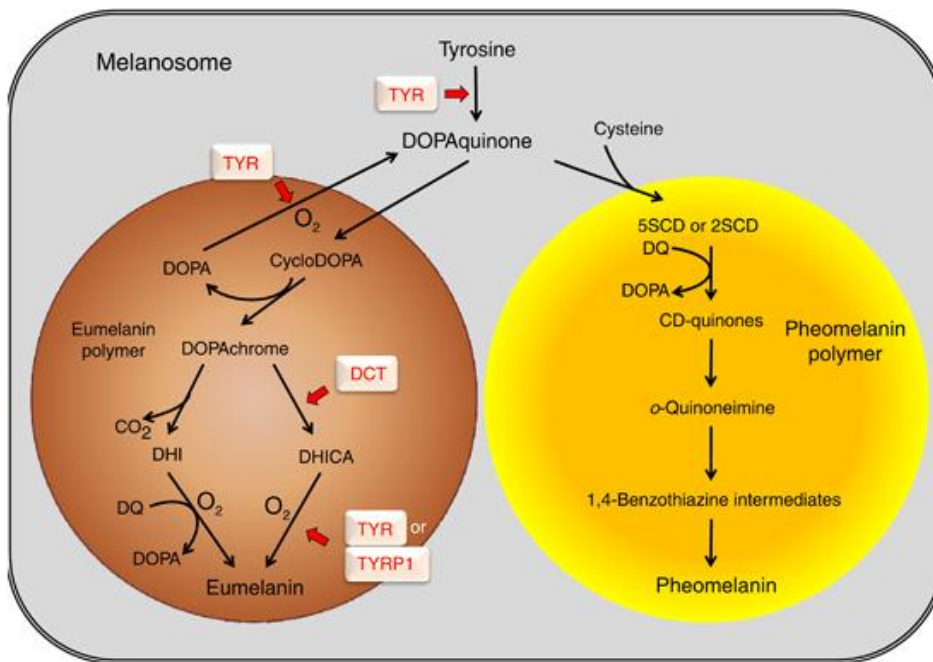


Abbildung 1.2: Synthesewege der Melanogenese in Melanosomen

Bildung von Eumelanin (DHI und DHICA) und Phäomelanin aus L-Tyrosin, mittels Tyrosinase, TYRP1 und DCT in Melanosomen (modifiziert nach Kondo und Hearing, 2011)

1.2.3 UV-induzierte Pigmentierung

Durch äußere und innere Einflüsse kann sich die konstitutive Pigmentierung der Haut ändern. Die UV-Strahlung der Sonne stellt einen bedeutenden Faktor für die Induktion von Pigmentierung dar. Das UV-Licht wird in drei Bereiche (UVA: 320-

400 nm, UVB: 280-320 nm und UVC: 200-280 nm) unterschieden und ist Teil des elektromagnetischen Spektrums. Der Einfluss von UVC-Strahlung auf die Haut ist limitiert, da kurzwelliges Licht von der Ozonschicht in der Stratosphäre absorbiert wird (Clydesdale *et al.*, 2001). Etwa 5 bis 10 % der auf der Erde auftreffenden Strahlung ist ultravioletten Ursprungs, der größere Anteil des Lichtes besteht aus sichtbarem Licht (40 %) und Infrarotstrahlung (50 %). Gegenwärtig wird UVB-Strahlung zu ca. 90 % durch die Ozonschicht zurückgehalten (abhängig von der geographischen Lage und Tageszeit), dadurch besteht die auf die Erdoberfläche eintreffende UV-Strahlung zu 95 % aus UVA-Anteilen. Die Eindringtiefe in die Haut nimmt mit steigender Wellenlänge zu. So erreichen etwa 19-50 % der UVA- und 9-14 % der UVB-Strahlung die Melanozyten in der Basalzellschicht. UVA-Strahlung dringt bis in die Dermis ein (Maverakis *et al.*, 2010). Auf Grund des inversen Zusammenhangs zwischen dem Energiegehalt der Strahlung und der Wellenlänge weist UVA-Strahlung einen 1000-fach niedrigeren Erythem-(Sonnenbrand)-produzierenden Effekt auf, als der des UVB-Anteils, der in erster Linie für die Schädigung der Haut verantwortlich ist. Die individuelle Dosis, die zur Ausbildung einer erythemalen Reaktion führt, wird als MED (minimale erythemale Dosis) bezeichnet (Clydesdale *et al.*, 2001).

Die UV-induzierte Bräunung wird in drei Phasen eingeteilt: Zwei werden der sofortigen Bräunung zugeordnet (immediate pigment darkening, IPD und persistent pigment darkening, PPD) und das delayed tanning (DT) der verzögerten Bräunung. Nach Exposition mit Sonnenlicht ist vor allem der UVA-Anteil für die Ausbildung einer IPD und PPD verantwortlich. In der IPD setzt bereits nach wenigen Minuten die grünlich wirkende Bräunungsreaktion ein, erreicht ihre stärkste Ausbildung nach 1 bis 2 Stunden und klingt innerhalb von 24 Stunden wieder ab. Die PPD scheint die zweite Phase der Bräunungsreaktion zu sein. Sie bildet durch einige Stunden UV-Exposition eine bräunliche Hautfarbe aus und besteht über mehrere Tage. Zurzeit geht man davon aus, dass der auftretenden Bräunung (IPD und PPD) keine Neusynthese von Melanin zugrunde liegt, sondern eine Umverteilung und

Photooxidation von bereits vorhandenen Melanin und dessen Vorstufen (Yamaguchi *et al.*, 2007). Im Gegensatz zur verzögerten Bräunung bietet die Sofortbräunung keinen photoprotektiven Effekt gegen UV-induzierte Schäden. Innerhalb von 48 bis 72 Stunden nach repetitiver UV-Bestrahlung tritt die verzögerte, vor allem durch UVB-Strahlung vermittelte, Bräunung auf. Nach etwa drei Wochen wird die maximale Pigmentierung erreicht. Zur Einstellung der konstitutiven Pigmentierung der Haut kommt es erst nach acht bis zehn Monaten (Nordlund *et al.*, 2006). Im DT kommt es zu einer Erhöhung der Melanozytenzahl, die vergrößert sind, mehr Dendriten ausbilden und vermehrt Tyrosinase synthetisieren. Zusätzlich werden mehr Melanosomen gebildet, die in erhöhter Anzahl an die Keratinozyten abgegeben werden. Gegen den UV-Reiz bilden Keratinozyten, durch gesteigerte Proliferation, ein verdicktes *Stratum corneum*, eine sogenannte Lichtschwiele aus, welche einen Teil der eingehenden UV-Strahlung streut, reflektiert und absorbiert (Kochevar, 1995).

Um DNA-Schäden zu vermeiden, konzentriert sich das gebildete Melanin über den Zellkernen der Keratinozyten. Durch Überdosierung von UV-Strahlung kommt es zur Ausbildung einer inflammatorischen Reaktion, dem Sonnenbrand. Vor allem der UVB-Anteil des Sonnenspektrums ist dafür verantwortlich. Beschädigte und potentiell kanzerogene Keratinozyten werden während ihrer Differenzierung abgeschilfert. Ein weiterer Schutzmechanismus kann durch UV-induzierte DNA-Schäden eingeleitet werden. Dabei werden die sogenannten Sonnenbrandzellen mittels Apoptose aus dem Zellverbund entfernt.

1.3 Postinflammatorische Hyperpigmentierung

Zu den bekanntesten, erworbenen Hyperpigmentierungen zählen Melasma, der Altersfleck und die postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH). Bereits geringe Änderungen im physiologischen Status des menschlichen Organismus oder der Einfluss von gefährdenden, externen Faktoren können die Pigmentierung zeitweilig (z.B. durch die Schwangerschaft) oder anhaltend (z.B. durch chronische UV-Exposition) beeinflussen.

Eine PIH kann durch Hautschädigungen, denen eine inflammatorische Reaktion folgt, hervorgerufen werden. Davon können Epidermis und/oder Dermis betroffen sein. Nach Abnahme von inflammatorischen Ausbrüchen der Haut, z.B. Akne, Kontakt-Dermatitis, oder Atopischer Dermatitis kann sich eine Hyperpigmentierung ausbilden. Weitere Ursachen für PIH sind entzündliche Reaktionen, die durch allergische Reaktionen, gespritzte Medikamente, phototoxische Reaktionen, Traumata, wie Verbrennung und mechanische Einwirkung und Infektion hervorgerufen werden (Epstein, 1989). Beschädigungen der Basallamina und der Basalzellschicht induziert eine stark ausgeprägte PIH (Ruiz-Maldonado und Orozco-Covarrubias, 1997). Eine Sonderform der PIH ist *Pseudofolliculitis barbae* die vor allem bei afrikanisch-stämmigen Individuen, auf Grund der kräuseligen Haarstruktur, durch das Einwachsen von Haaren im Achsel- und Gesichtsbereich, auftritt. Bei der PIH handelt es sich um eine Dispigmentierung, die geschlechts- und altersunabhängig ist, jedoch vermehrt bei stärker pigmentierten Individuen mit einem Fitzpatrick's Phototyp von IV bis VI auftritt (Halder und Nootheti, 2003). Auf zellulärer Ebene ist die PIH durch eine normale Menge an Melanozyten mit erhöhter Melaninsynthese charakterisiert. Derivate der Arachidonsäure gelten als wahrscheinliche Auslöser der PIH. Leukotriene und Prostaglandine werden, auf Grund ihrer stimulierenden Wirkung auf Melanozyten *in vitro*, in diesem Zusammenhang beschrieben. Ihnen wird eine Funktion in der Regulation von Entzündungszuständen zugesprochen. Multiple Signalwege, die Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beeinflussen, werden von Prostaglandine aktiviert. Untersuchungen zeigen eine Vergrößerung und vermehrte Dendritisierung von Melanozyten, gekoppelt mit einer Zunahme der Tyrosinasemenge bei Behandlung von Melanozyten mit Leukotrienen und Prostaglandinen (Tomita *et al.*, 1992).

1.4 Immunologie der Haut

Als schützende Grenzschicht zwischen dem Körperinneren und der Umwelt ist die Haut Toxinen, pathogenen Erregern und physikalischen Stress ausgesetzt. Um diesen Einflüssen entgegenzuwirken, agiert die Haut nicht nur als physikalische

Barriere, sondern auch als aktives Immunorgan. Für die Immunantwort der Haut bedarf es einer Vielzahl immun-kompetenter Zellen und löslicher biologischer Mediatoren, wie Zytokinen. Die mit Blut- und Lymphgefäßen durchzogene Dermis enthält die meisten Lymphozyten der Haut, andere eingewanderte Leukozyten, Mastzellen und Gewebemakrophagen. Obwohl die Epidermis keinen direkten Kontakt zum Blut- und Lymphsystem hat, ist sie mit immun-kompetenten Zellen ausgestattet: die Langerhans-Zellen, makrophagen-ähnliche Antigen präsentierende Zellen der Epidermis; Keratinozyten, Epithelzellen mit Immuneigenschaften; dendritische epidermale T-Lymphozyten, residente Zellen, die als primitives T-Zell Immunsystem agieren; epidermotropische Lymphozyten, migrieren von den Gefäßen in die Dermis; und Melanozyten, epidermale Pigmentzellen mit Immuneigenschaften. Im den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen immunologischen Komponenten der Haut beschrieben. Die Kommunikation zwischen den immunologischen Komponenten von Dermis und Epidermis ermöglichen die Regulationen der Immunantwort in der Haut (Salmon *et al.*, 1994).

T- und B-Zellen

T- und B-Lymphozyten besitzen die Eigenschaft, die durch Antigenrezeptoren entschlüsselte DNA, umzuformen und somit jedes Antigen zu identifizieren. Zusätzlich dienen T- und B-Lymphozyten als Repositorien für das Immungedächtnis. Lymphozyten, die bei einer Immunantwort generiert werden, können über Dekaden bestehen und ermöglichen damit eine schnelle, spezifische Reaktion bei erneuter Gegenüberstellung mit dem Antigen. Folglich ermöglichen T- und B-Zellen eine flexible und nachhaltige Immunität (Clark, 2010).

Monozyten

Von myelomonozytischen Stammzellen des Knochenmarks abgeleitete, zirkulierende Monozyten nehmen zwei Funktionen im Immunsystem ein. Zum einen stocken Monozyten residente Makrophagen und dendritische Zellen im peripheren Gewebe unter Normalbedingungen (wird auch als Steady State bezeichnet) auf. Zum anderen ist ihre zweite Funktion das Patrouillieren in gesundem Gewebe entlang des

Endothels. Als Reaktion auf Entzündungssignale wandern Monozyten zum Ort der Infektion im betreffenden Gewebe, leiten die Phagozytose von fremden Substanzen ein und initiieren eine frühe Immunantwort durch Rekrutierung von Neutrophilen (Granulozyten) und anderen polymorphkernigen Leukozyten (Zhou *et al.*, 2012).

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen bilden eine Gruppe von antigen-präsentierenden Leukozyten, die wichtig für die angeborene und adaptive Immunität ist. Im Körper befinden sich verschiedene Populationen von dendritischen Zellen, die alle auf Grund ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung als dendritische Zellen definiert sind. In nicht entzündeter Haut befinden sich drei Hauptgruppen dendritischer Zellen: epidermale Langerhans-Zellen, dermale myeloide dendritische Zellen und dermale plasmazytoide dendritische Zellen. Bei einer Entzündungsreaktion in der Dermis kommt es vorwiegend zum Anstieg der Population myeloider dendritischer Zellen (Zaba *et al.*, 2009).

Makrophagen

Makrophagen sind reife myeloide Zellen, die vor allem durch Differenzierung von zirkulierenden Monozyten nach Gewebeinfiltration entstehen. Durch unterschiedliche Zytokine wird die Reifung verschiedener Phenotypen mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften induziert (Rodero und Khosrotehrani, 2010). Abhängig vom eingehenden Stimulus können Makrophagen zwischen den funktionellen Subtypen wechseln (Stout und Suttles, 2004). In der durch Trauma induzierten Inflammation und in der Heilung des Trauma nehmen Makrophagen viele Funktionen ein. Zu ihren Funktionen gehören die Förderung und Auflösung von Entzündungen, der Abbau apoptotischer Zellen und die Unterstützung von Zellproliferation und Gewebeerneuerung (Koh und DiPietro, 2013).

Mastzellen

Mastzellen sind als Effektorzellen von allergischen Sofort-Typ-Reaktionen bekannt. Innerhalb der letzten Dekade wurden experimentelle Hinweise erhalten, die

Mastzellen eine Rolle hinsichtlich der angeborenen und erworbenen Immunität zuschreiben. Nach ihrer Aktivierung unterliegen Mastzellen anaphylaktischen oder teilweisen Degranulierungen oder Degranulierungs-unabhängigen Mediatorsekretionen, welche in rapiden oder langsamen Freisetzung von löslichen Mediatoren, wie Serinproteasen, Histamin, Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren, resultieren. Mastzellen besitzen die Fähigkeit verschiedene Rezeptoren und Liganden auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Diese Moleküle können die Aktivierung von Immunzellen induzieren, wie beispielsweise Untergruppen von T-Zellen. Genannte Mediatoren und Oberflächenmoleküle können Entzündungen in der Haut fördern. Mastzellen sind auch an der Induktion von Immunsuppression beteiligt und interagieren mit regulierenden T-Zellen (Harvima und Nilsson, 2011). Typischer Weise sind Mastzellen in Geweben lokalisiert, die mit externen Antigenen, Allergenen, Toxinen und Mikroben in Berührung kommen können, wie zum Beispiel die obere dermale Haut (*Stratum papillare*). Sie dienen dem Schutz der Haut bei starken bakteriellen und parasitären Infektionen, sowie heftigen Reaktionen nach Insektenstichen und Schlangenbissen (Metz *et al.*, 2008). Zusätzlich regulieren Mastzellen die kutane Wundheilung nach Trauma. Im menschlichen Gewebe werden Mastzellen in drei Subtypen klassifiziert: Mastzellen die Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase und Kathepsin G ähnliche Proteinase beinhalten, sogenannte MC_{TC}-Zellen; Mastzellen die lediglich Tryptase aufweisen, MC_T-Zellen; und Zellen die Chymase und Carboxypeptidase, aber keine Tryptase enthalten, MT_C-Zellen. Alle drei Subtypen enthalten Histamin. Die meisten Mastzellen in der menschlichen Haut sind dem Subtyp MC_{TC} zugeordnet, während in der Lunge und den Schleimhäuten die MC_T-Zellen dominieren. Daraus lässt sich eine spezifische Funktion der Chymase, Carboxypeptidase und der Kathepsin G ähnlichen Proteinase für die Haut, nach der Freisetzung durch die Mastzellen, ableiten (Weidner und Austen, 1993).

Granulozyten

Granulozyten zählen zu den wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems. Neutrophile und eosinophile Granulozyten bilden die erste Abwehr bei der Bekämpfung von bakteriellen und parasitären Befall. Durch die Freisetzung von Zytotoxinen und Entzündungsmediatoren sind Granulozyten an der Eliminierung von Pathogenen, der Rekrutierung anderer Immunzellen und der Auflösung der Entzündungsreaktion beteiligt (Hogan und Basten, 1988). Die Aktivität von Granulozyten ist durch die geringe Lebenszeit limitiert. Unter normalen Bedingungen existieren Neutrophile, die 95 % der Granulozyten ausmachen, nur wenige Stunden (Jiang und Schwarz, 2010).

2 Fragestellung der Arbeit

Die postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) ist eine reaktive Hypermelanose und eine Folgeerscheinung von einer Vielzahl an entzündlichen Hautzuständen. Medizinisch stellt die PIH keine Gefährdung dar, kann aber negative Auswirkungen auf die Lebensqualität von betroffenen Patienten haben. Die Fehlpigmentierung ist für die Betroffenen ein kosmetisches Problem, vor allem wenn sich die Pigmentstörung im Gesicht oder anderen exponierten Hautpartien befindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen helfen, grundlegende Mechanismen der PIH aufzuklären, um mögliche Ansatzpunkte zur Modulation abzuleiten.

Beiersdorf interne Untersuchungen zeigen die Bildung eines dermalen entzündlichen Infiltrats in postinflammatorischer, hyperpigmentierter Haut. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Quantifizierung und Charakterisierung dieses dermalen entzündlichen Infiltrats und dem Vergleich mit UV-induzierter Pigmentierung. Dazu gehörte die Untersuchung der Bräunungsreaktion, der Melanozytenaktivität, der Morphologie und des Immunzellstatus in UV-induzierter Pigmentierung. Die nähere Charakterisierung des Immunzellstatus in der PIH sollte auf bereits im Labor „Ethnic Skin/Suncare“ ermittelte Erkenntnisse aufbauen.

Ein weiterer Fokus lag auf der Untersuchung der Wirkung von konditionierten HMC1-Medium auf die Melanogenese von Melanozyten *in vitro*, da melanogene Einflussfaktoren durch Mastzellen und deren Mediatoren vermutet werden.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Tabelle 3.1: Laborgeräteliste

Bezeichnung	Typ/ Ausführung	Hersteller/ Bezugsquelle
Absaugpumpe	Vacunsafe comfort	IBS Integra Biosciences, Chur (Schweiz)
Analysenwaage	CP225 D	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Technoclav	IBS Integra Biosciences, Chur (Schweiz)
	Varioklav 135	SH+P, Oberschleißheim
Autostainer	Plus	Dako, Hamburg
Digitalkamera	PowerShot G10	Canon, Deutschland
Eindeckautomat	CV5030	Leica, Nussloch
Inkubator	HERAcell 150	Heraeus, Hanau
Kühlgerät	-196°C Cryostorage System K10	Taylor-Wharton, Theodor, AL (USA)
	-80°C ultra low temperature freezer	New Brunswick Scientific, NJ (USA)
	Kühlkombination -20°C, +4°C	Handelsübliche Geräte
Laborwaage	3713MP	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph, Kehlheim
	MR 3001	Heidolph, Kehlheim
Mehrkanalpipette	8 Kanal, 30-300µl	Eppendorf, Hamburg
Mikropipette	0,1-2,5µl	Eppendorf, Hamburg
	0,5-10µl	Eppendorf, Hamburg
	100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
	10-100µl	Eppendorf, Hamburg
	20-200µl	Eppendorf, Hamburg
	2-20µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroplattenlesegerät	Safire ²	Tecan, Crailsheim
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen

Bezeichnung	Typ/ Ausführung	Hersteller/ Bezugsquelle
	Axiovert S100	Zeiss, Göttingen
	Keyence BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg
	Mirax Scanner	Zeiss, Göttingen
Mikroskopadapter	SOLIGOR Adapter Tube for Canon G10 Tele 52mm	Zeiss, Göttingen
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Reinstwasseranlage	Milli-Q academic	Millipore, Eschhorn
Schüttler	MS2 Minishaker	IKA, Wilmington (USA)
	REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
	WT17	Biometra, Göttingen
Sterilwerkbank	HERAsafe	Heraeus, Hanau
	HERAsafe KS12	Heraeus, Hanau
Wärmeschrank	Stuart Incubator SI19	Jensons Scientific, Bridgeville, PA (USA)
Zellzählgerät	Nucleocounter	ChemoMetec, Allerød (Dänemark)
Zentrifuge	miniSpin	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
6-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturflaschen 75, 175 cm ²	Nunc, Roskilde (Dänemark)
KryoVials™ 2 ml	Nunc, Wiesbaden

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Mikroreaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
NucleoCassette	ChemoMetec, Allerød (Dänemark)
Objektträger SuperFrost Ultra Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Suspensionskulturflaschen 645 ml	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD, Heidelberg

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxidlösung 28%	Sigma-Aldrich, München
Antibiotic Supplement	CellSystems, St. Katharinen
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS, Hamburg
BSA-Block	Candor, Wangen
Common AB Diluent	Biogenex (USA)
Dulbeccos PBS w/o (1x)	PAA, Linz (Österreich)
EosinY Solution Aqueous 5%	Sigma, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz (Österreich)
Glutamax I (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Goldchloridlösung	Sigma-Aldrich, München
IHC Waschpuffer für Automaten 10x	DCS, Hamburg
Iscove's Modified Dilbecco's Medium	Sigma-Aldrich, München
Levamisole Solution	Dako, Glostrup (Dänemark)
Link-Diluent	Biogenex, USA

Bezeichnung	Hersteller
Low Cross Buffer	Candor, Wangen
Lysepuffer	ChemoMetec, Allerød (Dänemark)
Mayer's Hämatoxylin Solution	Sigma-Aldrich, München
Melanocyte Basal Medium	CellSystems, St. Katharinen
Melanocyte Growth Supplement	CellSystems, St. Katharinen
Methanol	Merck, Darmstadt
Monothioglycerol	Sigma-Aldrich, München
Mounting Medium CV Ultra	Leica, Nussloch
Natriumthiosulfatlösung	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, München
Stabilisierungspuffer	ChemoMetec, Allerød (Dänemark)
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenullserum	Jackson, West Grove (USA)

3.4 Medien und Lösungen

Immunhistochemie

IHC Waschpuffer

Tabelle 3.4: IHC Waschpuffer Ansatz für 1 Liter

Komponente	Volumen [ml]
IHC Waschpuffer für Automaten 10x	100
mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen	

Fontana Masson Färbung

Silbernitratlösung 10%

Tabelle 3.5: Silbernitratlösung 10%

Komponente	Einwaage [g]
Silbernitrat	10
Auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen	

Fontana Silbernitrat-Stocklösung

Tabelle 3.6: Fontana Silbernitrat-Stocklösung

Komponente	Volumen [ml]
Silbernitratlösung 10%	100
Ammoniumhydroxidlösung 28%	Zugabe tropfenweise bis Lösung fast klar wird

Fontana Silbernitratlösung

Tabelle 3.7: Fontana Silbernitratlösung

Komponente	Volumen [ml]
Fontana Silbernitrat-Stocklösung	100
ddH ₂ O	300

Eosinlösung 1%

Tabelle 3.8: Eosinlösung 1%

Komponente	Volumen [ml]
Eosin 5%	80
ddH ₂ O	320

Zellkultur*Stopp-Lösung*

Tabelle 3.9: Stopp-Lösung

Komponente	Zusammensetzung
PBS	500 ml
FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %

Melanocyte Growth Medium (MGM)

Tabelle 3.10: Melanozyten Kulturmedium

Komponente	Volumen [ml]
Melanocyte Basal Medium (MBM)	500
Melanocyte Growth Supplement	5
Antibiotic Supplement	1

Mastzellmedium (IMDM+)

Tabelle 3.11: Mastzellmedium (IMDM+)

Komponente	Zusammensetzung
Iscove's Modified Dilbecco's Medium (IMDM)	500 ml
FCS	10 %
L-Glutamin (Glutamax)	2 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
Monothioglycerol	10 μ M

3.5 Kits

Tabelle 3.12: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit <ul style="list-style-type: none"> • Catalyst • Dyesolution 	Roche, Mannheim
Histamine ELISA	GenWay, San Diego (USA)
PermaRot-2-Komponenten-Kit	DCS, Hamburg
Super Sensitive Link-Label IHC Detection System <ul style="list-style-type: none"> • MultiLink® • Conc. Label 	Biogenex (USA)

3.6 Antikörper

Tabelle 3.13: Primärantikörper

Primärantikörper (Herstellerbezeichnung)	Hersteller
Anti-CD45 antibody: Polyclonal Kaninchen (1:100)	abcam, Cambridge (UK)
Anti-Human CD14: monoclonal Maus, Klon TÜK4 (1:20)	Dako, Glostrup (Dänemark)
Anti-Human CD45, Leucocyte Common Antigen: monoklonal Maus, Klon 2B11 + PD7/26 (1:500)	Dako, Glostrup (Dänemark)
Anti-Mast Cell Tryptase antibody: monoclonal Maus, Klon AA1 (1:1.200)	abcam, Cambridge (UK)

Primärantikörper (Herstellerbezeichnung)	Hersteller
CD66b Antibody: monoklonal Maus, Klon G10F5 (1:100)	NOVUS, Cambridge (UK)
DAPI: (1:10.000)	Roche, Mannheim
TRP1 Antibody: monoclonal Maus, Klon 3F388 (1:100)	Santa Cruz, Dallas (USA)

Tabelle 3.14: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Alexa Fluor 546: Ziege anti-Maus IgG (1:1.000)	Invitrogen, Karlsruhe
Cy5: Ziege anti-Kaninchen (1:1.000)	Abcam, Cambridge (UK)

3.7 Software

Tabelle 3.15: Verwendete Software

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Excel	Berechnungen; Graphische Darstellung	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
IHC AUTOSTAN	Steuerung des Färbeautomaten (Autostainer Plus, DAKO)	Dako, Hamburg
ImageJ	Melaninquantifizierung	Wayne Rasband (NIH), Bethesda (USA)
KEYENCE BZ II Viewer	Bearbeitung der IF Bilder	Keyence, Neu-Isenburg
Mirax Scan	Bedienung des Mirax Scanner	3DHistech, Budapest (Ungarn)
NuclearQuant 1.15	Quantifizierung Hautdünnschnitten	von 3DHistech, Budapest (Ungarn)
Origin Pro 8	Statistische Auswertung; Graphische Darstellung	OriginLab Corporation
Pannoramic Viewer 1.15	Visualisierung Bearbeitung der Mirax Scan Daten	und 3DHistech, Budapest (Ungarn)

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Statistika	Statistische Auswertung	StatSoft (Europe) GmbH
XFluor4SafireII	Bedienung Spektralphotometers Safire ²	des Tecan, Crailsheim

4 Methoden

4.1 Studiendesign des Probenmaterials

Die verwendeten Probenmaterialien für die histologischen Untersuchungen entstammen zwei Studien, welche durch die Beiersdorf AG durchgeführt wurden. Das Design der Studien wird in den folgenden Abschnitten beschrieben. Bei dem Probenmaterial handelte es sich um Stanzbiopsien die nach der Entnahme in Einbettgeschälchen mit Einbettmedium (Tissue Tek®) aufgenommen wurden. Anschließend erfolgte die Ausrichtung der Biopsie und Kühlung auf Trockeneis. Abschließend wurden die Proben in die Stickstoffgasphase überführt und bei -196 °C gelagert.

4.1.1 PIH-Studie: Untersuchung der Saugblasen-induzierten postinflammatorischen Hyperpigmentierung (PIH)

Zur Gewinnung eines hyperpigmentierten Hautareals, das Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen war, wurde eine Saugblasenmethode verwendet. Dafür wurden 4-Loch- und 3-Loch-Saugblasentöpfe, mit einem Lochdurchmesser von 7 mm, auf die zuvor markierten Hautareale am unteren Rücken des Probanden befestigt. Durch Anlegen eines geringen Unterdrucks löste sich die Epidermis innerhalb von 2 bis 3 h und bildete eine sogenannte Saugblase (SB) aus, die anschließend abpräpariert wurde, um den Regenerations- und Pigmentierungsprozess zu induzieren. Als Kontrollareal (K) diente eine Hautpartie derselben Hautregion, welche keiner Behandlung unterzogen wurde. In Abbildung 4.1 ist die Arealanordnung für die PIH-Studie schematisch dargestellt.

Nach 2, 4 und 16 Wochen wurden bei 16 Probanden Farbmessungen durchgeführt und Stanzbiopsien entnommen. Bei 8 Probanden erfolgte noch eine zusätzliche Entnahme einer Stanzbiopsie nach 8 Wochen (siehe Abbildung 4.2). Der Probenumfang für die vorliegende Arbeit umfasst insgesamt 16 Probanden.

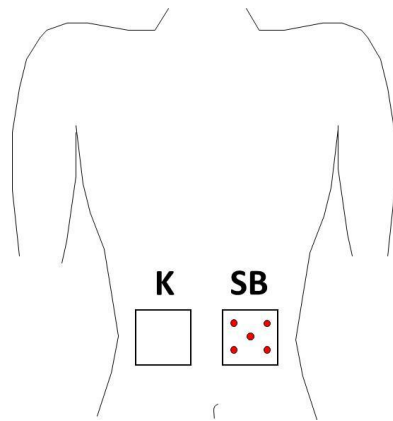


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Arealanordnung in der PIH Studie

Für die PIH-Studie wurden Stanzbiopsien aus dem unteren Rücken des Probanden (n=16) entnommen. Das Kontrollareal (K) wurde zu keinem Zeitpunkt der Studie behandelt und dient deshalb als Referenz für das Saugblasenareal (SB). Um einen systematischen Fehler zu minimieren wurden die Areale permutiert.

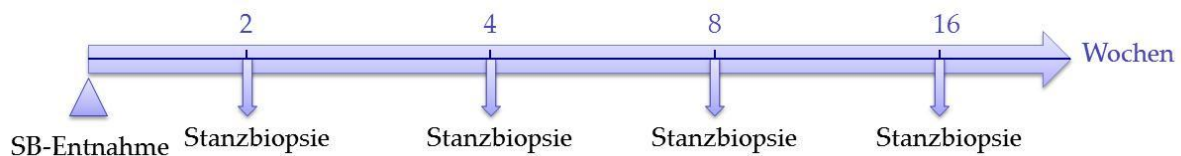


Abbildung 4.2: Studiendesign der Saugblasen-induzierten PIH

Zum Zeitpunkt 0 Wochen wurden SB (n=16) entnommen und somit die Genese hyperpigmentierter Areale induziert. Die Farbmessungen und die Entnahme je einer Stanzbiopsie pro Areal erfolgten 2, 4, 8 (n=8) und 16 Wochen nach der SB-Entnahme.

4.1.2 UV-Studie: Untersuchung der UV-induzierten Pigmentierung

Bei der UV-Studie handelte es sich um eine Bestrahlungsstudie. Diese hatte die Aufklärung der zellphysiologischen Mechanismen zum Gegenstand, die für die Pigmentierung der Haut essentiell sind. Um eine vergleichbare Pigmentierung zu erlangen, wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen jedes Versuchsareal 10-mal repetitiv mit sonnensimulierten Licht (SSR), UVA oder UVB bestrahlt. Für die Induktion einer annähernd identischen Pigmentierung in den bestrahlten Arealen wurde die Bestrahlung mit dem 2,3-fachen Anteil des in SSR enthaltenen UVA und dem 1,2-fachen UVB-Anteil durchgeführt. Als Kontrolle diente ein unbestrahltes Hautareal der gleichen Körperregion (siehe Abbildung 4.3). Um die Schutzleistung der Hautpigmentierung prüfen zu können wurden zehn Tage nach der letzten repetitiven Bestrahlung alle bereits bestrahlten Areale sowie ein zusätzliches

unbestrahltes Hautareal mit 1,5 MED SSR bestrahlt (siehe Abbildung 4.4). Das zuvor unbestrahlte Hautareal diente als Referenz für die repetitiv bestrahlten Areale.

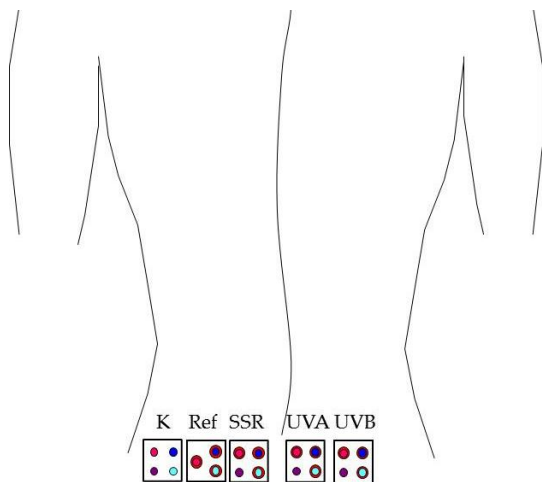


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Arealanordnung in der UV-Studie

In der UV-Studie wurden Stanzbiopsien aus dem unteren Rücken der Probanden ($n=8$) entnommen. Folgende Areale (vgl. Schema, von links beginnend) wurden gekennzeichnet: Das Kontrollareal (K) wurde zu keinem Zeitpunkt der Studie bestrahlt und bildet den Ausgangs- bzw. Normalzustand der Haut ab. Das Referenzareal (Ref) wurde nur zum Zeitpunkt t2 (10 Tage nach repetitiver Bestrahlung) einer UV-Dosis von 1,5 MED SSR ausgesetzt und dient als Referenz für die vorbehandelten Areale SSR, UVA und UVB, die ebenfalls zum Zeitpunkt t2 einem Reiz von 1,5 MED SSR ausgesetzt wurden. Um einen systematischen Fehler auszuschließen können, wurden die Areale permutiert.

Für histologische Untersuchungen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Stanzbiopsien von Probanden ($n=8$) entnommen. Diese Zeitpunkte wurden wie folgt definiert:

- 7 Tage nach letzter repetitiver Bestrahlung 7d post rep. Irr (t1)
- Direkt nach der Bestrahlung mit 1,5 MED SSR post 1,5 MED (t2)

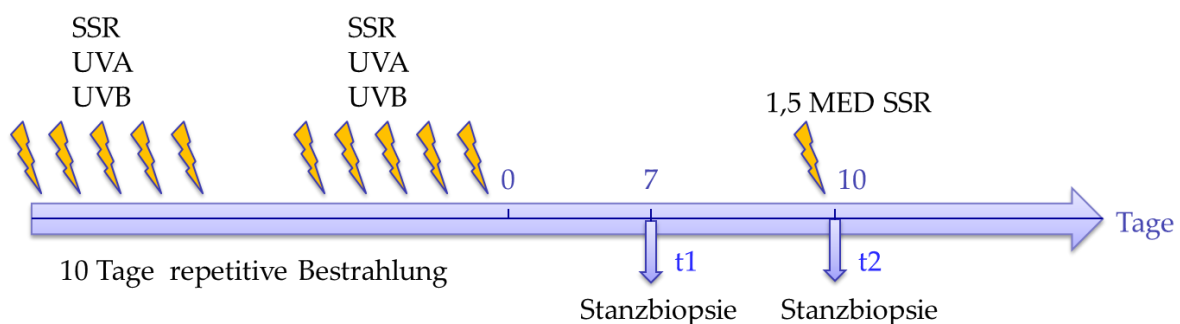


Abbildung 4.4: Studiendesign der UV-induzierten Pigmentierung

Für die Untersuchung UV-induzierter Pigmentierung wurden 7 Tage nach 10-maliger repetitiver Bestrahlung mit SSR, UVA oder UVB Stanzbiopsien entnommen. Nach weiteren 3 Tagen wurden alle repetitiv bestrahlten Areale sowie ein Referenzareal mit 1,5 MED SSR bestrahlt. Die Exzision der Stanz erfolgte ca. 1 h nach Bestrahlung.

4.2 Histologie und Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen und histologischen Untersuchungen wurden Gefrierdünnschnitte der entnommenen Stanzbiopsien aus den oben beschriebenen Studien (4.1.1 und 4.1.2) verwendet. Die Gefrierdünnschnitte, von 5 µm Dicke, wurden am Uniklinikum Eppendorf (Klinik für Dermatologie und Venerologie, Zell- und Molekularbiologisches Labor) angefertigt und jeweils drei Kryoschnitte auf Superfrost Ultra Plus Objektträgern (OT) aufgebracht. Die Anordnung der sogenannten Stufenschnitte erfolgte mit dem Ziel, dass sich keine direkt aufeinanderfolgenden Schnitte auf einem Objektträger befinden, um eine möglichst große Biopsietiefe abbilden zu können.

4.2.1 Fixierung von histologischen Gefrierschnitten

Vor der Fixierung, der bei -20 °C gelagerten Gefrierdünnschnitte, wurden diese bei Raumtemperatur (RT) für wenige Minuten ausgelegt damit Flüssigkeitsrückstände abdampfen können. Proben für Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz wurden in Aceton für 10 min bei -20 °C fixiert. Für die Fixierung von Proben der Fontana Masson Färbung wurde ein Gemisch aus Methanol/Aceton (1:1) verwendet. Dadurch wurden Proteine denaturiert und die Zellen permeabilisiert.

4.2.2 Automatisierte immunhistochemische Färbung

Kryokonservierte Biopsieschnitte wurden am Autostainer Plus der Firma Dako mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt. Die Verwendung des automatisierten Systems für die Bearbeitung von Objektträgern war bei einem Probenumfang wie er in dieser Arbeit vorlag, enorm zeitsparend. Es ermöglichte zusätzlich eine höhere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit, zu manuellen Färbemethoden.

Die zu Grunde liegende Färbemethode ist die alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP). Sie ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers, der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist. Ein Brückenantikörper, der sogenannte Linker, bindet am Primärantikörper und stellt gleichzeitig die Bindungsstelle für den monoklonalen Maus-anti-alkalische-Phosphatase Antikörper (Sekundärantikörper) dar. Am Sekundärantikörper bindet

alkalische Phosphatase, welche durch die Zugabe des Chromogens PermaRot einen roten Niederschlag erzeugt.

Mit Hilfe der Software IHC AutoStan konnte ein Färbeprotokoll individuell programmiert und verändert werden. Nach Erstellung des Programms wurden die Objektträger mit Barcode versehenen Etiketten beklebt, die dem Färbeautomat eine eindeutige Zuordnung der Objektträger ermöglichten. Sämtliche Reagenzien- und Puffervolumina wurden vom Programm automatisch berechnet und mussten dem Gerät vor dem Start des Programmlaufes bereitgestellt werden. Die Färbung erfolgte bei RT. Auf Grund der geringen Haltbarkeit des Chromogens bei RT erfolgte der Chromogenansatz kurz vor der Verwendung. Im Detail können alle Färbeschritte der Tabelle 4.1. entnommen werden.

Tabelle 4.1: Immunhistochemisches Färbeprotokoll am Dako Autostainer Plus

Schritt	Reagenz	Inkubationsdauer [min]
Blockierung	DCS Antikörperverdünnungspuffer	20
Vorbehandlung	DCS Antikörperverdünnungspuffer	20
Primärantikörper	Siehe Tabelle 3.13 (in DCS AKV)	30
Sekundärreagenz	Link-Diluent mit MultiLink®	20
Tertiärreagenz	Common AB Diluent mit Conc. Label	20
Chromogen	PermaRot-2-Komponenten-Kit	20
Übersichtsfärbung	Mayer's Hämatoxylin Solution	3

Nach jeder Inkubation folgte ein Waschschrift mit IHC Waschpuffer

Nach dem Programmlauf wurden die Objektträger mit vollentsalztem Wasser (VE) gewaschen und zum Trocknen ausgelegt. Mit dem CV5030 Eindeckautomaten von Leica wurden die Objektträger eingedeckt und standen nach ca. 6 h Aushärtung der weiteren Auswertung zur Verfügung. Die Digitalisierung der gefärbten Objektträger erfolgte mit Hilfe des Mirax Scanner von Zeiss. Dabei wurden hochaufgelöste Mosaikbilder generiert, die mit dem Panoramic Viewer 1.15 betrachtet und weiterverarbeitet werden konnten.

4.2.3 Quantifizierung immunhistochemischer Hautdünnschnitte

Mit Hilfe der Quantifizierungssoftware NuclearQuant 1.15 wurden die digitalisierten Gefrierdünnschnitte ausgewertet. Die Software ermöglichte in IHC gefärbten Hautdünnschnitten markierte und nicht markierte Zellen zu detektieren. Für eine individuelle Anwendung standen verschiedene Einstellungsmöglichkeiten zur Verfügung.

Zuerst wurde eine „Region of Interest“ (ROI) des zu quantifizierenden Gefrierdünnschnittes generiert. Die Erkennung der positiven (markierten) und negativen (nicht markierten) Zellen erfolgte über eine Farberkennung. Dafür wurde im gefärbten Kryoschnitt ein Farbton definiert, der repräsentativ für die durchgeführte Färbung war. Anhand der Einstellung von Grenzwerten für den Zellradius, die Zellfläche, die Zirkularität, die Weichheit, den Kontrast und die Intensität können die zu zählenden Objekte näher definiert werden. Die Ergebnisse der identifizierten positiven und negativen Objekte wurden in Kombination mit den entsprechenden Flächenangaben in Exceltabellen ausgelesen und standen für weitere Auswertungen zur Verfügung. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde mittels einer Übersicht des ausgewerteten Hautdünnschnittes visuell überprüft, ob die Zellen und ihre Identifizierung als positives oder negatives Objekt vom Programm richtig erkannt wurden. In der Abbildung 4.5 ist ein Ausschnitt eines solchen quantifizierten Hautdünnschnittes aufgeführt.

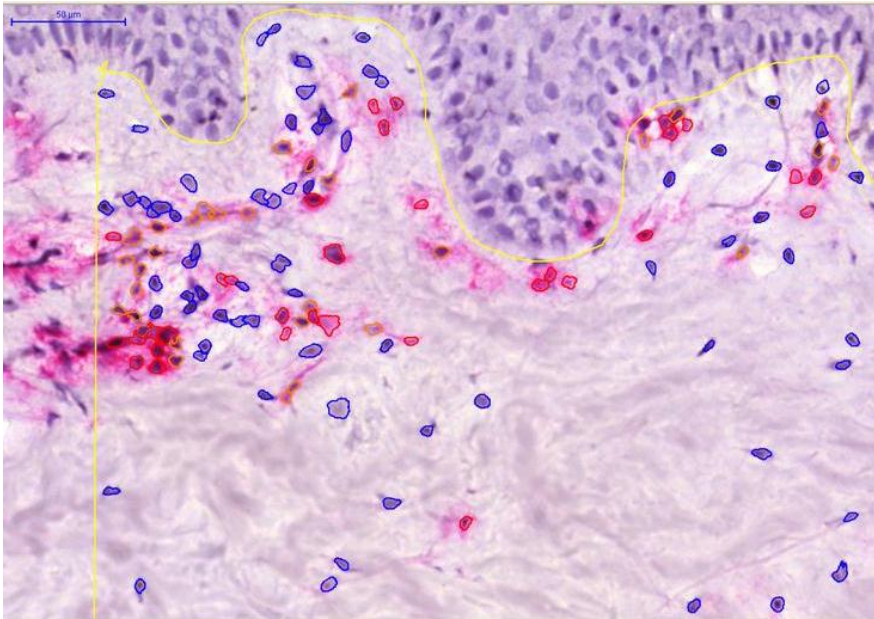


Abbildung 4.5: Ausschnitt eines mit NuclearQuant quantifizierten Hautdünnschnittes

Histologische Hautdünnschnitte, die mit immunhistochemischen Färbemethoden gefärbt wurden, konnten nach der Digitalisierung mittels der Software NuclearQuant analysiert werden. In Gelb dargestellt ist die ROI, welche per Hand mittels Polygonfunktion definiert wurde. Negative (blauer Kreis) und positive Objekte (roter Kreis) wurden vom Programm ausgezählt und standen zusammen mit der Flächenangabe für weitere Auswertungen zur Verfügung. (Vergrößerung 40-fach, Balken entspricht 50 μm)

4.2.4 Fontana Masson Färbung

Mit der Fontana Masson Färbemethode werden argentaaffine Granulate und das argentaaffine Pigment Melanin durch einen schwärzlichen Niederschlag dargestellt. Dabei reduziert Melanin in einer ammoniakalischen Silberlösungen die Ionen zu metallischen Silber. Dem zu Grunde liegt die Eigenschaft von Melanin zur Argyrophilie, bei dem sich das Polymer durch ein Reduktionsmittel anfärben lässt. Im Mikroskop werden angefärbte Melanine als braune bis schwarze Silbergranula wahrgenommen. Durch eine zusätzliche Übersichtsfärbung mit Eosin sind Zellkerne pink bis rot und das Zytoplasma leicht rosa gefärbt.

Kryo-gelagerte Hautdünnschnitte wurden fixiert (vgl. 4.2.1) und für 4 h bei 60 °C in Fontana Silbernitratlösung (siehe Tabelle 3.7) inkubiert. Nach drei Waschschritten über 5 min in VE-Wasser wurden die Objektträger für 1 min in 0,2 % Goldchloridlösung überführt, um die gebildeten Silberniederschläge zu tönen. Für die Fixierung erfolgte eine Inkubation mit 2 % Natriumthiosulfatlösung. Die Übersichtsfärbung erfolgte mit 1% Eosin für 5 min. Anschließend wurden die

Gefrierdünnsschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit dem Eindeckautomaten eingedeckt. Das genaue Färbeprotokoll kann in Tabelle 4.2 nachvollzogen werden.

Tabelle 4.2: Färbeprotokoll Fontana Masson Färbung

Schritt	Reagenz	Inkubationsdauer [min]
Inkubation mit Silbernitrat	Fontana Silbernitratlösung	240
Waschen 3x	VE-Wasser	5
Tönen	0,2 % Goldchloridlösung	1
Waschen	VE-Wasser	5
Fixierung	2 % Natriumthiosulfatlösung	1
Waschen	VE-Wasser	5
Übersichtsfärbung	1 % Eosinlösung	5
Waschen 2x	VE-Wasser	5
Entwässerung	70 % Ethanol	15
	80 % Ethanol	15
	96 % Ethanol	15
	Xylol	15

4.2.5 Automatisierte Immunfluoreszenz

Für die Untersuchungen mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden Gefrierdünnsschnitte, wie in 4.2 beschrieben, verwendet. Die Färbungen wurden am Dako Autostainer Plus mit dem folgenden Färbeprotokoll (siehe Tabelle 4.3) durchgeführt.

Die gefärbten Schnitte wurden anschließend mit Eindeckmedium und Deckglas versehen, wobei die Aushärtung im Dunkeln über Nacht erfolgte. Im Anschluss wurden Bilder der Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop KEYENCE angefertigt und mit dem Programm BZ II Viewer bearbeitet.

Tabelle 4.3: Immunfluoreszenz-Färbeprotokoll am Dako Autostainer Plus

Schritt	Reagenz	Inkubationsdauer [min]
Blockierung	BSA-Block + 5 % Ziegen Nullserum	60
Primärantikörper	Siehe Tabelle 3.13 (in Low Cross Buffer)	60
Waschschrift I	BSA-Block + 5 % Ziegen Nullserum	5
Waschschrift II	BSA-Block + 5 % Ziegen Nullserum	5
Sekundärantikörper	Siehe Tabelle 3.14 (in Low Cross Buffer)	60
Waschschrift III	BSA-Block + 5 % Ziegen Nullserum	5
Kernfärbung	DAPI	1

Nach jeder Inkubation folgte ein Waschschrift mit PBS

4.3 Zellbiologische Methoden

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer mit laminarem Luftstrom betriebenen Sterilwerkbank durchgeführt. Sowohl die benötigten Verbrauchsmaterialien als auch Medien und Lösungen waren gebrauchsfertig in einem sterilen Zustand oder wurden autoklaviert.

4.3.1 Kultivierung der Zellen

Melanozyten und Mastzellen (HMC1) wurden bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei einer Begasung von 7 % CO₂ kultiviert.

Bei den verwendeten Melanozyten handelt es sich um isolierte primäre Melanozyten aus Hautbiopsien, welche in 175 cm² Zellkulturflaschen mit 30 ml Melanin Growth Medium (MGM) (vgl. Tabelle 3.10) kultiviert wurden. Die Kultivierung der HMC1-Zellen erfolgte in 645 ml Suspensionskulturflächen mit 50 ml Mastzellmedium (IMDM+) (vgl. Tabelle 3.11). Zweimal wöchentlich wurde ein Medienwechsel mit vorgewärmtem Medium vorgenommen.

4.3.2 Passagieren der Melanozyten

Auf Grund von Expansion oder für verschiedene Versuche müssen Zellen in neue Zellkulturgefäße oder in Loch-Platten ausgesät werden. Adhärent wachsende Zellen, zu denen Melanozyten zählen, müssen dafür von der Kulturgefäßoberfläche mittels enzymatischen Verdaus abgelöst werden. Dieser Vorgang wird Passagieren genannt. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um das restliche fetale Kälberserum (FCS) zu entfernen. Nach 3 min Inkubation mit Trypsin bei 37 °C wurden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Oberfläche gelöst und in Stopp-Lösung (Tabelle 3.9) aufgenommen. Die in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführte Zellsuspension wurde für 5 min bei 1.300 g zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Verwendete Volumina für die Arbeitsschritte des Passagierens einer 175 cm² Gewebekulturflasche sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Anschließend wurden die Zellen in neue Kulturgefäße ausgesät und wie in 4.3.1 beschrieben kultiviert. War eine definierte Zellzahlaussaat nötig, wurde eine Zellzahlbestimmung (siehe 4.3.3) durchgeführt.

Tabelle 4.4: Verwendete Volumina für das Passagieren von Melanozyten aus einem 175 cm² Kulturgefäß

Schritt	Reagenz	Volumen [ml]
Waschen	PBS	15
Trypsinieren	Trypsin	4
Inhibieren des Trypsins	Stopp-Lösung	21
Resuspendieren	MGM	5 ⁽¹⁾
⁽¹⁾ abhängig von der weiteren Verwendung		

Tabelle 4.5: Verwendete Volumina für das Trypsinieren von Melanozyten aus 6-Loch-Platten

Schritt	Reagenz	Volumen pro Well [ml]
Waschen	PBS	2
Trypsinieren	Trypsin	0,1
Inhibieren des Trypsins	Stopp-Lösung	0,6

4.3.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung stand ein System von ChemoMetec zur Verfügung. Dafür wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Lysepuffer und 50 µl Stabilisierungspuffer versetzt. Der Lysepuffer ermöglicht das Durchdringen der Plasmamembran, damit der Zellkern mit dem sich in der NucleoCassette befindenden Promidiumjodid (PI) gefärbt werden kann. Außerdem wirkt der Lysepuffer der Aggregation von Zellaggregaten entgegen. Der Einsatz des Stabilisierungspuffers hebt den pH-Wert der Lösung an und bewirkt somit eine effektivere Färbung des Zellkerns. Etwa 50 µl des stabilisierten Lysats wurden in die NucleoCassette eingesaugt und die Kassette im Auswertegerät NucleoCounter platziert. Auf dem Display des NucleoCounters wurde das Ergebnis in Zellzahl pro ml ausgegeben. Für die Berechnung der tatsächlichen Zellzahl pro ml musste die Verdünnung mit dem Lyse- und Stabilisierungspuffer berücksichtigt werden.

4.3.4 Vitalitätsbestimmung

Zur Vitalitätsbestimmung wurde ein Laktatdehydrogenase (LDH) - Assay (Cytotoxicity Detection Kit, Roche) durchgeführt. Laktatdehydrogenase wurde im Kulturüberstand bestimmt. Der entnommene Zellkulturüberstand wurde für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Jeweils 50 µl der Probe wurde in Doppelbestimmung in einer 96-Loch-Platte ausplattiert und mit 50 µl Reaktionslösung versetzt. Die Reaktionslösung besteht aus Katalysator- und Färbelösung (vgl. Tabelle 3.12) in einer 1:45 Verdünnung. Der Ansatz wurde bei RT auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Nach 20 min wurde die 96-Loch-Platte mit dem Spektralphotometer Safire² bei einer Wellenlänge von 490 nm vermessen. Zusätzlich wurde eine Referenzmessung bei 620 nm durchgeführt, dessen resultierende Absorption von der bei 490 nm gemessenen Absorption abgezogen wurde. Als Leerwert diente das jeweils verwendete Medium, welches wie die zu vermessende Probe behandelt wurde.

4.4 Inkubation mit konditionierten HMC1-Medium und Substanzen

4.4.1 Mastzellstimulierung und Ernte des konditionierten Mediums

Die, wie in 4.3.1 beschrieben, kultivierten Mastzellen wurden mit Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.300 g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 2 ml IMDM+ resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung (vgl. 4.3.3) wurden 350.000 Zellen pro Well in 6-Loch-Platten mit jeweils 4 ml IMDM+ ausgesät. Die Stimulierung der Mastzellen erfolgte 24 h nach Aussaat. Dafür wurden die zu stimulierenden Substanzen zu den HMC1-Zellen gegeben (siehe Abbildung 4.6) und bei 37 °C, 7 % CO₂ für 30 min inkubiert. Mittels eines Zentrifugationsschrittes bei 4.000 g für 10 min wurden die Zellen vom konditionierten Medium getrennt.

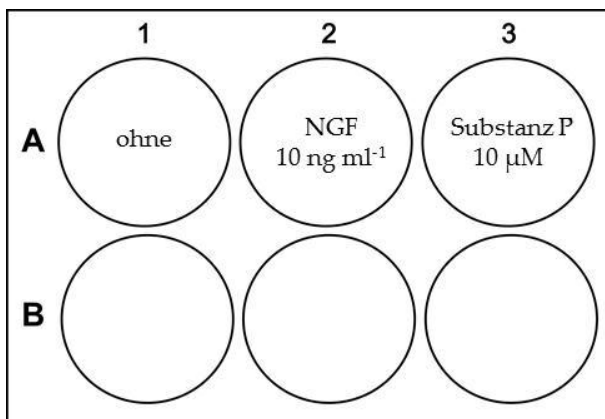


Abbildung 4.6: Versuchsaufbau zur Stimulierung von HMC1-Zellen

Die Stimulierung der Mastzelllinie HMC1 erfolgte in einer 6-Loch Platte für 30 min bei 37 °C. In 4 ml Medium wurden 350.000 Mastzellen ausgesät und nach 24 h mit 10 ng ml⁻¹ NGF und 10 μM Substanz P behandelt. Anschließend wurden die Kulturüberstände für die Behandlung von Melanozyten verwendet. A1) HMC1 ohne Zusatz von stimulierenden Substanzen dient als Kontrolle. A2) Dem Ansatz wurden 10 ng ml⁻¹ Nerve Growth Factor (NGF) zugegeben. A3) Zugabe von 10 μM Substanz P (SP).

4.4.2 Melanozytenbehandlung mit konditionierten Medium und synthetischen Substanzen

Für den Versuchsansatz wurden je 250.000 Melanozyten pro Well mit 2,5 ml MGM ausgesät. Drei Tage später wurde jedem Well 0,5 ml Überstand entnommen und mit 1 ml des konditionierten HMC1-Mediums oder der Substanz (in IMDM+ gelöst) beschickt. Der Versuchsaufbau und eingesetzte Konzentrationen sind in Abbildung 4.7 aufgeführt. Es folgte eine Inkubation von 4 d. Morphologische Veränderungen

wurden mit einer Digitalkamera von Canon mit Hilfe eines am Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) angebrachten Adapters (Soligor, Zeiss) dokumentiert.

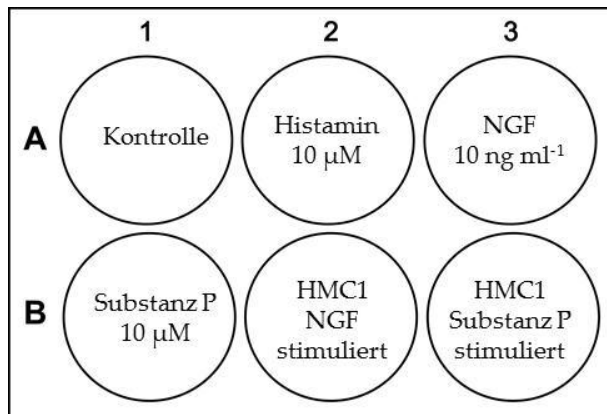


Abbildung 4.7: Versuchsaufbau für die Behandlung von Melanozyten mit konditioniertem HMC1-Medium und Substanzen

Über eine Dauer von 4 d wurden Melanozyten mit unterschiedlichen synthetischen Substanzen und konditionierten HMC1-Medium inkubiert (n=3). A1) Zugabe von unkonditioniertem Mastzellmedium (IMDM+) dient als Kontrolle. A2) Zugabe von 10 µM synthetisches Histamin in IMDM+. A3) Zugabe von 10 ng ml⁻¹ synthetisches NGF in IMDM+. B1) Zugabe von 10 µM synthetisches Substanz P in IMDM+. B2) HMC1 Kulturüberstand mit vorausgegangener Stimulierung mittels 10 ng ml⁻¹ NGF. B3) Zugabe von HMC1 Kulturüberstand nach Stimulierung mit 10 µM Substanz P.

4.5 Bestimmung von Histamin in Zellkulturüberständen

Mit Hilfe des Histamin ELISA von GenWay wurde gemäß den Herstellerangaben die Konzentration von Histamin in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Vermessung erfolgte mit dem Safire² bei einer Wellenlänge von 450 nm. Zusätzlich wurde eine Referenzmessung bei 620 nm durchgeführt, dessen resultierende Absorption von der bei 450 nm gemessenen Absorption abgezogen wurde.

4.6 Ermittlung des Melaningehalts

In zellbiologischen Versuchen wurde der Melaningehalt mittels einer Absorptionsmessung bestimmt. Für die Quantifizierung von Melanin in histologischen Schnitten fand die Bildauswertesoftware ImageJ Verwendung.

4.6.1 Bestimmung des Melaningehalts in histologischen Schnitten

Mit der Fontana Masson Methode gefärbte Gefrierdünnschnitte (siehe 4.2.4) wurden mit dem Mikroskop MiraxScanner digitalisiert und anschließend mit den Bildbearbeitungsprogrammen PanoramicViewer und ImageJ Mosaikbilder generiert. Die Mosaikbilder wurden bei 20-facher Vergrößerung erstellt und

umfassen eine Größe von ca. 1.550 μm Breite und 550 μm Höhe des Gefrierschnittes in realen Maßen. Auf diese Weise wurde je ein repräsentatives Mosaikbild pro Hautdünnschnitt angefertigt. Jeder Objektträger war mit drei Hautdünnschnitten versehen, sodass der Auswertung drei Ergebnisse für den gleichen Behandlungszustand zu Grunde lagen.

4.6.1.1 Quantifizierung mittels ImageJ

Die generierten Mosaikbilder (vgl. 4.6.1) wurden in ImageJ geladen. Mittels einer Polygonfunktion wurde der auszuwertende Bereich (ROI) festgelegt. Für diesen Bereich wurde ein Schwellwert (Threshold) gewählt, sodass das Melanin markiert ist. Um die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Bildern gewährleisten zu können, musste ein einheitlicher Schwellwert gewählt werden.

Das Schwellwertverfahren dient der Segmentierung (Gruppierung von Pixeln) digitaler Bilder. Dabei werden Pixel verschiedenen Segmenten zugeordnet. Mit Hilfe des Abgleichs eines Schwellwertes kann die Zugehörigkeit zu einem Segment entschieden werden. Als Schwellwert dient dieser Auswertung der Grauwert. Voraussetzung dafür ist ein binäres Bild. Der Grauwert eines Pixels ist sein reiner Helligkeitswert. Andere Farbinformationen werden dabei nicht berücksichtigt.

Die erhaltenen Ergebnisse für Flächen der ROI, markierte Fläche in % und Länge der Epidermis wurden in Excel importiert und standen der Auswertung mit Pivot-Tabellen zur Verfügung. In Abbildung 4.8 können die Arbeitsschritte für die Melaninquantifizierung nachvollzogen werden.

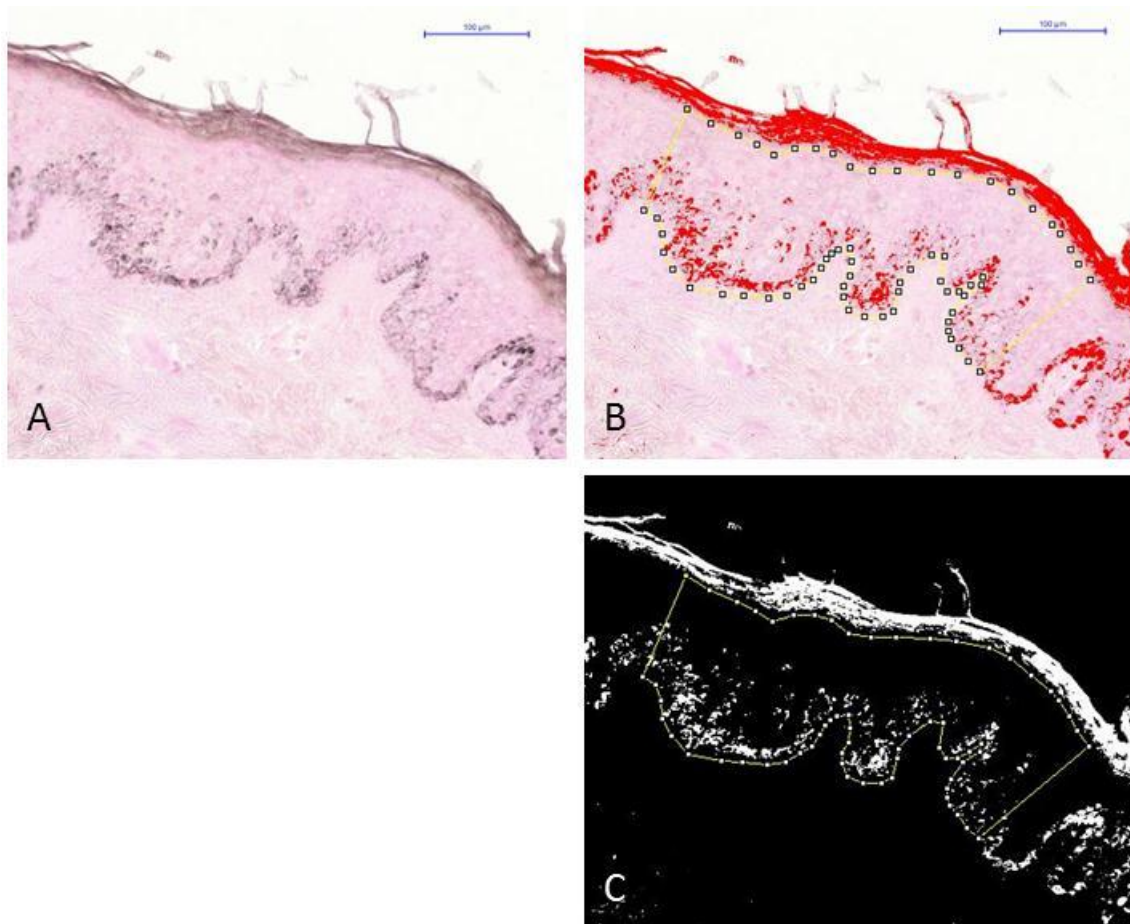


Abbildung 4.8: Melaninquantifizierung mit ImageJ an Fontana Masson gefärbten Hautschnitten

A) Hautdünnschnitt mit Fontana Masson Färbemethode gefärbt. B) Die zu quantifizierende Fläche (ROI, gelbe Linie) wurde mit einem Polygonenzug per Hand festgelegt. Durch das Setzen eines Schwellwertes erscheinen die schwellwertüberschreitenden Bildpunkte rot. C) Ein binäres Bild wurde generiert, um das Schwellwertverfahren anwenden zu können. (Vergrößerung 20-fach, Balken entspricht 100 µm).

4.6.2 Ermittlung des Melaningehalts in kultivierten Melanozyten und Kulturüberständen

Das in Melanozyten produzierte Melanin absorbiert Licht. Dieser Eigenschaft wird sich bei der photometrischen Quantifizierung von Melanin bedient. Von den Melanozyten abgegebenes Melanin kann in den Kulturüberständen ermittelt werden. Dafür wurden die Melanozytenkulturüberstände für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert und wie in 4.6.2.1 beschrieben die Absorption gemessen. Als Leerwert wurde das jeweils verwendete Medium verwendet.

Für die Bestimmung des Melaningehalts in den Melanozyten mussten die Zellen zunächst trypsiniert (siehe Tabelle 4.5) und in Stopp-Lösung aufgenommen werden. Nach einer Zellzahlbestimmung (siehe 4.3.3) wurden gleiche Zellzahlen der

unterschiedlich behandelten Ansätze in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und bei 5.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 200 µl 7,5 M NaOH aufgekocht. Nach vierstündiger Inkubation bei 99 °C auf dem Laborschüttler mit 750 rpm wurden die Mikroreaktionsgefäße abgekühlt. Anschließend wurde zu jeder Probe 150 µl Cyclohexan gegeben. Nach guter Durchmischung folgten 10 min Inkubation bei RT. Durch Zentrifugation bei 4 °C, 5.000 g für 10 min wurden die Phasen getrennt. Das in NaOH gelöste Melanin wurde der unteren Phase entnommen und der Absorptionsmessung zugeführt. Als Leerwert für die Quantifizierung von Melanin in den Melanozyten diente 7,5 M NaOH-Lösung.

4.6.2.1 Absorptionsmessung

Die Absorptionsmessung wurde in 96-Loch-Platten mit dem Safire² vermessen. Dafür wurde ein Wellenlängenscan im Bereich von 280 – 500 nm in 10 nm Schritten aufgenommen. Im Bereich von 320 – 400 nm Wellenlänge erfolgte eine Mittelwertbildung, die auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrolle bezogen wurde.

Für die Messung der Überstände wurden 250 µl Probe für eine Doppelbestimmung in 96-Loch-Platten ausplattiert. Eine Doppelbestimmung des aus den Melanozyten extrahierten Melanins war auf Grund sehr geringer Probenmengen nicht möglich. Für die Quantifizierung wurden in diesem Fall je 150 µl des in NaOH gelösten Melanins pro Ansatz vermessen. Synthetisches Melanin wurde für die Anfertigung einer Standardreihe verwendet.

4.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei verbundenen Stichproben verwendet. Dieser nichtparametrische Vorzeichentest ist eine Alternative zum t-Test bei verbundenen Stichproben. Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Testes ist, dass es sich bei den Daten um zusammengehörige Paare handelt. Anders als beim t-Test bei verbundenen Stichproben wird hier nicht angenommen, dass die Grundgesamtheit normalverteilt

ist. Bei einer zweifelhaften Normalverteilung wird der Vorzeichentest bei verbundenen Stichproben anstatt des t-Test bei verbundenen Stichproben angewandt.

Statistische Größen, wie das arithmetische Mittel und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel unter Zuhilfenahme von Pivot-Tabellen, um große Datenmengen übersichtlicher auszuwerten zu können, berechnet. Die Anwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests bei verbundenen Stichproben wurde mit dem Statistikprogramm Statistika durchgeführt.

Es wurden folgende Signifikanzniveaus (p) definiert:

- (***) $p \leq 0,001$ = höchst signifikant
- (**) $p \leq 0,01$ = sehr signifikant
- (*) $p \leq 0,05$ = signifikant
- n.s. $p > 0,05$ = nicht signifikant

5 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt werden Ergebnisse zu UV-induzierter Pigmentierung vorgestellt. Dabei werden die Melaninbildung, Melanogeneseaktivität und morphologische Veränderungen näher charakterisiert. Zusätzlich wird auf die Entstehung eines dermalen Infiltrats in UV-induzierten pigmentierten Arealen eingegangen. Der nächste Abschnitt beschäftigt sich mit der genaueren Charakterisierung des Immunzellstatus in Saugblasen induzierter Hyperpigmentierung. Zudem wird die Verteilung und Lokalisation von Immunzellen dargestellt. Abschließend werden Ergebnisse präsentiert, die die Responsivität von Melanozyten infolge von der Inkubation mit Mastzell-konditionierten Medium und synthetischen Substanzen beinhalten.

Die experimentellen Bedingungen sind in den Kapiteln 3 Material und 4 Methoden beschrieben. Bei Abweichungen wird im Einzelnen darauf hingewiesen.

5.1 Melaninbildung bei UV-induzierter Pigmentierung

5.1.1 Melaninneubildung nach repetitiver und folgender 1,5-facher erythemalen Bestrahlung

Um pigmentierungsrelevante Fragestellungen untersuchen zu können, wurde mittels UV-Exposition eine Bräune induziert. Die Vorbehandlung mit 10 repetitiven Bestrahlungen bei unterschiedlichen UV-Wellenlängen (vgl. 4.1.2) bietet die Möglichkeit, den Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsarten auf die Melaninneubildung untersuchen zu können. Der nachfolgend gesetzte UV-Reiz von 1,5 MED SSR lässt Rückschlüsse auf etwaig ausgebildete Schutzfunktionen zu, die durch die jeweiligen Vorbehandlungen induziert wurden.

Für die folgenden Ergebnisse wurden Hautdünnschnitte von 8 Probanden (Hauttyp II bis III) mit der Fontana Masson Methode gefärbt und wie in 4.6.1 beschrieben quantifiziert. Damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist, wird das als relative Fläche der ROI quantifizierte Melanin auf die Epidermislänge relativiert. Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in Abbildung 5.1 dargestellt.

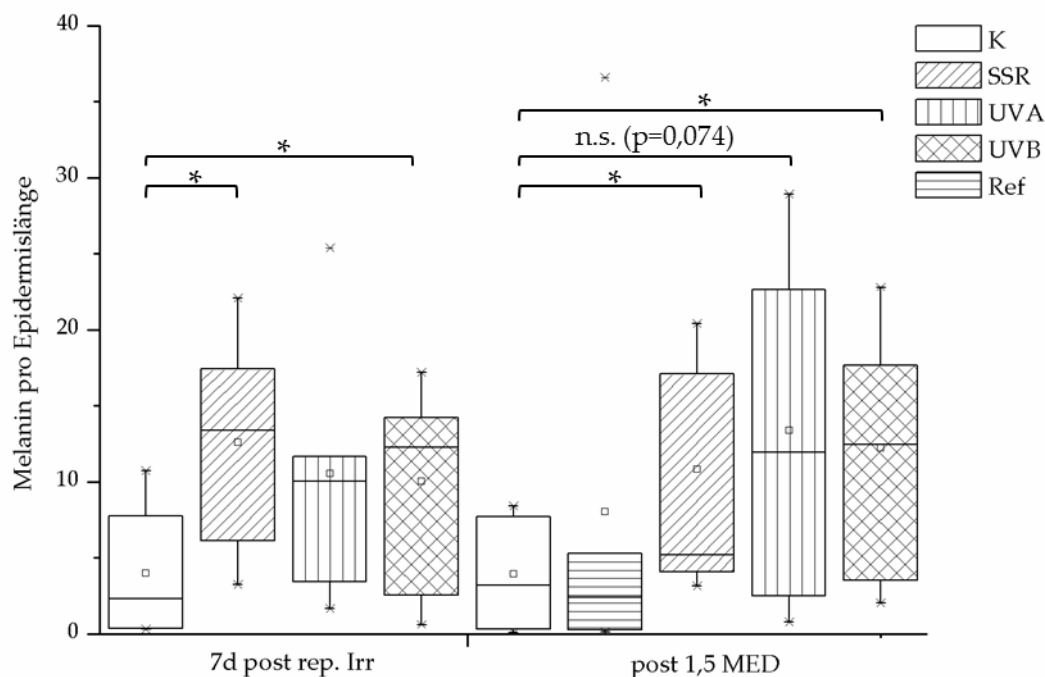


Abbildung 5.1: Neusynthese von Melanin nach repetitiver Bestrahlung und 1,5 MED SSR

Histologische Proben ($n=8$) der UV-Studie wurden mittels Fontana Masson gefärbt, digitalisiert und mit dem Auswerteprogramm ImageJ quantifiziert. Für die Datenerhebung wurden für jede Behandlung zu jedem der angegebenen Zeitpunkte 3 Hautdünnschnitte eines jeden Probanden ausgewertet. Aus den individuellen Mittelwerten der Probanden wurden die dargestellten Ergebnisse generiert. Die Box umfasst 25-75 % der Ergebnismenge. Das arithmetische Mittel ist durch ein kleines Quadrat und der Median durch eine Querlinie dargestellt. Minimum und Maximum werden mittels eines Kreuzes abgebildet und direkt mit der Box verbunden. Als Ausreißer ermittelte Datenpunkte, sind durch die fehlende Verbindung zur Box zu erkennen.

Eine repetitive Bestrahlung führt bei allen drei Bestrahlungsarten zu einer Neusynthese von Melanin. Wobei es sich bei der Bestrahlung mit SSR und UVB um signifikante Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle, handelt. Eine durchschnittliche Steigerung von 200 % wird bei der Bestrahlung mit SSR und eine Neusynthese von 150 % bei UVB-Bestrahlung ermittelt. Bezüglich des Melaningehalts sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Bestrahlungsarten nachweisbar. Nach der 1,5-fachen erythemalen Bestrahlung wird keine deutliche Melaninzunahme in den vorbehandelten Arealen erfasst. Für das Referenzareal, welches keiner Vorbehandlung unterzogen wurde, kann eine Neusynthese von durchschnittlich 100 % ermittelt werden. Die vorliegenden Ergebnisse unterliegen starken Streuungen, welche auf unterschiedliche Ursachen

zurückzuführen sind. In Abbildung 5.2 sind exemplarisch gefärbte Hautdünnschnitte abgebildet, um auf einige Ursachen näher eingehen zu können.

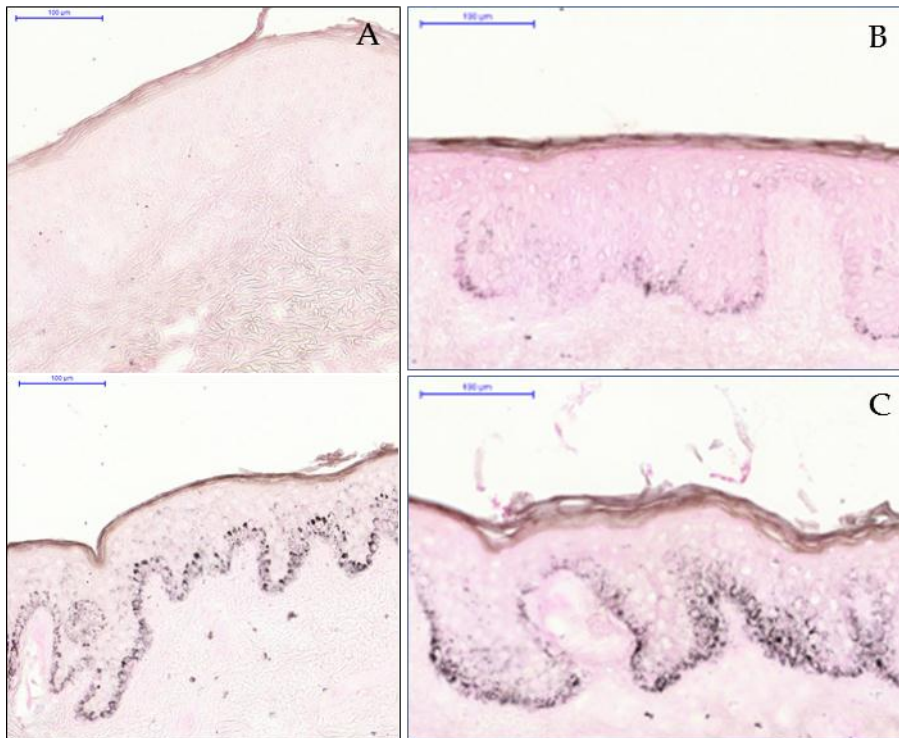


Abbildung 5.2: Unterschiedliche Melaninverteilung in der Epidermis als Ursache für starke Streuung der Ergebnisse

Hautdünnschnitte von 5 µm Dicke wurden mit Fontana Masson gefärbt. Als Übersichtsfärbung wurde Eosin verwendet. Die Balken entsprechen 100 µm. A) Unterschiedlich ausgeprägte Grundbräune: Ausschnitte von Kontrollarealen unterschiedlicher Probanden. B) Inhomogene Verteilung des Melanins und unterschiedliche Packungsdichte. C) Unterschiedliche Packungsdichte und heterogene Verteilung des Melanins in den Strata.

5.1.2 Vergleich der Melaninneusynthese mit *in vivo* Farbwerten

Die erhobenen Ergebnisse aus der Melaninquantifizierung in Hautdünnschnitten werden mit dem *in vivo* ermittelten Farbwert Melanin-Index (MelInd) verglichen.

Der MelInd ist eine einheitenlose Variable, die eine Messung des Melaningehalts ermöglicht. Die Herleitung des Index basiert auf Methoden, welche von Dawson *et al.* (1980) und Kollias und Baqer (1985) beschrieben werden. Hierbei wird die Steigung des Melaninabsorptionsspektrums mittels Spektrophotometrie gemessen, welche sich proportional zur Melaninkonzentration verhält. Das Prinzip ist die Proportionalität der Absorption zum Logarithmus des inversen Reflexionsgrades. Die resultierende Steigung ist der MelInd.

In Abbildung 5.3 zeigen die durchschnittlichen MelInd einen ähnlichen Verlauf wie die ermittelten Melaningehalte der histologischen Schnitte. Trotz großer Standardabweichungen handelt es sich um signifikante Änderungen bezogen auf die Kontrollmessungen. Korreliert man die zu Grunde liegenden Daten der *in vivo* Messung und der histologischen Quantifizierung miteinander, erhält man einen Korrelationskoeffizienten von 0,85 (Daten nicht gezeigt).

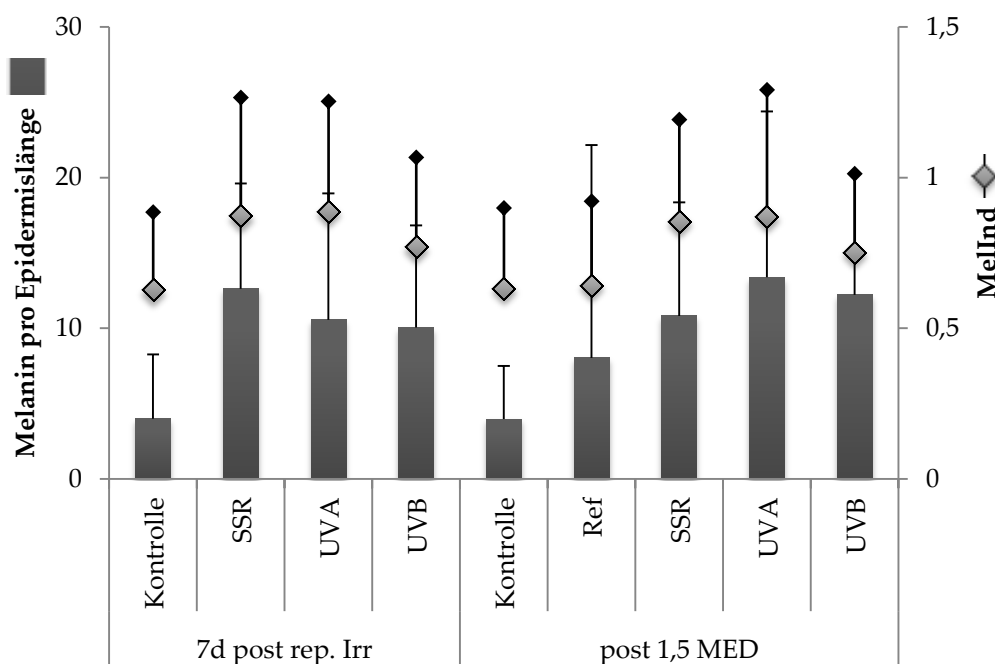


Abbildung 5.3: Gegenüberstellung von MelInd und histologisch quantifiziertem Melanin

Vergleich der *in vivo* Farbmessung mit dem in histologischen Schnitten quantifizierten Melanin pro Epidermislänge. Der MelInd wurde innerhalb der UV-Studie direkt am Probanden (n=8) ermittelt. Bei der Melaninquantifizierung an Hautdünnschnitten wurde sich der Fontana Masson Methode bedient und die Silberniederschläge mittels ImageJ analysiert. Die ermittelten Ergebnisse wurden anschließend auf die Epidermislänge normiert. Abgebildete Fehlerindikatoren beider Datenreihen stellen die Standardabweichung eines jeden Datenpunktes dar.

5.1.3 Erfassung der Melanogeneseaktivität durch TRP1

Das von Melanozyten synthetisierte Tyrosinase-assoziierte-Protein 1 (TRP1, auch TYRP1) dient als Indikator für die Melanogeneseaktivität. Lokalisiert ist das Glykoprotein in der Melanosomenmembran und ist maßgeblich an der Melanogenese beteiligt (vgl. 1.2.2). Ob Unterschiede in der Expression des TRP1 nach repetitiver Bestrahlung mit unterschiedlichen Bestrahlungsarten bestehen, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem spezifischen gegen TRP1 gerichteten Antikörper untersucht. Eine Steigerung der Expression von TRP1 im Vergleich zur

Kontrolle wird als Indiz für eine erhöhte Melanogenese gewertet. In Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 wird die Melanogeneseaktivität der Melaninneubildung zu zwei Zeitpunkten, repräsentativ am Beispiel eines Probanden, gegenübergestellt. Bei den verwendeten Bildern handelt es sich um Ausschnitte der analysierten Schnitte. Zur Quantifizierung wurden größere Flächen herangezogen. Die Melanogeneseaktivität wird durch TRP1 positiv markierte Zellen (TRP1⁺), normiert auf die Fläche, abgebildet. Dem gegenüber steht die Neusynthese von Melanin, welche durch quantifiziertes Melanin, normiert auf die Epidermislänge, ausgedrückt wird.

Sieben Tage nach repetitiver Bestrahlung ist eine deutlich erhöhte Expression von TRP1 in mit SSR, UVA und UVB bestrahlten Arealen, im Vergleich zum unbehandelten Areal, festzustellen. Die Unterschiede in der Anzahl der TRP1 positiven Zellen deckt sich weitgehend mit der ermittelten Melaninmenge pro Epidermislänge. Vergleicht man die unterschiedlichen Bestrahlungsarten miteinander so weisen die mit SSR induzierten Areale sowohl eine höhere Melaninneusynthese als auch eine höhere Melanogeneseaktivität auf.

Auch nach der Bestrahlung mit 1,5 MED wird in allen Fällen eine signifikante Steigerung der TRP1-Expression im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Ein deutlicher Unterschied in der Intensität zwischen den beiden Zeitpunkten kann nicht festgestellt werden. Lediglich das mit SSR vorbehandelte Areal zeigt nach der Induktion mit 1,5 MED eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich zu der Probe 7 Tage nach zehntägiger repetitiver Bestrahlung.

Diese Ergebnisse lassen sich in ähnlicher Form bei zwei weiteren Probanden beobachten (n=3).

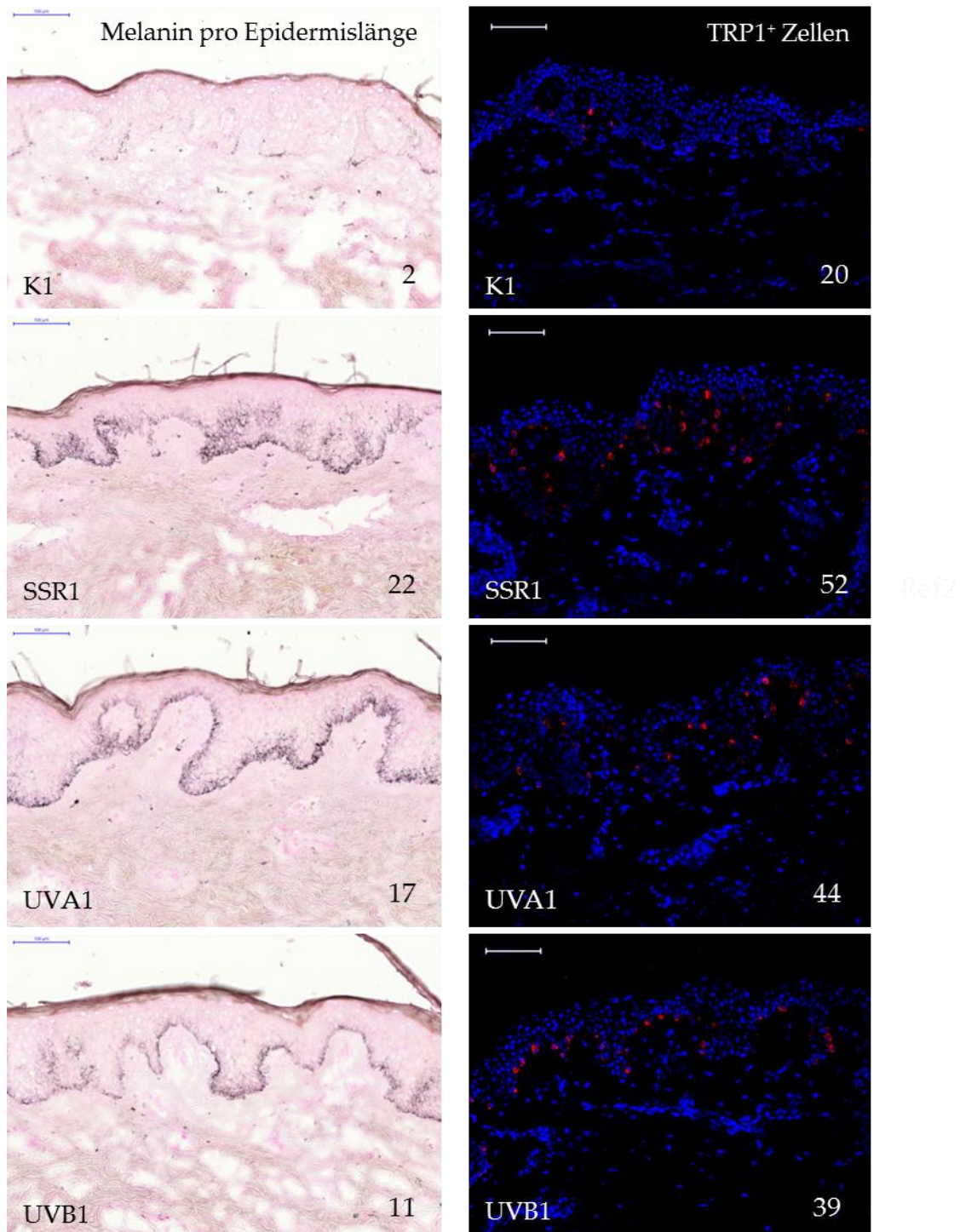


Abbildung 5.4: Gegenüberstellung von Melaninnesynthese und Melanogeneseaktivität 7 Tage nach repetitiver Bestrahlung

Die Hautareale wurden 10 Tage repetitiv mit sonnensimuliertem Licht (SSR), UVA und UVB bestrahlt. Nach 7 Tagen (t1) wurden Biopsien entnommen und 5 µm Gefrierdünnschnitte angefertigt. Auf der linken Seite sind FM-Färbungen dargestellt, deren ermittelter Melaninergehalt pro Epidermislänge in der rechten unteren Bildecke vermerkt ist. Rechts sind Immunfluoreszenzfärbungen gegen TRP1 aufgeführt. In den unteren rechten Bildecken ist die Anzahl an TRP1-positiven Zellen (normiert auf die Fläche) angegeben. Die Schnitte wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) sowie mit einem Antikörper gegen das in der Melanosomenmembran lokalisierte TRP1 (rot) fluoreszenzmarkiert. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 546 verwendet. Es sind exemplarisch Schnitte, in 20-facher Vergrößerung, eines Spenders dargestellt. Die Balken entsprechen 100 µm.

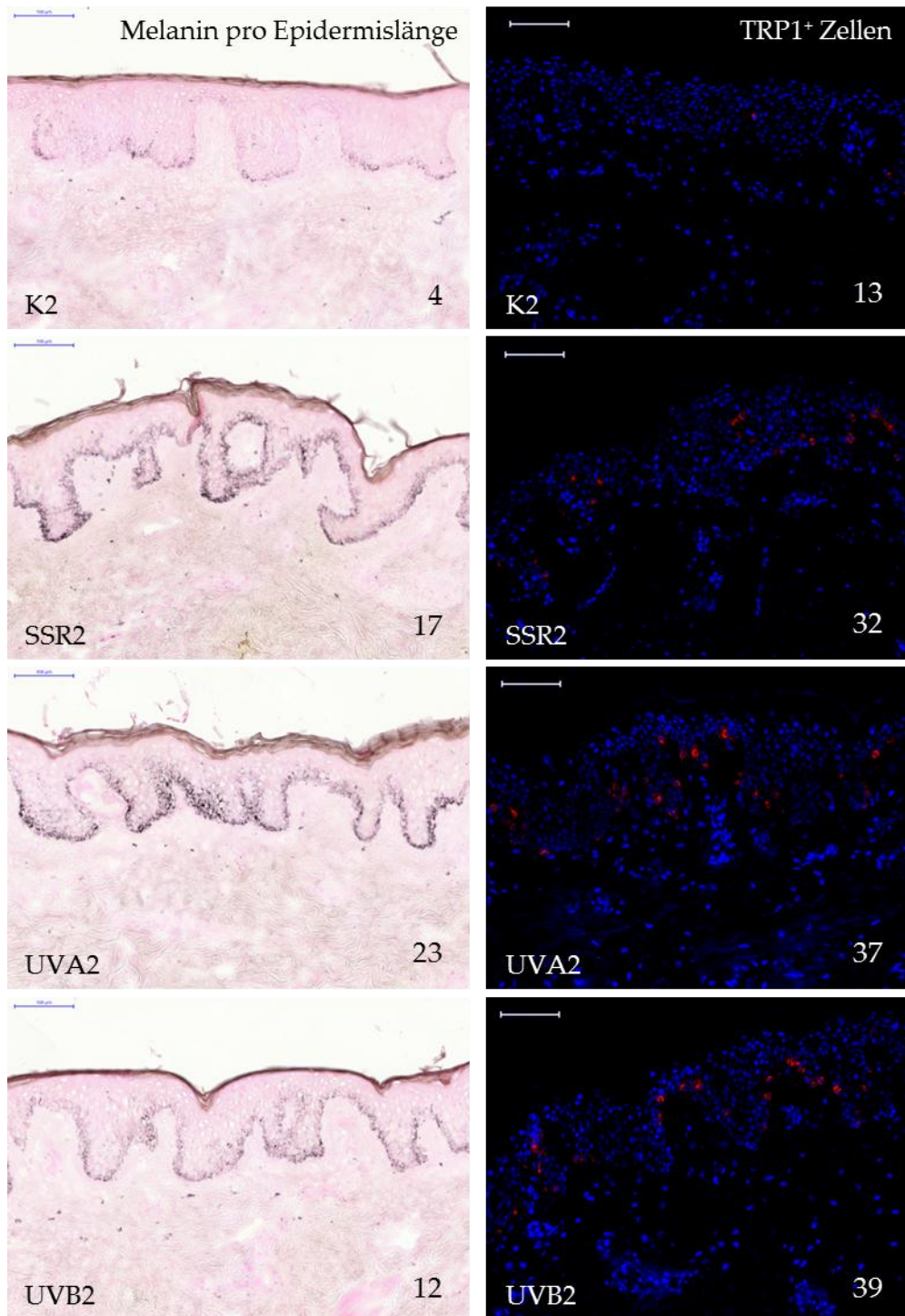


Abbildung 5.5: Gegenüberstellung von Melaninnesynthese und Melanogeneseaktivität nach 1,5 MED SSR

Zehn Tage nach repetitiver Bestrahlung (t2) wurden die vorbehandelten Areale mit 1,5 MED SSR bestrahlt. Aus entnommenen Biopsien wurden 5 µm Gefrierdünnschnitte angefertigt. Auf der linken Seite sind FM-Färbungen dargestellt, dessen ermittelter Melanin Gehalt pro Epidermislänge in der rechten unteren Bildecke vermerkt ist. Rechts sind Immunfluoreszenzfärbungen gegen TRP1 aufgeführt. In den unteren rechten Bildecken ist die Anzahl an TRP1 positiven Zellen (normiert auf die Fläche) angegeben. Die Schnitte wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) sowie mit einem Antikörper gegen das in der Melanosomenmembran lokalisierte TRP1 (rot) fluoreszenzmarkiert. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 546 verwendet. Es sind exemplarisch Schnitte, in 20-facher Vergrößerung, eines Spenders dargestellt. Die Balken entsprechen 100 µm Länge.

5.2 Morphologische Untersuchung UV-induzierter Pigmentierung

In Beiersdorf internen Untersuchungen zu Saugblasen induzierter Hyperpigmentierung wurden eine Verdickung und eine stärkere Verzäpfung der Epidermis beobachtet. Ob diese morphologischen Veränderungen auch bei UV-induzierter Pigmentierung auftreten, wird im folgenden Abschnitt untersucht.

5.2.1 Charakterisierung der Hyperplasie und Verzäpfungsgrad

Anhand der generierten Bilder zur Melaninquantifizierung (Fontana Masson Färbung) wurden Vermessungen der Epidermis durchgeführt (n=8). Mit Hilfe der Software ImageJ wurden die Epidermislänge, Basalzellschichtlänge und die Epidermisdicke ermittelt. Der Verzäpfungsgrad wurde durch die Bildung des Verhältnisses von Basalzellschichtlänge und Epidermislänge bestimmt.

In allen repetitiv bestrahlten Arealen wird eine erhöhte, mittlere Epidermisdicke nachgewiesen, die den Rückschluss auf eine Hyperplasie erlaubt (siehe Abbildung 5.6). Nach der Bestrahlung mit 1,5 MED SSR kommt es zu einer zusätzlichen Verdickungen bei mit SSR und UVA vorbehandelten Arealen.

Im Vergleich mit den Hautdünnschnitten der Kontrolle können keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ermittelten Verzäpfungsgrades zu den UV-induzierten Proben nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

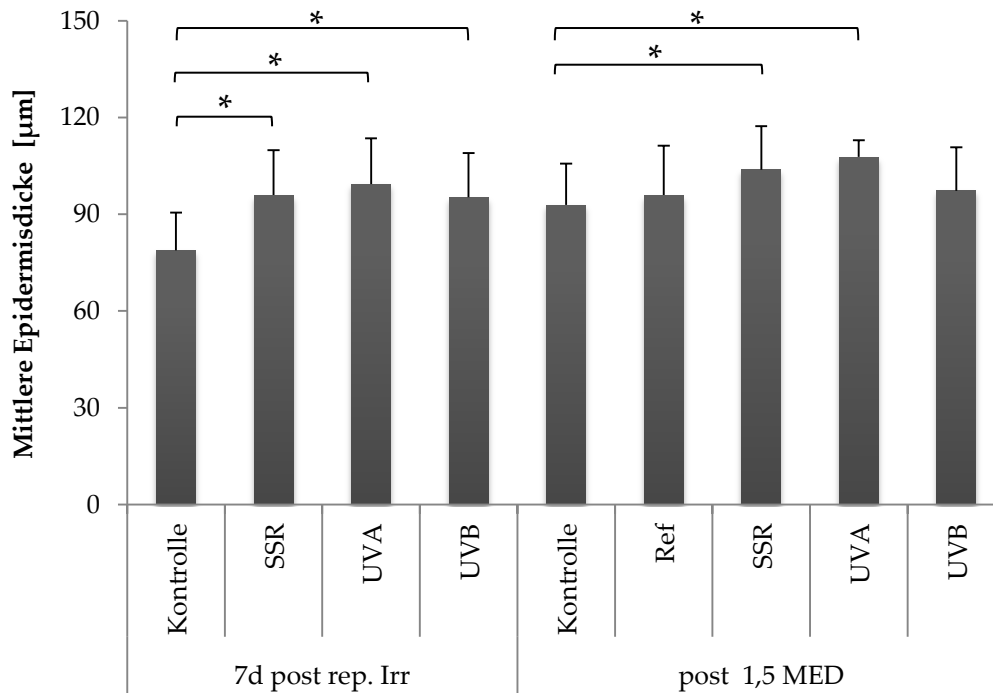


Abbildung 5.6: Entwicklung der mittleren Epidermisdicke bei UV-induzierter Pigmentierung

Grundlage für die Ermittlung der Epidermisdicke waren Fontana Masson gefärbte Hautdünnschnitte der UV-Studie. Es wurde die mittlere Epidermisdicke von 8 Probanden bestimmt und das arithmetische Mittel in Form von Balken dargestellt. Die Fehlerindikatoren stellen die ermittelte Standardabweichung der Mittelwerte dar.

5.3 Immunzellstatus in UV-induzierten hyperpigmentierten Hautarealen

In hyperpigmentierten Hautpartien, durch das Ziehen von Saugblasen induziert, wurde das Auftreten eines dermalen Infiltrats über einen Zeitraum von bis zu 16 Wochen nach SB-Exzision beobachtet. Dabei waren sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl CD45 positiver Zellen (CD45⁺) und CD14 positiver Zellen (CD14⁺) erhöht (Beiersdorf interne Untersuchungen; Daten nicht gezeigt). In den folgenden Nachweisen werden die durch UV-Exposition behandelten Hautareale auf dieses Phänomen hin untersucht. Daraus resultierende Ergebnisse ermöglichen Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Pigmentierung und Entzündungsreaktionen und lassen einen Vergleich zwischen unterschiedlich induzierten Pigmentierungen zu.

Für die Untersuchungen wurden Gefrierdünnschnitte der UV-Studie von 8 Probanden (siehe 4.1.2) mit der APAAP Färbemethode (vgl. 4.2.2) immunhistochemisch mit dem entsprechenden Antikörper von Dako (Tabelle 3.13) gefärbt. Anschließend erfolgte die Digitalisierung und Quantifizierung der

Hautdünnschnitte wie in 4.2.3 beschrieben. Nachfolgende angegebene Zellzahlen wurden auf eine Fläche von 1 mm² normiert. Die Quantifizierungsflächen wurden bei identischen Einstellungen mit einer Dermistiefe von 500 µm und unter Ausschluss der Epidermis erstellt (vgl. Abbildung 4.5).

5.3.1 CD45 positive Zellen (CD45⁺)

Das transmembrane Glykoprotein CD45 dient als Marker für verschiedene Leukozytenpopulationen. Die Expression von CD45 erfolgt durch ein am Chromosom 1 kartiertes Gen auf den meisten kernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Durch differentielles Spleißen existieren mehrere Isoformen. Auf humanen Leukozyten wurden fünf verschiedene Isoformen identifiziert (Sewell *et al.*, 1997). Der verwendete Anti-CD45 Marker ist eine Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern, den Klonen 2B11 und PD7/26, die mit allen bekannten Isotypen der CD45-Familie reagieren (Cobbold *et al.*, 1995). B-Zellen exprimieren vor allem die ABC-Form, wobei T-Zellen unterschiedliche Isoformen exprimieren, die ihrer Entwicklungsstufe und Aktivität entsprechen. Monozyten und dendritische Zellen bilden überwiegend und Granulozyten ausschließlich die Isoformen B und 0 aus.

Sieben Tage nach 10-facher repetitiver UV-Exposition bleibt der Anteil an CD45 negativen Zellen (CD45⁻) im Vergleich zum unbestrahlten Areal nahezu konstant. Somit resultiert die Zunahme der Gesamtzellzahl um bis zu 15 % (Abbildung 5.7) allein auf einer Erhöhung CD45⁺ Zellen.

Nach repetitiver Bestrahlung mit UVA und UVB ist die Anzahl CD45⁺ Zellen sehr bis höchst signifikant erhöht (4.7; Abbildung 5.8). In diesen Arealen wird eine Zunahme von 40 % CD45⁺ Zellen ermittelt. Hautpartien, die sonnensimulierten Licht (SSR) ausgesetzt waren, zeigen keine statistisch signifikante Zunahme von CD45⁺ Zellen.

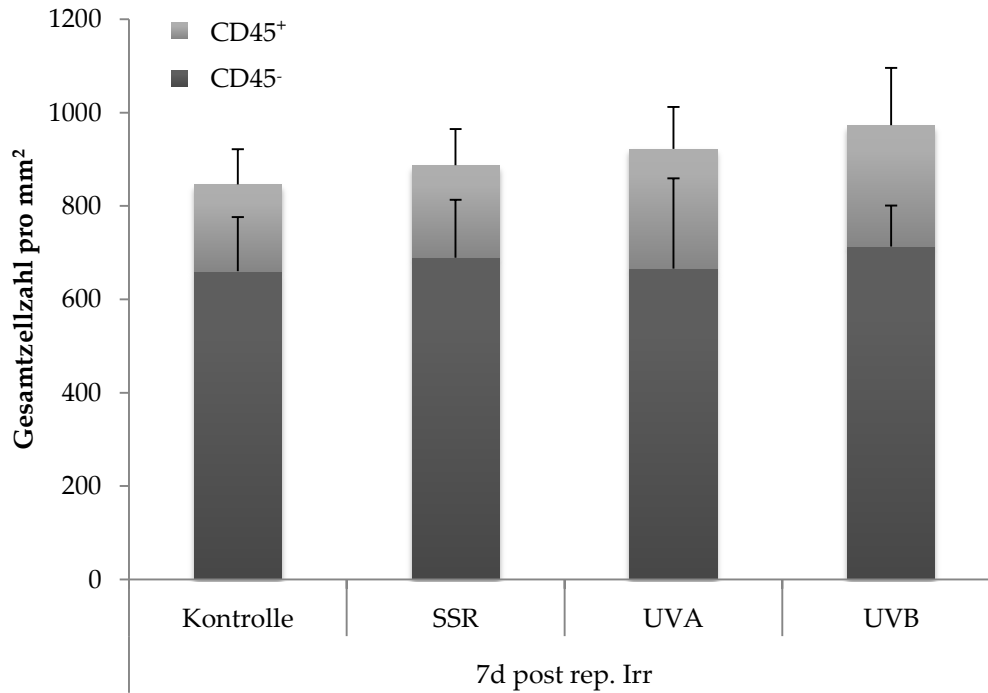


Abbildung 5.7: Gesamtzellzahl nach repetitiver Bestrahlung

Hautareale wurden repetitiv mit SSR, UVA und UVB bestrahlt. Sieben Tage nach der letzten repetitiven Bestrahlung wurden Stanzbiopsien entnommen. Gefrierdünnschnitte der Stanzbiopsien wurden mit der APAAP Methode immunhistochemisch gegen CD45 gefärbt. Die Gesamtzellzahl in den Hautdünnschnitten ergibt sich aus der Summe von CD45 positiven und negativen Zellen. Die aus 8 Probanden ermittelten Mittelwerte wurden durch gestapelte Säulen abgebildet. Der Fehlerindikator stellt die Standardabweichung dar.

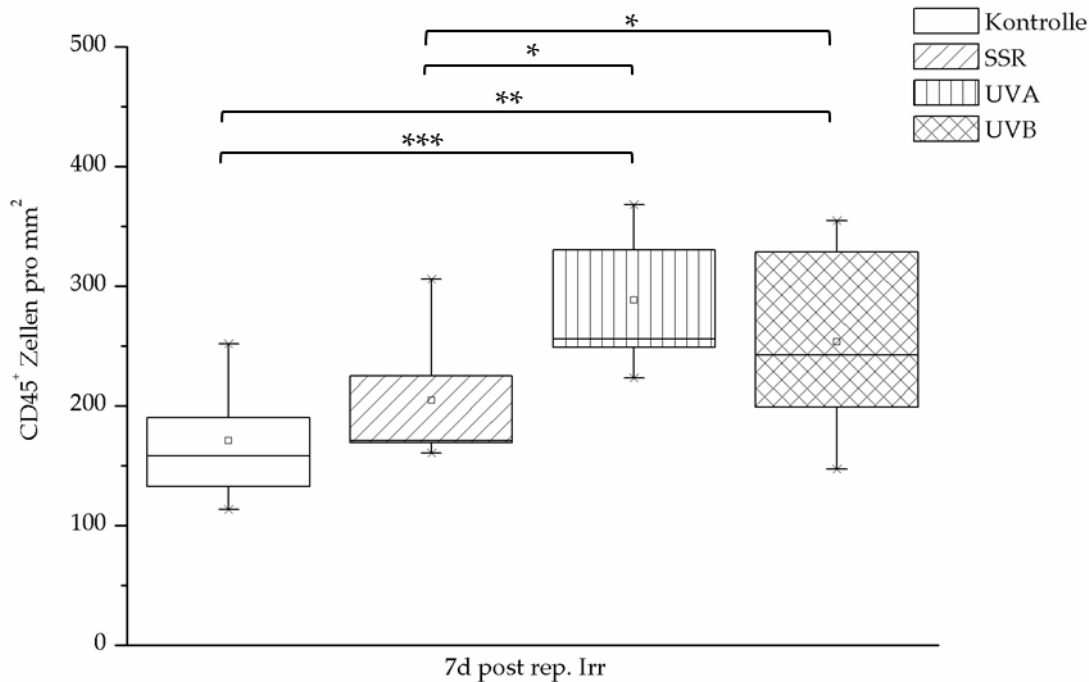


Abbildung 5.8: CD45 positive Zellen nach repetitiver Bestrahlung

Histologische Proben der UV-Studie wurden gegen den Antikörper CD45 immunhistochemisch gefärbt, digitalisiert und mit dem Auswerteprogramm NuclearQuant quantifiziert. Die Untersuchung umfasst Proben von 8 Probanden. Jede Behandlung wurde durch 3 Hautdünnschnitte eines jeden Probanden repräsentiert. Aus den individuellen Mittelwerten der Probanden wurden die dargestellten Ergebnisse generiert. Die Box umfasst 25-75 % der Ergebnismenge. Das arithmetische Mittel ist durch ein kleines Quadrat und der Median durch eine Querlinie abgebildet. Minimum und Maximum sind mittels eines Kreuzes dargestellt und direkt mit der Box verbunden. Als Ausreißer ermittelte Datenpunkte sind durch die fehlende Verbindung zur Box zu erkennen.

In Abbildung 5.9 ist ein gegenläufiger Zusammenhang von Entzündungsreaktion, abgebildet durch CD45⁺ Zellen und Pigmentierung, ausgedrückt durch den Melaninhalt, in SSR behandelten Arealen erkennbar. Im Gegensatz zu den mit UVA/UVB bestrahlten Partien, bei denen eine Steigerung von Melaninhalt und Leukozyten (CD45⁺) in ähnlicher Größenordnung ermittelt wird, steht in SSR bestrahlten Partien eine geringere Entzündungsreaktion einer sehr viel höheren Melaninneusynthese gegenüber.

In Abbildung 5.10 sind exemplarisch mit CD45 Antikörper gefärbte Gefrierdünnschnitte eines Probanden, nach repetitiver Bestrahlung, abgebildet.

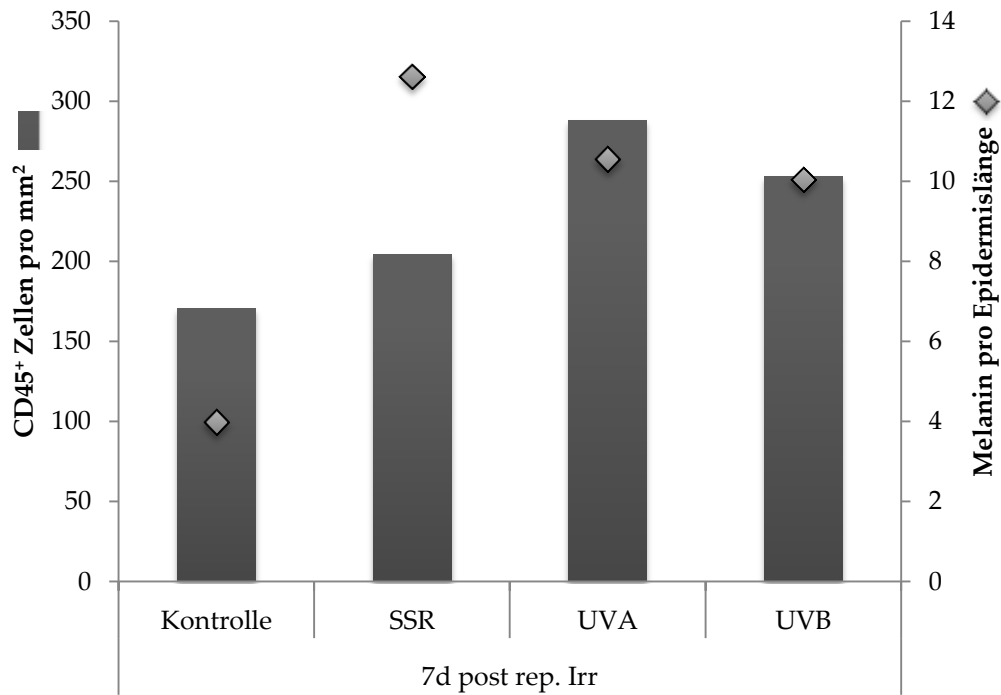


Abbildung 5.9: Vergleich CD45⁺ Zellen mit der Melaninnneubildung nach repetitiver Bestrahlung

Die abgebildeten Resultate basieren auf quantifizierten Hautdünnschnitten von 8 Probanden aus der UV-Studie. Die linke Achse bildet CD45⁺ Zellen, ermittelt durch immunhistochemische Färbung mit dem entsprechenden Antikörper, in Form von Säulen ab. Dem gegenübergestellt ist der Melaningehalt (◇), ermittelt durch Quantifizierung von Fontana Masson gefärbten Schnitten, dessen Werte der rechten Achse entnommen werden können.

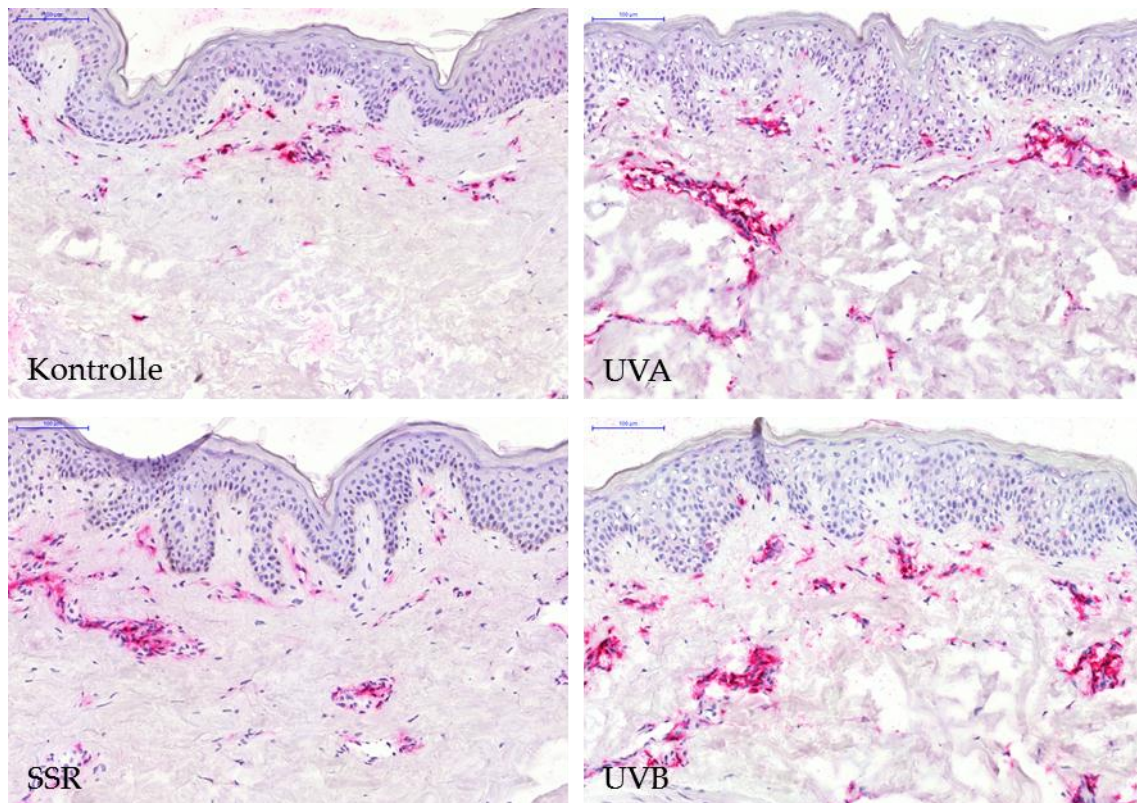


Abbildung 5.10: Exemplarische Färbung CD45⁺ Zellen

Immunhistochemische Färbung mit CD45 Antikörper (Dako) von Gefrierdünnschnitten der UV-Studie. Sieben Tage nach repetitiver Bestrahlung mit SSR, UVA oder UVB. (Vergrößerung 20-fach, Balken entspricht 100 µm)

5.3.2 CD14 positive Zellen (CD14⁺)

Zur näheren Charakterisierung des dermalen entzündlichen Infiltrats wurden immunhistochemische Färbungen gegen das Membranprotein CD14 durchgeführt.

Durch Verknüpfung mit Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) ist das CD14-Molekül in der Zellmembran verankert. Es übernimmt die Funktion eines Rezeptors für Endotoxin und ist an der letalen Reaktion auf Endotoxin und gramnegativen Bakterien beteiligt (Goyert *et al.*, 1997). In der Literatur werden zusätzlich zwei lösliche Formen von CD14 beschrieben (Goyert, CD14, 2002). Lösliche Formen entstehen durch Verlust der Zelloberflächengestalt oder durch Freisetzung durch die Zellen vor dem Anfügen eines GPI-Ankers.

Auf Monozyten wird CD14 stark und auf Granulozyten eher schwach exprimiert. Die meisten Gewebe-Makrophagen und Langerhans-Zellen weisen das Antigen ebenfalls auf.

In repetitiv bestrahlten Hautpartien wird bei allen angewendeten Bestrahlungsarten eine starke Zunahme von CD14⁺ Zellen zwischen 42 - 48 % quantifiziert (siehe Abbildung 5.12). Die Datenreihen für die Exposition mit sonnensimulierten Licht (SSR) unterliegen einer starken Streuung, deshalb ist es nicht möglich eine Signifikanz zu ermitteln. Lediglich die Änderung durch UVA und UVB Vorbehandlungen sind im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant.

Betrachtet man die Gesamtheit der detektierten Zellen sind Steigerungen von 22 - 29 % zu verzeichnen (siehe Abbildung 5.11). In bestrahlten Arealen nehmen als CD14⁻ analysierte Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 16 % - 25 % zu.

In Abbildung 5.13 sind exemplarisch mit CD14 Antikörper gefärbte Gefrierdünnsschnitte eines Probanden, nach repetitiver Bestrahlung, abgebildet.

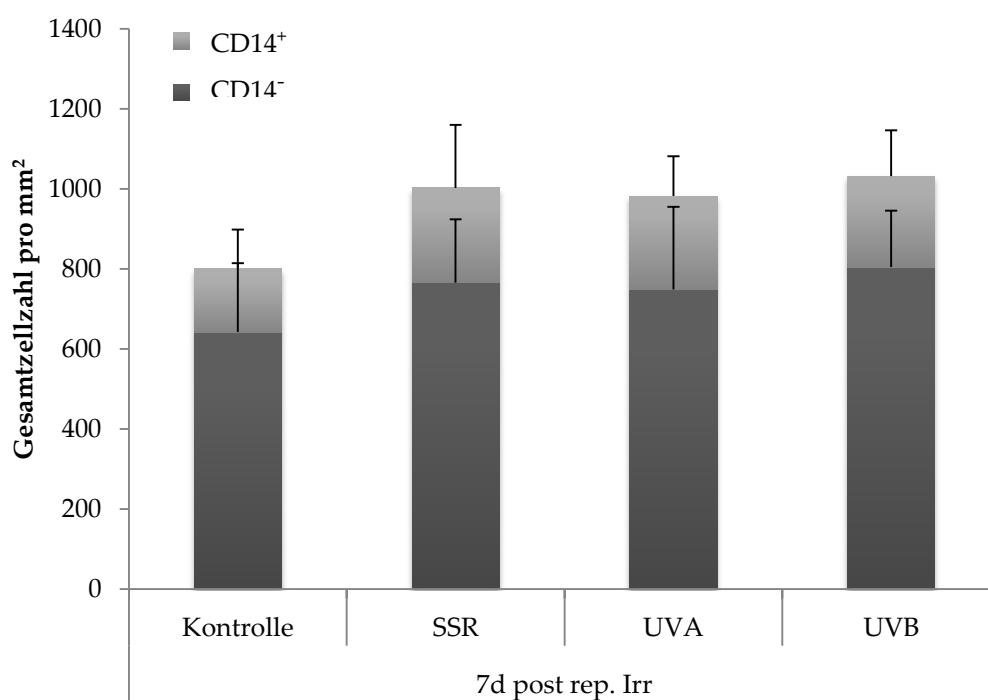


Abbildung 5.11: Gesamtzellzahl nach repetitiver Bestrahlung

Mit immunohistochemischer Färbung wurden Hautdünnsschnitte mit CD14 Antikörpern gefärbt. Die Hautdünnsschnitte wurden aus Stanzbiopsien gewonnen, die sieben Tage nach repetitiver Bestrahlung 8 Probanden entnommen wurden. Die Gesamtzellzahl setzt sich aus der Summe von CD14⁺ und CD14⁻ Zellen zusammen. Die Fehlerindikatoren bilden die Standardabweichung ab.

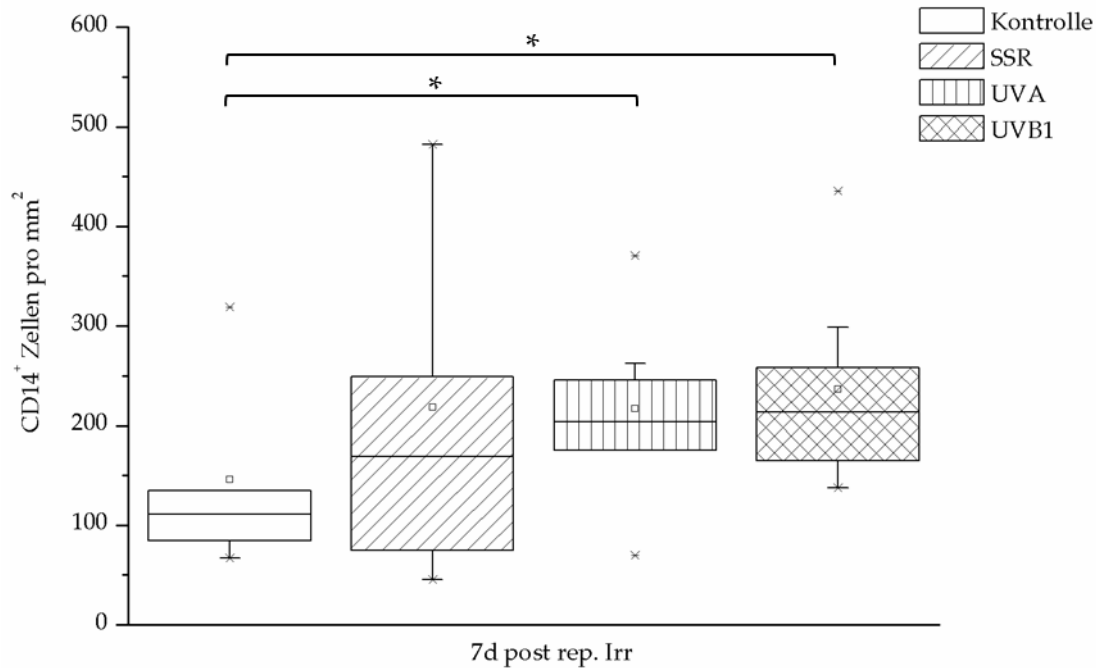


Abbildung 5.12: CD14 positive Zellen nach repetitiver Bestrahlung

Gefrierdünnschnitte der UV-Studie (n=8) wurden gegen den Antikörper CD14 immunhistochemisch gefärbt, digitalisiert und mit dem Auswerteprogramm NuclearQuant quantifiziert. Für die quantitative Erfassung wurden jeweils drei Schnitte einer Probe pro Proband und Zeitpunkt verwendet. Die Box umfasst 25 – 75 % der Ergebnismenge. Der Mittelwert der Bestrahlungsart ist durch ein kleines Quadrat und der Median durch eine Querlinie dargestellt. Minimum und Maximum sind mittels eines Kreuzes abgebildet. Durch sogenannte Whisker (Antennen) werden Werte von 5 und 95 % (anteilig zur Ergebnismenge) mit der Box verbunden. Als Ausreißer ermittelte Datenpunkte sind durch die fehlende Verbindung zur Box zu erkennen.

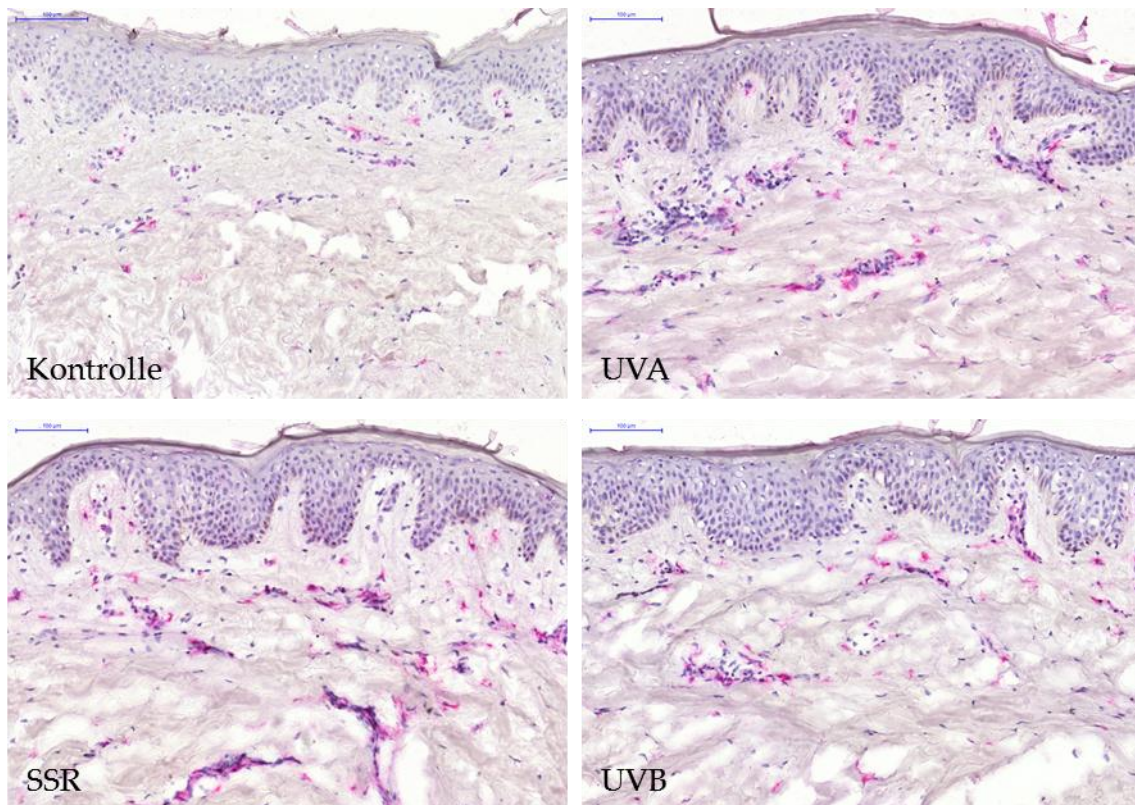


Abbildung 5.13: Exemplarische Färbung CD14⁺ Zellen

Immunhistochemische Färbung mit CD14 Antikörper (Dako) von Gefrierdünnschnitten der UV-Studie. Sieben Tage nach repetitiver Bestrahlung mit SSR, UVA oder UVB. (Vergrößerung 20-fach, Balken entspricht 100 µm)

5.4 Immunzellstatus in Saugblasen-induzierter PIH

Wie in 5.3 bereits erwähnt, wurde in Saugblasen induzierten hyperpigmentierten Arealen ein dermales entzündliches Infiltrat beobachtet. Die Beiersdorf internen Untersuchungen umfassten immunhistochemische Färbungen von Hautdünnschnitten der PIH-Studie (siehe 4.1.1) mit Antikörpern gegen CD45 (allgemeiner Marker für Leukozyten) und CD14 (Marker für Monozyten/Makrophagen). Den ermittelten Ergebnissen konnte entnommen werden, dass der Marker für das CD14-Antigen nur einen Teil der CD45⁺ Zellen erfasst. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Untersuchungen eine genauere Charakterisierung des Infiltrats vorgenommen.

Gefrierdünnschnitte der PIH-Studie (n=16) (siehe 4.1.1) wurden immunhistochemisch gefärbt. Nach der Digitalisierung der gefärbten Hautdünnschnitte erfolgte eine Quantifizierung der markierten Zellen mit NuclearQuant wie in 4.2.3 beschrieben. Dafür wurde unter Verwendung identischer

Einstellungen bis zu einer Dermistiefe von 500 μm quantifiziert und die Ergebnisse auf eine Fläche von 1 mm^2 normiert.

5.4.1 Mastzelltryptase positive Zellen

Mastzellen verfügen über ein großes Repertoire an Rezeptoren, Mediatoren und Enzymen, wie Histamin, Chymase, Carboxypeptidase und proteolytische Tryptase. Humane Mastzelltryptase gilt als bedeutender Marker für die Mastzellaktivierung und als wichtiger Mediator für Entzündungen.

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde ein anti-Mastzelltryptase Antikörper (siehe Tabelle 3.13) verwendet, der sowohl die Alpha- als auch die Beta-Isoform erkennt.

Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren eine Erhöhung der Gesamtzellzahl über den gesamten Zeitraum von 16 Wochen nach SB-Entnahme (siehe Abbildung 5.14). Nach 2 Wochen ist die Gesamtzellzahl um 40 % höher als im Kontrollareal. Zwei Wochen später wird ein Niveau erreicht, dass um 62 % über dem des Kontrollareals liegt. Danach geht die Gesamtzellzahl langsam zurück, erreicht innerhalb der Studiendauer jedoch kein Kontrollniveau. So wird zum Zeitpunkt 8 Wochen 32 % Zunahme und nach 16 Wochen eine Gesamtzellzahlerhöhung von 25 %, im Vergleich zum unbehandelten Areal, ermittelt.

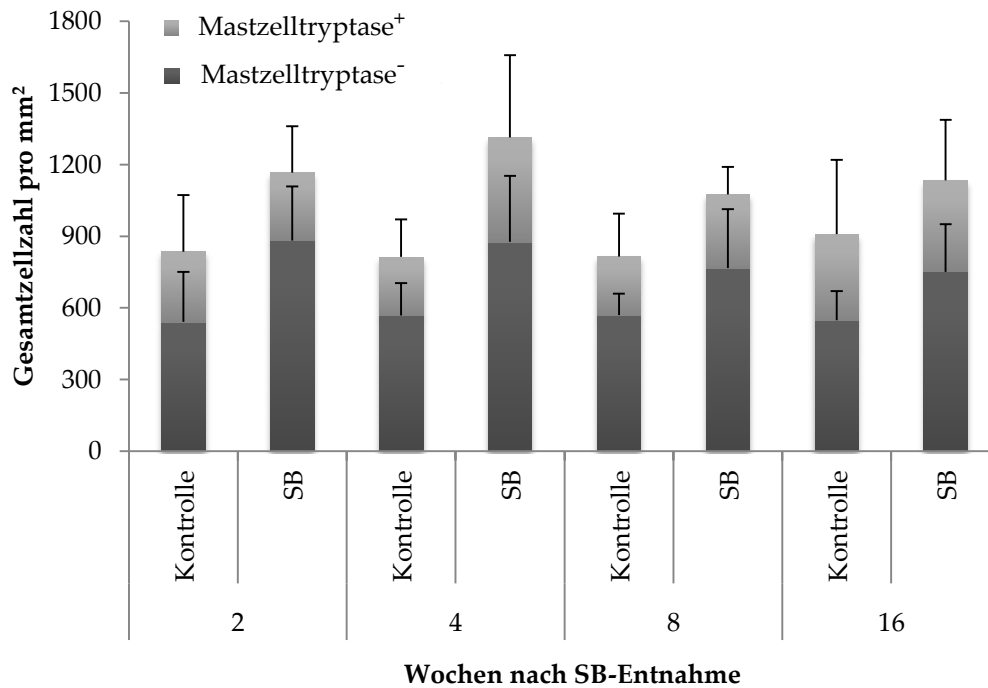


Abbildung 5.14: Entwicklung der Gesamtzellzahl bei Saugblasen-induzierter Pigmentierung

Über einen Zeitraum von 16 Wochen wurden Stanzbiopsien von unbehandelten und SB-Arealen entnommen. Mittels Immunhistochemie wurden Hautdünnschnitte mit Mastzelltryptase Antikörper gefärbt und mit der Auswertesoftware NuclearQuant analysiert. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Summe Mastzelltryptase positiver und negativer Zellen. Aufgetragene Fehlerindikatoren sind die Standardabweichung der ermittelten arithmetischen Mittel. Zu den Zeitpunkten 2, 4 und 16 Wochen wurde Probenmaterial von 16 Probanden untersucht. Nach 8 Wochen erfolgte die Entnahme der Stanzbiopsie nur bei 8 Probanden.

Bei Betrachtung Mastzelltryptase positiver (Mastzelltryptase⁺) Zellen (Abbildung 5.15) ist 4 Wochen nach Saugblasenentnahme ein deutlicher Anstieg von 79 % zu verzeichnen. Der Zeitpunkt stimmt mit der größten Gesamtzellzunahme überein. Vier Wochen darauf ist die Anzahl an Mastzelltryptase⁺ Zellen auf 125 %, bezogen auf das unbehandelte Areal, gesunken.

In Abbildung 5.16 sind exemplarisch mit Mastzelltryptase Antikörper gefärbte Gefrierdünnschnitte eines Probanden, nach repetitiver Bestrahlung, abgebildet.

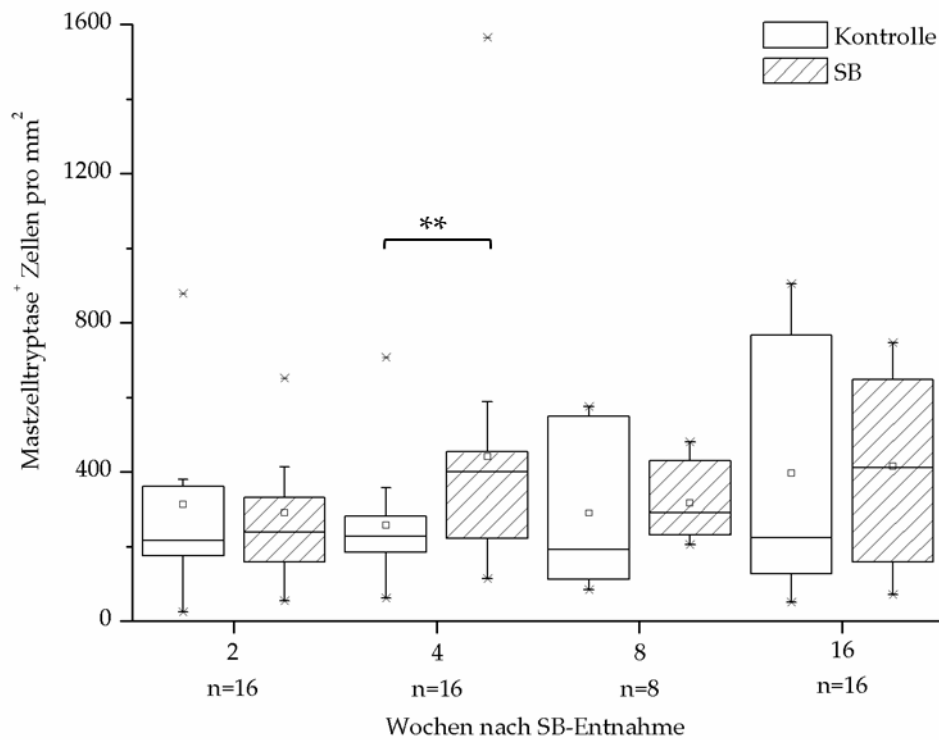


Abbildung 5.15: Mastzelltryptase positive Zellen in Saugblasen-induzierter Pigmentierung

Für die Untersuchungen standen Gefrierdünnchnitte der PIH-Studie zur Verfügung. Vor der Digitalisierung und Quantifizierung wurden die Gefrierdünnchnitte mit einem Anti-Mastzelltryptase Antikörper gefärbt. Jeweils 3 Hautdünnchnitte wurden pro Proband und Behandlung quantifiziert. Die Box stellt die Ergebnismenge zwischen 25-75 % dar. Das Quadrat ist der Mittelwert der Datenreihe und die Querlinie der Median. Minimum und Maximum sind mittels eines Kreuzes dargestellt. Durch sogenannte Whisker (Antennen) werden Werte von 5 und 95 % (anteilig zur Ergebnismenge) mit der Box verbunden. Datenpunkte die als Ausreißer ermittelt wurden, sind separat aufgetragene Kreuze.

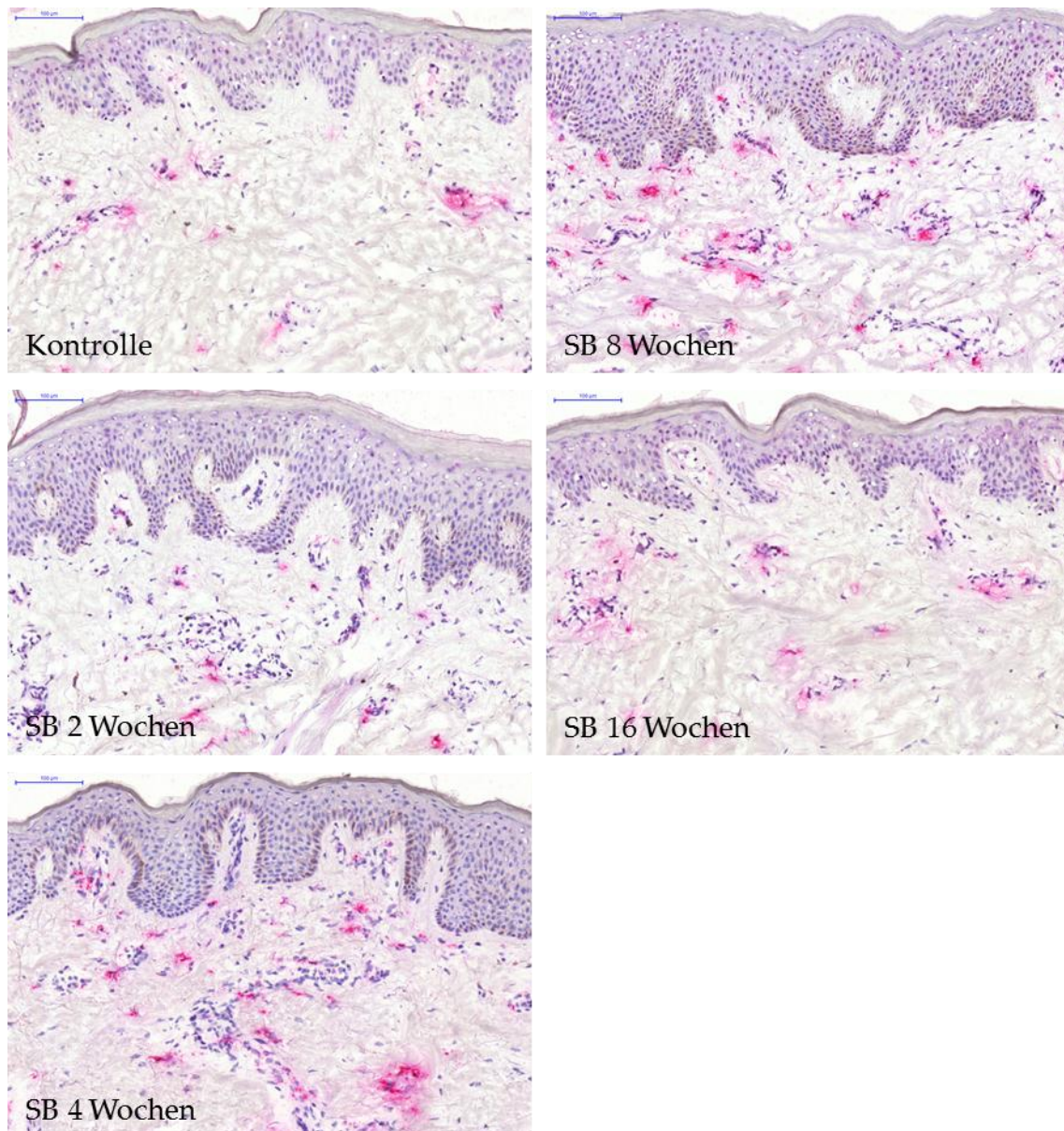


Abbildung 5.16: Exemplarische Färbung Mastzelltryptase⁺ Zellen

Immunhistochemische Färbung mit Mastzelltryptase Antikörper (abcam) von Gefrierdünnschnitten der UV-Studie. Sieben Tage nach repetitiver Bestrahlung mit SSR, UVA oder UVB. (Vergrößerung 20-fach, Balken entspricht 100 µm)

5.4.2 CD66b positive Zellen (CD66b⁺)

Das Glykoprotein CD66b ist durch eine GPI-Verknüpfung an der Zelloberfläche von humanen Granulozyten verankert. Unter normalen Bedingungen wird CD66b nur gering auf Neutrophilen exprimiert, erst durch die Anwesenheit von Entzündungsagonisten wird die Expression drastisch verstärkt. Auf Grund dieser Eigenschaft stellt es einen bedeutenden Marker für die Granulozytenaktivierung dar (Torsteinsdottir *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Die Funktion des Moleküls in

Eosinophilen ist größtenteils unbekannt (De Haas *et al.*, 1994; Eades-Perner *et al.*, 1998).

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Hautdünnschnitte von 3 Probanden der PIH-Studie verwendet.

Die Quantifizierung der Proben ergibt ein sehr geringes Vorkommen an aktivierten Granulozyten sowohl im Saugblasen- als auch im Kontrollareal. In Abbildung 5.17 sind Ausschnitte eines Probanden gegenübergestellt, um das ermittelte Ergebnis zu visualisieren.

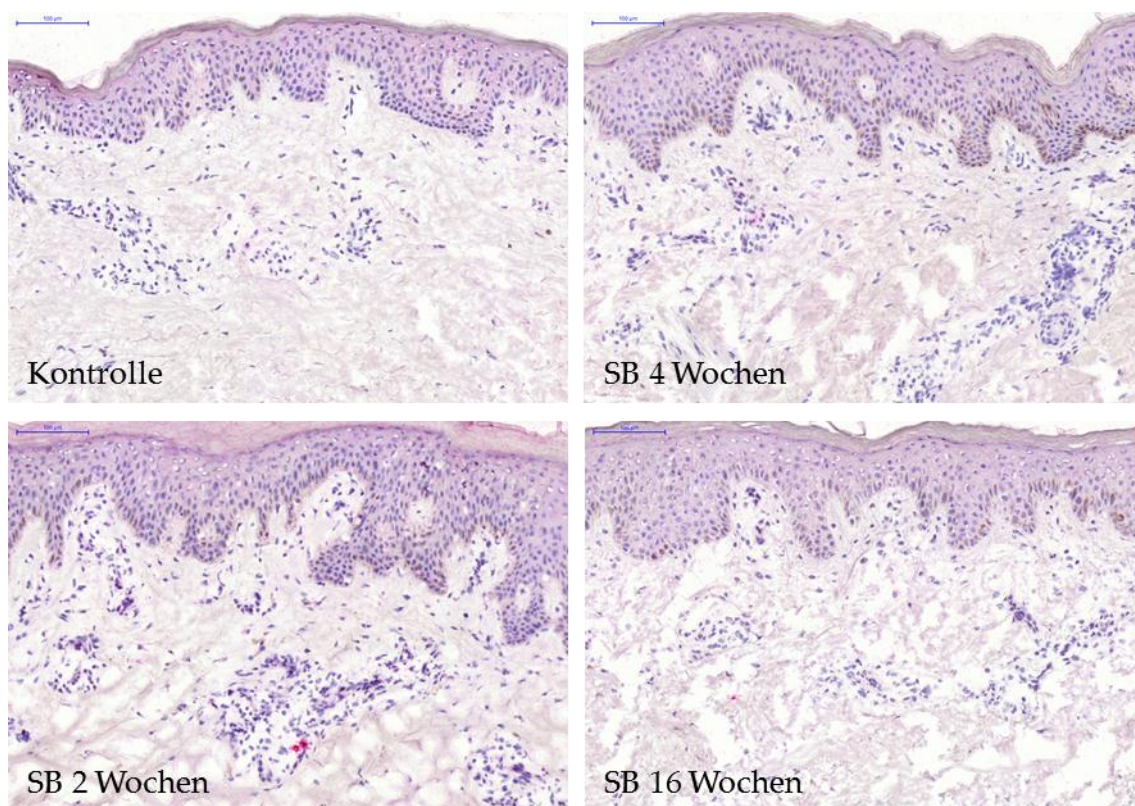


Abbildung 5.17: Exemplarische Färbung CD66b⁺ Zellen

Immunhistochemische Färbung mit CD66b Antikörper (Novus) von Gefrierdünnschnitten der UV-Studie. Sieben Tage nach repetitiver Bestrahlung mit SSR, UVA oder UVB. (Vergrößerung 20-fach, Balken entspricht 100 µm)

5.5 Lokalisation von Immunzellen in hyperpigmentierter Haut

Für Untersuchungen zur Verteilung und Lokalisation von Immunzellen in hyperpigmentierter Haut wurden Übersichtsfärbungen mittels Immunfluoreszenz angefertigt. Dabei wurden die Hautdünnschnitte der PIH-Studie von 8 Probanden, zum Zeitpunkt 16 Wochen nach SB-Entnahme, mit folgenden Antikörperkombinationen gefärbt (siehe Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Verwendete Antikörperkombinationen, Filter und Pseudofarben für IF-Übersichtsfärbung

Primär-AK	Sekundär-AK	Filter	Pseudofarbe
CD45 (Kaninchen)	Cy5 Ziege anti-Kaninchen	Cy5	Rot
Tryptase (Maus)	Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus	TRITC	Grün
CD14 (Maus)			
DAPI		DAPI	Blau

Daraus ergibt sich eine Darstellung von einem Teil CD45⁺ Zellen (T-Zellen, B-Zellen und einem großen Teil dendritischer Zellen) durch die Farbe Rot. Mastzelltryptase⁺ Zellen (Mastzellen) und ein Teil CD14⁺ Zellen (Makrophagen) werden durch eine grüne Farbe abgebildet. Da Monozyten, Granulozyten und Langerhans-Zellen gleichzeitig von dem CD45 und CD14 Antikörper erfasst werden, ergibt sich durch die Überlagerung der Farben, für diese Zelltypen die Identifikationsfarbe Orange.

Die untersuchten Biopsien weisen bei verschiedenen Probanden sehr unterschiedliche Immunzellvorkommen im Kontroll- und im Saugblasenareal auf. Ähnliche Beobachtungen werden in immunhistochemischen Färbungen mit der APAAP-Methode gemacht. Eine Gegenüberstellung von gefärbten Hautdünnschnitten von zwei Probanden soll dieses verdeutlichen (siehe Abbildung 5.19). Trotz der Unterschiede in quantitativer Hinsicht werden bei allen Probanden ähnliche charakteristische Veränderungen hinsichtlich der Lokalisation und Verteilung beobachtet (siehe Abbildung 5.18).

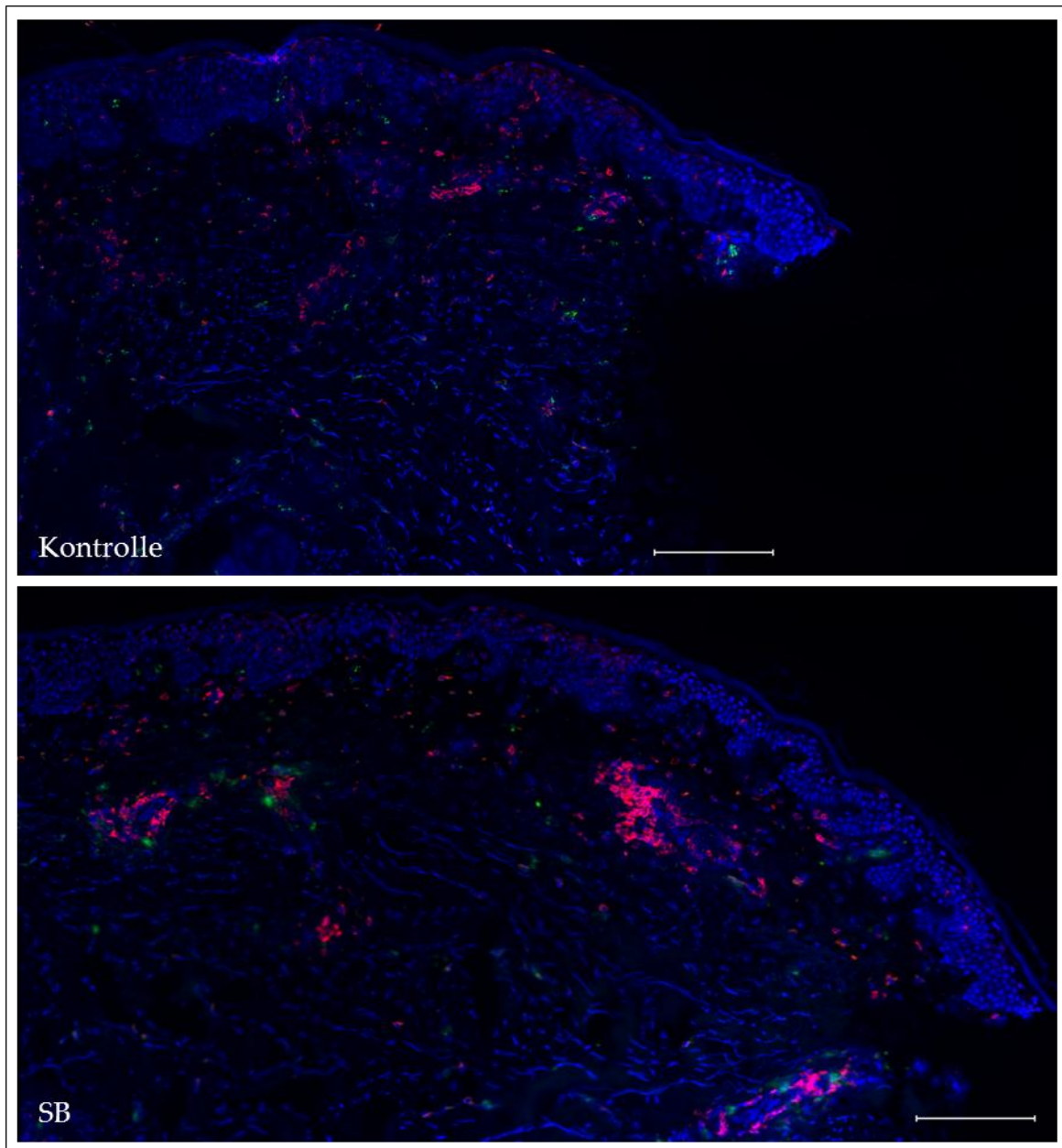


Abbildung 5.18: Cofärbung von CD45 positiven, Mastzelltryptase positiven und CD14 positiven Zellen; Mosaikaufnahme von der Immunzellverteilung in einem hyperpigmentierten Areal

16 Wochen nach Saugblasenentnahme wurden Stanzbiopsien des Saugblasenareals (SB) und eines Kontrollareals (Kontrolle) entnommen. Die aus den Biopsien angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden mit den Primärantikörpern anti-CD45 (Kaninchen), anti-CD14 (Maus) und anti-Mastzelltryptase (Maus) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus (grün) und Cy5 Ziege anti-Kaninchen (rot). Durch Überlagerung von Zelltypen, die durch anti-CD45 und anti-CD14 erfasst werden, ergibt sich für diese Zellen die Farbe Orange. Mit dem DAPI-Fluoreszenzfarbstoff erfolgte die DNA-Färbung. Die Abbildung zeigt exemplarisch die repräsentativen Ergebnisse von 8 Probanden. Balken entsprechen 200 μm .

Mastzellen und Makrophagen (grün) sind homogen in der Dermis verteilt. Es kommt nur vereinzelt zu einer Anhäufung von ca. 3 bis 4 Zellen dieser Zelltypen. CD45⁺ Zellen (rot) bilden häufig geballte Anhäufungen in den oberen 300 μm der Dermis

aus. Dieses Phänomen wird vermehrt bei hyperpigmentierten Arealen beobachtet. Orange markierte Zellen (Monozyten, Granulozyten und Langerhans-Zellen) befinden sich dabei nicht innerhalb dieser Zellballung, können aber in unmittelbarer Nähe detektiert werden. Bei Immunzellen die sich zwischen den Räteleisten ansiedeln, handelt es sich vermehrt um CD45⁺ Zellen (rot). Das bereits quantitativ ermittelte dermale Infiltrat in hyperpigmentierten Arealen (durch Saugblasen induziert) kann mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden.

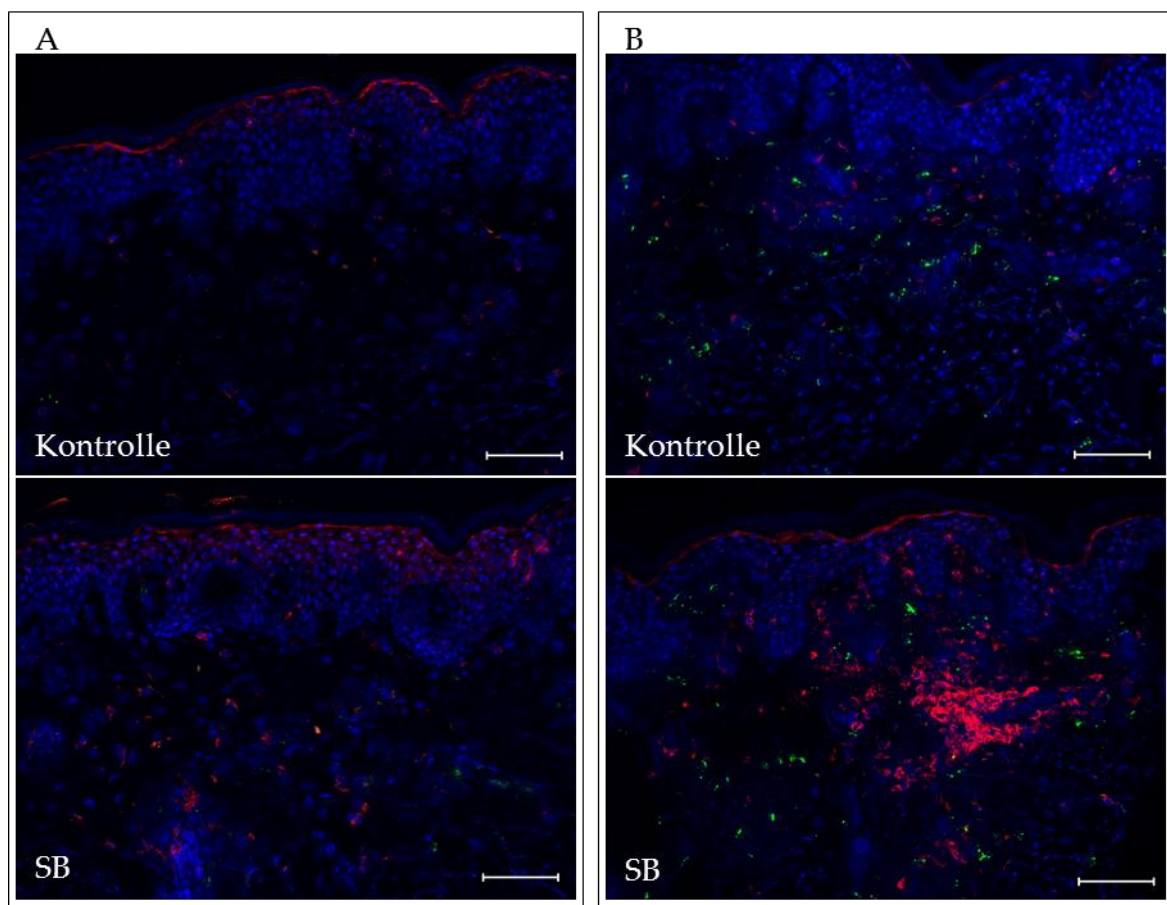


Abbildung 5.19: Cofärbung von CD45 positiven, Mastzelltryptase positiven und CD14 positiven Zellen in hyperpigmentierten Arealen; Unterschiede der Immunzellzahl zweier Probanden

Abgebildet sind die Immunzellverteilung zweier Probanden (A und B) nach Cofärbung von Kontroll- und Saugblasenareal (SB) 16 Wochen nach SB-Entnahme durch Immunfluoreszenz. Dargestellt sind CD45 positive Zellen in Rot (Cy5-Filter), Mastzelltryptase- und CD14 positive Zellen in Grün (TRITC-Filter), sowie die Zellkerne in Blau (DAPI). Durch Überlagerung von CD45 und CD14 positiven Zellen ergibt sich eine weitere Farbe (Orange). Balken entsprechen 100 μm .

5.6 Induzierbarkeit der Pigmentierung durch HMC1-konditioniertes Medium

Der Mastzellmediator Histamin wurde mehrfach als Melanogenese induzierende Substanz in *in vitro* Versuchen beschrieben (Tomita *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 2000).

In Transkriptionsanalysen (Beiersdorf interne Untersuchungen, Daten nicht gezeigt) der PIH-Studie waren Histaminrezeptoren in Biopsien des Saugblasenareals hochreguliert. Durch die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass Mastzellen in hyperpigmentierten Arealen erhöht vorliegen (5.4.1), wurde der Frage nachgegangen, ob ein kausaler Zusammenhang der erhöhten Anzahl von (aktivierten) Mastzellen und der Ausbildung einer Hyperpigmentierung besteht. Zu diesem Zweck wurden Melanozyten in Mastzell-konditioniertem Medium kultiviert. Melanozyten von drei Spendern wurden wie in (4.3.1) beschrieben kultiviert und mit Kulturüberständen von unterschiedlich stimulierten HMC1-Zellen behandelt (vgl. 4.4). Zuvor wurden HMC1-Zellen nach 24 h Kultivierung mit frischem Medium (IMDM+) mit 10 ng ml^{-1} Nerve Growth Factor (NGF) oder $10 \text{ }\mu\text{M}$ Substanz P für 30 min inkubiert.

In Vorversuchen wird der Einfluss des unkonditionierten Mastzellmediums auf die Vitalität, morphologische Veränderung und Melaninneubildung der Melanozyten untersucht (n=2). Es wird keine Veränderungen der Morphologie und der Melaninneubildung im Vergleich zur Kontrolle ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die spätere Behandlung mit dem konditionierten HMC1-Medium sieht ein Medienanteil von 33 % IMDM+ vor (siehe 4.4). Das zu einem Drittel veränderte Medium der Melanozyten erzeugt keine Beeinträchtigung der Vitalität (Daten nicht gezeigt). Neben der Quantifizierung von Melanin im Kulturüberstand und in den Zellen wurde eine Histaminbestimmung mittels ELISA durchgeführt.

Die mit konditioniertem Mastzellmedium behandelten Melanozyten der drei Spender weisen eine geringere Histaminkonzentration im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 5.20). Bei der Verwendung von NGF als Stimulationssubstanz ergibt sich eine Reduktion um 10 %. Für den Einsatz von Substanz P wird eine 30 % Senkung des Histamingehalts im Melanozytenüberstand ermittelt. Über die viertägige Behandlung werden keine Vitalitätsverluste oder morphologische Veränderungen verzeichnet (Daten nicht gezeigt).

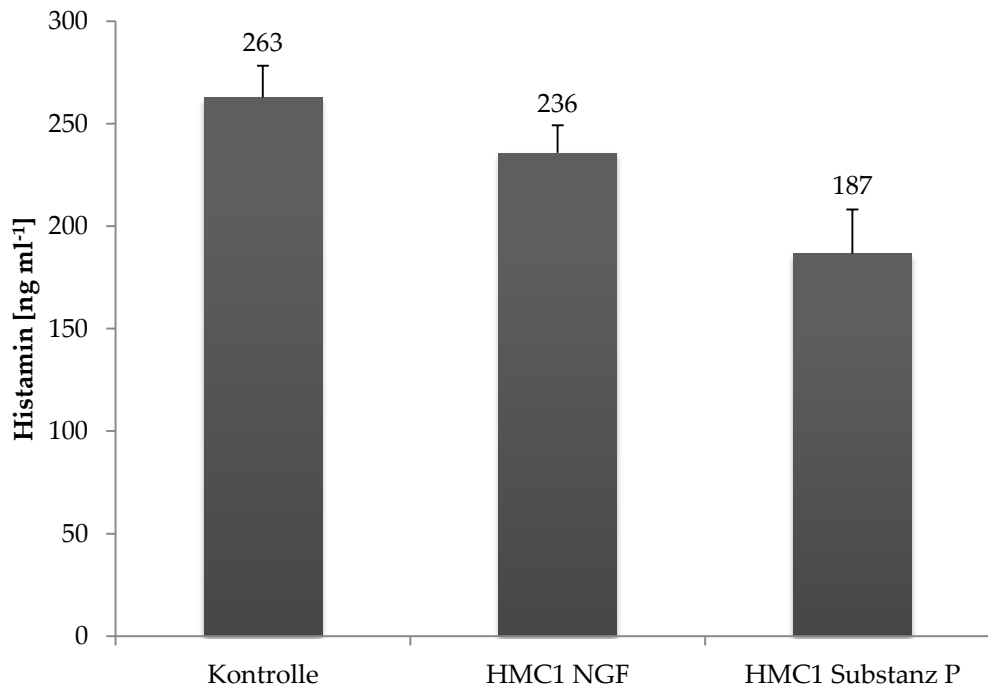


Abbildung 5.20: Histaminkonzentration im Kulturüberstand von Melanozyten behandelt mit konditioniertem HMC1-Medium

Mittels Histamin ELISA von Genway wurden Histaminkonzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt. Aus den gemittelten Absorptionswerten der Dreifachbestimmung wurde die Histaminkonzentrationen in ng ml^{-1} mittels Standardgeradengleichung ermittelt. Isolierte Melanozyten von drei Spendern wurden mit konditioniertem Mastzellmedium, mittels 10 ng ml^{-1} NGF (HMC1 NGF) oder $10 \mu\text{M}$ Substanz P (HMC1 Substanz P) stimuliert, behandelt. Die abgebildeten Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung der gemittelten Datenpunkte dar.

Ziel der Experimente ist es, den Einfluss von konditioniertem Mastzellmedium auf die Melanogenese in Form von Melaninbildung zu untersuchen. Dafür erfolgte eine Melaninquantifizierung im Kulturüberstand der Melanozyten und in den Zellen selbst. Durch Absorptionsmessung wurde der Melaningehalt festgestellt und auf die mitgeführte Kontrolle relativiert. Zuvor erfolgte bei der Bestimmung von Melanin in Kulturüberständen eine weitere Relativierung auf die Zellzahl.

In Abbildung 5.21 wird der ermittelte Melaningehalt in % gegen die jeweilige Art der Stimulationssubstanz aufgetragen. Die Kontrollwerte entsprechen 100 %. Unabhängig von der eingesetzten Stimulationssubstanz steigt die Melaninsynthese bis zu 10 % durch HMC1-konditioniertes Medium. Zusätzlich wird weniger Melanin in den Überstand abgegeben (siehe Abbildung 5.21).

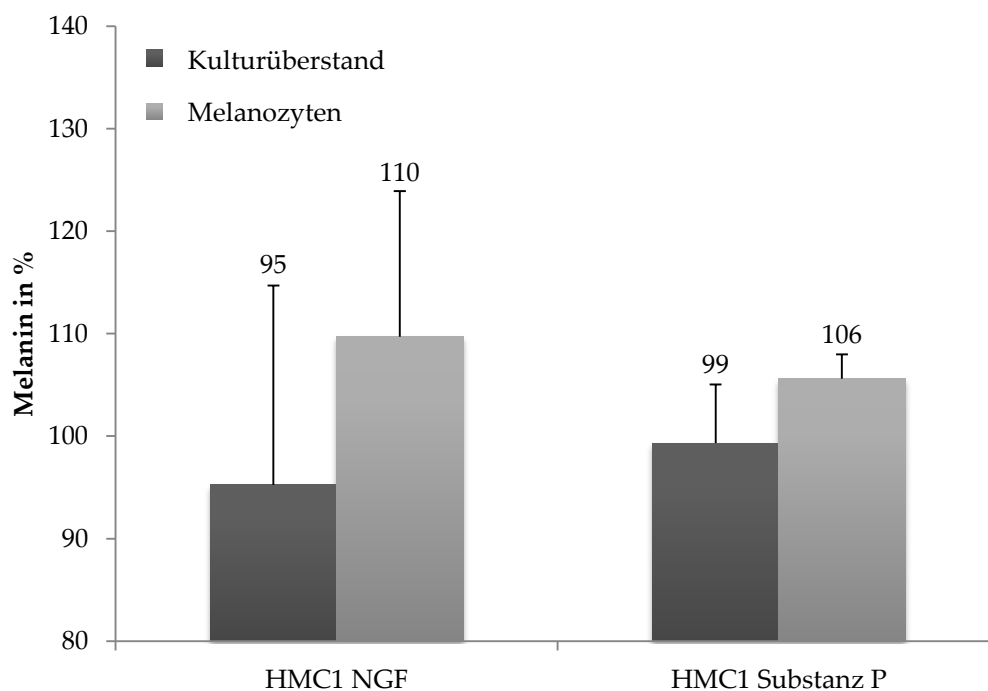


Abbildung 5.21: Melaningehalt im Kulturüberstand und in den Melanozyten nach Behandlung mit konditioniertem HMC1-Medium

Isolierte Melanozyten ($n=3$) wurden mit konditioniertem Mastzellmedium für 4 Tage inkubiert. Die Stimulation der Mastzellen erfolgte mit 10 ng ml^{-1} NGF (HMC1 NGF) oder $10 \text{ }\mu\text{M}$ Substanz P (HMC1 Substanz P). Ergebnisse für die Kulturüberstände unterliegen einer Dreifachbestimmung, deren Resultate auf die Zellzahl relativiert wurden. Auf Grund von geringen Probenmengen konnte für die Melaninquantifizierung in Melanozyten nur eine Einfachbestimmung durchgeführt werden. Alle Mittelwerte wurden auf die zugrunde liegende Kontrolle (entspricht 100 %) bezogen. Die berechneten Standardabweichungen werden mit Hilfe von Fehlerindikatoren dargestellt.

5.7 Einfluss von Substanzen auf die Melanogenese

In Kapitel 5.6 konnte gezeigt werden, dass HMC1-konditioniertes Medium einen positiven Einfluss auf die konstitutive Melanogenese hat. Um einen direkten Effekt der mastzellstimulierenden Substanzen auf die Melanogenese nachweisen bzw. ausschließen zu können, wurden Melanozyten mit NGF und Substanz P behandelt. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit synthetischem Histamin.

Der ermittelte Histamingehalt in den Kulturüberständen von mit 10 ng ml^{-1} NGF behandelten Melanozyten zeigt keine Abweichungen zur Kontrolle. Durch Behandlung mit Substanz P (SP) wird eine Reduktion von Histamin um 50 % induziert. Dieses entspricht etwa der Größenordnung der ermittelten Histaminabnahme bei HMC1-konditioniertem Medium, mit SP stimuliert (vgl. Abbildung 5.22). Bei mit synthetischem Histamin behandelten Melanozyten wird weder eine Reduktion noch eine Zunahme von Histamin im Überstand festgestellt.

Die ermittelte Histaminkonzentration ergibt sich aus der Summe des zugeführten Histamins ($10 \mu\text{M}$) und des Histamingehalts der Kontrolle.

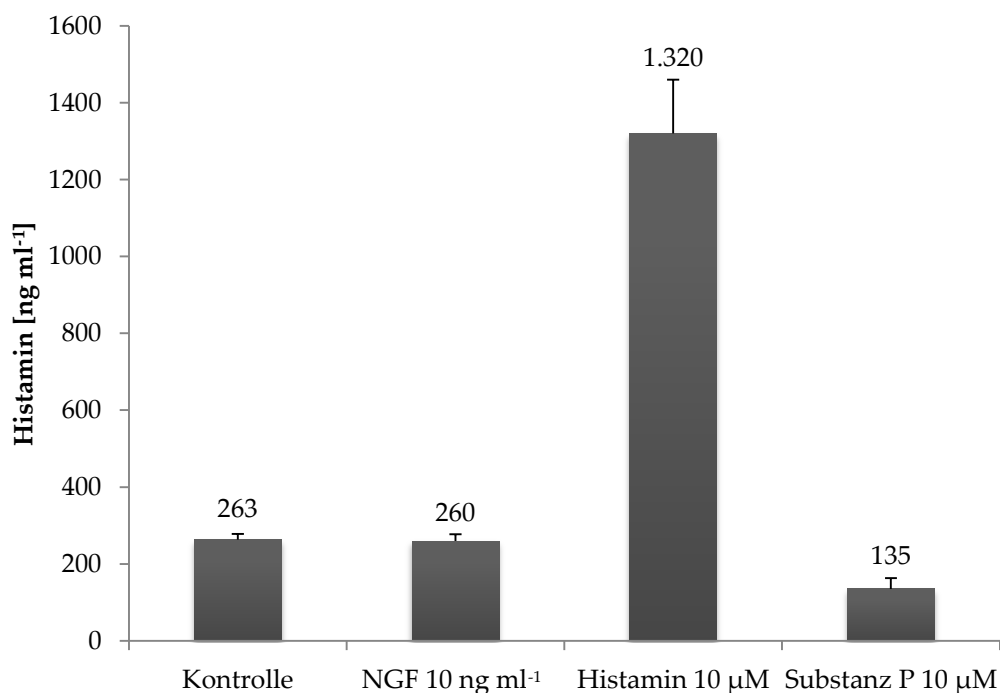


Abbildung 5.22: Histaminkonzentration im Kulturüberstand von Melanozyten nach der Behandlung mit Substanzen

In den Kulturüberständen von Melanozyten dreier Spender wurde die Histaminkonzentration mittels Histamin ELISA bestimmt. Nach einer Dreifachbestimmung wurden die Ergebnisse der Adsorptionsmessung gemittelt und anhand von einer Kalibriergeraden die Konzentrationen berechnet. Die viertägige Behandlung erfolgte mit 10 ng ml^{-1} NGF, $10 \mu\text{M}$ Histamin und $10 \mu\text{M}$ Substanz P. Die abgebildeten Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung der gemittelten Datenpunkte dar.

Aus der folgenden Abbildung 5.23 wird deutlich, dass eine Behandlung mit NGF in der angewendeten Konzentration keinen Einfluss auf die Melaninbiosynthese hat. Somit wird die Steigerung der Melanogenese um 10 % (vgl. Abbildung 5.21) durch das konditionierte Medium der Mastzelllinie induziert. Die Verwendung von synthetischem Histamin hat eine starke Reduktion (17 %) der Melaninabgabe in den Kulturüberstand zur Folge, während in den Melanozyten eine Melaninzunahme von 4 % detektiert wird. Bei der Behandlung mit Substanz P wird ein ähnliches Melanogeneseverhalten, wie bei Mastzell-konditioniertem Medium, SP stimuliert, beobachtet (vgl. Abbildung 5.21 und Abbildung 5.23). Aus diesem Grund ist ein Einfluss durch Substanz P auf die Pigmentierung nicht auszuschließen.

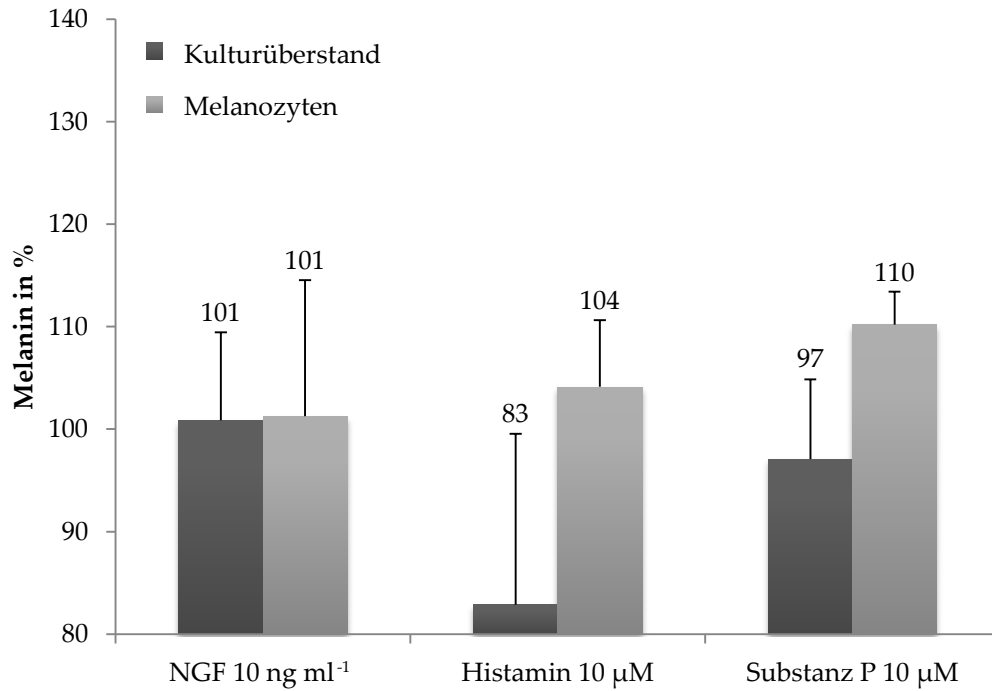


Abbildung 5.23: Melaningehalt im Kulturüberstand und in den Melanozyten nach Behandlung mit synthetischen Substanzen

Isolierte Melanozyten (n=3) wurden mit 10 ng ml⁻¹ NGF, 10 μM Histamin und 10 μM Substanz P für 4 Tage inkubiert. Die ermittelten Ergebnisse für die Kulturüberstände wurden auf die Zellzahl relativiert. Alle bestimmten Mittelwerte wurden auf die zugrunde liegende Kontrolle (entspricht 100 %) bezogen. Die berechneten Standardabweichungen werden mit Hilfe von Fehlerindikatoren dargestellt.

6 Diskussion

6.1 Mechanismen der UV-induzierten Pigmentierung

6.1.1 Melanogeneseaktivität und Melanineubildung nach repetitiver Bestrahlung mit UVA und/oder UVB

In der Literatur wird der UVA-Strahlung die Induktion der schnellen Bräunung (IPD und PPD) zugeschrieben. Durch Umverteilung, Photooxidation und/oder Polymerisation des vorhandenen Melanins und von Melaninvorstufen wird eine kurzweilige gräuliche Pigmentierung erzielt, die der Haut keinen Photoschutz bietet. Die biologische Funktion der Sofortbräunung ist weitgehend ungeklärt. Im Gegensatz dazu induziert die Bestrahlung mit UVB eine stabilere Art der Pigmentierung (DT, delayed tanning), die verzögert auftritt. Die Pigmentierung beruht in dieser Art der Bräunung auf einer Melanineusynthese und der Umverteilung von vorhandenen Melanin (Tadokoro *et al.*, 2005).

Über eine Periode von zwei Wochen wurden Areale des unteren Rücken (n=8) 10-mal repetitiv mit SSR (setzt sich aus UVA und UVB zusammen), UVA oder UVB bestrahlt. Die ermittelten Ergebnisse zur Melanineusynthese und Melanogeneseaktivität spiegeln sich zum größten Teil in bisherigen Veröffentlichungen wieder.

Alle drei Bestrahlungsarten führen drei Wochen nach Beginn der repetitiven Bestrahlung zu einer Melanineusynthese. UVB (mit und ohne UVA) steigert den Melaningehalt signifikant um das 2,5- bis 3-fache verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle. Bei der Bestrahlung mit UVA wurde ebenfalls ein Anstieg des Melaningehalts um das 2,5-fache ermittelt, jedoch ist diese Veränderung statistisch nicht signifikant ($p=0,1$). Die Melanineubildung der Probanden bei der Bestrahlung mit UVA unterliegt stärkeren Schwankungen im Vergleich zu UVB (mit und ohne UVA). Ein Teil der Probanden reagiert mit starker Melaninbildung auf die UVA Bestrahlung, während andere nur mäßig Melanin neusynthetisieren. Hingegen rufen Bestrahlungen mit UVB (mit und ohne UVA) einheitlichere Reaktionen bei unterschiedlichen Individuen hervor.

Bisher wird beschrieben, dass die unterschiedlichen UV-Wellenlängen auch unterschiedliche Reaktionen in der Haut hervorrufen. SSR stimuliert die Expression von spezifischen Melanozytenmarkern, wie Tyrosinase, TYRP1 und dem Microphthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF) und steigert die Produktion von Melanin, während UVA-Strahlung allein diese Reaktionen nicht induziert. Trotz der Unterschiede im Melanin Gehalt wird eine ähnliche sichtbare Bräunung bei UVA und UVB behandelten Arealen beobachtet (Wolber *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010). Anhand der ermittelten MelInd der UV-Studie kann eine einheitliche visuelle Bräune bei unterschiedlichen UV-Bestrahlungen bestätigt werden (Abbildung 5.3). Korrelationen von *in vivo* ermittelten Farbwerten (MelInd) mit dem Melanin Gehalt beschreiben einen linearen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von $R=0,85$ (Daten nicht gezeigt). Die starke Streuung, der miteinander korrelierten Werte, erklärt die lediglich hohe Korrelation. Viele Parameter können einen Einfluss auf die Streuung der Werte nehmen. Zum Beispiel kann die Bildung von Erythemen, nach UV-Exposition, durch das erhöhte Vorkommen von Hämoglobin und Carotinoiden den MelInd beeinflussen. Generell schließt der für die Berechnung von MelInd zu Grunde liegende Algorithmus diesen Einfluss aus, kann jedoch bei einer starken Erythembildung nicht ausgeschlossen werden. Weitere Gründe für die Streuung der Werte sind die heterogene Packungsdichte, unterschiedliche Verteilung des Melanins in den Strata und die variierende Zapftiefe der Epidermis. Für die sichtbare Bräunung der Haut sind neben dem Melanin Gehalt und dessen Zusammensetzung aus Eumelanin und Phäomelanin, die Verteilung und die Partikelgröße der Melanosomen wichtige Parameter (Alaluf *et al.*, 2002). Zusätzlich wird die Betrachtungsrichtung der Methoden zur Melaninquantifizierung als eine Ursache für die Streuung angesehen. Während bei der histologischen Quantifizierung der Querschnitt der Epidermis betrachtet wird, erfolgt in der Farbmessung die Ansicht von Oben auf die äußere Epidermisschicht.

Für die Charakterisierung einer Pigmentierungsreaktion sind neben der neugebildeten Melaninmenge, die Anzahl an Melanozyten und deren Aktivität

wichtige Merkmale. Das melanosomale Enzym TRP1 (oder TYRP1) wird als ein typischer spezifischer Melanozytenmarker in der UV-induzierten Melanogenese beschrieben. Die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen gegen TRP1 (siehe Abbildung 5.4) zeigen bei UVA und/oder UVB eine Verdopplung der TRP1⁺ Zellen. Da die Fluoreszenzmarkierung durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das melanogene Protein TRP1 erfolgt, können die ermittelten Melanozyten, in gewissen Grenzen als melanogenetisch aktiv betrachtet werden. Folglich unterstützen diese Resultate die Aussage, dass es auch in UVA bestrahlten Arealen, drei Wochen nach repetitiver Bestrahlung, zu einer deutlichen Melaninneubildung kommt. Untersuchungen von Coelho *et al.* (2006) und Miller *et al.* (2006) weisen bis drei Wochen nach repetitiver Bestrahlung nur geringe Zunahmen an Melanin in UVB und SSR bestrahlten Arealen auf. Erst nach fünf Wochen wird in UVB und SSR bestrahlten Arealen eine 2- bis 3-fache Melaninmenge erreicht. Die Größenordnung der Melaninzunahme stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, jedoch tritt eine eindeutige Melaninzunahme erst fünf statt drei Wochen nach repetitiver Bestrahlung ein und das mit UVA bestrahlte Areal weist keine Melaninneusynthese auf. Studien von Choi *et al.* (2010) und Miyamura *et al.* (2006) zeigen bereits drei Wochen nach Beginn der repetitiven Bestrahlung einen Anstieg an Melanin in UVB (mit und ohne UVA) bestrahlten Arealen. Auch in diesen Untersuchungen wird keine Melaninneusynthese in UVA behandelten Arealen beobachtet. Eine mögliche Ursache für die Abweichung der Ergebnisse mit der Literatur ist, dass für diese Arbeit ein verbessertes Protokoll für die FM-Färbung verwendet wurde. Die in dieser Arbeit generierten Bilder sind aussagekräftiger als die Bilder, die den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zu Grunde liegen. Mit der in den Veröffentlichungen verwendeten FM-Methode kann kein feinverteiltes Melanin detektiert werden, da die Färbung nicht sensitiv genug ist. Deshalb konnte die Bestimmung des Melanins und seine Verteilung bislang nicht mit dieser Genauigkeit erfasst werden.

6.1.2 Induzierter Photoschutz der Haut durch repetitive UVA- und/oder UVB-Strahlung

Es ist bekannt, dass UVA und UVB unterschiedliche Arten von DNA-Schäden hervorrufen können. UVA bewirkt vor allem oxidative Schäden von Proteinen, DNA und Membranen, während UVB zwei Typen von DNA-Schäden bedingt (Cyclobutan Pyrimidin Dimer (CPD) und 6,4-Photoprodukt (64PP)). Durch die fakultative Pigmentierung, induziert durch Bräunung der Haut, wird der photoprotektive Effekt der konstitutiven Pigmentierung verstärkt. Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen dem Melaningehalt und DNA-Schäden. Die Zunahme des Melaningehalts allein stellt allerdings keinen vollständigen Schutz dar (Young *et al.*, 1991). Die Haut verfügt über weitere Schutzmechanismen wie zum Beispiel die Verdickung der Haut durch eine epidermale Hyperplasie und die Verdickung des *Stratum corneum* (Ausbildung einer sogenannten Lichtschwiele) (Clydesdale *et al.*, 2001). Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine ausgeprägte Hyperplasie der Epidermis nach repetitiver Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR (UVA mit UVB) (siehe Abbildung 5.6). Die stärkste Hyperplasie wird von UVA behandelten Arealen ausgebildet. Nach einem induzierten starken Reiz von 1,5 MED SSR wird in UVA und SSR (UVA und UVB) vorbehandelten Arealen eine weitere Zunahme der Hyperplasie festgestellt, die aber keine statistische Signifikanz besitzt. Daraus lässt sich ableiten, dass UVA einen stärkeren Einfluss auf die Ausbildung einer Hyperplasie besitzt als UVB. Ein Grund dafür kann der viel diskutierte geringere Photoschutz durch UVA induzierte Bräunung sein, weshalb eine größere epidermale Hyperplasie ausgebildet wird. Es wird berichtet, dass besonders helle Hauttypen mit geringer konstitutiven Pigmentierung verstärkt Hyperplasien ausbilden und diese in einem höheren Maße an dem UV-Schutz beteiligt sind als das in heller Haut gebildete Melanin (Hennessey *et al.*, 2005).

Nach Setzen des Reizes von 1,5 MED SSR (siehe 4.1.2) ist der Hämoglobin-Index (HbInd) in den vorbehandelten Arealen SSR (*, $p=0,03$) und UVA (n.s., $p=0,09$) erhöht (Daten sind nicht gezeigt). Ein erhöhter HbInd weist auf eine stärkere Durchblutung und geweitete Blutgefäße in diesem Bereich hin. Das sind Merkmale für ein

gebildetes Erythem, welches vor allem durch den UVB-Anteil induziert wird. Folglich weist die Vorbehandlung mit UVB einen höheren erythemalen Schutz auf als die Vorbehandlung mit UVA und SSR.

In den zuvor repetitiv bestrahlten Arealen kommt es nach der Bestrahlung mit 1,5 MED SSR zu keiner zusätzlichen signifikanten Melaninneubildung oder Änderung an TRP1⁺ Zellen (Abbildung 5.1, Abbildung 5.5). Lediglich die starke Streuung der Werte bei UVA-vorbehandelten Arealen ist, wie bereits nach repetitiver Bestrahlung, auffällig. Die untersuchten Probanden gehören den Hauttypen II und III an. Trotzdem können Unterschiede in der Vorbräune (Studienbeginn) beobachtet werden (siehe Abbildung 5.2). Das und die sehr unterschiedlichen Reaktionen der Probanden auf die UVA-Exposition bedingen die starken Schwankungen der Ergebnisse. Dadurch stellt sich die Frage ob es eventuell unterschiedliche Reaktionstypen für die UVA-Exposition gibt. Obwohl inkonsistente Reaktionen auftreten werden signifikante Resultate erzielt. Eine Erhöhung des Probandenumfangs würde helfen, die getroffenen Aussagen zu untermauern.

6.1.3 Immun- und Zellstatus nach repetitiver Bestrahlung mit UVA und/oder UVB

Es wird mehrfach von entzündlichen Zellinfiltraten nach UV-Exposition berichtet (Kang *et al.*, 1994; Clydesdale *et al.*, 2001). In den Untersuchungen wird hauptsächlich die Infiltration der Epidermis charakterisiert. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse betrachten ausschließlich die Immun- und Gesamtzellzahl in der Dermis nach repetitiver Bestrahlung mit UVA und/oder UVB. Drei Wochen nach Beginn der repetitiven Bestrahlung ist die Gesamtzellzahl in den bestrahlten Arealen zwischen 5 % (SSR) und 15 % (UVB) erhöht (Abbildung 5.7.). In UVA oder UVB bestrahlten Arealen wird eine sehr bis höchst signifikante Zunahme an CD45⁺ Zellen verzeichnet (Steigerung um 40 %), die gegenüber der Behandlung mit SSR (Steigerung um 8 %) eine deutlich größere Anzahl an CD45⁺ Zellen aufweisen. Um einen Zusammenhang zwischen dem Immunzellstatus und dem neusynthetisierten Melanin nach repetitiver Bestrahlung herstellen zu können, wird der quantifizierte Melaningehalt

der Anzahl an CD45⁺ Zellen gegenübergestellt (Abbildung 5.9). SSR behandelte Areale weisen den höchsten Melaniningehalt, jedoch eine deutlich geringere Anzahl CD45⁺ Zellen gegenüber UVA oder UVB, auf. Der höhere Melaniningehalt könnte einen größeren photoprotektiven Effekt als in UVA und UVB behandelten Arealen ausüben. Dadurch lässt sich die geringere Entzündungsreaktion, in Form von infiltrierten CD45⁺ Zellen, erklären.

Für die genauere Charakterisierung des Immunzellinfiltrates wurden immunhistochemische Färbungen gegen CD14⁺ durchgeführt. In den repetitiv bestrahlten Arealen wird eine Zunahme von CD14⁺ Zellen zwischen 42 und 48 %, im Vergleich zum unbestrahlten Areal, ermittelt (Abbildung 5.12). Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Bestrahlungsarten wird nicht beobachtet.

Das durch CD45⁺ Zellen charakterisierte, UV-induzierte dermale Infiltrat besteht etwa zu 58 % - 69 % aus CD14⁺ Zellen (Monozyten, Granulozyten und Makrophagen). Der verbleibende Anteil von 31 – 42 % kann T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen zugeschrieben werden.

6.2 Charakterisierung des dermalen entzündlichen Infiltrats in der PIH

Eine Beiersdorf interne Untersuchung zeigt in hyperpigmentierten Arealen ein dermales Infiltrat. In Gefrierdünnschnitten der PIH-Studie (vgl. 4.1.1) wird eine erhöhte Gesamt- und Immunzellzahl, durch immunhistochemische Färbung gegen CD45 und CD14, ermittelt. Darauf basierend werden Zusammenhänge zwischen der Hyperpigmentierung und der Entzündungsreaktion diskutiert. Eine nähere Charakterisierung des dermalen Infiltrats dient der Aufklärung der postinflammatorischen Hyperpigmentierung und ist Ziel der kosmetischen Forschungsarbeit.

In den internen Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) wird 2 Wochen nach SB-Entnahme ein Anstieg von CD45⁺ und CD14⁺ Zellen um jeweils das 3-fache detektiert. Danach nimmt die Immunzellzahl ab und erreicht 16 Wochen nach SB-Entnahme mit einer Erhöhung von 25 - 30 % immer noch kein Kontrollniveau.

In Veröffentlichungen wird von einem Anstieg der Mastzellpopulation in inflammatorischer Haut und einer tragenden Rolle von Mastzellen in der Wundheilung berichtet (Harvima und Nilsson, 2011; Koh und DiPietro, 2013; Hernandez-Berrera *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurden immunhistochemische Färbungen gegen Mastzelltryptase, an Gefrierdünnschnitten der PIH-Studie (n=16; 8 Wochen mit n=8), durchgeführt, um das dermale Infiltrat genauer zu beschreiben. Da Tryptase als ein spezifischer Marker für Mastzellen gilt, können Mastzelltryptase positive Zellen eindeutig als Mastzellen identifiziert werden. In den SB-Arealen wird nach 4, 8 und 16 Wochen eine Erhöhung der Mastzellzahl detektiert. Vier Wochen nach SB-Entnahme erreicht die Mastzellpopulation sein Maximum mit der 1,8-fachen Mastzellanzahl (total 438 ± 78 % Zellen pro mm^2 ; $p=0,01$) im Vergleich zum Kontrollareal. Danach nimmt die Anzahl an Mastzellen ab, liegt aber noch 16 Wochen nach SB-Entnahme mit 6 % erhöht vor. Die Gesamtzellzahl ist zu diesem Zeitpunkt noch um 25 % erhöht.

Vergleichbare Beobachtungen werden in Melasma, einer Hyperpigmentierung der Haut nach Hauterkrankungen, gemacht. Hernandez-Berrera *et al.* (2008) und Na *et al.* (2012) ermitteln eine signifikant erhöhte Mastzellpopulation (total 173 ± 57 % und 312 ± 38 % Zellen pro mm^2) in der Dermis von Melasma. Das bestätigt die Annahme des engen Zusammenhangs zwischen der Hyperpigmentierung und einer begleitenden lokalen Entzündungsreaktion.

Eine im Laufe dieser Arbeit durchgeführte Co-Färbung mittels Immunfluoreszenz bestätigt, die bisher quantitativ erlangten Erkenntnisse von dem dermalen Infiltrat in PIH-Arealen auf qualitative Weise. Zusätzlich ermöglicht diese Färbung einen Überblick zu gewinnen, wie bisher untersuchte Immunzellen in der Dermis verteilt sind. Anhand der Anordnung von Immunzellen zueinander und der Lokalisation im Gewebe können Rückschlüsse auf Funktionen und Interaktionen gezogen werden.

CD45⁺ Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen, Granulozyten) treten in PIH-Arealen oft geballt in den oberen 300 μm der Dermis auf. Dabei befinden sich Monozyten nicht im Zentrum der Anhäufung, sondern werden in

nächster Nähe dieses Zellballens detektiert. Makrophagen und Mastzellen sind in der Dermis homogen verteilt und schließen sich seltener zu Zellverbänden von 3 bis 4 Zellen zusammen. In chronischen Hautentzündungen wie Psoriasis, Basalzellkarzinom und chronischen Geschwüren sind Mastzellen auch erhöht vertreten und dort typischer Weise in der Nähe der Epidermis lokalisiert (Harvima *et al.*, 1989). Bilder dieser Arbeit zeigen keine deutliche Lokalisation von Mastzellen in direkter Epidermisnähe. Bei den Zellen, die nah an der Epidermis (z.B. zwischen den Räteleisten) lokalisiert sind, handelt es sich vermehrt um CD45⁺ Zellen.

Die Erkenntnisse in dieser Arbeit bezüglich der PIH-Studie weisen auf einen Zusammenhang zwischen der durch SB-induzierten PIH und der Änderung im Immunzellstatus hin. Entzündungszellen, wie CD45⁺, CD14⁺ und Mastzellen infiltrieren die Dermis von SB-induzierten Wunden. Nach der äußeren Wundheilung besteht eine Hyperpigmentierung im verwundeten Bereich. Auf Grund der beschriebenen Beobachtungen liegt der Rückschluss nahe, dass ein Netzwerk von zellulären Interaktionen, zwischen den an der Pigmentierung beteiligten Zellen (Melanozyten und Keratinozyten) und den infiltrierenden Immunzellen, eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer PIH spielt.

6.3 Derales Infiltrat in PIH und UV-induzierter Pigmentierung im Vergleich

In diesem Kapitel wird ein Vergleich zwischen unterschiedlich induzierter Pigmentierung auf Ebene des ausgebildeten dermalen Infiltrats gezogen.

Beide untersuchte Arten der Pigmentierung (UV-induziert und PIH) weisen einige Wochen nach Induktion der Pigmentierung, durch repetitive UV-Strahlung und SB-Entnahme (PIH), eine erhöhte Gesamtzellzahl und eine Zunahme der Immunzellpopulation (CD45⁺ und CD14⁺ Zellen) in der Dermis auf (vgl. 6.1.3 und 6.2.). Zwei Wochen nach SB-Entnahme ist die Gesamtzellzahl in der PIH um 40 % gestiegen und erreicht ihr Maximum nach vier Wochen mit 62 % Zellzahlzunahme. Im Vergleich zur PIH ist die Gesamtzellzahl durch repetitive UV-Exposition nach drei Wochen nur moderat um bis zu 15 % erhöht. Die Markierung von Immunzellen

(CD45⁺ und CD14⁺) ermittelt eine Verdreifachung an CD45⁺ und CD14⁺ Zellen in der PIH, während identisch markierte Zellen in UV-bestrahlten Arealen auf das 1,5-fache, im Vergleich zur Kontrolle, ansteigen.

Folglich weisen PIH-Areale eine stärkere Entzündungsreaktion auf als repetitiv UV-bestrahlte Areale. Dieses Resultat ist naheliegend, da bei der PIH-Studie die Epidermis mittels SB-Methode entfernt wird und somit einen stärkeren Reiz induziert, als eine repetitive UV-Bestrahlung mit moderaten Dosen. Nähere Zusammenhänge der unterschiedlich induzierten Pigmentierungen lassen sich aus diesem Vergleich nicht schließen. Es kann aber zusammengefasst werden, dass beide Arten der Pigmentierung mit einer lokalen, nicht unerheblichen Entzündung einhergehen. Weitere Charakterisierungen der Immunzellen und Untersuchungen von Entzündungsfaktoren können zum besseren Verständnis des Mechanismus führen.

6.4 Untersuchungen zur Modulation der Pigmentierung *in vitro*

Beobachtungen zeigen, dass Änderungen in der Pigmentierung der Haut vielfach durch Entzündungsreaktionen begleitet werden. Einige Entzündungsfaktoren werden in diesem Zusammenhang als Melanogene, Melanogenese stimulierende Faktoren, beschrieben. Der physiologische Mechanismus, der zur Ausbildung einer postinflammatorischen Hyperpigmentierung führt ist aber noch weitestgehend ungeklärt (Yoshida *et al.*, 2000). Als einer dieser Melanogenese-stimulierenden Faktoren wird Histamin beschrieben (Tomita *et al.*, 1993). Histamin wird in menschlicher Haut in erster Linie von Mastzellen, aber auch von Keratinozyten, produziert und freigesetzt. Die Freisetzung führt zu einer Entwicklung einer Entzündungsreaktion. Aus diesem Grund wird spekuliert, dass Histamin an den Prozessen, die eine postinflammatorische Hyperpigmentierung bedingen beteiligt ist (Yoshida *et al.*, 2000; Lassalle *et al.*, 2003). Zusätzlich ist, wie in 6.2 bereits erwähnt, eine Hyperpigmentierung oft die Folge einer Entzündungsreaktion mit proliferierenden und infiltrierenden Mastzellen in der betreffenden Hautpartie.

In dieser Arbeit wird der Melanogenese-stimulierende Effekt von Histamin und HMC1-konditioniertem Medium auf kultivierte menschliche Melanozyten untersucht (n=3). Die Inkubation von Melanozyten mit 10 μ M Histamin induziert eine Melaninzunahme von 4 % in den Melanozyten und hat eine signifikante Reduktion von Melanin im Kulturüberstand, von 17 %, zur Folge (siehe Abbildung 5.23). Das lässt vermuten, dass Histamin inhibierend auf die Freisetzung von Melanin wirkt. Ob die reduzierte Menge an freigesetztem Melanin der zunehmenden Menge in den Zellen (Melanozyten) entspricht, wäre zu überprüfen. Lassalle *et al.* (2003) berichten von einer Melaninzunahme in den Zellen von 60 % nach Behandlung mit 10 μ M Histamin. In den Untersuchung dieser Arbeitsgruppe wird der Melanin Gehalt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermittelt und könnte ein Grund für die große Diskrepanz der Ergebnisse sein. In einer Veröffentlichung von Yoshida *et al.* (2000) wird der gleiche Sachverhalt untersucht. Dort wird nach der Inkubation mit 5 μ M Histamin eine Melaninzunahme von 23 % detektiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren lediglich auf einem Versuchansatz mit 3 Melanozytenspendern. Um die Abweichungen der ermittelten Ergebnisse zu bisher veröffentlichten Resultaten besser einordnen zu können, bedarf es der Wiederholung der Untersuchung mit einem größeren Spenderumfang.

Für die Untersuchung des melanogenen Effekts von HMC1-konditioniertem Medium auf Melanozyten, wird vor der Inkubation der Melanozyten mit dem Kulturüberstand der Mastzelllinie HMC1, diese mittels SP (Substanz P) oder NGF (Nerve Growth Faktor) stimuliert. SP und NGF besitzen die Fähigkeit Mastzellen zu stimulieren, das heißt durch Inkubation von Mastzellen mit SP oder NGF wird die Freisetzung von Mastzellmediatoren, wie z.B. Histamin, induziert (Molderings, 2010). Mittels Histaminbestimmung wird der Stimulationserfolg bewertet. In der Untersuchung dieser Arbeit wird weder nach Inkubation mit SP noch nach Inkubation mit NGF eine Histaminzunahme ermittelt. Somit erfolgt keine zusätzliche Freisetzung von Mastzellmediatoren, zumindest nicht von Histamin. Nicht aktive, zu

alte HMC1-Zellen könnten ein Grund dafür sein. Das konditionierte Mastzellmedium wird dennoch für die Behandlung von Melanozyten verwendet, da sich neben Histamin eine Vielzahl anderer Mediatoren in dem Kulturüberstand befinden kann.

Die Behandlung mit HMC1-konditioniertem Medium induziert eine Melaninzunahme von 6 % (SP-stimuliert) bis 10 % (NGF-stimuliert) in den Zellen und reduziert den Melaningehalt im Kulturüberstand um 1 % (SP-stimuliert) bis 5 % (NGF-stimuliert) (siehe Abbildung 5.21). Ein Einfluss von SP auf die Melaninbildung kann nicht ausgeschlossen werden, da die Behandlung mit SP allein einen Anstieg von 10 % im Melaningehalt (in den Zellen) induziert. Das Versuchsmodell ist für die Untersuchung der Wirkung von konditionierten Medien auf Melanozyten geeignet, jedoch muss die Vitalität und Agilität der verwendeten HMC1-Zelllinie abgeklärt werden.

7 Zusammenfassung

Die postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) ist eine erworbene Dispigmentierung, die für die Betroffenen, speziell bei exponierten hyperpigmentierten Hautpartien, einen psychischen Stressfaktor darstellen kann. Um mögliche Ansatzpunkte zur Modulation dieser Dispigmentierung identifizieren zu können, ist die Aufklärung grundlegender Mechanismen in der PIH Ziel der kosmetischen Forschungsarbeit.

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der ausgebildeten Hyperpigmentierung und einer begleitenden lokalen Entzündungsreaktion. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit der Gesamt- und Immunzellstatus in der PIH näher charakterisiert und quantifiziert. Zudem wird ein Vergleich zu UV-induzierter Pigmentierung auf Ebene des dermalen entzündlichen Infiltrats gezogen. Dafür erfolgt zusätzlich eine Charakterisierung der UV-induzierten Pigmentierung durch verschiedene Bestrahlungsarten mittels Quantifizierung des Melaningehalts und Untersuchungen zum induzierten Photoschutz.

Nach repetitiver Bestrahlung wird durch alle Bestrahlungsarten (SSR, UVA und UVB) ein 2,5 bis 3-fach erhöhter Melaningehalt ermittelt. Durch Verwendung eines verbesserten Fontana Masson Färbeprotokolls ist erstmals eine hohe Korrelation von Melanin-Index (MelInd) mit dem Melaningehalt möglich.

Beide Arten der Pigmentierung weisen eine Infiltration der Dermis durch CD45⁺ und CD14⁺ Zellen auf, wobei bei der PIH eine stärkere Entzündungsreaktion beobachtet wird. Auch Mastzellen sind an der Ausbildung des dermalen Infiltrats beteiligt. Deshalb wird in einem *in vitro* Versuchsmodell zur Untersuchung der Wirkung von konditioniertem HMC1-Medium auf Melanozyten der Melaningehalt untersucht und eine Zunahme von Melanin nachgewiesen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Netzwerk von zellulären Interaktionen, zwischen den an der Pigmentierung beteiligten Zellen (Melanozyten und Keratinozyten) und den infiltrierenden Immunzellen, eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer Hyperpigmentierung spielt.

8 Literaturverzeichnis

- Alaluf, S., Atkins, D., Barrett, K., Blount, M., Carter, N., & Heath, A. (2002).** The impact of epidermal melanin on objective measurements of human skin colour. *Pigment Cell Res*(15), S. 119-126.
- Butnaru, C. A., & Kanitakis, J. (2002).** Structure of normal human skin. *Eur J Dermatol*(12), S. 2-4.
- Choi, W., Miyamura, Y., Wolber, R., Smuda, C., Reinhold, W., Liu, H., et al. (2010).** Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure - Molekular characterization of responses to UVA and/or UVB. *J Invest Dermatol*(130), S. 1685-1696.
- Clark, R. A. (2010).** Skin resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol*(130), S. 362-370.
- Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., & Konrad Muller, H. (2001).** Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory. *Immunol Cell Biol*(79), S. 547-568.
- Cobbold, S., Hale, G., & Waldmann, H. (1995).** Non lineage, LFA-1, and leucocyte common antigens. *Oxford University Press*, S. 788-803.
- Coelho, S. G., Miller, S. A., Zmudzka, B. Z., & Beer, J. Z. (2006).** Quantification of UV-induced erythema and pigmentation using computer assisted digital image evaluation (CADIE). *Photochem Photobiol*(82), S. 651-656.
- Costin, G. E., & Hearing, V. J. (2007).** Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*(21), S. 976-994.
- Dawson, J. B., Barker, D. J., Ellis, D. J., Grassam, E., Cotterill, J. A., Fisher, G. W., et al. (1980).** A theoretical and experimental study of light adsorption and scattering by in vivo skin. *Phys Med Biol*(25), S. 695-709.
- De Haas, M., Kerst, J. M., van der Schoot, C. E., Calafat, J., & Hack, C. E. (1994).** Granulocyte the colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood*(84), S. 3885-3894.
- Eades-Perner, A. M., Thompson, J., van der Putten, H., & Zimmermann, W. (1998).** Mice transgenic for the human CGM6 gene express its product, the granulocyte marker CD66b, exclusively in granulocytes. *Blood*(91), S. 663-672.
- Elias, P. M. (1983).** Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*(80), S. 44-49.

- Epstein, J. H. (1989).** Postinflammatory hyperpigmentation. *Clin Dermatol*(7), S. 55-65.
- Fitzpatrick, T. B., & Breathnach, A. S. (1963).** The epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr*(147), S. 481-489.
- Goyert, S. M. (2002).** CD14. *Oxford University Press*, S. 761-763.
- Goyert, S. M., Cohen, L., Gangloff, S. C., Ashmun, R., & Haeffner-Cavaillon, N. (1997).** CD14 workshop panel report. *Garland Publishing Inc.*, S. 963-965.
- Haake, A., & Holbrook, K. (1999).** The structure and development of skin. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, S. 70-114.
- Halder, R. M., & Nootheti, P. K. (2003).** Ethnic skin disorders overview. *J Am Acad Dermatol*(48), S. 143-8.
- Harvima, I. T., & Nilsson, G. (2011).** Mast Cells as Regulators of Skin Inflammation and Immunity. *Acta Derm Venereol*(91).
- Harvima, I. T., Naukkarinen, A., Harvima, R. J., & Horsmanheimo, M. (1989).** Enzyme- and immunohistochemical localization of mast cell tryptase in psoriatic skin. *Arch Dermatol Res*(281), S. 387-391.
- Hennessey, A., Oh, C., Rees, J. L., & Diffey, B. (2005).** The photoadaptive response to ultraviolet exposure in human skin using ultraviolet spectrophotometry. *Photodermol Photoimmunol Photomed*(21), S. 229-233.
- Hennessey, A., Oh, C., Diffey, B., Wakamatsu, K., Ito, S., & Rees, J. (2005).** Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation. *Pigment Cell Res*(18), S. 220-223.
- Hernandez-Berrera, R., Torres-Alvarez, B., Castanedo-Cazares, J. P., Oros-Ovalle, C., & Moncada, B. (2008).** Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol*(33), S. 305-308.
- Hogan, P. G., & Basten, A. (1988).** What are killer cells and what do they do? *Blood Rev*(2), S. 50-58.
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2003).** Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res*(16), S. 523-531.
- Jiang, D., & Schwarz, H. (2010).** Regulation of granulocyte and makrophage populations of murine marrow cells by G-CSF and CD137 Protein. *PLoS ONE*(5).

- Kang, K., Hammerberg, C., Meunier, L., & Cooper, K. D. (1994).** CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potentially produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 Protein. *J Immunol*(153), S. 5256-5264.
- Kochevar, I. (1995).** Molecular and cellular effects of UV radiation, relevant to chronic photodamage. (B. Gilchrest, Hrsg.) *Blackwell Science*, S. 51-67.
- Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2013).** Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*(13).
- Kollias, N., & Baqer, A. (1985).** Spectroscopic characteristics of human melanin in vivo. *J Invest Dermatol*(85), S. 38-42.
- Kondo, T., & Hearing, V. J. (2011).** Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol*(6), S. 97-108.
- Lassalle, M. W., Igarashi, S., Sasaki, M., Wakamatsu, K., Ito, S., & Horikoshi, T. (2003).** Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res*(16), S. 81-84.
- Liu, Y., Wakamatsu, K., Ito, S., Adhyaru, B., Cheng, C., Bowers, C. R., et al. (2005).** Comparison of structural and chemical properties of black and red human hair melanosomes. *Photochem Photobiol*(81), S. 135-144.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y., & Goodarzi, H. (2010).** Light, including ultraviolet. *J Autoimmun*(34), S. 249-257.
- Metz, M., Mageri, M., Köhl, N. F., Valeva, A., Bhakdi, S., & Maurer, M. (2008).** Mast cells determine the magnitude of bacterial toxin-induced skin inflammation. *Exp Dermatol*(18), S. 160-166.
- Miller, S. A., Coelho, S. G., Zmudzka, B. Z., & Beer, J. Z. (2006).** Reduction of UV burden to indoor tanners through new exposure schedules: a pilot study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*(22), S. 59-66.
- Molderings, G. J. (2010).** Mast cells function in physiology and pathophysiology. *Biotrend Rev*(5).
- Montagna, W., & Carlisle, K. (1991).** The architecture of black and white facial skin. *J Am Acad Dermatol*(24), S. 929-937.
- Na, J. I., Choi, S. Y., Yang, S. H., Choi, H. R., Kang, H. Y., & Park, K. C. (2012).** Effect of tranexamic acid on melasma: a clinical trial with histological evaluation. *JEADV*.

- Nordlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J., King, R. A., Oetting, W. S., & Ortonne, J. P. (2006). The pigmentary system 2 nd edition. *Blackwell Publishing*.
- Rodero, M. P., & Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*(3), S. 643-653.
- Ruiz-Maldonado, R., & Orozco-Covarrubias, M. L. (1997). Postinflammatory hypopigmentation and hyperpigmentation. *Semin Cutan Med Surg*(16), S. 36-43.
- Salmon, J. K., Armstrong, C. A., & Ansel, J. C. (1994). The skin as an immune organ. *West J Med*(160), S. 146-152.
- Schoppmeyer, M. A. (2007). *Anatomie und Physiologie: Kurslehrbuch für Pflegeberufe* (3. Ausg.). (Elsevier, Hrsg.) Urban&FischerVerlag.
- Sewell, W. A., Cooley, M. A., & Hegen, M. (1997). CD45 workshop panel report. *Garland Publishing Inc.*, S. 499-502.
- Stout, R. D., & Suttles, J. (2004). Functional plasticity of makrophages: reversible adaption to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*(76), S. 509-513.
- Tadokoro, T., Kobayashi, N., Zmudzka, B. Z., Ito, S., Wakamatsu, K., Yamaguchi, Y., *et al.* (2003). UV-induced DNA-damage and melanin content in human skin in racial/ethnic origin. *Faseb J*(17), S. 1177-1179.
- Tadokoro, T., Yamaguchi, Y., Batzer, J., Coelho, S. G., Zmudska, B. Z., Miller, S. A., *et al.* (2005). Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol*(124), S. 1326-1332.
- Tobin, D. J. (2006). Biochemistry of human skin - our brain on the outside. *Chem Soc Rev*(35), S. 52-67.
- Tomita, Y., Maeda, K., & Tagami, H. (1993). Histamine stimulates normal human melanocytes in vitro: one of the possible inducer of hyperpigmentation in urticaria pigmentosa. *J Dermatol Sci*(6), S. 146-154.
- Tomita, Y., Maeda, K., & Tagami, H. (1992). Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res*(5), S. 357-361.
- Torsteinsdottir, I., Arvidson, N. G., Hallgren, R., & Hakansson, L. (1999). Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and effect of glucocorticoids. *Scand. J. Immunol.*(50), S. 433-439.

- Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto, K., Mascagna, D., Palumbo, A., Prota, G., *et al.* (1994). The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. *Biochem Biophys Acta*(1221), S. 272-8.
- Wakamatsu, K., Kavanagh, R., Kadekaro, A. L., Terzieva, S., Sturm, R. A., Leachman, S., *et al.* (2006). Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin. *Pigment Cell Res*(19), S. 154-162.
- Weidner, N., & Austen, K. F. (1993). Heterogeneity of mast cells at multiple body sites: fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase and carboxypeptidase content. *Path Res Pract*(189), S. 156-162.
- Wolber, R., Schlenz, K., Wakamatsu, K., Smuda, C., Nakanishi, Y., Hearing, V. J., *et al.* (2008). Pigmentation effects of solar simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment Cell Melanoma Res*(21), S. 487-491.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., & Hearing, V. J. (2007). The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem*(282), S. 27557-27561.
- Yoshida, M., Takahashi, Y., & Inoue, S. (2000). Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol*(114), S. 334-342.
- Young, A. R., Potten, C. S., Chadwick, C. A., Murphy, G. M., Hawk, J. L., & Cohen, A. J. (1991). Photoprotection and 5-MOP photochemoprotection from UVR-induced damage in humans: the role of skin type. *J Invest Dermatol*(97), S. 942-948.
- Zaba, L. C., Krueger, J. G., & Lowes, M. A. (2009). Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol*(129), S. 302-308.
- Zhao, L., Xu, S., Fjaertoft, G., Pauksen, K., Hakansson, L., & Venge, P. (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo. *J Immunol Methods*(293), S. 207-214.
- Zhou, L., Somasundaram, R., Nederhof, R. F., Dijkstra, G., Faber, K. N., Peppelenbosch, M. P., *et al.* (2012). Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clin Vacc Immunol*(19), S. 1065-1074.